

УДК 579.246.4

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НЕФТЕПРОДУКТОВ КАК СТРЕССОВОГО ФАКТОРА НА РАЗВИТИЕ КОЛОНИЙ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК**Т.А. Василенко, Е.О. Бездетко***Белгородский государственный технологический университет имени В.Г. Шухова, Белгород, Россия*

Существует множество факторов, влияющих на рост и развитие микроорганизмов. В работе изучено воздействие нефтепродуктов на колонии клеток дрожжей двух видов *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*. При этом мы оценивали различные уровни стресса и определили жизнеспособность клеток дрожжей методом окраски раствором Люголя, метиленовым синим и сафранином.

Различные группы микроорганизмов способны использовать нефтепродукты в качестве источника углерода или наоборот испытывать угнетение от их действия. Активность каталазы является маркером направленности и интенсивности биологических процессов в почвах в условиях нефтезагрязнения [1]. Выявлено, что интродукция полифункционального биопрепарата в почву, содержащая *Acinetobacter calcoaceticus*, *Ochrobactrum intermedium*, *Pseudomonas koreensis*, *Paenibacillus ehimensis*, снижала содержание нефти в 3,1–3,6 раза и повышала на 2–3 порядка численность основных физиологических групп почвенных микроорганизмов, участвующих в ее трансформации, а также ускоряла всхожесть семян [2]. Выявлено, что активный ил, отбираемый с очистных сооружений нефтеперерабатывающих производств, гораздо дешевле и не уступает по эффективности действию биопрепаратов на основе искусственных биоценозов [3].

Клетки дрожжей испытывают стресс от различных факторов. Высокие концентрации глюкозы и этанола, давление, кислотность, окислители – все эти факторы способствуют различным видам стресса дрожжевых клеток. Осмотический стресс происходит в сусле при пивоварении [4, 5].

Спирт образуется в процессе брожения и его влияние на дрожжи определяется как этанольный стресс. Нарушение свертывания белка в эндоплазматическом ретикулуле вызывает развернутый белковый ответ, который запускается в почковании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [6].

Обработка углекислым газом под высоким давлением – это метод нетермической пастеризации. В одном из исследований штаммы дрожжей подвергали обработке диоксидом углерода под высоким давлением и температуре и в дальнейшем были проанализированы повреждения органелл *Saccharomyces cerevisiae*, которые визуализировались с помощью специфичных для органелл *GFP fusion* белков. Восстановление дрожжевой клетки или её жизнеспособность сопровождалась разрушением эндоплазматического ретикулула, ядерной мембраны, тела Гольджи и ядрышка. Однако видимых повреждений клеточной мембраны не наблюдалось. Микроскопией было подтверждено, что обработка углекислым газом под высоким давлением повреждает мембраны основных органелл, но не клеточную мембрану и определяется как стресс дрожжевых клеток [7].

Когда дрожжевые клетки подвергаются воздействию концентраций окислителей, они адаптируются к последующей летальной обработке. Эта адаптация включает в себя толерантность к окислительному повреждению, а не защиту клеточных компонентов. М-тирозин используется в качестве чувствительной меры окислительного повреждения белка, и такое повреждение накапливается в дрожжевых клетках. Глутатион (трипептид) представляет собой одну из основных клеточных защит от атаки свободных радикалов и играет важную роль в адаптации к окислительному стрессу. Доказано что при атаке свободных радикалов, нарушающей метаболизм глутатиона, в нормальных аэробных условиях роста, дрожжи накапливают значительные уровни м-тирозина [8].

Способность реагировать и приспосабливаться к изменениям физической среды является еще одним универсальным и существенным свойством клеток. Клетки реагируют на механический сжимающий стресс, быстро индуцируя образование аутофагосом. Было доказано, что аутофагия очень чувствительна к изменениям механического давления и протекающие реакции градуированы. Так же механическая индукция аутофагии не зависит от времени и носит временный характер, длящийся до тех пор, пока клетки не адаптируются к новой среде и не восстановят свою форму. Таким образом, аутофагический ответ является частью комплексного ответа на механический вызов, позволяя клеткам справляться с постоянно меняющейся физической средой [9].

Жизнеспособность дрожжевых клеток, выращенных в различных условиях, можно определять с помощью красителей с эозином-У и Янусом Грином В, а также по количеству колоний клеток, посаженных на инфузионный агар с добавлением фактора роста гистоплазмы и бычьего сывороточного альбумина. Метод подсчета колоний на агаре является надежной процедурой определения жизнеспособности дрожжевых клеток *Histoplasma capsulatum*, а тесты с красителями не обязательно дифференцируют живые клетки от мертвых [10].

Для определения общего количества клеток и жизнеспособности *Saccharomyces carlsbergensis* разработали автоматизированный метод цитометрии с использованием недавно синтезированного ДНК-флуоресцентного красителя *PO-TEDM-1* и нового прибора *Easycounter YC*. Данный метод может быть использован в анализах, включающих простой подсчет клеток и обеспечение качества биообработки образцов [11].

Актуальным направлением является использование отходов производства [12]. Отходы производства могут быть использованы в биотехнологических процессах для роста и развития микроорганизмов. Перед высевом микроорганизмов были приготовлены 5,0 %-ные водные вытяжки:

- 1) *Saccharomyces cerevisiae* – из порошкообразных спиртовых дрожжей.
- 2) *Schizosaccharomyces pombe* – из отхода производства кормовых добавок.

Высев водных вытяжек в количестве 1 мл с разбавлением в 3 раза проводили на двух питательных средах на среде Сабура (рН = 6,62) и экспериментальной среде на основе отхода производства (рН = 3,96). После посева в чашки Петри на поверхность застывших сред дополнительно вносили 1 см³ нефтепродуктов (индустриальное масло И-20) и равномерно распределяли микробиологической петлей. Чашки выдерживали при температуре 30–31 °С в термостате. Повторность всего эксперимента трехкратная. Количество колоний через 24 ч после посева на 1 см² площади в чашке Петри приведено в табл. 1. Установлено, что для *Schizosaccharomyces pombe* более благоприятная экспериментальная среда, а для *Saccharomyces cerevisiae* – среда Сабура. Для жизнедеятельности грибов оптимальными условиями являются следующие: температура 30–32 °С, рН 4,2–4,5.

Таблица 1. Количество колоний дрожжей в чашке Петри на 1 см² (разведение вытяжек в 3 раза)

Вид дрожжей	Экспериментальная среда		Среда Сабура	
	Контроль	Добавление 1 дм ³ нефтепродуктов	Контроль	Добавление 1 дм ³ нефтепродуктов
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27,9	18,5	47,67	36,8
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	26,6	17,4	21,5	11,4

Фотографии колоний приведены на рис. 1–4. Визуально наблюдается угнетение колоний после введения нефтепродуктов. Морфометрический анализ клеток дрожжей проводили при микроскопировании прижизненных препаратов через сутки после посева. Также для определения количества гликогена клетки окрашивали раствором Люголя (табл. 2). Раствор Люголя окрашивает клетки в желтый цвет, а гликоген – в коричневый. В зрелых клетках гликоген занимает от 1/3 до 2/3 клетки и более. В клетках с низкой физиологической активностью окрашенный гликоген занимает менее 1/4 клетки. В молодых клетках гликоген отсутствует, а клетки при окрашивании раствором йода приобретают бледно-желтый цвет [4, 13]. Фотографии окрашенных препаратов клеток дрожжей раствором Люголя (контроль) приведены на рис. 5–6.

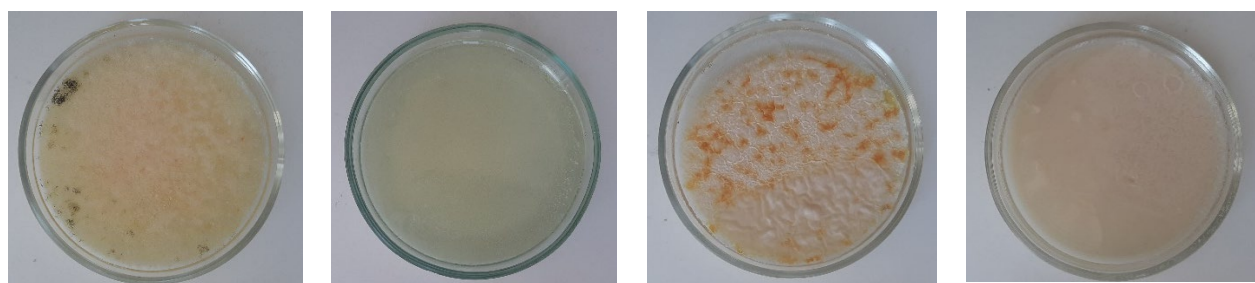
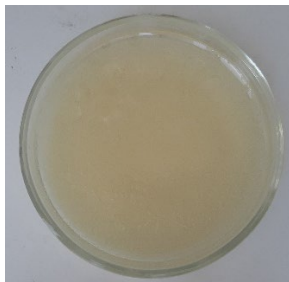


Рис. 1. Фотографии колоний (контроль) *Saccharomyces cerevisiae* на экспериментальной среде (1) и среде Сабура (2)

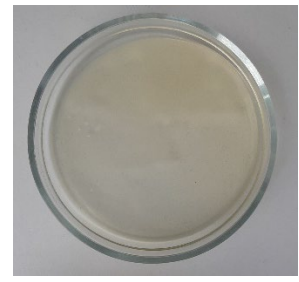
Рис. 2. Фотографии колоний (контроль) *Schizosaccharomyces pombe* на экспериментальной среде (1) и среде Сабура (2)



1

2

Рис. 3. Фотографии колоний (с добавлением нефтепродуктов) *Saccharomyces cerevisiae* на экспериментальной среде (1) и среде Сабуро (2)



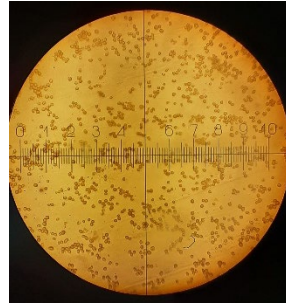
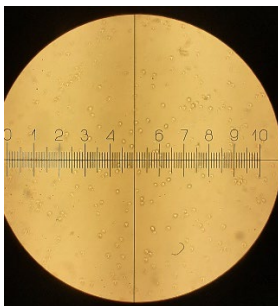
1

2

Рис. 4. Фотографии колоний (с добавлением нефтепродуктов) *Schizosaccharomyces pombe* на экспериментальной среде (1) и среде Сабуро (2)

Таблица 2. Диаметр клеток дрожжей (увеличение $\times 280$)

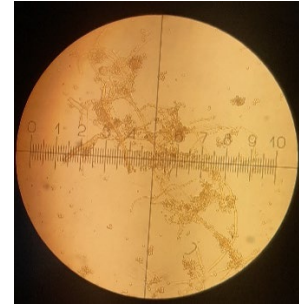
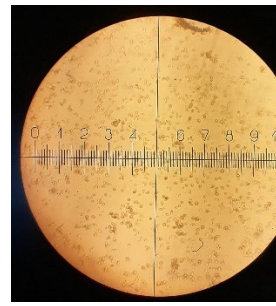
Вид дрожжей	Экспериментальная среда		Среда Сабуро	
	Контроль	Добавление 1 дм ³ нефтепродуктов	Контроль	Добавление 1 дм ³ нефтепродуктов
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<1,7–3,32 мкм; < 1 % зрелых клеток	<1,0–2,0 мкм; < 0,5 % зрелых клеток	<1,7–2,5 мкм; зрелые клетки отсутствуют	<1,0–2,0 мкм; зрелые клетки отсутствуют
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<1,7–2,5 мкм; 10 % зрелых клеток	<1,0–2,0 мкм; < 2,0 % зрелых клеток	0,83–1,7; 5 % зрелых клеток	<0,75–1,5 мкм 1 % зрелых клеток



1

2

Рис. 5. Фотографии колоний (контроль) *Saccharomyces cerevisiae* на экспериментальной среде (1) и среде Сабуро (2)

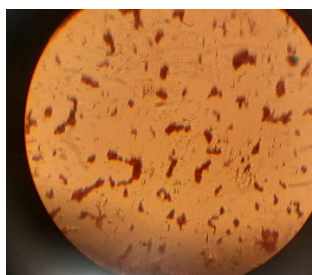


1

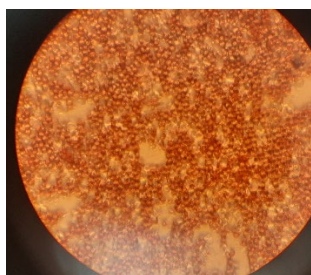
2

Рис. 6. Фотографии колоний (контроль) *Schizosaccharomyces pombe* на экспериментальной среде (1) и среде Сабуро (2)

Для выявления клеточных ядер в клетках дрожжей, в данной работе окраску проводили метиленовым синим и сафранином [4, 13]. Клетки окрашиваются в красный цвет, если они живые и содержат оксидоредуктазы; в противном случае – окраска фиолетовая (рис. 7–9).

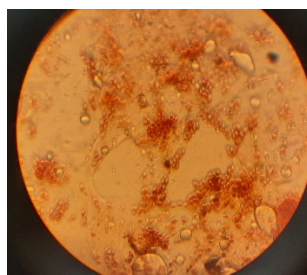


1

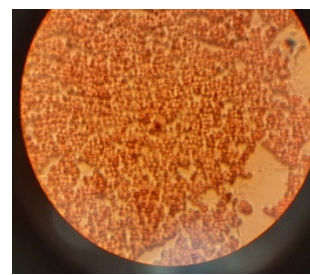


2

Рис. 7. Фотографии колоний (контроль) *Saccharomyces cerevisiae* на экспериментальной среде (1) и среде Сабуро (2)



1



2

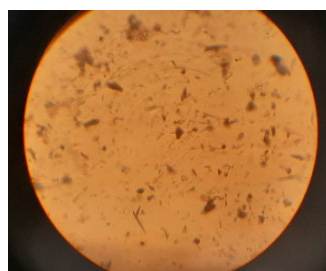
Рис. 8. Фотографии колоний (с добавлением нефтепродуктов) *Saccharomyces cerevisiae* на экспериментальной среде (1) и среде Сабуро (2)

После окрашивания было установлено, что фиолетовая окраска характерна только в случае инкубации *Schizosaccharomyces pombe* на среде Сабуро в присутствии нефтепродуктов. Во всех остальных случаях – окраска красная.

В рамках эксперимента к колониям дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, которые развивались на среде Сабуро, сутки вносили индустриального масла И-20 в количестве 1 дм³ сразу при высеве и на 3-и сутки. На рис. 10 приведены фотографии чашек Петри на 8 день эксперимента.



1



2

Рис. 9. Фотографии колоний клеток *Schizosaccharomyces pombe* на среде Сабуро: контроль (1); с добавлением нефтепродуктов (2)

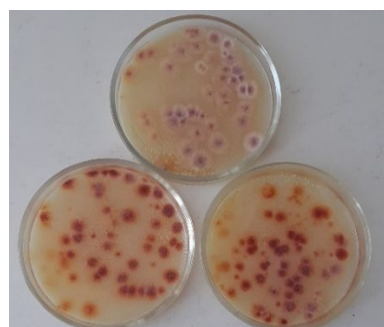


Рис. 10. Фотографии колоний (контроль) *Saccharomyces cerevisiae* на экспериментальной среде: сверху – без добавления нефтепродуктов; внизу с внесением 1 дм³ нефтепродуктов: слева – внесение на 3 сутки после посева; справа – внесение при высеве

Визуально отмечена окраска колоний без внесения нефтепродукта – фиолетовая с белыми краями. Форма колоний – круглая с ризоидным краем. При наличии нефтепродукта колонии приобретают красную окраску независимо от того, в какой период роста дрожжей была осуществлена их добавка (индустриальное масло И-20 в количестве 1 см³) и исчезает белый край (он приобретает желтую окраску). Проведен подсчет диаметра пигментированных колоний дрожжей и их количества на 7 день эксперимента: без добавления нефтепродуктов: 37 пигментированных колоний со средним $d = 0,97$ мм; с добавлением нефтепродуктов при посеве: 59 пигментированных колоний со средним $d = 0,77$ мм; с добавлением нефтепродуктов на 3 сутки после посева: 56 пигментированных колоний со средним $d = 0,82$ мм. В результате исследований было установлено, что наличие нефтепродуктов (индустриальное масло И-20) на поверхности двух агаризованных сред угнетает после посева клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*, что проявляется в уменьшении их размера и количества.

Полученные данные свидетельствуют, что при инкубации на следующие сутки после посева диаметр клеток при наличии нефтепродуктов уменьшился в следующее количество раз: экспериментальная среда: *Saccharomyces cerevisiae* – в 1,67 раза; *Schizosaccharomyces pombe* – в 1,4 раза; среда Сабуро: *Saccharomyces cerevisiae* – в 1,4 раза; *Schizosaccharomyces pombe* – в 1,12 раза.

Аналогично получены данные по количеству колоний дрожжей: экспериментальная среда: *Saccharomyces cerevisiae* – уменьшение в 1,51 раза; *Schizosaccharomyces pombe* – в 1,53 раза; среда Сабуро: *Saccharomyces cerevisiae* – уменьшение в 1,3 раза; *Schizosaccharomyces pombe* – в 1,89 раза.

При наличии нефтепродукта (в количестве 1 см³) колонии *Saccharomyces cerevisiae* меняют окраску с фиолетовой на красную, исчезает белый край, который присутствует в контрольном образце колоний. Форма колоний без присутствия нефтепродукта – круглая с ризоидным краем; при его наличии – круглая с фестончатым краем. После окрашивания клеток дрожжей метиленовым синим и сафранином было установлено, что фиолетовая окраска характерна только в случае инкубации *Schizosaccharomyces pombe* на среде Сабуров в присутствии нефтепродуктов. Во всех остальных случаях – окраска красная.

Литература

1. Ковалева Е.И., Пукальчик М.А., Яковлев А.С. О возможностях применения активности каталазы при экологическом нормировании и оценке нефтезагрязненных почв. Экология и промышленность России. 2016. Т.20. № 11. С. 26–31.
2. Коршунова Т.Ю., Бакаева М.Д., Логинов О.Н. Полифункциональные биопрепараты-нефедеструкторы: влияние на растения и содержание нефти в почве. Экология и промышленность России. 2018. Т.22. № 9. С. 18–22.
3. Ксенофонтов Б.С., Козодаев А.С., Таранов Р.А., Виноградов М.С., Сенник Е.В., Ворopaева А.А. Микробиологические технологии очистки почвы с использованием естественных биоценозов. Экология и промышленность России. 2015. Т.19. № 9. С. 4–7.
4. Меледина Т.В., Давыденко С.Г., Васильева Л.М. Физико-логистическое состояние дрожжей: – СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 48 с.
5. Халилова Э.А., Исламмагомедова Э.А., Котенка С.Ц., Гасанов Р.З., Макарова А.А., Аливердиева Д.А. О морфологических свойствах штамма *S. cerevisiae* Y-503 в условиях осмотического, температурного и кислотного стресса // Известия Самарского научного центра РАН. 2019. № 2–2. С. 133–141.
6. Miyagawa K. – I., Ishiwata-Kimata Y., Kohno K. and Kimata Y. (2014) Ethanol stress impairs protein folding in the endoplasmic reticulum and activates Ire1 in *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78:8, 1389–1391, DOI: 10.1080/09168451.2014.921561
7. Takahashi U., Hamada K. and Iwahashi H. (2019) Critical damage to the cellular organelles of *Saccharomyces cerevisiae* under sublethal conditions upon high pressure carbon dioxide treatment, *High Pressure Research*, 39:2, 273–279, DOI: 10.1080/08957959.2019.1610747
8. Poljak A., Dawes I.W., Ingelse B.A., Duncan M.W., Smythe G.A. and Grant C.M. (2003) Oxidative damage to proteins in yeast cells exposed to adaptive levels of H₂O₂, *Redox Report*, 8:6, 371–377, DOI: 10.1179/135100003225003401
9. Jason S. King, Douwe M. Veltman and Robert H. Insall (2011) The induction of autophagy by mechanical stress, *Autophagy*, 7:12, 1490–1499, DOI: 10.4161/autophagy.7.12.17924
10. Kyung J. Kwon-Chung and Ram P. Tewari (1987) Determination of viability of *Histoplasma capsulatum* yeast cells grown in vitro: comparison between dye and colony count methods, *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 25:2, 107–114, DOI: 10.1080/02681218780000151
11. Atanasova M., Yordanova G., Nenkova R., Ivanov Y., Godjevargova T. and Dinev D. (2019) Brewing yeast viability measured using a novel fluorescent dye and image cytometer, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33:1, 548–558, DOI: 10.1080/13102818.2019.1593053
12. Сапронова Ж.А., Свергузова С.В., Святченко А.В. Технология получения железосодержащего коагулянта из отходов сталеплавильного производства для очистки ливневых вод // Вестник БГТУ им. В.Г. Шухова. 2016. № 12. С. 160–164.
13. Давыденко С.Г., Васильева Л.М., Баташов Б.Э., Дедегкаев А.Т. Применение методов окраски дрожжей для оценки их физиологического состояния // Пиво и напитки. 2011. № 5. С. 8–10.