

УДК 576.8.095:633.12:546.73:621.039.85

НАКОПЛЕНИЕ И ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КОБАЛЬТА В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ

С. Г. КАСПАРОВА, Е. Г. ДАВИДОВА

(Кафедра применения изотопов и радиации в сельском хозяйстве)

Установлено, что дрожжи *Torulopsis farata* проявляют значительно большую устойчивость к высоким концентрациям Co^{2+} в питательной среде, чем дрожжи *Candida utilis*. Оба вида способны накапливать *in vivo* большие количества кобальта, однако относительное содержание этого элемента в клетках *T. farata* в 3—5 раз ниже, чем культуры *C. utilis* в адекватных условиях роста. При относительно низких концентрациях Co^{2+} в среде (до 10 мг/л) основная его часть [75—77 %] связана с растворимыми белками дрожжевой клетки, а при высоких концентрациях [100 мг/л] — у дрожжей *T. farata* с клеточными стенками. Предполагается, что клеточная стенка *T. farata* в значительной степени обеспечивает резистентность этого вида к кобальту.

В последнее время большое внимание уделяется проблеме использования микроорганизмов или компонентов их биомассы в качестве биосорбентов тяжелых металлов в медицине, сельском хозяйстве, геологии и других отраслях народного хозяйства [5]. В связи с этим определенный интерес представляет исследование способности дрожжевых культур к аккумуляции кобальта в условиях нормального роста.

Известно, что кобальт является кофактором для ряда ферментов: аминопептидазы, фруктозо-1, 6-дифосфотальдолазы, аргиназы и т. д. [6]. Таким образом, наряду со многими другими металлами он необходим для роста микроорганизмов, так как играет важную роль в их жизнедеятельности, участвуя в регуляции метаболических процессов в клетке.

Целью настоящей работы являлось изучение влияния различных концентраций Co^{2+} в жидкой питательной среде на рост дрожжевых культур, уровня его накопления в клетке и внутриклеточной локализации поглощенного кобальта.

Методика

В работе были использованы дрожжи *Candida utilis* и *Torulopsis farata*, полученные из коллекции культур ВНИИСинтезбелок. Культивирование проводили в стационарных условиях на термостатированной качалке при температуре 30 °С в течение 18 ч на жидкой питательной среде следующего состава (на 1 л водопроводной воды): $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ — 2 г; Na_2HPO_4 — 17,6 г; KH_2PO_4 — 6,8 г; MgSO_4 — 0,7; дрожжевой экстракт — 0,1 %; pH 6,5. Источником углерода служили глюкоза или этиловый спирт (концентрация в среде 1 %). Кобальт вносили в среду в концентрации 0,1—530 мкг/мл в форме CoSO_4 с изотопом-индикатором ^{57}Co . В контрольном варианте питательная среда не содержала Со.

Дрожжи для посева выращивали на сусло-агаре в течение 24 ч, затем переносили в колбу объемом 500 мл, содержащую 100 мл среды вышеуказанного состава и 1 % глюкозы или 1 % об. этанола, и культивировали в течение 12 ч. В опытные колбы

Т а б л и ц а 1

Накопление биомассы дрожжей (мг/мл) в зависимости от концентрации кобальта в питательной среде

Концентрация кобальта, мкг/мл	Глюкоза		Этанол
	<i>C. utilis</i>	<i>T. famata</i>	<i>C. utilis</i>
0	5,54	4,67	7,11
0,1	5,50	5,40	7,01
1	5,43	5,51	6,34
5	4,78	5,78	4,57
10	4,12	5,83	4,31
20	4,76	5,79	3,80
37	4,46	6,06	3,33
72	4,36	6,69	3,15
85	4,13	7,52	2,90
120	1,34	6,31	1,20
210	1,39	5,40	1,11
530	0,85	3,47	0,91

Примечание. Относительная ошибка измерений не более $\pm 10\%$.

суспензию клеток добавляли с таким расчетом, чтобы исходная концентрация биомассы составляла 0,1 мкг/мл.

В конце эксперимента отбирали аликвоты дрожжевой суспензии, центрифугировали для удаления питательной среды, промывали 3 раза дистиллированной водой и измеряли радиоактивность осадка на радиометре Компью-гамма (ЛКБ, Швеция). Количество кобальта рассчитывали, используя предварительно установленную массовую удельную активность исходного раствора этого металла. Концентрацию биомассы дрожжей определяли весовым способом.

Критерием устойчивости дрожжевых культур к кобальту в питательной среде служил прирост их биомассы по сравнению с контролем.

Для фракционирования дрожжевой биомассы клетки, находящиеся в середине логарифмической фазы роста, отделяли от питательной среды центрифугированием, промывали водой 2 раза и разрушали при помощи стеклянных бус Валлотини без использования буфера. Гомогенат при помощи дифференциального центрифугирования разделяли на фракции: клеточные стенки (1500 г, 15 мин), мембраны (105 000 г, 90 мин) и растворимую белковую фракцию. Содержание кобальта в каждой фракции опреде-

ляли радиометрическим методом. Обессоливание растворимой фракции проводили на колонке ($l=90$ см, $d=0,8$ см) с сефадексом G=10.

Результаты

У дрожжей *C. utilis* при выращивании на глюкозе снижение прироста биомассы началось уже при концентрации Co^{2+} в среде 5 мкг/мл; при концентрациях 37–85 мкг/мл оно достигало 20–25% (табл. 1). Более высокие концентрации кобальта (120–530 мкг/мл) практически полностью подавляли рост культуры. Следовательно, пороговая концентрация кобальта для дрожжевой культуры *C. utilis* — 85–90 мкг/мл.

У дрожжей *T. famata* повышенные концентрации Co^{2+} в питательной среде до 37 мкг/мл стимулировали рост культуры — прирост биомассы увеличивался на 30% по сравнению с контролем. Только очень высокие концентрации кобальта в питательной среде (около 530 мкг/мл) ингибировали рост этой дрожжевой культуры, однако в меньшей степени, чем *C. utilis*. Так для *T. famata* уровень прироста биомассы оставался 3,5 мг/мл, в то время как для *C. utilis* он составлял менее 1 мг/мл. Таким образом, резистентность у *T. famata* к кобальту значительно выше, чем у *C. utilis*.

Следует, однако, отметить, что в зависимости от используемого источника углеродного питания устойчивость культур к кобальту меняется (табл. 1): в диапазоне концентраций кобальта в среде 5–37 мкг/мл прирост биомассы *C. utilis* снизился на 40% при выращивании на этаноле и всего лишь на 20% при культивировании на глюкозе.

Определение накопления кобальта в биомассе дрожжей в зависимости от концентраций данного элемента в среде показало, что высокоустойчивая к кобальту культура *T. famata* накапливает значительно меньше Co^{2+} , чем *C. utilis* (табл. 2). Кроме того, клетки дрожжей *C. utilis*, выращенные на глюкозе, содержали больше кобальта, чем клетки, культивировавшиеся на этаноле. Это свидетельствует о том, что накопление кобальта в биомассе дрожжей зависит не только от таксономической

Таблица 2

Накопление кобальта (мкг/г) в биомассе дрожжей в зависимости от его концентрации в питательной среде

Концентрация кобальта, мкг/мл	Глюкоза		Этанол
	<i>C. utilis</i>	<i>T. famata</i>	<i>C. utilis</i>
0,1	0,0202	0,020	0,016
1	0,214	0,085	0,171
5	1,06	0,286	1,02
10	2,049	0,442	1,13
20	1,644	0,08	1,13
37	1,817	0,79	1,20
72	2,71	3,457	1,89
85	6,31	5,728	5,44
120	10	7,139	45,5
210	50	22,361	100
530	509	106	458

Примечание. Относительная ошибка измерений не более $\pm 3\%$.

принадлежности культуры, но и от источника углерода. При высоких концентрациях кобальта в среде накопление его в биомассе *C. utilis* достигает высоких значений — 500 мкг/г биомассы. Вероятно, это происходит за счет нарушения проницаемости клеточной стенки — разрушаются барьеры, препятствующие поступлению кобальта внутрь клетки. Это согласуется с литературными данными [4], согласно которым уровень накоп-

ления Cd^{2+} мертвыми клетками *Asipetobacter* значительно превышает уровень его накопления живыми бактериями.

Более низкий уровень накопления кобальта в биомассе дрожжей *T. famata* свидетельствует о том, что эта культура должна обладать специальным механизмом, препятствующим поступлению кобальта в клетку в большей степени, чем у *C. utilis*. Возможно, именно он и обеспечивает устойчивость *T. famata* к высоким концентрациям Co^{2+} в питательной среде — даже при концентрации Co^{2+} 530 мкг/мл уровень его накопления в биомассе *T. famata* в 5 раз ниже, чем у *C. utilis* (см. табл. 2).

Накопление металла в клетках дрожжей обусловлено рядом процессов, в том числе сорбцией металла на клеточной поверхности, транспортом его через цитоплазматическую мембрану и внутриклеточным распределением. Чтобы выявить причины указанных выше различий в накоплении кобальта у дрожжей, было проведено исследование внутриклеточного распределения поглощенного металла у *C. utilis* и *T. famata* (табл. 3). Эксперименты с *C. utilis* проводили при концентрациях Co^{2+} в среде 2 и 10 мкг/мл, а с *T. famata* — при концентрациях 10 и 100 мкг/мл.

У *C. utilis* основная часть поглощенного кобальта (75—76%) независимо от его концентрации в пита-

Таблица 3

Внутриклеточное распределение кобальта в зависимости от его концентрации в питательной среде

Концентрация кобальта, мкг/мл	Гомогенат			Клеточные стенки			Мембранная фракция			Растворимая фракция		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>C. utilis</i>												
2	—	53,24	100	0,04	5,37	11,1	0,045	6,55	13,5	0,154	36,42	75,3
10	—	830,93	100	0,68	67,08	9,2	0,88	108,84	14,9	3,0	554,8	75,9
<i>T. famata</i>												
10	—	380,4	100	0,39	34,69	9,5	0,49	48,14	13,2	1,67	281,5	77,3
100	—	4454,2	100	25	2355,7	57,6	10,75	805,2	19,7	6,4	927,8	22,7

Примечание. 1 — содержание кобальта в 1 мг фракции, мкг; 2 и 3 — общее содержание кобальта соответственно в мкг и %.

тельной среде находится в растворимой фракции. Обессоливание этой фракции на колонке с сефадексом G-10 показало, что свободный кобальт в клетках отсутствует. Следовательно, он связан с растворимыми белками или другими органическими соединениями [1].

Для дрожжей *T. famata* зависимость распределения кобальта от его концентрации в питательной среде имеет другой характер. Так, при концентрации кобальта в среде 100 мкг/мл основная часть внутриклеточного кобальта (57,6 %) находится в клеточных стенках и только 22,7 % — в растворимой фракции, в то время как при концентрации 10 мкг/мл дрожжи *T. famata* имеют такое же процентное соотношение внутриклеточного кобальта между исследуемыми фракциями, как и дрожжи *S. utilis*.

Полученные нами результаты о внутриклеточном распределении кобальта у дрожжей *S. utilis* согласуются с имеющимися в литературе данными о поглощении цинка дрожжами *S. cerevisiae* [3]: 56 % общего внутриклеточного пула цинка локализуется в растворимой вакуолярной фракции, 39 % связано с нерастворимыми компонентами и 5 % было обнаружено в цитозоле. При исследовании поглощения кобальта дрожжами *S. maltosa* [2] оказалось, что основная часть кобальта (34 %) приходилась на растворимую фракцию, 24 % — на мембранную, а с клеточными стенками было связано 17 % поглощенного дрожжами металла. Вероятно, устойчивость дрожжей *T. famata* к высоким концентрациям ко-

бальта связана с защитной функцией клеточных стенок, которые способны сорбировать значительные количества металла. Однако для выяснения природы резистентности дрожжей *T. famata* к повышенным концентрациям кобальта необходимы сравнительные исследования процессов сорбции и транспорта кобальта у обеих культур (*T. famata* и *S. utilis*).

Способность дрожжей накапливать большие количества металла может быть использована в практике при биологической очистке отходов, загрязненных тяжелыми металлами, извлечения и концентрировании металлов, получении препаратов, используемых в фармацевтических и диетических целях, а также в ветеринарии в виде препаратов для детоксикации в случае отравления животных тяжелыми металлами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белов А. П., Давидова Е. Г. Выделение и свойства Co^{2+} -связывающего белка из дрожжей. — Биохимия, 1984, № 9, с. 14—92. —
2. Белов А. П., Давидова Е. Г., Рачинский В. В. Внутриклеточное распределение кобальта в дрожжах *S. maltosa*. — Микробиол., 1985, т. 54, вып. 6, с. 970—973. —
3. Gadd G., White C. — J. General Microbiol. 1987, 133, p. 727—737. —
4. Gwerner C., Witting H., Glombitza L. — Acta Biotechnol., 1986, 4, p. 339—343. —
5. Norris P. — Develop. Microbiol., 1979, 20, p. 299—316. —
6. Suelter C. — Handbook of Microbiol., 1973, p. 811—818.

Статья поступила 6 октября 1989 г.

SUMMARY

It has been found that yeast *T. famata* are much more resistant to high concentration of Co^{2+} in nutrient medium than *S. utilis*. Both are able to accumulate great amounts of cobalt, however, relative content of this element in *T. famata* cells is 3—5 times lower than in *S. utilis* under adequate conditions of growth. With rather low concentrations of Co^{2+} in the medium (up to 10 mg/l) its main portion (75—77 %) is connected with soluble proteins of a yeast cell, while with high concentrations (100 mg/l) in *T. famata* it is connected with cell walls. It is supposed that the wall of *T. famata* considerably ensures the resistance of this species to cobalt.