

УДК 504.054.582.282.23:546.3:549.28

БИОИНДИКАЦИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ С ПОМОЩЬЮ КАРОТИНСИНТЕЗИРУЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ РОДА *RHODOTORULA*

Крупей К.С., аспирант, Рыльский А.Ф., д.б.н., профессор

Запорожский национальный университет ул. Жуковского, 66, г. Запорожье, Украина
email: krupeyynu@gmail.com

Исследования показали, что дрожжи *Rhodotorula rubra* RA-10, *Rh. aurantiaca* Y-1195 и *Rh. glutinis* Y-1335 реагируют на присутствие определенных концентраций металлов (Cu^{2+} , Zn^{2+} и Cd^{2+}) в среде утратой пигмента и ингибированием роста. Полная утрата пигмента наблюдалась при концентрациях металлов, что на 11,2-75 % ниже тех концентраций, при которых наблюдалось блокирование роста дрожжей. Сделано предположение о возможном участии каротиноидов и их предшественников в снижении влияния свободных радикалов на дрожжевые клетки. Полученные результаты делают возможным рекомендовать дрожжей рода *Rhodotorula* для использования в биоиндикационных исследованиях при загрязнении окружающей среды тяжелыми металлами.

Ключевые слова: пигментсинтезирующие дрожжи, ионы тяжелых металлов, рост, малоновый диальдегид, биоиндикация.

БІОІНДИКАЦІЯ ЗАБРУДНЕННЯ ДОВКІЛЛЯ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ ЗА ДОПОМОГОЮ КАРОТИНОСИНТЕЗУВАЛЬНИХ ДРІЖДЖІВ РОДУ *RHODOTORULA*

Крупей К.С., Рильський О.Ф.

Запорізький національний університет, Україна, 69600, м. Запоріжжя, вул. Жуковського, 66

Дослідження показали, що дріжджі *Rhodotorula rubra* RA-10, *Rh. aurantiaca* Y-1195 та *Rh. glutinis* Y-1335 реагують на присутність певних концентрацій металів (Cu^{2+} , Zn^{2+} та Cd^{2+}) у середовищі втратою пігменту та інгібуванням росту. Повна втрата пігменту спостерігалася при концентраціях металів, що на 11,2-75 % нижче тих концентрацій, за яких відбувалося блокування росту дріжджів. Зроблено припущення про можливу участь каротиноїдів та їх попередників у зниженні впливу вільних радикалів на дріжджові клітини. Отримані результати дозволяють рекомендувати дріжджів роду *Rhodotorula* для використання в біоіндикаційних дослідженнях за умов забруднення довкілля важкими металами.

Ключові слова: пігментосинтезувальні дріжджі, іони важких металів, ріст, малоновый діальдегид, біоіндикація.

BIOINDICATION OF HEAVY METALS POLLUTION BY CAROTINOID-SYNTHESIZING YEASTS *RHODOTORULA* GENUS

Krupey K.S., Rylsky A.F.

Zaporizhzhya national university, Ukraine, 69600, Zaporizhzhya, Zhukovskogo Street 66

The surest and the most available methods of the anthropogenic violations diagnosis are based on a number of microbiological characteristics, because among all the representatives of the biota, microorganisms are the most sensitive to change of the medium.

Metals persist in the environment and can become concentrated up the food chain. Metals may be bioconcentrated, bioaccumulated and biomagnified within food chains, causing higher trophic organisms to become contaminated with higher concentrations of chemical and metal contaminants than their prey. The risk for toxicity depends on the frequency, intensity and duration of contact with the metal contaminant along with exposure route. Toxicity risk also depends on the inherent toxic potential of the metal itself.

These heavy metals (HM) influence the microbial population by affecting their growth, morphology, biochemical activities and ultimately resulting in decreased biomass and diversity. HM can damage the cell membranes, alter enzymes specificity, disrupt cellular functions and damage the structure of the DNA. Toxicity of these HM occurs through the displacement of essential metals from their native binding sites or through ligand interactions. Also, toxicity can occur as a result of alterations in the conformational structure of the nucleic acids and proteins and interference with oxidative phosphorylation and osmotic balance.

As is known, exceeding of the HM concentrations in nature has an adverse effect on the ecological state of the environment, which may lead to the malfunction of physiological and biochemical processes taking place in living organisms. Main sources of HM, polluting environment, are metallurgy and galvanic shops of the industrial enterprises. That is why the search for effective methods of environment pollution indications by HM has taken the first place recently.

HM are natural constituents of the earth's crust, but indiscriminate human activities have drastically altered their geochemical cycles and biochemical balance. This results in accumulation of metals in plant parts having secondary metabolites, which is responsible for a particular pharmacological activity. Prolonged exposure to HM such as cadmium, copper, lead, nickel, and zinc can cause deleterious health effects in humans. Molecular understanding of plant metal accumulation has numerous biotechnological implications also, the long term effects of which might not be yet known.

Any toxic metal may be called HM, irrespective of their atomic mass or density. Heavy metals are a member of an ill-defined subset of elements that exhibit metallic properties. These include the transition metals, some metalloids, lanthanides, and actinides. One source defines HM as one of the common transition metals, such as copper, lead, and zinc. These metals are a cause of environmental pollution from sources such as leaded petrol, industrial effluents, and leaching of metal ions from the soil into lakes and rivers by acid rain.

Living organisms require varying amounts of HM. Iron, cobalt, copper, manganese, molybdenum, and zinc are required by humans. All metals are toxic at higher concentrations. Excessive levels can be damaging to the organism. Other HM such as mercury, plutonium, and lead are toxic metals that have no known vital or beneficial effect on organisms, and their accumulation over time in the bodies of animals can cause serious illness. Certain elements that are normally toxic are for certain organisms or under certain conditions, beneficial. Examples include vanadium, tungsten, and even cadmium.

HM disrupt metabolic functions in two ways:

1. They accumulate and thereby disrupt function in vital organs and glands such as the heart, brain, kidneys, bone, liver, etc.
2. They displace the vital nutritional minerals from their original place, thereby, hindering their biological function. It is, however, impossible to live in an environment free of HM. There are many ways by which these toxins can be introduced into the body such as consumption of foods, beverages, skin exposure, and the inhaled air.

HM contaminations of land resources continue to be the focus of numerous environmental studies and attract a great deal of attention worldwide. This is attributed to no-biodegradability and persistence of HM in soils.

So, the usage of the pigment-synthesizing bacteria as bioindicators is a new and promising tendency. Visual observation of the change of the pigment brightness under the influence of HM may serve as objective bioindicator of the environment pollution. Thus, researches of the bacteria that we carried out aroused our interest to the research of the HM influence on the pigment-synthesizing ability of the yeasts. In the literature accessible for us is mentioned only the fact that yeasts have the ability to sorb HM, and there is little information about the ability to change the pigment color in HM presence in the medium. As is known, exceeding of the HM concentrations in nature has an adverse effect on the ecological state of the environment, which may lead to the malfunction of physiological and biochemical processes taking place in living organisms. Carotenoid biosynthesis is a specific feature of the *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* and *Phaffia* genera. The best known function of carotenoids, such as α -carotene, β -carotene, β -cryptoxanthin, torulene and torularhodin, is acting as provitamin A. β -carotene possesses the highest provitamin A activity. The application of carotenoids as natural pigments in food and forages is a well-known practice. Carotenoids, and especially β -carotene, also act as antioxidants by reacting with active oxygen species and as anti-carcinogenic agents. For effective carotenogenesis, of vital importance is the use of: inexpensive alternative carbohydrate sources found in natural substrates, which typically are by-products from various industries and tend to contaminate the environment; and strain-producers of high carotenoid-synthesizing activity.

Thus, the aim of our study was to investigate the influence of HM on the carotenoid synthesis of the yeasts *Rhodotorula* genus.

The object of the research was pigment synthesizing yeasts *Rhodotorula* genus. Solid nutrient medium Sabouraud was prepared on the base of the water with certain HM salt concentrations. Nutrient medium Sabouraud without metals was used as a control. When Sabouraud set congeal, 18-days cultures was seeded by solid lawn on it (0,2 ml per one Petri dish). Suspension density was 10^7 /ml. Yeasts incubated in the thermostat under the temperature 27-28 °C. Results were calculated on the 3^d days of the cultivation. Visual observation and comparison of the experimental samples with the control was carried out. For the calculation of the color intensity difference between experimental and control samples, the Petri dishes with yeasts colonies were photographed, photos were loaded in the program Adobe Photoshop, indexes

of the color model channels (Lab), and then the difference of the pigment color intensity was calculated in the program CIEDE 2000. The concentration of malondialdehyde was determined on well-known methodology of M. M. Musienko.

The research has shown that yeasts *Rhodotorula rubra* RA-10, *Rh. aurantiaca* Y-1195 and *Rh. glutinis* Y-1335 react on the certain metal concentrations presence in the medium by pigment loss and by growth inhibiting. Absolute loss of pigment was observed under the concentration of metals that was by 11,2-75 % lower than the concentrations under which absolute blocking of the growth of yeasts was observed. It has emerged that the most toxic HM for yeasts *Rh. rubra* RA-10 is Zn^{2+} and for yeasts *Rh. aurantiaca* Y-1195 is Cd^{2+} (pigment synthesis was blocked under the 200 mg/l concentration of zinc and cadmium ions). Inhibiting effect on the synthesis of pigment at yeasts *Rh. glutinis* Y-1335 rendered the Zn^{2+} and Cu^{2+} ions (pigment synthesis was blocked under the 200 mg/l concentration of zinc and 250 mg/l concentration of copper). The assumption about probable participation of carotenoids and their predecessors in decrease of free radicals influence on yeasts cells has been made. Thus, visual observation of the change of the pigment brightness under the influence of heavy metals may serve as objective bioindicator of the environment pollution. Obtained results make it possible to recommend the yeasts *Rhodotorula* genus for the usage in the bioindication researches.

Key words: pigment-synthesizing yeasts, ions of heavy metals, growth, malondialdehyde, bioindication.

ВСТУПЛЕНИЕ

Среди химических веществ, загрязняющих окружающую среду и негативно воздействующих на человека, тяжелые металлы (ТМ) и их соединения образуют значительную группу токсикантов. Основными источниками ТМ, загрязняющих окружающую среду, являются металлургия и гальванические цеха промышленных предприятий [1, 2]. Поэтому поиск эффективных и экономически выгодных методов индикации ТМ в среде является актуальной проблемой.

На сегодня система оценки состояния окружающей среды определяется с помощью предельно допустимых концентраций (ПДК) химических веществ, которые разрабатываются государственными органами здравоохранения. При разработке ПДК и последующем контроле загрязнений используют различные аналитические методы: химические, физические, физико-химические и биохимические. Все они являются информативными для человека и требуют больших материальных затрат. Для оценки же состояния окружающей среды информация относительно ПДК оказывается недостаточной, поскольку многие поллютанты способны трансформироваться в окружающей среде и живых организмах в более или менее токсичные соединения (примером такой трансформации может быть превращение в микроорганизмах металлической ртути в высокотоксичное соединение – метилртуть) [3]. Следует также отметить, что ПДК не учитывают влияние определенных концентраций загрязняющих веществ на разные возрастные категории населения, суммарный эффект воздействия химических соединений и многие другие факторы. К сожалению, сегодня сторонники инструментальных методов исследований пренебрегают биоиндикацией, аргументируя это тем, что с помощью данного метода не всегда можно установить точную концентрацию химического вещества в среде. Но для оценки состояния окружающей среды целесообразно использовать критерии, которые информируют о влиянии антропогенных факторов на специфические признаки биоиндикаторов, а не только про концентрацию того или иного загрязнителя.

Наиболее надежные и доступные методы диагностики антропогенных нарушений основаны на ряде микробиологических показателей, потому что из всех представителей биоты микроорганизмы наиболее чутко реагируют на изменение условий обитания. Так, достаточно новым и перспективным направлением является использование пигментсинтезирующих бактерий как биоиндикаторов [4, 5]. Однако на сегодняшний день не изучено влияние ТМ на одноклеточных эукариотических организмов, одними из которых являются дрожжи. В доступной нам литературе указывается только то, что дрожжи обладают способностью сорбировать ТМ, а факты блокирования синтеза пигмента в присутствии ТМ в среде встречаются в виде коротких несистемных сообщений [6]. Одними из наиболее богатых на

качественный состав каротиноидов являются дрожжи рода *Rhodotorula*, которые способны синтезировать фитоин, фитофлюин, нейроспорин, γ -, β -, ξ -каротины, торулин и другие [7, 8]. Пигментсинтезирующие дрожжи могут хорошо расти на пищевых продуктах, их выделяют из воды, почвы, наземных частей растений, следовательно, они могут служить объективными биоиндикаторами загрязнения окружающей среды ТМ. Проведенные исследования по влиянию ТМ на дрожжи *Rh. aurantiaca* Y-1193 и *Rh. glutinis* Y-1333 [9, 10] заинтересовали нас проверить действие ТМ на синтез пигмента других штаммов дрожжей рода *Rhodotorula*. Таким образом, целью нашей работы было изучить влияние ТМ на синтез каротиноидов у дрожжей рода *Rhodotorula*, а также выявить возможные механизмы защиты дрожжевых клеток от «металлического» стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были пигментсинтезирующие дрожжи *Rh. rubra* RA-10 (выделенные сотрудниками Института коллоидной химии и химии воды им. А.В. Думанского АН Украины с водопроводной питьевой воды г. Киева), *Rh. aurantiaca* Y-1195 и *Rh. glutinis* Y-1335 (любезно предоставленные нам из Украинской коллекции микроорганизмов Институтом микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины).

Твердую питательную среду Сабуро готовили на основе воды с определенными концентрациями солей ТМ: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CdCl_2 . Таким образом, водные модельные растворы содержали такие ионы ТМ, как Cu^{2+} , Zn^{2+} и Cd^{2+} . Контролем служила питательная среда Сабуро без металлов. После застывания Сабуро на него сплошным газом засеивали 18-суточную культуру дрожжей. Плотность суспензии составляла 10^7 кл./мл. Дрожжи инкубировали в термостате при температуре 27-28°C. Учёт результатов проводили на 3 день культивирования. Наблюдали визуально, сравнивая опытные образцы с контролем. Для расчета разницы в интенсивности цвета между опытными и контрольными образцами чашки Петри с дрожжевыми колониями фотографировали, помещали фотографии в компьютерную программу Adobe Photoshop, определяли показатели каналов цветной модели (Lab), затем в программе CIEDE 2000 рассчитывали разницу в интенсивности цвета пигмента [11].

Для определения количества малонового диальдегида (МДА) в контрольных и опытных образцах дрожжевую биомассу *Rh. aurantiaca* Y-1195 смывали с твердой питательной среды Сабуро и центрифугировали при 6000g; 20 мин. Навеску дрожжевой биомассы (0,35 г) измельчали и растирали в фарфоровой ступке с 2 см^3 дистиллированной воды. К гомогенату добавляли 3 см^3 трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и гомогенизировали второй раз. С полученного гомогената отбирали в мерные пробирки с притертыми пробками 2 пробы по 2 см^3 . К одной из них добавляли равный объем (2 см^3) ТХУ и эту пробу в дальнейшем использовали как контроль при спектрофотометрии. К другой пробе добавляли 2 см^3 раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК). Пробу инкубировали 30 мин. на кипящей водяной бане, затем охлаждали и центрифугировали при 3000g; 10 мин. Супернатант отбирали шприцом в пробирки и измеряли показания оптической плотности на спектрофотометре СФ-42 ($\lambda=532 \text{ нм}$).

Количество МДА (X) в дрожжевой биомассе выражали в наномолях МДА на 1 г сухой массы и рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D_{532} * 1000000 * V * A}{H * \epsilon},$$

где X – количество МДА в дрожжевой биомассе;

D_{532} – значения оптической плотности при ($\lambda=532$ нм);

V – объем;

A – отношение общего объема вытяжки к объему пробы, взятой для определения МДА;

H – навеска дрожжевой биомассы, г;

ϵ – молярный коэффициент экстинкции, равный 155000 л/(см·моль) [12].

Статистическую обработку проводили с помощью компьютерных программ Excel и STATISTICA 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали, что дрожжи рода *Rhodotorula* реагируют на присутствие в среде ТМ задержкой роста и пигментообразования (см. табл. 1-3).

Блокирование синтеза пигмента у дрожжей *Rh. rubra* RA-10, *Rh. aurantiaca* Y-1195 и *Rh. glutinis* Y-1335 наблюдалось при концентрациях ионов меди на 14,3, 30 и 58,4 % соответственно ниже тех концентраций, которые полностью подавляли рост дрожжей. Механизм сорбции меди клетками дрожжей основанный на взаимодействии между ее ионами и нуклеиновыми кислотами и ферментами. Известно, что медь является кофактором для ряда ферментов – Cu, Zn- супероксиддисмутазы, лизилоксидазы, галактозидазы и других. Однако основным механизмом действия меди является разрушение целостности цитоплазматической мембраны [13, 14]. Дрожжи *Rh. rubra* RA-10 оказались наиболее устойчивыми к ионам меди (II), концентрация, при которой ещё наблюдался слабый рост беспигментных колоний, составляла 700 мг/дм³ меди, а концентрация 600 мг/дм³ ионов Cu²⁺ вызывала блокирование синтеза пигмента. При концентрациях 50-300 мг/дм³ меди у дрожжей *Rh. aurantiaca* Y-1195 колонии имели бледно-розовую окраску и кое-где встречались беспигментные колонии. Так, ранние исследования ученых показали, что наиболее стойким к высоким концентрациям меди оказался пигментированный штамм *Rh. aurantiaca* Y-1195 – рост наблюдался даже при концентрации 500 мг/дм³ ионов Cu²⁺ в среде [6]. Следует отметить, что результаты наших исследований подтвердили этот факт. Концентрации 350-500 мг/дм³ меди вызывали рост только беспигментных колоний *Rh. aurantiaca* Y-1195. При 600 мг/дм³ ионов Cu²⁺ в среде роста колоний не наблюдалось. У дрожжей *Rh. glutinis* Y-1335 при концентрациях 150 и 200 мг/дм³ купрума наблюдался рост пигментных и беспигментных колоний, а концентрации 250-600 мг/дм³ данного металла вызывали рост только молочных колоний. Рост *Rh. glutinis* Y-1335 блокировался при концентрации 700 мг/дм³ меди в среде.

Таблица 1 – Влияние ионов Cu^{2+} на синтез пигментов у дрожжей *Rh. rubra* RA-10, *Rh. aurantiaca* Y-1195 и *Rh. glutinis* Y-1335

Концентрация ионов Cu^{2+} , мг/дм ³	<i>Rh. rubra</i> RA-10		<i>Rh. aurantiaca</i> Y-1195		<i>Rh. glutinis</i> Y-1335	
	Рост*	Пигмент**	Рост	Пигмент	Рост	Пигмент
Контроль	++++	++++	++++	++++	++++	++++
20	++++	++++	++++	++	++++	++++
50	++++	++++	+++	±	++++	++++
100	++++	++++	+++	±	++++	+++
150	++++	++++	+++	±	++++	±
200	++++	++++	+++	±	+++	±
250	+++	++++	+++	±	+++	-
300	++	+++	++	±	+++	-
350	++	+++	++	-	+++	-
375	++	+++	++	-	+++	-
500	++	++	+	-	++	-
600	+	-	-	-	+	-
700	+	-	-	-	-	-
800	-	-	-	-	-	-

Примечание (здесь и далее): *рост: +++++ – сплошной, +++ – хороший, ++ – умеренный, + – слабый, - – отсутствует; **пигментообразование: +++++ – интенсивное, +++ – хорошее, ++ – умеренное, + – слабое, - – отсутствует, ± – наблюдаются пигментные и беспигментные колонии.

Катионная сорбция ионов цинка и кадмия может сопровождаться выходом ионов калия для уравнивания ионного баланса в клетке, где происходит стехиометрический обмен ионов кадмия и калия [15]. Наибольший концентрационный интервал между утратой роста и синтезом пигмента в присутствии в среде ионов Zn^{2+} был отмечен у дрожжей *Rh. glutinis* Y-1335 (полная утрата пигмента наблюдалась при концентрации цинка (II) на 50 % ниже той концентрации, которая полностью ингибировала жизнедеятельность дрожжей). У дрожжей *Rh. rubra* RA-10 этот интервал равнялся 20 %. Синтез пигмента полностью блокировался у *Rh. rubra* RA-10 при концентрации 200 мг/дм³ ионов Zn^{2+} , а рост подавлялся в присутствии 300 мг/дм³ данного иона в среде. Дрожжи *Rh. aurantiaca* Y-1195 оказались достаточно стойкими по отношению к ионам цинка. Синтез пигмента у *Rh. aurantiaca* Y-1195 частично блокировался только при концентрации 600 мг/дм³ Zn^{2+} (на чашках росли молочные и бледно-розовые колонии).

При 900 мг/дм³ цинка рост *Rh. aurantiaca* Y-1195 полностью ингибировался. Задержку роста и ингибирование синтеза пигмента, как было отмечено выше, хорошо продемонстрировали дрожжи *Rh. glutinis* Y-1335, при концентрациях 50-150 мг/дм³ цинка росли пигментные и беспигментные колонии, а с концентрации 200 мг/дм³ Zn^{2+} был отмечен слабый рост только молочных колоний. Концентрация 600 мг/дм³ цинка вызывала блокирование роста дрожжей *Rh. glutinis* Y-1335.

Таблица 2 – Влияние ионов Zn^{2+} на синтез пигментов у дрожжей *Rh. rubra* RA-10, *Rh. aurantiaca* Y-1195 и *Rh. glutinis* Y-1335

Концентрация ионов Zn^{2+} , мг/дм ³	<i>Rh. rubra</i> RA-10		<i>Rh. aurantiaca</i> Y-1195		<i>Rh. glutinis</i> Y-1335	
	Рост	Пигмент	Рост	Пигмент	Рост	Пигмент
Контроль	++++	++++	++++	++++	++++	++++
50	+++	+++	++++	++++	++++	±
100	+++	++	++++	++++	+++	±
150	++	+	++++	++++	+	±
200	+	-	++++	++++	+	-
250	+	-	++++	++++	+	-
300	-	-	++++	++++	+	-
400	-	-	++++	++++	+	-
600	-	-	++	±	-	-
800	-	-	++	±	-	-
900	-	-	-	-	-	-

Полная утрата пигмента у дрожжей *Rh. rubra* RA-10, *Rh. aurantiaca* Y-1195, *Rh. glutinis* Y-1335 наблюдалась при концентрациях ионов кадмия на 11,2, 75 и 62,5 % соответственно ниже тех концентраций, которые полностью ингибировали рост дрожжей. Так, при концентрациях 300-700 мг/дм³ ионов кадмия в среде у дрожжей *Rh. rubra* RA-10 наблюдался умеренный рост и слабое пигментообразование. Концентрации 800 и 900 мг/дм³ Cd^{2+} вызывали слабый рост беспигментных колоний. Полностью рост прекращался при 1050 мг/дм³ кадмия в среде. У дрожжей *Rh. aurantiaca* Y-1195 хороший рост и слабое пигментообразование наблюдалось при концентрации 100 мг/дм³ ионов кадмия, а при 200 мг/дм³ данного иона был отмечен хороший рост беспигментных колоний, который ингибировался в присутствии в среде 900 мг/дм³ Cd^{2+} . Подобный результат был получен при исследовании влияния ионов кадмия (II) на рост и синтез пигмента дрожжей *Rh. glutinis* Y-1335. При концентрации 200 мг/дм³ на чашках встречались молочные и бледно-розовые колонии, а начиная с концентрации 300 мг/дм³ кадмия в среде росли только беспигментные колонии.

В отличие от биотехнологических производств, где существует необходимость весовой оценки количества синтезируемого пигмента, в отрасли охраны окружающей среды при оценке влияния антропогенных факторов на микроорганизмы-индикаторы достаточно бывает провести относительное оценивание интенсивности пигмента микроорганизма, который претерпел влияние такого фактора, к контрольной культуре и выразить это отношение в объективных единицах.

Таблиця 3 – Влияние ионов Cd^{2+} на синтез пигментов у дрожжей *Rh. rubra* RA-10, *Rh. aurantiaca* Y-1195 и *Rh. glutinis* Y-1335

Концентрация ионов Cd^{2+} , мг/дм ³	<i>Rh. rubra</i> RA-10		<i>Rh. aurantiaca</i> Y-1195		<i>Rh. glutinis</i> Y-1335	
	Рост	Пигмент	Рост	Пигмент	Рост	Пигмент
Контроль	++++	++++	++++	++++	++++	++++
20	+++	+++	++++	++	++++	+++
100	++	++	+++	+	+++	±
200	++	++	+++	-	++	±
300	++	+	+++	-	++	-
500	++	+	++	-	+	-
700	++	+	+	-	+	-
800	+	-	+	-	+	-
900	+	-	-	-	-	-
1050	-	-	-	-	-	-

Поэтому разницу в интенсивности цвета пигмента мы определяли между контрольными культурами дрожжей и теми, которые испытали влияние ТМ (пример расчетов представленный в таблице 4).

Чем больше разница между цветом пигмента (dE) в контрольном и исследуемом образце, тем больше значение dE.

Так, при концентрации 20 мг/дм³ кадмия у дрожжей *Rh. glutinis* Y-1335 было отмечено хорошее пигментообразование, чашки с дрожжевыми колониями почти не отличались от контроля, поэтому dE равнялась 9,5 единиц, при концентрации 300 мг/дм³ кадмия росли только беспигментные колонии, следовательно, dE составила 17,2 единицы.

Таким образом, утрата пигментсинтезирующей способности под действием ТМ носит универсальный характер и является ответом дрожжевой клетки на действие стрессового фактора. Важным остается изучение вероятных механизмов защиты дрожжевой клетки от «металлического» стресса.

Таблица 4 – Оценка интенсивности цвета пигмента на концентрационный ряд Cd^{2+} у дрожжей *Rh. glutinis* Y-1335

Концентрация Cd^{2+} , мг/дм ³	3 сутки культивирования			dE
	L	a	b	
Контроль	67	20	26	
20	56	21	26	9,5±0,01
100	51	19	30	14,5±0,04
200	50	22	28	15,3±0,05
300	49	24	20	17,2±0,4
500	49	28	21	17,7±0,3
700	46	23	24	19,6±0,5
800	46	21	22	19,6±0,7

Примечание: L, a, b – показатели каналов цветной модели CIE Lab; dE – разница в интенсивности цвета между контролем и опытом, рассчитанная с помощью компьютерной программы CIEDE 2000.

В решении данного вопроса о возможных механизмах блокирования синтеза пигмента мы обратили внимание на то, что одним из индикаторов разрушения мембранных структур под действием стрессовых факторов является образование МДА в клетке (бифункционального альдегида, который образует шиффовые основания с аминоклуппами белка, выступая как сшивающий агент), который появляется в результате перекисного окисления липидов в связи с активацией свободно-радикальных процессов. Таким образом, МДА является показателем окислительных процессов, обусловленных свободными радикалами.

В данной работе представлено, что дрожжи *Rh. aurantiaca* Y-1195 начинали утрачивать пигмент при концентрации 50 мг/дм³ меди, а при 350 мг/дм³ этого иона в среде синтез пигмента полностью блокировался. Это заинтересовало нас исследовать увеличение концентрации МДА в дрожжевых клетках при увеличении концентрации меди, как одного из наиболее важных биологически активных элементов (см. рис. 1).

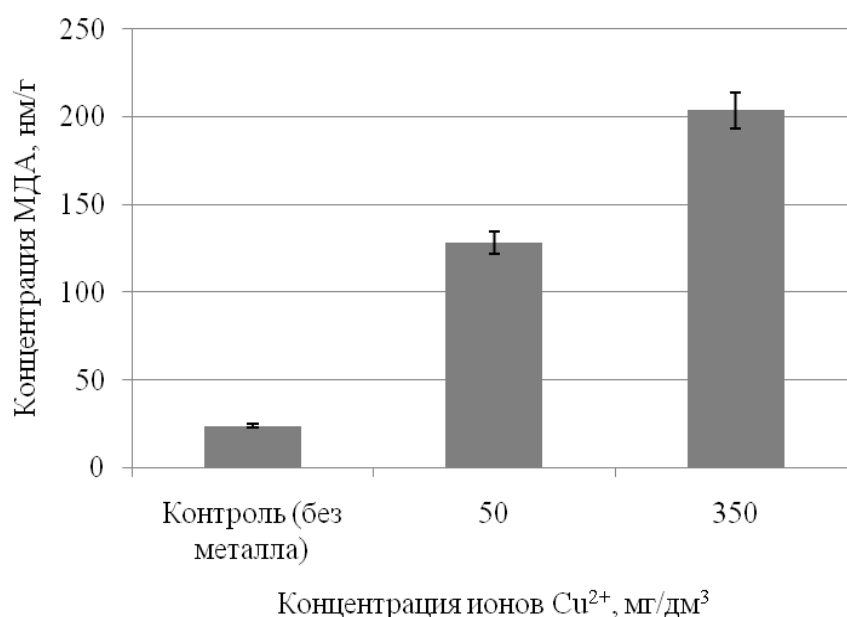


Рисунок 1 – Влияние ионов меди (II) на концентрацию МДА в клетках дрожжей *Rh. aurantiaca* Y-1195

Установлено, что при концентрациях меди (II) 50 и 350 мг/дм³ количество МДА в контроле (23,7±1,22 нм/г) и в опытах (127,97±1,23 и 203,81±1,72 нм/г соответственно) достоверно отличалось (p<0,05).

Так, при концентрации 350 мг/дм³ меди МДА было в 8,6 раз больше, чем в контроле, а это может указывать на то, что одним из вероятных механизмов блокирования синтеза пигмента у дрожжей может быть поражение пигментсинтезирующих участков на мембранах свободными радикалами.

Таким образом, исследования показали, что с определенного концентрационного уровня ТМ в среде дрожжи рода *Rhodotorula* реагировали задержкой роста и блокированием синтеза пигмента, при этом мы наблюдали большой концентрационный интервал между блокированием роста и ингибированием синтеза пигмента (от 11,2 до 75 %). Это делает возможным продолжить исследования с целью использования дрожжей рода *Rhodotorula* в биоиндикационных исследованиях.

ВЫВОДЫ

1. Исследования показали, что дрожжи *Rhodotorula rubra* RA-10, *Rh. aurantiaca* Y-1195 и *Rh. glutinis* Y-1335 реагировали на присутствие определенных концентраций металлов в среде утратой пигмента и ингибированием роста.
2. Наиболее токсическое действие на синтез пигмента у дрожжей *Rh. rubra* RA-10 оказал Zn²⁺, а у *Rh. aurantiaca* Y-1195 – Cd²⁺ (пигментообразование блокировалось при концентрации 200 мг/дм³ ионов цинка и кадмия соответственно), ингибирующий эффект на синтез пигмента у дрожжей *Rh. glutinis* Y-1335 оказали ионы Zn²⁺ и Cu²⁺ (синтез каротиноидов блокировался при концентрации 200 и 250 мг/дм³ цинка и меди соответственно).
3. Показано, что одним из вероятных механизмов блокирования синтеза пигментов у дрожжей может быть поражение пигментсинтезирующих участков на мембранах свободными радикалами, о чем свидетельствует появление малонового диальдегида в клетке.
4. Полученные результаты делают возможным рекомендовать дрожжи рода *Rhodotorula* для использования в биоиндикационных исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тонха О.Л. Моніторинг важких металів у системі ґрунт-рослина-тварина в залежності від обробітку ґрунту / О.Л. Тонха, В.М. Галімова // Науковий вісник Національного аграрного університету. – 2005. – № 81. – С. 200–206.
2. Гаранин Р.А. Метод биосорбции тяжелых металлов из промышленных сточных вод с использованием пивоваренных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* : автореф. дис. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук : 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнология)» / Р.А. Гаранин. – М., 2011. – 25 с.
3. Сюзанна М. Ульрих. Ртуть в природных водных объектах: обзор факторов, влияющих на метилирование / Сюзанна М. Ульрих, Тревор В. Тантон, Светлана А. Абдрашитова // Environmental Science and Technology. – 2001. – № 31(3). – С. 241-293.
4. Патент на винахід № 75513, МПК (2006). Спосіб визначення забруднення оточуючого середовища металами / Рильський О. Ф., Гвоздяк П. І., Шевчук І. А., заявник та патентовласник Запорізький державний університет. – № 20040706208; заявл. 26.07.2004; опубл. 17.04.2006, Бюл. № 4, 2006 р.

5. Рыльский А.Ф. Действие тяжелых металлов на пигментсинтезирующие грамотрицательные бактерии / А.Ф. Рыльский // Вісник Донецького національного університету. – 2009. – Вип. 2. – С. 260-264. – (Серія А: Природничі науки).
6. Лозовая О.Г. Поиск биосорбентов тяжелых металлов среди дрожжей различных таксономических групп / О.Г. Лозовая, Т.П. Касаткина, В.С. Подгорский // Мікробіологічний журнал. – 2004. – Т. 66, № 2. – С. 92–101.
7. Каротинсинтезирующие дрожжи [Квасников Е.И., Васкивнюк В.Г., Суденко В.И., Гринберг Т.А.]. – К. : Наукова думка, 1980. – 171 с.
8. Goodwin T.W. Carotenoids in fungi and non-photosynthetic bacteria / T.W. Goodwin // Progr. Industr. Microbiol., 1972. – pp. 29-88.
9. Рильський О.Ф. Пігментосинтезувальна активність дріжджів *Rhodotorula aurantiaca* 1193 в умовах «металевого стресу» / О.Ф. Рильський, К.С. Крупей // Вісник Запорізького національного університету. – 2013. – № 3. – С. 151-155.
10. Krupеу K.S. Influence of heavy metals on the pigment synthesizing activity of the yeasts *Rhodotorula glutinis* 1333 / K.S. Krupеу, A.F. Rylsky, K.O. Plotnikova // Вісник Запорізького національного університету. – 2014. – № 1. – С. 217-225.
11. Патент на корисну модель № 49812 Україна, МПК (2009), С12Q 1/00, С12М 1/00, С12М 1/34. Спосіб визначення інтенсивності пігментоутворення у бактерій / Рильський О.Ф., Домбровський К.О., Гороховський Є.Ю., Жиленко А.В.; заявник і патентовласник ЗНУ. – № u200912311; заявл. 30.11.2009; опубл. 11.05.2010, Бюл. № 9, 2010 р.
12. Мусієнко М.М. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин / М.М. Мусієнко, Т.В. Паршикова, П.С. Славний. – К. : Фітосоціоцентр, 2001. – 245 с.
13. Kosman D.J. Transition metal ion uptake in yeasts and filamentous fungi / D.J. Kosman // Metal ions in fungi. – New York etc., 1994. – 507 p.
14. Walker M.G. Yeast physiology and biotechnology / M.G. Walker. – New York; Toronto : John Wiley and Sons, 1998. – 350 p.
15. Vido K. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae* / K. Vido, D. Spector, G. Langniel [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276, № 11. – pp. 8469-8471.

REFERENCES

1. Tonxa O.L. Monitoring vazhkix metaliv u sistemi rrunt-roslina-tvarina v zalezhnosti vid obrobтку rruntu / O.L. Tonxa, V.M. Galimova // Naukovij visnik Nacional'nogo agrarnogo universitetu. – 2005. – № 81. – S. 200–206.
2. Garanin R.A. Metod biosorbicii tyazhelyx metallov iz promyshlennyx stochnyx vod s ispol'zovaniem pivovarenyx drozhzhej *Saccharomyces cerevisiae* : avtoref. dis. na soisk. uch. step. kand. biol. nauk : 03.01.06 – «Biotexnologiya (v tom chisle bionanotexnologiya)» / R.A. Garanin. – М., 2011. – 25 s.
3. Syuzanna M. Ul'rix. Rtut' v prirodnyx vodnyx ob'ektax: obzor faktorov, vliyayushhix na metilirovanie / Syuzanna M. Ul'rix, Trevor V. Tanton, Svetlana A. Abdrashitova // Environmental Science and Technology. – 2001. – № 31(3). – S. 241-293.
4. Patent na vinaxid № 75513, МПК (2006). Sposib viznachennya zabrudnennya otouchuyuchogo seredovishha metalami / Ril's'kij O. F., Gvozdyak P. I., Shevchuk I. A., zayavnik ta patentovlasnik Zaporiz'kij derzhavnij universitet. – № 20040706208; zayavl. 26.07.2004; opubl. 17.04.2006, Byul. № 4, 2006 r.

5. Ryl'skij A.F. Dejstvie tyazhelyx metallov na pigmentsinteziruyushhie gramotricatel'nye bakterii / A.F. Ryl'skij // Visnik Donec'kogo nacional'nogo universitetu. – 2009. – Vip. 2. – S. 260-264. – (Seriya A: Prirodnichi nauki).
6. Lozovaya O.G. Poisk biosorbentov tyazhelyx metallov sredi drozhzhej razlichnyx taksonomicheskix grupp / O.G. Lozovaya, T.P. Kasatkina, B.C. Podgorskij // Mikrobiologichnij zhurnal. – 2004. – T. 66, № 2. – S. 92–101.
7. Karotinsinteziruyushhie drozhzhi [Kvasnikov E.I., Vaskivnyuk V.G., Sudenko V.I., Grinberg T.A.]. – K. : Naukova dumka, 1980. – 171 s.
8. Goodwin T.W. Carotenoids in fungi and non-photosynthetic bacteria / T.W. Goodwin // Progr. Industr. Microbiol., 1972. – pp. 29-88.
9. Ril's'kij O.F. Pigmentosintezuval'na aktivnist' drizhdzhiv *Rhodotorula aurantiaca* 1193 v umovax «metalevogo stresu» / O.F. Ril's'kij, K.S. Krupey // Visnik Zaporiz'kogo nacional'nogo universitetu. – 2013. – № 3. – S. 151-155.
10. Krupey K.S. Influence of heavy metals on the pigment synthesizing activity of the yeasts *Rhodotorula glutinis* 1333 / K.S. Krupey, A.F. Ryl'sky, K.O. Plotnikova // Visnik Zaporiz'kogo nacional'nogo universitetu. – 2014. – № 1. – S. 217-225.
11. Patent na korisnu model' № 49812 Ukraїna, MPK (2009), C12Q 1/00, C12M 1/00, C12M 1/34. Sposib viznachennya intensivnosti pigmentoutvorennya u bakterij / Ril's'kij O.F., Dombrovs'kij K.O., Goroxovs'kij Є.Yu., Zhilenko A.V.; zayavnik i patentovlasnik ZNU. – № u200912311; zayavl. 30.11.2009; opubl. 11.05.2010, Byul. № 9, 2010 r.
12. Musienko M.M. Spektrofotometrichni metodi v praktici fiziologii, bioximii ta ekologii roslin / M.M. Musienko, T.V. Parshikova, P.S. Slavnij. – K. : Fitosociocentr, 2001. – 245 s.
13. Kosman D.J. Transition metal ion uptake in yeasts and filamentous fungi / D.J. Kosman // Metal ions in fungi. – New York etc., 1994. – 507 p.
14. Walker M.G. Yeast physiology and biotechnology / M.G. Walker. – New York; Toronto : John Wiley and Sons, 1998. – 350 p.
15. Vido K. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae* / K. Vido, D. Spector, G. Langniel [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276, № 11. – pp. 8469-8471.

Рецензенты: Доля В.С., д.фарм.н., профессор кафедры фармакогнозии, фармакологии и ботаники Запорожского государственного медицинского университета;
Костюченко Н.И., к.б.н., доцент кафедры общей и прикладной экологии и зоологии ЗНУ.