

Vera Pavlović^{1*}, Danka Radić², Vera Karličić²,
Blažo Lalević², Steva Lević², Vera Raičević²

¹Univerzitet u Beogradu, Mašinski fakultet, Beograd, Srbija,

²Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija

Naučni rad

ISSN 0351-9465, E-ISSN 2466-2585

UDC:631.466

doi: 10.5937/ZasMat1603455P



Zastita Materijala 57 (3)

455 - 459 (2016)

Raman spektroskopija i determinacija zemljišnih kvasaca

IZVOD

U ovom radu su Raman spektroskopijom ispitivana dva izolata kvasaca iz roda *Candida*. Izolacija kvasaca je izvršena iz zemljišta uzetog iz gradskog parka u Tivtu (Crna Gora) i sa oglednog dobra Radmilovac (Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija), metodom nakupljanja. Dobijene čiste kulture kvasaca identifikovane su primenom API AUX 20C sistema (bioMerieux-Vitek). Konstatovano je prisustvo vrsta *Candida guilliermondii* i *Candida utilis*. Analizirani su Raman spektri koji potiču od lipida, amida, proteina, ugljenih hidrata, aromatičnih aminokiselina i nukleotidnih baza, u širokoj oblasti talasnih brojeva, od 500 do 3200 cm^{-1} . Utvrđeno je da su kod kvasca *Candida guilliermondii* pikovi koji odgovaraju frakciji lipida bitno izraženiji nego kod *Candida utilis*, što može predstavljati specifičan odgovor date vrste kvasca na stres.

Ključne reči: Raman spektri, kvasci, lipidi, proteini, amidi, aromatične aminokiseline.

1. UVOD

Zemljište predstavlja složen i dinamičan biološki sistem, u kome brojne mikrobne populacije doprinose biodiverzitetu. Mikroorganizmi su od ključnog značaja za održavanje funkcije zemljišta u prirodnim i agroekosistemima, zbog njihove uloge u procesima razlaganja organske materije, uklanjanja toksičnih jedinjenja, kruženja ugljenika, azota, fosfora i sumpora [1]. Pored toga, mikroorganizmi imaju značajnu ulogu u suzbijanju biljnih bolesti i u stimulaciji rasta biljaka [2].

Poslednjih godina sve veću pažnju privlače zemljišni kvasci, koji imaju značajnu ulogu u ekološkim i antropogenim procesima. Kvasci predstavljaju važne eukariotne mikroorganizme u mnogim ekosistemima i značajno doprinose opštem biodiverzitetu [3]. Poznato je da zemljišni kvasci učestvuju u formiranju mehaničke strukture zemljišta, da predstavljaju izvor hrane za ostale zemljišne mikroorganizme, kao i da učestvuju u kruženju materije u zemljištu [4]. U zemljištu su najzastupljeniji kvasci iz rodova: *Candida*, *Cryptococcus*,

Debaryomyces, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizoblastosporion*, *Sporobolomyces*, *Torulasporea*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Kluyveromyces* i *Zygosaccharomyces* [5]. Kvasci koji žive slobodno u zemljištu utiču na rast biljaka, odnosno mogu se smatrati stimulatorima biljnog rasta (PGPs) kroz mobilisanje hranljivih materija [6], kao i kroz kontrolu ili inhibiciju patogenih agenasa [7], proizvodnju brojnih regulatora rasta biljaka [8], produkciju siderofora [9] itd. Kvasci, kao i ostali mikroorganizmi, imaju značajnu ulogu u procesima kruženja fosfora, azota i sumpora [10]. Zemljišni kvasci iz rodova *Candida*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* i *Williopsis* sposobni su da nerastvorljiv oblik fosfata prevode u rastvorljiv oblik u uslovima in vitro [11].

Praćenje aktivnosti zemljišnih mikroorganizama se uglavnom bazira na primeni konvencionalnih mikrobioloških metoda, koje često zahtevaju značajnu potrošnju materijala i veliki utrošak vremena. Raman spektroskopija je od nedavno veoma zastupljena metoda u savremenom pristupu biohemijskoj karakterizaciji, koja obezbeđuje brzu i preciznu klasifikaciju velikog broja prokariotskih i eukariotskih mikroorganizama [12]. Raman spektri mikroorganizama su značajni i za procenu promene sastava mikroorganizama pod uticajem spoljašnjih faktora, jer oslikavaju vibracije biohemijskih komponenata unutar ćelije, kao što su: proteini,

*Autor za korespondenciju: Vera Pavlović

E-mail: vpavlovic@mas.bg.ac.rs

Rad primljen: 10.04.2016.

Rad prihvaćen: 11.05.2016.

Rad je dostupan na sajtu: www.idk.org.rs/casopis

DNK, RNK, lipidi, ugljeni hidrati, voda i druge komponente prisutne u manjim koncentracijama [13].

Imajući u vidu značaj zemljišnih kvasaca, cilj ovog rada je bio sagledavanje mogućnosti primene Raman spektroskopije u njihovoj biohemijskoj karakterizaciji. Odabrani sojevi kvasaca su izolovani i identifikovani konvencionalnim mikrobiološkim metodama, a paralelno je izvršena i analiza ćelija kvasaca metodom Raman spektroskopije.

2. MATERIJAL I METODE

Uzorki zemljišta su uzeti iz gradskog parka u Titvu (Crna Gora) i sa ogleđnog dobra Radmilovac (Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija).

Izolacija kvasaca je izvršena metodom nakupljanja na YPD (*engl.* yeast extract-peptone-dextrose) podlozi za uzgoj kvasaca (sa 1 % kvaščevog ekstrakta, 2 % peptona i 2 % dekstroze), na temperaturi od 28°C tokom 48h. Nakon inkubacije, za dalja istraživanja izabrane su morfološki različite kolonije, a višestrukim presejavanjem dobijene su čiste kulture kvasaca. Identifikacija čistih kultura kvasaca je izvršena primenom API AUX 20C sistema (bioMerieux-Vitek), a karakterizacija – pomoću Raman spektroskopije.

Pripremljeni uzorci čiste kulture kvasaca su snimani Raman mikroskopom XploRA (Horiba Jobin Yvon), na sobnoj temperaturi, u oblasti talasnih brojeva od 500 do 3200 cm^{-1} , primenom lasera talasne dužine od 532 nm, sa rešetkom od 1200 zarez po 1 mm. Merenje je vršeno sa korakom od 3 cm^{-1} . Dijametar snopa na uzorku je iznosio ~1 μm , dok je ukupno vreme snimanja po ćeliji bilo 20 s.

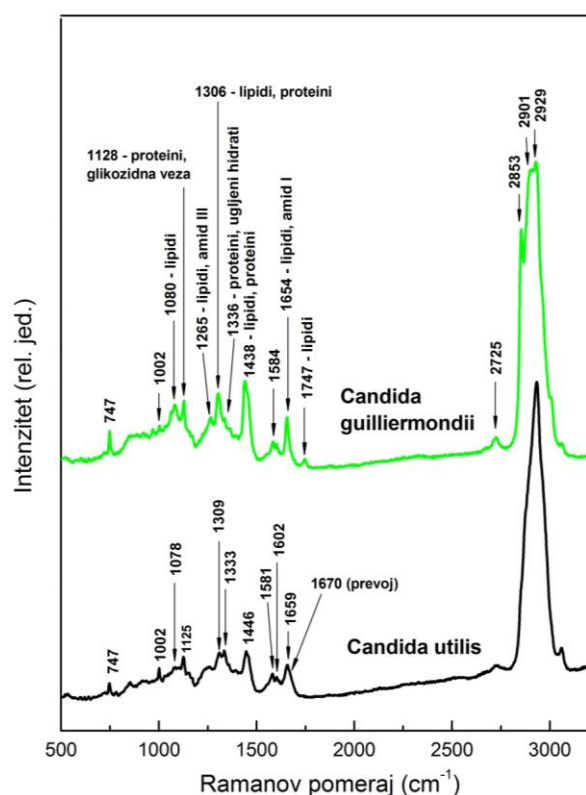
3. REZULTATI I DISKUSIJA

Primenom API AUX 20C sistema (bioMerieux-Vitek) izolovani kvasci su identifikovani kao *Candida guilliermondii* (*C. guilliermondii*) i *Candida utilis* (*C. utilis*).

Analizom Raman spektara prikazanih na slici 1, primećeno je da su kod kvasca *C. guilliermondii*, pikovi koji odgovaraju frakciji lipida bitno izraženiji, nego kod kvasca *C. utilis*. To se najpre može zaključiti na osnovu oblasti talasnih brojeva iznad 1700 cm^{-1} . Naime, u spektrima kvasca *C. utilis* se uopšte ne zapaža pik u oblasti oko 1747 cm^{-1} , koji je karakterističan za frakciju lipida, a potiče od C=O istežućih vibracija [14–17], dok je taj pik primetan kod *C. guilliermondii*. Takođe, u oblasti od 2800 do 3100 cm^{-1} , koja u opštem slučaju odgovara C–H istežućim vibracijama lipida i proteina [17–19], u spektru kvasca *C. guilliermondii* se zapaža složeni pik sastavljen od više Raman linija, koji pokazuje oblik karakterističan za dominantan odziv frakcije lipida [17, 19], dok kod kvasca *C. utilis* nema nikakvih naznaka diferencijacije ovog pika na pojedine Raman mode. Pik na ~ 2725 cm^{-1} , za koji

se iz literaturnih podataka može zaključiti da takođe karakteriše lipide [17], prisutan je kod oba kvasca, ali je izraženiji kod *C. guilliermondii*. Pored toga, pri prelasku sa spektra *C. utilis* na spektar *C. guilliermondii*, zapaža se i znatan porast u intenzitetu pika na ~ 1078–1080 cm^{-1} , koji se takođe primarno može pripisati frakciji lipida (C–C istežućim vibracijama) [17, 20], uz manji doprinos C–N istežućih vibracija proteina [21].

Od ostalih pikova koji su uobičajeno prisutni u spektru lipida, ali nisu specifični samo za njih, primećeni su (sl. 1): 1) pik u oblasti 1250–1270 cm^{-1} (lipidna traka i tzv. amid III traka, pri čemu ova druga potiče prvenstveno od N–H savijajućih vibracija i C–N istežućih vibracija u amidnoj funkcionalnoj grupi [17–21]), 2) pik na 1306–1309 cm^{-1} (dominantno CH₂ savijajuća vibraciona moda lipida i u manjoj meri C–H deformaciona moda proteina [18, 21, 23]), kao i 3) pikovi na 1438–1446 cm^{-1} i 1654–1659 cm^{-1} , od kojih prvi potiče od lipida i proteina, a drugi od lipida i tzv. amid I trake [14–17, 22–25]. Pri tome je amid I traka uzrokovana dominantno C=O istežućim vibracijama u amidnoj funkcionalnoj grupi [18]. Svaki od ova četiri navedena pika je izraženiji kod kvasca *C. guilliermondii*.

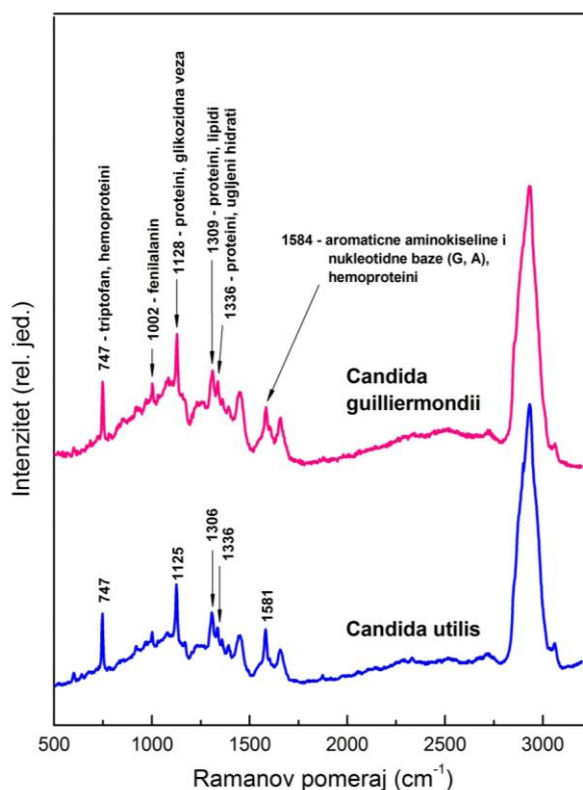


Slika 1 – Raman spektri kvasaca *Candida utilis* i *Candida guilliermondii*, na kojima dominiraju pikovi lipida

Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da je sadržaj lipida veći kod kvasca *C. guilliermondii*. Na povećani međusobni odnos sadržaja lipida i sadržaja proteina kod kvasca *C. guilliermondii*, u poređenju sa tim odnosom kod kvasca *C. utilis*, ukazuje i oblik pika na $\sim 1654 - 1659 \text{ cm}^{-1}$. Ovaj pik je u opštem slučaju asimetričan, jer njemu, pored trake lipida i amid I trake proteina α -spiralne strukture, čiji se maksimum javlja na pomenutim vrednostima talasnog broja [14, 17, 25, 26], daje doprinos i amid I traka proteina β sekundarne strukture na oko $1660-1670 \text{ cm}^{-1}$, u vidu prevoja [17–20, 23, 24]. Asimetričnost tog pika se u spektrima naših uzoraka faktički uočava samo kod kvasca *C. utilis* (sl. 1), dok je kod kvasca *C. guilliermondii* ovaj pik uži i dobija skoro simetričnu formu (efekat u vidu prevoja sa desne strane pomenutog pika se gubi), zbog pojačanog udela frakcije lipida u odnosu na frakciju proteina. Dodatno, u prilog promene sadržaja frakcije lipida u odnosu na sadržaj proteina i ugljenih hidrata, govori i promena relativnog intenziteta pika na $\sim 1306-1309 \text{ cm}^{-1}$ u odnosu na pik na $\sim 1333-1336 \text{ cm}^{-1}$ [14, 16–21]. Naime, kod kvasca *C. guilliermondii* je prvi pik (dominantan doprinos lipida) znatno veći od drugog, dok su kod kvasca *C. utilis* ova dva pika približno jednakog intenziteta (slika 1).

Promene u izgledu Raman spektara dve izabrane vrste kvasca se ne odnose samo na promene u sadržaju lipida, već i na promene u Raman odgovoru aromatičnih aminokiselina i nukleotidnih baza, što je prikazano na slici 2. Pik koji se u našim spektrima zapaža u oblasti oko $1581-1584 \text{ cm}^{-1}$ se u literaturi pripisuje vibracijama unutar aromatičnih aminokiselina i nukleotidnih baza (prvenstveno adenina i guanina) [16, 19]. Pored toga, pikovi na $\sim 747 \text{ cm}^{-1}$ i 1002 cm^{-1} se pripisuju primarno aromatičnim aminokiselinama triptofanu i fenilalaninu respektivno, kao i vibracijama pojedinih veza koje u proteinima grade neke komponente sa bočnim ostacima ovih aminokiselina [14, 16, 20]. Na slici 2 su prikazani spektri na kojima su ovi pikovi intenzivniji, nego što su oni to bili u spektru na slici 1 gde su dominirale trake lipida, što je posledica druge izabrane oblasti u okviru ćelije kvasca, tokom snimanja spektara.

Takođe, pik na $1125-1128 \text{ cm}^{-1}$, koji se najčešće pripisuje C–N istežućim modama proteina i C–O–C glikozidnoj vezi [16, 20, 21], je na slici 2 izražen kod oba kvasca, naročito u poređenju sa lipidnim pikom na $\sim 1078-1080 \text{ cm}^{-1}$ koji se na slici 2 faktički i ne zapaža, a i pik na $\sim 1333-1336 \text{ cm}^{-1}$ (C–H deformacione mode u proteinima i mode ugljenih hidrata kao što je glikogen) je kod kvasca *C. guilliermondii* bitno izraženiji nego što je bio u spektru lipida.



Slika 2 – Raman spektri kvasca *Candida utilis* i *Candida guilliermondii*, na kojima dominiraju pikovi aromatičnih aminokiselina i nukleotidnih baza, proteina i ugljenih hidrata

Prilikom poređenja spektara kvasca *C. utilis* i *C. guilliermondii*, na osnovu slike 2 se može konstatovati da je relativni intenzitet pika u oblasti $1581-1584 \text{ cm}^{-1}$, posmatrano u odnosu na njegove susedne pikove, izraženiji kod kvasca *C. utilis*, što najverovatnije ukazuje na nešto veći sadržaj nukleotidnih baza adenina i guanina, jer nema porasta linije triptofana na 747 cm^{-1} i fenilalanina na 1002 cm^{-1} . Iako pikovima na $\sim 747 \text{ cm}^{-1}$, $1306-1309 \text{ cm}^{-1}$, $1125-1128 \text{ cm}^{-1}$ i $1581-1584 \text{ cm}^{-1}$ u opštem slučaju mogu dati doprinos i linije hemoproteina [18, 27], veća izraženost poslednjeg navedenog pika kod *C. utilis* verovatno nije posledica većeg udela hemoproteina, jer intenzitet prva tri navedena pika nije povećan.

4. ZAKLJUČAK

Imajući u vidu raznovrsnost zemljišnih kvasaca i različitu funkciju u ekosistemu (snabdevanje biljaka azotom i fosforom, transformacija organske materije, razvijanje antagonističkog odnosa prema nekim fitopatogenim gljivama, itd.), može se pretpostaviti da kvasci predstavljaju potencijal i za primenu u održivoj poljoprivredi. Stoga je za potpunije razumevanje uloge i značaja kvasaca u

zemljištu, pored konvencionalnih metoda neophodno koristiti i nove metode biohemijske karakterizacije kvasaca, poput Raman spektroskopije. U ovom radu su razmatrani Raman spektri dve vrste kvasaca: *C. guilliermondii* i *C. utilis*. Analizirane su trake koje potiču od lipida, amida, proteina, ugljenih hidrata, aromatičnih aminokiselina i nukleotidnih baza, u širokoj oblasti talasnih brojeva, od 500 do 3200 cm^{-1} . Konstatovano je da su kod *C. guilliermondii* pikovi koji odgovaraju frakciji lipida bitno izraženiji nego kod kvasca *C. utilis*, što može predstavljati specifičan odgovor date vrste kvasca na stres. Dalja istraživanja na ovom polju će se upravo odnositi na ispitivanje odgovora pojedinih vrsta mikroorganizama na različite zagađivače sredine (teške metale i organske zagađivače).

Zahvalnost

Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u okviru naučno-istraživačkih projekata OI 172057 i TR 31080.

5. LITERATURA

- [1] J.D. Van Elsas, V.Torsvik, A.Hartmann, L.Ovreas, J.Jansson (2006) The bacteria and archaea in soil, book: Modern Soil Microbiology (Second Edition), eds J. D. Van Elsas, J. K. Jansson, J. T. Trevors, CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 83–106.
- [2] P.Garbeva, J.A. van Veen, J.D. van Elsas (2004) Microbial diversity in soil: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness, Annual Review of Phytopathology, 42, 243–70.
- [3] G.H.Fleet (1998) Yeasts in natural habitats, Food Technology and Biotechnology, 36, 285–289.
- [4] A.Botha (2011) The importance and ecology of yeasts in soil, Soil Biology and Biochemistry, 43 (1), 1–8.
- [5] K.A.El-Tarabily, K.Sivasithamparam (2006) Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters, Mycoscience, 47 (1), 25–35.
- [6] L.M.Alonso, D.Kleiner, E.Ortega (2008) Spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* host yeasts that solubilize phosphate and accumulate polyphosphates, Mycorrhiza, 18, 197–204.
- [7] G.Sansone, I.Rezza, V.Calvente, D.Benuzzi, M.I.S. de Tosetti (2005) Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts, Postharvest Biology and Technology, 35, 245–251.
- [8] A.H.Nassar, K.A.El-Tarabily, K.Sivasithamparam (2005) Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots, Biology and Fertility of Soils, 42, 97–108.
- [9] K.Amprayn, M.T.Rose, M.Kecskés, L.Pereg, H.T.Nguyen, I.R.Kennedy (2012) Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth, Applied Soil Ecology, 61, 295–299.
- [10] A.M.Al-Falih, M.Wainwright (1995) Nitrification, S-oxidation and P-solubilization by the soil yeast *Williopsis californica* and by *Saccharomyces cerevisiae*, Mycological Research, 99 (2), 200–204.
- [11] A.M.Al-Falih (2005) Phosphate solubilization in vitro by some soil yeasts, Qatar University Science Journal, 25, 119–125.
- [12] K.M.Hamasha (2011) Raman spectroscopy for the microbiological characterization and identification of medically relevant bacteria, Dissertation, Wayne State University, Detroit, Michigan
- [13] P.Rösch, S.Stöckel, S.Meisel, U.Münchberg, S.Kloß, D.Kusic, W.Schumacher, J.Popp (2011) A Raman spectroscopic approach for the cultivation-free identification of microbes, Asia Communications and Photonics Conference and Exhibition 2011, Shanghai China, Proceedings of SPIE (Optical Society of America), p. 83111B.
- [14] Y.S.Huang, T.Karashima, M.Yamamoto, H.Hamaguchi (2005) Molecular-level investigation of the structure, transformation and bioactivity of single living fission yeast cells by time- and space-resolved Raman spectroscopy, Biochemistry, 44 (30), 10009–10019.
- [15] P.Rösch, M.Harz, M.Schmitt, J.Popp (2005) Raman spectroscopic identification of single yeast cells, Journal of Raman Spectroscopy, 36 (5), 377–379.
- [16] P.Rösch, M.Harz, K.D.Peschke, O.Ronneberger, H.Burkhardt, J.Popp (2006) Identification of single eukaryotic cells with micro-Raman spectroscopy, Biopolymers, 82 (4), 312–316.
- [17] L.Bednarova, J.Palacky, V.Bauerova, O.Hruskova-Heidingsfeldova, I.Pichova, P.Mojzes (2012) Raman Microspectroscopy of the Yeast Vacuoles, Spectroscopy: An International Journal, 27 (5-6), 503–507.
- [18] A.Rygula, K.Majzner, K.M.Marzec, A.Kaczor, M.Pilarczyka, M.Baranska (2013) Raman spectroscopy of proteins: a review, Journal of Raman Spectroscopy, 44, 1061–1076.
- [19] P.Serrano, A.Hermelink, P.Lasch, J.P. de Vera, N.König, O.Burckhardt, D.Wagner (2015) Confocal Raman microspectroscopy reveals a convergence of the chemical composition in methanogenic archaea from a Siberian permafrost-affected soil, FEMS Microbiology Ecology, 91 (12), fiv126.
- [20] O.Samek, K.Mlynariková, S.Bernatová, J.Ježek, V.Krzyžánek, M.Šiler, P.Zemánek, F.Růžička, V.Holá, M.Mahelová (2014) *Candida parapsilosis* Biofilm Identification by Raman Spectroscopy, International Journal of Molecular Sciences, 15 (12), 23924–23935.
- [21] T.K.Bhowmick, G.Pyrgiotakis, K.Finton, A.K.Suresh, S.G.Kane, B.Moudgil, J.R.Bellare (2008) A study of the effect of JB particles on *Saccharomyces cerevisiae* (yeast) cells by Raman spectroscopy, Journal of Raman Spectroscopy, 39 (12), 1859–1868.

- [22] Y.-S.Huang, T.Karashima, M.Yamamoto, T.Ogura, H.Hamaguchi (2004) Raman spectroscopic signature of life in a living yeast cell, *Journal of Raman Spectroscopy*, 35 (7), 525–526.
- [23] G.P.Singh, G.Volpe, C.Caitriona, M.Creely, H.Grötsch, I.M.Geli, D.Petrov (2006) The lag phase and G1 phase of a single yeast cell monitored by Raman microspectroscopy, *Journal of Raman Spectroscopy*, 37 (8), 858–864.
- [24] C.Xie, Y.Lia (2003) Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques, *J. Appl. Phys.*, 93 (5), 2982–2986.
- [25] C.Onogi, H.Torii, H.Hamaguchi (2009) Raman Spectra of Isotope-substituted Mitochondria of Living Budding Yeast Cells: Possible Origin of the “Raman Spectroscopic Signature of Life”, *Chemistry Letters*, 38 (9), 898–899.
- [26] H.Hamaguchi (2009) Developments of Raman Spectroscopy in the past 40 years: from a molecule to a living cell, *Current Science*, 97 (2), 186–191.
- [27] M.Z.Pacia, K.Turnau, M.Baranska, A.Kaczor (2015) Interplay between carotenoids, hemoproteins and the “life band” origin studied in vivo in *Rhodotorula mucilaginosa* cells by means of Raman microimaging, *Analyst*, 140, 1809–1813.

ABSTRACT

RAMAN SPECTROSCOPY AND DETERMINATION OF SOIL YEASTS

In this paper, two isolates of yeasts, members of the genus Candida, have been examined using Raman spectroscopy. The yeasts were isolated from soils sampled at the town park in Tivat (Montenegro) and experimental farm Radmilovac (Serbia), by the accumulation method. The pure cultures of yeasts were identified by the API 20C AUX system. The presence of Candida guilliermondii and Candida utilis was noted. The Raman spectra, originating from lipids, amides, proteins, carbohydrates, aromatic amino acids and the nucleotide bases, were analyzed in the wide range of the wave numbers from 500 to 3200 cm⁻¹. It was noticed that peaks which correspond to the lipid fraction were more pronounced in the case of Candida guilliermondii compared to Candida utilis. This may represent a specific response of the yeast species to stress conditions.

Keywords: Raman spectra, yeast, lipids, proteins, amides, aromatic amino acids.

Scientific paper

Paper received: 10. 04. 2016.

Paper accepted: 11. 05. 2016.

Paper is available on the website: www.idk.org.rs/journal