

Urszula Wachowska^{1*}, Anna Daria Stasiulewicz-Paluch¹

¹Katedra Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wpłynęło w maju 2015 r.
Zaakceptowano w lutym 2016 r.

1. Wstęp. 2. Drożdże. 3. Przydatność drożdży do oceny zanieczyszczeń środowiska. 3.1. Środki ochrony roślin w środowisku. 3.2. Biotesty w oparciu o hamowanie wzrostu. 3.3. Testy genotoksyczności. 3.4. Testy endokrynne. 4. Drożdże w toksykogenomice. 4.1. Zalety drożdży wykorzystywanych w toksykogenomice. 4.2. Narzędzia transkrypto-, proteo- i metabolomiczne stosowane w toksykogenomice drożdży. 4.3. Toksykogenomika funkcjonalna genów drożdży. 4.4. Toksykogenomika drożdży w ocenie zanieczyszczenia środowiska rolniczego. 5. Podsumowanie

Yeast as bioindicators of agricultural pollution

Abstract: This review paper discusses a new set of biotests used for toxicity assessment of plant protection products and their residues in agricultural ecosystems. Recent regulations have imposed restrictions on the use of animals for scientific purposes, and also the obligation to analyze auxiliary substances in plant protection products and to identify endocrine disrupters. The major characteristics of yeasts and their taxonomic classification are described in the study. Commercial yeast-based biotests and potential uses of yeasts in environmental studies and toxicogenomics are also analyzed.

1. Introduction. 2. Yeast. 3. Yeast as indicators of environmental pollution. 3.1. Plant protection products in the environment. 3.2. Growth inhibition biotests. 3.3. Genotoxicity tests. 3.4. Endocrine tests. 4. Yeasts in toxicogenomics. 4.1. The advantages of using yeasts in toxicogenomics. 4.2. Transcriptomics, proteomics and metabolomics tools in yeast toxicogenomics. 4.3. Yeast functional toxicogenomics. 4.4. Yeast toxicogenomics in agricultural pollution assessment. 5. Conclusions

Słowa kluczowe: agrocenozy, biotesty, drożdże, środki ochrony roślin

Key words: agricultural biocenoses, biotests, yeasts, plant protection products

1. Wstęp

Szacuje się, że na świecie istnieje około 30 tysięcy substancji chemicznych stanowiących potencjalne zagrożenia dla człowieka i środowiska [48]. Dodatkowo corocznie na rynek wprowadza się nowe substancje do stosowania w rolnictwie podlegające obowiązkowi rejestracji. Jednocześnie opracowuje się wspólne normy dla oceny ryzyka stosowania tych substancji. Niebezpieczne są zwłaszcza substancje rakotwórcze, genotoksyczne i teratogenne oraz związki trwałe lub zdolne do bioakumulacji. W państwach Unii Europejskiej związki takie nie mogą być stosowane, ale stanowią duży problem w innych rejonach świata. W Unii Europejskiej od 14 czerwca 2011 roku obowiązują nowe przepisy dotyczące rejestracji środków ochrony roślin, wprowadzone rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. dotyczącym dopuszczania do obrotu środków ochrony roślin [60]. Przepisy te nakładają obowiązek minimalizowania ilości przeprowadzanych badań, w szczególności na zwierzętach, a testy na kręgowcach powinny być stosowane tylko w ostateczności. Zgodnie z nowymi przepisami kontroli ekotoksykologicznej podlegają zarówno substancje aktywne środków ochrony roślin

jak i sejfny, synergetyki, adiuwanty lub inne obojętne substancje zawarte w tych preparatach [23]. Pomimo wprowadzenia europejskich wytycznych zmierzających do unikania powielania testów na kręgowcach często są one niezbędne w celu potwierdzenia bezpieczeństwa stosowania środków ochrony roślin lub zawartych w nich substancji aktywnych. Jednocześnie rośnie zapotrzebowanie na opracowanie alternatywnych procedur testowych. Konwencjonalne testy toksykologiczne opierają się głównie na modelach wykorzystujących gryzonia. Obecne zmiany prawne są kierowane także do środowiska naukowego w celu wypracowania szybkich i wiarygodnych testów o wysokiej czułości, przepustowości i precyzji [48, 36]. Celem opracowania jest ocena możliwości wykorzystania drożdży jako organizmów modelowych do oceny zagrożeń jakie stanowią dla środowiska środki ochrony roślin.

2. Drożdże

Drożdże najczęściej definiowane są jako saprotroficzne jednokomórkowe grzyby rozmnażające się przez pączkowanie, rozwijające się na podłożach zawierających cukier i wywołujące w warunkach beztlenowych

* Autor korespondencyjny: Katedra Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Prawocheńskiego 17, 10-720 Olsztyn; e-mail: urszula.wachowska@uwm.edu.pl

Tabela I
Skrócona systematyka filogenetyczna grzybów

Gromada	Podgromada	Przykładowe rodzaje
Ascomycota	<i>Pezizomycotina</i>	<i>Aureobasidium</i> , <i>Morchella</i> , <i>Eremascus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Pleospora</i> , <i>Neurospora</i> , <i>Ophiostroma</i>
	<i>Saccharomycotina</i>	<i>Dipodascopsis</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Candida</i> , <i>Dipodascus</i>
	<i>Taphrinomycotina</i>	<i>Schizosaccharomyces</i> , <i>Taphrina</i> , <i>Pneumocystis</i>
Basidiomycota	<i>Agaricomycotina</i>	<i>Coprinus</i> , <i>Boletus</i> , <i>Tremella</i>
	<i>Ustilaginomycotina</i>	<i>Tilletia</i> , <i>Ustilago</i>
	<i>Pucciniomycotina</i>	<i>Cronartium</i> , <i>Leucosporidium</i>
Zygomycota	Zygomycetes	<i>Glomus</i>

Na podstawie [43]

fermentację alkoholową [13]. Najczęściej znajdują one zastosowanie w piwowarstwie, gorzelnictwie i piekarnictwie. Jednak w rzeczywistości drożdże są bardzo liczną grupą grzybów szeroko rozpowszechnionych w środowisku, wykorzystywanych w badaniach biotechnologicznych. Występują one na powierzchni roślin uprawnych, we wnętrzu ziarniaków, w glebie, wodzie oraz atmosferze [22, 41, 42, 76].

Badania filogenetyczne grzybów w oparciu o analizę fragmentów sekwencji rDNA kodujących 18S, 5,8S i 28S rRNA wybranych grzybów pozwoliły na wydzielenie trzech podgromad w gromadzie *Ascomycota* (Tabela I), zawierających drożdże: (1) *Schizosaccharomyces* w *Taphrinomycotina*, (2) *Saccharomycotina* oraz (3) grzyby strzępkowe *Pezizomycotina* [5]. Drożdże i grzyby strzępkowe są taksonami siostrzanymi a *Schizosaccharomyces* i gatunki pokrewne uległy wcześniejszemu wydzieleniu w tym rodowodzie, co zostało też poparte analizą wielogenowej sekwencji [44, 20]. Wiele gatunków drożdży znajduje się też w gromadzie *Basidiomycota*, co dodatkowo utrudnia klasyfikację tych grzybów [43].

W pracy Kurtzman i Robnett [44] badano relacje filogenetyczne między gatunkami i rodzajami w obrębie gromady workowców na podstawie analizy sekwencji pięciu genów (Tabela II). Gatunki należące do *Lipomyces* (klad 11) są ewolucyjnie najwcześniej rozbieżnymi gatunkami *Saccharomycotina*. Grzyby rodzaju *Lipomyces* są powszechnie izolowane z gleby i stanowią jedną z kilku grup drożdży, dla których gleba jest głównym siedliskiem. Sekwencje genów analizowanych gatunków rodzaju *Saccharomyces* i powiązanych rodzajów (klad 1) wydają się być najbardziej odmienne od pozostałych kladów w *Saccharomycotina*, klad ten obejmuje drożdże fermentacji cukrów (glukozy, galaktozy, sacharozy i innych). Na uwagę zasługuje też rodzaj *Eremothecium*, zawierający pięć gatunków, z których wszystkie są patogenami roślin (na przykład *E. ashbyi* i *E. coryli* soi, [28]).

Co ciekawe rodzaj *Candida* zakwalifikowano do kilku kladów, co sugeruje, że jest to rodzaj polifiletyczny lub analiza sekwencji pięciu fragmentów DNA jest niewystarczająca w badaniach filogenetycznych.

Tabela II
Wybrane gatunki *Saccharomycotina* zakwalifikowane do kladów

Klad	Wybrane gatunki
Klad 1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Cyniclomyces guttulatus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Eremothecium cymbalariae</i> , <i>E. ashbyi</i> , <i>E. coryli</i> , <i>Hanseniaspora valbyensis</i>
Klad 2	<i>Wickerhamomyces canadensis</i> , <i>Starmera amethionina</i>
Klad 3	<i>Komagataella pastoris</i>
Klad 4	<i>Saccharomycopsis capsularis</i> , <i>Ascoidea rubescens</i>
Klad 5	<i>Candida boidinii</i> , <i>Ogataea minuta</i> , <i>Kuraishia capsulata</i>
Klad 6	<i>Candida multigemmis</i> , <i>Scheffersomyces stipitis</i> , <i>Candida shehatae</i> , <i>Spathaspora passalidarum</i> , <i>Metschnikowia bicuspidate</i> , <i>Wickerhamia fluorescens</i>
Klad 7	<i>Ascoidea</i> – podobne
Klad 8	<i>Sporopachydermia lactativora</i>
Klad 9	<i>Candida petrohuensis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Galactomyces geotrichum</i> , <i>Zygoascus hellenicus</i> , <i>Nadsonia fulvescens</i>
Klad 10	<i>Candida caseinolytica</i>
Klad 11	<i>Lipomyces starkeyi</i> , <i>Dipodascopsis uninucleata</i>

Sporządzono w oparciu o drzewo filogenetyczne gatunków drożdży [44]

Dalsza analiza pokrewieństwa między drożdżami *Saccharomycotina* wymaga porównania całych genomów [44]. Obecnie dostępne są sekwencje genomów kilkudziesięciu gatunków drożdży, ale są to przede wszystkim gatunki ważne w medycynie lub wykorzystywane biotechnologicznie. Kład 1 zawiera rodzaje *Saccharomyces* i *Kluyveromyces* wykorzystywane w przemyśle spożywczym. W kładzie 6 znajdują się gatunki *Scheffersomyces stipitis*, *Candida shehatae* i *Spathaspora pasalidarum* fermentujące D-ksylozę (cukier drzewny) w słomie i drewnie do etanolu [35]. Wiele gatunków rodzaju *Ogataea* i *Kuraishia*, które powodują rozkład metanolu, znajduje się w kładzie 5 [42].

W niektórych przypadkach molekularne badania porównawcze mogą być uzupełniane opisem właściwości morfologicznych i fizjologicznych drożdży. Wiele parametrów fizjologicznych, takich jak fermentacja cukru i wykorzystanie azotanów jako jedynego źródła azotu są powszechnie spotykane u *Saccharomycotina*. Ale są przypadki wyjątkowe, na przykład asymilacja metanolu jest unikatowa dla kilku gatunków drożdży i może być stosowana do rozpoznawania rodzaju, służy również do selektywnej izolacji poszczególnych grup drożdży [45].

Wiele właściwości morfologicznych drożdży jest typowych dla *Saccharomycotina*, na przykład kuliste askospory. Ale wydłużone askospory są typowe tylko dla rodzaju *Eremothecium*. Typowe jest pączkowanie drożdży w dowolnym miejscu komórki, ale dwubiegunowe początkowanie jest ograniczone do czterech rodzajów: *Hanseniaspora*, *Saccharomycodes*, *Wickerhamia* i *Nadsonia*. Cechy morfologiczne drożdży tylko w wyjątkowych przypadkach pozwalają właściwie je zidentyfikować, ale mogą być bardzo ważnym narzędziem w ich wstępnym oznaczaniu [43].

Rodzaj *Aureobasidium* należy do rzędu *Dothideales* (*Ascomycota*, *Dothideomycetes*) i obejmuje 27 gatunków i odmian [26], w tym niedawno opisany gatunek *A. thailandense* [59]. Gatunek *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud zaliczany jest do czarnych drożdży w podgromadzie *Pezizomycotina* o istotnym znaczeniu biotechnologicznym [Tabela III]. Posiada on wyjątkową odporność na czynniki stresowe i coraz większe znaczenie w medycynie [26, 27]. Występuje w środowiskach charakteryzujących się silnym zasoleniem i dużą wilgotnością. Spotykany jest w żywności,

w łazienkach, na skałach i pomnikach a w agrocenozach jako epifit lub endofit na przechowywanym ziarnie [80]. Gatunek ten tworzy strzępki, grubościenne chlamydospory oraz pączkujące blastospory [24, 75]. Grzyb ten wykazuje duże zróżnicowanie właściwości fizjologicznych i morfologicznych, dlatego też wyodrębniono jego cztery odmiany: *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var. *melanogenum*, *A. pullulans* var. *subglaciale* oraz *A. pullulans* var. *namibiae* [80]. Gostinčar i wsp. [27] podają wyniki sekwencjonowania genomów czterech odmian gatunku *A. pullulans*, należących do najmniejszych w porównaniu z innymi grzybami *Dothideomycete*.

Wiele gatunków drożdży należy do gromady *Basidiomycota* tylko w bezpiecznej fazie, część z nich klasyfikowanych jest do rodzajów *Rhodotorula* i *Cryptococcus* [79]. Jednakże analizy filogenetyczne wykazywały wielokrotnie polifiletyczny charakter tych dwóch rodzajów. Anamorficzne drożdże rodzaju *Rhodotorula* obejmują gatunki aktualnie umieszczone w dwóch podgromadach *Pucciniomycotina* i *Ustilagomycotina*, klasach *Microbotryomycetes* (29 gatunków) i *Cystobasidiomycetes* (14 gatunków), rzędach *Sporidiobolales*, *Kriegeriales*, *Microbotryales*, *Cystobasidiales* i *Erythrobasidiales* [1, 42, Tabela IV]. Kurtzman i wsp. [42] opisali 47 gatunków rodzaju *Rhodotorula* tworzących kremowe, różowe lub pomarańczowe kolonie.

Anamorficzne gatunki rodzaju *Cryptococcus* znajdowane są we wszystkich głównych liniach *Basidiomycota* oprócz klasy *Tremellomycetes* [42]. Większość gatunków tworzy wokół owalnych, elipsoidalnych lub wydłużonych komórek polisacharydową otoczkę. U niektórych gatunków obserwowano również strzępki z doliporowymi septami, nie spotykano jednak balistospor. Znanych i opisywanych jest 70 gatunków rodzaju *Cryptococcus*. Gatunki rodzaju *Sporobolomyces* wytwarzają symetryczne balistospory na krótkich strygmach i nie są zdolne do fermentacji cukrów [42]. Rodzaj *Sporobolomyces* to rodzaj polifiletyczny, należy do *Urediniomycetes* i ma przedstawicieli w *Microbotryomycetidae*, gdzie większość gatunków klasyfikowanych jest do rzędu *Sporidiobolales* (Tabela IV). Rząd *Sporidiobolales* obejmuje także pięć gatunków *Sporidiobolus*.

Rodzaj *Pseudozyma* jest anamorficznym drożdżem należącym do rzędu *Ustilaginales*, klasy *Ustilaginomycetes* w podgromadzie *Ustilaginomycotina* i obejmuje

Tabela III
Systematyka gatunku *Aureobasidium pullulans*

Klasa	Rząd	Gatunki	Odmiany <i>A. pullulans</i>
<i>Dothideomycetes</i>	<i>Dothideales</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>A. pullulans</i> var. <i>pullulans</i> , <i>A. pullulans</i> var. <i>subglaciale</i> , <i>A. pullulans</i> var. <i>namibiae</i> , <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>
	<i>Capnodiales</i>	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	
	<i>Hysteriales</i>	<i>Hysterium pulcare</i>	

Na podstawie [26]

Tabela IV
Skrócona systematyka gromady *Basidiomycota*

Podgromada	Rząd	Wybrane gatunki
<i>Pucciniomycotina</i>	<i>Sporidiobolales</i>	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i> , <i>Rhodospodium fluviale</i> , <i>R. mucilaginoso</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>R. graminis</i>
	<i>Erythrobasidiales</i>	<i>Rhodotorula armeniace</i> , <i>Rh. aurantiaca</i> , <i>Rh. lactose</i> , <i>Rh. marina</i> , <i>Sporobolomyces phyllomatis</i> , <i>S. cluyveri-niehi</i> , <i>Erythrobasidium hasegawianum</i>
	<i>Microbotryales</i>	<i>Microbotryam reticulatum</i> , <i>M. violaceum</i> , <i>Rh. honiea</i> , <i>Ustilentylama fluitans</i>
	<i>Cystobasidiales</i>	<i>Rhodotorula</i> sp., <i>Rh. pollida</i> , <i>Rh. laryngis</i> , <i>Rh. pinicola</i>
<i>Ustilagomycotina</i>	<i>Ustilaginales</i>	<i>Pseudozyma antarctica</i>

Na podstawie drzewa filogenetycznego [1, 42]

10 gatunków [42]. W roku 2013 został zsekwencjonowany genom wyizolowanego w Japonii gatunku *Pseudozyma antarctica* [54], który jest zdolny do produkcji zewnątrzkomórkowych glikolipidów MEL. Genom jądrowy *P. antarctica* ma wielkość 18,0 Mb i zawiera 6543 genów kodujących białka, z których 4910 (74,9%) jest homologiczna z sekwencjami zawartymi w bazie danych [54].

3. Przydatność drożdży do oceny zanieczyszczeń środowiska

3.1. Środki ochrony roślin w środowisku

W uwagi na rosnące ilości zanieczyszczeń chemicznych wprowadzanych do ekosystemów wodnych i glebowych oraz zmienionych ram prawnych rosną wymagania dotyczące rozwoju czułych i wiarygodnych metod oceny wpływu zanieczyszczeń na organizmy wodne, glebowe i związane z rośliną. Według nowych wytycznych dotyczących rejestracji środków ochrony roślin, wymagane są informacje na temat ich wpływu na mikroorganizmy glebowe i żyzność gleby. Stefani i wsp. [68] udowodnili, że chlorotalonil (fungicyd) może znacząco ograniczać respirację gleby a efekt ten utrzymuje się przez 28 dni. Komárek i wsp. [40] zwracają uwagę, że zanieczyszczenie gleb rolniczych fungicydami nieorganicznymi zawierającymi miedź oraz fungicydami organicznymi stanowi poważne zagrożenie toksykologiczne dla środowiska. Wyżej cytowani autorzy wskazują, że w zdecydowanej większości badanych w UE winnic stężenie miedzi w glebach przekracza dopuszczone prawem granice. Murray i wsp. [55] oceniając przy pomocy nowoczesnych technik analitycznych pozostałości wybranych środków ochrony roślin (między innymi benomylu, karbendazymu) i innych zanieczyszczeń w wodach słodkowodnych wykrywali śladowe ich ilości, zwykle w zakresie od nanogramów lub mikrogramów w litrze, ale w wielu przypadkach ich koncentracja przekroczyła dopuszczalne limity. Kompleksowa ocena zawartości potencjalnie niebezpiecznych i toksycznych

substancji w jednej próbie, przy pomocy chemicznych metod analitycznych, jest niemożliwa. Zadanie to mogą spełniać wrażliwe mikroorganizmy modelowe (głównie bakterie) lub bezkręgowce glebowe [34, 36].

Badania ekotoksyczności środków ochrony roślin w stosunku do drożdży prowadzone są obecnie głównie w przypadku zastosowania środków ochrony roślin w uprawach, których owoce mogą zostać wykorzystane do fermentacji (winorośl, jabłoń) z przeznaczeniem do produkcji wina lub cydru [10, 22].

3.2. Biotesty w oparciu o hamowanie wzrostu

Badania przewlekłej toksyczności wymagające kilku pokoleń organizmów testowych prowadzone są w celu określenia skutków długoterminowego oddziaływania środków ochrony roślin w organizmach żywych. Zanieczyszczenia rolnicze przedostają się do środowiska wodnego, dlatego badania toksyczności w środowisku wodnym wymagają szybkich i reprezentatywnych testów biologicznych [48]. Biotesty wykorzystujące organizmy reprezentujące różne poziomy troficzne, wiele gatunków bakterii, glonów i orzęsków o krótkim cyklu życia i szybkich reakcjach na zmiany, przedstawiono w tabeli V. Drożdże stanowią tylko niewielką liczbę tych organizmów.

Należy jednak podkreślić, że wyniki badań z wykorzystaniem bakterii, nie są reprezentatywne dla eukariontów. Jednokomórkowe organizmy eukariotyczne, takie jak algi, są zwykle wykorzystywane do oceny fitotoksyczności, a orzęski nie są powszechnie używane jako organizmy testowe. Ogromna różnorodność substancji chemicznych stosowanych w rolnictwie skłania do korzystania z krótkoterminowych testów cytotoxyczności z udziałem komórek eukariotycznych. Badania toksyczności krótkookresowej prowadzone są z wykorzystaniem *S. cerevisiae* jako biosensorem do oceny cyto- i genotoksycznego działania zanieczyszczeń. Chatterjee i Luo [12] w swoich badaniach wykorzystali ten gatunek do oceny toksyczności Cr (III) analizując zahamowanie wzrostu, liczbę komórek, suchą biomasę i zmiany w kształcie i wielkości komórek

Tabela V
Przykłady organizmów wykorzystywanych w testach toksyczności

Organizm	Rodzaj/gatunek
Bakterie	<i>Bacillus, Escherichia, Pseudomonas, Salmonella, Vibrio</i>
Grzyby	<i>Aspergillus, Candida, Saccharomyces, Penicillium</i>
Glony	<i>Chlorella, Scenedesmus, Selenastrum</i>
Pierwotniaki	<i>Paramecium, Spirostomum, Vorticella</i>
Wrotki	<i>Brachionus</i>
Skorupiaki	<i>Artemia, Asellus, Ceriodaphnia, Daphnia, Gammarus, Hyalella, Mysis, Thamnocephalus</i>
Owady	<i>Chironomus, Ephemerella, Hydropsyche</i>
Mięczaki	<i>Dreissena polymorpha, Physa acuta, Planorbarius corneus</i>
Ryby	<i>Brachydanian rerio, Lebistes reticulatus</i> oraz wiele innych

Według Klimiuk, Lebkowska [38]

S. cerevisiae. Na tej podstawie oszacowali wskaźnik EC_{50} dla tego związku na poziomie $51,03 \text{ mg dm}^{-3}$, a analiza mikroskopowa wykazała deformację komórek drożdży. Rumlova i Dolezalova [61] oceniając toksyczność pięciu substancji (atropiny, fenitrotonu, cyjanku potasu, chlorku rtęci i azotanu ołowiu) w wodzie wobec drożdży *S. cerevisiae* w porównaniu z dwoma standardowymi testami toksyczności na podstawie hamowania ruchliwości *Daphnia magna* i bioluminiscencji *Vibrio fischeri* stwierdziły, że dla niektórych substancji test biologiczny z *S. cerevisiae* okazał się czulszy.

Pewne nadzieje można wiązać także z szeroko prowadzonymi badaniami nad biogenezą peroksysomów w komórkach drożdży *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha* i *Pichia pastoris* [74]. Spośród wszystkich badanych organizmów największą liczbę tych organelli napotkano w komórkach metylotroficznych drożdży, peroksysomy masowo pojawiają się w czasie wzrostu komórek w obecności metanolu jako jedyne źródła węgla i energii. Biogeneza peroksysomów związana jest z białkami zwanymi peroksynami, geny je kodujące należą do grupy PEX. Dotychczas u człowieka zidentyfikowano 16 genów PEX, natomiast u grzybów 32 geny. Ponieważ w peroksysomach znajduje się olbrzymia liczba enzymów odpowiedzialnych za transformację, także ksenobiotyków, ich liczba może być wskaźnikiem aktywności enzymatycznej komórki bioindykatora.

3.3. Testy genotoksyczności

Genotoksyczność jest terminem opisującym wszystkie niekorzystne dla organizmu uszkodzenia materiału genetycznego w komórce organizmu żywego pod wpływem związku chemicznego. W badaniach mutagenności liczba odpowiedzi ze strony biotestów genotoksyczności po zastosowaniu ksenobiotyku powinna być większa niż bez ksenobiotyku. Dodatkowo poznano biomarkery, które pojawiają się w komórce po ekspozycji na szkodliwy związek chemiczny (określone

substancje lub ich metabolity w komórkach, mutacje DNA, określone białka oraz addukty DNA czyli produkty połączenia DNA z innymi związkami wiązaniemi wodorowymi). Efektami działania ksenobiotyków na materiał genetyczny mogą być dodatkowe, w porównaniu z kontrolą, aberracje chromosomowe (*Chromosomal Aberrations, CA*), wymiana siostrzanych chromatyd (*Sister Chromatid Exchange, SCE*), mikrojądra (*Micronuclei, MN*), uszkodzenia DNA wykrywane testem kometkowym (*Comet Assay Test*), mutacje w genie transferazy fosforybozylowej hipoksantyny-guaniny (*Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase, HGPRT*) [19, 48]. Potencjalnie w testach tych komórki drożdży mogą zastąpić dotychczas stosowane komórki innych organizmów.

3.4. Testy endokrynne

Ludzie narażeni są na wpływ mieszanin różnych substancji toksycznych w środowisku. Połączone efekty toksykologiczne dla dwóch lub więcej substancji mogą być inne niż dla poszczególnych składników mieszanin. Obecnie dyskutowana i badana jest ocena łącznych skutków związków o aktywności hormonalnej także z powodu nowych regulacji prawnych [21, 39]. Zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. środki ochrony roślin nie mogą wpływać na układ endokryny [60].

Biotesty komórkowe są alternatywą dla tradycyjnych technik analitycznych i testów przeprowadzanych na całych organizmach [52]. Biotesty te przeważnie wykorzystują komórki ludzkie (takie jak na przykład komórki raka piersi lub nerki) w celu określenia zakresu zakłóceń procesów hormonalnych [2]. Obecnie dostępne są także komercyjne biotesty wykorzystujące komórki drożdży. Grzyby te nie mają naturalnych receptorów estrogenu, ale może zostać do ich komórek wprowadzony taki receptor z genomu

ludzkiego lub ryb. Raz wbudowane receptory będą przyczyniać się do ekspresji mierzonych białek, takich jak lucyferaza czy β -galaktozydaza, które mogą być monitorowane kolorymetrycznie lub luminescencyjnie [2]. Jednym z najczęściej wykorzystywanych takich testów jest test aktywności estrogennej z użyciem drożdży (*Yeast Estrogen Screen*, YES) [57]. Otrzymane wyniki są znormalizowane w stosunku do najpowszechniejszego, naturalnego estrogenu używanego jako standard. Komercyjne testy *Yeast Estrogen Screen* (YES), *Yeast Androgen Screen* (YAS) łącznie z wariantami LYES i BLYES są obecnie szeroko stosowane. Test YES został opisany po raz pierwszy przez Arnold i wsp. [2] w celu określenia powinowactwa DDT, oktylofenolu i naturalnych substancji do ludzkiego receptora estrogenowego w porównaniu z 17β -estradiolem. W celu zwiększenia czułości i szybkości testu YES opracowano test LYES, w którym wprowadzono dodatkowo etap fermentacji enzymatycznej z litykaza [64].

Pojawiła się obawa, że część środków ochrony roślin, w tym środki owadobójcze są zdolne do naśladowania działania 17β -estradiolu w wyniku interakcji z ludzkim receptorem estrogenu [53]. Powszechnie stosowanymi środkami owadobójczymi są pyretroidy i kilka z nich oceniano różnymi metodami pod kątem ewentualnej aktywności wobec układu hormonalnego. Zaobserwowano, że niektóre metabolity pyretroidów, zwłaszcza permetyryny i cypermetryny, mają struktury chemiczne, które są predysponowane do oddziaływania z komórkowym receptorem estrogenu w teście YES bardziej niż pyretroidy macierzyste. Mimo, że aktywność estrogenowa tych związków była około 10^5 razy mniejsza niż 17β -estradiolu należy je uznać za zagrożenie dla zdrowia ludzkiego, a także środowiska [53]. Kolle i wsp. [39] zastosowali test YAS w celu oceny aktywacji receptora androgenowego przez winklozolinę (fungicyd) i flutamid (lek) oraz przez mieszaniny tych związków zastosowane w różnych stężeniach. Działanie tych związków nie było synergistyczne a ich efekt estrogeny widoczny był tylko przy wyższych stężeniach – ale nie sumował się. Badania Taxvig i wsp. [69] dowiodły także, że tebukonazol i epoksykonazol (fungicydy) mogą działać na układ endokryny szczurów, na co wskazywała między innymi feminizacja samców lub zwiększenie masy urodzeniowej tych zwierząt.

4. Drożdże w toksykogenomice

4.1. Zalety drożdży wykorzystywanych w toksykogenomice

Toksykogenomika jest interdyscyplinarną dziedziną nauki, która łączy toksykologię z naukami „omicznymi” w celu wyjaśnienia reakcji na stresy środowiskowe na

poziomie genomu [29, 56]. Duży potencjał wynikający z połączenia tych dyscyplin z bioinformatyką zapewnia bardziej kompleksową wiedzę odnośnie oddziaływań substancji chemicznych na poziomach molekularnym i komórkowym [28, 70]. Gatunek *S. cerevisiae* jest dokładnie poznany i powszechnie stosowany jako eukariotyczny model w tego typu badaniach. Kilka cech drożdży sprawia, że są one dobrym modelem: (1) są jednokomórkowymi, niepatogenicznymi mikroorganizmami o szybkim wzroście i prostych warunkach hodowli, (2) są podatne na manipulacje genetyczne, (3) została już przeprowadzona analiza całego genomu i wypracowano w tym zakresie dużo prostych technik eksperymentalnych, (4) genom drożdży posiada uderzająco wysoki stopień funkcjonalnej homologii z genomem człowieka i innych wyższych eukariotów, i (5) mają unikalną zaletę posiadania informacji funkcjonalnych dostępnych dla niemal każdego genu [31]. Od 20 lat znana jest sekwencja genomu *S. cerevisiae* [25]. Składa się on z 12 068 kilopar zasad (ponad 12 mln par zasad) i zawiera około 6000 genów. Obecnie baza danych genomu drożdży piekarniczych *Saccharomyces Genome Database* (SGD; [78]) dostarcza wiadomości o każdym genie tych drożdży. Po zsekwencjonowaniu genomu drożdży piekarniczych można było ostatecznie stwierdzić, że geny drożdży piekarniczych i ssaków kodują podobne białka oraz określić, ile z genów, które odkryto u drożdży piekarniczych, ma swoje homologie wśród genów ssaków [6].

Liczne informacje zebrane w ciągu kilku ostatnich lat badań znajdują się w łatwo dostępnych bazach danych. Pionierskie badania nad *S. cerevisiae* przyczyniły się do rozwoju kilku postgenomowych technik i narzędzi obliczeniowych, zmieniając obszar zastosowań drożdży w metodach funkcjonalnej genomiki i proteomiki [7, 49, 67]. I chociaż wiele związków cytotoksycznych działa na organizmy za pośrednictwem mechanizmów fizjologicznych, które nie istnieją u drożdży, wiele podstawowych mechanizmów, takich jak adaptacja i odporność na presje chemiczne i środowiskowe znajdują się w komórkach tych grzybów i organizmów odległych filogenetycznie [58].

4.2. Narzędzia transkrypto-, proteo- i metabolomiczne stosowane w toksykogenomice drożdży

Badanie zmian w ekspresji genów i białek lub poziomów metabolitów po ekspozycji na substancje toksyczne może pomóc w identyfikacji komponentów komórkowych i szlaków metabolicznych, które są najbardziej istotne z toksykologicznego punktu widzenia [29, 56]. *S. cerevisiae* stanowi doskonały eksperymentalny model do uzyskania zintegrowanej oceny odpowiedzi całego genomu na stres poprzez połączenie transkryptomiki i proteomiki ilościowej do oceny

ekspresji genomu, metabolomiki, czyli badaniu profilu metabolitów komórkowych jako ostatecznej odpowiedzi na toksyny i chemogenomiki, do identyfikacji molekuł będących celem ataków toksyn w komórce. Po ekspozycji komórek drożdży na toksyny następuje zmiana ekspresji mRNA, w celu dostosowania się do nowych warunków środowiskowych. W ten sposób tworzy się specyficzny wzór ekspresji genów charakterystyczny dla danego związku [65, 66]. Takie transkrypcyjne wzory są podobne dla związków o podobnych mechanizmach działania i mogą być stosowane do wnioskowania o mechanizmach działania i przewidywaniu efektów niescharakteryzowanych toksyn [46, 70]. W rzeczywistości, zmiana ekspresji genów może wystąpić niemal natychmiast po ekspozycji i ocena tych zmian może potencjalnie zapewnić wcześniejszą i bardziej czułą reakcję biomarkera niż tradycyjne metody toksykologiczne [29, 66]. Jednakże ocena samej ekspresji genów jest niewystarczająca, aby w pełni zrozumieć działanie toksyny i wynikające stąd konsekwencje [29], ponieważ spodziewane są również zaburzenia w produkcji i/lub funkcji białka. Analizy profili białek mogą być stosowane w celu identyfikacji zmian jakie w nich zachodzą po ekspozycji na toksynę [17, 62, 71, 72]. Genomowe i proteomiczne metody nie uwzględniają dynamicznego stanu metabolicznego komórki. Metabolomika jest podejściem, które umożliwia badanie profili metabolicznych w oparciu o założenie, że zmiany wywołane są przez toksyczne substancje. Niestety tego typu badania z wykorzystaniem drożdży są nadal rzadkie [30, 47].

4.3. Toksykogenomika funkcjonalna genów drożdży

Toksykogenomika funkcjonalna bada funkcje genów związanych z działaniem toksycznego związku lub stresu środowiskowego, czyli określa bezpośredni związek między genem i toksycznością [29, 56]. W tym kontekście, przełomem w badaniach nad mechanizmem działania toksyn, i jedną z głównych zalet stosowania drożdży do oceny toksyczności substancji było uzyskanie zbioru haploidalnych i heterozygotycznych/homozygotycznych diploidalnych drożdży z delecją określonego genu [63]. Kolekcje tych drożdży umożliwiają kompleksowe i systematyczne badania genetyczne, które wskazują na bezpośredni związek między specyficznym genem i jego funkcjonalnym produktem tworzącym się w odpowiedzi na dany ksenobiotyk [3, 32, 77]. Badania skryningowe są często prowadzone w celu identyfikacji genów, które są ważnymi czynnikami decydującymi o oporności na stres. Możliwe jest także wykrywanie delecji, które warunkują oporność na związek toksyczny, wówczas gdy jest on szkodliwy dla szczepu typu dzikiego. Testy te wykonuje się na szczepach homozygotycznych i haploidalnych [77]. Obecnie dostępnych jest wiele narzędzi bioinforma-

tycznych, które ułatwiają interpretację wyników [54]. Jak dotychczas co najmniej kilkadziesiąt publikacji napisano w oparciu o badania z wykorzystaniem kolekcji delecyjnych drożdży [16, 17].

4.4. Toksykogenomika drożdży w ocenie zanieczyszczenia środowiska rolniczego

Badania toksykologiczne związków chemicznych stosowanych w rolnictwie, w tym herbicydów i fungicydów, rozwijają się od wielu lat, ale długofalowe skutki stosowania tych substancji są trudne do przewidzenia. Analiza całego genomu drożdży jest z powodzeniem stosowana do identyfikacji genów odpowiedzialnych za odpowiedzi i oporność na stropy wywołane przez środki ochrony roślin [8, 9]. Opisywana jest między innymi odpowiedź drożdży na sulfometuron metylowy (herbicyd), mankozeb (fungicyd ditiokarbaminianowy), tiuram, zineb, maneb i benomyl (fungicydy), lindan (inektocyd), kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D), parakwat i cyperquat (herbicydy) [14–16, 70, 72]. Podejście toksykogenomiczne zaproponowano do zdefiniowania i przewidzenia nowych efektów toksykologicznych dla fungicydu mankozeb [14, 16] i herbicydu 2,4-D [72, 73]. Mankozeb jest nieselektywnym fungicydem zawierającym kompleks cynku z etyleno-bis-ditiokarbaminianem manganu o szerokim spektrum działania powszechnie stosowanym wobec fitopatogennych grzybów w różnych uprawach, o niskiej toksyczności ostrej [4, 50]. Jednak w ostatnich latach jest coraz więcej dowodów wskazujących, że przewlekła ekspozycja na ten fungicyd zwiększa prawdopodobieństwo zachorowania na chorobę Parkinsona i niektóre formy raka [11, 81]. Metody proteomiki ekspresyjnej wykazały, że 70% białek inaczej wyraża się w komórkach ekspozycyjnych na mankozeb [16] i aż 53% determinantów oporności drożdży na fungicyd ma ludzkie ortologi [14].

Kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) należy do rodziny herbicydów auksynopodobnych. Pomimo, że jego stosowanie jest uznane za stosunkowo bezpieczne, ekspozycja na 2,4-D może być związana z rozwojem nieziarniczego chłoniaka i mięsaka [33]. W badaniach Teixeira i wsp. [75] dotyczących oceny mechanizmów reakcji na stres i powstawania oporności na 2,4-D zastosowano cały genom *S. cerevisiae*. Reakcja transkrypcji drożdży na ekspozycję na 2,4-D skutkowałą zmianami w regulacji kilku genów zaangażowanych w odpowiedzi na stres oksydacyjny, co korelowało ze wzrostem stężenia rodników hydroksylowych i peroksydacji lipidów zarejestrowanych w wyniku ostrego stresu na 2,4-D w komórkach drożdży [73].

Opisane przypadki podkreślają podobieństwa skutków toksykologicznego działania fungicydów i herbicydów u drożdży i u innych organizmów eukariotycznych, takich jak ludzie i rośliny. W związku z tym oczekuje

się, że zastosowanie układu modelowego z drożdżami będzie nadal przyczyniać się do zrozumienia mechanizmów molekularnych leżących u podstaw toksyczności środków ochrony roślin dla bardziej skomplikowanych i mniej dostępnych w badaniach eukariontów.

5. Podsumowanie

Reasumując należy podkreślić, że wzrasta znaczenie drożdży wykorzystywanych w nauce, szczególnie w badaniach środowiskowych, jako organizmów modelowych. Zainteresowanie budzą przede wszystkim eksperymenty nad oddziaływaniem toksyn na geny, prowadzone na drożdżach w celu określenia podobieństw reakcji, także na środki ochrony roślin, pomiędzy różnymi organizmami. Dostępnych jest także kilka komercyjnych biotestów wykorzystujących drożdże do oceny zagrożeń zanieczyszczeń rolniczych dla środowiska.

Piśmiennictwo

- Aime M.C., Matheny P.B., Henk D.A., Frieders E.M., Nilsson R.H., Piepenbring M., McLaughlin D.J., Szabo L.J., Begerow D., Sampaio J.P., Bauer R., Weiss M., Oberwinkler F., Hibbett D.: An overview of the higher level classification of *Pucciniomycotina* based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. *Mycologia*, **98**, 896–905 (2006)
- Arnold S.F., Robinson M.K., Notides A.C., Guillette Jr L.J., McLachlan J.A.: A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens. *Environ. Health Persp.* **104**, 544 (1996)
- Auerbach D., Arnoldo A., Bogdan B., Fetchko M.: Drug discovery using yeast as a model system: a functional genomic and proteomic view. *Curr. Proteomics*, **2**, 1–13 (2005)
- Ballantyne B.: Toxicology in fungicides. Pesticide Toxicology and International Regulation, red. T.C. Marrs, B. Ballantyne, John Wiley and Sons, 2004, s. 191–303
- Berbee M.L., Taylor J.: Ascomycete relationships: dating the origin of asexual lineages with 18S ribosomal RNA gene sequence data. W: The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematic. Edited by Reynolds, D.R. & Taylor, J.W. Wallingford: CAB International, 1993, s. 67–78
- Botstein D., Chervitz S.A., Cherry M.: Perspective GENETICS Yeast as a Model Organism. *Science*, **277**, 1259–1260 (1997)
- Botstein D., Fink G.R.: Yeast: an experimental organism for 21st century biology. *Genetics*, **189**, 695–704 (2011)
- Cabrito T.R., Teixeira M.C., Duarte A.A., Duque P., Sa-Correia I.: Heterologous expression of a Tpo1 homolog from *Arabidopsis thaliana* confers resistance to the herbicide 2,4-D and other chemical stresses in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 927–936 (2009)
- Cabrito T.R., Teixeira M.C., Singh A., Prasad R., Sa-Correia I.: The yeast ABC transporter Pdr18 (ORF YNR070w) controls plasma membrane sterol composition, playing a role in multi-drug resistance. *Biochem. J.* **440**, 195–202 (2011)
- Calhelha R.C., Andrade J.V., Ferreira I.C., Estevinho L.M.: Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. *Food Microbiol.* **23**, 393–398 (2006)
- Calviello G., Piccioni E., Boninsegna A., Tedesco B., Maggiano N., Serini S., Wolf F. I., Palozza P.: DNA damage and apoptosis induction by the pesticide mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **211**, 87–96 (2006)
- Chatterjee N., Luo Z.: Effect of two different Cr-(III)-organic compounds exposure to *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicol. Environ. Chem.* **92**, 75–88 (2010)
- Definicja.net: definicja.net/definicja/Drożdże (05/12/2014)
- Dias P.J., Teixeira M.C., Telo J.P., Sá-Correia I.: Insights into the mechanisms of toxicity and tolerance to the agricultural fungicide mancozeb in yeast, as suggested by a chemogenomic approach. *OMICS*, **14**, 211–227 (2010)
- Doostzadeh J., Davis R. W., Gaever G. N., Nislow C., Langston J.W.: Chemical genomic profiling for identifying intracellular targets of toxicants producing Parkinson's disease. *Toxicol. Sci.* **95**, 182–187 (2007)
- Dos Santos S.C., Tenreiro S., Palma M., Becker J., Sa-Correia I.: Transcriptomic profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* response to quinine reveals a glucose limitation response attributable to drug-induced inhibition of glucose uptake. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 5213–5223 (2009)
- Dos Santos S.C., Teixeira M.C., Cabrito T.R., Sá-Correia I.: Yeast Toxicogenomics: genome-wide responses to chemical stresses with impact in environmental health, pharmacology and biotechnology. *Front Genet.* **3**: 63 (2012)
- Dos Santos S.C., Teixeira M.C., Cabrito T.R., Sá-Correia I.: Yeast toxicogenomics: genome-wide responses to chemical stresses with impact in environmental health, pharmacology and biotechnology. *Toxicogenomics in non-mammalian species*, **3**, 63 (2013)
- Estève K., Poupot C., Dabert P., Mietton-Peuchot M., Milišić V.A.: *Saccharomyces cerevisiae*-based bioassay for assessing pesticide toxicity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 1529–1534 (2009)
- Fitzpatrick D.A., Logue M.E., Stajich J.E., Butler G.: A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from super-tree and combined gene analysis. *BMC Evol. Biol.* **6**, 99–113 (2006)
- Frische T., Faust M., Meyer W., Backhaus T.: Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). *Environ. Sci. Pollut. R.* **16**, 593–603 (2009)
- García M.A., Oliva J., Barba A., Cámara M.Á., Pardo F., Díaz-Plaza E.M.: Effect of fungicide residues on the aromatic composition of white wine inoculated with three *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Agr. Food Chem.* **52**, 1241–1247 (2004)
- GIS: gis.gov.pl (15/07/2014)
- Gniewosz M., Duszkiwicz-Reinhard W.: Comparative studies on pullulan synthesis, melanin synthesis and morphology of white mutant *Aureobasidium pullulans* B-1 and parent strain A.p.-3. *Carbohydr. Polym.* **72**, 431–438 (2008)
- Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G.: Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 563–547 (1996)
- Gostinčar C., Grube M., Gunde-Cimerman N.: Evolution of fungal pathogens in domestic environments? *Fungal Biol.* **115**, 1008–1018 (2011)
- Gostinčar C., Ohm P.R.A., Kogej T., Sonjak S., Turk M., Zajc J., Zalar P., Grube M., Sun H., Han J., Sharma A., Chiniquy J., Ngan C.Y., Lipzen A., Barry K., Igor V Grigoriev I.V., Gunde-Cimerman N.: Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genomics*, **15**, 549 (2014)
- Guerreiro N., Staedtler F., Grenet O., Kehren J., Chibout S.D.: Toxicogenomics in drug development. *Toxicol. Pathol.* **31**, 471–479 (2003)

29. Hamadeh H.K., Amin R.P., Paules R.S., Afshari C.A.: An overview of toxicogenomics. *Curr. Issues Mol. Biol.* **4**, 45–56 (2002)
30. Hasunuma T., Sanda T., Yamada R., Yoshimura K., Ishii J., Kondo A.: Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* **10**, 1 (2011)
31. Hiren K., Vilaprinyo E., Sorribas A., Alves R.: *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS one* **6**, 1–10 (2011)
32. Hoon S., Smith A.M., Wallace I.M., Suresh S., Miranda M., Fung E., Proctor M., Shokat K.M., Zhang C., Davis R.W., Giaever G., St Onge R.P., Nislow C.: An integrated platform of genomic assays reveals small-molecule bioactivities. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 498–506 (2008)
33. Ibrahim M.A., Bond G.G., Burke T.A., Cole P., Dost F.N., Enterline P.E., Gough M., Greenberg R.S., Halperin W.E., Mcconnell E., Munro I.C., Swenberg J.A., Zahm S.H., Graham J.D.: Weight of the evidence on the human carcinogenicity of 2,4-D. *Environ. Health Perspect.* **96**, 213–222 (1991)
34. Iwahashi Y., Hosoda H., Park J.H., Lee J.H., Suzuki Y., Kitagawa E., Iwahashi H.: Mechanisms of patulin toxicity under conditions that inhibit yeast growth. *J. Agr. Food. Chem.* **54**, 1936–1942 (2006)
35. Johnson E.A., Echavarrri-Erasun C.: Yeast Biotechnology. The Yeasts, a Taxonomic Study, 5th edn, Edited by Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. Amsterdam: Elsevier, 2011, s. 21–44
36. Kapanen A., Vikman M., Rajasärkkä J., Virta M., Itävaara M.: Biotests for environmental quality assessment of composted sewage sludge. *Waste Manag.* **33**, 1451–1460 (2013)
37. Kimura S., Tokumaru S., Kuge K.: *Eremothecium ashbyi* causes soybean yeast-spot and is associated with stink bug, *Riptortus clavatus*. *J. Gen. Plant. Pathol.* **74**, 275–280 (2008)
38. Klimiuk E., Lebkowska M.: Biotechnologia w ochronie środowiska. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 2004, s. 266
39. Kolle S.N., Melching-Kollmuss S., Krennrich G., Landsiedel R., van Ravenzwaay B.: Assessment of combinations of antiandrogenic compounds vinclozolin and flutamide in a yeast based reporter assay. *Regul. Toxicol. Pharm.* **60**, 373–380 (2011)
40. Komárek M., Čadková E., Chrástný V., Bordas F., Bollinger J.C.: Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environ. Int.* **36**, 138–151 (2010)
41. Kucharska K., Wachowska U.: Mikrobiom liści roślin. *Post. Mikrobiol.* **53**, 352–359 (2014)
42. Kurtzman C., Fell J.W., Boekhout T.: The yeasts: a taxonomic study. 5th edn, Edited by Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T., Elsevier, Amsterdam, 2011, s. 2080
43. Kurtzman C.P.: Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 325–332 (2014)
44. Kurtzman C.P., Robnett C.J.: Relationships among genera of the *Saccharomycotina* (*Ascomycota*) from multigene phylogenetic analysis of type species. *FEMS Yeast Res.* **13**, 23–33 (2013)
45. Lachance M.A., Kurtzman C.P.: The yeast genus *Tortispora* gen. nov., description of *Tortispora ganteri* sp. nov., *Tortispora mauiana* f. a., sp. nov., *Tortispora agaves* f. a., sp. nov., *Tortispora sangerardonensis* f. a., sp. nov., *Tortispora cuajimiquilana* f. a., sp. nov., *Tortispora starmeri* f. a., sp. nov. and *Tortispora phaffii* f. a., sp. nov., reassignment of *Candida caseinolytica* to *Tortispora caseinolytica* f. a., comb. nov., emendation of *Botryozyma*, and assignment of *Botryozyma*, *Tortispora* gen. nov. and *Trigonopsis* to the family *Trigonopsidaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 3104–3114 (2013)
46. Lamb J., Golub T.R. i wsp.: The connectivity map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science*, **313**, 1929–1935 (2006)
47. Lourenço A.B., Ascenso J.R., Sá-Correia I.: Metabolic insights into the yeast response to propionic acid based on high resolution 1H NMR spectroscopy. *Metabolomics*, **7**, 457–468 (2011)
48. Ludwig J., Schmitt M., Lichtenberg-Fraté H.: *Saccharomyces cerevisiae* as biosensor for cyto- and genotoxic activity. W: Atmospheric and Biological Environmental Monitoring, Springer Netherlands, 2009, s. 251–259
49. Mager W.H., Winderickx J.: Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**, 265–273 (2005)
50. Maroni M., Colosio C., Ferioli A., Fait A.: Biological monitoring of pesticide exposure: a review. *Toxicology*, **143**, 1–11 (2000)
51. Martin D., Brun C., Remy E., Mouren P., Thieffry D., Jacq B.: GOToolBox: functional analysis of gene datasets based on gene ontology. *Genome Biol.* **5**, R101 (2004)
52. Matejczyk M., Zalewski P.: Związki endokrynnie aktywne i ich aktywność biologiczna. *Kosmos*, **1–2**, 17–32 (2011)
53. McCarthy A.R., Thomson B.M., Shaw I.C., Abell A.D.: Estrogenicity of pyrethroid insecticide metabolites. *J. Environ. Monitor.* **8**, 197–202 (2006)
54. Morita T., Koike H., Koyama Y., Hagiwara H., Ito E., Fukuoka T., Imura T., Machida M., Kitamoto D.: Genome sequence of the Basidiomycetous yeast *Pseudozyma antarctica* T-34, a producer of the glycolipid biosurfactants mannosylerythritol lipids. *Genome Announcements*, **1**, e00064–13 (2013)
55. Murray K.E., Thomas S.M., Bodour A.A.: Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environ Pollut.* **158**, 3462–3471 (2010)
56. North M., Vulpe C.D.: Functional toxicogenomics: mechanism-centered toxicology. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 4796–4813 (2010)
57. Okubo T., Yokoyama Y., Kano K., Soya Y., Kano I.: Estimation of estrogenic and antiestrogenic activities of selected pesticides by MCF-7 cell proliferation assay. *Arch. Environ. Con. Tox.* **46**, 445–453 (2004)
58. Parsons A.B., Brost R.L., Ding H., Li Z., Zhang C., Sheikh B., Brown G.W., Kane P.M., Hughes T.R., Boone C.: Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat. Biotechnol.* **22**, 62–69 (2004)
59. Peterson S.W., Manitchotpisit P., Leathers T.D.: *Aureobasidium thailandense* sp. nov. isolated from leaves and wooden surfaces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 790–795 (2013)
60. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. dotyczącym dopuszczania do obrotu środków ochrony roślin.
61. Rumlova L., Dolezalova J.: A new biological test utilising the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the rapid detection of toxic substances in water. *Environ. Toxicol. Phar.* **33**, 459–464 (2012)
62. Sa-Correia I., Teixeira M.C.: 2D electrophoresis-based expression proteomics: a microbiologist's perspective. *Expert Rev. Proteomics*, **7**, 943–953 (2010)
63. Scherens B., Goffeau A.: The uses of genome-wide yeast mutant collections. *Genome Biol.* **5**, 229 (2004)
64. Schultis T., Metzger J.W.: Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). *Chemosphere*, **57**, 1649–1655 (2004)
65. Schwartz D.A., Freedman J.H., Linney E.A.: Environmental genomics: a key to understanding biology, pathophysiology and disease. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 217–224 (2004)
66. Simmons P.T., Portier C.J.: Toxicogenomics: the new frontier in risk analysis. *Carcinogenesis*, **23**, 903–905 (2002)
67. Smith A.M., Ammar R., Nislow C., Giaever G.: A survey of yeast genomic assays for drug and target discovery. *Pharmacol. Ther.* **127**, 156–164 (2010)

68. Stefani A., D'Arc Felicio J. de Andréa M.: Comparative assessment of the effect of synthetic and natural fungicides on soil respiration. *Sensore*, **12**, 3243–3252 (2012)
69. Taxvig C., Hass U., Axelstad M., Dalgaard M., Boberg J., Andersen H.R., Vinggaard A.M.: Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicological Sci.* **100**, 464–473 (2007)
70. Teixeira M.C., Duque P., Sá-Correia I.: Environmental genomics: mechanistic insights into toxicity of and resistance to the herbicide 2,4-D. *Trends Biotechnol.* **25**, 363–370 (2007)
71. Teixeira M.C., Raposo L.R., Mira N.P., Lourenço A.B., Sá-Correia I.: Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5761–5772 (2009)
72. Teixeira M.C., Santos P.M., Fernandes A.R., Sá-Correia I.: A proteome analysis of the yeast response to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Proteomics*, **5**, 1889–1901 (2005)
73. Teixeira M.C., Telo J.P., Duarte N.F., Sá-Correia I.: The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces the generation of free-radicals and associated oxidative stress responses in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 1101–1107 (2004)
74. Van Dijk R., Faber K.N., Kiel J.A., Veenhuis M., van der Klei I.: The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: a versatile cell factory. *Enzyme Microb. Tech.* **26**, 793–800 (2000)
75. Wachowska U., Głowacka K.: Antagonistic interactions between *Aureobasidium pullulans* and *Fusarium culmorum*, a fungal pathogen of winter wheat. *BioControl*, **59**, 635–645 (2014)
76. Wachowska U., Kucharska K., Jędryczka M., Łobik N.: Microorganisms as biological control agents against *Fusarium* pathogens in winter wheat. *Pol. J. Environ. Stud.* **22**, 591–597 (2013)
77. Wuster A., Madan Babu M.: Chemogenomics and biotechnology. *Trends Biotechnol.* **26**, 252–258 (2008)
78. Yeastgenome: yeastgenome.org, *Saccharomyces* Genome Database (01/01/2015)
79. Yurkov A.M., Kachalkin A.V., Daniel H.M., Groenewald M., Libkind D., de Garcia V., Zalar P., Gouliamova D.E., Boekhout T., Begerow D.: Two yeast species *Cystobasidium psychroaquaticum* f.a. sp. nov. and *Cystobasidium rietchieii* f.a. sp. nov. isolated from natural environments, and the transfer of *Rhodotorula minuta* clade members to the genus *Cystobasidium*. *A Van Leeuw. J. Microb.* **107**, 173–185 (2015)
80. Zalar P., Gostinčar C., de Hoog G.S., Uršič V., Sudhaham M., Gunde-Cimerman N.: Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Stud. Mycol.* **61**, 21–38 (2008)
81. Zhou Y., Shie F.S., Piccardo P., Montine T.J., Zhang J.: Proteasomal inhibition induced by manganese ethylene-bis-dithiocarbamate: relevance to Parkinson's disease. *Neuroscience*, **128**, 281–291 (2004)