

9. Воробьева Л.И. Стрессоры, стрессы и выживаемость бактерий (обзор) / Л.И. Воробьева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т.40, № 3. – С. 261–269.
10. Коржов В.И. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты / В.И. Коржов, В.Н. Жадан, М.В. Коржов // Журн. АМН України. – 2007. – Т.13, № 1. – С. 3–19.
11. Подкопаева Д.А. Окислительный стресс и системы защиты клеток у микроаэрофильных бактерий *Spirillum winogradskii* / Д.А. Подкопаева, М.Ю. Грабович, Г.А. Дубинина // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 5. – С. 600–608.
12. Транспортування флуоресцеїну та антиоксидантна система дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* за дії кислотного стресу / Абрам О.Б., Семчишин Г.М., Медзобродські Я., Лушак В.І. // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т.80, № 3. – С. 70–77.
13. Лушак В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий (обзор) / В.И. Лушак // Биохимия. – 2001. – Т.66, Вып.5. – С. 592–609.
14. Свободные радикалы ртути-резистентных бактерий как индикаторы нового метаболического пути / [Островский Д.Н., Демина Г.Р., Бинюков В.И. и др.] // Микробиология. – 2003. – Т.72, №5. – С. 594–599.
15. Степаненко Б.Н. Курс органической химии / Б.Н. Степаненко. – М.: Высш. шк., 1981. – 464 с.
16. Петров А.А. Органическая химия: учеб. для вузов / Петров А.А., Бальян Х.В., Трощенко А.Т. – М.: Иван Федоров, 2002. – 624 с.
17. Горишний М.Б. Рост *Chlorobium limicola* Y-2002 при разных условиях культивирования / М.Б. Горишний, С.П. Гудзь, С.А. Гнатуш // Мікробіологія і біотехнологія. – 2008. – №1. – С. 56–57.

УДК 57.018.6 : 579.26 : 546. 4/7

ПІГМЕНТОСИНТЕЗОВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ДРІЖДЖІВ *RHODOTORULA AURANTIACA* 1193 В УМОВАХ «МЕТАЛЕВОГО СТРЕСУ»

Рильський О.Ф., д.б.н., доцент, Крупей К.С., аспірант

Запорізький національний університет

Стаття присвячена дослідженню впливу іонів Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} та Al^{3+} на синтез пігментів у дріжджів *Rhodotorula aurantiaca* 1193. Встановлено, що між повним інгібуванням синтезу пігменту та відсутністю росту існує певний концентраційний інтервал, що надає можливість використовувати дріжджі *Rhodotorula aurantiaca* 1193 для досліджень в області біоіндикації забруднення довкілля важкими металами.

Ключові слова: пігментосинтезувальні дріжджі, ріст, іони важких металів.

Рильский А.Ф., Крупей К.С. ПИГМЕНТСИНТЕЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ *RHODOTORULA AURANTIACA* 1193 В УСЛОВИЯХ «МЕТАЛЛИЧЕСКОГО СТРЕССА» / Запорожский национальный университет, Украина

Статья посвящена исследованию влияния ионов Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} и Al^{3+} на синтез пигментов у дрожжей *Rhodotorula aurantiaca* 1193. Установлено, что между полным ингибированием синтеза пигмента и отсутствием роста существует определенный концентрационный интервал, что дает возможность использовать дрожжи *Rhodotorula aurantiaca* 1193 для исследований в области биоиндикации загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами.

Ключевые слова: пигментсинтезирующие дрожжи, рост, ионы тяжелых металлов.

Rylsky A.F., Krupcey K.S. PIGMENT-SYNTHESIZING ACTIVITY OF *RHODOTORULA AURANTIACA* 1193 YEAST IN CONDITIONS OF «METALLIC STRESS» / Zaporizhzhya National University, Ukraine
 The article presents investigation of the ions Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} and Al^{3+} influence on the synthesis of pigments of the *Rhodotorula aurantiaca* 1193 yeast. Found that between the total pigment synthesis inhibition and lack of growth there is a certain concentration range, which makes possible to use *Rhodotorula aurantiaca* 1193 yeast for bioindication researches of pollution with heavy metals.

Key words: pigment-synthesizing yeast, growth, ions of heavy metals.

ВСТУП

У наш час однією з найголовніших екологічних проблем є накопичення важких металів (ВМ) у навколишньому природному середовищі, основними джерелами надходження яких є металургія і гальванічні цехи промислових підприємств [1]. Це зумовлює потребу в пошуку надійних експрес-методів індикації забруднення, одним з яких є використання мікроорганізмів як біоіндикаторів. Вони здатні руйнувати сполуки як природного, так і антропогенного походження. Саме на цьому базується принцип біоіндикації з їх використанням. Останнім часом проводяться дослідження із застосуванням мікроорганізмів як «біосенсорів», тобто для моніторингу іонів ВМ у навколишньому середовищі [2].

Проведені попередні дослідження на прокаріотах [3], зацікавили нас дослідити вплив ВМ на пігментосинтезувальну здатність дріжджових клітин. Розглядаючи функціональне значення каротиноїдів, слід зауважити, що певним групам дріжджів відповідає специфічний набір цих пігментів, який, можливо, пов'язаний із роллю, яку вони виконують у клітині. Так, якісний склад каротиноїдів досліджуваного нами штаму *Rhodotorula aurantiaca* 1193 характеризується наявністю γ -, β -каротинів [4]. Яскравість та стійкість пігментів-каротиноїдів цього штаму спонукає дослідити вплив на нього іонів ВМ.

Отже, метою роботи було дослідити вплив ВМ, а саме Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} та Al^{3+} на синтез пігментів у дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193 з можливістю рекомендації щодо його застосування у біоіндикаційних дослідженнях забруднення довкілля ВМ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження були пігментосинтезувальні дріжджі *Rhodotorula aurantiaca* 1193, люб'язно надані нам із колекції музейних культур Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Тверде поживне середовище Сабуро готували на основі води з певним вмістом солей ВМ. Контролем слугувало поживне середовище Сабуро без металів. Після застигання середовища на нього суцільним газоном засівали 18-годинну колекційну культуру *Rh. aurantiaca* 1193 (0,2 мл на 1 чашку Петрі). Щільність клітин становила 10^7 /мл [5]. Інкубування проводили в термостаті при температурі 27-28°C. Облік результатів проводили на 3 добу культивування. Спостерігали візуально, порівнюючи дослідні зразки з контролем. Для розрахунку різниці в інтенсивності кольору між дослідними і контрольними зразками чашки Петрі з дріжджовими колоніями фотографували, розміщали фотографії у комп'ютерну програму Adobe Photoshop, визначали показники каналів кольорової моделі (Lab), потім у програмі CIEDE 2000 розраховували різницю в інтенсивності кольору пігменту [6]. Використовували водні модельні розчини, які містили такі іони ВМ, як Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} та Al^{3+} . Солі, які використовували в досліджах: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CdCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження щодо впливу ВМ на життєдіяльність дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193 показали, що дріжджі реагують на присутність у середовищі ВМ затримкою росту та пігментоутворення (табл. 1-4).

Таблиця 1 – Вплив іонів Cu^{2+} , Zn^{2+} та Cd^{2+} на ріст і пігментування дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193

Концентрація іонів важких металів, мг/дм ³	Cu^{2+}		Zn^{2+}		Cd^{2+}	
	Ріст*	Пігмент**	Ріст	Пігмент	Ріст	Пігмент
Контроль	++++	++++	++++	++++	++++	++++
10	++++	++++	++++	++	+++	++
20	+++	+++	+++	+	++	-
50	++	++	+++	±	+	-
70	++	+	+	-	+	-
100	++	-	+	-	+	-
150	++	-	+	-	+	-
200	+	-	-	-	+	-
225	-	-	-	-	-	-

Примітка тут та далі: *ріст: +++++ – суцільний, +++ – добрий, ++ – помірний, + – слабкий, - – відсутній; **пігментування: +++++ – інтенсивне, +++ – добре, ++ – помірне, + – слабке, - – відсутнє, ± – наявність пігментних та безпігментних колоній.

Таблиця 2 – Вплив іонів Cr^{6+} , Ni^{2+} та Al^{3+} на ріст і пігментування дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193

Концентрація іонів важких металів, мг/дм ³	Cr^{6+}		Ni^{2+}		Al^{3+}	
	Ріст	Пігмент	Ріст	Пігмент	Ріст	Пігмент
Контроль	++++	++++	++++	++++	++++	++++
10	+++	±	+++	++	++++	++++
20	+	-	+++	+	++++	+++
50	-	-	++	-	+++	++
75	-	-	+	-	+++	++
100	-	-	+	-	+++	+
125	-	-	-	-	+++	+
150	-	-	-	-	++	+
250	-	-	-	-	++	-
350	-	-	-	-	++	-
450	-	-	-	-	+	-
500	-	-	-	-	-	-

Таблиця 3 – Оцінка інтенсивності кольорів на концентраційний ряд Cu^{2+} , Zn^{2+} та Cd^{2+} у дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193

Концентрація металу, мг/дм ³	Cu^{2+}				Zn^{2+}				Cd^{2+}			
	L	a	b	dE	L	a	b	dE	L	a	b	dE
Контроль	36	29	35		38	25	34		38	25	34	
10	38	31	42	3,3±0,09	43	6	32	13,8±0,1	47	8	29	13,7±0,6
20	44	22	33	8,0±0,2	51	15	46	16,0±1,3	54	17	10	20,0±2,6
50	46	15	41	13,9±0,7	53	10	28	17,0±0,7	53	5	31	19,8±1,1
70	44	6	34	17,0±0,7	54	17	10	20,0±0,2	53	3	30	20,9±0,1
100	53	10	31	19,8±1,3	51	3	40	20,8±0,04	53	3	29	20,8±0,06
150	56	16	18	21,0±1,2	51	4	39	20,0±0,02	53	2	30	21,5±1,2
200	56	18	15	21,5±1,9	-	-	-	-	54	17	10	20,0±0,9

Примітка тут та далі: L, a, b – показники каналів кольорової моделі CIE Lab; dE – різниця в інтенсивності кольору між контролем і дослідом, розрахована за допомогою комп'ютерної програми CIEDE 2000.

Таблиця 4 – Оцінка інтенсивності кольорів на концентраційний ряд Cr^{6+} , Ni^{2+} та Al^{3+} у дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193

Концентрація металу, мг/дм ³	Cr^{6+}				Ni^{2+}				Al^{3+}			
	L	a	b	dE	L	a	b	dE	L	a	b	dE
Контроль	34	26	37		39	29	36		38	28	35	
10	39	2	33	16,9±1,0	48	17	44	13,1±1,1	44	32	44	6,3±0,4
20	53	15	51	21,0±2,2	50	15	49	16,5±0,9	46	23	40	8,7±0,08
50	-	-	-	-	53	13	55	20,1±1,2	49	21	48	13,6± 0,8
75	-	-	-	-	55	6	26	21,0±0,7	49	21	49	13,9± 1,3
100	-	-	-	-	53	5	33	20,8±0,06	54	35	52	16,5± 0,2
125	-	-	-	-	-	-	-	-	44	4	32	17,0± 0,04
150	-	-	-	-	-	-	-	-	42	4	34	16,9± 1,1
250	-	-	-	-	-	-	-	-	56	9	22	20,7± 0,7
350	-	-	-	-	-	-	-	-	56	9	25	20,8± 1,0
450	-	-	-	-	-	-	-	-	56	10	14	21,1± 0,9

Втрата здатності до утворення пігменту та поява безпігментних колоній у культури *Rh. aurantiaca* 1193 спостерігалася при концентраціях на 50-90 % нижче рівня тих концентрацій ВМ, за яких відбувалося повне інгібування росту дріжджових клітин. Так, у випадку з іонами Cu^{2+} та Zn^{2+} ця різниця дорівнювала 50 та 53,4 % відповідно, а з Cd^{2+} досягла 90 %.

При дослідженні впливу іонів Cu^{2+} на життєдіяльність дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193 виявилось, що на 3 добу культивування концентрація іонів міді 20 мг/л у середовищі слабо пригнічувала ріст і синтез пігменту. При концентрації 50-70 мг/л купруму колонії були молочною кольору, але верхівка мала темно-коричневе забарвлення, а при 100-200 мг/л з'являлися тільки безпігментні колонії.

Іони Zn^{2+} також мали здатність затримувати ріст і пігментоутворення в дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193. Пригнічення пігментоутворення спостерігалось з концентрації 10-20 мг/л цинку. Починаючи з концентрації 50 мг/л іонів Zn^{2+} на 3 добу спостерігався майже суцільний ріст пігментних та безпігментних колоній, а концентрації 70-150 мг/л цинку викликали помітне пригнічення росту та синтезу пігменту, колонії мали напівпрозорий та молочний колір.

Найбільш яскраве інгібування росту та пігментоутворення у дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193 було відмічено в присутності в середовищі іонів Cd^{2+} , затримку росту та повну втрату пігменту спостерігали при концентраціях 20-200 мг/л іонів кадмію.

Результати досліджень із впливу іонів Cr^{6+} , Ni^{2+} та Al^{3+} на ріст і пігментоутворення *Rh. aurantiaca* 1193 показали, що найбільш токсичну дію на життєдіяльність дріжджів спричинив $\text{Cr}(\text{VI})$, який, як відомо, є набагато токсичніше хрому (III). При 20 мг/л іонів хрому подекуди спостерігався ріст безпігментних колоній. Повна втрата пігменту спостерігалася при концентраціях Ni^{2+} та Al^{3+} , що на 50 і 44,5 % відповідно нижчі за ті, які повністю блокували життєдіяльність дріжджів.

Помітне пригнічення пігментоутворення спостерігалось при концентрації 10 мг/л у середовищі іонів нікелю, а при 50 мг/л та вище, разом зі зменшенням кількості колоній, культура втрачала здатність синтезувати пігмент.

Найбільш стійкими дріжджі *Rh. aurantiaca* 1193 виявилися відносно $\text{Al}(\text{III})$. З концентрації 50 мг/л помітно знижувався синтез пігменту, який повністю блокувався при 250 мг/л іонів алюмінію в середовищі. Ріст помітно зменшувався, починаючи з 150 мг/л іонів Al^{3+} .

Отже, з даних таблиць 3-4 видно, що з підвищенням концентрації певного металу в середовищі, зростала різниця в інтенсивності пігментоутворення між контролем та дослідом. Так, при концентрації 10 мг/л Cu^{2+} спостерігався суцільний ріст рожевих колоній, як і в контролі, тому різниця в інтенсивності кольорів дослідного і контрольного зразків становила $3,3 \pm 0,09$, а при 100 мг/л колоній були безпігментні (dE дорівнювала $19,8 \pm 1,3$). Теж саме ми спостерігали і для інших концентрацій металів: при концентраціях 70, 20, 20, 50, 250 мг/л Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} та Al^{3+} відповідно починався ріст безпігментних колоній (dE варіювала в межах $20,0 \pm 0,2$ до $21,0 \pm 2,2$).

Отже, дослідження показали, що культура *Rh. aurantiaca* 1193 здатна реагувати на присутність у середовищі ВМ пригніченням росту та пігментоутворення, внаслідок чого виявляється цікавим подальше дослідження пігментосинтезувальних дріжджів із метою можливого їх використання в біоіндикаційних дослідженнях.

ВИСНОВКИ

1. Дослідження показали, що найбільш токсичним ВМ для дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193 виявився Cr^{6+} (пігментоутворення блокувалося при концентрації 20 мг/л), стійкими дріжджі виявилися відносно Al^{3+} (тільки при концентрації 250 мг/л дріжджі втрачали здатність до синтезу пігменту).
2. Встановлено, що повна втрата пігменту спостерігалася при концентраціях Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} та Al^{3+} , що на 44,5-90 % відповідно нижчі за тих, які повністю інгібували життєдіяльність дріжджів *Rh. aurantiaca* 1193.
3. Отримані результати надають можливість рекомендувати дріжджі *Rh. aurantiaca* 1193 для біоіндикаційних досліджень ступеня забруднення довкілля ВМ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гаранин Р.А. Метод биосорбции тяжелых металлов из промышленных сточных вод с использованием пивоваренных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* : автореф. дис. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук : 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнология)» / Р.А. Гаранин. – М., 2011. – 25 с.
2. Рильський О.Ф. Вплив іонів важких металів на пігментсинтезуючу здатність бактерій / О.Ф. Рильський, П.І. Гвоздяк // Доповіді НАН України. – 2007. – № 1. – С. 161-164.
3. Патент на винахід № 75513, МПК (2006). Спосіб визначення забруднення оточуючого середовища металами / Рильський О. Ф., Гвоздяк П. І., Шевчук І.А., заявник та патентовласник Запорізький державний університет. – № 20040706208; заявл. 26.07.2004; опубл. 17.04.2006, Бюл. № 4, 2006 р.
4. Каротин-синтезирующие дрожжи / [Квасников Е. И., Васкивнюк В. Т., Суденко В.И., Гринберг Т. А.]. – К. : Наукова думка, 1980. – 170 с.
5. Стандартизація приготування мікробних суспензій : Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006. – К. : Укрмедпатентінформ, 2006. – 5 с. – (Нормативний документ. МОЗ України; Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. Інформаційний лист).
6. Патент на корисну модель № 49812 Україна, МПК (2009), С12Q 1/00, С12M 1/00, С12M 1/34. Спосіб визначення інтенсивності пігментоутворення у бактерій / Рильський О. Ф., Домбровський К. О., Гороховський Є. Ю., Жиленко А. В.; заявник і патентовласник ЗНУ. – № u200912311; заявл. 30.11.2009; опубл. 11.05.2010, Бюл. № 9, 2010 р.