

ОЦІНКА ТОКСИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ *EREMOTHECIUM ASHBYI* НА МОДЕЛЬНОМУ ОРГАНІЗМІ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Шопова З.С.¹, Орлова В.О.², Проценко О.В.², Поліщук В.Ю.¹

¹КПІ імені Ігоря Сікорського, polischukvu@gmail.com

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Abstract

In this article, the ability of the culture filtrate of Eremothecium ashbyi and the mycelium of E. ashbyi to exert a toxic effect on adults and individuals that have undergone a full development cycle (from egg to adult) of the model organism Drosophila melanogaster was evaluated. The absence of a toxic effect was shown.

Keywords: *Eremothecium ashbyi, riboflavin, toxicity, Drosophila melanogaster.*

Вступ. Рибофлавін є одним з найбільш широко розповсюджених вітамінів. Він міститься у всіх тваринних та рослинних клітинах, але лише деякі продукти є багатими джерелами даного вітаміну. Тому пошук його додаткових джерел в харчуванні є актуальним. Комерційне ферментативне виробництво рибофлавіну природним чином здійснюється флавіногенними аскоміцетами, такими як *Eremothecium ashbyi*. Мікроорганізми накопичують вітамін В₂ наприкінці фази росту у міцелії, надаючи їй яскраво-жовтого забарвлення [1]. *E. ashbyi* характеризується біосинтезом флавінаденіндинуклеотиду [1], що робить даний штам конкурентоспроможним на ринку фармацевтичної продукції [2].

Drosophila вже давно оцінюється як універсальний та потужний модельний об'єкт через її легкість у використанні та низьку вартість обслуговування в лабораторії. Дрозофіла є зручним об'єктом для токсикологічних досліджень завдяки її генетичній вивченості, короткому життєвому циклу та простоті утримання. Прозорість ембріонів дозволяє легко спостерігати за розвитком, а добре розвинені генетичні інструменти допомагають вивчати механізми токсичності [3, 4]. Введення досліджуваної речовини шляхом годування личинок і дорослих особин є кращим методом у плануванні токсикологічного аналізу [4].

Метою нашої роботи було дослідити чи має продуцент рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* та його метаболіти токсичний вплив на модельний організм *Drosophila melanogaster*.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження був аскоміцет, природний продуцент рибофлавіну *Eremothecium ashbyi*. Підтримуючим середовищем для *E. ashbyi* є середовище ГПДа: глюкоза 10 г/дм³, пептон 3 г/дм³, дріжджовий екстракт 5 г/дм³, агар 20 г/дм³. З метою отримання штамів, стійких до антиметаболіту ізоцитратліази – ітаконату [5], до ГПДа додавали ітаконову кислоту у концентраціях 50мМ, 75 мМ та 100мМ. рН доводили до значення 6,0 додаванням 50 %-го розчину NaOH. Культивування проводили протягом 7 діб у термостаті при температурі 28 °С, відбирали колонії, які мали найбільш інтенсивне жовте забарвлення.

Ізоляти, позначені як 50/0, 75/0, 100/0 оброблені ітаконатом один раз, 50/50, 75/75, 100/100 – повторно оброблені ітаконатом. Для визначення рівня біосинтезу рибофлавіну, здійснювали глибинне культивування отриманих ізолятів на

рідкому ГПД середовищі. Дослідження рівня накопичення рибофлавіну проводилось спектрофотометричним методом.

Нами було оцінено дію продуценту рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* на дорослих особин та на особин, які пройшли повний цикл розвитку (від яйця до імаго) *Drosophila melanogaster*, на середовищі з додаванням культуральної рідини *E. ashbyi*. Для цього до 5 см³ стандартного поживного середовища (вода 1 дм³, агар-агар 6 г, цукор 50 г, дріжджі пресовані 80 г, манна крупа 50 г) [6] додавали по 1 мл або фільтрату культуральної рідини, або культуральної рідини з міцелієм *E. ashbyi*, проби відрізнялись концентрацією рибофлавіну. Назва проби та відповідна концентрація рибофлавіну приведені в таблиці 1. В якості контролю використовували стандартне поживне середовище, до якого додавали 1 мл дистильованої води.

Таблиця 1. Кількість рибофлавіну, що продукується ізолятами, отриманими при культивуванні на середовищах з ітаконатом.

Варіант досліджу	Концентрація рибофлавіну, мг/дм ³
контроль	0
50/0	17,15
75/0	23,95
100/0	19,23
50/50	22,02
75/75	39,45
100/100	30,15

Всі досліди проводили у трьох повторностях. На досліджуване середовище висаджували по п'ять самок та по п'ять самців *Drosophila melanogaster*. Культивування мух проводили протягом 7 діб при оптимальній температурі 20-25 °С, спостерігали потенційну загибель мух. Після семи днів спостережень мух забирали з середовища і далі аналізували кількість потомків першого покоління (F1). Оцінка різниці середніх показників у вибірках проводилась методом Манна-Уїтні.

Результати та обговорення. В результаті при дослідженні виживаності дорослих особин *Drosophila melanogaster* на середовищі з *E. ashbyi* для всіх варіантів досліджу загибель імаго склала в середньому по 1 або 2 мухи, що пояснюється випадковими чинниками, і не відрізняється від результатів, отриманих у контрольному досліді. Отримані результати свідчать про відсутність токсичної дії *E. ashbyi* та метаболітів культуральної рідини на дорослих особин дрозофіл. На наступному етапі досліджень дорослі особини були вилучені з культуральних ємностей та було проведено оцінку кількості нащадків першого покоління (F1) (рис. 1).

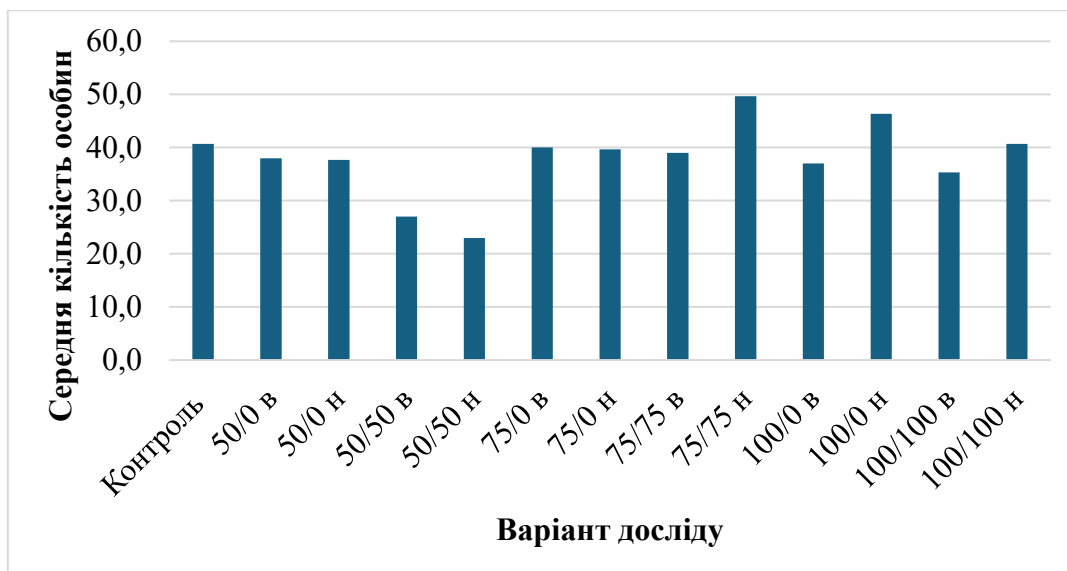


Рис. 1. Середня кількість особин першого покоління мух, які розвинулись на середовищі з різними дослідними пробами (в - додавали фільтрат культуральної рідини; н - додавали культуральну рідину з міцелієм *E. ashbyi*).

Отримані середні значення кількості особин першого покоління (F1) порівнювались попарно з контрольними значеннями. В результаті при жодному варіанті досліду, не було відмічено статистично достовірних відмінностей від контрольних значень, що свідчить про відсутність токсичної дії культуральної рідини *E. ashbyi*, що містила рибофлавін.

Висновки. В результаті проведених досліджень показано відсутність токсичної дії культуральної рідини *Ermothecium ashbyi* з вмістом рибофлавіну в діапазоні концентрацій від 4,4 мг/дм³ до 7,6 мг/дм³ на модельний організм *Drosophila melanogaster*. Встановлено, що токсична дія відсутня як та дорослі особини, так і на особини, які пройшли повний цикл розвитку.

Список використаної літератури:

1. Kalingan A. E., Liao C.-M. Influence of type and concentration of flavinogenic factors on production of riboflavin by *Ermothecium ashbyi* NRRL 1363. *Bioresource Technology*. 2002. Vol. 82, no. 3, P. 219–224. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00194-8](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00194-8).
2. Abbas C. A., Sibirny A. A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011. Vol. 75, no. 2. P. 321– 360. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00030-10>.
3. Huang J., Lee Y. The power of *Drosophila* genetics in studying insect toxicology and chemical ecology. *Crop Health*. 2023. Vol. 1, no. 12. <https://doi.org/10.1007/s44297-023-00012-x>.
4. Rand M.D., Tennessen J.M., Mackay T.F.C., Anholt R.R.H. Perspectives on the *Drosophila melanogaster* model for advances in toxicological science. *Curr Protoc*. 2023. Vol. 3, no. 8. e870. <https://doi.org/10.1002/cpz1.870>.
5. Kanamasa, S., Tajima, S., & Park, E. Y. Isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase are essential enzymes for riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2007. Vol. 12, no. 2, P. 92–99. URL: <https://doi.org/10.1007/bf03028632>.
6. *Drosophila*. Methods and protocols/ Ed. by Christian Dahmann. Humana Press, 2008. 437 p.