

С. А. ДЖОКЕБАЕВА, С. Ж. КОЛУМБАЕВА, С. Б. ОРАЗОВА

## ПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

(НИИ проблем экологии КазНУ имени аль-Фараби)

Изучены протекторные свойства биологически активных препаратов БВ-14 и БВ-22, выделенных из смешанной культуры цианобактерий *Amorphonostoc paludosum*+*Anabaenopsis issatschenkoi*. Исследуемые препараты в условиях сочетанного применения с хлоридом кадмия проявили антимутагенный эффект, статистически значимо снижая частоту индуцированных хлоридом кадмия хромосомных aberrаций в семенах ячменя. Обработка семян озимой пшеницы БВ-14 и БВ-22 повышала устойчивость проростков к низким положительным температурам и действию фитопатогенов.

Накопление в биосфере тяжелых металлов, пестицидов, загрязнение нефтью и нефтепродуктами приводит к росту заболеваемости населения, снижению численности редких и эндемичных видов растений и животных, к дестабилизации природных экосистем. Многие из перечисленных выше поллютантов являются прямыми или косвенными мутагенами, способными уве-

личить частоту неблагоприятных наследственных изменений, что приведет к резкому возрастанию генетического груза в популяциях живых организмов. Поэтому поиск эффективных протекторов мутагенного и токсического действия экологически опасных факторов представляет несомненную актуальность. Известно, что в условиях действия неблагоприятных эндо- и экзо-

генных факторов система поддержания равновесия в ДНК постепенно нарушается, проявляясь в нестабильности генома и нарастании числа ДНК-аддуктов. В связи с этим, в качестве модификаторов индуцированного мутационного процесса могут выступать различные биологически активные вещества природного происхождения (витамины, растительные флавонолы и др.), которые являются антиоксидантами и могут повысить устойчивость организма к мутагенному и токсическому действию широкого ряда загрязнителей /1, 2/. Накоплено немало данных о том, что различные экстракты многих пищевых, лекарственных и дикорастущих растений, водорослей и грибов способны снижать частоту мутаций, вызванных действием определённых мутагенов /3-5/. Известно, что в качестве перспективных источников стимуляторов роста, повышающих иммунные реакции растений, могут служить цианобактерии (сине-зеленые водоросли), которые в процессе жизнедеятельности накапливают в клетках и секрецируют в окружающую среду метаболиты, обладающие высокой биологической активностью /1/. Ранее нами были выделены вторичные метаболиты ряда смешанных культур цианобактерий и установлена их ростстимулирующая активность. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение протекторных свойств биологически активных веществ, продуцируемых дикультурой *Amorphonostoc paludosum + Anabaenopsis Issatschenkoi*.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования явились воздушно-сухие семена ячменя (*Hordeum vulgare L.*), широко используемые в цитогенетических исследованиях. Цитогенетическую систему ячменя можно рассматривать как приемлемую для мониторинга генетических повреждений, вызываемых мутагенами, особенно на хромосомном уровне. В качестве испытуемых химических соединений были использованы водные растворы биологически активных препаратов (БАП) БВ-14 и БВ-22, полученных из смешанной культуры цианобактерий *Amorphonostoc paludosum + Anabaenopsis Issatschenkoi*, в концентрации  $1 \times 10^{-4}$  мг/мл. По результатам предварительных биотестов БАП в данной концентрации оказали наибольшее ростстимулирующее влияние на ра-

стяжение колеоптилей пшеницы по методу Бояркина /6/. В качестве мутагена был использован водный раствор сульфата кадмия в концентрации  $1 \times 10^{-4}$  М /7/. Перед проращиванием семена ячменя замачивали в испытуемых соединениях на 6 часов. За 3-4 часа до первой фиксации семена переносили на 0,01% раствор колхицина для накопления метафазных пластинок /8/. После проведения холодного гидролиза разбавленной HCl (1:1) корешки окрашивали водным раствором фуксинсернистой кислоты. Анализ цитологических препаратов проводили на микроскопе МБИ-6 с использованием теста по учету хромосомных аберраций. Структурные нарушения хромосом анализировали с помощью метафазного метода /9/. Для изучения влияния полученных препаратов на устойчивость к низким положительным температурам семена озимой пшеницы после замачивания в десятикратных разведениях БАП (от  $10^{-1}$  до  $10^{-9}$  мг/мл) выдерживали от 5 до 7 суток последовательно при температурах  $+10^{\circ}\text{C}$ ,  $+7^{\circ}\text{C}$ ,  $+2^{\circ}\text{C}$ . После короткого периода адаптации проростков в условиях комнатной температуры проводили визуальную оценку выживаемости по морфологическим характеристикам /10/. Семенной материал озимой пшеницы, обработанный по вышеописанной методике, выращивали в пробирках на агаризованной среде Кнопа. Полученные стерильные проростки инфицировали уредоспорами ржавчины. Для определения влияния БАП на рост фузариума проводили посев культуры фитопатогена на агаризованную среду Чапека, с последующим вырезанием дисков, в которые вносили препараты. Оценку влияния БАП проводили по наличию зоны ингибирования роста фузариума. Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента /11/.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения мутагенного и анти-мутагенного действия биологически активных веществ, выделенных из культуральной жидкости дикультур цианобактерий *Amorphonostoc paludosum + Anabaenopsis Issatschenkoi*, на семена ячменя при раздельных и комбинированных обработках представлены в таблице. Спонтанный уровень мутирования в клетках корневой зародышевой меристемы семян ячменя соста-

Таблица. Частота хромосомных аберраций, индуцированных в семенах ячменя при раздельных и комбинированных обработках биологически активными препаратами и хлоридом кадмия

Варианты обработки	Всего просмотренных метафаз	Метафазы с хромосомными аберрациями		Всего аберраций	Количество аберраций на 100 метафаз
		Число	(M ± m)%		
Контроль	612	5	0.82±0.28	5	0.82±0.28
CdCl <sub>2</sub>	583	20	3.43±0.45°	27	4.63±0.48°
БВ-14	589	5	0.85±0.31	5	0.85±0.31
БВ-22	548	4	0.73±0.29	4	0.73±0.29
БВ-14+CdCl <sub>2</sub>	706	9	1.27±0.35*	12	1.70±0.32*
БВ-22+CdCl <sub>2</sub>	683	8	1.17±0.33*	10	1.46±0.29*
CdCl <sub>2</sub> + БВ-14	631	11	1.74±0.34*	13	2.06±0.35*
CdCl <sub>2</sub> + БВ-22	694	11	1.59±0.31*	12	1.73±0.33*

Примечание: ° - p<0.001 в сравнении с контрольными значениями  
\* - p<0.001 в сравнении с CdCl<sub>2</sub>

вил 0.82±0.28%. Обработка семян ячменя биологически активными препаратами БВ-14 и БВ-22 из смешанной культуры цианобактерий *Amorphonostoc paludosum* + *Anabaenopsis issatschenkoi* индуцировала хромосомные аберрации с частотой, равной 0.85±0.31%, что несколько выше в сравнении с контрольным уровнем, однако, эта разница статистически не достоверна.

В результате обработки семян ячменя водным раствором CdCl<sub>2</sub> частота метафаз со структурными нарушениями хромосом достоверно увеличилась по сравнению с контрольным вариантом и составила 3.43±0.45% (p<0.001). Необходимо отметить, что из 20 aberrантных клеток 7 имели по две перестройки, поэтому количество нарушений на 100 метафаз оказалось равным 4.63±0.48%. Полученные результаты свидетельствуют о наличии мутагенной активности хлорида кадмия в использованной концентрации.

При совместном воздействии хлорида кадмия и БАП на семена ячменя наблюдалось снижение общей частоты структурных нарушений хромосом, индуцированных одним хлоридом кадмия. При этом частота хромосомных нарушений зависела от последовательности комбинированной обработки. Так, в вариантах опыта, где до обработки хлоридом кадмия семена ячменя обрабатывали биологически активными препаратами БВ-14 и БВ-22, общая частота метафаз с хромосомными аберрациями составила 1.27±0.35% и 1.17±0.33%. Число хромосомных повреждений на 100 просмотренных метафаз –

1.70±0.32% и 1.46±0.29%, соответственно, что более чем в 2,5 раза ниже, чем в варианте обработки одним хлоридом кадмия. При комбинированном воздействии изучаемых соединений, когда биологически активный препарат применяли уже после обработки семян ячменя хлоридом кадмия, частота aberrантных клеток составила 1.74±0.34% и 1.59±0.31%, а количество структурных перестроек хромосом на 100 просмотренных метафаз – 2.06±0.35 и 1.73±0.33, что статистически значимо ниже, чем в варианте с одним CdCl<sub>2</sub>.

Помимо общей частоты нами изучался и качественный состав хромосомных аберраций (рисунок 1). Так, спектр аберраций хромосом при спонтанном уровне мутирования в клетках корневой зародышевой меристемы семян ячменя был представлен преимущественно перестройками хроматидного типа. Однако были отмечены и аберрации хромосомного типа, а также точечные фрагменты. Спектр аберраций хромосом, индуцированных хлоридом кадмия, был также представлен структурными перестройками обоих типов с превалированием перестроек хроматидного типа. Хроматидные перестройки были представлены одиночными концевыми делециями и одиночными ацентрическими кольцами. Нами были отмечены такие нарушения хромосомного типа, как изолокусные разрывы, парные точечные фрагменты, центрические кольца. Также с высокой частотой встречались и микрофрагменты. Анализ спектра структурных хромосомных нарушений, обусловленных воз-



Рис. 1. Структурные нарушения хромосом в клетках корневой зародышевой меристемы ячменя, индуцированных хлоридом кадмия

действием хлорида кадмия в использованной концентрации, показал, что увеличение выхода аберрантных клеток по сравнению с контролем происходило, главным образом, за счет нарушений хроматидного типа и микрофрагментов.

Достоверное снижение выхода структурных перестроек хромосом в результате совместной обработки семян ячменя биологически активными препаратами и хлоридом кадмия происходило за счет всех типов нарушений (рисунок 2). Так, если в контроле число нарушений хромосомного и хроматидного типов было одинаковым и составило 0.17, а микрофрагментов – 0.34 на 100 метафаз, то при воздействии БВ-14, соответственно, 0.20, 0.39 и 0.39. В результате обработки семян ячменя хлоридом кадмия произошло достоверное увеличение всех отмеченных выше типов хромосомных аберраций. Число перестроек хромосомного типа на 100 мета-

фаз уже составило 0.57, хроматидного типа – 2.29, микрофрагментов – 1.53. В результате комбинированного воздействия БВ-14 и хлоридом кадмия более чем в 3 раза снизилось число нарушений хромосомного типа, хроматидного типа – в 2,5 раза и микрофрагментов – в 1,6 раза. Аналогичная закономерность характерна и для БВ-22.

Таким образом, результаты проведенных цитогенетических исследований свидетельствуют об отсутствии мутагенной активности у изучаемых БАП в используемой концентрации. При комбинированном воздействии БАП с хлоридом кадмия наблюдалось существенное модифицирование цитогенетического эффекта, вызванного хлоридом кадмия. Дополнительное воздействие БАП приводило к достоверному снижению как частоты аберрантных клеток, так и числа хромосомных аберраций на 100 проанализированных метафаз, индуцированных кадмием. При этом уровень цитогенетического эффекта зависел от последовательности обработки семян испытуемыми соединениями.

Нами также было изучено влияние БАП на повышение устойчивости растений к неблагоприятным факторам: низким положительным температурам и действию фитопатогенов (ржавчина, фузариоз). Результаты проведенных опытов показали, что воздействие препарата БВ-14 в концентрациях от  $10^{-3}$  до  $10^{-7}$  г/л приводило к повышению у проростков холодаустойчивости. Растения в опытных вариантах были более жизнеспособные и высокорослые, в то время как в кон-

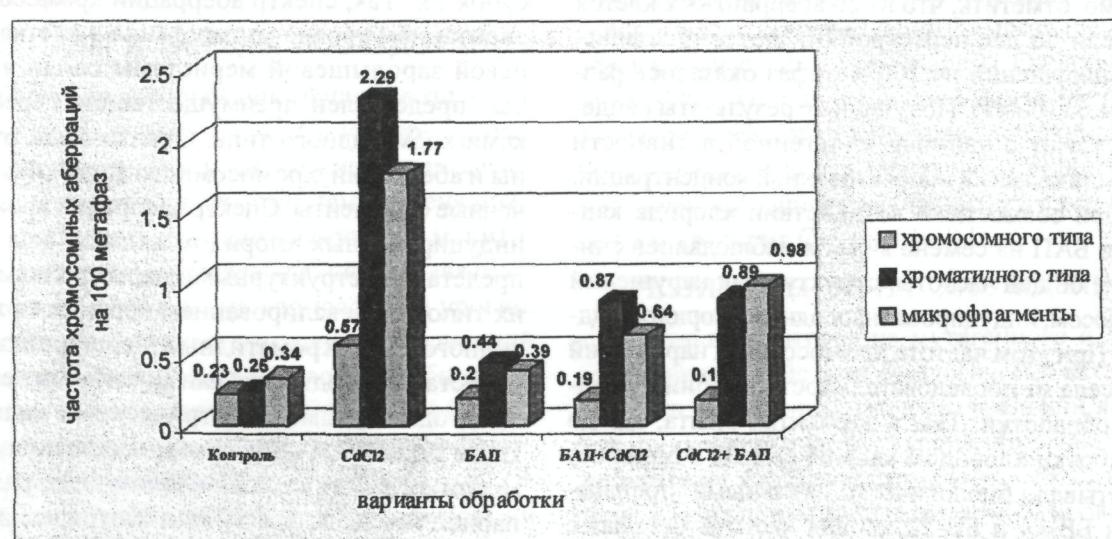
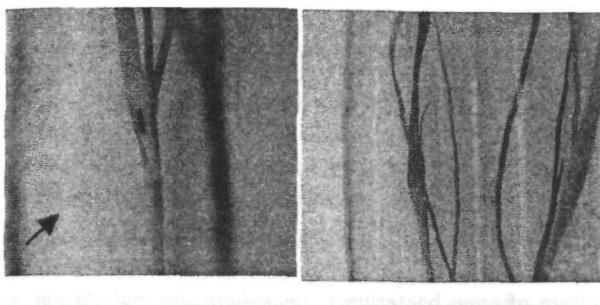


Рис. 2. Спектр структурных нарушений хромосом, индуцированных в семенах ячменя при раздельных и комбинированных обработках БВ-14 и хлоридом кадмия



не обработанные БАП

обработанные БАП

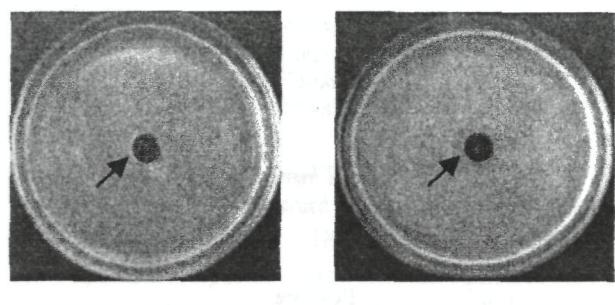
Рис.3. Инфицирование уредоспорами ржавчины проростков пшеницы, обработанных и не обработанных БАП (БВ-22)

трольном варианте наблюдалось угнетение роста и повреждение стеблей в результате воздействия низких положительных температур.

Для изучения влияния БАП на устойчивость растений к фитопатогенам стерильные проростки пшеницы, выращенные на среде Кнопа, были заражены уредоспорами *Russinia sp.* Наилучшие результаты были получены при обработке препаратами БВ-14 и БВ-22 в концентрации  $10^{-3}$  мг/мл (рисунок 3). Как видно из представленного рисунка, инфицирование спорами ржавчины не обработанных препаратами растений привело к образованию пораженных участков листьев уже на ранних этапах развития (на 6-й день после заражения). В то же время предобработка семян препаратами БВ-14 и БВ-22 перед посадкой и последующее инфицирование проросших растений не приводила к появлению на листьях пятен ржавчины. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данные препараты повышают резистентность растений к данному фитопатогену.

Как показано на рисунке 4, в опытном варианте отмеченные выше препараты, внесенные в углубления в агаре в концентрации  $10^{-6}$  г/л, образовывали зону ингибирования, в которой рост фузариума отсутствовал. Это свидетельствует об ингибировании роста культуры фитопатогена под влиянием БАП. По-видимому, в данном случае происходит лизис клеток гриба, как это было ранее показано /12/.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что биологически активные препараты БВ-14 и БВ-22, полученные из смешанной культуры цианобактерий *Amorphonostoc paludosum + Anabaenopsis issatschenkoi*, обладают протекторной активно-



контроль

опыт

Рис.4. Определение влияния БАП (БВ-22) на рост гриба фузариума методом диффузии в агаре

стью по отношению к ряду экологически неблагоприятных факторов окружающей среды. Установлено, что препараты, не оказывая мутагенного действия, статистически значимо снижали генотоксический эффект, индуцированный хлоридом кадмия в семенах ячменя. Кроме того, изучаемые биологически активные препараты, способствовали повышению холодостойкости и устойчивости пшеницы к заражению ржавчиной, а также подавляли рост фузариума в культуре.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Засухина Г.Д., Синельщикова Т.А. Мутагенез, анти-мутагенез, reparация ДНК // Вестник РАМН. 1993. № 1. – С.9-14.
2. Goncharova R.I. Антимутагенез как генетический процесс. Вестник РАМН. 1993. № 1. – С.26-32.
3. Goncharova R., Kuzhir N., Dalivelya O., Savina N., Slukvin A., Duburus G. Some 1,4- dihidropyridine derivatives against environmental mutagenic factors // Mutation Research. 2001. Vol. 483, Suppl. 1. - P.112.
4. Hurna E., Hurna S. The effects of ascorbic acid on cadmium cytotoxicity and genotoxicity // J.Trace and Microprobe Techn. 2000. № 4. – P. 563-569.
5. Midorikawa Kaoru, Murata Mariko et all. // Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention // Biochem and Biophys.Res.Commun. 2001. 288, N3. – P. 551-557.
6. Бояркин А.Н. Метод количественного определения активности ростовых веществ / В кн. Методы определения регуляторов роста и гербицидов. - М.: Наука, 1966. - 172 с.
7. Колумбаева С.Ж. Модифицирующее влияние рост-активирующих веществ на мутагенный эффект нитрозогуанидина и солей тяжелых металлов // Цитология и генетика. 1984. Т.18, №1. - С. 36-40.
8. Паушева З.М. Практикум по цитогенетике растений. - М., 1989. - 293 с.
9. Немцева Л.С. Метафазный метод учета перестроек хромосом. - М.: Наука, 1970. - 126 с.
10. Третьяков Н.Н. Практикум по физиологии растений – М.: Агропромиздат, 1990. - 271 с.

11. Рокицкий Н.А. Введение в статистическую генетику. – Минск: Вышайшая школа, 1978. - 448 с.

12. Лосева А. С., Петров-Спиридонов А. Е. Устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды. – М., 1988. – 187 с.

Представленная работа выполнена в рамках проекта Национального центра биотехнологии РК, № ГР 0106РК00567 (2006-2008 гг.).

### Резюме

*Amorphonostoc paludosum + Anabaenopsis Issatschenkoi* цианобактериялардың аралас өсіруінен алынған БВ-14 және БВ-22 биологиялық белсенді заттардың протекторлық қасиеттері анықталды. Аталған препараттары кадмий хлоридімен бірге қолданған жағдайда арпа дәндегі қоздырылған хромосомалық aberrациялардың

жиілігін статистикалық маңызды деңгейде төмендетіп antimutagenдік өсерлерін көрсетті. Күздік бидайдың дәндерін БВ-14-пен және БВ-22-мен өндеуі өскіндердің төменгі он температураларға және фитопатогендерге карсы төзімділігін арттырады.

### Summary

It is investigated tread properties of biologically active preparations BS-14 and BS-22, which isolated from the mixed culture of cyan bacterium *Amorphonostoc paludosum* + *Anabaenopsis Issatschenkoi*. Preparations have shown antimutagen effect when using with chloride of cadmium. They are statistically reducing frequency of chromosomal aberrations in barley seeds. Priming of winter wheat seeds raised sprouts proof against to low positive temperatures and phytopathogen by BS-14 and BS-22.