

УДК 663.125/663.252.4

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЗНАЧЕНИЙ рН НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

© 2018 Э.А. Исламмагомедова, Э.А. Халилова, С.Ц. Котенко,
Р.З. Гасанов, Д.А. Аливердиева

Прикаспийский институт биологических ресурсов
Дагестанского научного центра РАН, г. Махачкала

Статья поступила в редакцию 30.07.2018

Изучено влияние экстремальных условий на физиологическое состояние клеток дрожжей *Saccharomyces*. В работе использовались штамм *S. cerevisiae* Y-503, гетерозиготный тетраплоид, полученный методом селекции в результате лазерного воздействия на смешанную культуру клеток промышленных штаммов, и *S. cerevisiae* DAW-За - гетероталличный гаплоид, потомок линии штамма Y-503. Показано, что функциональное состояние дрожжей тесно связано с их морфологическими параметрами. В условиях рН – стресса происходят изменения формы и размеров клеток Y-503 и DAW-За, обнаружено наличие зернистой цитоплазмы, крупные вакуоли в отдельных клетках. Обнаружено, что экстремальные условия влияют на морфологические особенности гигантских колоний. Оптимальным для роста колоний исследуемых дрожжей является рН 4.5, при этом клетки Y-503 и DAW-За были достаточно устойчивы к экстремально высоким (11.0) и низким (3.0) рН. В условиях экстремальных концентраций NaCl и рН клетки приобретали округлую форму, для гигантских колоний было характерно уменьшение размеров, изменение поверхности, профиля и структуры. Показано, что исследуемые штаммы *S. cerevisiae* по-разному реагируют на вариации концентраций соли и значений рН. Возможно, это объясняется различной пloidностью Y-503 и DAW-За. Показана способность *S. cerevisiae* Y-503 и *S. cerevisiae* DAW-За к росту в неблагоприятных условиях, что делает эти штаммы дрожжей перспективными для использования в различных биотехнологиях.

Ключевые слова: дрожжи *Saccharomyces*, морфология, клетки, гигантские колонии, экстремальные условия, стресс.

Большой интерес исследователей к изучению стрессовых воздействий на микроорганизмы и механизмов регуляции метаболизма клеток в процессе антистрессовой адаптации объясняется актуальностью поиска экстремофильных штаммов – перспективных объектов различных биотехнологий [1 – 4]. В уникальных природных экосистемах, где экстремальные значения рН часто сочетаются с высокими кон-

центрациями солей, микроорганизмы располагают комплексом адаптационных механизмов. Так, уравновешивание внешнего осмотического давления происходит либо за счет накопления или синтеза цитоплазматических осморегуляторов, либо в результате накопления заряженных ионов из окружающей среды [5]. В биотехнологических процессах жизнеспособность штаммов дрожжей, устойчивых к экстремальным условиям, может быть повышена в результате предварительного воздействия небольших доз стрессоров [6].

Известно, что при выращивании дрожжей на средах с высоким рН и содержанием NaCl клетки становятся более округлыми; происходит стабилизация липидного состава митохондриальных мембран, накопление ионов натрия, свободных жирных кислот и аминокислот, что дает возможность клетке нейтрализовать повышенное содержание соли в среде культивирования [7]. В ответ на стресс при низких значениях рН происходит изменение клеточного метаболизма дрожжей *S. cerevisiae*: перегруппировка липидов и уменьшение фосфатидилхолина, одного из основных компонентов клеточной мембраны; перераспределение углеводов в клеточной стенке; значительное изменение белков агрегации, ответственных за снижение темпов ро-

Исламмагомедова Эльвира Ахмедовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии и биотехнологии.

E-mail: islammagomedova@mail.ru

Халилова Эсланда Абдурахмановна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии и биотехнологии.

E-mail: eslinda61@mail.ru

Котенко Светлана Цалистиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии и биотехнологии.

Гасанов Расул Закирович, младший научный сотрудник лаборатории биохимии и биотехнологии. E-mail: gasanov@bk.ru

Аливердиева Динара Алиевна, кандидат биологических наук, зам. директора по научной работе, зав. лаб. биохимии и биотехнологии.

E-mail: aliverdieva_d@mail.ru

ста клеток [8]. Одним из механизмов адаптации некоторых культур микроорганизмов, существующих в природе при низких рН, являются происходящие изменения в последовательности нуклеотидов в хромосомной ДНК [9, 10]. В щелочной среде культивирования происходит увеличение содержания белков митохондрий относительно белков цитоплазмы [11], проявляется способность ферментов функционировать при высоких значениях рН. Так, оптимумы рН большинства ферментов галоалкалоильных микроорганизмов находятся в области щелочных значений.

Независимо от вида воздействия, в экстремальных условиях происходят индукция стресс – белков, накопление полифосфатных и появление липидных гранул, появление в составе липидов жирных кислот с длинной цепью, однотипные изменения ультраструктуры клеток дрожжей – увеличение размеров митохондрий, повышение численности и размеров перокси-
сом [9, 12].

Дрожжи обладают высокой адаптивной способностью, обеспечивающей их существование в экстремальных условиях среды. В этом плане представляет интерес изучение физиологического состояния клеток дрожжей в условиях стресса. Целью работы является исследование влияния различных значений рН на морфологические особенности *Saccharomyces cerevisiae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследований являлись штаммы *S. cerevisiae* Y-503 и *S. cerevisiae* DAW-За из коллекций лаборатории биохимии и биотехнологии ПИБР ДНЦ РАН и Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИГенетика. Штамм *S. cerevisiae* Y-503 получен в результате лазерного воздействия на промышленный штамм *S. cerevisiae* 73 в Прикаспийском институте биологических ресурсов ДНЦ РАН [13]. Штамм Y-503 является гетерозиготным тетрапloidом, штамм DAW-За – гетероталличным гаплоидом, потомком линии штамма Y-503 [14]. Принадлежность штаммов *S. cerevisiae* Y-503 и *S. cerevisiae* DAW-За к таксону *S. cerevisiae* была подтверждена с помощью молекулярно-генетических методов [14].

Штаммы дрожжей выращивались на твердой стандартной средеYPD: дрожжевой экстракт – 0.5 % (BD, США), пептон – 0.5 % (BD, США), глюкоза (D-глюкоза) – 2.0 % (Merk, Германия), агар-агар – 2.5 % (Difco, Нидерланды) на чашках Петри в течение двадцати суток при температуре 30°C при значениях рН: 3.0, 4.5, 7.0, 9.0, 11.0. Кислотность среды корректировалась 1N HCl или 4M KOH (Россия). Для приготовления агаризованной среды с рН 3.0 растворы YPD и

агар-агара автоклавировались отдельно, а затем стерильно объединялись [15].

В работе использовались приборы: ламинарный бокс ВЛ-12 1000 (Россия), сушильный шкаф SNOL 67/350 (Utenos, Литва), микроскоп CX21 (Olympus, Япония), pH-метр Анион 4100 (Анион, Россия); весы аналитические DV215CD (Ohaus Discovery, Швейцария).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что в условиях рН – стресса происходят морфологические изменения клеток и гигантских колоний штаммов *S. cerevisiae* Y-503 и *S. cerevisiae* DAW-За. Морфологические параметры клеток дрожжей тесно связаны с их функциональным состоянием. Обнаружено наличие зернистой цитоплазмы, подтверждающей присутствие запасных питательных веществ; 15 % клеток содержали крупную вакуоль. Проведенный морфометрический анализ исследованных штаммов показал, что изменение рН среды отразилось на форме и размерах клеток (рис. 1). Обнаружено, что при культивировании на твердых средах для клеток штамма Y-503 характерно появление R – форм, в отличие от штамма DAW-За. При выращивании дрожжей на средах с низким содержанием рН 3.0 количество клеток R – формы составляло почти 50 %, и по мере увеличения рН количество таких клеток уменьшалось. В щелочной среде культивирования (рН 11.0) клетки R – формы полностью отсутствовали. Во всех вариантах форма клеток Y-503 в основном овальная, но имелись и округлые клетки небольшого размера. Клетки DAW-За были более однородны и имели в основном округлую форму. Можно сделать вывод, что значение рН 4.5 среды являлось оптимальным для роста обоих штаммов дрожжей.

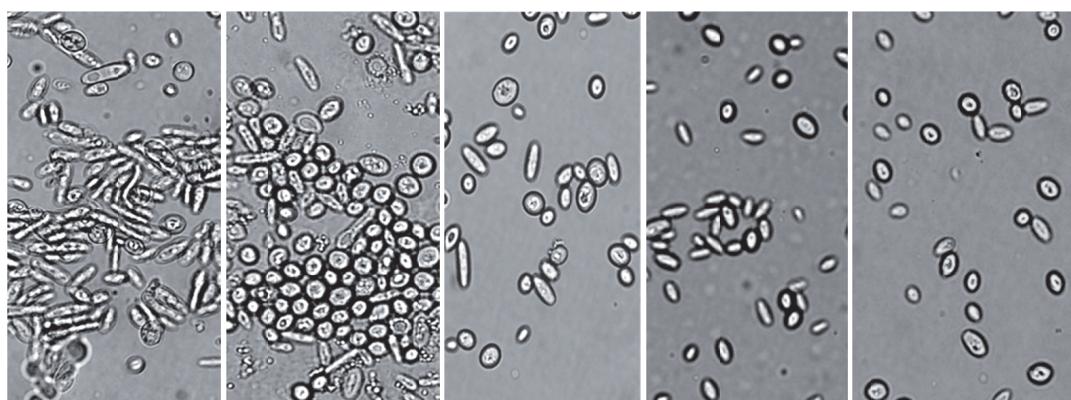
При культивировании на средах с низким значением рН 3.0 наблюдалось уменьшение размеров клеток дрожжей, особенно штамма DAW-За. В щелочных условиях обнаружено разнообразие клеток Y-503, однородность и небольшое уменьшение размеров DAW-За (таблица).

Одним из параметров, по которому оценивали действие рН на физиологические особенности штаммов Y-503 и DAW-За, была морфология гигантских колоний. Нами исследованы двадцатисуточные культуры, выращенные в чашках Петри при 30°C на плотной питательной среде при рН 3.0, 4.5, 7.0, 9.0 и 11.0. Обнаружено, что происходящие в экстремальных условиях трансформации в биохимических процессах и скорости клеточного деления дрожжей оказывают влияние и на морфологические особенности колоний.

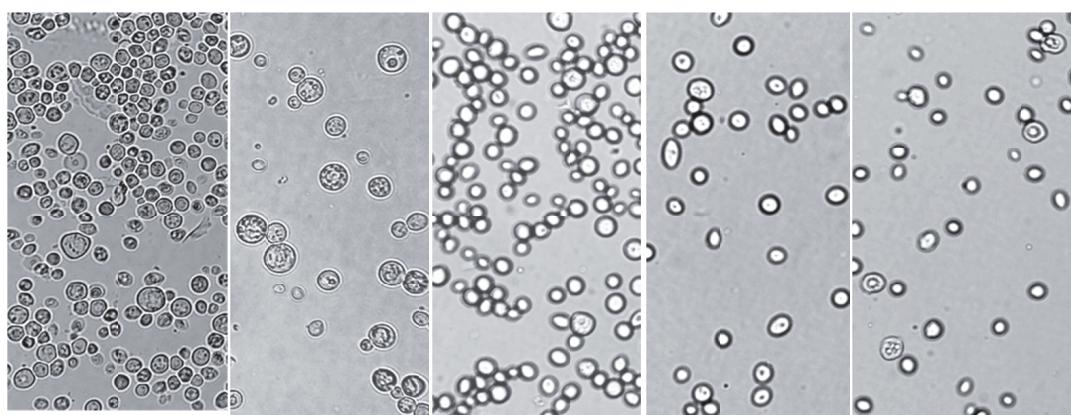
Морфологические исследования показали незначительное изменение формы (округлая,

Таблица. Изменение формы и размеров (мкм) клеток *S. cerevisiae* Y-503 и *S. cerevisiae* DAW-3a при выращивании на питательной среде с различными значениями pH

<i>Значения pH</i>	<i>pH 3.0</i>	<i>pH 4.5</i>	<i>pH 7.0</i>	<i>pH 9.0</i>	<i>pH 11.0</i>
<i>Штаммы</i>					
<i>S. cerevisiae</i> Y-503	Форма: R-; овальная; округлая Размеры: 4x15; 8x10; 6x7; 3x3; 2x3	Форма: R-; овальная; округлая Размеры: 4x15; 8x9; 7x8; 5x6; 3x3	Форма: овальная; R- Размеры: 4x15; 4x10; 4x9; 8x9; 6x7; 5x6; 3x3	Форма: овальная; R- Размеры: 8x8; 6x8; 4x9; 4x6	Форма: овальная Размеры: 7x9; 5x6; 4x6; 2x3
<i>S. cerevisiae</i> DAW-3a	Форма: округлая Размеры: 10x12; 6x7; 5x6; 3x3; 2x3	Форма: округлая; овальная Размеры: 10x12; 7x8; 5x6; 3x3	Форма: округлая Размеры: 8x9; 6x7; 5x6; 3x3	Форма: округлая; овальная Размеры: 7x9; 8x8; 6x7; 5x6	Форма: округлая Размеры: 6x7; 5x5; 4x5; 2x3



a)



pH 3 pH 4.5 pH 7.0 pH 9.0 pH 11.0

б)

Рис. 1. Влияние различных значений pH на морфологию клеток *S. cerevisiae* Y-503 (а) и *S. cerevisiae* DAW-3a (б)

в виде цветка), поверхности (радиально исчерченная), профиля (плоский, со слегка выпуклым центром), цвета (бежевый с сероватым оттенком) и структуры (пастообразная, мажущаяся) макроколоний. Установлено, что в процессе роста оба штамма проявили достаточную устойчивость к экстремальным значениям pH. При этом выявлено существенное изменение размеров гигантских колоний Y-503 и DAW-3а в зависимости от pH среды (рис. 2).

Обнаружено, что значение pH 4.5 являлось оптимальным для роста колоний обоих штаммов дрожжей. Дрожжевые клетки достаточно устойчивы к значительным изменениям pH окружающей среды. Однако внутриклеточные процессы обладают высокой чувствительностью к pH, постоянная величина которой поддерживается с помощью эффективных буферных систем. По сравнению с оптимальными значениями повышение или уменьшение pH среды культивирования сначала снижает, а затем приостанавливает рост дрожжевых клеток.

При выращивании дрожжей на средах с экстремально низким значением pH 3.0 размер колоний по сравнению с оптимальным pH уменьшался почти в 1.9 (Y-503) и 1.8 раза (DAW-3а).

Установлено, что при культивировании дрожжей на средах с pH 7.0 размер колоний по сравнению с pH 4.5 уменьшился в 1.7 (Y-503) и 2.4 раза (DAW-3A). Среда с нейтральным значением pH для исследуемых штаммов не являлась оптимальной, однако существенного ингибирования роста дрожжей не наблюдалось.

В щелочных условиях (pH 9.0 и 11.0) нами так-

же обнаружена способность дрожжевых клеток к адаптации. При этом установлено уменьшение размеров гигантских колоний при выращивании на средах с экстремально высокими pH в 2.6 раз (Y-503) и в 2.4 – 2.7 раза (DAW-3а) соответственно по сравнению с оптимальным pH.

Проведенный нами анализ морфологических особенностей гигантских колоний и клеток Y-503 и DAW-3а в зависимости от экстремальных значений pH среды показал, что изученные дрожжи обладают способностью активно развиваться в неблагоприятных условиях: на средах с экстремально высокими (11.0) и низкими (3.0) pH, что делает эти штаммы перспективными для использования в биотехнологии производства спирта, целлюлозы, осмотически активных веществ, биополимеров, ферментов.

Обнаружено, что морфологические особенности исследуемых дрожжей зависят не только от условий культивирования, но и от свойств различных штаммов. Как было сказано выше, при критических значениях pH клетки штамма DAW-3а были более однородны и имели в основном округлую форму. Гигантские колонии также имели отличия, в том числе размеры колоний Y-503 были несколько больше по сравнению с другим вариантом (рис. 3). Возможно, это объясняется различной пloidностью штаммов Y-503 и DAW-3а. Известно, что одним из механизмов адаптации дрожжей является полиплоидия [16], часто приводящая к диверсификации генетической информации [17] и обеспечивающая преимущество определенного фенотипа в условиях стресса [18].

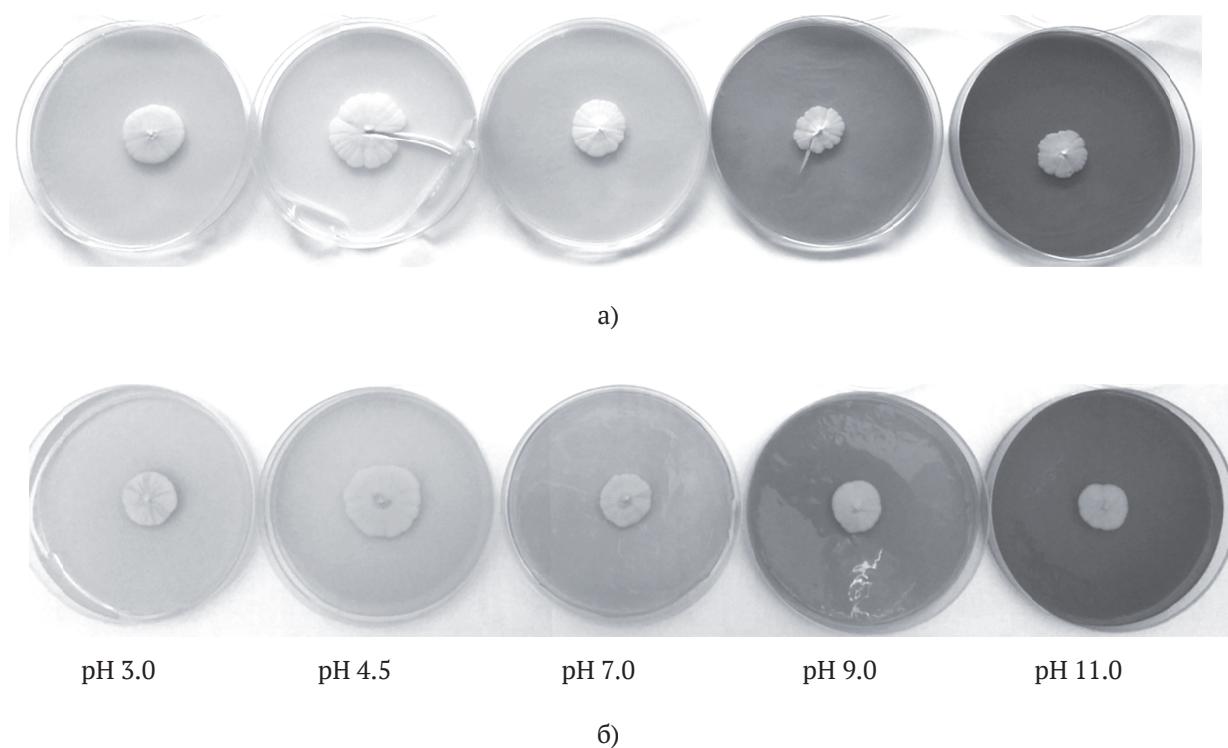


Рис. 2. Влияние различных значений pH на морфологию гигантских колоний *S. cerevisiae* Y-503

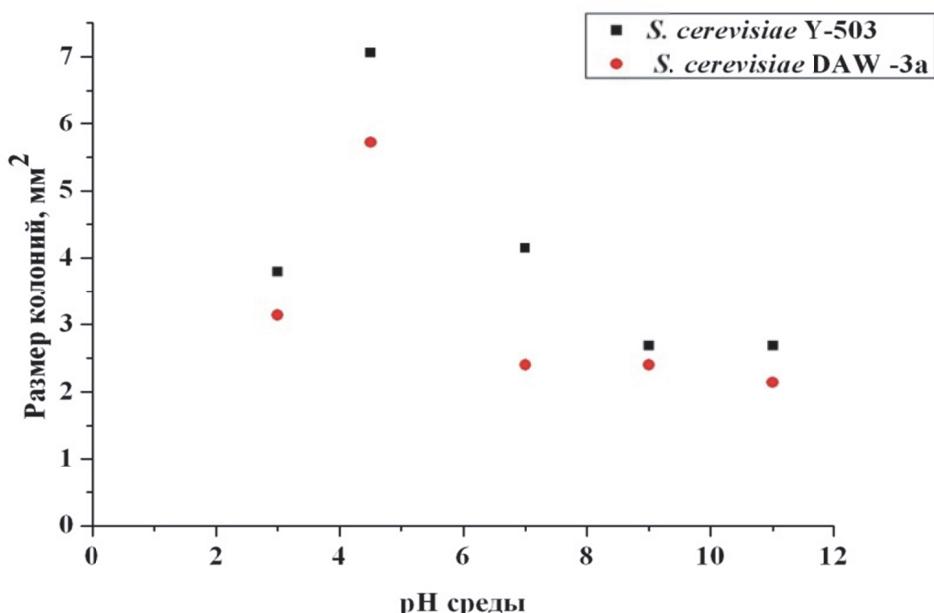


Рис. 3. Динамика изменения размеров гигантских колоний дрожжей *Saccharomyces* в зависимости от экстремальных значений pH

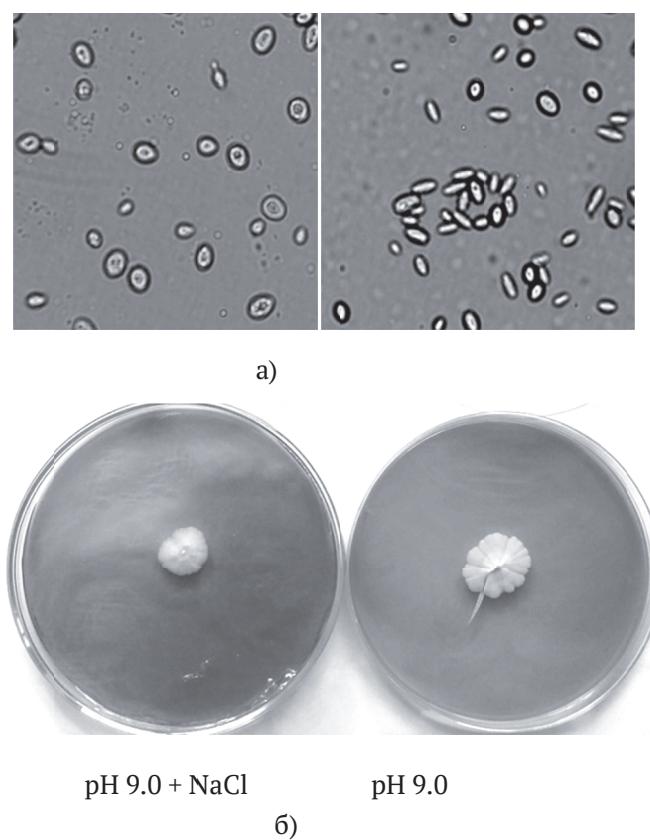


Рис. 4. Особенности роста клеток (а) и гигантских колоний (б) *S. cerevisiae* Y-503 на средах при pH 9.0 в присутствии и отсутствии 5% NaCl

В целях исследования адаптации дрожжей в условиях многофакторного влияния окружающей среды были изучены морфологические показатели дрожжей Y-503 при культивировании на средах с экстремальными значениями NaCl и

pH (рис. 4). Показано, что, в отличие от колоний, культивируемых при pH 9.0, гигантские колонии, выращенные на средах с содержанием NaCl 5% при pH 9.0, характеризуются уменьшением размеров (более чем в 2 раза), изменением по-

верхности (радиально исчерченная, с каймой) и профиля (более выпуклый), уплотнением структуры. Клетки приобретали более округлую форму, что находит подтверждение в литературе [7].

Таким образом, экстремальные значения pH существенно влияют на морфофизиологические и культуральные свойства дрожжей *Saccharomyces*. Показаны морфологические изменения клеток и гигантских колоний штаммов Y-503 и DAW-3а в условиях pH – стресса. Оптимальным для роста дрожжей является pH 4.5, при этом клетки исследованных штаммов были достаточно устойчивы к экстремальным значениям pH 3.0 и pH 11.0. Представленные результаты выполнены в рамках исследований по адаптации микроорганизмов к стрессу и могут быть полезны для решения практических задач, связанных с разработкой биотехнологий, основанных на использовании устойчивых к экстремальным условиям штаммов дрожжей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Caspeta L., Nielsen J.* Thermotolerant yeast strains adapted by Laboratory evolution show trade-off at ancestral temperatures and preadaptation to other stresses // *MBio*. 2015. 6(4): 431-446. doi: 10.1128/mBio.00431-15
2. Аливердиева Д.А. Мамаев Д.В., Лагутина Л.С., Шольц К.Ф. Особенности изменения содержания субстратов эндогенного дыхания в клетках *Saccharomyces cerevisiae* при низкой температуре // Биохимия. 2006. 71(1): 50-58. doi: 10.1134/S0006297906010056
3. *Borrull A., Lopez-Martínez G., Miro-Abella E., Salvado Z., Poblet M., Cordero-Otero R., Rozes N.* New insights into the physiological state of *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol acclimation for producing sparkling wines // Food Microbiology. 2016. 54: 20 – 29.
4. *Zhao X.Q., Bai F.W.* Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. Biotechnology. 2009. 144(1): 23-30. doi: 10.1016/j.biote
5. Деткова Е.Н., Болтянская Ю.В. Осмоадаптация галоалкалофильных бактерий: роль осморегуляторов и возможности их практического применения // Микробиология. 2007. 76(5): 581-593. doi: 10.1134/S0026261707050013
6. *Balakumar S., Arasaratnam V.* Osmo-, thermo- and ethanol- tolerances of *Saccharomyces cerevisiae* S1 // Brazilian Journal of Microbiology. 2012. 43(1): 157-166. doi: 10.1590/S1517-838220120001000017
7. Секова В.Ю., Исакова Е.П., Дерябина Ю.И. Применение экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* в биотехнологии (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. 51(3): 290-304. doi: 10.7868/S0555109915030150
8. *Berterame N.M., Porro D., Ami D., Branduardi P.* Protein aggregation and membrane lipid modifications under lactic acid stress in wild type and *OPI1* deleted *Saccharomyces cerevisiae* strains // Microbial Cell Factories. 2016. 15(39): 1-12. doi: 10.1186/s12934-016-0438-2
9. *Weissgram M., Gstöttner J., Lorantfy B., Tenhaken R., Herwig C., Weber H.K.* Generation of PHB from spent sulfite liquor using halophilic microorganisms // Microorganisms. 2015. 3: 268 – 289. doi: 10.3390/microorganisms3020268
10. *Maruyama Y., Toshiyuki I., Kodama H., Matsuura A.* Availability of amino acids extends chronological lifespan by suppressing hyper-acidification of the environment in *Saccharomyces cerevisiae* // PLoS ONE. 2016. 1(3): 1-19. doi: 10.1371/journal.pone.0151894
11. Гусева М.А., Эпова Е.Ю., Ковалёв Л.И., Шевелёв А.Б. Изучение механизмов адаптации дрожжей *Yarrowia lipolytica* к щелочным условиям среды методами протеомики // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. 46(3): 336-341.
12. Аринбасарова А.Ю., Бирюкова Е.Н., Меденцев А.Г. Антистрессовые системы дрожжей *Yarrowia lipolytica* (Обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. 51(2): 122-131. doi: 10.7868/S0555109915020026
13. Абрамов Ш.А., Котенко С.Ц., Далгатова Б.И., Маммаев А.Т., Пейсахова Д.С. Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-503, используемый в производстве хлебобулочных изделий // Патент СССР 1284998 (C12 N 1/18, C12 R 1:865). 1987. 3: 104.
14. Аливердиева Д.А., Мамаев Д.В., Лагутина Л.С. Транспорт сукцинатов в клетки *Saccharomyces cerevisiae* после продолжительной холодовой преинкубации // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. 45(5): 577-585. doi: 10.1134/S0003683809050111
15. Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н. Руководство к практическим занятиям по микробиологии (под ред. Н.С. Егорова, 3-е издание). М.: МГУ, 1995. 224 с.
16. *Swinnen S., Fernandez-Nino M., Gonzalez-Ramos D., Antonius J.A., Maris A.J.A., Nevoigt E.* The fraction of cells that resume growth after acetic acid addition is a strain-dependent parameter of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast Research. 2014. 14: 642-653. doi: 10.1111/1567-1364.12151
17. *Storchova Z.* Ploidy changes and genome stability in yeast // Yeast. 2014. 31: 421–430. doi: 10.1002/yea.3037
18. *Anderson C.A., Roberts S., Zhang H., Kelly C.M., Kendall A., Lee C., Gerstenberger J., Koenig A.B., Kabeche R., Gladfelter A.S.* Ploidy variation in multinucleate cells changes under stress // Mol .Biol. Cell. 2015. 26(6): 1129–1140. doi: 10.1091/mbc.E14-09-1375

**INFLUENCE OF EXTREME pH ON MORPHOLOGICAL FEATURES
OF YEAST *SACCHAROMYCES CEREVIAE***

© 2018 E.A. Islammagomedova, E.A. Khalilova, S.Ts. Kotenko,
R.Z. Gasanov, D.A. Aliverdieva

Caspian Institute of Biological Resources of Dagestan Scientific Centre RAS, Makhachkala

The effect of extreme conditions on the physiological state of yeast *Saccharomyces* cells was studied. The strain *S. cerevisiae* Y-503, heterozygous tetraploid, which was obtained by means of selection method after laser action on a mixed cell culture of industrial strains, and *S. cerevisiae* DAW-3a is a heterothallic haploid, a descendant of line strain Y-503, were used in the work. It was shown that the functional state of yeast was closely related to their morphological parameters. Under conditions of pH stress, changes in the shape and size of Y-503 and DAW-3a cells occurred, the presence of a granular cytoplasm a large vacuole in individual cells. It was found that in extreme conditions also affect the morphological features of giant colonies. PH 4.5 was optimal for growth of the yeast colonies, while the Y-503 and DAW-3a cells were sufficiently resistant to extremely high (11.0) and low (3.0) pH. In conditions of extreme NaCl and pH the cells acquired a rounded shape, for giant colonies a decrease of sizes, a change of the surface, profile and structure were characteristic. It was shown that the studied *S. cerevisiae* strains react differently to variations of salt concentrations and pH values. Perhaps this is due to the different ploidy of Y-503 and DAW-3a. Demonstrated ability of *S. cerevisiae* Y-503 and *S. cerevisiae* DAW-3a to grow in unfavorable conditions makes these strains promising objects for use in various biotechnologies.

Keywords: yeast *Saccharomyces*, morphology, cells, giant colonies, extreme conditions, stress

Elvira Islammagomedova, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher at the Laboratory of Biochemistry and Biotechnology.

E-mail: islammagomedova@mail.ru.

Eslanda Khalilova, Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher at the Laboratory of Biochemistry and Biotechnology. E-mail: eslanda61@mail.ru

Svetlana Kotenko, Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher at the Laboratory of Biochemistry and Biotechnology.

Rasul Gasanov, Associate Researcher at the Laboratory of Biochemistry and Biotechnology.

E-mail: gacanov@bk.ru

Dinara Aliverdieva, Candidate of Biological Sciences, Deputy Director on Scientific Work, Head at the Laboratory of Biochemistry and Biotechnology.

E-mail: aliverdieva_d@mail.ru