

УДК 57.084

**КОМПЛЕКСНАЯ БАЛЛОВАЯ СИСТЕМА ОЦЕНКИ ВОЗДЕЙСТВИЯ
МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК
КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЫ ALLIUM CEPA L.**

¹Петров С.А., ²Еноктаева О.В., ¹Субботин А.М., ¹Мальчевский В.А.

*¹Тюменский научный центр СО РАН, Тюмень, e-mail: tumiki@yandex.ru,
subbotin.prion@yandex.ru, malchevski@mail.ru;*

²Институт криосферы Земли СО РАН, Тюмень, e-mail: pechkanova@mail.ru

Предложена комплексная балльная система оценки воздействия психротолерантных мезофильных микроорганизмов на пролиферацию клеток у высших организмов. В ходе эксперимента выяснено, что бактерии рода *Bacillus* способны изменять митотическую активность корневой меристематической ткани *Allium cepa L.* и индуцировать такие аномалии ядерного аппарата клетки, как фрагменты, мосты, отставания и забегания хромосом. Выявлена эффективность применения данной комплексной балловой системы оценки. Доказано, что она дает возможность определять общий вектор направленности изменений, происходящих в корневой системе *Allium cepa L.*: одновременно регистрировать изменения морфометрических показателей на организменном уровне и изменения на клеточном уровне в меристематической ткани. Применение комплексной системы позволяет выявлять штаммы психротолерантных мезофильных микроорганизмов, обладающих цитотоксическими, генотоксическими или митозстимуляционными эффектами воздействия.

Ключевые слова: микроорганизмы, цитотоксичность, генотоксичность, митозстимуляция

**COMPREHENSIVE SCORING SYSTEM FOR ASSESSING THE IMPACT
OF MICROBIAL CELL PROLIFERATION ROOT MERISTEM ALLIUM CEPA L.**

¹Petrov S.A., ²Enoktaeva O.V., ¹Subbotin A.M., ¹Malchevskiy V.A.

¹Tyumen Science Center SB RAS, Tyumen,

e-mail: tumiki@yandex.ru, subbotin.prion@yandex.ru, malchevski@mail.ru;

²Earth Cryosphere Institute SB RAS, Tyumen, e-mail: pechkanova@mail.ru

A complex scoring system for assessing the impact of psychrotolerant mesophilic microorganisms on the proliferation of cells in organisms. The experiment revealed that bacteria of the genus *Bacillus* alter the mitotic activity of the root meristem of *Allium cepa L.* and induce abnormalities of the cell nucleus. It is proved that the system helps to identify changes in the root system of *Allium cepa L.*: simultaneously recording changes in morphometric parameters at the organismal level and changes at the cellular level in the meristem. Application of complex systems can identify strains of psychrotolerant mesophilic microorganisms have cytotoxic, genotoxic effects of exposure or to stimulate cell division.

Keywords: microorganism, cytotoxicity, genotoxicity, stimulation of mitosis

Ряд исследователей [1, 5] считают актуальным изучение воздействия психротолерантных мезофильных микроорганизмов на высшие организмы, так как были выявлены штаммы, оказывающие как положительное, так и отрицательное влияние на физиологические процессы у лабораторных животных.

Изменения на клеточном уровне, происходящие у высших организмов под воздействием изучаемых факторов, приводят к фенотипическим изменениям на организменном уровне. Для более объективной оценки воздействия микроорганизмов на макроорганизмы необходимо выявление общего вектора направленности течения митозстимуляционного эффекта воздействия. В доступных нам специальных литературных источниках мы не обнаружили системы оценки общего вектора направленности течения пролиферативных процес-

сов, учитывающего митозстимуляционный эффект. В связи с вышеизложенным актуальность разработки комплексной балльной системы оценки процессов пролиферации, приводящей к цитоморфометрическим изменениям у высших организмов, не подлежит сомнению.

Цель исследования – выявить эффективность применения комплексной балльной системы оценки воздействия психротолерантных мезофильных микроорганизмов рода *Bacillus* на течение пролиферативных процессов в корневой системе *Allium cepa L.*

Материалы и методы исследования

Для гуманного обращения с животными согласно рекомендациям Каркищенко (2010) было решено использовать растительную тест-систему *Allium*-тест, которая позволяет оценить цито- и генотоксическое воздействие факторов различной природы на пролиферацию клеток корневой меристемы [8, 9].

Моделью исследования послужил вид лук репчатый (*Allium cepa* L.), сорт российской селекции ВНИИССОК «Черный принц». Для проращивания использовали растения массой 10–20 г без зеленых листьев. От луковиц аккуратно скальпелем отрезали часть донца с омертвевшими клетками и отделяли сухие пленчатые наружные чешуи. Растительный материал выращивали без доступа солнечного света при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ в центрифужных пробирках, заполненных 50 мл дистиллированной воды.

Через 48 ч проращивания для дальнейшего проведения эксперимента были отобраны луковицы, у которых средняя длина 10 крупных корней на одном растении составляла 18 ± 3 мм. В качестве критерия деления растений на экспериментальные группы была выбрана среда для проращивания: в первой экспериментальной группе (контроль) средой для проращивания послужил смыв дистиллированной воды с мясопептонного агара, во второй экспериментальной группе – суспензия бактериальных клеток концентрацией $1 \cdot 10^6$ м.к.л./мл дистиллированной воды; в третьей экспериментальной группе – суспензия бактериальных клеток концентрацией $1 \cdot 10^9$ м.к.л./мл дистиллированной воды; в четвертой экспериментальной группе – суспензия бактериальных клеток концентрацией $1 \cdot 10^{12}$ м.к.л./мл дистиллированной воды.

Бактерии рода *Bacillus* штамм 2/09, идентифицированный по 16S RNA, высевали в 5 пробирок на мясопептонный агар (ТУ 9385-001-64786015-2012, г. Углич) и культивировали при температуре $+36^\circ\text{C}$ в термостате в течение 24 ч. Затем производили смыв микроорганизмов из каждой пробирки 5 мл дистиллированной воды. Концентрацию микроорганизмов определяли культуральным методом предельных разведений по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) на агаризованной питательной среде в чашках Петри. После определения количества клеток бакте-

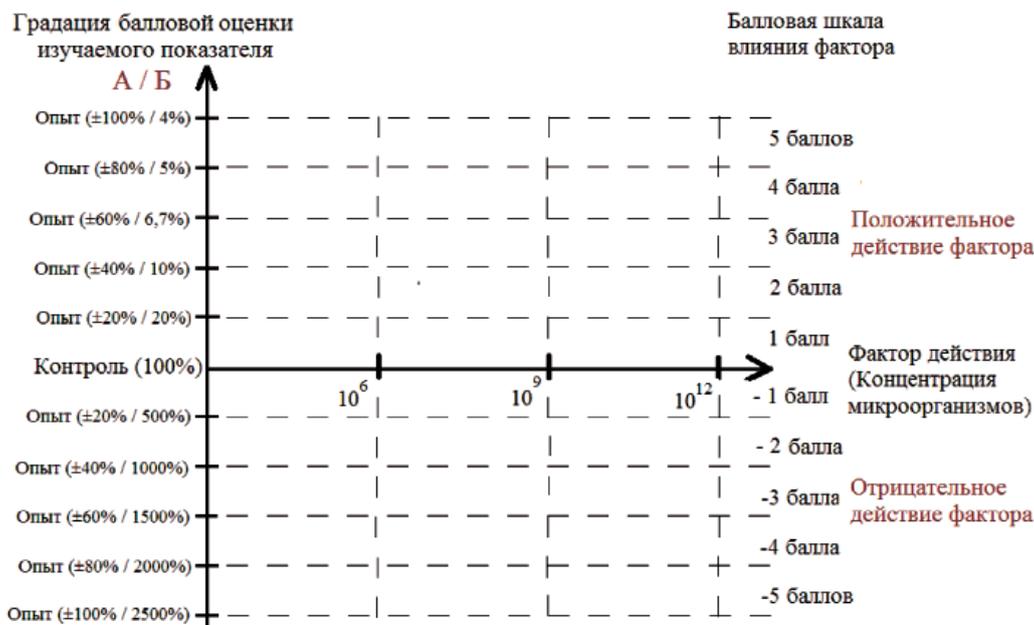
рий в исходной суспензии плотность культур довели до рабочей концентрации.

Выборка в каждой экспериментальной группе составила 10 луковиц. После 96 ч пребывания в среде для проращивания для каждого растения определяли среднюю длину 10 крупных корней, которые впоследствии помещали в фиксатор Кларка на 24 ч при температуре 5°C . Для длительного хранения материал промывали в 96% растворе этилового спирта и переносили его в 70% раствор этилового спирта.

Из полученного материала готовили давленные цитологические препараты, которые были окрашены 2% ацетоарсеином. Анализ препаратов и фотографии клеток корневой меристемы выполняли на микроскопе AxioImager A1 («Zeiss»), используя лицензионное программное обеспечение AxioVision 4.7.1 и видеокамеру AxioCam MRc5 («Zeiss»).

В каждой экспериментальной группе проанализировали 10 000 клеток на всех стадиях жизненного цикла. Для цитологического анализа выбирали цельные клетки округло-квадратной формы с хорошо прокрашенным хроматином. Рассчитывали митотический индекс и регистрировали следующие типы хромосомных aberrаций: микроядра, мосты, фрагменты, отставания и забегания хромосом. Клетки с неопределенным типом aberrаций регистрировали как клетки с патологиями ядерного аппарата. Митотический индекс и частоту встречаемости aberrантных клеток определяли по формулам, приведенным в работе В.А. Iwalokun, 2011.

Полученные данные в контрольном варианте принимали за 100%. Длину корней, митотический индекс и количество клеток с патологиями ядерного аппарата в опытных вариантах так же выражали в процентах относительно контроля и экстраполировали в баллы, используя разработанную нами шкалу (рисунок).



Шкала комплексной балловой системы оценки результатов цито-, генотоксического и митозстимуляционного эффектов воздействия микроорганизмов на высшие организмы с учетом морфометрических и цитологических изменений в корневой системе *Allium cepa* L.

А – показатели: длина корней и митотический индекс;

Б – показатель: количество клеток с патологиями ядерного аппарата

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программы BioStat.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе исследования было выявлено, что психротолерантный мезофильный штамм бактерий рода *Bacillus* достоверно не оказывает ингибирующего воздействия на морфометрический показатель – рост корневой системы *Allium cepa* L. (таблица). При этом следует отметить, что данный штамм может проявлять цитотоксические свойства, так как во второй экспериментальной группе митотический индекс по сравнению с контролем снизился на 12,1%, а в четвертой экспериментальной группе – увеличился на 15,5%. Снижение митотической активности, на наш взгляд, объясняется негативным влиянием бактерий на хромосомный аппарат клеток, а стимуляция пролиферативных процессов – работой компенсационных механизмов, уменьшающих потерю клеток, вызванную нарушениями митоза, что совпадает с результатами В.Н. Калаева (2008) и С.И. Цитленок (2002). Статистически достоверных ($p < 0,05$) различий в выраженности митозстимуляционного эффекта воздействия изучаемого штамма между значениями в экспериментальных и контрольной группах не было выявлено.

Анализируя данные, приведенные в таблице, можно утверждать, что психрофильный штамм бактерий рода *Bacillus* является генотоксикантом. Об отклонениях нормального течения митоза в опытных экспериментальных группах позволяет говорить увеличение количества клеток с индуцированными геномными мутациями. Во всех экспериментальных группах таких пато-

логий, как фрагменты хромосом, мосты (на стадиях анафазы и телофазы) и микроядра (на стадии интерфазы), обнаружено не было, хромосомные aberrации были представлены отставаниями и забеганиями хромосом при их расхождении к полюсам в период анафазы. Исключением является четвертая экспериментальная группа, где были обнаружены фрагменты и мосты. Отставание и забегание хромосом связано с нарушением поведения последних на веретене деления; мосты являются следствием разрывов хромосом и объединения фрагментов, имеющих центромеры, в результате чего возникают дицентрики. Нами выявлено, что возникновение ди- и полицентрических хромосом задерживает наступление цитотомии, что коррелирует с полученными данными других авторов [4].

Выявленные в ходе эксперимента хромосомные aberrации, на наш взгляд, являются проявлением дестабилизации кариотипа и активации соматического мутагенеза. Хромосомные aberrации возникают в результате повреждений ДНК, которые приводят к разрыву двойной спирали. В дальнейшем, по литературным данным [7], эти повреждения могут или репарироваться, или фиксироваться, при этом либо обновляется оригинальная последовательность оснований, либо возникают генные мутации, хромосомные aberrации. Факторы, обладающие мутагенными свойствами, у всех эукариот в одинаковой степени индуцируют хромосомные aberrации, поэтому применение растительных тест-систем является экономичным подходом для изучения воздействия психротолерантных мезофильных микроорганизмов на высшие организмы.

Комплексная балльная система оценки влияния бактерий рода *Bacillus* на пролиферацию клеток корневой меристемы *Allium cepa* L. (в баллах)

Экспериментальная группа	Прирост корней за 96 ч (в мм)	Баллы	Митотический индекс, %	Баллы	Количество клеток с патологиями ядерного аппарата, %	Баллы	Итоговая сумма баллов
Первая (контрольная)	3,5 ± 0,32 (100%)	0	5,8 ± 2,2	0	0,14 ± 0,03 (100%)	0	0
Вторая	3,3 ± 0,49 (94,3%)	-0,3	5,1 ± 1,2* (87,9%)	-0,6*	0,62 ± 0,02* (443%)	-0,8*	-0,56 ± 0,25 -0,7 ± 0,14*
Третья	3,7 ± 0,29 (105,7%)	0,3	6 ± 1,4 (103,5%)	0,2	0,8 ± 0,02* (572%)	-1,2*	-0,43 ± 0,71 -1,2*
Четвертая	3 ± 0,41 (85,7%)	-0,7	6,7 ± 1,5* (115,5%)	-0,8*	1 ± 0,03* (714%)	-1,4*	-0,97 ± 0,38 -1,1 ± 0,42*

Примечание. Достоверность отличия опыта от интактного контроля (* – $p < 0,05$)

Заключение

На основании проведенных экспериментов мы убедились, что разработанная нами комплексная система балльной оценки позволяет объективно анализировать цито- и генотоксическое воздействие микроорганизмов на процессы пролиферации у высших организмов, о чем свидетельствует то, что бактерии рода *Bacillus* штамма 2/09 способны изменять митотическую активность корневой меристематической ткани *Allium cepa* L. и индуцировать такие аномалии ядерного аппарата клетки, как фрагменты, мосты, отставания и забегания хромосом.

Список литературы

1. Брушков А.В., Мельников В.П., Суховой Ю.Г., Грива Г.И., Репин В.Е., Каленова Л.Ф., Бреннер Е.В., Субботин А.М., Трофимова Ю.М., Танака М., Катаяма Т., Утсуми М. Реликтовые микроорганизмы криолитозоны как возможные объекты геронтологии // Успехи геронтологии. – 2009. – Т. 22, № 2. – С. 253–258.
2. Калаев В.Н., Логачева А.А. Цитогенетические реакции семенного потомства дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) на загрязнение атмосферного воздуха выхлопными газами автотранспорта // Генетика и биотехнология 21 века. Фундаментальные и прикладные аспекты: материалы международного на-уч. конф. – Минск, 2008. – С. 93–95.
3. Каркищенко Н.Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. – М., 2010. – 358 с.
4. Ковалева О.А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих // Цитология и генетика. – 2008. – № 1. – С. 58–72.
5. Турбасова Н.В., Ефимова Ю.А., Каленова Л.Ф., Фишер Т.А. Влияние психрофильных микроорганизмов и грибов, выделенных из вечной мерзлоты, на некоторые иммунофизиологические процессы организма лабораторных мышей // Вестник ТюмГУ. – 2011. – № 6. – С. 183–192.
6. Цитленок С.И., Козлова А.А., Пулькина С.В. Использование митотической активности как показателя антропогенной нагрузки в природных и агропопуляциях растений [Томской области] // Контроль и реабилитация окружающей среды: Материалы III Междунар. симп. – Томск, 2002. – С. 132–133.
7. Bertrand R., Sarang M., Jenkin J., Kerrigan D., Pomnier Y. Differences induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor cell lines with amplified c-myc expression // Cancer Res. – 1991. – № 51. – P. 6280–6285.
8. Iwalokun B.A., Oyenuga A.O., Saibu G.M., Ayorinde J. Analyses of Cytotoxic and Genotoxic Potentials of *Loranthus*

micranthus using the *Allium cepa* Test // Current Research Journal of Biological Sciences. – 2011. – Vol. 3, № 5. – P. 459–467.

9. Koce J. D., Drobne D., Klančnik K., Makovec D., Novak S., Hočevar M. Oxidative potential of ultraviolet-A irradiated or nonirradiated suspensions of titanium dioxide or silicon dioxide nanoparticles on *Allium cepa* roots // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2014. – Vol. 33, № 4. – P. 858–867.

References

1. Brushkov A.V., Mel'nikov V.P., Suhovej Ju.G., Griva G.I., Repin V.E., Kalenova L.F., Brenner E.V., Subbotin A.M., Trofimova Ju.M., Tanaka M., Katajama T., Utsumi M. Uspеhi gerontologii, 2009, Vol. 22, no.2, pp. 253–258.
2. Kalaev V.N., Logacheva A.A. *Genetica i Biotechnologiya XXI veka. Fundamentalnye i prikladnye aspekty: materialy mezhdunarodnoe nauchnoy konferentsii* (Genetics and Biotechnology of the XXI century. Fundamental and applied aspects: Proc. of the Int. Scien. Conf.). Minsk, 2008, pp. 93–95.
3. Karkischenko N.N. *Rukovodstvo po laboratornym zhitvotnym i alternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh* [Guidelines for laboratory animals and alternative models in biomedical research]. Moscow, 2010. 358 p.
4. Kovaleva O.A. *Tsitologiya i genetika*, 2008, no. 1, pp. 58–72.
5. Turbasova N.V., Efimova Y.A., Kalenova L.F., Fischer T.A. *Vestnik TyumGU*, 2011, no. 6, pp. 183–192.
6. Tsitlenok S.I., Kozlova A.A., Pulkina S.V. *Control i reabilitatsiya okruzhayushey sredy: Materialy III Mezhdunarodnogo Simpoziuma* (Control and rehabilitation of the environment: Proc. of the III Int. Symp.). Tomsk, 2002, pp. 132–133.
7. Bertrand R., Sarang M., Jenkin J., Kerrigan D., Pomnier Y. Differences induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor cell lines with amplified c-myc expression // *Cancer Res*, 1991, no. 51, pp. 6280–6285.
8. Iwalokun B.A., Oyenuga A.O., Saibu G.M., Ayorinde J. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 2011, Vol. 3, no. 5, pp. 459–467.
9. Koce J.D., Drobne D., Klančnik K., Makovec D., Novak S., Hočevar M. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, Vol. 33, no. 4, pp. 858–867.

Рецензенты:

Петухова Г.А., д.б.н., профессор, ФГБОУ ВПО «Тюменский государственный университет» Министерства образования и науки России, г. Тюмень;

Дуров А.М., д.м.н., профессор, ФГБОУ ВПО «Тюменский государственный университет» Министерства образования и науки России, г. Тюмень.