УДК 587.871.1:8.04.615.28

Л. Степура, канд. техн. наук, О. Радченко, канд. біол. наук, П. Зелена, зав. учеб. лаб.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ НА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ТА ЦИТО-МОРФОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДРІЖДЖІВ РОДІВ *CANDIDA* І *SACCHAROMYCES*

Порівняно фізіолого-біохімічні та цито-морфологічні властивості вихідних штамів Candida albicans ATCC 10331, Saccharomyces sp. КНУ 1 та їх варіантів, які культивували на середовищі Сабуро з аніонною поверхнево-активною речовиною (ПАР) додецилсульфатом натрію (ДСН). Показано, що контакт з ДСН супроводжувався зникненням у дріжджів здатності до асиміляції ряду субстратів але не впливав на чутливість до антибіотиків. Після першого пасажу змінювалась морфологія клітин, зменшувалась кількість волютину, з'являлись жирові включення. Після четвертого пасажу цито-морфологічні особливості клітин частково відновлювались.

Ключові слова: додецилсульфат натрію, біологічні властивості, дріжджі.

Вступ. Індустріальна революція призвела до забруднення біосфери широким спектром ксенобіотиків. Контакт живих організмів з цими речовинами може супроводжуватися зміною їх біологічних властивостей, формуванням резистентності, а часом і появою здатності використовувати ксенобіотики як джерела харчування [3,12]. Дріжджі є зручною моделлю для дослідження антропогенного впливу на еукаріотичні організми. Для них характерна мінливість та широкі адаптаційні властивості, які забезпечуються багатьма генетичними і регуляторними механізмами [6]. Показано, що за впливу бензо-α-пірену і 7,12-диметилбензо-α-антрацену змінювалась швидкість поглинання *Saccharomyces cerevisiae* низки амінокислот [11]. Під дією *L*-нафтилацетату спостерігали збільшення активності естерази у *Symbiotaphrina kochii* [13]. Вплив тритону Х-100 призводив до суттєвого підвищення утворення цитринової кислоти культурою *Yarrowia lipolytica* і до змін морфології клітин [10]. В присутності дибутилфтолату спостерігали зміни швидкості росту дріжджів родів *Candida* і *Saccharomyces*, а твіну 80 – товщини клітинної стінки [7]. Зафіксовано появу нового зовнішнього полісахаридного шару навколо клітин *Candida utilis* та *Saccharomyces cerevisiae* після опромінення радіочастотним електромагнітним випроміненням, який забезпечував стійкість дріжджів до дії pH, температури, антибіотиків [1].

Додецилсульфат натрію – аніонна поверхнево-активна речовина (ПАР), яка широко розповсюджена в товарах побутової хімії (зубних пастах, шампунях, гелях для душів, піні для ванн) і, в силу свого призначення, практично у повному обсязі надходить у довкілля [9]. Раніше нами було показано, що короткотривале культивування деяких бактерій на середовищі з ДСН в концентрації, що наближається до мінімальної інгібувальної, супроводжується зміною їх морфологічних і фізіолого-біохімічниих властивостей. Так бактерії роду *Corynebacterium*, які культивувались впродовж 10 пасажів на середовищі, яке містило ДСН в концентрації 50 мг/л, змінювали морфологію клітин, забарвлення за Грамом, чутливість до антибіотиків, інтенсивність секреції лізину, антигенні властивості та склад поверхневих білків [3]. Культивування впродовж 4 пасажів бактерій *Staphylococcus aureus* ATCC 6633 на середовищі з 50 мг/л ДСН призводило до зміни здатності бактерій позитивно забарвлюватися за Грамом, появою уреази, зникненням бета-галактозидази, вдвічі зменшенням чутливості до антибіотиків левофлоксацину і лінезоліду [5]. Оскільки дріжджі є представниками мікробіоти людини, а також активно використовуються в промисловості, актуальним залишається вивчення впливу ДСН на еукаріотичні клітини у концентрації, що зумовлює зміни у прокаріотичних клітин. Зміни біологічних властивостей мікроорганізмів можуть створювати проблеми для їх ідентифікації.

Метою даної роботи було порівняти фізіолого-біохімічні та цито-морфологічні властивості штамів *Candida albicans* ATCC10331 і *Saccharomyces sp.* КНУ 1 до та після нетривалого контакту з додецилсульфатом натрію.

Матеріали та методи досліджень. Об'єктами дослідження були штами *Candida albicans* ATCC 10331, *Saccharomyces sp.*КНУ1 з колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології та загальної імунології Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Їх культивували за температури 28^0С, впродовж 1, 2 та 4 пасажів на щільному середовищі Сабуро (pH 5,6) з додецилсульфатом натрію (ДСН) в концентрації 50 мг/л. Час культивування кожного пасажу становив 48 годин. Фізіолого-біохімічні властивості вихідних штамів і їх варіантів визначали за допомогою мікробіологічного аналізатора Vitek 2 Compact (Biomerieus, Франція) [8]. Суспензії 48-годинних культур у 3 мл фізіологічного розчину готували в умовах ламінарного боксу за 5-10 хв. до початку аналізу. Щільність суспензій за стандартом Мак Фарланда доводили до 2 McF ($2x10^7$ КУО/мл)за допомогою денситометра Densi-La-Meter (Erba-Lachema). У роботі використовували YST-картки. Для антибіотикограми готували іншу суспензію: 280 мкл першої суспензії вносили у 3 мл фізіологічного розчину. Для визначення чутливості до антибіотиків (флуцитозину, флюконазолу, вориконазолу, амфотерицину-В) використовували AST-картки. Морфологію клітин та гранули волютину визначали на фіксованих препаратах, пофарбованих метиленовим синім, жирові включення – суданом червоним [2] в десяти полях зору. Розміри клітин визначали за допомогою окуляр та об'єкт мікрометра. Препарати мікроскопіювали на мікроскопі Zeiss Primo Star. Достовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента на рівні значимості не менше 95%. Обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми "Statistica 12".

Результати та їх обговорення. Фізіолого-біохімічні властивості вихідних штамів та їх варіантів що культивувалися на середовищі з ДСН, наведено у табл.1.

© Степура Л., Радченко О., Зелена П., 2014

***Таблиця* 1. Фізіолого-біохімічні властивості вихідних штамів *Candida albicans* АТСС 10331 і *Saccharomyces sp.* КНУ 1 та їх варіантів, отриманих після чотирьох пересівів на середовищі Сабуро з додецилсульфатом натрію в концентрації 50 мг/л**

№ за/п	Властивості	*Candida albicans* АТСС 10331		*Saccharomyces sp.* КНУ 1	
		Вихідний штам	Після культивування на середовищі Сабуро з ДСН	Вихідний штам	Після культивування на середовищі Сабуро з ДСН
	Асиміляція				
1	*L*-малату	-	-	+	+
2	Еритритолу	-	-	-	-
3	Гліцерину	-	-	+	-
4	Арбутину	-	-	+	+
5	Амігдаліну	-	-	+	-
6	*D*-галактози	+	+	+	-
7	Гентібіози	-	-	+	-
8	*D*-глюкози	+	+	+	+
9	Лактози	-	-	+	-
10	Метил-*α*-*D*-глюкопіранозиду	+	+	+	+
11	*D*-целобіози	-	-	+	-
12	*D*-мальтози	+	+	+	+
13	*D*-рафінози	-	-	+	+
14	*D*-манози	+	+	+	+
15	*D*- мелібіози	-	-	+	-
16	*D*- мелезітози	+	+	-	+
17	*L*-сорбози	+	-	+	-
18	*L*-рамнози	-	-	+	-
19	Ксиліту	+	+	+	+
20	*D*-сорбіту	+	+	+	-
21	Сахарози	+	+	+	+
22	*D*-туранози	+	+	+	+
23	*D*-трегалози	+	+	+	+
24	*L*-арабінози	-	-	+	-
25	*D*-галактуронату	+	+	-	-
26	*L*-глютамату	+	+	+	-
27	*D*- ксилози	+	+	+	-
28	*DL*-лактату	-	-	-	-
29	Ацетату	+	+	+	+
30	Цитрату	+	+	+	-
31	Глюкуронату	+	(-)	+	+
32	*L*- проліну	+	+	-	-
33	2-кето-D-глюконату	+	+	-	-
34	*N*-ацетилглюкозаміну	+	(-)	-	-
35	*D*-глюконату	+	+	-	-
	Синтез ферментів				
36	Гамма-глютаміл- трансферази	-	-	+	-
37	Тирозин-ариламідази	-	-	-	-
38	Лейцин- аріламідази	+	+	+	+
39	Бета-N-ацетил-глюкозамідази	-	-	-	-
40	PNP-N-ацетил-BD-галактозамідази 1	-	-	-	-
41	*L*-лізин-аріламідази	-	-	-	-
42	Уреази	-	-	-	-
43	Альфа-глюкозидази	+	+	-	-
44	Гідроліз ескуліну	-	-	+	-
45	Розщеплення аргініну	+	+	+	-
46	Редукція нітрату	-	-	-	-

Позначення: "+" – реакція позитивна; "-" – реакція негативна; "(-)" – реакція слабко негативна

Як видно з таблиці, вихідний штам *Candida albicans* АТСС 10331 під впливом ДСН зазнавав змін за трьома параметрами: втрачав здатність асимілювати *L*-сорбозу і знижував здатність асимілювати глюкуронат і *N*-ацетилглюкозамін. Впродовж чотирьох пасажів на середовище з ксенобіотиком ми спостерігали цито-морфологічні зміни дріжджів. Клітини вихідного штаму *Candida albicans* АТСС 10331 після культивування на Сабуро добре зафарбовувались метиленовим синім, були овальними, іноді утворювали псевдоміцелій. Волютинові гранули спостерігали у 40% клітин. (рис 1, А). Після першого пасажу на Сабуро з ДСН виявлено зменшення довжини клітин з 8-10 мкм до 4-7 мкм. Вони погано профарбовувались барвником, кількість клітин з волютиновими гранулами зменшувалась вдвічі, натомість майже в кожній клітині з'являлись включення жиру (рис 1, Б). Однак, після чотирьох пересівів на середовище з ДСН *Candida albicans* АТСС 10331 майже повністю відновлював свої цито-морфологічні властивості і практично не відрізнявся від вихідного штаму (рис 1, В).

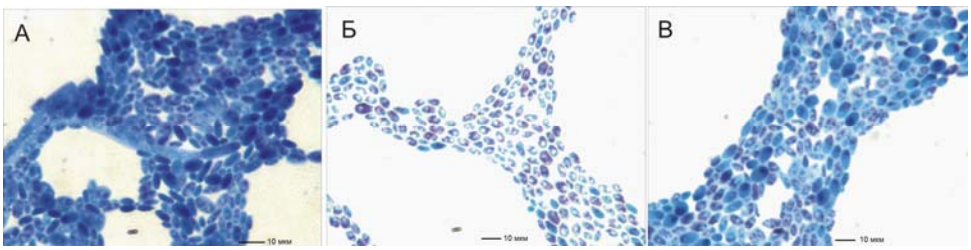

Рис.1. Морфологія клітин *Candida albicans* АТСС 10331 у препараті, забарвленому метиленовим синім:
А – вихідний штам; Б – варіант, що культивувався 1 пасаж на середовищі Сабуро з ДСН (50 мг/л);
В – варіант, що культивувався 4 пасажі на середовищі Сабуро з ДСН (50 мг/л).
На рисунку гранули волютину виглядають темними зонами в клітині, жирові включення – світлими

Saccharomyces sp. КНУ 1 після культивування на середовищі Сабуро з ДСН зазнав зміни 18 параметрів, при цьому 17 властивостей було втрачено і одна – набута. Ці дріжджі втратили здатність асимілювати гліцерин, амігдалін, *D*-галактозу, гентібіозу, лактозу, *D*-целобіозу, *D*-мелібіозу, *L*-сорбозу, *L*-рамнозу, *D*-сорбіт, *L*-арабінозу, *L*-глютамат, *D*-ксилозу, цитрат, позбулися ферменту гамма-глютаміл-трансферази, перестали розщеплювати аргінін і гідролізувати ескулін, проте почали асимілювати *D*-мелезітозу (табл.1).

Saccharomyces sp. КНУ 1 під впливом ДСН зазнавав і цито-морфологічних змін. Клітини вихідного штаму після культивування на середовищі Сабуро були овальної форми, розмірами 4-5х8-10 мкм (рис.2, А). Включення волютину фіксували у 30% клітин. Після першого пасажу на середовищі з ДСН дріжджі ставали округлими, діаметром 5±0,2 мкм, втрачали гранули волютину (рис.2,Б), дрібнозернисті жирові включення з'являлися практично в кожній клітині. Морфологія клітин *Saccharomyces sp.* КНУ 1 за чотири пасажі на середовищі з додаванням додецилсульфату натрію повністю не відновлювалась. Клітини мали розміри 4-5х 6-8 мкм і не містили включень жиру та волютину (рис.2, В).

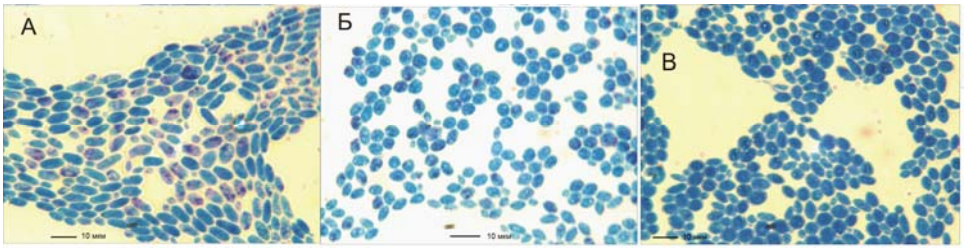

Рис.2. Морфологія клітин *Saccharomyces sp.* КНУ 1 у препараті, забарвленому метиленовим синім:
А – вихідний штам; Б – варіант, що культивувався 1 пасаж на середовищі Сабуро з ДСН (50 мг/л);
В – варіант, що культивувався 4 пасажі на середовищі Сабуро з ДСН (50 мг/л).
На рисунку гранули волютину виглядають темними зонами в клітині, жирові включення – світлими

Подібна тенденція до вкорочення довжини клітини при збереженні їх ширини спостерігалась нами раніше за впливу аналогічної концентрації ДСН на прокаріотичні клітини – бактерії *Stenotrophomonas maltophilia* УКМ 5642 [4]. На знімках, отриманих за допомогою електронного мікроскопа фіксували в клітинах появу темних і прозорих включень після контакту з ДСН.

Зміна деяких біохімічних властивостей мікроорганізмів може супроводжуватись зміною чутливості до низки антибіотиків та формування резистентності до них [4]. Чутливість до антибіотиків штаму *Candida albicans* АТСС 10331 після нетривалого контакту клітин з 50 мг/л ДСН залишилась без змін. Як вихідний штам, так і його варіант були чутливими до флуцитозину, флюконазолу, вориконазолу, амфотерицину. Мінімальні інгібуючі концентрації флуцитозину і флюконазолу становили – 1, вориконазолу – 0,12, амфотерицину -0,5 мг/л.

Висновки. Таким чином, було показано, що короткотривале (впродовж 4 пасажів) культивування дріжджів *Candida albicans* АТСС 10331 і *Saccharomyces sp.* КНУ 1 на середовищі Сабуро з незначним вмістом (50 мг/л) аніонної поверхнево-активної речовини додецилсульфату натрію призводить до зміни деяких фізіолого-біохімічних властивостей. *Candida albicans* АТСС 10331 втрачав здатність асимілювати *L*-сорбозу, і знижував здатність асимілювати глюкуронат і *N*-ацетилглюкозамін. *Saccharomyces sp.* КНУ 1 зазнав зміни 18 параметрів: 17 з них пов'язані з втратою здатності асимілювати 14 субстратів, синтезувати гамма-глютаміл-трансферазу, розщеплювати аргінін, гідролізувати ескулін; 1 – з набуттям властивості асимілювати *D*- мелезітозу. Такі суттєві зміни фізіолого-біохімічних властивостей свідчать про негативний вплив ДСН на дріжджові клітини і можуть створювати проблеми при ідентифікації як клінічно важливих так і промислових штамів дріжджів. На середовищі з ДСН, вже після першого пасажу, клітини *Candida albicans* АТСС 10331 та *Saccharomyces sp.* КНУ 1 накопичували жирові гранули, волютин був практично відсутнім. Дріжджі різко змінювали цито-морфологічні властивості на перших двох пасажах і відновлювали їх повністю (*Candida albicans* АТСС 10331) або частково після четвертого пасажу (*Saccharomyces sp.* КНУ 1), що може свідчити про поступову адаптацію культур до аніонної ПАР. Під впливом ДСН чутливість *Candida albicans* АТСС 10331 до антибіотиків (флуцитозину, флюконазолу, вориконазолу, амфотерицину) не змінилася.

Список використаних джерел

1. Войчук С. И. Влияние радиочастотного электромагнитного излучения на физиологические особенности Saccharomyces cerevisiae УКМ Y-517 / С. И. Войчук,. В. С. Подгорский, Е. Н. Громозова // Мікробіол. журн. – 2004. – Т. 66, № 3. – С. 51–57.

2. Особенности строения волютиновых гранул в клетках низших полифосфатаккумулирующих эукариот / Е. Н. Громозова, С. И. Войчук, Т. Л., Качур В. Ф. Горчев, С. А. Карахим // Біотехнологія. – 2010. – Т. 3, № 4. – С. 55–61.

3. Вплив синтетичних поверхнево-активних речовин на деякі біологічні властивості непатогенних видів роду Corynebacterium / Л. О. Михальський, І. М. Фуртат, О. С. Радченко, Л. Г. Степура // Мікробіол. журн. – 2006. – Т. 68, № 3. – С. 52–61.
4. Зміна деяких біологічних властивостей Stenotrophomonas maltophilia під впливом додецилсульфату натрію / О.Радченко, Л. Степура, Ю. Юмина, М. Борецкая, П. Зелена // Мікробіологія і біотехнологія = Microbiology & Biotechnology. – 2014. – N 1. – С. 53–62.
5. Вплив поверхнево-активних речовин на деякі біологічні властивості Corynebacterium glutamicum / І. М. Фуртат, Т. М. Ногіна, Л. О. Михальський та ін. // Національний університет "Києво-Могилянська Академія". Наукові записки. – 2002. – 20 (2). – С. 435–438.
6. G. D. Brown, M. G. Netea et al. Immunology and Fungal Infections – Springer. – 2007. Chapter 16. – P. 361-382.
7. Dibutylphthalate and Tween 80 alter ultrastructure in Candida albicans: implications for peroxisome proliferation / J. Blaize, W. J. L'amoreaux, M. Downey et al. // Can. J. Microbiol. – 2009. – Vol. 55, N 4. – P. 437–449.
8. David H., Pincus D.H. Microbial Identification Using the bioMérieux VITEK® 2 System in M.J.Miller Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods, 2006. – Vol. 2.
9. Hrenovic J. Toxicity of anionic and cationic surfactantto Acinetobacter junii in pure culture / J. Hrenovic, T. Ivankovic // Central European Journal of Biology. – 2007. – Vol. 2, N 3. – P. 405–414.
10. Enhanced Production of Citric Acid in Yarrowia lipolytica by Triton X-100 / M. Mirbagheri, I. Nahvi, G. Emtiazi at al. // Appl Biochem Biotechnol. – 2011. – Jul. 20.
11. Tanudjojo Nurhajati. Uptake rate measurement of some amino acids on normal and treated yeast cells to xenobiotics using ^{14}C labelled amino acid / Nurhajati Tanudjojo, Pringgo Soedigdo, Soekeni Soedigdo // Food and nutrition bulletin. – 2002. – Vol. 23, N 3. – P. 61–65.
12. The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects / R. J. Russell, C. Scott, C. J. Jackson et al. // Evolutionary Applications. – 2011. – Vol. 4, N 2. – P. 225–248.
13. Shen S. K. Xenobiotic induction of esterases in cultures of the yeast-like symbiont from the cigarette beetle / S. K. Shen, P. F. Dowd // Emomol. expo appl. – 1989. – Vol. 52. – P. 179–184.

Надійшла до редколегії 24.11.14

Л. Степура, канд. техн. наук, О. Радченко, канд. биол. наук, П. Зелена, зав. учеб. лаб.
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ЦИТО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДРОЖЖЕЙ РОДА *CANDIDA* И *SACCHAROMYCES*

Сравнены физиолого-биохимические и цито-морфологические свойства исходных штаммов Candida albicans ATCC 10331, Saccharomyces sp. КНУ 1 и их вариантов, которые культивировали на среде Сабуро с анионным поверхностно-активным веществом (ПАВ) додецилсульфатом натрия (ДСН). Показано, что контакт с ДСН сопровождался исчезновением у дрожжей способности к ассимиляции ряда субстратов, но не влиял на чувствительность к антибиотикам. После первого пассажа изменялась морфология клеток, уменьшалось количество волютина, появлялись жировые включения. После четвертого пассажа цито-морфологические особенности клеток частично восстанавливались.

Ключевые слова: додецилсульфат натрия, биологические свойства, дрожжи.

L. Stepura, PhD., O. Radchenko, PhD., P. Zelena, chief of science lab.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

EFFECTS OF SODIUM DODECYLSULFATE ON PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AD CYTOMORPHOLOGICAL PROPERTIES OF *CANDIDA* AND *SACCHAROMYCES* GENERA

Physiological, biochemical, cyto-morphological properties of initial strain Candida albicans ATCC 10331, Saccharomyces sp. КНУ 1 and their variants, which were cultivated in medium Saburo with anionic surfactant (SAS) sodium dodecyl sulfate (SDS) have been compared. It was shown that the effect of SDS was accompanied by disappearance of possibility to assimilate a number of substrates, but did not affect antibiotics sensitivity. They changed its morphology after 1 passage, diminution quantity of volutin, appearance of fat inclusion. Morphology of cells partially restored after 4-th passage.

Key words: sodium dodecyl sulfate, biological properties, yeasts.

UDK 577.121.9

A. Yurchenko, student, V. Konopelniuk, PhD., E. Torgalo, PhD., O. Savchuk, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

EFFECT OF DIFFERENT ORAL DOSES OF GLUCOSE ON THE BLOOD SERUM CONTENT OF SEROTONIN IN RATS

The analysis of the effect of different doses of oral glucose content of serotonin in blood serum of rats. The increasing content of serotonin in blood serum of rats with diabetes and with the administration of glucose. The increase in the studied parameters in the serum of the control group of animals under conditions of a glucose. It is concluded that glucose has a direct positive effect on the endogenous flow of serotonin into the bloodstream.

Key words: glucose, serotonin, rat.

Introduction. Ukraine has a population of about 45.7 million and the official data state that the prevalence of diabetes in Ukraine is 2.5% % (1,133,922 people are registered with diagnosed diabetes). The Diabetes Atlas indicates for Ukraine an estimated prevalence of 9.6% [for the population between 20 to 79 years old] which is in great discrepancy with the figures registered by the health system (2.5%) but is closer to the results of local studies (8.7%).

Diabetes begins with a loss of insulin sensitivity in white adipose tissue and skeletal muscle. Initially, the body compensates for the decrease in insulin-mediated signaling by enlarging the beta cells (found in the Islets of Langerhans in the pancreas), resulting in increased insulin release to maintain euglycemia *(2)*. Eventually, however, the beta cells begin to fail, leading to a loss of insulin production. The lack of insulin results in elevated plasma glucose concentrations, which if sustained, leads to damage of the microvasculature of various internal organs (e.g., kidneys and eyes) and the peripheral aspects of the limbs, including the feet.

Current therapies for diabetes include agents that enhance insulin sensitivity, elevators of insulin release and inhibitors of carbohydrate absorption (3). More recently characterized agents mimic the role (and enhance the activity) of the incretin hormone glucagon-like peptide- 1 (GLP-1) (Box 1). Such mimetics include the dipeptylpeptidase inhibitor sitigliptin, which prolongs the half-life of endogenous GLP-1, and the non-hydrolyzable GLP-1 analog exendin-4. GLP-1 is released in a glucose-dependent manner from the L cells of the gut, enters the circulation, evokes GLP-1 receptor–mediated release of insulin from beta cells, inhibits glucagon release, and reduces gastric motility (4).

© Yurchenko A., Konopelniuk V., Torgalo E., Savchuk O., 2014