

УДК 582.282.23:546.56

СКРИНІНГ ПІГМЕНТОСИНТЕЗУВАЛЬНИХ ДРІЖДЖІВ-БІОІНДИКАТОРІВ ІОНІВ МІДІ (II)

Крупей К.С., Місірук М.О., Рильський О.Ф.

*Запорізький національний університет
69600, Україна, м. Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

krupeyznu@gmail.com

Повна втрата пігменту в дріжджів *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* та *Sporobolomyces* спостерігалася при концентраціях міді (II), що на 14,3-58,3% нижчі за ті концентрації, які повністю інгібували ріст дріжджових клітин. Проведений скринінг пігментосинтезувальних дріжджів під впливом іонів міді (II) для біоіндикаційних досліджень. Рекомендовані для використання в біоіндикації культури каротиносинтезувальних дріжджів, а саме: *Rh. aurantiaca* Y-1193, *Rh. glutinis* Y-1335, *Rh. mucilaginoso* Y-1394, які мали найбільші концентраційні інтервали між втратою пігменту та затримкою росту і втрачали здатність повністю синтезувати каротиноїди при концентраціях 100, 250, 250 мг/дм³ іонів Cu²⁺ відповідно. Розрахунки різниці між кольором пігменту в контрольних і досліджуваних зразках (dE) показали, що чим більше концентрація міді в середовищі, тим більше значення dE. Встановлено, що дріжджі *Rh. glutinis* Y-1335, які зазнали впливу 250 мг/дм³ іонів Cu²⁺, володіли здатністю поновлювати синтез пігменту при пересіві їх на твердне поживне середовище Сабуро без металу, а після повернення їх знову в токсичне середовище (з більшими концентраціями міді) підвищувався поріг виживання та синтезу пігменту.

Ключові слова: мідь, пігментосинтезувальні дріжджі, каротиноїди, біоіндикація.

СКРИНІНГ ПІГМЕНТСИНТЕЗУЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ-БИОИНДИКАТОРОВ ИОНОВ МЕДИ (II)

Крупей К.С., Мисирук М.А., Рильский А.Ф.

*Запорожский национальный университет
69900, Украина, г. Запорожье, ул. Жуковского, 66,*

krupeyznu@gmail.com

Полная потеря пигмента у дрожжей *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* и *Sporobolomyces* наблюдалась при концентрациях меди (II), что на 14,3-58,3% ниже тех концентраций, которые полностью ингибировали рост дрожжевых клеток. Проведен скрининг пигментсинтезирующих дрожжей под влиянием ионов меди (II) для биоиндикационных исследований. Рекомендованы для использования в биоиндикации культуры каротинсинтезирующих дрожжей, а именно: *Rh. aurantiaca* Y-1193, *Rh. glutinis* Y-1335, *Rh. mucilaginoso* Y-1394, которые имели наибольшие концентрационные интервалы между потерей пигмента и задержкой роста и утрачивали способность полностью синтезировать каротиноиды при концентрациях 100, 250, 250 мг/дм³ ионов Cu²⁺ соответственно. Расчеты разницы между цветом пигмента в контрольных и опытных образцах (dE) показали, что чем больше концентрация меди в среде, тем больше значение dE. Установлено, что дрожжи *Rh. glutinis* Y-1335, которые поддавались влиянию 250 мг/дм³ ионов Cu²⁺, владели способностью возобновлять синтез пигмента при пересеве их на твердую питательную среду Сабуро без металла, а после возвращения их снова в токсическую среду (с большими концентрациями меди) повышался порог выживания и синтеза пигмента.

Ключевые слова: медь, пигментсинтезирующие дрожжи, каротиноиды, биоиндикация.

SCREENING OF PIGMENT-SYNTHESIZING YEAST-BIOINDICATORS IONS OF COPPER (II)

Krupey K.S., Misiruk M.A., Rylsky O.F.

*Zaporizhzhya National University
69900, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovskiy str. 66*

krupeyznu@gmail.com

Carotenoid biosynthesis is a specific feature of the *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* and *Phaffia* genera. The best known function of carotenoids, such as α -carotene, β -carotene, β -cryptoxanthin, torulene and torularhodin, is acting as provitamin A. β -carotene possesses the highest provitamin A activity. The application of carotenoids as natural pigments in food and forages is a well-known practice. Carotenoids, and especially β -carotene, also act as antioxidants by reacting with active oxygen species and as anti-carcinogenic agents. For effective carotenogenesis, of vital importance is the use of: inexpensive alternative

carbohydrate sources found in natural substrates, which typically are by-products from various industries and tend to contaminate the environment; and strain-producers of high carotenoid-synthesizing activity.

Main sources of heavy metals (HM), polluting environment, are metallurgy and galvanic shops of the industrial enterprises. That is why the search for effective methods of environment pollution indications by heavy metals has taken the first place recently. The surest and the most available methods of the anthropogenic violations diagnosis are based on a number of microbiological characteristics, because among all the representatives of the biota, microorganisms are the most sensitive to change of the medium.

These heavy metals influence the microbial population by affecting their growth, morphology, biochemical activities and ultimately resulting in decreased biomass and diversity. Heavy metals can damage the cell membranes, alter enzymes specificity, disrupt cellular functions and damage the structure of the DNA. Toxicity of these heavy metals occurs through the displacement of essential metals from their native binding sites or through ligand interactions. Also, toxicity can occur as a result of alterations in the conformational structure of the nucleic acids and proteins and interference with oxidative phosphorylation and osmotic balance.

So, the usage of the pigment synthesizing bacteria as bioindicators is a new and promising tendency. Visual observation of the change of the pigment brightness under the influence of HM may serve as objective bioindicator of the environment pollution. Thus, researches of the bacteria that we carried out aroused our interest to the research of the HM influence on the pigment-synthesizing ability of the yeasts. In the literature accessible for us is mentioned only the fact that yeasts have the ability to sorb HM, and there is little information about the ability to change the pigment color in HM presence in the medium. As is known, exceeding of the HM concentrations in nature has an adverse effect on the ecological state of the environment, which may lead to the malfunction of physiological and biochemical processes taking place in living organisms. And the surest and the most available methods of the anthropogenic violations diagnosis are based on a number of microbiological characteristics, because among all the representatives of the biota, microorganisms are the most sensitive to change of the medium. Thus, the aim of our study was to investigate the influence of Cu^{2+} (as a matter of priority and toxic environmental pollutants) on the pigment synthesis of the yeasts.

The object of the research was pigment synthesizing yeasts *Rhodotorula Rhodosporidium*, *Sporobolomyces* genus. Solid nutrient medium Sabouraud was prepared on the base of the water with certain Cu^{2+} (salt-copper dichloride) concentrations. Nutrient medium Sabouraud without metals was used as a control. When Sabouraud set congeal, 18-days cultures was seeded by solid lawn on it (0,2 ml per one Petri dish). Suspension density was 10^7 c./ml. Yeasts incubated in the thermostat under the temperature 27-28 °C. Results were calculated on the 3^d days of the cultivation. Visual observation and comparison of the experimental samples with the control was carried out. For the calculation of the color intensity difference between experimental and control samples, the Petri dishes with yeasts colonies were photographed, photos were loaded in the program Adobe Photoshop, indexes of the color model channels (Lab), and then the difference of the pigment color intensity was calculated in the program CIEDE 2000.

Complete loss of pigment in the yeast *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Sporobolomyces* was observed at concentrations of copper that 14,3-58,3% respectively below those concentrations which completely blocked the growth of yeast cells.

Screening pigment-synthesizing yeast under the influence of copper (II) ions for bioindication research was studied.

Recommended for use in bioindication culture carotenoid-synthesizing yeast, namely: *Rh. Aurantiaca* Y-1193, *Rh. glutinis* Y-1335, *Rh. mucilaginoso* Y-1394, which had the greatest concentration intervals between loss of pigment and delayed growth and lost the ability to completely synthesize carotenoids with concentrations of 100, 250, 250 mg/dm³ Cu^{2+} , respectively.

Found, that yeast *Rh. glutinis* Y-1335 impacted 250 mg/dm³ Cu^{2+} have the ability to renew the synthesis of pigment in reseeding them on nutrient medium Sabouraud without metal, and after returning them again in a toxic nutrient medium, with larger concentrations of copper raised the threshold of survival and synthesis of pigment.

Key words: copper, pigment-synthesizing yeasts, carotenoids, bioindication.

ВСТУП

Через недосконалі системи водокористування більша частина забраної природної води, після її використання для господарсько-побутових та промислових потреб, повертається у водойми у вигляді стічних вод, що зумовлює забруднення гідросфери. У зв'язку з цим актуальним і перспективним є розширення біоіндикаційного напрямку в моніторингу

стану водних об'єктів, оскільки інструментальні методи дослідження не є оптимальними для оцінки стану довкілля [1]. Для біоіндикації необхідно обирати найбільш чуттєві угруповання, які характеризуються максимальною швидкістю відгуку та вираженістю параметрів. Серед таких біоіндикаторів слід назвати мікроорганізмів, які найбільш швидко реагують на зміни навколишнього середовища [2-4].

Одними з головних забруднювачів навколишнього природного середовища, зокрема водних об'єктів, є важкі метали (ВМ). Серед джерел надходження ВМ у водні екосистеми виділяють природні (продукти абразії берегів і русла водоймищ; води приток), змішані (атмосферні опади) та антропогенні (різноманітні промислові виробництва) [5]. Одним із найбільш небезпечних забруднюючих металів є мідь (Cu^{2+}). У фізіологічних нормах мідь є життєво важливим мікроелементом, виконує роль кофактора таких важливих ферментів, як цитохромоксидаза, поліфенілоксидаза, аміноаскорбінооксидаза; мідьвмісні білки беруть участь у процесах дихання, транспорті заліза, захищають клітини від вільних радикалів. Порівняно з іншими іонами металів життя, іони міді активно реагують з амінокислотами і білками, утворюючи стійкі комплекси. Мідь здатна переходити із одного ступеня окиснення в інший, що сприяє прояву окисно-відновних функцій її з'єднань. Вміст міді в рослинних організмах у середньому у 2 рази вищий, ніж в організмах тварин, але на порядок нижчий, ніж у ґрунті. За даними різних авторів, в організмі дорослої людини міститься від 72 до 150 мг міді, з них 30% знаходиться в м'язових тканинах [6, 7].

Проте у великих концентраціях мідь є досить токсичним елементом та має властивість накопичуватись у живих організмах. Вона вибірково депонується в головному мозку, а її надлишок в їжі людини призводить до хвороби Вільсона [7]. Встановлено, що за дії високих концентрацій іонів купруму на вищу водну рослинність, знижується кількість хлорофілу до 28-89%, каротиноїдів – до 70%, що може стати причиною зміни інтенсивності фотосинтезу [8]. Вважають, що двократне перевищення концентрації міді в рослинах може спричинити розвиток хлорозу та некрозу [9].

Стічні води металургійних, машинобудівних, хіміко-фармацевтичних підприємств можуть містити до 400-500 мг/дм³ міді [10]. Основними джерелами надходження міді є підприємства кольорової металургії (промислові викиди, стічні води, відходи), транспорт, мідьвмісні добрива і пестициди, процеси зварки, гальванізація, спалювання водневого палива в різних ланках промисловості. Річний об'єм техногенного потрапляння міді в навколишнє середовище складає: в атмосферу – 56 тис. т, з відходами – 77 тис. т, з добривами – 94 тис. т. Хімічні підприємства викидають на поверхню Землі щорічно до 155 тис. т міді. Кам'яне вугілля містить близько 15 мг/кг іонів купруму, але в деяких видах вугільного пилу вміст міді може досягати 340 мг/кг. При спалюванні вугілля та нафти в атмосферу щорічно потрапляє близько 2100 т іонів купруму [11].

Останнім часом все більше привертають увагу дослідників дріжджові клітини. Саме вони є потенційними сорбентами багатьох ВМ: Cu, Zn, Mn, Cr, Cd, Pb, Ag, Ca, U, Co. Велика кількість цих металів може виводитись із розчину, оскільки з'єднується з клітинною стінкою дріжджів [12, 13].

Механізм сорбції міді клітинами дріжджів полягає у взаємодії між її іонами та нуклеїновими кислотами і ферментами. Однак основним механізмом її дії є руйнування цілісності цитоплазматичної мембрани [14, 15]. Учені встановили, що найбільш стійким до високих концентрацій міді є пігментований штам *Rhodotorula aurantiaca* Y-1195 (ріст спостерігався навіть при концентрації 500 мг/дм³ міді) [16]. Слід зазначити, що результати наших досліджень підтвердили цей факт. Але автори цих і багатьох інших робіт не звертали увагу на можливість використання пігментосинтезувальних дріжджів у біоіндикаційних дослідженнях, а факти блокування синтезу пігменту в присутності ВМ викладено у вигляді коротких несистемних повідомлень [17].

Отже, метою роботи було проведення скринінгу пігментосинтезувальних дріжджів для біоіндикаційних досліджень за умов забруднення середовища іонами міді (II).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дріжджі *Rhodotorula rubra* RA-10 (виділені співробітниками Інституту колоїдної хімії і хімії води ім. А.В. Думанського НАН України), *Rh. aurantiaca* Y-1193, *Rh. aurantiaca* Y-1195, *Rhodospiridium sphaerocarpum* Y-44, *Rh. glutinis* Y-1333, *Rh. glutinis* Y-1335, *Rh. mucilaginosa* Y-1394, *Rh. mucilaginosa* Y-1395, *R. diobovatum* Y-42, *R. diobovatum* Y-43, *Sporobolomyces roseus* Y-1443, *Sp. roseus* Y-1444, *Metschnikowia pulcherrima* Y-332 та *M. pulcherrima* Y-333 (надані нам із колекції музейних культур Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України) культивували на твердому поживному середовищі Сабуро, яку готували на основі води з певним вмістом Cu^{2+} (у солі $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Контролем слугувало поживне середовище без металів. Культуру засівали суцільним газоном по 0,2 мл на 1 чашку Петрі. Щільність суспензії становила 10^7 кл./мл. Дріжджі інкубували в термостаті при температурі 28°C , протягом трьох днів. На останню добу культивування візуально проводили облік результатів, порівнюючи дослідні зразки з контролем. Для розрахунку різниці в інтенсивності кольору пігменту (dE) між дослідними чашками та контролем дріжджові колонії фотографували, розміщали фотографії в комп'ютерну програму Adobe Photoshop. Потім визначали показники каналів кольорової моделі (Lab) і в програмі CIEDE 2000 розраховували різницю кольору пігменту [18]. Статистичну обробку проводили за допомогою комп'ютерних програм «Microsoft Office Excel 2007» і «Statistica 10».

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Токсичність міді підвищується при зниженні жорсткості води, температури та вмісту кисню. Відомо, що хлорид міді спричиняє найбільш токсичний вплив на пігментосинтезувальні дріжджі *Rhodotorula aurantiaca* Y-1193 та *Rh. glutinis* Y-1335, порівняно з іншими її аніонами [19]. Тому цікавим було дослідити вплив іонів міді (II) у складі хлориду на інших пігментосинтезувальних дріжджах із метою можливого їх використання в біоіндикаційних дослідженнях за умов забруднення довкілля Cu^{2+} .

Повна втрата пігменту в дріжджів *Rh. rubra* RA-10, *Rh. aurantiaca* Y-1193, *Rh. aurantiaca* Y-1195 та *Rhodospiridium sphaerocarpum* Y-44 спостерігалася при концентраціях міді, що на 14,3, 50, 30, 16,7% відповідно нижчі за ті концентрації, які повністю блокували ріст дріжджових клітин (табл. 1 та рис. 1).

Найбільш чутливими до дії іонів міді виявилися дріжджі *Rh. aurantiaca* Y-1193, синтез пігменту повністю блокувався при концентрації Cu^{2+} 100 мг/дм^3 . Культура *Rh. aurantiaca* Y-1193 мала найбільший концентраційний інтервал (KI) між втратою пігменту та інгібуванням росту (50%), внаслідок чого її можна рекомендувати використовувати в біоіндикаційних дослідженнях при забрудненні середовища іонами міді (II). Такий вплив, можливо, пояснюється тим, що *Rh. aurantiaca* Y-1193 синтезує менший спектр каротиноїдних пігментів (γ - β -каротини) [20], порівняно з іншими культурами, які стають «пастками» потоку вільних радикалів при ураженні клітини металом. Найменший токсичний вплив Cu^{2+} спричинив на каротиносинтезувальні дріжджі *Rh. rubra* RA-10 (пігментоутворення починало блокуватися лише за концентрації 600 мг/дм^3 міді). KI також був найнижчим у *Rh. rubra* RA-10 – 14,3%, що в 3,5 рази менше, ніж у *Rh. Aurantiaca* Y-1193.

На відміну від біотехнологічних виробництв, де існує необхідність вагової оцінки кількості пігменту, що синтезується, у галузі охорони довкілля при оцінці впливу антропогенних чинників на мікроорганізми-індикатори достатньо провести відносне оцінювання інтенсивності пігменту мікроорганізму, який зазнав впливу такого чинника,

до контрольної культури і виразити це відношення в об'єктивних одиницях. Тому різницю в інтенсивності кольору пігменту ми визначали між контрольними культурами дріжджів і тими, які піддали впливу Cu^{2+} (приклад розрахунків представлений на рис. 2 та в табл. 2). Чим більша різниця між кольором пігменту (dE) в контрольному і досліджуваному зразку, тим більше значення dE. Колір пігменту дріжджових клітин мав здатність поновлюватися на 6 та 9 добу культивування, разом із збільшенням кількості колоній. При мікроскопіюванні колоній із відновленим синтезом каротиноїдів (об'єктив зі збільшенням $\times 40$) було відмічено слабко-рожеве забарвлення їхньої верхівки та безбарвне підніжжя. Пігментовану верхівку колоній можна пояснити вторинним ростом дріжджових клітин, які не контактували із токсичним поживним середовищем.

Таблиця 1 – Вплив іонів Cu^{2+} на синтез пігментів у дріжджів *Rhodotorula rubra* RA-10, *Rh. aurantiaca* Y-1193 та *Rh. aurantiaca* Y-1195, *Rhodospiridium sphaerocarpum* Y-44

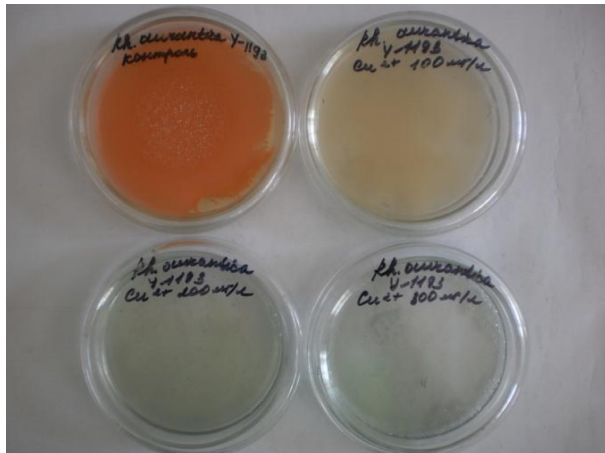
Концентрація іонів Cu^{2+} , мг/дм ³	<i>Rh. rubra</i> RA-10		<i>Rh. aurantiaca</i> Y-1193		<i>Rh. aurantiaca</i> Y-1195		<i>R. sphaerocarpum</i> Y-44	
	Р*	П**	Р	П	Р	П	Р	П
Контроль	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
20	++++	++++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
50	++++	++++	++	++	+++	±	++++	++++
100	++++	++++	++	-	+++	±	++++	++++
150	++++	++++	++	-	+++	±	++++	++++
200	++++	++++	+	-	+++	±	++++	++++
250	+++	++++	-	-	+++	±	++++	++++
300	++	+++	-	-	++	±	+++	±
350	++	+++	-	-	++	-	+++	±
375	++	+++	-	-	+	-	++	±
500	++	++	-	-	+	-	++	-
600	+	-	-	-	-	-	+	-
700	+	-	-	-	-	-	-	-
800	-	-	-	-	-	-	-	-

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

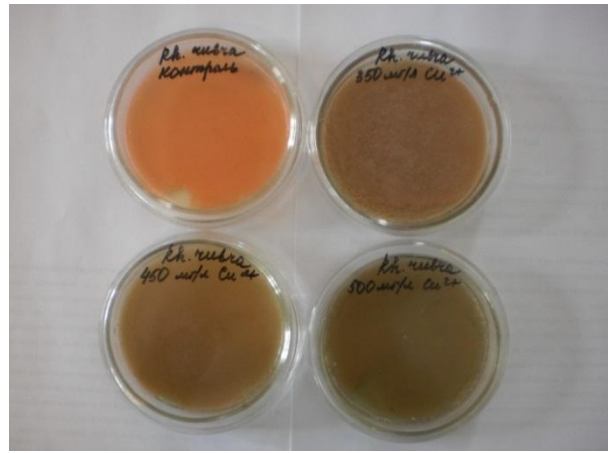
Так, результати розрахунку різниці в інтенсивності кольору пігменту між контролем та дослідом показали, що в дріжджів *Rh. aurantiaca* Y-1193 dE при концентрації міді 20 мг/дм³ дорівнювала $8,0 \pm 0,2$ ум. од., що відповідає доброму пігментоутворенню колоній. При концентрації 100 мг/дм³ іонів міді (П) колонії були безпігментні, тому dE була $19,8 \pm 1,3$ ум. од., проте на 9 добу культивування синтез пігменту дещо поновлювався до слабко-рожевого кольору і dE складала вже $13,5 \pm 0,6$ ум. од.

КІ між повною втратою пігменту та блокуванням росту в дріжджів *Rh. glutinis* Y-1335, *Rh. mucilaginosa* Y-1394 та *Rh. mucilaginosa* Y-1395 дорівнював 58,3, 16,7 та 14,3% відповідно (табл. 3). У дріжджів *Rh. glutinis* Y-1335 та *Rh. mucilaginosa* Y-1394 повне

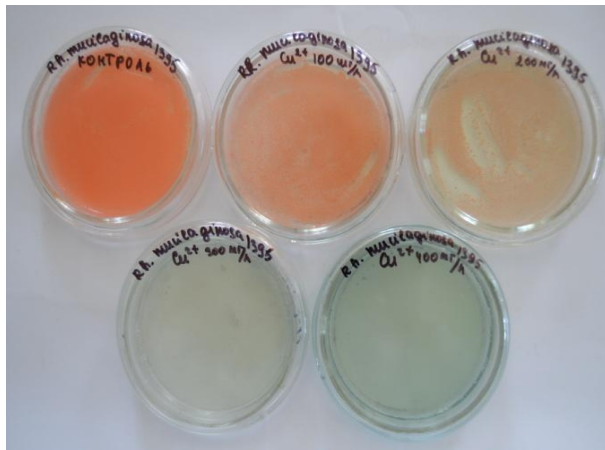
інгібування синтезу каротиноїдів починалося при концентрації 250 мг/дм^3 іонів міді (II). Культури *Rh. glutinis* Y-1333 та *Rh. mucilaginosa* Y-1395 були дуже стійкими відносно токсичної дії міді та втрачали здатність синтезувати пігмент при концентрації Cu^{2+} 350 та 300 мг/дм^3 відповідно.



а



б



в



г

Рис. 1 Вплив іонів міді (II) на синтез пігментів у дріжджових клітин: а – вплив Cu^{2+} на синтез пігментів у *Rh. aurantiaca* Y-1193 ($100, 200, 300 \text{ мг/дм}^3$); б – вплив Cu^{2+} на пігментосинтезувальну здатність *Rh. rubra* RA-10 ($350, 400, 500 \text{ мг/дм}^3$); в – вплив Cu^{2+} на каротиноутворення в дріжджів *Rh. mucilaginosa* Y-1395 ($100, 200, 300, 400 \text{ мг/дм}^3$); г – вплив Cu^{2+} на синтез каротиноїдів *R. diobovatum* Y- 43 (300 мг/дм^3).

Дріжджі *R. diobovatum* Y-42 та *R. diobovatum* Y-43 (на відміну від дріжджів *R. sphaerocarpum* Y-44) не втрачали здатності повністю синтезувати каротиноїди та не мали КІ між втратою пігменту і затримкою росту, проте володіли здатністю поступово зменшувати інтенсивність кольору пігменту при підвищенні концентрації металу, що є добре спостережуваною індикаційною ознакою (табл. 4). При концентрації 100 мг/дм^3 Cu^{2+} колір колоній навіть був більш темного кольору, ніж у контролі. Таке явище, можливо, пояснюється тим, що мідь, як біологічно активний елемент, у певних концентраціях стимулює пігментоутворення в деяких мікроорганізмів. Дріжджі *Sp. roseus* Y-1444 втрачали здатність синтезувати каротиноїди при концентрації міді 250 мг/дм^3 (КІ між втратою пігменту та блокуванням росту дорівнював $16,7\%$). У культури *Sp. Roseus* Y-1443 при концентрації міді $200-500 \text{ мг/дм}^3$ спостерігався ріст пігментних та безпігментних колоній, а при 600 мг/дм^3 Cu^{2+} ріст і синтез пігменту повністю блокувалися.

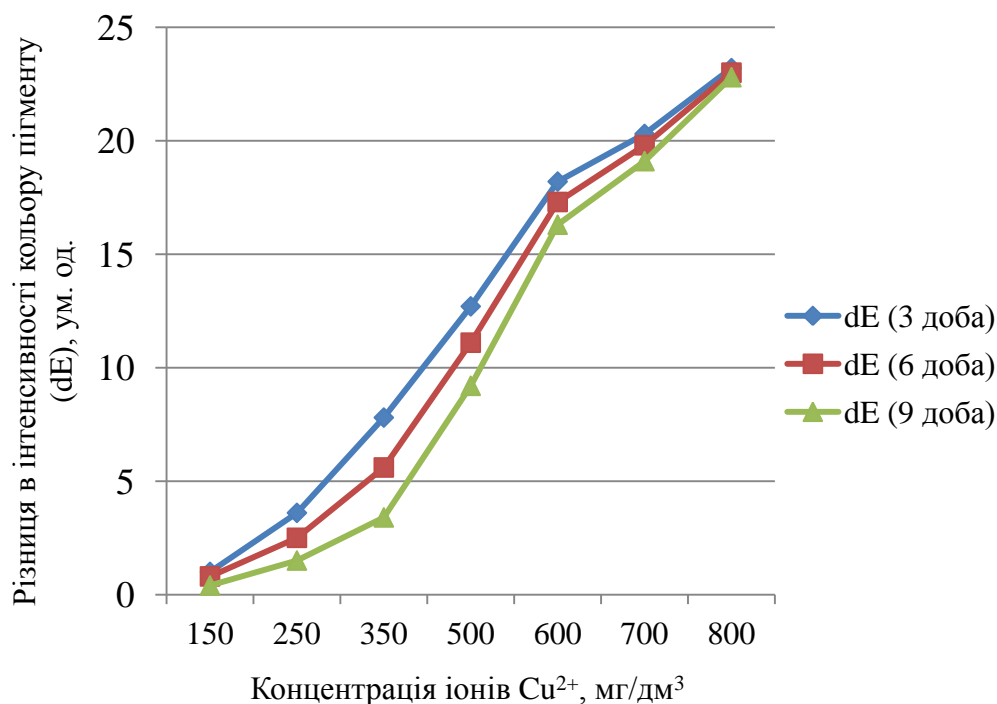


Рис. 2 Оцінка інтенсивності кольору пігменту під впливом іонів міді (II) у дріжджів *Rh. rubra* RA-10

Таблиця 2 – Оцінка інтенсивності кольору пігменту на концентраційний ряд Cu²⁺ у *Rh. aurantiaca* Y-1193

Концентрація Cu ²⁺ , мг/дм ³	3 доба				6 доба				9 доба			
	L	a	b	dE	L	a	b	dE	L	a	b	dE
Контроль	36	29	35		41	28	32		41	29	33	
20	44	22	33	8,0±0,2	45	16	26	7,4±0,01	48	24	29	7,0±0,02
50	46	15	41	13,9±0,7	50	28	21	10,7±0,9	45	19	24	6,4±0,05
100	53	10	31	19,8±1,3	57	28	26	16,3±0,04	53	16	24	13,5±0,6
150	56	16	18	21,0±1,2	53	9	25	16,4±1,1	56	23	23	15,6±0,07
200	56	18	15	21,5±1,9	56	7	29	20,3±1,0	57	24	30	16,1±1,0
250	-	-	-	-	57	8	30	20,7±0,5	51	5	24	18,0±0,2
350	-	-	-	-	-	-	-	-	53	8	23	17,1±0,4

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

Дріжджі *Metschnikowia pulcherrima* Y-332 та *M. pulcherrima* Y-333 синтезують червоно-вишневий пігмент пульхеримін на середовищах із залізом [21]. На твердому поживному середовищі Сабуро (без заліза) вони утворювали колонії кремового кольору. Під дією іонів міді (II) ріст дещо затримувався разом із зміненням кольору колоній. Так, при концентрації 100-400 мг/дм³ іонів міді у *M. pulcherrima* Y-332 був відмічений ріст блідо-сірих колоній. При концентрації 500 мг/дм³ Купруму ріст повністю блокувався. У штаму *M. pulcherrima* Y-333 при концентраціях міді 100 мг/дм³ був відмічений суцільний ріст кремових колоній, як і в контролі, при 200 мг/дм³ Cu²⁺ спостерігався добрий ріст блідо-

сірих колоній. При концентрації міді 300 мг/дм³ був зареєстрований помірний ріст дрібних кремових та середніх сірих колоній (dE дорівнювала 19,9±0,06 ум. од., при значеннях показників каналів кольорової моделі: контроль L – 64, a – 4, b – 18; дослід L – 44, a – 7, b – 13). Концентрація 400 мг/дм³ купруму викликала появу на 3 добу 4±0,09 темно-сірих колоній. Ріст повністю блокувався при концентрації в середовищі 450 мг/дм³ міді (II). Слід відмітити, що розрахунок різниці в інтенсивності кольору хоча і показав результат, але все ж таки візуально було важко оцінити відмінності кольору контрольних та дослідних зразків.

Таблиця 3 – Вплив іонів Cu²⁺ на синтез пігментів у дріжджів *Rh. glutinis* Y-1333, *Rh. glutinis* Y-1335, *Rh. mucilaginosa* Y-1394, *Rh. mucilaginosa* Y-1395

Концентрація іонів Cu ²⁺ , мг/дм ³	<i>Rh. glutinis</i> Y-1333		<i>Rh. glutinis</i> Y-1335		<i>Rh. mucilaginosa</i> Y-1394		<i>Rh. mucilaginosa</i> Y-1395	
	Р	П	Р	П	Р	П	Р	П
Контроль	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
50	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++
100	+++	++++	++++	+++	+++	±	+++	±
150	++	+++	++++	±	++	±	+++	±
200	++	±	+++	±	++	±	+++	±
250	++	±	+++	-	+	-	+++	±
300	+	±	+++	-	+	-	++	-
350	+	-	+++	-	-	-	+	-
375	-	-	+++	-	-	-	-	-
500	-	-	++	-	-	-	-	-
600	-	-	+	-	-	-	-	-
700	-	-	-	-	-	-	-	-

При додаванні в середовище Сабуро сульфату заліза червоно-вишневі колонії росли тільки в контролі. При концентрації 100 мг/дм³ міді (II) росли блідо-червоні колонії в обох штаммах *Metschnikowia pulcherrima*. Концентрації 200-300 мг/дм³ купруму викликали добрий ріст слабо-пігментованих та безпігментних колоній *M. pulcherrima* Y-332 та *M. pulcherrima* Y-333.

При концентрації 400 мг/дм³ міді ріст і синтез пігменту дріжджів повністю блокувалися. Варто відзначити, що при додаванні в середовище Сабуро сульфату заліза зменшився поріг виживання культур в 1,25 разу, порівняно з їх культивуванням на середовищі без заліза (тільки з іонами міді). Хоча при додаванні заліза ми й спостерігали неповне інгібування синтезу пульхериміну, але КІ між втратою пігменту та затримкою росту був відсутній, тому штамми *M. pulcherrima* Y-332 та *M. pulcherrima* Y-333 не доцільно використовувати для біоіндикації.

Таблиця 4 – Вплив іонів Cu^{2+} на синтез пігментів у дріжджів *R. diobovatum* Y-42, *R. diobovatum* Y-43, *Sporobolomyces roseus* Y-1443, *Sp. roseus* Y-1444

Концентрація іонів Cu^{2+} , мг/дм ³	<i>R. diobovatum</i> Y-42		<i>R. diobovatum</i> Y- 43		<i>Sp. roseus</i> Y-1443		<i>Sp. roseus</i> Y-1444	
	Р	П	Р	П	Р	П	Р	П
Контроль	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
100	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	±
200	+++	++	+++	++	+++	±	++	±
250	++	+	+++	++	+++	±	++	-
300	-	-	+++	++	+++	±	+	-
350	-	-	++	±	+++	±	-	-
400	-	-	-	-	++	±	-	-
500	-	-	-	-	++	±	-	-
600	-	-	-	-	-	-	-	-

У попередній роботі нами було показано, що одним із вірогідних механізмів блокування синтезу пігментів у дріжджів за умов «металевого» стресу може бути ураження пігментосинтезувальних ділянок на мембранах вільними радикалами, про що свідчило збільшення в клітині малонового діальдегіду (біфункціонального альдегіду, який є показником окислювальних процесів, обумовлених вільними радикалами) [22, 23]. Тому в нашій роботі ми вирішили з'ясувати здатність дріжджових клітин, які втратили пігмент під впливом іонів міді, відновлювати пігментоутворення при пересіві їх на тверде середовище Сабуро без металу. Тест-культурою були дріжджі *Rh. glutinis* Y-1335, які повністю втрачали здатність синтезувати каротиноїди при концентрації 250 мг/дм³ Cu^{2+} . Після пересівання даної культури з середовища Сабуро (з 250 мг/дм³ міді) в середовище без металу синтез пігменту майже повністю поновлювався на 3 добу. При повторному пересіванні *Rh. glutinis* Y-1335 з відновленим синтезом пігменту на середовище Сабуро з концентраційним рядом міді на 3 добу спостерігали підвищення концентраційного рівня, з якого починалося блокування синтезу каротиноїдів в 2,4 разу. Так, при концентрації 250 мг/дм³ міді був суцільний ріст помірно пігментованих колоній. Синтез пігменту повністю блокувався при концентрації міді 600 мг/дм³. Концентрація 700 мг/дм³ Купруму (II) викликала також помірний ріст безпігментних колоній (проте без попередніх пересівів при такій концентрації росту *Rh. glutinis* Y-1335 не спостерігалось).

Отже, результати досліджень показали, що пігментосинтезувальні дріжджі родів *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* *Sporobolomyces* та *Metschnikowia* володіли здатністю втрачати пігмент із певних концентраційних рівнів іонів міді (II). Тому виявляється цікавим подальше вивчення впливу ВМ на пігментосинтезувальні дріжджові клітини з метою їх застосування в біоіндикаційних дослідженнях.

ВИСНОВКИ

1. Повна втрата пігменту в дріжджів *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* та *Sporobolomyces* спостерігалася при концентраціях міді, що на 14,3-58,3% відповідно нижчі за ті концентрації, які повністю блокували ріст дріжджових клітин.

2. Проведений скринінг пігментосинтезувальних дріжджів під впливом іонів міді (II) для біоіндикаційних досліджень. Рекомендовані для використання в біоіндикації культури каротиносинтезувальних дріжджів, а саме: *Rh. aurantiaca* Y-1193, *Rh. glutinis* Y-1335, *Rh. mucilaginosa* Y-1394, які мали найбільші концентраційні інтервали між втратою пігменту та затримкою росту і втрачали здатність повністю синтезувати каротиноїди з концентрацій 100, 250, 250 мг/дм³ іонів Cu²⁺ відповідно.
3. Встановлено, що дріжджі *Rh. glutinis* Y-1335, які зазнали впливу 250 мг/дм³ Cu²⁺, володіли здатністю поновлювати синтез пігменту при пересіві їх на твердне поживне середовище Сабуро без металу, а після повернення їх знову в токсичне середовище з більшими концентраціями міді підвищувався поріг виживання та синтезу пігменту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Кондакова Г.В. Биоиндикация. Микробиологические показатели / Г.В. Кондакова. – Ярославль : ЯрГУ, 2007. – 136 с.
2. Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды / [Бубнов А.Г., Буймова С.А., Гушин А.А. и др.]; под. общ. ред. В.И. Гриневича; ГОУ ВПО Иван. гос. хим.-технол. ун-т. – Иваново, 2007. – 112 с.
3. Егорова Е.И. Биотестирование и биоиндикация окружающей среды / Е.И.Егорова, В.И. Белолипецкая. – Обнинск : ИАТЭ, 2000. – 80 с.
4. Рильський О.Ф. Мікробіологічна біоіндикація довкілля, забрудненого важкими металами та іншими ксенобіотиками / О.Ф. Рильський, Ю.Г. Масікевич // Вісник Запорізького національного університету. – 2012. – № 3. – 139-147.
5. Гузієнко І.А. Оцінка основних джерел надходження важких металів в донні відклади водосховищ / І.А. Гузієнко, Н.М. Осадча // Геополитика и экогеодинамика регионов. – 2014. – Т. 10, № 1. – С. 484-489.
6. Янева О.Д. Механизмы устойчивости бактерий к ионам тяжелых металлов / О.Д. Янева // Мікробіологічний журнал. – 2009. – Т. 71, № 6. – С. 54-65.
7. Чистяков Ю.В. Основы бионеорганической химии / Ю.В. Чистяков. – М. : КолоС, 2007. – 539 с.
8. Сторчак Т.В. Особенности пигментной системы *Leptothrix* при воздействии ионов меди / Т.В. Сторчак, А.А. Гришечкина // Вестник Нижегородского государственного университета. – 2013. – № 3. – С. 1-4.
9. Иванова Е.М. Токсическое действие меди и механизмы ее детоксикации растениями рапса : автореф. дис. на соискание учен. степени канд. биол. наук : спец. 03.01.05 «Физиология и биохимия растений» / Е.М. Иванова. – М., 2011. – 26 с.
10. Грушко Я.М. Вредные неорганические соединения в промышленных сточных водах / Я.М. Грушко. – СПб. : Химия, 1979. – 161 с.
11. Манчук В.А. Металлы. Гигиенические аспекты оценки и оздоровления окружающей среды / В.А. Манчук, Н.А. Рябов. – М., 1983. – С. 194–199.
12. Архіпова Г.І. Вплив надлишкового вмісту важких металів у питній воді на організм людини / Г.І. Архіпова, Т.О. Мудрак, Д.В. Завертана // Вісник Національної академії України. – 2010. – № 1. – С. 232 – 235.
13. Інтенсифікація сорбції іонів міді дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* 1968 в постійному магнітному полі / [Горобець С.В., Касаткіна Т.П., Горобець О.Ю. та ін.] // Харчова промисловість. – 2004. – № 3. – С. 107-109.

14. Kosman D.J. Transition metal ion uptake in yeasts and filamentous fungi / D.J. Kosman // *Metal ions in fungi*. – New York etc., 1994. – 507 p.
15. Walker M.G. Yeast physiology and biotechnology / M.G. Walker. – New York; Toronto : John Wiley and Sons, 1998. – 350 p.
16. Лозовая О.Г. Поиск биосорбентов тяжелых металлов среди дрожжей различных таксономических групп / О.Г. Лозовая, Т.П. Касаткина, В.С. Подгорский // *Мікробіологічний журнал*. – 2004. – Т. 66, № 2. – С. 92–101.
17. Лозовая О.Г. Влияние хрома (VI) на физиологию роста и сорбционную способность дрожжей / О. Г. Лозовая, Т. П. Касаткина, В. С. Подгорский // *Мікробіологічний журнал*. – 2004. – Т. 66, № 3. – С. 43–50.
18. Патент на корисну модель № 49812 Україна, МПК (2009), C12Q 1/00, C12M 1/00, C12M 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.
19. Крупей К.С. Вплив аніонів солей цинку та міді на пігментосинтезувальну здатність дріжджових клітин / К.С. Крупей, О.Ф. Рильський // *Вісник Запорізького національного університету: збірник наукових праць. Біологічні науки*. – Запоріжжя : ЗНУ, 2014. – № 2. – С. 218-224.
20. Каротинсинтезирующие дрожжи [Квасников Е.И., Васкивнюк В.Г., Суденко В.И., Гринберг Т.А.]. – К. : Наукова думка, 1980. – 171 с.
21. An atypical, pigment-producing *Metschnikowia* strain from a leukaemia patient / [Vincenzo Savini, Marijke Hendrickx, Maurizio Sisti et. al.] // *Medical Mycology*. – 2012. – P. 1-6.
22. Крупей К.С. Биоиндикационные возможности пигментсинтезирующих дрожжей рода *Rhodotorula* / К.С. Крупей // *Australian Journal of Scientific Research*, 2014. – Vol. III. – №. 1. (5) (January-June). – P. 249-254.
23. Крупей К.С. Биоиндикация загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами с помощью каротинсинтезирующих дрожжей рода *Rhodotorula* [Електронне наукове видання] / К.С. Крупей, А.Ф. Рильський // *Актуальні проблеми біології, екології та хімії*. – Запоріжжя : ЗНУ. – 2015. – Т. 9. – № 1. – С. 64-75. – Режим доступу: http://sites.znu.edu.ua/bio-eco-chem-sci/issues/index.php?action=url/view&url_id=6693

REFERENCES

1. Kondakova G.V. Bioindikacija. Mikrobiologicheskie pokazateli / G.V. Kondakova. – Jaroslavl' : JarGU, 2007. – 136 s.
2. Biotestovij analiz – integral'nyj metod ocenki kachestva ob#ektov okružhajushhej sredy / [Bubnov A.G., Bujmova S.A., Gushhin A.A. i dr.]; pod. obshh. red. V.I. Grinevicha; GOU VPO Ivan. gos. him.-tehnol. un-t. – Ivanovo, 2007. – 112 s.
3. Egorova E.I. Biotestirovanie i bioindikacija okružhajushhej sredy / E.I. Egorova, V.I. Belolipeckaja. – Obninsk : IATJe, 2000. – 80 s.
4. Ril's'kij O.F. Mikrobiologichna bioindikacija dovkillja, zabrudnenogo vazhkimi metalami ta inshimi ksenobiotikami / O.F. Ril's'kij, Ju.G. Masikevich // *Visnik Zaporiz'kogo nacional'nogo universitetu*. – 2012. – № 3. – 139-147.
5. Guzienko I.A. Ocinka osnovnih dzherel nadozhennja vazhkih metaliv v donni vidkladi vodoshovishh / I.A. Guzienko, N.M. Osadcha // *Geopolitika i jekogeodinimika regionov*. – 2014. – Т. 10, № 1. – S. 484-489.
6. Janeva O.D. Mehanizmy ustojchivosti bakterij k ionam tjazhelyh metallov / O. D. Janeva // *Mikrobiologichnij zhurnal*. – 2009. – Т. 71, № 6. – S. 54-65.
7. Chistjakov Ju.V. Osnovy bioneorganicheskoj himii / Ju.V. Chistjakov. – M. : KoloS, 2007. – 539 s.
8. Storchak T.V. Osobennosti pigmentnoj sistemy Lemna minor pri vozdejstvii ionov medi / T.V. Storchak, A.A. Grishechkina // *Vestnik Nizhnevartovskogo gosudarstvennogo universiteta*. – 2013. – № 3. – S. 1-4.

9. Ivanova E.M. Toksicheskoje dejstvie medi i mehanizmy ee detoksikacii rastenijami rapsa : avtoref. dis. na soiskanie uchen. stepeni kand. biol. nauk : spec. 03.01.05 «Fiziologija i biohimija rastenij» / E.M. Ivanova. – M., 2011. – 26 s.
10. Grushko Ja.M. Vrednye neorganicheskie soedinenija v promyshlennyh stochnyh vodah / Ja.M. Grushko. – Spb. : Himija, 1979. – 161 s.
11. Manchuk V.A. Metally. Gigienicheskie aspekty ocenki i ozdorovenija okruzhajushhej sredy / V.A. Manchuk, N.A. Rjabov. – M., 1983. – S. 194–199.
12. Arhipova G.I. Vpliv nadlishkovogo vmistu vazhkih metaliv u pitnij vodi na organizm ljudini / G.I. Arhipova, T.O. Mudrak, D.V. Zavertana // Visnik Nacional'noi akademii Ukraïni. – 2010. – № 1. – S. 232–235.
13. Intensifikacija sorbcii ioniv midi drizhdzhami *Saccharomyces cerevisiae* 1968 v postijnomu magnitnomu poli / [Gorobec' S.V., Kasatkina T.P., Gorobec' O.Ju. ta in.] // Harchova promislovist'. – 2004. – № 3. – S. 107-109.
14. Kosman D.J. Transition metal ion uptake in yeasts and filamentous fungi / D.J. Kosman // Metal ions in fungi. – New York etc., 1994. – 507 p.
15. Walker M.G. Yeast physiology and biotechnology / M.G. Walker. – New York; Toronto : John Wiley and Sons, 1998. – 350 p.
16. Lozovaja O.G. Poisk biosorbentov tjazhelyh metallov sredi drozhzhej razlichnyh taksonomicheskikh grupp / O.G. Lozovaja, T.P. Kasatkina, B.C. Podgorskij // Mikrobiologichnij zhurnal. – 2004. – T. 66, № 2. – S. 92–101.
17. Lozovaja O.G. Vlijanie hroma (VI) na fiziologiju rosta i sorbcionnuju sposobnost' drozhzhej / O.G. Lozovaja, T.P. Kasatkina, B. C. Podgorskij // Mikrobiologichnij zhurnal. – 2004. – T. 66, № 3. – S. 43–50.
18. Patent na korisnu model' № 49812 Ukraïna, MPK (2009), C12Q 1/00, C12M 1/00, C12M 1/34. Sposib viznachennja intensivnosti pigmentoutvorennja u bakterij / Ril's'kij O.F., Dombrovs'kij K.O., Gorohovs'kij E.Ju., Zhilenko A.V.; zajavnik i patentovlasnik ZNU. – № u200912311; zajavl. 30.11.2009; opubl. 11.05.2010, Bjul. № 9, 2010 r.
19. Krupej K.S. Vpliv anioniv solej cinku ta midi na pigmentosintezuval'nu zdatsnist' drizhdzhovih klitin / K.S. Krupej, O.F. Ril's'kij // Visnik Zaporiz'kogo nacional'nogo universitetu : zbirnik naukovih prac'. Biologichni nauki. – Zaporizhzhja : ZNU, 2014. – № 2. – S. 218-224.
20. Karotinsintezirujushhie drozhzhi [Kvasnikov E.I., Vaskivnjuk V.G., Sudenko V.I., Grinberg T.A.]. – K. : Naukova dumka, 1980. – 171 s.
21. An atypical, pigment-producing *Metschnikowia* strain from a leukaemia patient / [Vincenzo Savini, Marijke Hendrickx, Maurizio Sisti et. al.] // Medical Mycology. – 2012. – R. 1-6.
22. Krupej K.S. Bioindikacionnye vozmozhnosti pigmentsintezirujushhijh drozhzhej roda *Rhodotorula* / K.S. Krupej // Australian Journal of Scientific Research, 2014. – Vol. III. – № 1. (5) (January-June). – R. 249-254.
23. Krupej K.S. Bioindikacija zagrjaznenija okruzhajushhej sredy tjazhelymi metallami s pomoshh'ju karotinsintezirujushhijh drozhzhej roda *Rhodotorula* [Elektronne naukovе vidannja] / K.S. Krupej, A.F. Ryl's'kij // Aktual'ni problemi biologii, ekologii ta himii. – Zaporizhzhja : ZNU. – 2015. – T. 9. – № 1. – S. 64-75. – Rezhim dostupu: http://sites.znu.edu.ua/bio-eco-chem-sci/issues/index.php?action=url/view&url_id=6693

УДК 579.234

ВПЛИВ МУТАЦІЙ У ГЕНАХ ЛІГАЗ *WAAL* НА СТРЕСОСТІЙКІСТЬ БАКТЕРІЙ *YERSINIA ENTEROCOLITICA* O:3 ТА O:8

^{1,2}Шевченко Ю.І., ¹Позур В.К., ²Скурнік М.

¹ННЦ «Інститут біології» Київський національний університет імені Тараса Шевченка
01601, Україна, Київ, вул. Володимирська, 64/13

²*Haartman Institute, University of Helsinki,
Haartmaninkatu 3 (P.O. Box 21), FIN-00014, Finland*

julia.i.shevchenko@gmail.com

Метою роботи є дослідження участі продуктів генів лігаз *waal* ліпополісахаридів (ЛПС) бактерій *Yersinia enterocolitica* у формуванні стійкості бактерій до впливу стресових факторів. Зміни структури ЛПС *waal*-нокаутних мутантів аналізували за допомогою імуноблотингу