

сообщения
объединенного
института
ядерных
исследований
Дубна

4095/83

8/8-83

P19-83-221

Д.С.Давидков, В.И.Данилов, С.П.Пейкова,
Ю.В.Таран, А.И.Чепурной

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ДРОЖЖЕЙ
В МАГНИТНОМ ЭКРАНЕ

1983

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени накоплен обширный статистический материал, свидетельствующий о наличии корреляций между солнечной активностью и многими процессами, протекающими в биосфере Земли. Полагают ^{1/}, что существование гелиобиологических связей объясняется воздействием флуктуаций геомагнитного поля /ГМП/, являющихся результатом проявления солнечной активности. Ряд исследователей считает, что не только флуктуации ГМП, вызванные хромосферными вспышками на Солнце, но и само наличие ГМП оказывают влияние на ход биологических процессов ^{2,3/}.

Проверка этих гипотез возможна при исследовании жизнедеятельности биологических объектов в условиях ослабления как флуктуаций, так и постоянной составляющей ГМП. Литературные данные по этому вопросу весьма противоречивы. С одной стороны, имеются описания отклонений от нормы жизнедеятельности биологических объектов в "магнитном вакууме" ^{4,6/}, с другой - существуют не менее убедительные экспериментальные данные об отсутствии таковых ^{5,7/}.

В ^{4/} при наблюдении за белыми мышами линии Swiss Webster, находившимися от 4 до 12 мес. в экранированном до 100 нТ объеме, обнаружили изменения физиологических и биологических свойств клеток и тканей, а также гистологические нарушения внутренних органов. Наблюдалась преждевременная смерть животных, наступавшая иногда в возрасте 6 мес. В ^{5/} проводили аналогичные опыты с мышами в течение 3 мес., помещая их в экраны с внутренним полем 30-130 нТ. Отмечены некоторые сдвиги при исследовании двигательной активности и мышечной работоспособности. Никаких других отклонений от нормы найдено не было.

В ^{6/} культивировали в ослабленном магнитном поле, напряженностью 0,1 от ГМП, стафилококк *Staphylococcus aureus*. Выросшие в жидкой питательной среде культуры разводились и высевались на твердую среду для определения титра клеток. Во всех разведениях исследуемой культуры стафилококка наблюдалось значительное сокращение количества колоний, а также уменьшение их размеров по сравнению с контрольными. В ^{7/} повторили опыты со стафилококком в экранированной комнате /47 нТ/, но не обнаружили достоверной разницы между контролем и опытом по скорости размножения.

Неоднозначность результатов, полученных со стафилококком, проявляется и в опытах с кишечной палочкой. Если в ^{8/} при культивировании бактерий в пермалловом экране /напряженность остаточного магнитного поля не указана/ уже после 4 ч наблюдали стимуляцию размножения *E. coli*, то в ^{9/} при ослаблении ГМП в 160 раз

в течение первых двух суток культивирования наблюдали уменьшение скорости роста на 17-20%. В тех же работах были получены различные данные об антибиотикоустойчивости *E. coli*.

Таким образом, вопрос о влиянии ослабления ГМП и его флуктуаций на биологические объекты до настоящего времени не решен. В связи с этим по-прежнему представляет большой интерес проведение систематических исследований жизнедеятельности биологических объектов в условиях максимально возможного ослабления как флуктуаций, так и постоянной составляющей ГМП. В таких экспериментах представляется целесообразным использование достаточно хорошо изученных в генетическом и молекулярно-биологическом отношении микроорганизмов, уже неоднократно использовавшихся в качестве тест-систем для оценки действия внешних факторов.

В настоящем сообщении представлены результаты наблюдений за скоростью размножения и генетическими свойствами дрожжевых клеток при культивировании их в ослабленном магнитном поле.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ослабление геомагнитного поля. Для ослабления ГМП использовался магнитный экран ^{/10/}, состоящий из восьми коаксиальных пермаллоевых цилиндров /рис.1/. Как показали измерения и расчеты, в цилиндрической полости диаметром 12 см на длине 20 см ГМП

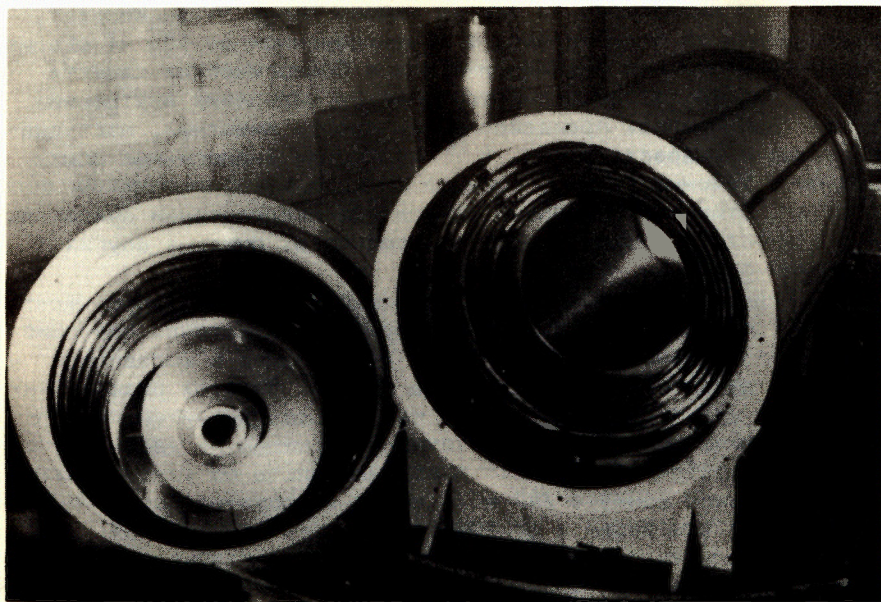


Рис.1. Магнитный экран со снятым блоком торцевых крышек.

было ослаблено более чем в 10^6 раз. Рассеянное магнитное поле внутри экрана, вызванное его остаточной намагниченностью, составляло 0,5-2 нТ. Среднеквадратичная амплитуда флуктуаций остаточного поля не превышала 0,2 нТ в диапазоне частот $2 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-1}$ Гц.

Контрольная установка по конструкции была идентична магнитному экрану, но с пенопластовыми цилиндрами вместо пермаллоевых. В этом устройстве магнитное поле составляло 45 мкТ.

Штаммы. В работе использовался штамм дрожжей *Pichia pinus* МН4¹¹⁷, гаплоид, прототроф, а также штаммы *Sacch. cerevisiae*: ПГ-154 /a/a ade2-192/ade2-G45 RAD/RAD/; ПГ-155 /a/a ade2-192/ade2-G45 rad2/rad2 / и ПГ-157 /a/a ade2-192=ade2-G45 rad54/rad54/. Штаммы *Sacch. cerevisiae* являются компаундами по двум мутациям гена *ade2*, показывающим межallelную комплементацию. Все три штамма являются прототрофами и образуют белые колонии. Митотический кроссинговер на участке XV хромосомы между центромерой и локусом *ade2* приводит к появлению двух сестринских клеток, гомозиготных одна по мутации *ade2-192*, другая по *ade2-G45*. Первая мутация в гомозиготе вызывает появление красной окраски колонии, вторая - розовой. Спонтанная частота митотической сегрегации у штаммов ПГ-154 и ПГ-155 очень низка, порядка 0,1%, у штамма ПГ-157 она повышена до >1%. При действии мутагенов частота митотической сегрегации повышается ^{/12/}.

Среды. Для выращивания дрожжей использовались полная питательная среда /ПС/ и минимальная питательная среда /МС/^{/13/}.

Условия роста. Культивирование *Pichia pinus* производилось в жидкой МС, а *Sacch. cerevisiae* - в жидкой ПС. Рабочий объем пробирок составлял 20 мл. Аэрация и перемешивание осуществлялись путем продува через суспензию клеток стерильного воздуха /10 л/ч/. Пробирки из установок в течение опытов не вынимались. Анализ состояния культур производился по пробам, которые брались с помощью шлангов. Температурная стабильность в опытах составляла около 0,1 °С.

В первой серии экспериментов снимались кривые роста *Pichia pinus* в диапазоне температур от 25,0 до 38,0 °С. Предполагалось, что при отклонении температуры от оптимальной дрожжи окажутся более чувствительными к действию ГМП и флуктуаций.

Далее осуществлялось шестисуточное периодическое культивирование *P. pinus*. Начальная концентрация клеток составляла 10^5 мл⁻¹. Пробы, вырощенные до концентрации $2 - 6 \cdot 10^7$ мл⁻¹, разбавлялись свежей питательной средой до первоначальной концентрации. Путем регулярного повторения операции разбавления клетки в течение шести суток поддерживались в экспоненциальной фазе роста.

Периодическое культивирование *Sacch. cer.* осуществлялось по типу *P. pinus*, с той лишь разницей, что вместо МС использовалась ПС.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК

Удельную скорость размножения дрожжей вычисляли по формуле:

$$\mu = \frac{\ln N(t_2)/N(t_1)}{t_2 - t_1},$$

где $N(t_2)$ и $N(t_1)$ - концентрации клеток в моменты времени t_2 и t_1 . Концентрацию клеток определяли с помощью микроскопирования.

Для определения числа жизнеспособных клеток дрожжи после подсчета концентраций высевались на твердую ПС. Просчет выросших клонов производился на шестой день после посева.

Определение содержания мутантов, устойчивых к нистатину. Для выявления мутантов *Pichia pinus* MN4, устойчивых к нистатину, клетки, выросшие в магнитном экране и в контрольной установке, высевались на твердую ПС, содержащую 150 Е/мл нистатина. На шестой день после посева выросшие клоны, перепроверялись на наличие Nys^r признака.

Определение содержания митотических рекомбинантов. Пробы клеток *Sacch cer.* из магнитного экрана и из контрольной установки высевались на твердую ПС. Учет митотических рекомбинантов /кроссоверов/ с мутациями *ade2-G45/ade2-G45* и *ade2-192/ade2-192* производился на 10-й день после посева по появлению клонов с розовой и красной окраской.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование *Pichia pinus* MN4 в диапазоне температур от 25,0 до 38,0°C. Культивирование длилось в течение 40-50 ч. Начальная концентрация составляла 10^5 мл⁻¹. Каждые 4-5 ч. отбирались пробы и определялась концентрация клеток. По полученным данным строились кривые роста и вычислялась удельная скорость размножения на участке экспоненциального роста. Результаты представлены на рис.2. Из полученных данных следует, что скорости размножения *Pichia pinus* MN4 в ГМП и в магнитном экране при культивировании в жидкой ПС в течение 40-50 ч в диапазоне температур от 25,0 до 38,0°C в пределах ошибок опытов не различаются.

Просчет клонов по чашкам, на которые высевались соответствующие разведения клеток, показал, что жизнеспособность клеток из магнитного экрана во время опытов и после их завершения составляла фактически 100% по отношению к контролю.

Содержание нистатинустойчивых мутантов в культурах, росших в магнитном экране, составляло $\leq 2 \cdot 10^{-7}$ и достоверно не отличалось от содержания таковых в контрольных пробах.

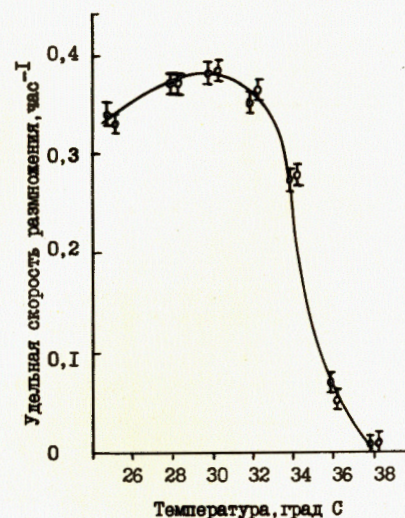


Рис.2. Скорость размножения *Pichia pinus* MN4 в магнитном экране (●) и в контрольной установке (○) в зависимости от температуры культивирования.

Таким образом, в 40-50-часовых опытах не наблюдалось влияния ослабления ГМП на *Pichia pinus*. Этот результат согласуется с результатами, полученными в [14], где также не было обнаружено влияния ослабления до 50 нТ поля на клетки млекопитающих в коротких экспериментах.

Периодическое культивирование *Pichia pinus* MN4. Периодическое культивирование *P. pinus* произ-

водилось при 30,0°C. Как описано выше, клетки в течение 80 генераций поддерживались в экспоненциальной фазе роста. Данные по скоростям размножения *P. pinus* MN4 в магнитном экране и в контрольной установке представлены на рис.3. В течение шести суток скорость размножения *Pich. pinus* MN4 в магнитном экране была практически постоянной и составляла $0,37 \pm 0,02$ ч⁻¹. В контрольной установке *Pichia pinus* MN4 размножалась также с постоянной скоростью, которая в пределах ошибок совпадала со скоростью размножения в экране.

Клетки в магнитном экране на протяжении всего опыта сохраняли 100%-ную жизнеспособность по отношению к контрольным.

Содержание Nys^r мутантов в культурах составляло $\leq 2 \cdot 10^{-7}$ и не различалось в контроле и опыте.

Периодическое культивирование *Saccharomyces cerevisiae*. Периодическое культивирование *Sacch cer.* в жидкой ПС производилось в течение четырех суток /32-35 генераций/ при 30,0°C. На протяжении опыта клетки поддерживались в экспоненциальной фазе роста.

Данные по скорости размножения и содержанию митотических рекомбинантов с мутациями *ade2-G45/ade2-G45* и *ade2-192/ade2-192*, полученные на штамме ПГ-157, представлены на рис.4. Скорость размножения и содержание рекомбинантов практически не изменялись в ходе эксперимента. Аналогичные результаты были получены на штаммах ПГ-154 и ПГ-155.

Средние значения полученных в ходе опытов данных по культивированию *Sacch cer.* приведены в таблице.

Как видно из таблицы, ослабление ГМП не сказывается на скорости размножения и частотах митотических рекомбинаций у *Sacch cer.*

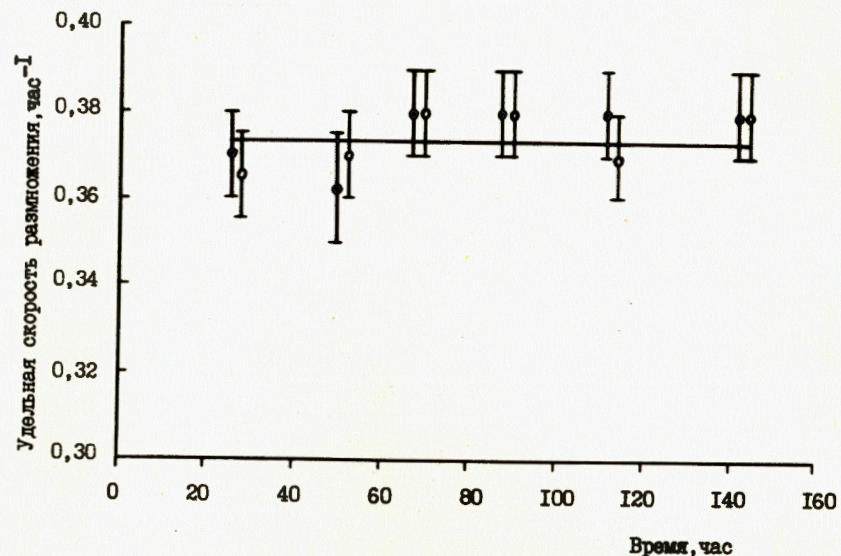


Рис.3. Скорость размножения *Pichia pinus* MN4 в магнитном экране (●) и в контрольной установке (○) в течение шестисуточного культивирования при 30,0 °С.

Эксперименты, описанные выше, проводились в период с мая по декабрь 1981 года. Из 88 дней экспериментов 13 дней были со спокойной, 62 - с возмущенной и 13 - с сильно возмущенной геомагнитной обстановкой /локальные индексы магнитной возмущенности С соответственно равны 0; 1 и 2/. Во всех циклах экспериментов были дни со спокойной и с сильно возмущенной геомагнитной обстановкой, но ни в эти дни, ни в последующие, эффекта ослабления ГМП и флуктуаций не наблюдалось. На этом основании можно сделать вывод: ослабление ГМП и его флуктуаций, вызванных солнечной активностью; не сказывается на жизнедеятельности и генетических процессах *P. pinus* и *Sacch. cerevisiae* в непродолжительных экспериментах. Этот вывод согласуется с данными, полученными на различных объектах при коротких экспозициях в "магнитном вакууме" /8,5,7,14/.

Можно допустить, что влияние ослабления ГМП незначительно и скрывается в пределах ошибок краткосрочных опытов. В таком случае возможно накопление слабых эффектов до регистрируемых величин при очень длительных непрерывных наблюдениях. В цитированных во введении работах появление эффектов наблюдалось, как правило, при длительных экспозициях /4/.

Так как наши исследования были относительно кратковременными, есть основания считать, что полученные результаты не являются

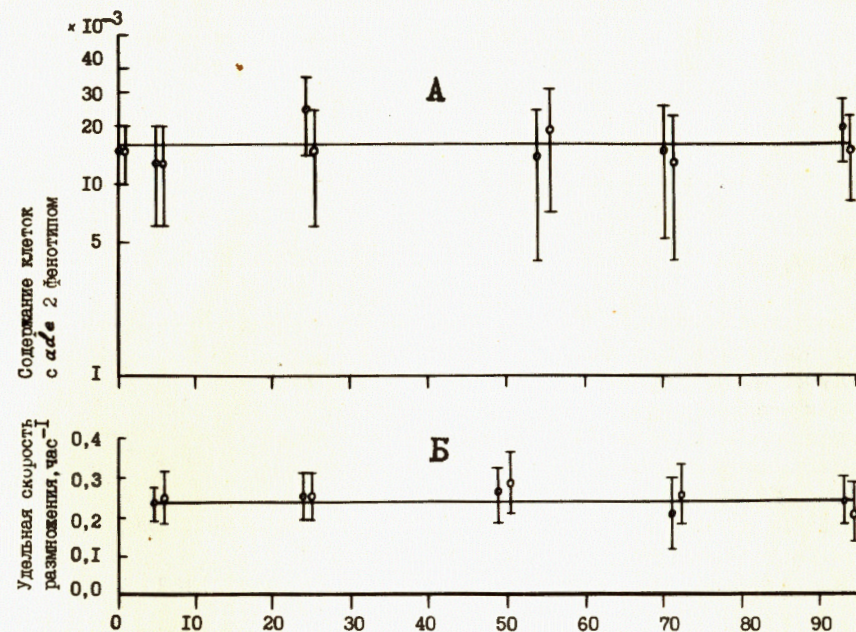


Рис.4. Содержание рекомбинантных клеток с *ade2* фенотипом /А/ и скорость размножения клеток /Б/ при культивировании *Sacch. cerevisiae* ПГ-157 в магнитном экране (●) и в ГМП (○) в течение четырехсуточного опыта.

Таблица

Средние значения скорости размножения клеток и доли рекомбинантных клеток с *ade2* фенотипом, полученные в ходе четырехсуточного культивирования *Sacch. cerevisiae* в магнитном экране /опыт/ и в контрольной установке

Штаммы		ПГ-154	ПГ-155	ПГ-157
удельная скорость размножения, ч ⁻¹	контроль	0,25±0,03	0,26±0,04	0,25±0,03
	опыт	0,23±0,03	0,24±0,02	0,23±0,03
процент рекомбинантных клеток с <i>ade2</i> фенотипом	контроль	0,04±0,04	0,14±0,14	1,59±0,54
	опыт	0,02±0,02	0,16±0,16	1,74±0,50

еще достаточными для категорических выводов относительно роли ГМП в биологических процессах, которые происходили в далеком прошлом или происходят в настоящее время.

Авторы благодарят И.И.Толсторукова и И.А.Захарова за любезно предоставленные штаммы дрожжевых культур для проведения опытов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирский Б.М. В кн.: Влияние солнечной активности на атмосферу и биосферу Земли". "Наука", М., 1971, с. 126.
2. Дубов А.П. Геомагнитное поле и жизнь /краткий очерк по магнитобиологии/. Гидрометеоздат, Л., 1974.
3. Холодов Ю.А. Шестой незримый океан. Знание, М., 1978.
4. Halpern M.H., Van Dybe J.H. Aerospace Med., 1966, vol. 37, No. 3, p. 281.
5. Нахильницкая З.Н. и др. Космическая биология и авиакосмическая медицина, 1978, №2, т. 12, с. 74.
6. Becker R.O. Med. Electron and Biol. Engng., 1963, vol.1, No. 2, p. 293.
7. Beischer D.E., Convard G.S. Frowth of Staphylococcus aureus in a null magnetic field enviroption NAMI(c), Pensacola, Florida 32512, 23, April 1970.
8. Ачкасова Ю.Н. и др. В кн.: Влияние естественных и слабых искусственных магнитных полей на биологические объекты. Белгород, Книжн.изд-во, 1973, с. 129.
9. Алферов О.А. В кн.: Применение магнитных полей в медицине, биологии и сельском хозяйстве. Изд-во Саратовского государственного университета, Саратов, 1978, с. 59.
10. Давидков Д.С. и др. ОИЯИ, P13-81-586, Дубна, 1981.
11. Толсторуков И.И. и др. Генетика, 1977, т. 13, №2, с. 322.
12. Захаров И.А., Ковальцова С.В., Марфин С.В. Генетика, 1979, т. 15, №1, с. 41.
13. Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей. "Пищевая промышленность", М., 1979.
14. Greene A.E., Halpern M.H. Aerospace Medicine, 1966, v. 37, No. 3, p. 251.

Рукопись поступила в издательский отдел
6 апреля 1983 года.

Давидков Д.С. и др.
Культивирование дрожжей в магнитном экране

P19-83-221

Проверялась гипотеза о биологической значимости геомагнитного поля /ГМП/. Результаты культивирования дрожжей *Pichia pinus* и *Saccharomyces cerevisiae* в ГМП и в магнитном экране, ослаблявшем ГМП в 10^6 раз, показали отсутствие влияния магнитного поля Земли на физиологические свойства и генетическую изменчивость дрожжей.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1983

Davidkov D.S. et al.
Yeast Cultivation in Magnetic Screen

P19-83-221

The hypothesis of biological role of geomagnetic field (GMF) was tested. *Pichia pinus* and *Saccharomyces cerevisiae* cultivation results obtained in GMF and in magnetic screen, where GMF was relaxed 10^6 times, demonstrate the absence of the effect of Earth's magnetic field on physiological properties and on genetic alternations of yeast.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1983

Перевод О.С.Виноградовой.