

Е.Н. Громозова, Т.Л. Качур, С.И. Войчук, М.С. Харчук

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, 03143, Киев, Украина*

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИИ МЕТАХРОМАЗИИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

*Проведен мониторинг метахроматической окраски волютиновых гранул ряда штаммов дрожжей *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* УКМ Y-517, *S. cerevisiae* CRY, *S. cerevisiae* CNX, *S. bayanus* УКМ Y-493, *S. unisporus* УКМ Y-2065, *S. rosinii* УКМ Y-2614, *S. exiguus* УКМ Y-649) в условиях различной космической погоды. Установлено, что наиболее чувствительным штаммом является *S. cerevisiae* УКМ Y-517, который метахромазировал в 96,7% случаев. Изменение в фосфорном метаболизме на примере мутантного штамма *S. cerevisiae* CNX, дефектного по экзополифосфатазам PPX1 и PPN1 (КФ 3.6.1.11), не влияет на проявление реакции метахромазии. Сравнительный анализ окрашивания дрожжевых клеток, выращенных на разных питательных средах, показал, что лучшие метахромазируют клетки дрожжей, культивируемые на сусло-агаре. Однако внесение дополнительного количества фосфора в агаризованную среду YEPD улучшало визуализацию реакции метахромазии. Исследование клеток на разных стадиях развития показало, что возраст культуры не влияет на метахроматическое окрашивание. Штамм *S. cerevisiae* УКМ Y-517 рекомендуется для проведения мониторинговых исследований в проекте «Гелиомед» как высокочувствительный штамм для исследований влияния космической погоды на микроорганизмы. Данная работа является продолжением исследования био-астрономического эффекта Чижевского-Вельхова.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: дрожжи, метахромазия, волютиновые гранулы, космическая погода.

Метахроматическая окраска волютиновых гранул характерна как для прокариотических, так и эукариотических микроорганизмов. В основе этой реакции лежит агрегация молекул красителя (толуидинового синего или метиленовой сини) при взаимодействии с неорганическими полифосфатами, основными компонентами волютиновых гранул [9]. Следует отметить, что до сих пор остаётся открытым вопрос о причине вызывающей появление метахромазии. Изменение окраски отличной от цвета красителя можно наблюдать периодически в стандартных условиях культивирования микроорганизмов. То, что это явление может быть обусловлено воздействием факторов космической погоды, впервые было показано С.Т. Вельхвером и А.Л. Чижевским и зафиксировано в био-астрономическом эффекте Чижевского-Вельхова [2]. О важности исследований, связанных с проявлением реакции метахромазии, можно судить из Программы, предложенной А.Л. Чижевским, для Международного года спокойного солнца. Первым пунктом этого документа значится: "Во всех университетских городах мира установить наблюдения за эффектом Чижевского-Вельхова ...» при обязательном контакте микробиологов и астрофизиков [5]. К сожалению, при его жизни этот проект не был реализован. Только в наши дни такой эксперимент является одной

из составных частей международного проекта «Гелиомед» – разноширотного телекоммуникационного мониторинга солнечно-земных связей. Проведение этого исследования в разных лабораториях требует неукоснительного соблюдения всех правил даже в такой простой реакции, как окраска клеток метиленовым синим. Предварительные эксперименты показали, что далеко не всем исследователям удавалось получить чёткое изображение окрашенных клеток и дать соответствующую оценку этому явлению. В связи с этим возникла необходимость в разработке строго стандартизированной методики проведения опытов и в первую очередь выбора объекта исследования.

Таким образом, целью работы было изучить реакцию метакромазии волютиновых гранул различных микроорганизмов в условиях изменения космической погоды с целью выявления наиболее чувствительного штамма и исследовать участие фосфорного метаболизма в этом процессе.

Материалы и методы. В экспериментах использовали дрожжевые культуры из Украинской коллекции микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины: *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517, *S. exiguus* УКМ Y-649, *S. bayanus* УКМ Y-493, *S. unisporus* УКМ Y-2065, *S. rosinii* УКМ Y-2614. Кроме того, реакцию метакромазии проводили, используя штаммы *S. cerevisiae* CRY и CNX из коллекции А. Корнберга (США), любезно предоставленные лабораторией И.С. Кулаева Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН. Штамм *S. cerevisiae* CRY – родительский по отношению к штамму *S. cerevisiae* CNX с инактивированными генами *ppx1* и *ppn1*, кодирующими экзополифосфатазы PPX1 и PPN1 (КФ 3.6.1.11).

Культуры выращивали на плотной питательной среде сусло-агар и агаризованной среде YEPD в течение 24 ч при температуре 28°C в суховоздушном термостате. Дополнительно в среду YEPD вносили калий фосфорнокислый одно-замещённый 0,25г/л и 0,50г/л (175 мг/л и 350 мг/л фосфата, P₁). В фиксированное время проводили реакцию метакромазии, окрашивая клетки метиленовым синим по Лёфлеру [4]. Одновременно пересеивали дрожжи на свежую питательную среду. Для стандартизации, исследовательские процедуры проводили в одно и то же время каждый день (12:00). Учёт реакции МТХ проводили визуально, микрофотографируя окрашенные мазки в светлом поле (микроскоп “PrimaStar”, Zeiss). Нами была выбрана 3-х бальная система оценки: «1» – отсутствие МТХ (гранулы синие), «2» и «3» – разная степень выраженности МТХ (гранулы фиолетово-красные).

Препараты фотографировали и в электронном виде посылали на сайт проекта «ГЕЛИОМЕД» для последующей обработки изображений.

Эксперимент длился месяц с ежедневной фиксацией результатов. Данные об изменении космической погоды в этот период получены на сайте <http://www.solen.info/solar/indices>. Уровни корреляционных связей по Пирсону и статистическую достоверность определяли при помощи программы Statistica 6.0 (StatSoft., Inc. 2002).

Результаты и их обсуждение. В первую очередь, необходимо было обосновать выбор объекта – микроорганизма, чувствительного к действию космофизических факторов, быстрорастущего, неприхотливого

к условиям среды с чёткой визуализацией волютиновых гранул. Этим требованиям соответствовали дрожжевые культуры. Выбор этих микроорганизмов был обусловлен также тем, что они являются низшими эукариотами, в то время как вид *Saccharomyces cerevisiae* – известен как общепринятая экспериментальная модель для изучения поведения клеток высших организмов [6]. Другими словами, результаты, полученные на этих культурах, могут быть с определённой степенью осторожности экстраполированы на реакцию животных и человека.

Было установлено, что клетки *S. cerevisiae* УКМ Y-517 чаще всего давали метакроматическую окраску (96,7% времени наблюдения). *S. bayanus* УКМ Y-493, *S. rosinii* УКМ Y-2614 метакромазировали в 80% и 73,3% случаях соответственно. Средней чувствительностью характеризовался штамм *S. unisporus* УКМ Y-2065 (66,7%). Наименее активным из всех исследуемых штаммов был *S. exiguus* УКМ Y-649 (33,3%).

Таким образом, в результате работы было установлено, что дрожжи *S. cerevisiae* УКМ Y-517 являются наиболее чувствительными к проявлениям космической погоды и могут быть рекомендованы для проведения мониторинговых исследований в проекте «Гелиомед». Это было подтверждено результатами, проведенного ранее длительного мониторинга реакции метакромазии волютиновых гранул и изменения космо-физических факторов [1]. Следующий этап работы предполагал изучение реакции МТХ разных штаммов *S. cerevisiae*.

Для исследований были выбраны штаммы как родительские, так и мутантные, с дефектом в фосфорном обмене. Это было обусловлено необходимостью изучения связи между проявлением реакции метакромазии и ферментами, участвующими в модификации полифосфатов, основных компонентов волютиновых гранул. Как видно из представленных данных (табл.1), показатели метакромазии исследованных штаммов *S. cerevisiae* за 94 суток наблюдений достоверно коррелировали между собой на 65% ($p \leq 0,001$). Отличий в частоте проявления МТХ у мутантного штамма по сравнению с родительским выявлено не было. Как известно, у этого штамма отсутствуют экзополифосфатазы цитозоля, клеточной оболочки, митохондрий и ядра. Отмечено присутствие экзополифосфатазы только в вакуолях [7]. Поскольку исследуемые нами волютиновые гранулы расположены внутри вакуолярного пространства, то отсутствие различий метакроматической окраски при сравнении со штаммами дикого типа может свидетельствовать об участии именно вакуолярной экзополифосфатазы в модификации полифосфатной цепи. Известно, что метакроматическая реакция является тестовой на определение длины полифосфатов [8]. Однако наряду с этим окраска может меняться и при изменении агрегативного состояния полимера (золь-гель переходы) и в результате конформации цепи (при расстоянии между реакционными группами равных или менее 5 Å [3]).

В то же время только штамм *S. cerevisiae* УКМ Y-517 демонстрировал корреляцию метакроматического (МТХ) окрашивания с изменением скорости солнечного ветра и напряжённостью магнитного поля в этот период (табл.2)

Таблица 1
Корреляционная связь между показателями метахромазии разных штаммов *S. cerevisiae*

Штаммы	Y-517 (wt)*	CRY (wt)
CNX (<i>Appn1/ Appx1</i>)**	0,65 N=94 <i>p</i> =0,001	0,65 N=94 <i>p</i> =0,001
CRY(wt)	0,60 N=95 <i>p</i> =0,001	-

* wt – штамм дикого типа (wild type);

** *Appn1/ Appx1* – штамм с инактивированными генами полифосфатаз PPN1 и PPX1.

Таблица 2
Связь реакции метахромазии разных штаммов *S. cerevisiae* с гео-гелиофизическими показателями

Штамм	Поток солнечной радиации на Землю	Число солнечных пятен (STAR)	Число солнечных пятен (NOAA)	Планетарный А-индекс (STAR)	Планетарный А-индекс (NOAA)	Скорость солнечного ветра, min	Скорость солнечного ветра, max	Скорость солнечного ветра, mean	Период геомагнитного возмущения
Y-517	-0,03	0,08	0,04	0,25	0,24	0,40	0,27	0,3370	0,01
	N = 61	N = 61	N = 61	N = 61	N = 61	N = 61	N = 61	N = 61	N = 99
	<i>p</i> = 0,800	<i>p</i> = 0,552	<i>p</i> = 0,740	<i>p</i> = 0,050	<i>p</i> = 0,066	<i>p</i> = 0,002	<i>p</i> = 0,032	<i>p</i> = 0,008	<i>p</i> = 0,905
CRY	-0,16	-0,08	-0,01	-0,11	-0,11	-0,06	-0,11	-0,0912	-0,18
	N = 57	N = 57	N = 57	N = 57	N = 57	N = 57	N = 57	N = 57	N = 95
	<i>p</i> = 0,244	<i>p</i> = 0,579	<i>p</i> = 0,966	<i>p</i> = 0,425	<i>p</i> = 0,403	<i>p</i> = 0,677	<i>p</i> = 0,432	<i>p</i> = 0,500	<i>p</i> = 0,077
CNX	-0,11	0,09	0,10	0,15	0,13	0,19	0,09	0,1366	0,01
	N = 56	N = 56	N = 56	N = 56	N = 56	N = 56	N = 56	N = 56	N = 94
	<i>p</i> = 0,431	<i>p</i> = 0,502	<i>p</i> = 0,483	<i>p</i> = 0,258	<i>p</i> = 0,349	<i>p</i> = 0,164	<i>p</i> = 0,487	<i>p</i> = 0,315	<i>p</i> = 0,892

Стандартизация условий проведения эксперимента потребовала особое внимание уделить составу питательной среды, на которой выращивали дрожжи. Сравнительный анализ сусло-агара и агаризованной среды YEPD показал, что большее количество дней с изменённой окраской гранул зафиксировано в первом случае (рис. 1). Выросшие на среде YEPD дрожжи плохо прокрашивались метиленовым синим (рис. 2). Дополнительное внесение в среду YEPD культивирования соединений фосфора значительно улучшало визуализацию реакции. Учитывая, что среда YEPD на сегодняшний день общепринята и строго стандартизована в отличие от сусло-агара (состав сусла может варьировать), можно рекомендовать её для культивирования дрожжей с дополнительным внесением определённого количества фосфора.

В процессе культивирования клеток возник вопрос, не влияет ли расположение клеток на скошенной агаризованной среде на проявление реакции метахромазии. Эксперименты, которые проводились ежедневно в

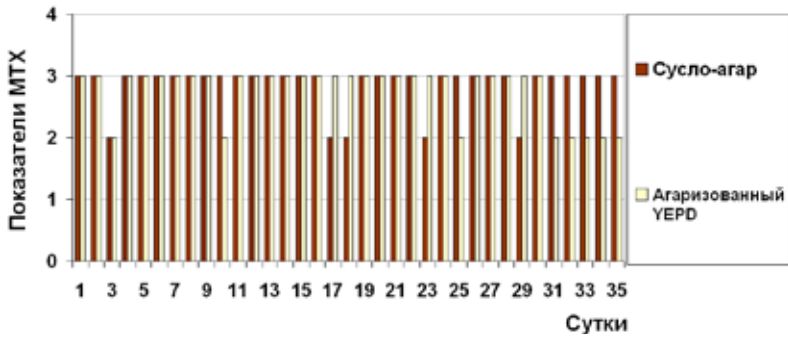


Рис.1. Диаграмма показателей метахромазии *S. cerevisiae* УКМ Y-517 при выращивании клеток на сусло-агаре и агаризованной среде YEPD

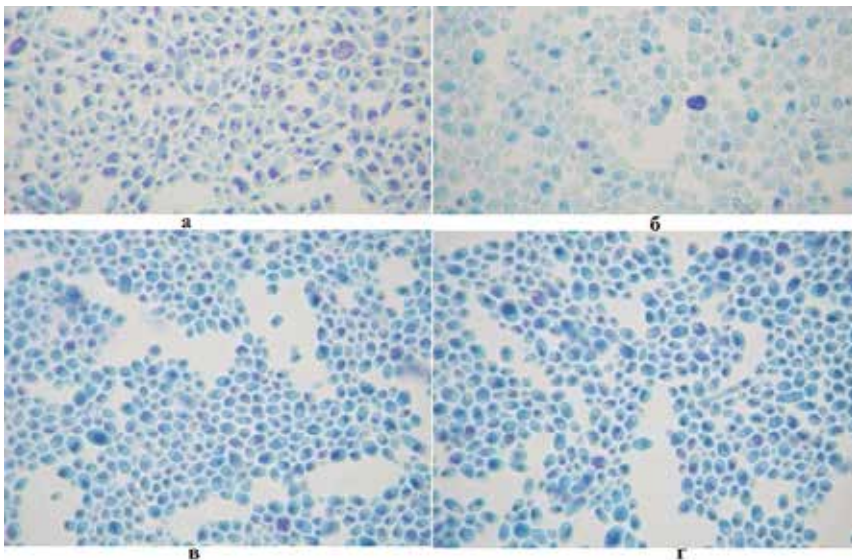


Рис.2. Окраска метиленовым синим клеток *S. cerevisiae* УКМ Y-517, выросших на сусло-агаре (а), агаризованной среде YEPD (б), среде YEPD с 175 мг/л P_i (в) и 350 мг/л P_i (г). Увеличение $\times 1000$

течение 2-х недель, подтвердили однородность культуры по всей поверхности засева.

Исследование клеток в разных стадиях развития показало, что их возраст не влияет на проявление реакции метахромазии, также как и суточное время их отбора. Для стандартизации исследований было предложено проводить определение, соблюдая строгие временные рамки: в 12:00, ежедневно. При этом 24-часовая культура более однородная и находится в ранней стационарной фазе развития.

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов был предложен штамм *S. cerevisiae* УКМ Y-517, высокочувствительный к изменению факторов космической погоды, и разработаны рекомендации по стандартизации методики проведения реакции метахромазии волютиновых гранул дрожжевых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта НАН Украины «Роль нормальных и экстремальных гелиогеофизических процессов в эволюции биосферы» (36-02-14).

О.М. Громозова, Т.Л. Качур, С.І. Войчук, М.С. Харчук

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

ДОСЛІДЖЕННЯ РЕАКЦІЇ МЕТАХРОМАЗІЇ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Резюме

Проведено моніторинг метахроматичного забарвлення волютинових гранул ряду штамів роду *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* УКМ Y-517, *S. cerevisiae* CRY, *S. cerevisiae* CNX, *S. bayanus* УКМ Y-493, *S. unisporus* УКМ Y-2065, *S. rosinii* УКМ Y-2614, *S. exiguus* УКМ Y-649) в умовах різної космічної погоди. Встановлено, що найбільш чутливим штамом є *S. cerevisiae* УКМ Y-517, який метахромазував у 96,7% випадків. Зміна у фосфорному метаболізмі на прикладі мутантного штаму *S. cerevisiae* CNX, дефектного за екзополіфосфатазами PPX1 і PPN1 (КФ 3.6.1.11), не впливає на прояв реакції метахромазії. Порівняльний аналіз зафарбовування дріжджових клітин, які вирощені на різних поживних середовищах, показав, що краще метахромазують клітини дріжджів, які культивуються на сусло-агарі. Однак, внесення додаткової кількості фосфору в агаризоване середовище YEPD покращувало візуалізацію реакції метахромазії. Дослідження клітин на різних стадіях розвитку показало, що вік культури не впливає на метахроматичне забарвлення. Штам *S. cerevisiae* УКМ Y-517 рекомендується для проведення моніторингових досліджень у проекті «Геліомед» як високочутливий штам для досліджень впливу космічної погоди на мікроорганізми. Дана робота є продовженням дослідження біо-астрономічного ефекту Чижевського-Вельховеера.

К л ю ч о в і с л о в а: дріжджі, метахромазія, волютинові гранули, космічна погода.

E.N. Gromozova, T.L. Kachur, S.I. Voychuk, M.S. Kharchuk

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine*

RESEARCH OF METACHROMATIC REACTION OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Summary

This work is a continuation of research of the Chizhevsky-Velhover's bio-astronomic effect. Monitoring of volutin granule metachromatic staining of *Saccharomyces* yeasts (*S. cerevisiae* UCM Y-517, *S. cerevisiae* CRY, *S. cerevisiae* CNX, *S. bayanus* UCM Y-493, *S. unisporus* UCM Y-2065, *S. rosinii* UCM Y-2614, *S. exiguus* UCM Y-649) under conditions of different space weather was carried out. *S. cerevisiae* UCM Y-517, which displayed the metachromatic reaction in 96.7 % cases, showed the biggest sensitivity to the space weather changes. The changes in phosphoric metabolism of *S. cerevisiae* CNX cells, which can not synthesize exopolyphosphatases PPX1 and PPN1 (CF 3.6.1.11), did not influence the metachromatic reaction. Yeast cells grown on wort-agar displayed more intensive metachromatic reaction compared to those grown on YEPD-agar. However, increasing concentration of phosphorus in YEPD-agar improved visualization of the metachromatic staining. The strain *S. cerevisiae* UCM Y-517 is recommended as a model for monitoring

of volutin granules metachromatic reaction in the research project “Heliomed” because of its high sensitivity to the space weather changes.

The paper is presented in Russian.

Key words: yeasts, metachromasy, volutin granules, space weather.

1. Громозова Е.Н., Григорьев П.Е. Качур Т.Л., Войчук С.И. Влияние космофизических факторов на реакцию метахромазии волютиновых гранул *Saccharomyces cerevisiae* // Биофизические процессы и биосфера. – 2010. – 9, № 2. – С. 67-76.
2. Краткий справочник по космической биологии и медицине. – Москва : Медицина, 1967. – 296 с.
3. Пирс Э. Гистохимия: теоретическая и прикладная. – Москва: Изд-во ин. лит., 1962. – 962 с.
4. Практикум по микробиологии: Учебное пособие / Под ред. Егоров Н.С. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – 307 с.
5. Чижевская Н.В. К вопросу о глобальной программе в области гелиобиологии // Солнце, электричество, жизнь. – Москва : Изд-во МГУ, 1972. – С. 21-23.
6. Karathia H., Vilaprinyo E., Sorribas A., Alves R. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organisms: a comparative study // PloS One. – 2011. – 6, №2. – P. 1-10.
7. Lichko L., Kulakovskaya T., Pestov N., Kulaev I. Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in cell compartments of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under inactivation of PPX1 and PPN1 genes // Biosci. Rep. – 2006. – 26. – P. 45-54.
8. Lorenz B., Schröder H.C. Methods for investigation of inorganic polyphosphates and polyphosphate-metabolizing enzymes // Inorganic Polyphosphates. Biochemistry, Biology, Biotechnology/ – Springer, 1999. – P. 217-241.
9. Serafim L.S., Lemos P.C., Levantesi C., Tandoi V., Santos H., Reis M.A.M. Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms // Journal of Microbiological Methods. – 2002. – 51. – P. 1-18.

Отримано 13.01.2016