

С.О. Білоіваненко, А.Є. Бухтіяров

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: beloiv@onu.edu.ua

РЕЗИСТЕНТНІСТЬ *RHODOTORULA RUBRA* G2/1 ДО ВАЖКИХ МЕТАЛІВ ТА ЇХ АДСОРБЦІЯ

*Метою роботи було вивчення рівня стійкості штаму *Rhodotorula rubra* g2/1 до важких металів *Cu*, *Zn*, *Pb*, *Cd* та їх адсорбції клітинами цих дріжджів. Штам червоних дріжджів *Rhodotorulla rubra* g2/1 був виділений з прибережних вод острова Зміїний. Оцінка впливу іонів досліджуваних токсичних металів на ріст дріжджів проведена на середовищі Рідер з додаванням різних концентрацій важких металів *Cu*, *Zn*, *Pb*, *Cd*. Вміст досліджених металів у зразках визначали за допомогою атомно-абсорбційного спектрофотометру "Сатурн-2". Визначено мінімальні концентрації важких металів, що інгібують ріст дріжджів штаму *Rhodotorula rubra* g2/1. Для міді – 750 мг/л, цинку – 500 мг/л, свинцю – 120 мг/л, кадмію – 10 мг/л. Отже, досліджені дріжджі найрезистентніші до міді та найчутливіші до кадмію. За інкубації в розчинах, що містять важкі метали, дріжджі вилучають за 2 години 85,6% міді, 18,6% свинцю, 7,8% кадмію, 7,7% цинку. При цьому на один грам сухої біомаси дріжджі накопичують 90,0 мг міді, 38,9 мг кадмію, 12,9 мг цинку та 26,2 мг свинцю. Таким чином, проведені дослідження показали, що дріжджі штаму *Rhodotorula rubra* g2/1 одночасно мають високий рівень резистентності до міді та здатність до адсорбції цього металу.*

Ключові слова: дріжджі, важкі метали, резистентність, біосорбенти.

Дріжджі здатні активно накопичувати токсичні сполуки з навколишнього середовища, у тому числі важкі метали, та відзначаються високим кумулятивним ефектом у природі [1, 5, 9]. Вони адсорбують важкі метали із забруднених вод досить активно, іноді до повного вилучення. Набір металів, що накопичують дріжджі, надзвичайно широкий. Це дозволяє розглядати їх як потенційні, ефективні і дешеві сорбенти для очищення водного середовища від забруднень токсичними металами [1, 6, 10].

З іншого боку дріжджі виявляють значну резистентність до токсикантів. Відомо, що одними з найбільш стійких є червоні дріжджі завдяки активному синтезу пігментів, що виступають у ролі антиоксидантів та



дозволяють їм адаптуватися до екстремальних умов існування, у тому числі в середовищі з високими концентраціями токсичних металів [2].

Пошук високо резистентних штамів дріжджів здатних до накопичення важких металів має важливе значення для подальшого використання їх в екологічній біотехнології.

Метою роботи було вивчення рівня стійкості штаму *Rhodotorula rubra* g2/1 до Cu, Zn, Pb, Cd та їх адсорбції клітинами цих дріжджів.

Матеріали і методи

У роботі використовували штам червоних дріжджів *Rhodotorulla rubra* g2/1, виділений з поверхневого шару прибережних вод острова Зміїний [4].

Дріжджі вирощували на середовищі Рідер такого складу (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,0; K_2HPO_4 – 0,1; KH_2PO_4 – 1,0; MgSO_4 – 0,7; NaCl – 0,5; глюкоза – 1%, екстракт дріжджів – 0,1%; рН – 5,5.

Оцінку впливу досліджуваних важких металів на ріст дріжджів *Rhodotorulla rubra* g2/1 здійснювали на середовищі Рідер з додаванням важких металів у різних концентраціях. Дріжджі культивували впродовж 72 год за 28 °С [3, 9, 10].

Для оцінки стійкості до важких металів досліджуваного штаму в середовище Рідер додавали розчин CuSO_4 , до кінцевої концентрації міді 50, 100, 150, 250, 500, 750 мг/л; $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ до кінцевої концентрації кадмію 5, 10, 20, 50 мг/л; ZnSO_4 до кінцевої концентрації цинку 20, 40, 100, 150, 200, 500 мг/л; $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ до кінцевої концентрації свинцю 30, 60, 120, 250, 500 мг/л [3, 5, 9].

Середовище Рідер інокулювали двохдобовою культурою дріжджів *Rhodotorulla rubra* g2/1 в концентрації $1,5 \times 10^9$ КУО/мл. Ріст оцінювали після 4-х діб культивування за 28 °С за п'ятибальною шкалою.

Здатність мікроорганізмів до сорбції Cu, Cd, Zn і Pb визначали згідно з методикою [11]. Дріжджі культивували при 25 °С впродовж доби на середовищі Сабуро, змивали з живильного середовища і суспендували в 0,2 ммоль малеатному буфері (рН 6,8), доводячи їх до концентрації $1,5 \times 10^9$ КУО/мл. До суспензії дріжджів об'ємом 9,9 мл додавали 100 мкл розчину солей в розрахунку на метал: міді – в концентрації 3,1 мг/мл, кадмію – 4,0 мг/мл, цинку – 1,1 мг/мл, свинцю – 3,7 мг/мл. Таким чином, в 10 мл дослідних зразків містилося 310 мкг міді, 400 мкг кадмію, 110 мкг цинку, 370 мкг свинцю.

Як контрольні зразки використовували дріжджову суспензію, малеатний буфер або розчин солі відповідного металу. Інкубацію провадили на інкубаторі-шейкері Іппова 43R за 150 об/хв впродовж 2 год при температурі 25 °С. Клітини осаджували центрифугуванням при 8000 g впродовж 10 хв при температурі 4 °С. Після відбору надосадової рідини клітини мікроорганізмів двічі промивали малеатним буферним розчином з центрифугуванням при 8000 g впродовж 10 хв при температурі 4 °С.



У попередньо висушені при 110 °С впродовж 30 хв і зважені пеніцилінові флакони переносили ресуспендований у бідистильованій воді клітинний осад з центрифужних пробірок. Флакони повторно висушували при 110 °С впродовж 30 хв і зважували для визначення маси дріжджів. Для руйнування дріжджових клітин додавали 2,5 мл 70% азотної кислоти після чого витримували 30 хв при 180 °С. Після охолодження до кімнатної температури у флакони додавали по 4 мл бідистильованої води і закривали пластиковими корками. У всі варіанти дослідів вносили 70% азотної кислоти до отримання 20% розчину.

Вміст металів як у дослідних так і в контрольних зразках визначали за допомогою атомно-абсорбційного спектрофотометра “Сатурн-2” при довжині хвилі 324,7 нм для Cu, 228,8 нм для Cd, 213,9 нм для Zn і 283,3 нм для Pb. Кінцевий вміст важких металів у клітинах, надосадовій рідині і промивних водах дозволив розрахувати загальний вміст металів. Коливання від загального вмісту металу в кожному тесті становило до 5% від початкової концентрації токсикантів, доданих в суспензію клітин. Всі експерименти проводили у трьох повторях. Результати досліджень опрацьовували статистично [7].

Результати та їх обговорення

Характер впливу на мікроорганізми важких металів визначається їх концентрацією у середовищі, рівнем токсичності та біологічними властивостями клітин. В табл. 1 наведено дані залежності росту дріжджів від концентрацій міді, кадмію, цинку і свинцю в середовищі.

При вивченні стійкості до міді встановлено, що штам *R. rubra* g2/1 росте навіть за 500 мг/л. При цьому спостерігали зміну кольору біомаси *R. rubra* g2/1 на зелений при концентраціях міді 250 мг/л, що свідчить про перетворення та накопичення в біомасі іонів міді Cu. Пригнічення росту виявлено вже за концентрації 100 мг/л Cu, а за концентрації 750 мг/л дріжджі не росли. Втрата пігментації більшості дріжджів мала місце за концентрації 150 мг/л. Як відомо, основним механізмом токсичної дії міді є руйнування цілісності цитоплазматичної мембрани. Встановлено, що резистентність до іонів міді, обумовлена металотіонами, які зв'язують метал та перешкоджають його токсичній дії [3].

Кадмій виявився найтоксичнішим для *R. rubra* g2/1. Вже за концентрації Cd в середовищі 10 мг/л ріст дріжджів не спостерігали.

Затримку росту дріжджів не виявили навіть за концентрації 100 мг/л Zn. Вони не втрачали пігментацію до концентрації 150 мг/л Zn. При 100 мг/л колір колоній змінився на жовтий.

Встановлено, що штам *R. rubra* g2/1 при концентрації 250 мг/л Pb в середовищі і вище втрачає здатність до синтезу червоних пігментів та затримує ріст, починаючи з концентрації свинцю 60 мг/л Pb. За 120 мг/л свинцю в середовищі ріст дріжджів припиняється.

Вплив іонів Cu, Cd, Zn і Pb на ріст дріжджів штаму
Rhodotorula rubra g2/1Influence of different ions of Cu, Cd, Zn and Pb on the growth
of *Rhodotorula rubra* g2/1 strain

| Метал | Концентрація металу, мг/л | Ріст |
|---------|---------------------------|------|
| Мідь | 50 | +++ |
| | 100 | +++ |
| | 150 | +++ |
| | 250 | ++ |
| | 500 | + |
| | 750 | — |
| Кадмій | 5 | ++ |
| | 10 | — |
| | 20 | — |
| | 50 | — |
| Цинк | 20 | +++ |
| | 40 | +++ |
| | 100 | +++ |
| | 150 | ++ |
| | 200 | + |
| | 500 | — |
| Свинець | 30 | +++ |
| | 60 | ++ |
| | 120 | — |
| | 250 | — |
| | 500 | — |

Примітка: — відсутність росту; + — слабкий ріст; ++ — помірний ріст; +++ — інтенсивний ріст.

Для вивчення адсорбції важких металів дріжджі *R. rubra* g2/1 інкубували впродовж 2 год за 25 °С. З наведених в табл. 2 результатів можна зробити висновок, що клітини штаму *R. rubra* g2/1 найбільшою мірою здатні до адсорбції міді. Вони вилучають з розчину 85,6% внесеного металу.



Клітини *R. rubra* g2/1 вилучають із середовища 18,6% свинцю, 7,8% кадмію та 7,7% цинку. Проведені розрахунки показали, що дріжджі дослідженого штаму на один грам сухої біомаси накопичують $90,0 \pm 4,1$ мг міді, $38,9 \pm 2,1$ мг кадмію, $12,9 \pm 1,2$ мг цинку та $26,2 \pm 1,9$ мг свинцю.

Механізми адсорбції міді, та інших металів, дріжджами добре вивчені. Адсорбція металів на поверхні клітин, пов'язана з присутністю негативно заряджених груп аніонів: COO^- , HS^- , OH^- . Встановлено, що основними іонообмінними сайтами дріжджів є: ацетамідна група хітину, поліцукридні групи, аміногрупи і фосфатні групи нуклеїнових кислот, аміно- і амідогрупи, сульфгідрильні та карбоксильні групи білків.

Таблиця 2

Адсорбція важких металів червоними дріжджами *Rhodotorula rubra* g2/1

Table 2

Adsorption of heavy metals by red yeast *Rhodotorula rubra* g2/1

| Метал | Внесено металу, мкг | Клітини, мкг | | Надосадова рідина, мкг | | Промивні води, мкг | | Всього, мкг | |
|---------|---------------------|------------------|------|------------------------|------|--------------------|-----|-------------|------|
| | | $M \pm m$ | % | $M \pm m$ | % | $M \pm m$ | % | $M \pm m$ | % |
| Мідь | 310 | $257,0 \pm 13,2$ | 85,6 | $42,0 \pm 2,4$ | 12,6 | $9,3 \pm 0,3$ | 1,8 | 308,3 | 99,5 |
| Кадмій | 400 | $31,0 \pm 2,3$ | 7,8 | $358,0 \pm 18,8$ | 90,2 | $7,9 \pm 0,4$ | 2,0 | 396,9 | 99,2 |
| Цинк | 110 | $8,6 \pm 1,2$ | 7,7 | $96,3 \pm 5,4$ | 88,5 | $4,1 \pm 0,2$ | 3,8 | 109,0 | 99,1 |
| Свинець | 375 | $70,0 \pm 3,3$ | 18,6 | $285,5 \pm 13,2$ | 76,1 | $19,0 \pm 0,9$ | 5,3 | 374,5 | 99,9 |

Відомо, що стійкість грибів, у тому числі і дріжджів, до токсичної дії важких металів, залежить як від морфологічних, так і від фізіологічних характеристик клітини. Адсорбція клітинними стінками і накопичення всередині клітин дозволяє видалити з розбавлених розчинів іноді до 100% металу [3, 5, 9].

З літературних джерел відомою, що різні штами *Rhodotorula mucilaginosa* (раніше відома як *Rhodotorula rubra*) здатні акумулювати від 8 до 579 мг на один грам сухої біомаси міді, та рости від 32 до 200 мг/л міді [8, 12].

Таким чином, ізолюваний з акваторії острова Зміїний штаму дріжджів *Rhodotorula rubra* g2/1, характеризується одночасно як високим рівнем резистентності до міді так і здатністю до активної адсорбції цього металу з навколишнього середовища, тому є перспективним для застосування в екологічній біотехнології як біосорбент.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабьев К.Н., Щелоков С.А. Дрожжи. Биология. Пути развития. — М.: Мир, 1996. — 272 с.
2. Голубцев В.И. Идентификация дрожжевых грибов рода *Rhodotorula*. — М.: Мир, 1990. — 321 с.
3. Давидова Е.Г. О природе сорбции металлов клеточными стенками дрожжей // Микробиология. — 2002. — Т. 61, № 6. — С. 1018–1022.
4. Іваниця В.О., Білоіваненко С.О. Чисельність та таксономічний склад дріжджів прибережної акваторії острова Зміїний // Микробиологія і біотехнологія. — 2012. — № 3. — С. 74–81.
5. Іваниця В.А., Бухтіяров А.Є., Лисютин Г.В., Захарія А.Н., Гудзенко Т.В. Аккумуляція тяжелих металлов бактеріями рода *Pseudomonas* // Микробиологія і біотехнологія. — 2012. — № 4. — С. 76–83.
6. Квасников Л.Н. Дрожжи. — К.: Наук.думка, 1998. — 264 с.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
8. Мамеева О.Г., Касаткіна Т.П., Лаврінчук В.Я. Біосорбційна спроможність мутантів *Rhodotorula mucilaginosa* УКМ У-1776 // Микробиол. журнал — 2007. — Т. 69, № 2. — С. 29–35.
9. Подгорский В.С., Касаткіна Т.П., Лозовая О.Г. Дрожжи — биосорбенты тяжелых металлов // Микробиол. журнал — 2004. — Т. 66, № 1. — С. 91–101.
10. Fell J.W., van Uden N. Yeasts in marine environments. — Germany, 1963. — P. 329–335.
11. McEldowney S. Effect of cadmium and zinc on attachment and detachment interactions of *Pseudomonas fluorescens* H2 with glass // Appl. and Environ. Microbiol. — 1994. — V. 60, № 8. — P. 2759–2765.
12. Villegas L.B., Amoroso M.J., de Figueroa L.I. Copper tolerant yeasts isolated from polluted area of Argentina // J. Basic Microbiol. — 2005. — V. 45(5). — P. 381–391.

Стаття надійшла до редакції 20.03.2013 р.



С.А. Белоиваненко, А.Е. Бухтияров

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 68 79 64,
e-mail: beloiv@onu.edu.ua

УСТОЙЧИВОСТЬ *RHODOTORULA RUBRA* G2/1 К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ И ИХ АДСОРБЦІЯ

Реферат

Целью работы было изучение уровня устойчивости штамма *Rhodotorula rubra* g2/1 к тяжелым металлам Cu, Zn, Pb, Cd и их адсорбции клетками этих дрожжей. Штамм красных дрожжей *Rhodotorulla rubra* g2/1 был выделен из прибрежных вод острова Змеиный. Оценка влияния ионов исследуемых тяжелых металлов на физиологию роста дрожжей проведена на среде Ридер с добавлением различных концентраций тяжелых металлов Cu, Zn, Pb, Cd. Содержание исследованных металлов в образцах определяли с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра «Сатурн-2». Определены минимальные концентрации тяжелых металлов, ингибирующих рост дрожжей штамма *Rhodotorula rubra* g2/1. Для меди — 750 мг/л, цинка — 500 мг/л, свинца — 120 мг/л, кадмия — 10 мг/л. Таким образом, исследуемые дрожжи наиболее устойчивы к меди и наиболее чувствительны к кадмию. При инкубации дрожжей в растворах, содержащих тяжелые металлы, они извлекают за 2 часа 85,6% меди, 18,6% свинца, 7,8% кадмия, 7,7% цинка. При этом на один грамм сухой биомассы дрожжи накапливают 90,0 мг меди, 38,9 мг кадмия, 12,9 мг цинка и 26,2 мг свинца. Таким образом, проведенные исследования показали, что дрожжи штамма *Rhodotorula rubra* g2/1 одновременно обладают высоким уровнем устойчивости к меди и способностью к адсорбции этого металла.

Ключевые слова: дрожжи, тяжелые металлы, резистентность, биосорбенты.



S.O. Biloivanenko, A.Y. Bukhtiyarov

Odesa National I.I. Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa,
65082, Ukraine, tel.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: beloiv@onu.edu.ua

RESISTANCE OF *RHODOTORULA RUBRA* G2/1 TO HEAVY METALS AND THEIR ADSORPTION

Summary

The aim was to study the level of resistance of the strain *Rhodotorula rubra* g2/1 to the heavy metals Cu, Zn, Pb, Cd and adsorption of them by the yeast cells. Red yeast strain *Rhodotorula rubra* g2/1 was isolated by seeding on nutrient medium Saburo from the coastal waters of the Zmiinyi Island. The estimation of the influence of ions of heavy metals on physiology of yeast growth was conducted on Reader medium with addition of various concentrations of heavy metals Cu, Zn, Pb, Cd. The content of the metals in the investigated samples was determined with the atomic absorption spectrophotometer "Saturn-2". The minimal concentrations of heavy metals inhibited the growth of yeast strain *Rhodotorula rubra* g2/1 were determined. They are 750 mg/l for copper, 500 mg/l for zinc, 120 mg/l for lead, 10 mg/l for cadmium. Thus, the studied yeast strain is the most resistant to copper and the most sensitive to cadmium. During incubation of the yeast in solutions containing heavy metals for 2 hours they remove 85.6% of copper, 18.6% of lead, 7.8% of cadmium, 7.7% of zinc. One gram of dry yeast biomass accumulates 90.0 mg of copper, 38.9 mg of cadmium, 12.9 mg of zinc and 26.2 mg of lead. Thus, the conducted investigations have shown that the yeast strain *Rhodotorula rubra* g2/1 simultaneously possesses high levels of resistance to copper and the ability to absorb this metal.

Key words: yeast, heavy metals, resistance, biosorbents.

