

УДК 582.282.23:504:546.3

**ДРІЖДЖІ *RHODOTORULA MUCILAGINOSA* 1394 –
БІОІНДИКАТОРИ ЗАБРУДНЕННЯ ДОВКІЛЛЯ
ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ**

Крупей К.С.

Запорізький національний університет

krupeyuzni@gmail.com

Установлено, что под действием определенных концентраций ионов тяжелых металлов (Al^{3+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) у дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa* 1394 наблюдается утрата пигментсинтезирующей способности при росте на твердой питательной среде (Сабура). Ионы хрома (VI) оказались наиболее токсичными для *Rh. mucilaginosa* 1394 (синтез пигмента блокировался при концентрации 10 мг/л Cr^{6+}). Стойкими дрожжи оказались по отношению к ионам кадмия (II), полное ингибирование синтеза пигмента наблюдалось при концентрации 900 мг/л Cd^{2+} . Ионы алюминия (III) слабо подавляли пигментообразование дрожжевых клеток. Способность дрожжей к потере пигмента при разных концентрациях ионов тяжелых металлов может быть использована в биоиндикационных исследованиях.

Дрожжи Rhodotorula mucilaginosa 1394, ионы тяжелых металлов, пигмент, рост, биоиндикация.

ВСТУП

У зв'язку з тим, що дріжджі здатні синтезувати широкий спектр каротиноїдів, ця група еукаріотних мікроорганізмів зайняла міцні позиції у сучасній біотехнології [2, 8]. Відомо також, що пігментосинтезувальні дріжджі можуть адсорбувати важкі метали (ВМ), внаслідок чого їх можна застосовувати в очистці стічних вод [5]. Проте автори цих та інших робіт не звертали увагу на можливість використання пігментосинтезувальних дріжджів у біоіндикаційних дослідженнях. Як було показано нами у попередніх роботах [3, 7], дріжджі роду *Rhodotorula* здатні пригнічувати синтез пігменту під впливом різних концентрацій іонів важких металів. Це є добре спостережуваною ознакою, тому метою нашої роботи було вивчити вплив важких металів на синтез каротиноїдів у

дріжджів *Rhodotorula mucilaginosa* 1394 із можливістю їх подальшого застосування як біоіндикаторів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження були пігментосинтезувальні дріжджі *Rh. mucilaginosa* 1394, люб'язно надані нам із колекції музейних культур Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Тверде поживне середовище Сабуро готували на основі води з певним вмістом солей VM. Контролем слугувало поживне середовище Сабуро без металів. Після застигання середовища на нього суцільним газоном засівали 18-годинну колекційну культуру *Rh. mucilaginosa* 1394 (0,2 мл на 1 чашку Петрі). Щільність клітин становила 10^7 /мл. Інкубування проводили в термостаті при температурі 27-28°C. Облік результатів проводили візуально на 3 добу культивування, порівнюючи дослідні зразки з контролем, але спостерігали за ростом і синтезом пігменту протягом 9 діб. Для розрахунку різниці в інтенсивності кольору між дослідними і контрольними зразками чашки Петрі з дріжджовими колоніями фотографували, розміщали фотографії у комп'ютерну програму Adobe Photoshop, визначали показники каналів кольорової моделі (Lab), потім у програмі CIEDE 2000 розраховували різницю в інтенсивності кольору пігменту [4].

Метали, вплив яких на пігментосинтезувальну здатність дріжджів нами вивчався, мають різну електронну структуру. З урахуванням цього їх згруповано таким чином:

- p-елементи – Al;
- d-елементи з незаповненими d-орбіталями – Cr, Ni;
- d-елементи з заповненими d-орбіталями – Cu, Zn, Cd

[1, 6].

Солі, які використовували в дослідях: $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, $K_2Cr_2O_7$, $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CdCl_2$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження показали, що дріжджі *Rh. mucilaginosa* 1394, які синтезують найбільший спектр каротиноїдних пігментів (фітоїн, фітофлюїн, нейроспорин, γ -каротин, β -каротин, ξ -каротин, торулін, β -зеакаротин та лікопін), втрачали здатність до пігментоутворення з певних концентраційних рівнів ВМ (див. табл. 1–2). Так, встановлено, що повна втрата пігменту спостерігалася при концентраціях Cr^{6+} та Zn^{2+} на 50 та 33,4 % відповідно нижчі за тих, які повністю інгібували життєдіяльність дріжджів.

Іони алюмінію (III) слабо пригнічували ріст і пігментоутворення дріжджових клітин. При концентрації 400 мг/л алюмінію протягом 9 діб росли слабо-рожеві і молочні колонії (біля країв чашки Петрі). Різниця в інтенсивності кольору пігменту між дослідом і контролем (dE) зростала з підвищенням концентрації металу в середовищі та іноді дещо зменшувалася на 6 і 9 добу культивування дріжджових колоній, коли синтез пігменту поновлювався. Так, концентрація 500 мг/л Al^{3+} викликала слабкий ріст безпігментних колоній на 3 добу, внаслідок чого dE дорівнювала $20,9 \pm 1,2$ одиниці, але на 6 і 9 добу з'являлися також і слабо-рожеві колонії, dE складала $17,5 \pm 0,9$ та $15,0 \pm 1,1$ одиниць відповідно. Присутність у середовищі 600 мг/л іонів алюмінію спричиняли слабкий ріст на 6 та 9 добу слабо-рожевих і молочних колоній, а при наявності 700 мг/л даного іону росту не спостерігалось протягом 9 діб.

Іони Cr^{6+} спричиняли найбільш токсичний вплив на пігментоутворення у дріжджів *Rh. mucilaginosa* 1394. Як відомо, шестивалентна форма хрому є значно токсичнішою, ніж трьохвалентна [5]. При концентрації 10 мг/л Cr^{6+} на 3 добу спостерігався суцільний ріст безпігментних колоній (dE була $20,7 \pm 1,3$ одиниці), які на 9 добу повністю відновлювали здатність синтезувати пігмент. Концентрація 20 мг/л хрому викликала слабкий ріст безпігментних колоній на 3 добу (dE складала $20,2 \pm 0,2$ одиниці), але на 6 і 9 добу з'являлися і слабо-рожеві колонії. При 30 та 40 мг/л іонів хрому (VI) колонії подекуди починали рости на 6 і 9 добу відповідно і не

містили пігменту. При концентрації 50 мг/л Cr^{6+} на протязі 9 діб росту не спостерігалось.

Таблиця 1 – Вплив іонів Al^{3+} , Cr^{6+} та Ni^{2+} на ріст і пігментосинтезувальну здатність дріжджів *Rh. mucilaginosa* 1394

Table 1 – The influence of the ions Al^{3+} , Cr^{6+} and Ni^{2+} on the growth and the pigment synthesizing ability of the yeasts *Rh. mucilaginosa* 1394

Концентрація іонів, мг/л	Al^{3+}		Cr^{6+}		Ni^{2+}	
	Ріст*	Пігмент**	Ріст	Пігмент	Ріст	Пігмент
Контроль	+++ +	++++	+++ +	++++	+++ +	++++
10	+++ +	++++	+++ +	-	+++ +	++++
20	+++ +	++++	+	-	+++ +	++++
30	+++ +	++++	-	-	+++	+++
50	+++ +	++++	-	-	+++	±
100	+++ +	++++	-	-	+	±
125	+++ +	++++	-	-	+	-
150	+++ +	++++	-	-	-	-
200	+++ +	++++	-	-	-	-
300	+++	+++	-	-	-	-
400	++	±	-	-	-	-
500	+	-	-	-	-	-
600	-	-	-	-	-	-
700	-	-	-	-	-	-

Примітка тут та далі. *ріст: +++++ – суцільний, +++ – добрий, ++ – помірний, + – слабкий, - – відсутній; **пігментоутворення: +++++ – інтенсивне, +++ – добре, ++ – помірне, + – слабе, - – відсутнє, ± – наявність пігментних та безпігментних колоній.

Таблиця 2 – Вплив іонів Cu^{2+} , Zn^{2+} та Cd^{2+} на ріст і пігментосинтезувальну здатність дріжджів *Rh. mucilaginosa* 1394

Table 2 – The influence of the ions Cu^{2+} , Zn^{2+} and Cd^{2+} on the growth and the pigment synthesizing ability of the yeasts *Rh. mucilaginosa* 1394

Концентрація іонів, мг/л	Cu^{2+}		Zn^{2+}		Cd^{2+}	
	Ріст	Пігмент	Ріст	Пігмент	Ріст	Пігмент
Контроль	++++	++++	++++	++++	++++	++++
50	++++	+++	++++	++++	+++	+++
100	+++	±	+++	±	+++	±
200	++	±	++	-	+++	±
300	+	-	+	-	++	±
400	-	-	-	-	++	±
600	-	-	-	-	+	±
800	-	-	-	-	+	±
900	-	-	-	-	+	-
1000	-	-	-	-	-	-

Нікель (II) починав затримувати ріст і пігментоутворення у *Rh. mucilaginosa* 1394 при концентрації 50–100 мг/л. Концентрація 125 мг/л Ni^{2+} викликала появу на 3 добу тільки безпігментних колоній (dE складала $20,2 \pm 1,4$ одиниці), а при 150 мг/л даного іону вони з'являлися тільки на 6 добу. Повністю ріст дріжджів припинявся в присутності в середовищі 175 мг/л іонів нікелю (колонії не з'являлися 9 діб).

Іони міді (II) починали інгібувати синтез пігменту в дріжджів *Rh. mucilaginosa* 1394 при концентрації 100–200 мг/л, колонії мали слабо-рожевий і молочний колір протягом 9 діб. Концентрація 300 мг/л міді викликала появу тільки молочних колоній на 3 добу (dE була $20,4 \pm 0,8$ одиниці), але на 6 і 9 добу подекуди з'являлися і безпігментні колонії. При 400 мг/л купруму безпігментні колонії починали рости тільки на 6 добу, а на 9 добу були відмічені і декілька слабо-рожевих колоній. Концентрація 500 мг/л Cu^{2+} у середовищі повністю пригнічувала ріст дріжджових клітин.

Дослідження показали, що дріжджі *Rh. mucilaginosa* 1394 починали втрачати пігмент при концентрації в середовищі 100 мг/л іонів цинку – на 3 добу росли рожеві і подекуди молочні колонії (dE була $17,3 \pm 1,0$ одиниці). Концентрації 200 та 300 мг/л цинку викликали ріст на 3 добу тільки безпігментних колоній, при концентрації 200 мг/л Zn^{2+} на 6 і 9 добу колір пігменту дещо відновлювався. Повністю ріст інгібувався в присутності в середовищі 400 мг/л іонів цинку.

Концентрації 100–400 мг/л кадмію в середовищі викликали добрий та помірний ріст слабо-рожевих і молочних колоній, у присутності 500-800 мг/л слабо-рожевих колоній було набагато менше, ніж молочних. Концентрація 900 мг/л викликала появу на 3 добу безпігментних колоній (dE дорівнювала $19,2 \pm 0,07$ одиниці), колір яких дещо відновлювався на 9 добу. При 1000 мг/л іонів кадмію росту колоній не спостерігалось протягом 9 діб.

Таким чином, встановлено, що дріжджі *Rh. mucilaginosa* 1394 реагують на присутність ВМ у середовищі втратою пігменту і затримкою росту, внаслідок чого виявляється цікавим подальше їх вивчення з метою застосування в біоіндикаційних дослідженнях і виявлення вірогідних механізмів блокування синтезу пігменту під впливом стресових факторів.

ВИСНОВКИ

1. Дослідження показали, що під дією певних концентрацій іонів важких металів (а саме Al^{3+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) у дріжджів *Rhodotorula mucilaginosa* 1394 спостерігається втрата пігментосинтезувальної здатності при рості на твердому поживному середовищі (Сабуро).

2. Найбільш токсичними для *Rh. mucilaginosa* 1394 виявилися іони хрому (VI) (синтез пігменту блокувався при концентрації 10 мг/л Cr^{6+}). Стійкими дріжджі виявилися відносно до іонів кадмію (II), блокування синтезу пігменту спостерігалось при концентрації 900 мг/л Cd^{2+} .

3. Здатність дріжджів до втрати пігменту при різних концентраціях іонів важких металів може бути використана в біоіндикаційних дослідженнях.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Глинка Н.Л. *Общая химия* / Н.Л. Глинка. – Л.: Химия, 1978. – 720 с.

Нлунка N.L. *Obshchaya khymyua* / N.L. Nlyunka. – L.: Khymyua, 1978. – 720 с.

2. Кирица Е. *Направленный синтез каротиноидов у дрожжей и перспектива их использования: дисс. ... доктора биологии: 03.00.23 «Биотехнология»* / Е. Кирица. – Кишинев, 2005. – 129 с.

Kirica E. *Napravlennyj sintez karotinoidov u drozhdzhej i perspektiva ih ispol'zovanija: diss. ... doktora biologii: 03.00.23 «Biotehnologija»* / E. Kirica. – Kishinev, 2005. – 129 s.

3. Крупей К.С. *Вплив іонів Ni²⁺, Al³⁺ та Cr⁶⁺ на каротиносинтезувальну здатність дріжджів [Електронне наукове видання]* / К.С. Крупей, О.Ф. Рильський, С.А. Цимбалістий // *Актуальні проблеми біології, екології та хімії. – Запоріжжя : ЗНУ. – 2014. – Т. 7. – № 1. – С. 23-32. – Режим доступу: http://sites.znu.edu.ua/bio-eco-chem-sci/issues/index.php?action=url/view&url_id=6666.*

Krupej K.S. *Vpliv ioniv Ni²⁺, Al³⁺ ta Cr⁶⁺ na karotinosintezuval'nu zdatnist' drizhdzhiv [Elektronne naukove vidannja]* / K.S. Krupej, O.F. Ril's'kij, S.A. Cimbalistij // *Aktual'ni problemi biologii, ekologii ta himii. – Zaporizhzhja: ZNU. – 2014. – Т. 7. – № 1. – С. 23-32. – Rezhim dostupu: http://sites.znu.edu.ua/bio-eco-chem-sci/issues/index.php?action=url/view&url_id=6666.*

4. Патент на корисну модель № 49812 Україна, МПК (2009), C12Q 1/00, C12M 1/00, C12M 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.

Patent na korisnu model' № 49812 Ukraïna, MPK (2009), C12Q 1/00, C12M 1/00, C12M 1/34. Sposib viznachennja intensivnosti pigmentoutvorenja u bakterij / Ril's'kij O.F., Dombrovs'kij K.O., Gorohovs'kij Є.Ju., Zhilenko A.V.; zajavnik i patentovlasnik ZNU. – № u200912311; zajavl. 30.11.2009; opubl. 11.05.2010, Bjul. № 9, 2010 r.

5. Подгорский В.С. Дрожжи – биосорбенты тяжелых металлов / В.С. Подгорский, Т.П. Касаткина, О.Г. Лозовая // *Мікробіологічний журнал*. – 2004. – Т. 66, № 1. – С. 91–103.

Podgorskij V.S. Drozhzhi – biosorbenty tjazhelyh metallov / V.S. Podgorskij, T.P. Kasatkina, O.G. Lozovaja // Mikrobiologichnij zhurnal. – 2004. – Т. 66, № 1. – S. 91-103.

6. Пузаков С.А. Химия / С.А. Пузаков. – М. : Медицина, 1995. – 624 с.

Puzakov S.A. Himija / S.A. Puzakov. – M.: Medicina, 1995. – 624 s.

7. Рильський О.Ф. Пігментосинтезувальна активність дріжджів *Rhodotorula aurantiaca* 1193 в умовах «металевого стресу» / О.Ф. Рильський, К.С. Крупей // *Вісник Запорізького національного університету: збірник наукових праць. Біологічні науки*. – Запоріжжя: ЗНУ, 2013. – № 3. – С. 151–155.

Ril's'kij O.F. Pigmentosintezuval'na aktivnist' drizhdzhiv Rhodotorula aurantiaca 1193 v umovah «metalevogo stresu» / O.F. Ril's'kij, K.S. Krupej // Visnik Zaporiz'kogo nacional'nogo universitetu: zbirnik naukovih prac'. Biologichni nauki. – Zaporizhzhja: ZNU, 2013. – № 3. – S. 151–155.

8. Joshi V K. Microbial Pigments / Joshi V K, Devender Attri, Anju Bala [et al.] // *Indian Journal of Biotechnology*. – 2003. – Vol. 2. – pp. 362-369.

**RHODOTORULA MUCILAGINOSA 1394 YEAST IS
BIOINDICATOR WITH ENVIRONMENT POLLUTED OF
HEAVY METALS**

Krupey K.S.

Zaporizhzhya National University

krupeyznu@gmail.com

As is known, exceeding of the heavy metals 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 heavy metals, polluting environment, are metallurgy and galvanic shops of the industrial enterprises. That is why the search for effective methods of environment pollution indications by heavy metals has taken the first place recently. 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. 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 heavy metals may serve as objective bioindicator of the environment pollution.

These heavy metals influence the microbial population by affecting their growth, morphology, biochemical activities and ultimately resulting in decreased biomass and diversity. Heavy metals can damage the cell membranes, alter enzymes specificity, disrupt cellular functions and damage the structure of the DNA. Toxicity of these heavy metals 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.

Thus, researches of the bacteria that we carried out aroused our interest to the research of the heavy metals 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 heavy metals, and there is little information about the ability to change the pigment color in heavy metals presence in the medium.

Solid nutrient medium Sabouraud was prepared on the base of the water with certain heavy metals salt concentrations

$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CdCl_2 . Nutrient medium Sabouraud without metals was used as a control. When Sabouraud set congeal, 18-days culture *Rh. mucilaginosa* 1394 was seeded by solid lawn on it (0,2 ml per one Petri dish). Suspension density was $10^7/\text{ml}$. Yeasts incubated in the thermostat under the temperature 27–28°C. Results were calculated on the 3th 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.

It was ascertained, that under the influence of the certain heavy metals ions concentrations (Al^{3+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) *Rhodotorula mucilaginosa* 1394 yeasts may lose pigment synthesizing ability when growing in the solid nutrient medium (Sabouraud). It has emerged that the most toxic heavy metals for yeasts *Rh. mucilaginosa* 1394 is Cr^{6+} (pigment genesis was blocked under the concentration of 10 mg/l chrome ions). The yeasts have turned out to be solid in regard to the Cd^{2+} (only under the concentration of 900 mg/l the pigment synthesis was blocked). Ions of Al^{3+} provoked weak inhibiting on the pigment synthesis yeasts cells. Yeasts ability to lose pigment under different heavy metals concentrations may be used in the bioindication researches.

УДК 582.282.23:504:546.3

Крупей К.С. Дріжджі *Rhodotorula mucilaginosa* 1394 – біоіндикатори забруднення довкілля важкими металами / К.С. Крупей // Питання біоіндикації та екології. – Запоріжжя: ЗНУ, 2014. – Вип. 19, № 1. – С. 226–235.

Встановлено, що під дією певних концентрацій іонів важких металів (Al^{3+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) у дріжджів *Rhodotorula mucilaginosa* 1394 спостерігається втрата пігментосинтезувальної здатності при рості на твердому поживному середовищі (Сабуру).

Іони хрому (VI) виявилися найбільш токсичними для *Rh. mucilaginosa* 1394 (синтез пігменту блокувався при концентрації 10 мг/л Cr⁶⁺). Стійкими дріжджі виявилися відносно до іонів кадмію (II), повне інгібування синтезу пігменту спостерігалось при концентрації 900 мг/л Cd²⁺. Іони алюмінію (III) слабо пригнічували пігментоутворення дріжджових клітин. Здатність дріжджів до втрати пігменту при різних концентраціях іонів важких металів може бути використана в біоіндикаційних дослідженнях.

Дріжджі Rhodotorula mucilaginosa 1394, іони важких металів, пігмент, ріст, біоіндикація.

Бібл. 8. Табл. 2.