2. При изучении аэромонад было установлено, что изолируемые микроорганизмы относятся к 6 различным видам: *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. eucrenophila*, *A. schubertii*.

3. При тестировании биологических свойств для белых мышей и рыб установлено, что *A. hydrophila* является наиболее патогенной, культура высоковирулентна, токсигенна, токсин вызывает гибель подопытных через 8-9 часов, без клинических признаков заболевания. *A. sobria* – культура вирулентна, слаботоксигенна, гибель животных отмечена через 20-22 часа. *A. veronii* – культура вирулентна, нетоксигенна, гибель наступает через 70 часов. *A. eucrenophila* и *A. schubertii* не вызывали гибели подопытных животных.

1. Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб, 2 том, 1999. Москва, АМБ-агро, с.142-151
2. Гулюкин М.И., Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Коломыцев С.А. Анализ эпизоотической ситуации по болезням рыб в России //Ветеринария. 2011. № 8. С. 3-7.
3. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С. Современное состояние проблемы аэромоноза рыб//Рыбн.хоз-во. сер. аквакультура: информ.пакет «Болезни рыб» - М.: ВНИЭРХ. 1997. – Вып.2. – с.1-9
4. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С., Бычкова Л.И., Смирнов Л.П. Биологические свойства аэромонад и их роль в патологии рыб// Рыбн.хоз-во. сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре: Анализ. и реф. инф.- М.: ВНИЭРХ, - 2001. – Вып. 1 – с.1-10
5. Trust T.S.& Sparrow R.A. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. Canadian Journal of microbiology, 1974, 20, 1219-1228
6. Ventura M.T. & Grizzle J.M. Evaluation of portals of entry of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. Aquaculture, 1987, 65, 205-214
7. George W.I., Nakata M.M., Thompson J. & White M.I. *Aeromonas*-related diarrhea in adults. Archives of internal medicine, 1985, 145, 2207-2211
8. Amin N.E., Abdallah I.S., Elallawy T. & Ahmed S.M. Motile *Aeromonas* septicemia among *Tilapia nilotica* (*Sarotherodon niloticus*) in Upper Egypt. Fish pathology, 1985, 20, 93-97
9. Ruangpan L., Kitao T. & Yoshida T. Protective efficacy of *Aeromonas hydrophila* vaccines in Nile tilapia. Immunology & Immunopathology, 1986, 12, 345-350
10. Дрошнев А.Е. Разработка комплексного препарата "ВИТАРОЛ-Е" для антиоксидантной защиты карповых рыб при аэромонозе, Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук. Щёлково, 2010
11. Стаффорд В.В., Дрошнев А.Е. Патоморфологические изменения при экспериментальном аэромонозе карпов // В сборнике: Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел Международная научно-практическая конференция, посвященная 50-летию со дня основания лаборатории лейкологии, лаборатории ихтиопатологии и отдела охраны полезной энтомофауны. 2011. С. 84-85
12. Пичугина Т.Д., Борисова М.Н., Завьялова Е.А., Козлова В.И. Взаимодействие различных видов аэромонад с культурой клеток эпителиальной папилломы карпа // В книге: Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов Сборник тезисов докладов Всероссийской научно-практической конференции. Москва, 2003. С. 104-105.
13. Определитель бактерий Берджи, Д.Холта и др./Под ред. Покровского В.И. 1997.

Рахманова Т.И., Даллакян А.Т., Мазур Е.И., Ситник С.А., Резникова М.Г., Ал-Кхаилани Г.Х.И.

Интенсивность свободнорадикального окисления в клетках *Yarrowia lipolytica* при выращивании в условиях экстремальных значений pH среды

*Воронежский государственный университет
(Россия, Воронеж)*

doi: 10.18411/lj-05-2020-02

idsp: ljjournal-05-2020-02

Аннотация

Исследована интенсивность свободнорадикального окисления в клетках дрожжей *Yarrowia lipolytica* при выращивании на средах с различными значениями pH

(4,0, 5,5 и 9,0). Установлено, что при выращивании, как в кислых, так и в щелочных условиях наблюдалось интенсификация свободнорадикального окисления, о чем свидетельствует возрастание параметров биохемилюминесценции ($I_{\max}$ и S), накопление диеновых конъюгатов и снижение активности аконитатгидратазы. Рост клеток в экстремальных условиях сопровождался мобилизацией работы антиоксидантной системы, о чем свидетельствует тангенс угла наклона кривой биохемилюминесценции.

Ключевые слова: экстремофильные дрожжи, pH, свободнорадикальное окисление, биохемилюминесценция, аконитатгидратаза.

Abstract

The intensity of free radical oxidation in *Yarrowia lipolytica* yeast cells was studied when grown on media with different pH values (4,0, 5,5 and 9,0). It was found that during cultivation, both in acidic and in alkaline conditions, intensification of free radical oxidation was observed, as evidenced by an increase in biochemiluminescence parameters ($I_{\max}$ and S), the accumulation of diene conjugates and a decrease in the activity of aconitate hydratase. Cell growth under extreme conditions was accompanied by the mobilization of the antioxidant system, as evidenced by the slope of the biochemiluminescence curve.

Keywords: extremophilic yeast, pH, free radical oxidation, bio-chemiluminescence, aconitate hydratase.

В настоящее время дрожжи *Yarrowia lipolytica* активно изучаются с точки зрения филогенетической эволюции, физиологии и генетики, использования в биотехнологии и других сферах. Создан международный центр по координации данных исследований, регулярно проводятся международные конференции [1]. Особый интерес у исследовательских групп вызывает характерная черта дрожжей *Yarrowia lipolytica* – это умение адаптироваться к различным условиям окружающей среды, в том числе и к экстремальным. Известно, что данный вид дрожжей способен не только выдерживать pH-стресс, но и эффективно развиваться на средах с pH до 9.5. Однако механизмы, обеспечивающие выживание *Yarrowia lipolytica* в данных условиях, остаются до конца не выясненными.

В этой связи актуальным представляется оценка интенсивности свободнорадикального окисления (СРО) в клетках *Yarrowia lipolytica* при выращивании в условиях экстремальных значений pH среды, что и явилось целью настоящей работы.

В качестве объекта был использован штамм экстремофильного вида дрожжей *Yarrowia lipolytica* W 29, полученные из коллекции Института биохимии имени А.Н. Баха. В ходе работы были сформированы три экспериментальные группы:

1. Клетки *Yarrowia lipolytica*, выращенные на питательной среде с pH 4,0.
2. Клетки *Yarrowia lipolytica*, выращенные на питательной среде с pH 5,5.
3. Клетки *Yarrowia lipolytica*, выращенные на питательной среде с pH 9,0.

Культуру выращивали в качалочных колбах емкостью 1000 мл на глицерин – содержащей (1%) среде при постоянном перемешивании в строго контролируемых условиях, как описано в работе [2]. Биомассу дрожжей собирали на стадии стационарной фазы роста (24 ч), что соответствовало величине оптической плотности (ОП) суспензии клеток при 590 нм 9,0-10,0 ед. Для получения суспензии клеток и отделения от культуральной жидкости использовали метод центрифугирования, для разрушения клеток был использован метод ультразвуковой дезинтеграции [2].

Интенсивность процессов СРО и активность антиоксидантной системы (АОС) оценивали с помощью параметров биохемилюминесценции (БХЛ), которые определяли на биохемилюминометре БХЛ-06М с программным обеспечением. Кинетическую

кривую БХЛ регистрировали в течение 30 секунд (времени наибольшей информации об интенсивности протекающего СРО). Определяли следующие параметры: светосумму хемилюминесценции (S), интенсивность вспышки ($I_{\max}$) и тангенс угла наклона кинетической кривой ($\operatorname{tg}\alpha_2$). Активность аконитатгидратазы (АГ) определяли спектрофотометрически на СФ 56 при 235 нм в среде, содержащей 0,05 мМ трис-НСI-буфер (рН 7,8), 4 мМ цитрат. За ферментативную единицу (Е) принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мкмоль субстрата в 1 мин при 25°C. Активность фермента выражали в расчете в виде удельной активности (Е/мг белка). Общий белок определяли по методу Лоури [3]. Количество диеновых конъюгатов (ДК) спектрофотометрическим методом [4].

Статистическую обработку данных проводили на IBMPC/AT с использованием программы “Stadia”. Обсуждаются статистически значимые различия при $p < 0,05$.

Известно, что поддержание нативной конформации мембранных структур, является основным адаптивным свойством дрожжевых организмов, подвергающихся различного рода стрессовым воздействиям. Индуцированное активными формами кислорода (АФК) пероксидное окисление липидов (ПОЛ) клеточных мембран обуславливает изменения в последних, приводящие к нарушению физиологии клетки, вплоть до ее гибели [5]. Кроме того, отмечено, что стрессовые воздействия различной природы (тепловой шок, истощение по субстрату, солевой, осмотический и собственно окислительный стрессы) приводят к ингибированию белкового синтеза, в частности, на стадии элонгации и терминации, что также отражается на мембранных функциях дрожжевой клетки [6]. Необходимо отметить, что основные действующие АФК являются короткоживущими соединениями, присутствие которых верифицировать затруднительно. В связи с этим большинство биохимических подходов к оценке интенсивности процессов СРО косвенные. Более точным методическим подходом служит изучение БХЛ, позволяющий в режиме реального времени оценить уровень радикалов липидов при детектировании их свечения в видимой области спектра в спонтанном и железоиндуцированном режиме. Данный метод основан на использовании реакции Фентона. Кроме того, указанная биофизическая технология дает возможность уточнить текущую общую антиоксидантную активность биосубстрата. В ходе оценки интенсивности СРО методом БХЛ в культуре клеток *Yarrowia lipolytica* при адаптации к различным условиям рН установлено, что в стационарной фазе роста культуры дрожжевых клеток параметры $I_{\max}$ и S , характеризующие интенсивность свободнорадикальных процессов, существенно возрастали в условиях экстремальных рН среды (табл.). Так, интенсивность максимальной вспышки увеличивалась в 1,4 и 1,7 раз при рН среды, равном 4,0 и 9,0, соответственно, по сравнению с параметром при рН 5,5. При этом светосумма вспышки возрастала в большей степени: в 1,4 и 1,9 раз при экстремально кислых и щелочных условиях, соответственно.

Наряду с этим известно, что высокая адаптивная способность дрожжей и грибов связана с наличием целого комплекса антиоксидантной защиты, препятствующего развитию в клетках окислительного стресса [7]. При исследовании величины тангенса угла падения кинетической кривой, характеризующая общую антиоксидантную активность, установлено, что данный параметр был в 1,2 раза выше при выращивании на среде с рН 4,0, чем соответствующий параметр при условиях выращивания рН 5,5 и 9,0. Необходимо отметить, что данный параметр в последних случаях практически не отличался (табл.).

Известно, что образующиеся в процессе ПОЛ гидропероксиды неустойчивы и их распад приводит к появлению первичных продуктов - ДК, представляющих собой высокотоксичные соединения, оказывающие повреждающее действие на мембраны и клеточные структуры.

Таблица.

Показатели свободнорадикальных процессов в экстрактах клеток *Y. lipolytica* при выращивании на питательных средах с pH 4,0 (1), 5,5 (2) и 9,0 (3)*

Показатели СРО		Исследованные группы		
		1	2	3
Параметры БХЛ	S, mV*сек	847±39,0	605±28,2	1149±52,8
	I _{max} , mV	175±6,81	125±5,44	212±9,71
	tg α ₂	78,0±3,62	65,0±2,93	67,0±2,81
Диеновые конъюгаты, мкМ		0,80±0,03	0,67±0,02	0,87±0,03
Удельная активность АГ, Е/мг белка		0,009±0,0003	0,012±0,0004	0,007±0,0003

*Примечание - отличия достоверны (уровень значимости - $P < 0,05$)

Показано, что при адаптации *Yarrowia lipolytica* к экстремальным условиям pH наблюдалось небольшое увеличение содержания ДК в экстрактах клеток, выращенных при pH 4,0 в 1,2 раза и при pH 9,0 – в 1,3 раза по сравнению с уровнем данного показателя у клеток, выращенных в условиях нормы (табл.). Полученные данные свидетельствуют об интенсификации СРО на фоне адаптации *Yarrowia lipolytica* к экстремальным значениям pH среды, что проявляется в накоплении высокотоксичных первичных продуктов ПОЛ.

Исследование активности аконитатгидратазы – маркера развития оксидативного стресса, также выявило интенсификацию процессов СРО в клетках *Yarrowia lipolytica*, растущих в условиях экстремальных значений pH. Так, при выращивании культуры в условиях оптимального pH активность фермента, выраженная в виде удельной активности, была в 1,7 раз и 1,3 раза больше, чем при выращивании на средах с pH 9,0 и 4,0, соответственно (табл.).

Полученные результаты об интенсификации СРО в клетках *Yarrowia lipolytica* при экстремальных условиях согласуются с данными литературы: определение скорости генерации АФК в гомогенатах дрожжевых клеток выявило существенное увеличение образования АФК как в кислых, так и в щелочных условиях pH среды, тогда как при оптимальном значении pH степень генерации АФК была почти в 1,5 раза ниже [2].

1. Nicaud Jean-Marc *Yarrowia lipolytica* / Jean-Marc Nicaud // Yeast. – 2012. – № 29. – P. 409-418.
2. Окислительно-восстановительный статус экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* при адаптации к pH-стрессу / В.Ю. Секова, Н.Н. Гесслер, Е.П. Исакова, А.Н. Антипов, Д.И. Дергачева, Ю.И. Дерябина, Е.В. Трубникова // Прикладная биох. и микробиол. – 2015. – Т. 51, № 6. – С. 570-577.
3. Protein measurement with the Folin-phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 194. – P. 265-275.
4. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1972. – С.63-64.
5. Runas K.A. Low levels of lipid oxidation radically increase the passive permeability of lipid bilayers / K.A Runas, N. Malmstadt // Soft Matter. – 2015. – V. 11, № 3. – P. 499-505.
6. Simpson C.E. Adaptation to stress in yeast / C.E. Simpson, M. P. Ashe // Biochem. Soc. Trans. – 2012. – V. 40, № 4. – P. 794-749.
7. Антистрессовые системы дрожжей *Yarrowia lipolytica* / А.Ю. Аринбасарова, Е.Н. Бирюкова, А.Г. Меденцев // Прикладная биох. и микробиол. – 2015. – Т. 51, № 1. – С. 122-131.