

OLKOVA A.S.

Vyatka State University of Humanities

Russia, 610002, Kirov, Krasnoarmeyskaya str. 26, e-mail: morgan-abend@mail.ru

RESEARCH EXPERIENCE NATURAL AND INDUSTRIAL SYSTEMS OF THE BIOSPHERE BY BIOASSAY METHODS: FEATURES PROBLEMS, SOLUTIONS

Aims. Synthesis of many years of experience with the features and problems of bioassays environmental components according to the certified methods and develop some solutions. **Methods.** With the test organisms of different trophic groups determined by the integral components of the toxicity of natural and industrial systems. We used the following organisms: *Chlorella vulgaris*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis*, *Paramecium caudatum*, *Escherichia coli*. **Results.** Interpretation of the results of bioassays, if possible, should take into account the natural "matrix", effects of stimulation, as well as organisms reactions, manifested before the death of individuals. **Conclusion.** In our opinion, requires better methodological framework, the creation of a data bank, reflecting the dependence of the "dose-effect", the effects of the combined action of pollutants, as well as integrated effect of factors.

Key words: bioassay, the integrated toxicity, natural and industrial systems.

СУСЛОВА О.С., ГОЛЕМБІОВСЬКА С.Л., МАЦЕЛЮХ Б.П., ТАШИРЕВ О.Б.

Інститут мікробіології і вірусології НАН України

Україна, ДОЗ680, Київ МСП, вул. Академіка Заболотного, 154, e-mail: Golembiovaska@ukr.net

ПІГМЕНТИ ДРІЖДЖІВ, ВИДІЛЕНИХ З ПЕЧЕРИ МУШКАРОВА ЯМА

На сьогоднішній день карстові порожнини залишаються малодослідженими еконішами Землі щодо існування в них біологічних об'єктів. Печера Мушкарова Яма (Тернопільська область, Україна) утворена з гіпсу і є однією з таких порожнин. З цієї печери співробітниками нашого інституту на середовищі з високою концентрацією іонів токсичних металів (Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cr_4O^{2-}) був виділений ряд мікроорганізмів. Серед них особливу увагу привернули колонії, які на другу добу культивування накопичували внутрішньоклітинний пігмент рожевого кольору. За допомогою методів світлової мікроскопії визначено, що дані мікроорганізми мають типову для дріжджів морфологію.

Дріжджі – хемоорганогетеротрофні мікроорганізми, класичними джерелами виділення яких в мікробіологічній практиці є субстрати, багаті на цукристі речовини [1]. Такими є поверхні плодів, листків чи місця навколо тріщин в корі, звідки може витікати сік дерев. Існування в таких місцях забезпечується харчуванням дріжджів прижиттєвими виділеннями рослин, некта-

ром квітів, раневими соками рослин, мертвою фітомасою і т. д. Відомі також представники дріжджів роду *Lypomyces*, які поширені у ґрунті, особливо у підстилці. Дріжджі родів *Candida*, *Pichia*, *Ambrosiozyma* постійно присутні у кишечнику і ходах ксилофагів (комах, що харчуються деревиною), різноманіття дріжджових співтовариств розвиваються також на листі, ураженому тлюю [7]. Українськими дослідниками були виділені дріжджі, переважно родів *Rhodotorula*, з ґрунтів скелястої області Малих Карпат та високогірних районів Криму, які відкриті сонячному випромінюванню [2]. Тому у нас викликало зацікавлення виділення пігментованих дріжджів з такої екосистеми як карстова печера, адже вона характеризується відсутністю світла і обмеженістю органічних речовин, що легко засвоюються.

Метою даної роботи була первинна ідентифікація внутрішньоклітинних кольорових пігментів, які синтезують дріжджі, виділені з печери Мушкарова Яма.

Матеріали і методи

Препарати для світлової мікроскопії фіксували в полум'ї пальника і фарбували 0,5% водним розчином фуксину основного [1].

Дріжджі вирощували на м'ясопептоному агарі та на середовищі сусло при рН 4 [2]. Куль-

тивування на обох середовищах проводили протягом 3 діб при наявності та відсутності (термостат) світла, t 21 і 28°C. Біомасу дріжджів знімали з поверхні агару скальпелем, висушували при t 60-80°C та розтирали у фарфоровій ступці ква-

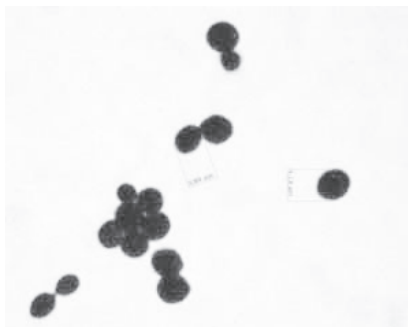
рцовим піском. Екстракцію внутрішньоклітинних пігментів проводили поетапно спиртом 96°, ацетоном і гексаном до знебарвлення розтертої біомаси. Зібрані екстракти осаджували від кварцового піску і інших речовин центрифугуванням при 8050 g протягом 5 хв [5].

Первинну ідентифікацію речовин досліджуваних мікроорганізмів здійснювали методом тонкошарової хроматографії на пластинках *Cromatofolgas AL HPTLC Silicagel 60 F254* фірми "Merck". Компоненти каротиноїдів розділяли в

Результати та їх обговорення

За допомогою методів світлової мікроскопії визначено, що виділена з печери Мушкарова Яма культура є дріжджами (рис. 1). Дані мікроорганізми здатні до брунькоутворення, діаметр окремих клітин становив 3-4 мкм.

У процесі росту досліджуваних дріжджів у



При екстракції внутрішньоклітинних пігментів спостерігалось їх швидке руйнування при дії на них тепла та світлових променів, що є характерним для властивостей каротиноїдів [6]. Етанол екстрагував один пігмент рожевого кольору (рис. 2,1), що свідчить про неполярні властивості кольорового метаболіту і є характерним для ксантофілів – кисновмісних каротиноїдів [6]. Ацетоном екстрагувалися два пігменти

системі розчинників ацетон : петролейний ефір 4:1 [2]. Окремі плями пігментів знімали з носія хроматографічної пластики і розчиняли в спирті та ацетоні. Далі проводили спектрофотометричний аналіз очищених пігментів за допомогою спектрофотометра Beckman DU-8B в діапазоні видимого світла 400 – 600 нм [6]. У контролі використовували хроматографічно очищений каротиноїд торулародин, екстрагований з дріжджів *Rhodotorula glutinis* YKM-1330.

всіх вищезазначених варіантах культивування візуально визначено, що накопичення кольорових пігментів відбувалося інтенсивніше на сусло-агарі, в умовах освітлення і при t 21°C. Тому, подальші дослідження проводилися з використанням саме цих умов.

Рис. 1. Клітини виділених дріжджів в полі світлового мікроскопа, збільшення x 1000

рожевого та оранжевого кольору (рис. 2,2), гексаном – жодного із них (дані не приводяться).

Методом ТШХ показано, що хроматографічна рухливість (Rf) рожевого пігменту в обох випадках становила 0,21, а оранжевого - 0,95. Отже, досліджувані дріжджі при культивуванні на сусло-агарі накопичують два неполярні каротиноїди рожевого і оранжевого забарвлення.



Рис. 2 Тонкошарова хроматограма ендогенних пігментів досліджуваних дріжджів, екстрагованих етанолом (1), ацетоном (2)

Подальша ідентифікація кольорових пігментів дріжджів, виділених з печери Мушкарова Яма, проводилася за допомогою спектрофотометрії. Рожевий каротиноїд з Rf 0,21, розчинений в ацетоні, мав два максимуми поглинання 495 та 523 нм (рис. 3,1). Отримані результати спектрофотометрії рожевого пігменту мали подібність за даними літератури до максимумів поглинання каротиноїда торулародину, який характерний для представників базидіоміцетних дріжджів [2, 3]. Для порівняння даних спектрофотометрії рожевого пігменту з Rf 0,21 (рис. 3,3 та 3,5) було використано хроматографічно очищений торулародин із дріжджів *Rhodotorula glutinis* УКМ-1330 розчинений в етанолі (рис.3,4) та ацетоні (рис. 3,6). Максимуми спектрів по-

глинання рожевого пігменту досліджуваних дріжджів та *Rhodotorula glutinis* УКМ-1330 були ідентичні, що свідчить про накопичення дріжджами, виділеними з карстової печери, каротиноїда торулародину.

Спектрофотометрія верхньої смуги каротиноїдів оранжевого кольору з Rf 0,95 давала піки поглинання при довжині хвилі 464 і 485 нм (рис.3.2), що подібно до спектру поглинання торуліну [2, 3]. Дріжджі *Rhodotorula glutinis* УКМ-1330 на третю добу росту накопичують суміш каротиноїдів торулін, γ - і β -каротини, які мають подібну хроматографічну рухливість, що ускладнює процес їх очищення та порівняння з оранжевим пігментом дріжджів, виділених з печери Мушкарова Яма.

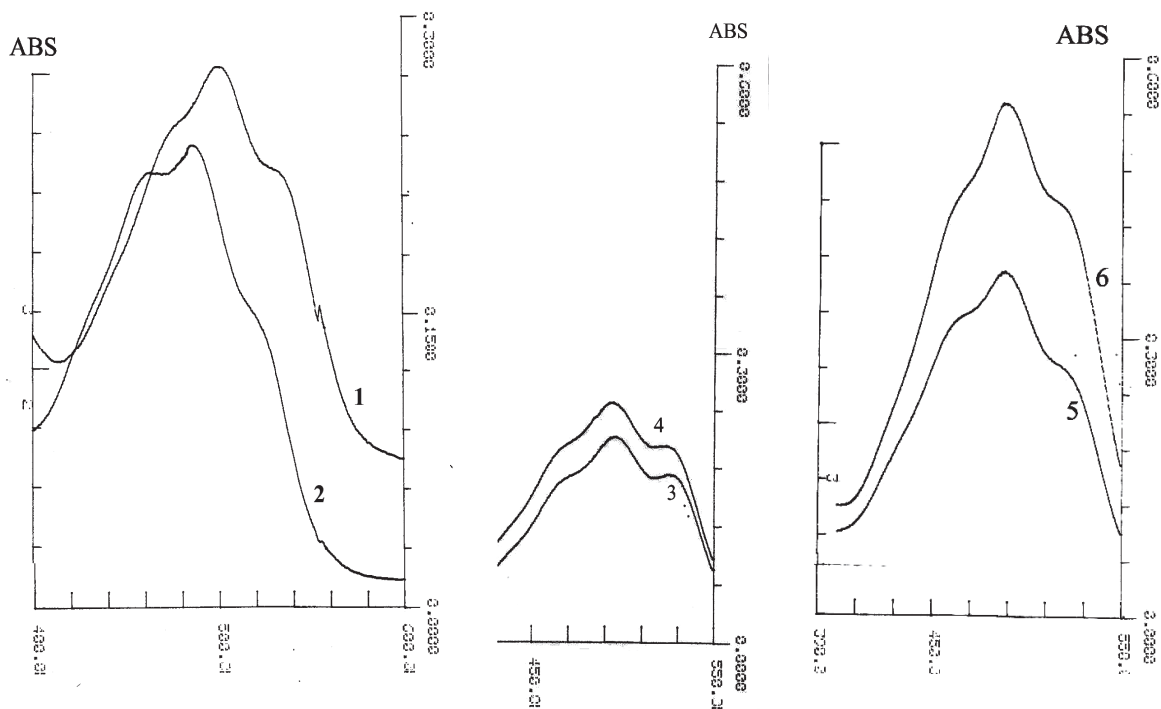


Рис. 3 Спектри поглинання очищених пігментів: нижньої смуги з Rf 0,21 в ацетоні (1); верхньої смуги з Rf 0,95 в ацетоні (2); нижньої смуги в етанолі (3); торулародину *Rhodotorula glutinis* УКМ-1330 в етанолі (4); нижньої смуги в ацетоні (5); торулародину *Rhodotorula glutinis* УКМ-1330 в ацетоні (6)

З літературних даних відомо, що шлях синтезу кольорових каротиноїдів у дріжджів іде у напрямку від вуглеводню γ -каротину до каротиноїдної кислоти – торулародину, включаючи етап синтезу торуліну [3], який, вірогідно, і накопичують досліджувані дріжджі на третю добу культивування.

Отже, дріжджі виділені з карстової порожнини Мушкарова Яма, на третю добу культивування накопичують два каротиноїди, один з яких є торулародином, а інший, вірогідно, є його

попередником торуліном. За типовою властивістю базидіоміцетів синтезувати каротиноїди досліджувані дріжджі можна віднести до представників цього роду. Але залишається відкритим питання функціональності каротиноїдів у досліджуваних дріжджів. З літературних даних відомо, що у нефотосинтезуючих мікроорганізмів, в тому числі у дріжджів, каротиноїди захищають клітину в першу чергу від дії вільних радикалів, утворених надмірним впливом сонячної радіації. Водорості ж використовують каротиноїди як

додаткові засоби для отримання енергії світлових променів діапазону 400-500 нм [6]. Можливо, в нашому випадку каротинсинтезуючі дріжджі використовують каротиноїди аналогічно фотосинтезуючим організмам. Проте потрібно сказати, що виділення даних мікроорганізмів відбувалося на середовищі, яке містило велику кількість іонів міді (1000 мг/л). Такі умови лімітували виділення мікроорганізмів, які б не були резистентні до великих концентрації ксенобіо-

тичних речовин. Ймовірно, що в даному випадку продукування каротиноїдів є механізмом захисту від дії іонів токсичних металів. Раніше співробітниками нашого інституту була показана пряма залежність між наявністю каротиноїдних пігментів і стійкістю до високих концентрації іонів міді [4]. З іншої сторони, виділені дріжджі, крім каротиноїдних пігментів, можуть мати еволюційно доскональну систему репарації, наявність якої дає змогу існувати в даних умовах.



Схема 1. Шлях синтезу каротиноїдних пігментів у дріжджів [3]

Висновки

1. Ідентифіковано внутрішньоклітинні пігменти дріжджів виділених з карстової печери Мушкарова Яма. Досліджувані дріжджі накопичують торлародин та, вірогідно, його попередник торунін.

2. Наявність у виділених дріжджів пігментів каротиноїдної природи ймовірно обумовлена необхідністю захисту клітини від ксенобіотичних речовин, що містило середовище, на якому вони були ізолювані.

Література

1. Бабьева И.П., Гoubев В.И. Методы выделения и идентификация дрожжей. – Москва. Пищ. Пром-ть, 1979. – 120 с.
2. Квасников Е.И., Васкивнюк В.Т., Суденко В.И., Гринберг Т.А. Каротинсинтезирующие дрожжи. – Киев: Наук. думка, 1980. – 171 с.
3. Кирица Елена. Направлений синтез каротиноидов у дрожжей и перспектива их использования. Автореферат. Кишинев. – 2005. – 129 с.
4. Мамеева О.Г., Касаткіна Т.П., Лаврінчук В.Я. Біосорбційна спроможність мутантів *Rhodotorula mucilaginosa* УКМ У-1776 // Мікробіол. журн. – 2007. – Т. 69, № 2. – С. 29 – 35
5. Мацелюх Б.П., Лутченко В.А., Поліщук Л.В. Синтез каротиноїдів мутантними штамми *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. – 2003. – Т. 65, № 6. – С. 24-30.
6. Britton G. General carotenoid methods // Meth. Enzymol. – V. 111. Steroids and Isoprenoids. Part B. / Ed. J.H. Law, H.C. Rilling. – Orlando, San Diego etc.: Academ. Press. – 1985. – P. 113-149.
7. Kurtzman, C.P., Fell, J.W. Yeast systematics and phylogeny — implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: Rosa, C.A. and Peter, G., editors. The Yeast Handbook. Germany: Springer-Verlag Berlin Herdelberg. – 2006. – P. 11-30.

SUSLOVA O.S., GOLEMBIOVSKA S.L., MATSELYKH B.P., TASHYREV O.B.

*Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
Ukraine, D 03680, Kiev, Zabolotnogo str., 154, e-mail: Golembiovaska@ukr.net*

PIGMENTS OF THE YEAST ISOLATED FROM THE MUSHKAROVA YAMA CAVE

Aim. To identify color pigments of yeast isolated from the Mushkarova Yama cave (Ukraine). **Methods.** The color pigments were obtained from yeast cells and dissolved in solution (TCL-method, spectroscopy analysis). **Results.** The color yeasts were isolated from the karst cave. The obtained pigments were identified as torulin and torularhodin by TLC-methods and spectroscopy analysis. **Conclusions.** The data indicates ability of carotenoids pigments' biosynthesis in the yeast isolated from karst cave Mushkarova Yama.
Key words: yeast, carotenoids, torulin, torularhodin.