

## ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЮГЛОНА НА ИНТАКТНЫЕ И ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ МИКРОБНЫЕ КЛЕТКИ

Е.В. Емельянова, И.П. Соляникова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, Пущино, Россия, [elenvem@ibpm.pushchino.ru](mailto:elenvem@ibpm.pushchino.ru), [innas@ibpm.pushchino.ru](mailto:innas@ibpm.pushchino.ru)

**Аннотация.** Было проведено сравнение воздействия юглона (5-гидрокси-1,4-нафтохинона) на интактные и иммобилизованные клетки бактерий. Показано, что исследованные культуры различались по соотношению реакции на юглон между интактными и иммобилизованными клетками. Индукция юглоном также по-разному влияла на клетки. После индукции юглоном наблюдали повышение в 2 раза активности как фермента, инициирующего разложение юглона, так и каталазы.

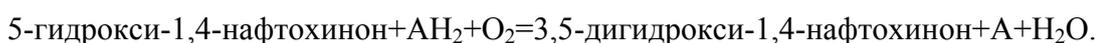
**Ключевые слова:** *актинобактерии, интактные и иммобилизованные клетки, юглон; 5-гидрокси-1,4-нафтохинон*

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-297-301

Природный нафтохинон – юглон (5-окси-1,4-нафтохинон), благодаря своим свойствам, находит применение в пищевой и косметической промышленности, в медицине, технике и сельском хозяйстве.

Оперативный метод определения содержания юглона основан на использовании сенсорных анализаторов, например, микробного сенсора, лабораторная модель которого разработана в ИБФМ РАН. Ранее было показано, что разработанная модель микробного амперометрического сенсора на 5-гидрокси-1,4-нафтохинон может быть использована для изучения метаболизма юглона актинобактериями. В настоящей работе было продолжено изучение влияния юглона на метаболизм бактерий с использованием интактных клеток (полярографический метод) и иммобилизованных покоящихся клеток (сенсорная методика) [Емельянова, 2017].

Юглон 3-монооксигеназа – фермент, инициирующий реакцию разложения юглона в аэробных условиях [Schonburg, 2006]:

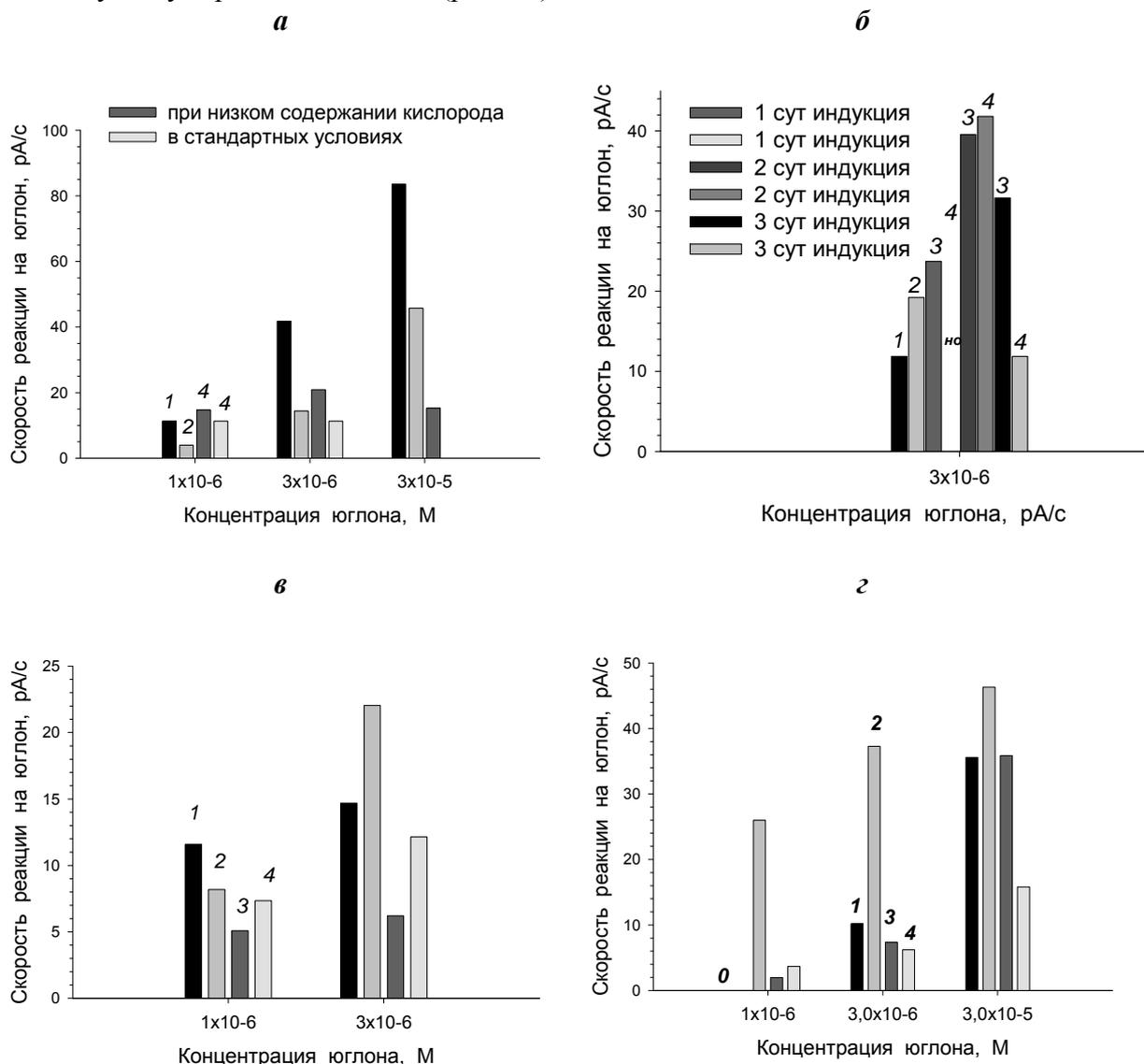


Фермент относится к классу оксидоредуктаз. Реакция происходит с потреблением кислорода. Поэтому интенсивность реакции клеток (как интактных, так и иммобилизованных) на юглон оценивали по изменению потребления кислорода клетками в ответ на внесение субстрата – юглона, которое было связано с изменением метаболизма бактерий. Реакцию клеток на юглон измеряли в рА/с.

Была оценена реакция на юглон интактных и иммобилизованных бактериальных клеток до и после индукции юглоном. Результаты измерения приведены на рис. 1. Как видно из приведённых на рис. 1 данных, у двух культур из четырёх величина реакции на юглон для интактных клеток была выше, чем для иммобилизованных: для *Rh 13* – в области низких концентраций юглона, а для *Rhodococcus erythropolis* – при всех исследованных концентрациях. При этом только для *P. putida* индукция юглоном однозначно привела к увеличению отклика клеток на него, для остальных культур эффект индукции был отрицательным. Примеры зависимости реакции клеток от концентрации юглона приведены на рисунке 2.

В случае культуры *P. putida*, когда индукция юглоном приводила к положительным результатам, существенное значение имели условия проведения

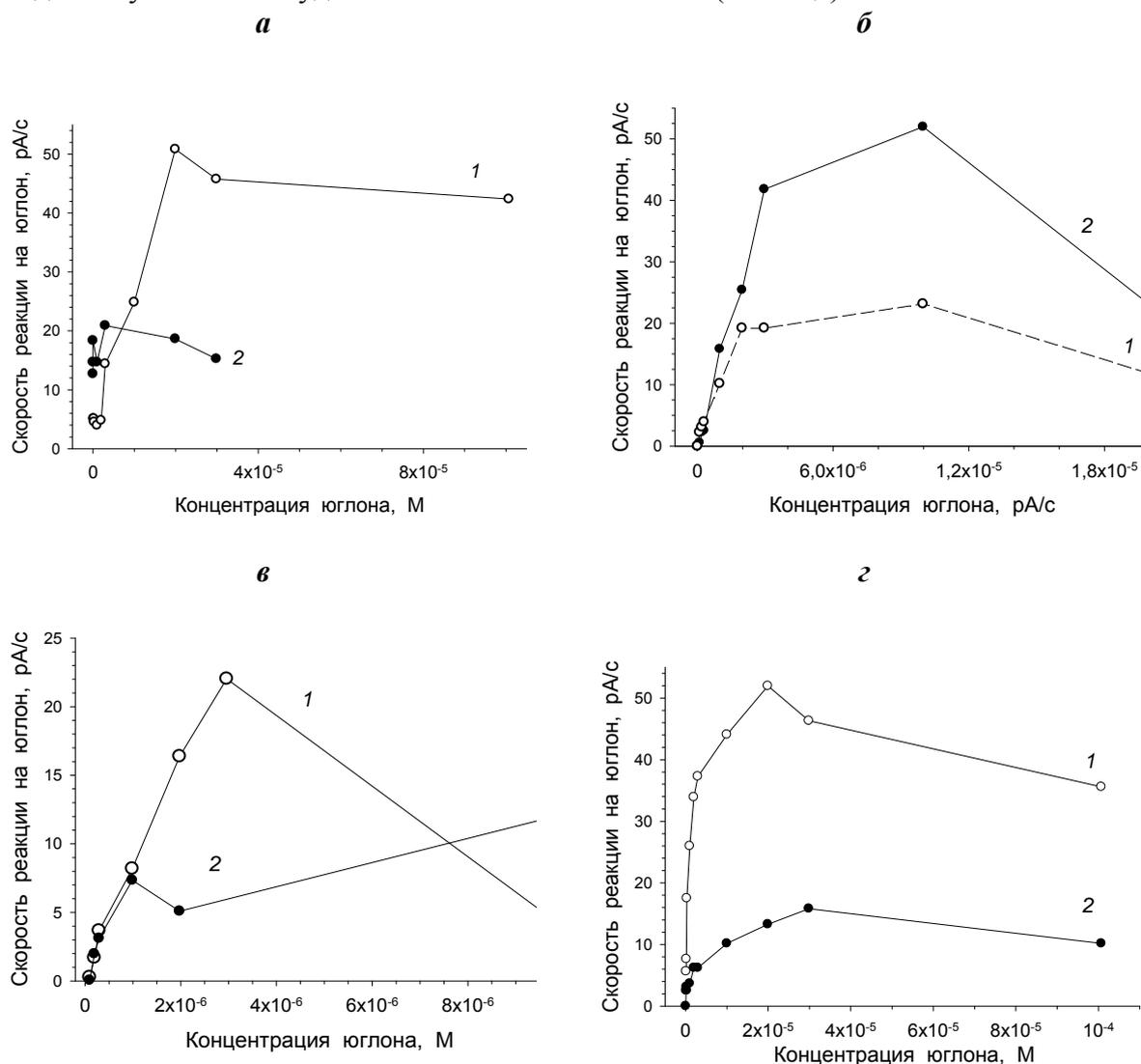
адаптации: продолжительность индукции (рис. 1б) и концентрация кислорода в среде (рис. 3). Так для *P. putida* понижение содержания кислорода в среде приводило к снижению эффективности индукции. В отличие от этой культуры, для *R. erythropolis*, у которого в стандартных условиях аэрации был зафиксирован отрицательный эффект индукции, снижение аэрации во время индукции способствовало повышению реакции на юглон у индуцированных клеток (рис. 1а).



**Рис. 1.** Реакция на юглон интактных неиндуцированных (1), индуцированных (3) и иммобилизованных неиндуцированных (2), индуцированных (4) клеток бактерий: *Rhodococcus erythropolis* (а), *Pseudomonas putida* (б), *Rh13* (в), *Rh1св* (г). *no* – нет реакции.

Активность юглон 3-монооксигеназы штамма *Rh13* (самая низкая величина реакции для иммобилизованных клеток) определяли в бесклеточных экстрактах, полученных как из неиндуцированных клеток, так и из индуцированных юглоном в течение 4 часов. Результаты измерений представлены в таблице. В экстракте из неиндуцированных клеток удельная активность юглон 3-монооксигеназы была невысокой, но достоверно определяемой. После индукции юглоном наблюдали повышение активности фермента в 2 раза. Известно, что, попадая в клетку, нафтохиноны приводят к условиям окислительного стресса [Thomson, 1971]. Так для

гриба *Fusarium decemcellulare*, синтезирующего нафтохиноновые метаболиты, было показано, что процесс адаптации к юглону связан с увеличением в клетках активности основных защитных ферментов от окислительного стресса – каталазы и супероксиддисмутазы [Меденцев, 2001]. Поэтому нами, кроме юглона 3-монооксигеназы, была проверена активность двух ферментов, принимающих участие в защите организмов от окислительного стресса: каталазы и глутатионредуктазы. В обоих бесклеточных экстрактах штамма *Rh13* активность глутатионредуктазы отсутствовала. Штамм является каталазо-положительным, инкубирование с юглоном приводило к увеличению удельной активности каталазы (таблица).



**Рис. 2. Зависимость реакции на юглол от концентрации субстрата для иммобилизованных неиндуцированных (1) и индуцированных (2) клеток бактерий: *Rhodococcus erythropolis* (а), *Pseudomonas putida* (б), *Rh13* (в), *Rh1св* (г).**

Ранее при определении активности ферментов, участвующих в защите от перекисных радикалов (каталазы, супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы, пероксидазы) у актинобактерии *Rhodococcus opacus* 1СР, выращенной на богатой среде, активность супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы, и пероксидазы не детектировалась, за исключением каталазы. В клетках, выращенных на бензоате, активность каталазы была в 2-3 раза выше, чем в клетках, выращенных на богатой среде [Соляникова, 2017]. Каталазо-положительной была и бактериальная культура,

способная расти на юглоне в качестве единственного источника углерода и энергии [Rettenmaier, 1983].

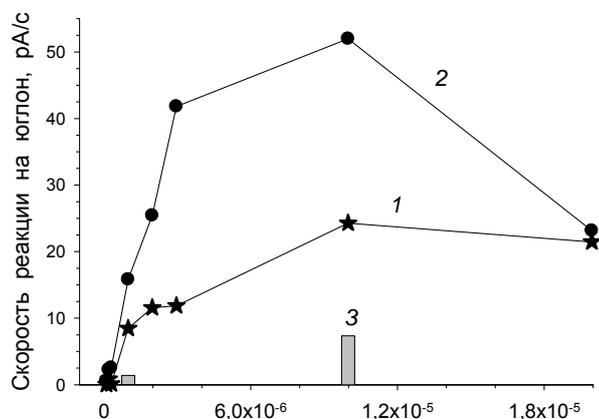


Рис. 3. Зависимость реакции иммобилизованных клеток *Pseudomonas putida* от условий индукции юглоне: 1 - 2х суточная индукция; 2 – 3х суточная индукции; 3 – индукция при низком содержании кислорода в среде.

Таблица.

Активность ферментов в бесклеточном экстракте *Rh13* до и после индукции юглоне

| Фермент                | Удельная активность, мкмоль/мин на мг белка |                       |
|------------------------|---|-----------------------|
|                        | Неиндуцированные клетки                     | Индуцированные клетки |
| Юглон 3-монооксигеназа | 0.0182                                      | 0.0405                |
| Каталаза               | 0.0191                                      | 0.0389                |
| Глутатион редуктаза    | 0   | 0                     |

В дальнейшем предполагается расширить круг определяемых ферментов, защищающих клетки от окислительного стресса, выявить зависимость активности этих ферментов от условий проведения индукции юглоне и особенности, характерные для каждой культуры.

Таким образом, исследованные культуры различались не только по ответу на индукцию юглоне, но и по соотношению реакции на юглон между интактными и иммобилизованными клетками. Это можно объяснить как наличием или отсутствием ферментов, ответственных за формирование ответа культуры, так и их природой – индуцибельные или конститутивные.

#### Литература

Емельянова Е.В., Сузина Н.Е., Поливцева В.Н., Решетилов А.Н., Соляникова И.П. Выживаемость и биодegradативная активность *Gordonia polyisoprenivorans* 135 – основы рецепторного элемента биосенсора // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53, № 5. – С. 510–518.

Меденцев А.Г., Аринбасарова А.Ю., Акименко В.К. Адаптация фитопатогенного гриба *Fusarium decemcellulare* к окислительному стрессу // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 1. – С. 34–38.

Соляникова И.П., Сузина Н.Е., Емельянова Е.В., Поливцева В.Н., Пшеничникова А.Б., Лобанок А.Г., Головлёва Л.А. Морфо-физиологические и биохимические характеристики штамма *Rhodococcus opacus* 1CP – деструктора бензоата – в стрессовых условиях // Микробиология. – 2017. – Т. 86, № 2. – С. 188–200.

Rettenmaier H., Kupas U., Lingens F. Degradation of juglone by *Pseudomonas putida* J1 // FEMS Microbiology Letters. – 1983. – V. 19, No. 2/3. – P. 193–195.

Schonburg D., Schonberg I., Chang A. Handbook of enzymes / V. 27. Class I. Oxidoreductases XII. EC 1.14.15-1.97. – Springer, 2006. – P. 364–366.

Thomson R.H. Naturally occurring quinones. – London, New York: Academic Press, 1971. – 198 p.

## **STUDY OF THE EFFECT OF JUGLONE ON INTACT AND IMMOBILIZED MICROBIAL CELLS**

E.V. Emelyanova, I.P. Solyanikova

G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia, [elenvem@ibpm.pushchino.ru](mailto:elenvem@ibpm.pushchino.ru), [innas@ibpm.pushchino.ru](mailto:innas@ibpm.pushchino.ru)

**Abstract.** The effects of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) on intact and immobilized microbial cells were compared. It has been shown that as to one cultures responses of intact cells were higher than those of immobilized cells to juglone and vice versa with respect to other cultures. The effect of induction by juglone was different for the cultures studied. The activity of juglone 3-monooxygenase, the enzyme that initiates the decomposition of juglone, and the activity of catalase increased 2 times after induction.

**Keywords:** *actinobacteria, intact and immobilized cells, juglone, 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone*