

Влияние пестицидов на морфологию дрожжевой клетки в процессе брожения плодового сусла

Г. Ю. Белослюдова¹, А. Л. Панасюк^{1,2}

¹ Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г.Разумовского (Первый Казачий университет), Москва, Россия

² ВНИИ пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности – филиал ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

Корреспонденция:

Белослюдова Галина Юрьевна,
Московский Государственный университет технологий и управления им.К.Г.Разумовского (Первый Казачий университет), 109004, Россия, Москва, ул. Земляной Вал, 73
E-mail: beloslyudova@bk.ru

Конфликт интересов:

авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 06.05.2024

Поступила после

рецензирования: 19.11.2024

Принята: 29.11.2024

Copyright: © 2024 Авторы

АННОТАЦИЯ

Введение. При производстве плодовых материалов используют плоды и ягоды, которые могут быть загрязнены пестицидами, негативно влияющими не только на качество и безопасность готовой продукции, а также на технологический процесс получения. Таким образом, обеспечение безопасности плодовых материалов и плодовых вин из них является важной задачей производителя.

Цель. Изучить влияние фосфорорганических пестицидов в ходе процесса брожения плодового материала на морфологию и физиологическую активность дрожжевой клетки.

Материалы и методы. Объектами исследования были выбраны пестициды диметоат, пиримифос-метил, малатион, представляющие собой чистые растворы, а также дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* расы Яблочная 7, выращенные в лаборатории. В качестве среды исследования было выбрано яблочный материал, полученное из свежих яблок.

Результаты. Результаты исследования показывают, что при наличии пестицидов в среде дрожжевая клетка способна отвечать путем изменения морфологии дрожжевой клетки. При этом выявлено, что структурные изменения в клетке зависят от вида действующего пестицида. Обнаружено различие в сорбционной способности дрожжевой клетки в зависимости от используемого пестицида.

Выводы. Полученные данные можно использовать при производстве плодовых материалов и вин.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

пестициды, изменение структуры дрожжевой клетки, плодовый материал, адсорбция, электронно-микроскопические исследования.



Для цитирования: Белослюдова Г.Ю., & Панасюк А.Л. (2024). Влияние пестицидов на морфологию дрожжевой клетки в процессе брожения плодового сусла. *Health, Food & Biotechnology*, 6(3), 35–41. <https://doi.org/10.36107/hfb.2024.i3.s215>

<https://doi.org/10.36107/hfb.2024.i3.s215>

Influence of Pesticides on the Morphology of Yeast Cells During the Fermentation of Fruit Must

Galina Yu. Beloslyudova¹, Alexander L. Panasyuk^{1,2}

¹ K.G. Razumovsky Moscow State University of Technologies and Management (the First Cossack University), Moscow, Russia

² All-Russian Scientific Research Institute of Brewing, Beverage and Wine Industry, Moscow, Russia

Correspondence:

Galina Yu. Beloslyudova,
K.G. Razumovsky Moscow State University of Technologies and Management (the First Cossack University),
73 Zemlyanoy Val street, Moscow, 109004, Russia
E-mail: beloslyudova@bk.ru

Declaration of competing interest:
none declared.

Received: 06.05.2024

Received in revised form: 19.11.2024

Accepted: 29.11.2024

Copyright: © 2024 The Authors

ABSTRACT

Introduction. In the production of fruit materials, fruits and berries are used, which can be contaminated with pesticides, which negatively affect not only the quality and safety of finished products, but also the technological process of obtaining. Thus, ensuring the safety of fruit materials and fruit wines from them is an important task of the manufacturer.

Purpose. To study the effect of organophosphate pesticides during the fermentation process of fruit material on the morphology and physiological activity of the yeast cell.

Materials and Methods. The objects of the study were selected pesticides dimethoate, pyrimiphos-methyl, malathion, which are pure solutions, as well as yeast *Saccharomyces cerevisiae* of the Malic 7 race, grown in the laboratory. Apple material obtained from fresh apples was chosen as the research medium.

Results. The results of the study show that in the presence of pesticides in the environment, the yeast cell is able to respond by changing the morphology of the yeast

Conclusions. The obtained data can be used in the production of fruit materials and wines.

KEYWORDS

pesticides, changes in the structure of yeast cells, fruit material, adsorption, electron microscopic studies.



To cite: Beloslyudova, G. Yu., & Panasyuk, A.L. (2024). Influence of pesticides on the morphology of yeast cells during the fermentation of fruit must. *Health, Food & Biotechnology*, 6(3), 35–41. <https://doi.org/10.36107/hfb.2024.i3.s215>

ВВЕДЕНИЕ

Наличие пестицидов в плодах и ягодах, используемых для получения сброженных плодовых материалов и плодовых вин из них, может отрицательно влиять не только на здоровье потребителей, но также и на ход технологического процесса. Присутствие фосфорорганических пестицидов в плодах и ягодах, используемых для получения сброженных плодовых материалов, негативно влияет на процесс брожения и в конечном итоге ухудшает качество готового продукта.

В последние годы в литературе появились данные о возможности извлечения пестицидов из среды дрожжевыми клетками (Gallardo et al., 2012; Серова & Матросова, 2013), однако известно, что в процессе адсорбции пестицидов дрожжи снижают бродильную активность, что приводит к неполному сбраживанию сахаров и усилению образования нежелательных компонентов вина, например таких как летучие кислоты (Becerra et al., 2023). Тот факт, что дрожжи способны адсорбировать пестициды из среды, вызывает интерес, поскольку на определенных стадиях технологического процесса получения сброженных плодовых материалов содержание пестицидов может превышать допустимый уровень (Giacomini et al., 2023).

В исследованиях зарубежных коллег (Viviani-Nauer et al., 1997; Nishimura et al., 2002) обнаружена способность дрожжей адсорбировать или расщеплять определенные молекулы пестицидов, российские ученые также занимались вопросом адсорбции дрожжевой клеткой пестицидов (Панасюк и соавт., 2023; Ажогина и соавт., 1995), однако в этих исследованиях не затрагивалось изучение структурного изменения дрожжевой клетки. Таким образом, цель настоящего исследования заключается в изучении ответа дрожжевой клетки на присутствие в среде фосфорорганических пестицидов различного строения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Для исследования было использовано яблочное сусло, полученное путем прессования свежих яблок сорта Ред Делишес. Для сбраживания сусла использовали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* расы Яблочная 7. Предварительно в яблочное сусло вносили пестициды малатион до достижения содержания 2,02 мг/кг, диметоат — 2,33 мг/кг, пиримифос-метил — 1,97 мг/кг. Образцы

с содержанием пестицидов и контрольный образец отбирали для подготовки к электронной микроскопии спустя 18, 36 и 72 часа после внесения дрожжевой разводки в яблочный сок.

Оборудование

Для проведения исследования использовали электронный микроскоп марки JEM-1400 (Япония), центрифуга лабораторная Liston C 2201 (Россия), электронно-цифровая камера Quemesa (Германия), ультрамикротом Reichert-Jung Ultracut E (США).

Методы и процедура исследования

Для электронно-микроскопических исследований суспензии дрожжевых клеток промывали для удаления культуральной среды и фиксировали 2,5 % раствором глутарового альдегида в 100 mM какодилате натрия в течение 40 минут, фиксированные образцы тщательно промывали какодилатом натрия и подвергли обработке литиказой в концентрации 45 единиц на мл в 1,4 M растворе сорбита с добавлением 20 mM триэтаноламина, 1 mM хлорида кальция и 10 mM дитиотреитола в течение 45 минут при 30 °C и осторожном перемешивании. Раствор для лизиса клеточной стенки удаляли центрифугированием в течение 5 минут и клетки несколько раз промывали какодилатом натрия перед последующей фиксацией 1 % тетроксидом осмия в какодилате натрия в течение 20 минут. Далее клетки обезвоживали в возрастающей концентрации этанола, включая пропитку уранилацетатом в 70 % этаноле в течение 40 минут. Переносили клетки в безводный ацетон и пропитывали смолой Эпон-812 путем обработки возрастающими концентрациями смолы в ацетоне. Образцы переносили в чистую смолу и инкубировали в течение 48 часов при 70°C. Фиксированные ячейки устанавливали на медные щелевые решетки, покрытые формваром. Ультратонкие срезы толщиной 80 нм готовили стеклянным ножом с использованием ультрамикротомата Reichert-Jung Ultracut E, затем срезы докрашивали 2 % водным раствором уранилацетата и цитратом свинца. Образцы исследовали и фотографировали с использованием электронного микроскопа JEM-1400 при напряжении 100 кВ, изображения были сняты цифровой камерой Quemesa.

Калибровку электронного микроскопа проводили с помощью стандартов в соответствии с ГОСТ Р 8.636–2007¹.

¹ ГОСТ Р 8.636–2007. Государственная система обеспечения единства измерений. Микроскопы электронные растровые. Методика калибровки

Статистическую значимость оценивали с использованием U-критерия Манна-Уитни с поправками Бонферрони для сравнений, количество экспериментов для каждого образца было проведено 5 раз. Полученные результаты сравнивали с контрольным образцом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При ультратонкой организации дрожжевых клеток, подвергнутых воздействию пестицидов, было установлено, что популяции состояли из деструктурированных клеток. К деструктурированным клеткам относили особи, которые имели нарушение целостности цитоплазматической мембраны и мембранных органоидов, отсутствие гранулированного рибонуклеопротеида, низкую плотность цитоплазмы, наличие в ней зон коагуляции, а также полностью разрушенные клетки. Деструкцию клеток рассматривали как показатель токсического эффекта пестицидов так же, как и Ибрагимова и Эмирова (2020) в своем исследовании. Воздействие пестицидов в яблочном сусле вызвало подавление дыхательной активности дрожжей, снижение синтеза белка, а также процесс размножения клеток приостановился. В исследовании Колосовой и Кишковской (2017) выявлена способность дрожжей адсорбировать пестициды, при этом останавливается бродильная активность, однако полученные нами данные свидетельствуют о том, что дрожжи способны адсорбировать не все пестициды.

Цитологические изменения дрожжевой клетки заключались в появлении в цитоплазме эндоцитозных включений, усилении гликогенеза, митохондриогенеза, мембраногенеза, дифференциации ядерного материала на нуклеоплазму и периферические зоны хроматина. Эндоцитозные включения представлены обособленными от цитоплазмы округлыми светлыми зонами с аморфным содержимым (Рисунок 1). Наиболее вероятно, что эндоцитоз начинался с образования щелевидных инвагинаций цитоплазматической мембраны, а в последующем около инвагинации формировалось светлое образование округлой формы, с содержимым, которое идентично материалу среднего слоя клеточной стенки (Slavikova & Vadkertiova, 2014). В большинстве включений была обнаружена округлая мембранная везикула, являющаяся производной инвагинации, в исследование Montes de Oca et al. (2016) предполагает образование мембранной везикулы вследствие ее отшнуровки, что также подтверждается в нашем исследовании.

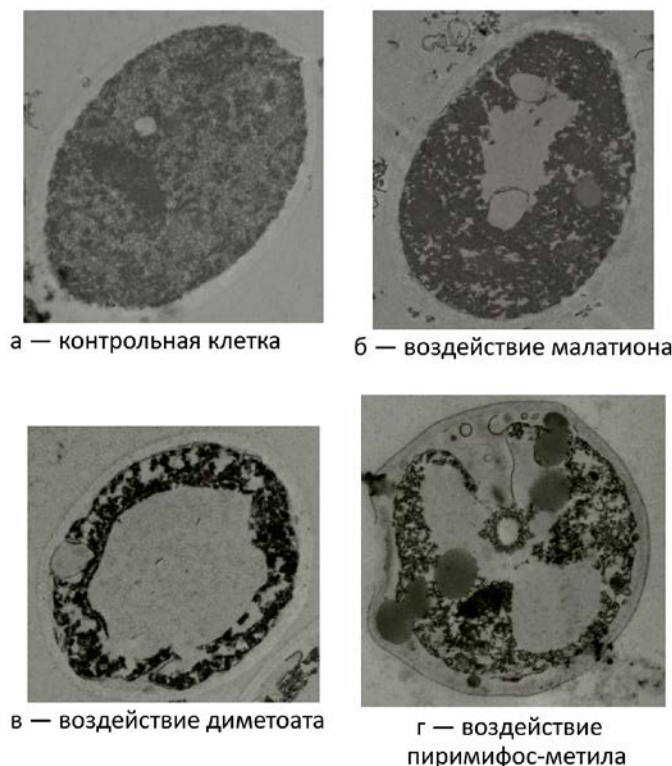
Последующая стадия эндоцитоза характеризовалась утратой морфологической связи включения с цитоплазматической мембраной. Включения были обнаружены в центре, вблизи или в контакте с вакуолями, что вероят-

Рисунок 1

Общий вид дрожжевых клеток в середине логарифмической фазы роста

Figure 1

General View of Yeast Cells in the Middle of the Logarithmic Growth Phase



нее отражает продвижение эндоцитированного содержимого к вакуолярному компартменту клетки. Таким образом, выявленные нами цитологические проявления эндоцитоза, а также усиление гликогенеза, характеризуют влияние пестицидов на морфологию дрожжевой клетки, что подтверждается исследованиями Steiner et al. (2024).

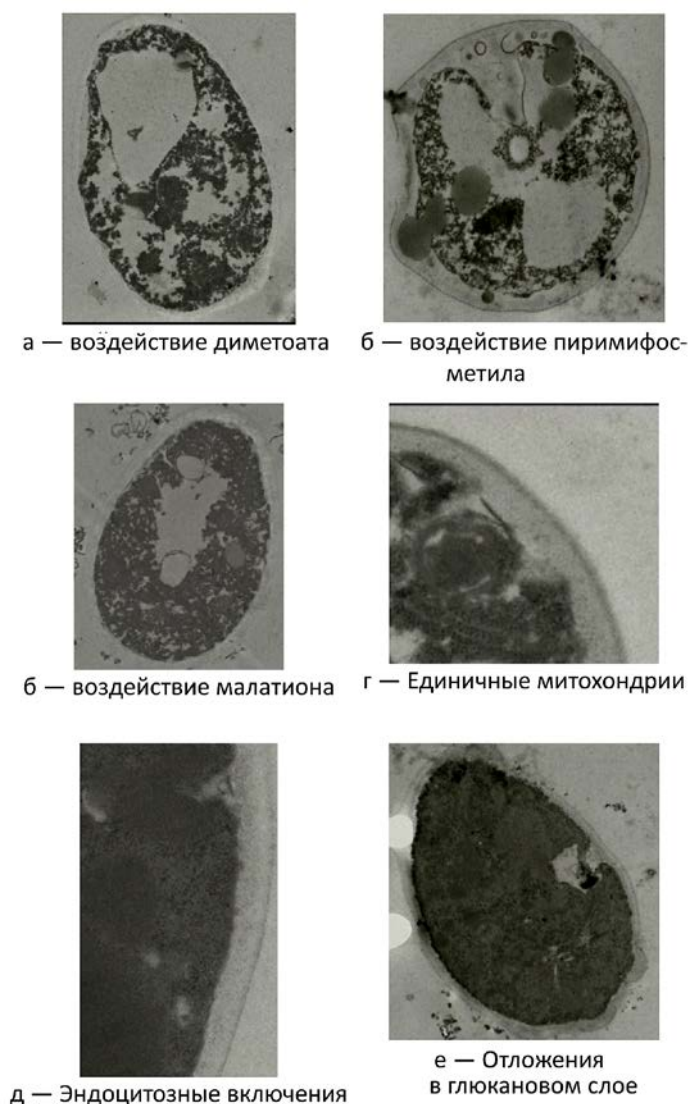
Другие изменения клетки, такие, как усиленное образование клеточных мембран, увеличение количества митохондрий, дифференцирование ядерного материала не рассматривались нами в качестве влияния пестицидов на дрожжевую клетку, поскольку эти изменения также характерны для клеток, в которых возрастает физиологическая активность.

Рисунок 2

Структурные перестройки дрожжевой клетке в результате воздействия пестицидов

Figure 2

Structural Rearrangements of Yeast Cell as a Result of Pesticide Exposure



Результаты воздействия фосфорорганических пестицидов на структуру дрожжевой клетки

Анализ ультраструктуры дрожжевой клетки, подвергнутой воздействию пестицидов диметоат и пиримифос-метила, позволил установить видимые отложения пестицидов в клеточной структуре большинства клеток (Рисунок 2). У отпочковавшихся клеток, на поверхности почечных шрамов и во внутреннем глюкановом слое, были обнаружены плотные отложения, вероятнее все-

го, представляющие собой, образовавшийся комплекс пестицидов с дрожжевой клеткой. В исследованиях Ажогиной и соавт. (1995) было выявлено, что пестициды могут связываться с липидами дрожжевой клетки, проведя исследование можно объяснить плотные отложения в глюкановом слое (Рисунок 2е) с образованием устойчивой коллоидной системы дрожжевой клетки и пестицида.

Влияние пестицида малатион на дрожжевую клетку различалось в структурных особенностях эндоцитоза, а именно наименьшее по содержанию и количеству эндоцитозных включений, при этом включения обладали наименьшими размерами. Морфология интактных клеток также, как и в среде с пестицидами диметоат и пиримифос-метил, характеризовалось высоким содержанием рибосомального компонента, однако, в цитоплазме дрожжевой клетки из среды с пестицидом малатион, отсутствовал гликоген, обнаружено большее количество митохондрий, обладающих конденсированными формами (Панасюк и соавт., 2000).

В среде с малатионом в клетках мембранообразующая способность выражена сильнее, чем в среде с диметоатом и пиримифос-метилом, инвагинации цитоплазматической мембраны обладали значительной протяженностью в глубину цитоплазмы, а эндоплазматический ретикулум дрожжевой клетки был более развит. Таким образом, можно сделать вывод, что усиление мембраногенеза и митохондрогенеза, дифференцирование ядра, а также высокое содержание рибонуклеопротеида, выражают повышение адсорбционной активности дрожжевой клетки. При наличии клеток с признаками деструкции обнаружена высокая сорбция пестицида малатион. Предположительно основополагающую роль в сорбции малатиона выполняют биополимеры клеточных стенок дрожжевой клетки, что подтверждается увеличением электронно-оптической плотности клеточных стенок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные данные показывают, что воздействие на дрожжевую клетку разных по строению фосфорорганических пестицидов неодинаково, что приводит к различным изменениям в морфологии дрожжевой клетки. Отличительные особенности изменения структуры дрожжевой клетки относительно контрольных, отображают различные функциональные нагрузки клеток, как для осуществления эндоцитоза, так и для защитных механизмов дрожжевой клетки. Наличие клеток с признаками деструкции является следствием токсического воздействия пестицидов на дрожжевую клетку. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что диметоат и пиримифос-метил незначитель-

но удаляется из среды, при этом содержание малатиона в сброженном плодном материале находится в допустимых пределах, что связано вероятнее всего со структурой пестицида, а также с избирательной сорбционной способностью дрожжей.

Данные проведенной работы свидетельствуют о необходимости разработки новых технологических приемов в виноделии для снижения остаточного содержания пестицидов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Белослюдова Г.Ю.: разработка методологии исследования, проведение исследовательского процесса, подготовка и создание черновика рукописи

Панасюк А.Л.: концептуализация, разработка методологии исследования, надзор и руководство за планированием и выполнением исследовательской деятельности, подготовка и создание рукописи, ее комментирование

AUTHORS CONTRIBUTION STATEMENT

Galina Yu. Beloslyudova: methodology; investigation; writing – original draft preparation; writing – review & editing

Alexander L. Panasyuk: conceptualization; investigation; project administrations; writing – review & editing

ЛИТЕРАТУРА

- Ажогина, В. Л., Агеева, И. М., Гугучкина, Т. И. (1995). Трансформация липидного комплекса сусел и вин под действием пестицидов. *Известия вузов. Пищевая технология*, (5–6), 26–27.
- Azhogina, V. L., Ageeva, I. M., Guguchkina, T. I. (1995). Transformation of the lipid complex of musts and wines under the influence of pesticides. *Izvestiya vuzov. Food Technology*, (5–6), 26–27. (In Russ.)
- Ибрагимова, Э. Э., & Эмирова, Д. Э. (2020). Оценка экотоксического действия различных концентраций раундапа на *Saccharomyces cerevisiae*. *Экосистемы*, (23), 111–117.
- Ibragimova, E. E., & Emirova, D. E. (2020). Assessment of ecotoxic action of various roundup concentrations on *Saccharomyces cerevisiae*. *Ekosistemy*, (23), 111–117. (In Russ.)
- Колосова, А. А., & Кишковская, С. А. (2017). Влияние пестицидов на длительность забраживания виноградного сусла. *Магарач. Виноградарство и виноделие*, (1), 34–36.
- Kolosova, A. A., & Kishkovskaya, S. A. (2017). The influence of pesticides on the duration of fermentation of grapes must. *Magarach. Viticulture and winemaking*, (1), 34–36. (In Russ.)
- Панасюк, А. Л., Клепиков, Д. В., & Белослюдова, Г. Ю. (2023). Снижение содержания остаточных количеств некоторых пестицидов в плодовых сброженных материалах. *Пиво и напитки*, (3), 33–37. <https://doi.org/10.52653/PIN.2023.03.03.006>
- Panasyuk, A. L., Klepikov, D. V., & Beloslyudova, G. Yu. (2023). Reduction of residual amounts of some pesticides in fruit fermented materials. *Beer and Beverages*, (3), 33–37. <https://doi.org/10.52653/PIN.2023.03.03.006> (In Russ.)
- Панасюк, А. Л., Кузьмина, Е. И., Харламова, Л. Н., & Лиле, М. В. (2000). Изучение морфологических особенностей клеток винных дрожжей при воздействии пестицидов. В *Пищевая промышленность на рубеже третьего тысячелетия*, 2(5), (с. 188). МГТА.
- Panasyuk, A. L., Kuzmina, E. I., Kharlamova, L. N., & Lilye, M. V. (2000). Study of morphological features of wine yeast cells under the influence of pesticides. In *Food industry at the turn of the third millennium*, 2(5), (p. 188). MGTA (In Russ.)
- Серова, Ю. В., & Матросова, Л. Е. (2013). Биodeградирующая способность микроорганизмов в отношении тетраметилтиурамдисульфида. *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*, (3 (19)), 37–38.
- Serova, Yu. V., & Matrosova, L. E. (2013). Biodegradation capacity of microorganisms in relation to tetramethylthiuram disulfide. *Actual Questions of Veterinary Biology*, (3 (19)), 37–38. (In Russ.)
- Becerra, K., Ghosh, S., & Godoy, L. (2023). Pesticide and yeast interaction in alcoholic fermentation: A mini-review. *Fermentation*, (9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/fermentation9030266>
- Gallardo, G., Martín, A., Hernández, A., Pérez-Nevado, F., Casquete, R., & Córdoba, M. G. (2012). Role of yeast in the persistence of pesticides during the fermentation of vegetable products. In *Microbes in Applied Research*, (pp. 304–307). https://doi.org/10.1142/9789814405041_0061
- Giacomini, R., Acosta, E., Cerqueira, M., Primel, E., & Garda-Buffon, J. (2023). Alcoholic fermentation as a strategy to mitigate pesticides and mycotoxins. *Food and Bioprocess Technology*, (16), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03070-9>

- Montes de Oca, R., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Monroy, H., Perez, L.S., Zamora, L.J. & Gutierrez, A. (2016) Yeast: Description and structure. In: Salem, A.Z.M., Kholif, A.E. & Puniya, A.K. (eds.) *Yeast additive and animal production*. PubBioMed Central Research Publishing Services, pp. 4–13.
- Nishimura, K., Yamamoto, M., Nakagoni, T., Taki- Guchi, Y., Naganuma, T., & Usuka, Y. (2001). Biodegradation of triazine herbicides on polyvinylalcohol gel plates by the soil yeast *Lipomyces starkeyi*. *Applied Microbiology and Botechnology*, 58, 848–852.
- Sláviková, E., & Vadkertiová, R. (2003). Effects of pesticides on yeasts isolated from agricultural soil. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 58(11–12), 855–859. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-11-1220>
- Steiner, M., Falquet, L., Fragnière, A.-L., Brown, A., & Bacher, S. (2024). Effects of pesticides on soil bacterial, fungal and protist communities, soil functions and grape quality in vineyards. *Ecological Solutions and Evidence*, 5, e12327. <https://doi.org/10.1002/2688-8319.12327>
- Viviani-Nauer A., Hoffman-Boller, P., & Gafner, J. (1997). In vitro degradation of phthalimide in aqueous solutions and in yeast suspensions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 63–66.