

УДК 579.22+579.24

**ОСОБЕННОСТИ РОСТА КУЛЬТУРЫ
Saccharomyces cerevisiae В ПРИСУТСТВИИ
ЭКЗОГЕННЫХ АУТОРЕГУЛЯТОРОВ КЛЕТОЧНОЙ
ПЛОТНОСТИ ПОПУЛЯЦИИ**

Э.Т. Калимуллина, А.Б. Маргулис, А.И. Колпаков, Ф.Г. Куприянова-Ашина

Аннотация

При изучении особенностей роста культуры *S. cerevisiae* в присутствии экзогенных факторов межклеточной коммуникации бактерий, а именно ацилированных производных гомосерин лактонов (N-гексаноил- и N-октаноил-DL-гомосерин лактоны), наблюдался дозозависимый эффект подавления почкования дрожжей в зависимости от их концентрации (1.0, 10, 100 мкМ) и фазы роста культуры в момент воздействия на нее фенилэтанолом. Антагонисты гомосеринлактонов – химически синтезированные фураноны, добавленные в растущую культуру в микродозах (0.1, 1.0, 10 мкМ), стимулировали почкование дрожжей. Наиболее чувствительными к действию экзогенного фуранона были клетки, взятые в начале лаг-фазы кривой роста и находящиеся на стадии подготовки к почкованию (G1-фаза).

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, чувство кворума, почкование дрожжей, G1-фаза, гомосерин лактоны, хлорированные фураноны.

Введение

Одна из важнейших особенностей живых клеток – это способность их к росту и делению. Для микроорганизмов наиболее характерным проявлением роста является увеличение числа клеток популяции, основные функции которых находятся под контролем сигналов внешней среды. Причинами возникновения этих сигналов могут быть изменения концентрации питательных веществ или количества секретируемых клетками аутоиндукторных молекул в среде культивирования [1–6].

В настоящее время активно изучаются факторы межклеточной коммуникации, отвечающие за плотностно-зависимые процессы у про- и эукариотных микроорганизмов. Наиболее изученными факторами межклеточной коммуникации у бактерий являются ацильные производные лактонов L-гомосерина (ГСЛ) [7, 8]. Эти низкомолекулярные сигнальные молекулы, возникающие в ответ на стресс голодания (*starvation stress*) и достигающие максимального уровня при увеличении численности популяции до определенного порогового уровня (*quorum sensing*), регулируют плотность клеточной популяции концентрацией собственных аутоиндукторов [9–11].

У бактерий известны альтернативные пути регуляции плотностно-зависимых процессов, осуществляемые с помощью антагонистов ГСЛ – фуранонов, препятствующих связыванию аутоиндуктора с молекулами рецепторных белков

[12–14]. При введении в организм в малых дозах они вызывают четко выраженные физиологические эффекты [15], которые могут быть обусловлены такими факторами, как дефицит источников питания и энергии или достижение критической плотности клеточной суспензии.

Одним из перспективных подходов к изучению биологической роли сигнальных молекул в регуляции клеточной пролиферации является непосредственное воздействие экзогенными аутоиндукторами на микробные культуры. Удобной моделью в подобных исследованиях являются дрожжи, хорошо растущие в органических и синтетических питательных средах [16, 17], что позволяет получать быстро и в достаточном количестве микробную массу для оценки результатов воздействия на них аутоиндукторных молекул. Использование в качестве объекта исследования эукариотных микроорганизмов представляет интерес также в плане подтверждения имеющихся данных литературы, согласно которым бактериальные коммуникационные молекулы могут восприниматься эукариотическими клетками как малые «молекулы связи» (QMs), которые секретируются одним организмом и меняют поведение другого [18].

Целью настоящей работы было выяснение особенностей роста культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при воздействии на нее экзогенными лактонами гомосеринов различной природы.

1. Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовали пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* 823, полученные из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии Казанского федерального университета.

Культуру дрожжей *S. cerevisiae* выращивали при 30 °С на агаризованной и жидкой средах Сабуро [16]. Для приготовления инокулята 18-часовую культуру смывали жидкой средой Сабуро с поверхности агаризованной среды и выращивали в стационарных условиях 16–18 ч. Полученную суспензию использовали в качестве посевной культуры, которую вносили в свежую жидкую среду до конечной концентрации 10 млн клеток/мл в опытных и контрольных вариантах.

Контроль за ростом культуры осуществляли с помощью подсчета числа клеток в камере Горяева в объеме 1 мкл по классической формуле под микроскопом Carl Zeiss (Германия). По величине удельной (μ) и общей средней скорости (V_{cp}) роста дрожжей устанавливали кинетику роста культуры [19].

Особенности роста культуры дрожжей оценивали при воздействии на нее такими факторами межклеточной коммуникации, как гомосеринлактоны (N-гексаноил-DL-гомосеринлактон) и (N-октаноил-DL-гомосеринлактон) и химически синтезированные хлорированные фураноны – антагонисты ГСЛ.

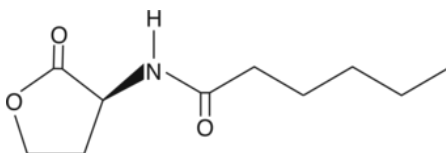


Рис. 1. (ГСЛ-1) – N-гексаноил-DL-гомосеринлактон (C6 – HSL) – $C_{10}H_{17}NO_3$, мол. масса 199,2, степень чистоты $\geq 98\%$

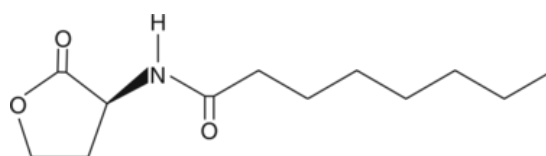


Рис. 2. (ГСЛ-2) – N-октаноил-DL-гомосеринлактон (C8-HSL) – $C_{12}H_{21}NO_3$, мол. масса 227.30, степень чистоты 98%

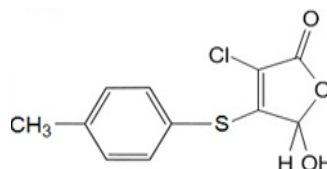


Рис. 3. Фуранон Ф-2С1-(Ф-1) (5-гидрокси-4[(4-Метилфенил)тио]-3-хлор-2(5H)-фуранон), мол. масса, 258.5

Для приготовления исследуемых концентраций ГСЛ исходное соединение растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО).

Использованные в работе аналоги гомосеринлактонов (фураноны) синтезированы на кафедре органической химии (Казанский федеральный университет).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel. Для оценки достоверной разницы групп данных принимали достаточный уровень значимости $p = 0.05$. На рисунках представлены 95%-ные доверительные интервалы для истинных средних.

2. Результаты и их обсуждение

В работе исследовали особенности роста *S. cerevisiae* в присутствии экзогенных факторов межклеточной коммуникации, внесенных в культуру разного физиологического возраста. В связи с этим была определена кинетика роста периодической культуры дрожжей при ее начальной плотности – 10 млн клеток/мл. Как оказалось, в течение первых трех часов инкубации численность популяции сохранялась на исходном уровне (рис. 4, кривая 1), что характерно для лаг-фазы роста. В период от 3 до 5 ч регистрировалась экспоненциальная фаза, когда количество почкующихся клеток в популяции возрастало, а общая и удельная скорости роста культуры достигали максимума (рис. 4, кривые 2, 3). После 5-часовой инкубации наступала фаза замедления роста, о чем свидетельствует снижение удельной скорости роста (рис. 4, кривая 3), а через 6 ч происходило снижение как удельной, так и общей скорости роста, и культура достигала стационарной фазы.

На первом этапе исследований регистрировали рост культуры дрожжей *S. cerevisiae* в присутствии таких факторов факторов межклеточной коммуникации бактерий, как ацильные производные лактона L-гомосерина (ГСЛ) [7, 10]. Существенно, что механизм действия плотностно-зависимого регулятора гомосеринлактона может иметь межвидовой характер [20], когда, например, сигнальная молекула N-(3-оксо)-додеcanoил-лактон гомосерина воспринимается

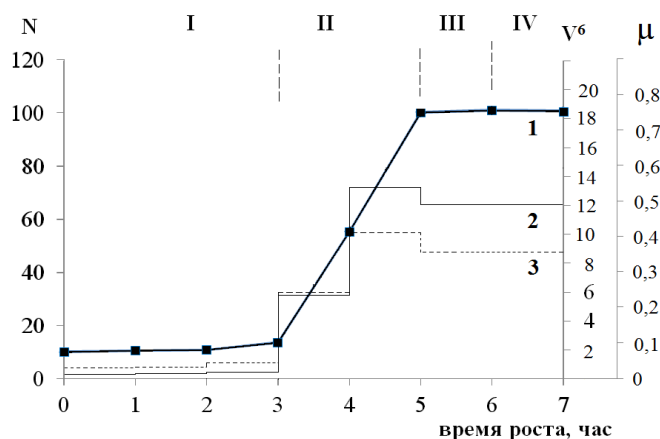


Рис. 4. Кинетика роста культуры *S. cerevisiae* в среде Сабуро: 1 – количество клеток (N , млн/мл); 2 – общая средняя скорость роста культуры (V_{cp}); 3 – удельная скорость роста культуры (μ , $ч^{-1}$); I – лаг-фаза (от 1 до 3 ч); II – экспоненциальная фаза (от 3 до 5 ч); III – фаза замедления роста (от 5 до 6 ч); IV – стационарная фаза (от 6 ч до 7 ч)

эпителиальными клетками человека и индуцирует синтез фактора межклеточной коммуникации, участвующего в иммунной защите человека. Возможно, что бактериальные сигнальные молекулы кворум-эффекта – гомосеринлактоны – могут оказывать влияние также на эукариотные микроорганизмы, в частности индуцировать изменения роста дрожжей *S. cerevisiae*. В связи с этим исследовали особенности роста культуры *S. cerevisiae* при воздействии на нее экзогенными аутоиндукторами бактерий, такими как N-октаноил-DL-гомосеринлактон (ГСЛ-1) [21] и N-гексаноил-DL-гомосеринлактон (ГСЛ-2) [22].

В экспериментах экзогенный ГСЛ-1 добавляли в культуру *S. cerevisiae* в разных концентрациях и в зависимости от ее физиологического возраста. Учитывая способность биологически активных веществ в микродозах стимулировать рост микробных культур [23], прежде всего изучали действие ГСЛ-1 на *S. cerevisiae* в концентрациях от $1 \cdot 10^{-1}$ до $1 \cdot 10^{-6}$ мкМ. После 6-часовой инкубации дрожжей в этих условиях различий в скорости размножения клеток опытного и контрольного вариантов обнаружено не было (табл. 1).

В последующих экспериментах дозы экзогенного ГСЛ-1 увеличивали (от 1 до 100 мкМ) с учетом известных данных [24], что в указанных в концентрациях ГСЛ не проявлял токсических и мутагенных эффектов по отношению к бактериальным клеткам. Инкубация дрожжей в этих условиях показала, что экзогенный ГСЛ-1 в дозе 1,0 мкМ не оказывал влияния на рост культуры, в то время как увеличение его концентрации до 10 мкМ индуцировало уменьшение количества клеток в культуре на 20%, а в концентрациях 100 мкМ – на 49,3% по сравнению с контрольным вариантом, принятым за 100%. Следовательно, ингибирующий эффект ГСЛ-1 является дозозависимым, так как действие его на рост культуры дрожжей возрастает с увеличением концентрации.

Анализ кинетики роста *S. cerevisiae* в присутствии ГСЛ-1, добавленного в культуру клеток, находящихся в начале лаг-фазы, в дозе 100 мкМ, показал увеличение продолжительности лаг-фазы на 1 ч по сравнению с контрольным вариантом (рис. 5, а).

Табл. 1

Рост культуры дрожжей *S. cerevisiae* при добавлении в среду микродоз ГСЛ-1 одновременно с инокулятом (млн/мл)

Инкубация, ч	Контроль	1	2	3	4	5	6
0*	10.3 ± 0.97	10.2 ± 0.89	10 ± 0.95	10.1 ± 0.89	10.7 ± 0.95	10.4 ± 0.91	10.6 ± 0.89
1	11.9 ± 1.15	10.2 ± 1.11	11 ± 1.15	10.7 ± 1.11	11.3 ± 1.15	11 ± 1.12	11.7 ± 1.11
2	11.9 ± 1.21	11.8 ± 1.18	11.9 ± 1.20	12.6 ± 1.18	11.8 ± 1.20	11.9 ± 1.25	12.6 ± 1.18
3	14.18 ± 1.2	14.7 ± 1.19	15.7 ± 1.14	16.38 ± 1.2	13.3 ± 1.14	13.8 ± 1.17	14.1 ± 1.19
4	53.3 ± 4.27	52.5 ± 1.24	49.5 ± 1.24	50 ± 1.24	53.5 ± 1.24	54.1 ± 1.22	53.8 ± 1.24
5	103.9 ± 3.4	102 ± 2.38	102 ± 2.41	101 ± 2.38	103 ± 2.41	102 ± 2.37	102.4 ± 2.4
6	106.5 ± 2.3	102.8 ± 2.4	103 ± 2.35	102.5 ± 2.4	103.3 ± 2.4	103.7 ± 2.4	102.9 ± 2.4

Контроль – среда с растворителем; 1, 2, 3, 4, 5, 6 обозначают концентрации экзогенного ГСЛ-1: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} мкМ. Звездочкой отмечено время внесения ГСЛ-1 в культуру клеток, находящихся в начале лаг-фазы.

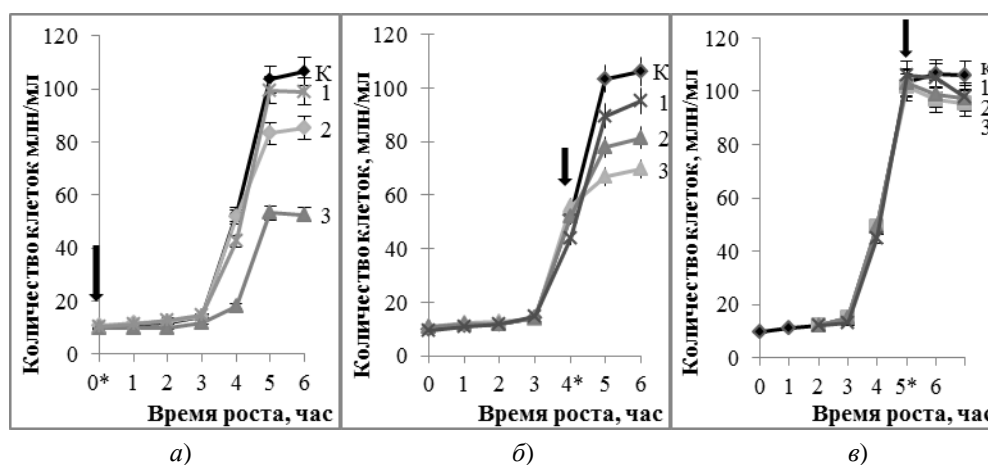


Рис. 5. Кинетики роста культуры *S. cerevisiae* при добавлении ГСЛ-1 в среду одновременно с инокулятом (а), в середине экспоненциальной фазы (б) и фазе замедления роста (в). К – контроль (среда с растворителем); 1, 2, 3 – концентрации ГСЛ-1, равные 1, 10, 100 мкМ соответственно. Звездочкой отмечен момент внесения ГСЛ-1 в культуру

Наряду с этим наблюдалось сокращение периода экспоненциального роста и ускорение перехода культуры в стационарную фазу. Вероятно, влияние экзогенного ГСЛ-1 на клетки инициируется в самом начале лаг-фазы, когда низкая численность популяции сопряжена с невысоким уровнем ГСЛ, синтезируемым каждой клеткой [6]. По мере роста культуры, увеличения численности популяции и, как следствие, содержания внеклеточного ГСЛ в культуральной жидкости размножение клеток замедляется и полностью прекращается к началу стационарной фазы (6 ч).

При добавлении ГСЛ-1 в середине экспоненциального роста культуры, когда плотность популяции постоянно возрастает за счет активного почкования дрожжей, индуцируется ее мгновенный переход в стационарную фазу, что может быть следствием ограничения пространства в клеточной суспензии. При этом численность популяции на 6-й час инкубации была в 2 раза ниже, чем в контроле (рис. 5, б). Помимо этого присутствие экзогенного фенилэтанола в культуральной

жидкости экспоненциальной фазы может восприниматься пролиферирующей культурой как сигнал о стрессовой ситуации, индуцирующий в процессе адаптации клеток включение регулонов стационарной фазы, замедление и остановку роста культуры [6].

ГСЛ-1, добавленный в культуру фазы замедления роста (через 5 ч после посева), не оказывал влияния на рост культуры дрожжей ни в одной из исследованных концентраций (рис. 5, в). Наблюдаемый эффект мог быть обусловлен как увеличением плотности клеточной суспензии, так и лимитом пищевого ресурса в среде стационарной культуры [5].

Учитывая данные [25, 26] об изменении функциональной активности ацилированных лактонов гомосерина в зависимости от длины ацильной цепи, исследовали влияние на рост культуры *S. cerevisiae* N-октаноил-DL-гомосерин-лактона (ГСЛ-2), который добавляли в среду вместе с инокулятом в тех же концентрациях (1, 10, 50 и 100 мкМ), что и ГСЛ-1. При этом ГСЛ-2 индуцировал такие же изменения роста культуры: проявлял дозозависимый эффект ингибиции роста дрожжей, способствовал удлинению периода лаг-фазы и сокращению фазы экспоненциального роста и вызывал более ранний переход культуры в стационарную фазу по сравнению с контролем.

Таким образом, сигнальные молекулы ГСЛ-1 и ГСЛ-2 независимо от их химического состава и строения, добавленные в среду вместе с инокулятом, угнетали рост культуры дрожжей *S. cerevisiae* в зависимости от их концентрации и физиологического состояния клеток-мишеней.

В последнее время внимание исследователей привлекают потенциальные регуляторы плотностно-зависимых процессов – фураноны, известные как природные антагонисты сигнальных молекул кворум-сенсинга. По данным [26], действие фуранонов приводило к подавлению различных клеточных процессов, регулируемых кворум-сенсингом: биолуминесценции *Vibrio fischeri*; продукции факторов вирулентности у *P. aeruginosa*, образования биопленок. Вместе с тем было показано, что некоторые фураноны способны увеличивать образование биопленок у некоторых штаммов грамположительных бактерий в субингибиторных концентрациях. Имеются противоположные сведения о проявлении у фуранонов антибактериальной, противогрибковой, противопаразитарной и других активностей [15]. В связи с вышеизложенным представляло интерес исследовать влияние экзогенного фуранона на особенности роста культуры дрожжей *S. cerevisiae*.

Как уже показано [27], производные фуранонов с двумя атомами брома ингибировали плотностно-зависимую систему бактерий, что побудило нас к изучению влияния на рост культуры дрожжей *S. cerevisiae* соединения фуранона с двумя атомами хлора (Ф-С1). Было установлено, что в дозах 50 и 100 мкМ фуранон не оказывал заметного влияния на рост культуры, в то время как добавление его в микродозах (0.1, 1.0 и 10 мкМ) индуцировало увеличение численности популяции в сравнении с контролем на 50% (рис. 6, а). Полученные результаты согласуются с данными литературы [28], согласно которым фуранон 1 в малых дозах (0.1 мкМ) совместно с воздействием теплового шока (45° С) стимулирует рост культуры *S. aureus*. При этом фураноны, в том числе их галогенизированные производные, в этих же малых дозах не проявляли токсических и генотоксических эффектов [29].

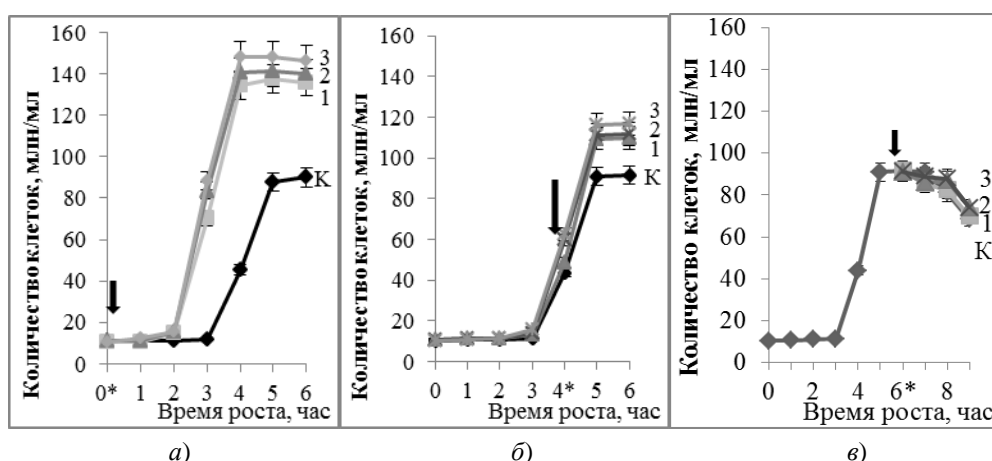


Рис. 6. Кинетика роста *S. cerevisiae* при добавлении Ф-С1 в культуру дрожжей разного физиологического возраста: а) начало лаг-фазы; б) середина экспоненциальной фазы; в) фаза замедления роста (через 0, 4, 5 ч роста соответственно). К – контроль (среда с растворителем); 1, 2, 3 – концентрации Ф-С1, равные 10, 1.0, 0.1 мкМ соответственно. Стрелка указывает момент внесения Ф-С1 в культуру

Изучение кинетики роста *S. cerevisiae* в присутствии Ф-С1, внесенного в среду вместе с инокулятом (начало лаг-фазы), показало, что стимуляция почкования дрожжей коррелировала с сокращением длительности лаг-фазы и ускорением перехода культуры в стационарную фазу. В то же время эффект стимуляции почкования дрожжей снижался при добавлении малых доз Ф-С1 (0.1–10 мкМ) в середине экспоненциальной фазы роста (4 ч после посева) (рис. 6, б) и не проявлялся в случае воздействия фураноном на культуру фазы замедления роста (рис. 6, в). Следовательно, наиболее чувствительными к действию экзогенного фуранона являются клетки *S. cerevisiae* в начале лаг-фазы, в период клеточного цикла, предшествующего инициации почкования дрожжей.

Одним из механизмов стимулирующего эффекта экзогенного фуранона является способность его взаимодействовать с рецепторными белками типа LuxR. Связывание фуранона с рецептором влияет на стабильность комплекса белок-лиганд и, приводя к быстрому расщеплению рецепторного белка, препятствует связыванию сигнальной молекулы кворум-сенсинга (ГСЛ) с белком [12].

Оценка результатов роста *S. cerevisiae*, подвергнутых воздействию разных аутоиндукторных молекул межклеточной коммуникации (гомосеринлактона, фуранона), свидетельствует о том, что участие экзогенных аутоиндукторов в регуляции клеточной плотности популяции зависит от дозы сигнальной молекулы, физиологического возраста культуры и компетентности клеток к этим соединениям. Тем не менее следует отметить, что механизм действия на дрожжевую клетку сигнальных молекул бактериальных клеток не изучен [1, 7, 30, 31].

Литература

1. Хохлов А.С. Низкомолекулярные микробные ауторегуляторы. – М.: Наука, 1988. – 272 с.

2. *Dworkin M., Dunny G.M., Brickman T.J.*, Multicellular behavior in bacteria: communication, cooperation, competition and cheating // *BioEssays*. – 2008. – V. 30, No 4. – P. 296–298. – doi: 10.1002/bies.20740.
3. *Parsek M.R., Greenberg E.P.* Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2000. – V. 97, No 16. – P. 8789–8793.
4. *LaRock C.N., Yu J., Horswill A.R., Parsek M.R., Minion F.C.* Transcriptome analysis of acetyl-homoserine lactone-based quorum sensing regulation in *Yersinia pestis* // *PLoS One*. – 2013. – V. 8, No 4. – doi: 10.1371/journal.pone.0062337.
5. Эль Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Степаненко Л.Ю., Козлова А.Н. Роль алкилоксибензолов в адаптации *Micrococcus luteus* к температурному шоку // *Микробиология*. – 2005. – Т. 74, № 1. – С. 26–33.
6. Эль Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // *Микробиология*. – 2006. – Т. 75, № 4. – С. 446–456.
7. *Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P.* Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators // *J. Bacteriol.* – 1994. – V. 176, No 2. – P. 269–275.
8. *van Kessel J.C., Rutherford S.T., Cong J.-P., Quinodoz S., Healy J., Bassler B.L.* Quorum sensing regulates the osmotic stress response in *Vibrio harveyi* // *J. Bacteriol.* – 2015. – V. 197, No 1. – P. 73–80. – doi: 10.1128/JB.02246-14.
9. *Visick K.L., Fuqua C.* Decoding microbial chatter: cell-cell communication in bacteria // *J. Bacteriol.* – 2005. – V. 187, No 16. – P. 5507–5519.
10. *Oleskin A.V., Kirovskaya T.A.* Research on population organization and communication in microorganisms // *Microbiology*. – 2006. – V. 75, No 4. – P. 374–379.
11. *Malikina K.D., Shishov V.A., Chuvelev D.I., Kudrin V.S., Oleskin A.V.* Regulatory role of monoamine neurotransmitters in *Saccharomyces cerevisiae* cells // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2010. – V. 46, No 6. – P. 620–625.
12. *Manefield M., Rasmusen T.B., Hentzer M., Andersen J.B., Steinberg P., Kjelleberg S., Givskov M.* Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover // *Microbiology*. – 2002. – V. 148, Pt. 4. – P. 1119–1127.
13. *Manefield M., Whiteley A.S.* Acylated homoserine lactones in the environment: chameleons of bioactivity // *Philos. Trans. R. Soc., B*. – 2007. – V. 362, No 1483. – P. 1235–1240. – doi: 10.1098/rstb.2007.2048.
14. *Chong G., Kimyon Ö., Manefield M.* Quorum sensing signal synthesis may represent a selective advantage independent of its role in regulation of bioluminescence in *Vibrio fischeri* // *PLoS One*. – 2013. – V. 8, No 6. – Art. e67443, P. 1–8. – doi: 10.1371/journal.pone.0067443.
15. *Singh S, Sharma P.K., Kumar N., Dudhe R.* Furanone derivatives: diverse biological activities // *Int. J. Pharm. Sci.* – 2011. – V. 2, No 3, Suppl. 1. – P. S51–S61.
16. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. – М.: Агропромиздат, 1990. – 240 с.
17. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. Справочник. – Киев: Наукова думка, 1982. – 550 с.
18. *Mullard A.* Microbiology: Tinker, bacteria, eukaryote, spy // *Nature*. – 2009. – V. 459. – P. 159–161. – doi: 10.1038/459159a.
19. Иванов В.Н., Угодчиков Г.А. Клеточный цикл дрожжей // *Клеточный цикл микроорганизмов и гетерогенность их популяций*. – Киев: Наукова думка, 1984. – С. 1–149.

20. Gray K.M. Intercellular communication and group behavior in bacteria // Trends Microbiol. – 1997. – V. 5, No 5. – P.184–188.
21. Martins M.L., Pinto U.M., Riedel K., Vanetti M.C.D., Mantovani H.C., Araújo E.F. Lack of AHL-based quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens* isolated from milk // Braz. J. Microbiol. – 2014. – V. 45, No 3. – P. 1039–1046.
22. Gould T.A., Herman, J., Krank, J. Specificity of acyl-homoserine lactone synthases examined by mass spectrometry // J Bacteriol. – 2006. – V. 188, No 2. – P. 773–783.
23. Kolpakov A.I., Kupriianova-Ashina F.G., Leshchinskaia I.B. Effect of *Bacillus intermedius* ribonuclease on properties of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Prikl. Biokhim. Mikrobiol. – 2000. – V. 36, No 4. – P. 479–483.
24. Маргулис А.Б., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Муффер К. Индукция гипометаболических форм у неспоробразующих грамположительных бактерий // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2005. – Т. 147, кн. 2. – С. 108–114.
25. Suga H., Smith K. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2003. – V. 7. – P. 586–591.
26. Hentzer M., Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections // J. Clin. Invest. – 2003. – V. 112, No 9. – P. 1300–1307.
27. Hentzer M, Riedel K., Rasmussen T.B., Heydorn A., Andersen J.B., Parsek M.R., Rice S.A., Eberl L., Molin S., Høiby N., Kjelleberg S., Givskov M. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound // Microbiology. – 2002. – V. 148, Pt. 1. – P. 87–102.
28. Белоногова Н.В., Бардина Т.С., Пономарев В.Я., Колпаков А.И., Маргулис А.Б., Ильинская О.Н. Галогенированные фураноны как модификаторы физиологической активности *Staphylococcus aureus* // Вестн. Казан. технол. ун-та. – 2013. – Т. 16, № 15. – С. 100–102.
29. Митько В.Е., Маргулис А.Б., Пономарев В.Я., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. Токсические и генотоксические эффекты новых синтезированных фуранонов и их галогенированных производных // Вестн. Казан. технол. ун-та. – 2013. – Т. 16, № 11. – С. 211–213.
30. Stephens K. Pheromones among prokaryotes // Crit. Rev. Microbiol. – 1986. – V.13, No 4. – P. 105–112.
31. Kell D.B., Kaprelyants A.S., Grafen A. Pheromones, social behavior and the functions of secondary metabolism in bacteria // Tree. – 1995. – V. 10, No 3. – P. 126–129.

Поступила в редакцию
26.05.15

Калимуллина Эльмира Талгатовна – студент кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: elmira452@gmail.com

Маргулис Анна Борисовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: Anna.Margulis@kpfu.ru

Колпаков Алексей Иванович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

Куприянова-Ашина Флера Гарифовна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

* * *

**GROWTH PECULIARITIES OF THE *Saccharomyces cerevisiae*
CULTURE IN THE PRESENCE OF EXOGENOUS AUTOREGULATORS
OF THE CELL POPULATION DENSITY**

E.T. Kalimullina, A.B. Margulis, A.I. Kolpakov, F.G. Kuprianova-Ashina

Abstract

A dose-dependent effect of budding suppression in yeasts, depending on their concentration (1.0, 10, and 100 μM) and the growth phase of the culture at the time of exposure to phenylethanol was observed during the study of growth peculiarities of the *S. cerevisiae* culture in the presence of exogenous factors determining the intercellular communication of bacteria, namely acylated homoserine lactone derivatives (N-hexanoyl- and N-octanoyl-DL-homoserine lactones). The antagonists of homoserine lactones are chemically synthesized furanones, which were added to the growing culture in microdoses (0.1, 1.0, and 10 μM) and stimulated budding in yeasts. The culture cells in the early lag phase of growth (G1 phase), i.e., preparing for budding, were most sensitive to exogenous furanones.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, quorum sensing, yeast budding, G1 phase, homoserine lactones, chlorinated furanones.

References

1. Khokhlov A.S. Low-molecular microbial autoregulators. Moscow, Nauka, 1988. 272 p. (In Russian)
2. Dworkin M., Dunny G.M., Brickman T.J., Multicellular behavior in bacteria: communication, cooperation, competition and cheating. *BioEssays*, 2008, vol. 30, no. 4, pp. 296–298. doi: 10.1002/bies.20740.
3. Parsek M.R., Greenberg E.P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, no. 16, pp. 8789–8793.
4. LaRock C.N., Yu J., Horswill A.R., Parsek M.R., Minion F.C. Transcriptome analysis of acetyl-homoserine lactone-based quorum sensing regulation in *Yersinia pestis*. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 4. doi: 10.1371/journal.pone.0062337.
5. El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Stepanenko L.Yu., Kozlova A.N. The role of alkylhydroxybenzenes in the adaptation of *Micrococcus luteus* to heat shock. *Microbiology*, 2005, vol. 74, no. 1, pp. 20–26.
6. El Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Suzina N.E., Gal'chenko V.F., Duda V.I. Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms. *Microbiology*, 2006, vol. 75, no. 4, pp. 380–389.
7. Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.*, 1994, vol. 176, no. 2, pp. 269–275.
8. van Kessel J.C., Rutherford S.T., Cong J.-P., Quinodoz S., Healy J., Bassler B.L. Quorum sensing regulates the osmotic stress response in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.*, 2015, vol. 197, no. 1, pp. 73–80. doi: 10.1128/JB.02246-14.
9. Visick K.L., Fuqua C. Decoding microbial chatter: cell-cell communication in bacteria. *J. Bacteriol.*, 2005 vol. 187, no. 16, pp. 5507–5519.
10. Oleskin A.V., Kirovskaya T.A. Research on population organization and communication in microorganisms. *Microbiology*, 2006, vol. 75, no. 4, pp. 374–379.
11. Malikina K.D., Shishov V.A., Chuvelev D.I., Kudrin V.S., Oleskin A.V. Regulatory role of monoamine neurotransmitters in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2010, vol. 46, no. 6. pp. 620–625.
12. Manefield M., Rasmusen T.B., Hentzer M., Andersen J.B., Steinberg P., Kjelleberg S., Givskov M. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology*, 2002, vol. 148, pt. 4, pp. 1119–1127.

13. Manefield M., Whiteley A.S. Acylated homoserine lactones in the environment: chameleons of bioactivity. *Philos. Trans. R. Soc., B.*, 2007, vol. 362, no. 1483, pp. 1235–1240.
14. Chong G., Kimyon Ö., Manefield M. Quorum sensing signal synthesis may represent a selective advantage independent of its role in regulation of bioluminescence in *Vibrio fischeri*. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 6, art. e67443, pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0067443.
15. Singh S., Sharma P.K., Kumar N., Dudhe R. Furanone derivatives: diverse biological activities. *Int. J. Pharm. Sci.*, 2011, vol. 2, no. 3, suppl. 1, pp. S51–S61.
16. Semenov S.M. Laboratory Media for Actinomycetes and Fungi. Moscow, Agropromizdat, 1990. 240 p. (In Russian)
17. Bilai V.I. Methods of Experimental Mycology. Manual. Kiev, Naukova dumka, 1982. 550 p. (In Russian)
18. Mullard A. Microbiology: Tinker, bacteria, eukaryote, spy. *Nature*, 2009, vol. 459, pp. 159–161. doi: 10.1038/459159a.
19. Ivanov V.N., Ugodchikov G.A. The cellular cycle of microorganisms and heterogeneity of their populations. *Cellular Cycle of Yeast*. Kiev, Naukova dumka, 1984, pp. 1–149. (In Russian)
20. Gray K.M. Intercellular communication and group behavior in bacteria. *Trends Microbiol.*, 1997, vol. 5, no. 5, pp. 184–188.
21. Martins M.L., Pinto U.M., Riedel K., Vanetti M.C.D., Mantovani H.C., Araújo E.F. Lack of AHL-based quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens* isolated from milk. *Braz. J. Microbiol.*, 2014, vol. 45, no. 3, pp. 1039–1046.
22. Gould T.A., Herman, J., Krank, J. Specificity of acyl-homoserine lactone synthases examined by mass spectrometry. *J. Bacteriol.*, 2006, vol. 188, no. 2, pp. 773–783.
23. Kupriianova-Ashina F.G., Kolpakov A.I., Leshchinskaia I.B. Effect of *Bacillus intermedius* ribonuclease on properties of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 2000, vol. 36, no. 4, pp. 479–483.
24. Margulis A.B., Il'inskaya O.N., Kolpakov A.I., Mufer K. Induction of hypometabolic forms of non-sporeforming grampositive bacteria. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2005, vol. 147, no. 2, pp. 108–114. (In Russian)
25. Suga H., Smith K. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003, vol. 7, pp. 586–591.
26. Hentzer M., Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.*, 2003, vol. 112, no. 9, pp. 1300–1307.
27. Hentzer M., Riedel K., Rasmussen T.B., Heydorn A., Andersen J.B., Parsek M.R., Rice S.A., Eberl L., Molin S., Høiby N., Kjelleberg S., Givskov M. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound, *Microbiology*, 2002, vol. 148, pt. 1, pp. 87–102.
28. Belonogova N.V., Bardina T.S., Ponomarev V.Ya., Kolpakov A.I., Margulis A.B., Il'inskaya O.N. Halogenated furanones as modifiers physiological activity in *Staphylococcus aureus*. *Vestn. Kazan. Tekhnol. Univ.*, 2013, vol. 16, no. 15, pp. 100–102. (In Russian)
29. Mit'ko V.E., Margulis A.B., Ponomarev V.Ya., Kolpakov A.I., Il'inskaya O.N. Toxic and genotoxic effects of newly synthesized furanones and their halogenated derivatives. *Vestn. Kazan. Technol. Univ.*, 2013, vol. 16, no. 11, pp. 211–213. (In Russian)
30. Stephens K. Pheromones among prokaryotes. *Crit. Rev. Microbiol.*, 1986, vol. 13, no. 4, pp. 105–112.
31. Kell D.B., Kaprelyants A.S., Grafen A. Pheromones, social behavior and the functions of secondary metabolism in bacteria. *Tree*, 1995, vol. 10, no. 3, pp. 126–129.

Received
May 26, 2015

Kalimullina Elmira Talgatovna – Student, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: elmira452@gmail.com

Margulis Anna Borisovna – PhD in Biology, Associate Professor, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: *Anna.Margulis@kpfu.ru*

Kolpakov Aleksei Ivanovich – PhD in Biology, Senior Research Fellow, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

Kuprianova-Ashina Flera Garifovna – Doctor of Biology, Leading Research Fellow, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.