

WPLYW HERBICYDU BASTA NA AKTYWNOŚĆ KATALAZY W KOMÓRKACH DROŻDŻY *Saccharomyces cerevisiae*

Anna Krzepiłko, Agata Świącilo

Instytut Nauk Rolniczych w Zamościu, Akademia Rolnicza w Lublinie

Wstęp

Glufozinat amonu (kwas 2-amino-4-hydroksymetylofosfynilomasłowy) – aktywny składnik preparatu Basta jest herbicydem stosowanym przeciwko jedno- i wieloletnim trawom, hamuje fotosyntezę, działa kontaktowo, niszczy naziemne, zielone części roślin przez desykcję [RÓŻAŃSKI 1996]. U roślin hamuje aktywność syntetazy glutaminowej, co prowadzi do wzrostu stężenia jonów amonowych w tkankach roślin [NAKAKI i in. 2000] i powoduje zaburzenie metabolizmu azotu. W dalszej kolejności wysokie stężenie jonów amonowych powoduje depolaryzację błon komórkowych i śmierć komórek [AHMAD, MALLOCH 1995].

W przeciwieństwie do roślin, u zwierząt glufozinat amonu nie wpływa znacząco na metabolizm azotu, przypuszczalnie dlatego, że inne szlaki metaboliczne kompensują efekt wywołany przez zahamowanie aktywności syntetazy glutaminowej. U zwierząt objawy ostrego zatrucia glufozinatem amonu związane są z funkcjonowaniem centralnego układu nerwowego [NAKAKI i in. 2000]. W doświadczeniach *in vivo* nie stwierdzono jednak teratogennego, genotoksycznego i rakotwórczego działania glufozinatu amonu [EBERT i in. 1990; HACK i in. 1994].

Zmieniające się warunki środowiska mogą indukować mechanizmy ochronne i adaptacyjne w komórkach, nazywane odpowiedzią stresową, a typowym jej przejawem jest indukcja ekspresji pewnych genów i synteza specyficznej grupy białek HSP (białek szoku termicznego) [WIESER i in. 1991; KRAWIEC, BILIŃSKI 1987]. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* są dogodnym obiektem do badań odpowiedzi stresowej komórek. Wiele czynników fizycznych i chemicznych, między innymi pestycydy, mogą zainicjować odpowiedź stresową w komórkach drożdży podczas której dochodzi do ekspresji m.in. genu *CTT1* kodującego katalazę T, enzymu katalizującego reakcję rozkładu nadtlenu wodoru [WIESER i in. 1991]. Szereg związków indukuje *de novo* biosyntezę katalazy T w logarytmicznej fazie wzrostu hodowli. Po inkubacji z tymi związkami poziom katalazy w komórkach gwałtownie zwiększa się i w ciągu krótkiego czasu (0,5–1,5 godziny) osiąga wartości charakterystyczne dla hodowli w stacjonarnej fazie wzrostu [KRAWIEC, BILIŃSKI 1987].

Celem pracy było zbadanie czy herbicyd Basta wpływa na aktywność katalazy w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i wywołuje opisaną reakcję stresową.

Materiał i metody badań

Doświadczenia przeprowadzono na dzikim szczepie drożdży SP-4 o genotypie alfa leu 1 agr 4 [BILIŃSKI i in. 1985]. Drożdże hodowano na pożywce płynnej YPG zawierającej: 1% ekstraktu drożdżowego, 1% peptonu, 2% glukozy. Do pożywki stałej YPG dodatkowo dodawano 2% agaru. Hodowlę drożdży w pożywce płynnej prowadzono w warunkach aerobowych w kolbach stożkowych, w temperaturze 28°C, przez 24 godz. w celu uzyskania hodowli logarytmicznej. Do hodowli drożdży dodawano handlowy roztwór herbicydu Basta. Stężenie preparatu Basta wyrażono w przeliczeniu na substancję aktywną glufozinat amonu. Po 1 godzinnej inkubacji z herbicydem badano przeżywalność komórek drożdży i aktywność katalazy.

Przeżywalność drożdży po inkubacji z herbicydem Basta określono na podstawie zdolności komórek do wytworzenia kolonii, w tym celu wysiewano na pożywki stałe zawiesinę o znanej liczbie komórek. Próbę kontrolną stanowiła zawiesina komórek drożdży nie inkubowana z herbicydem.

Ekstrakty z komórek drożdży wykonano wg metody opisanej w pracy BILIŃSKI i in. [1985]. Białko oznaczano metodą Lowry [LOWRY i in. 1951].

Całkowitą aktywność katalazy oznaczono spektrofotometrycznie wg metody Beers i Sizer [BEERS, SIZER 1952]. Mierzono absorbcję roztworu nadtlenu wodoru przy długości fali 240 nm. Aktywność właściwą katalazy wyrażono w $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ rozłożonych w ciągu 1 minuty przez 1 mg białka zawartego w ekstrakcie z komórek drożdży w temperaturze 25°C ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka).

Przy pomocy arkusza kalkulacyjnego Excel 7.0 liczono średnie i odchylenie standardowe. Wykonano test t-Studenta na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ aby stwierdzić czy uzyskane różnice są istotne [OKTABA 1977].

Wyniki i dyskusja

Powszechne stosowanie pestycydów mimo niezaprzeczalnych ekonomicznych korzyści budzi obawy związane z ich niespecyficznym oddziaływaniem na środowisko. Szczególnie interesujący jest wpływ pestycydów na mikroorganizmy, zwłaszcza glebowe, które przeprowadzają rozkład materii organicznej i dzięki antagonistycznej kontroli ograniczają rozwój patogenów roślinnych. Wpływ pestycydów na mikroorganizmy jest zróżnicowany, mogą one powodować zahamowanie lub zwiększenie liczby i aktywności metabolicznej mikroorganizmów [AHMAD, MALLOCH 1995].

Badając wpływ herbicydu Basta na drożdże stwierdzono, że przy zastosowanych stężeniach 0,3–3,0 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ obniżał on przeżywalność komórek (tab. 1). Wchodzący w skład tego preparatu glufozinat amonu o stężeniu 1,2 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ powodował spadek przeżywalności o 10%, natomiast o stężeniu 3,0 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ o 18% w porównaniu z próbą kontrolną.

Inni autorzy badający oddziaływanie glufozinatu amonu na mikroflorę gleby stwierdzili, że wiele gatunków bakterii i liczne grzyby są wrażliwe na zalecane dla ochrony roślin stężenia tego herbicydu [AHMAD, MALLOCH 1995]. Glufozinat amonu może zmieniać skład mikroflory ekosystemu glebowego, co ma wpływ na urodzajność gleby. Związek ten o stężeniu 5 mM zupełnie hamował wzrost *Trioderma harzianum* i *T. longipilus*, natomiast nawet 50 mM stężenie

glufozinatu w niewielkim stopniu powodowało utratę żywotności przez *Mortierella*. Pośród najbardziej tolerancyjnych gatunków były dwa szczepy *Verticillium*, gatunku reprezentującego groźne patogeny roślin. Inne saprofity zaliczane do *Ascomycetes* w różnicowany sposób reagowały na ten herbicyd. Pośród *Penicillium*, *P. janthinellum* tolerował nawet 5 mM stężenia glufozinat amonu, podczas gdy *P. brevicompactum* był wrażliwy na 1 mM stężenie tego związku. *Aspergillus fumigatus* tolerował nawet 10 mM stężenia glufozinatu amonu [AHMAD, MALLOCH 1995].

Reakcji na pestycydy może towarzyszyć zaburzenie homeostazy antyoksydacyjno-prooksydacyjnej komórki i wzrost stężenia wolnych rodników, czego następstwem jest stres oksydacyjny [SIES 1985]. Towarzyszą mu zmiany metabolizmu komórek przejawiające się m.in. zmianą aktywności enzymów odpowiedzialnych za ochronę antyoksydacyjną. Jednym z mechanizmów adaptacyjnych komórek na stres oksydacyjny jest zwiększenie aktywności enzymów chroniących przed wolnymi rodnikami [BARTOSZ 2003].

Literatura dostarcza licznych przykładów, że pestycydy mogą powodować stres oksydacyjny [BŁASZCZYŃSKI i in. 1985; KALE i in. 1999; GIRAY i in. 2001]. W przypadku glufozinatu amonu dysponujemy nielicznymi danymi potwierdzającymi tę tezę. Udział tlenu azotu (związku będącego reaktywną formą tlenu) w mechanizmie oddziaływania glufozinatu amonu potwierdzono podczas badań nad wpływem tego związku na funkcjonowanie synaps komórek nerwowych. NAKAKI i in. [2000] stwierdzili, że toksyczne oddziaływanie glufozinatu amonu związane jest z funkcjonowaniem receptorów dla kwasu glutaminowego czemu towarzyszy wzmożona produkcja tlenu azotu [NAKAKI i in. 2000]. U mysich embrionów glufozinat amonu indukuje apoptozę [WATANABE 1997], proces w którym istotną rolę odgrywają reaktywne formy tlenu [BARTOSZ 2003].

W prezentowanej pracy stwierdzono, że glufozinat amonu już o stężeniu $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ zwiększał znacznie aktywność katalazy w komórkach drożdży (tab. 1). Najsilniejszy wpływ tego związku stwierdzono jednak przy stężeniu $1,2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, powodował on przyrost aktywności katalazy o około 330% w porównaniu do kontroli. Podwyższenie poziomu aktywności katalazy sugeruje, że glufozinat amonu może powodować stres oksydacyjny w komórkach drożdży.

Tabela 1; Table 1

Wpływ herbicydu Basta na przeżywalność i aktywność katalazy w komórkach drożdży w logarytmicznej fazie wzrostu

Effect of herbicide Basta on survivors and on catalase activity in logarithmic yeast cells

Wyszczagólnienie Specification	Stężenie glufozinatu amonu Glufozinate ammonium concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)				
	0	0,3	0,6	1,2	3
Przeżywalność; Survivors (%)	100±0,6	97,7±0,8a	97±1,2a	90±1,8	82±2,3
Aktywność katalazy ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ białka) i w % kontroli Activity of catalase ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein) and % of control	1,8±0,14 100%	4±0,11 222%	4,6±0,15 256%	5,94±0,18 330%	3±0,16 167%

średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie; means followed by the same letter do not differ significantly

Wnioski

1. Herbicyd Basta zawierający glufozinat amonu o stężeniach 0,3–0,6 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ powodował jedynie niewielkie obniżenie przeżywalności komórek, natomiast wyższe dawki tego związku o stężeniu 1,2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ i 3,0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ powodowały spadek przeżywalności odpowiednio o 10% i o 18%.
2. Inkubacja komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* z preparatem Basta zawierającym glufozinat amonu powodowała wzrost aktywności katalazy. Sugeruje to, że glufozinat amonu wywołuje stres oksydacyjny w komórkach drożdży.

Literatura

- AHMAD I., MALLOCH D. 1995. *Interaction of soil microflora with the bioherbicide phosphinothricin*. *Agricul. Ecos. Environ.* 54: 165–174.
- BARTOSZ G. 2003. *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. Wydawn. Nauk. PWN: 144–177.
- BEERS R.F., SIZER J.W. 1952. *A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase*. *J. Biol. Chem.* 195: 133–140.
- BILIŃSKI T., KRAWIEC Z., LICZMAŃSKI A., LITWIŃSKA J. 1985. *Is hydroxyl radical generated by the Fenton reaction in vivo?* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130(2): 533–539.
- BŁASZCZYŃSKI M., LITWIŃSKA J., ZABOROWSKA D., BILIŃSKI T. 1985. *The role of respiratory chain in paraquat toxicity in yeast*. *Acta Microbiol. Polon.* 34(3/4): 243–254.
- EBERT E., LEIST K.H., MAYER D. 1990. *Summary of safety evaluation toxicity studies of glufosinate ammonium*. *Food Chem Toxicol.* 28(5): 339–349.
- GIRAY B., GURBAYA., HINCAL F. 2001. *Cypermethrin – induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol*. *Toxicol. Lett.* 118(3): 139–146.
- HACK R., EBERT E., EHLING G., LEIST K.H. 1994. *Glufosinate ammonium – some aspects of its mode of action in mammals*. *Food Chem Toxicol.* 32(5): 461–470.
- KALE M., RATHORE N., DEEPAK B. 1999. *Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues in pyrethroid toxicity: possible involvement of reactive oxygen species*. *J. Nutrit. Environ. Medicine* 9(1): 37–47.
- KRAWIEC Z., BILIŃSKI T. 1987. *New types of catalase regulatory mutants in yeast*. *Bull. Pol. Acad. Sci. Biol. Ser. B*, 35: 285–291.
- LOWRY O., ROSEBROUGH W., FARR A., RANDALL R. 1951. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- NAKAKI T., MISHIMA A., SUZUKI E., SHINTANI F., FUJII T. 2000. *Glufosinate ammonium stimulates nitric oxide production through N-methyl D-aspartate receptors in rat cerebellum*. *Neurosc. Lett.* 290: 209–212.
- OKTABA W. 1977. *Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczalnictwa*. PWN Warszawa: 310 ss.
- RÓŻAŃSKI L. 1996. *Vademecum pestycydów*. Agra-Enviro Lab. Poznań 11–72.

SIES II. 1985. *Oxidative stress: damage to intact cells and organs*. Philos. Trans., Soc., Lond., Biol. Sci. 17(311): 617–631.

WATANABE T. 1996. *Apoptosis induced by glufosinate ammonium in the neuroepithelium of developing mouse embryos in culture*. Neurosc. Lett. 222: 17–20.

WIESER R., ADAM G., WAGNER A., SCHULLER C., MARCILER G., RUIS H., KRAWIEC Z., BIL-ŃSKI T. 1991. *Heat shock factor-independent control of transcription of the CTT1 gene encoding the cytosolic catalase T of Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 266: 12406–12411.

Słowa kluczowe: drożdże, glufozinat amonu, katalaza

Streszczenie

W prezentowanej pracy zbadano wpływ herbicydu Basta na przeżywalność komórek drożdży i aktywność katalazy w komórkach drożdży *S. cerevisiae* w logarytmicznej fazie hodowli. Herbicyd Basta zawierający glufozinat amonu o stężeniach 0,3–0,6 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ powodował jedynie niewielkie obniżenie przeżywalności komórek, natomiast wyższe dawki tego związku o stężeniu 1,2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ i 3,0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ powodowały spadek przeżywalności o 10% i o 18%. Stwierdzono, że aktywność katalazy wzrasta znacząco podczas stresu wywołanego przez ten herbicyd. Po inkubacji komórek drożdży z tym herbicydem zawierającym 1,2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ glufozinatu amonu stwierdzono wzrost aktywności katalazy o 330% w porównaniu z próbą kontrolną. Sugeruje to, że glufozinat amonu wywołuje stres oksydacyjny w komórkach drożdży.

EFFECT OF BASTA HERBICIDE ON CATALASE ACTIVITY IN *Saccharomyces cerevisiae* YEAST CELLS

Krzepiłko Anna, Święciło Agata
Institute of Agricultural Sciences in Zamość,
Agricultural University, Lublin

Key words: yeast, glufosinate ammonium, catalase

Summary

This study investigated the effect of the herbicide Basta on the survival rate and catalase activity of *S. cerevisiae* yeast cells in the logarithmic phase of growth. The herbicide Basta containing glufosinate ammonium in concentrations of 0.3–0.6 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ caused only a small decrease in the survival rate of the cells, whereas higher doses of this compound, in concentrations of 1.2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ and 3.0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, caused a 10% and 18% decrease in survival rate. It was found that catalase activity increases significantly under stress induced by this herbicide. After

the yeast cells were incubated with the herbicide containing $1.2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ of glufosinate ammonium, there was noted a 330% increase in catalase activity in comparison with the control sample. This suggests that glufosinate ammonium induces oxidative stress in yeast cells.

Dr Anna **Krzepińko**
Instytut Nauk Rolniczych
Akademia Rolnicza w Lublinie
ul. Szczepkowska 102
22-400 ZAMOŚĆ