

УДК 572.521:579.22:579:253

## ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ПІГМЕНТОСИНТЕЗУВАЛЬНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ У БІОІНДИКАЦІЇ

(Літературний огляд)

Крупей К.С., к. б. н., ст. викладач, Рильський О.Ф., д.б.н., проф., Обруч К.І., Горобець К.А.

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

krupeyynu@gmail.com

У статті розглянуто основні типи пігментів мікроорганізмів, їх функції і властивості. Узагальнений матеріал щодо впливу умов культивування та екологічних факторів на пігментосинтезувальну активність бактерій та дріжджів. Описано механізми стійкості та проникнення важких металів у клітини мікроорганізмів. Зроблено аналіз особливостей біологічного та інструментального моніторингу довкілля. Увага акцентується на перевагах використання пігментосинтезувальних мікроорганізмів у біоіндикації. Розглянуто внесок вітчизняних та закордонних вчених у розвиток мікробіологічної індикації. Виявлено недостатній рівень вивчення індикаторних ознак пігментосинтезувальних дріжджів, що спонукало авторів розробити метод біоіндикації важких металів та їх сполук у воді, який дозволяє швидко оцінити екологічний стан водної екосистеми.

*Ключові слова: біоіндикація, пігменти, мікроорганізми, важкі метали.*

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПИГМЕНТСИНТЕЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В БИОИНДИКАЦИИ

Крупей К.С., Рылский А.Ф., Обруч К.И., Горобец К.А.

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

В статье рассмотрены основные типы пигментов микроорганизмов, их функции и свойства. Обобщен материал по влиянию условий культивирования и экологических факторов на пигментсинтезирующую активность бактерий и дрожжей. Описаны механизмы устойчивости и проникновения тяжелых металлов в клетки микроорганизмов. Проведен анализ особенностей биологического и инструментального мониторинга окружающей среды. Внимание акцентируется на преимуществах использования пигментсинтезирующих микроорганизмов в биоиндикации. Рассмотрен вклад отечественных и зарубежных ученых в развитие микробиологической индикации. Выявлен недостаточный уровень изучения индикаторных признаков пигментсинтезирующих дрожжей, что побудило авторов разработать способ биоиндикации тяжелых металлов и их соединений в воде, который позволяет быстро оценить экологическое состояние водной экосистемы.

*Ключевые слова: биоиндикация, пигменты, микроорганизмы, тяжелые металлы.*

## PERSPECTIVES OF USE OF PIGMENT-SYNTHESIZING MICROORGANISMS IN THE BIOINDICATION

Krupey K.S., Rylsky O.F., Obruch K.I., Gorobec K.A.

*Zaporizhzhya National University; 69900, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovski str. 66*

In the article researched the main pigment types of microorganisms, their functions and features. Content had consensus about conditions influence of cultivation and ecological factors on pigment-synthesizing activity bacteria and yeasts. Analysis was made about the features biological and instrumental monitoring. Major accent was oriented on use advantages synthesis of pigment-synthesizing microorganisms in bioindication.

An important issue is the search for reliable and worthy methods for indicating heavy metals (HM) in the environment. One of such promising directions is bioindication, which is the identification and determination of ecologically significant natural and anthropogenic loads on the basis of the reactions on them living organisms. The peculiarity of indicator organisms is that they reflect not only the concentration of a particular chemical component in the environment, but also provide information on the impact of anthropogenic factors on their specific features. For bioindication, it is necessary to choose the most sensitive organisms that are characterized by the maximum rate of response. Such bioindicators can be microorganisms that react quickly to changes in the environment.

The last bioindicative researches are related to the use of prodrug-reductants as bioindicators, namely, pigment-synthesizing bacteria. But in these and many other researches, scientists did not pay attention to the possibility of using

in bioindication the intensity of pigment accumulation of eukaryotic organisms. So, the closest to the *Protista* kingdom is yeast. They are unicellular organisms, but the structure and chemical composition of yeast cells are closest to eukaryotes. In addition, yeast is more likely to contact a person. So, for example, *Rhodotorula rubra* culture lives next to a person (it can exist in the atmosphere, water, soil, grows well on food products, ground parts of plants). Such a high prevalence of yeast in biotopes is the most important requirement for indicator organisms. The cellular level of the organization of yeast allows extrapolating the results of bioindication to other representatives of eukaryotic organisms.

Microorganisms are able to synthesize a large number of different pigments, which are colorants of different classes of chemical compounds and released in the environment or are part of the cells. The main diagnostic feature of a pigment is its «color», that is, the ability to absorb certain beams of the spectrum used to identify pigments. For example, carotenoids are capable of absorbing light wavelengths from 280 to 550 nanometers. There is no generally accepted pigment classification system for today. This is due to the complexity of the choice of a feature that could be used as a basis for classification. For a more correct selection of signs in the classification, it is necessary to study the chemical structure of pigments. The molecules of all organic pigments contain a system of coupled double bonds.

In most species of plants and animals, the color and the nature of its distribution are inconsistent, and changes may be related to the season of the year, the stages of development or to manifest quickly in response to changes in the environment. Equally important is the question of studying the functions of pigments that are synthesized by microorganisms. This is due to the fact that pigments can simultaneously be physiologically active substances (antibiotics, enzymes, vitamins, phytoncides, growth stimulators), and also that the pigmentation of microorganisms in combination with other physiological features can be an important addition to the microorganism taxonomy.

Bacteria synthesize a wide range of different pigments (prodigiosin, phenazine, quinone pigments, melanins, carotenoids, etc.). The question of their function in a bacterial cell is rather unclear.

The visual observation of the change in the brightness of pigments, due to the influence of different concentrations of ions of the inner membrane, has a significant advantage over the indication of the environment by physical and chemical methods, given the high cost of the reagents and the equipment used in this process.

The author's method for identifying heavy metals and their compounds in water with pigmented yeast cells allows us to quickly identify the physiologically active forms of the pollutants and to assess the ecological status of the aquatic ecosystem, in contrast to analytical methods, with which it is not always possible to determine the total effect of the substances on living organisms.

Thus, the paper presents the advantages and potential of application in bioindication of pigmented forms of microorganisms.

*Key words: bioindication, pigments, microorganisms, heavy metals.*

## ВСТУП

До найнебезпечніших токсикантів, які надають воді та ґрунту екоцидних властивостей, поряд із радіонуклідами та пестицидами, належать важкі метали. Під «важкими металами» розуміють групу металів із густиною вище ніж  $5,0 \text{ г} \times \text{см}^{-3}$  або з атомним номером більше 20. До них належить ціла низка забруднень довкілля: Кадмій (Cd), Плюмбум (Pb), Нікель (Ni), Хром (Cr), Гідраргірум (Hg), Купрум (Cu), Цинк (Zn) тощо. Вивчення взаємодії іонів металів з клітинами мікроорганізмів становить значний інтерес для мікробіологів та біотехнологів. Сорбційні властивості бактерій покладені в основу технологій очистки води, проте недостатньо відомостей щодо використання мікроорганізмів (особливо одноклітинних еукаріот) як сигналізаторів забруднень [1]. Індикаторні ознаки бактерій практично обмежуються ростом, розмноженням і груповим складом клітин. Вчені не проводили системні дослідження щодо зниження інтенсивності пігментонакопичення одноклітинних еукаріот під впливом полютантів. Тому, метою роботи було зробити наукове обґрунтування еукаріотичної та прокаріотичної біоіндикації забруднення довкілля важкими металами.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПІГМЕНТІВ МІКРООРГАНІЗМІВ ЯК ПЕРЕДУМОВА ВИВЧЕННЯ ЇХ ІНДИКАТОРНИХ ОЗНАК

Мікроорганізми здатні синтезувати велику кількість різноманітних пігментів, які являють собою фарбувальні речовини різних класів хімічних сполук і виділяються в середовище або входять до складу клітин. Основною діагностичною ознакою пігменту є його «кольоровість», тобто здатність поглинати певні промені спектру, що використовується при ідентифікації

пігментів. Так, наприклад, каротиноїди здатні поглинати світло довжиною хвилі від 280 до 550 нм. Загальноприйнятої системи класифікації пігментів на сьогодні не існує. Це пояснюється складністю вибору ознаки, яку можна було б покласти в основу класифікації. Докладніше основні класифікації наведені в літературних джерелах [2]. Для більш правильного вибору ознаки при класифікації необхідно вивчати хімічну структуру пігментів, яка складається із системи зв'язаних подвійних зв'язків [3].

У більшості видів рослин і тварин забарвлення та характер його розподілу непостійні, причому зміни можуть бути пов'язані з сезоном року, стадіями розвитку, крім того, вони можуть швидко проявлятися у відповідь на зміни умов навколишнього середовища. Не менш важливим є питання про вивчення функцій пігментів, які синтезуються мікроорганізмами. Це пояснюється тим, що пігменти одночасно можуть бути фізіологічно активними речовинами (антибіотиками, ферментами, вітамінами, фітонцидами, стимуляторами росту), і також тим, що пігментація мікроорганізмів у сполученні з іншими фізіологічними ознаками може бути важливим доповненням про систематику мікроорганізмів.

Бактерії синтезують широкий спектр різних пігментів (продигіозин, феназинові, хінонові пігменти, меланіни, каротиноїди тощо). Питання про їх функції у бактеріальній клітині вивчені недостатньо. Вважають, що основна функція пігментів у клітині бактерій – це захист від природної ультрафіолетової (УФ) радіації (наприклад, у пігментованих форм повітряної мікрофлори). Резистентність кольорових та безпігментних мутантів на прикладі *Srteptomycetes globisporus* 1912 до дії УФ-променів добре досліджена С.Л. Голембіовською із співавторами. Можливо, це пов'язано з тим, що безпігментні мутанти утворюють безбарвні попередники лікопіну та  $\beta$ -каротину, які містять менше спряжених подвійних зв'язків. Але більшість функцій пігментів, як показали дослідження ще в минулому столітті, залежать від їх типу [4].

Ще в ХХ столітті дослідники звернули увагу на каротиносинтезувальні дріжджі, деякі представники яких (*Sporobolomyces*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* тощо) синтезують широкий спектр каротиноїдів [5].

Каротиносинтезувальні дріжджі зайняли міцну позицію у сучасній біотехнології. Каротиноїдні пігменти цих мікроорганізмів володіють високою біологічною активністю. Близько 10 % каротиноїдів є попередниками вітаміну А (ретинолу). Вони застосовуються також для лікування і профілактики багатьох захворювань: каротин володіє радіопротекторними властивостями.

В багатьох країнах каротиноїди використовуються як добавки до харчових продуктів. На сьогодні встановлено, що каротиноїди підвищують резистентність організму до мутагенезу та канцерогенезу, знижують вікові дегенеративні зміни у тканинах, інгібують проліферацію злоякісних клітин, активують синтез цитокінів та інтерлейкінів, беруть участь у регуляції транскрипції генів, а також проявляють імуномодулюючу дію [6]. Слід також зазначити, що каротиносинтезувальні дріжджі слугують цінним об'єктом у вивченні процесів каротиногенезу, який має загальнобіологічне значення.

Термін «каротиноїди» був запропонований російським вченим М. С. Цветом у 1911 р. (від латинської назви моркви – *Daucus carota*, основну частину пігментів якої складає  $\beta$ -каротин). Вони відносяться до класу вуглеводнів (каротинів) та їх окиснених похідних (ксантофілів), які складаються з 8 ізопренових одиниць. На відміну від безкольорових (фітоїн, фітофлюїн) аліфатичних полієнів, до каротиноїдів належить велика група пігментів тетратерпенового ряду, які завдяки системі спряжених подвійних зв'язків (їх кількість варіює в молекулі від 7 до 15) мають інтенсивне жовте, помаранчеве, червоне або фіолетове забарвлення. Основна структура каротиноїдів представлена ациклічним каротином лікопіном, який може циклізуватися з утворенням  $\alpha$ - або  $\beta$ -іононового кільця. Відомим прикладом циклічних каротинів є  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\gamma$ -каротин [7].

За хімічною структурою каротиноїди поділяють на гідрокарбони (фітофлюїн,  $\alpha$ -зеаксантин), спирти (лютеїн, зеаксантин), глікозиди (осцилоксантин), етери (сфероїдин), епоксиди (діадиноксантин, зеаксантин), альдегіди (родопінал), кетони (астаксантин, кантаксантин), апокаротиноїди (аполікопінати, аполікопінали), секокаротиноїди ( $\beta$ -каротин), вищі каротиноїди (бактеріоруберин), ретро- і ретроапокаротиноїди (родоксантин), естери спиртів (фукоксантин, зеаксантин) та естери кислот (торулародін). Вищезазначені групи каротиноїдів об'єднують у два класи: сполуки, які складаються з Карбону та Гідрогену; оксикаротиноїди або ксантофіли, що у структурі додатково містять молекули кисню. Слід зазначити, що лише першій групі каротиноїдів притаманні антиоксидантний ефект і провітамінна активність [8].

Початком біологічного підходу до вивчення пігментів і деяких питань їхнього утворення в клітині можна вважати роботи радянських дослідників школи Н. А. Красильникова. Утворення пігментів у мікробних клітинах відбувається при освітленні, достатньому доступі кисню і певному складі поживного середовища.

Відомо, що пігменти бактерій локалізуються в мембрані та клітинній стінці (*S. marcescens*), а можуть накопичуватися у вигляді зерен між клітинами (*Staphylococcus aureus*) чи рівномірно дифундувати у навколишнє середовище (*Pseudomonas aeruginosa*). Пігменти дріжджів в залежності від видової приналежності локалізовані в основному в цитоплазматичній мембрані (разом із дихальними ферментами), клітинній стінці та ліпідних глобулах цитоплазми [9].

Наразі з'ясовано, що синтез каротиноїдів у прокариот відбувається за 2-С-метил-D-4-ерітріол-4-фосфатним та пренілдіфосфатним шляхами з утворенням ізопренілпірофосфату та диметилалілдіфосфату через реакцію конденсації пірувату та гліцеральдегід-3-фосфату. На відміну від прокариотичних організмів, еукаріоти використовують мевалонатний шлях для конвертації ацетил-КоА у ізопренілпірофосфат. Слід зазначити, що стрептоміцетам та рослинам притаманні обидва із зазначених шляхів [10].

Розглядаючи функціональне значення каротиноїдів, слід відмітити, що певним групам мікроорганізмів відповідає специфічний набір цих пігментів, який, можливо, пов'язаний із роллю, яку вони виконують у клітині. Так, наприклад,  $\beta$ -каротинів нараховується понад 600. Характерною екологічною особливістю каротиноїдів є їх обов'язкова присутність у фотосинтезувальних організмах. Крім функції – передачі енергії електронного збудженого стану на хлорофіл – у фототрофних організмів каротиноїди виконують ще й іншу не менш важливу роль: захищають клітину від загибелі у результаті окиснення сенсibilізованого хлорофілу. Каротиноїди здатні захищати бактеріальну клітину від ряду хімічних сполук, проте деякі солі важких металів у великих кількостях здатні змінювати кількісний ( $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ) і якісний ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) склад каротиноїдів [11]. Є відомості щодо здатності каротиноїдів захищати клітину від шкідливого впливу озону [12]. Значно менше досліджень, в яких вивчалась участь каротиноїдів у процесі дихання. Каротиноїди приймають участь у явищах фототропізму та фототаксису. Експериментальні дані з цього приводу висвітлені в ряді оглядових робіт [13].

Актуальним напрямком досліджень на сьогодні є вивчення пробіотичних властивостей біомаси селекціонованих каротиносинтезувальних та селеновмісних штамів дріжджів. Зазвичай пробіотики створюють на основі бактерій родів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*, але вони не завжди характеризуються високою антагоністичною активністю щодо патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. На сьогодні перспективним залишається дослідження щодо пошуку пробіотичних штамів серед каротиносинтезувальних дріжджів [14].



Таким чином, перед проведенням скринінгу пігментосинтезувальних мікроорганізмів-індикаторів забруднення довкілля необхідно детально вивчити будову, хімічний склад та функції пігментів.

### **ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА КАРОТИНОСИНТЕЗУВАЛЬНУ ЗДАТНІСТЬ ДРІЖДЖІВ**

Якісний і кількісний склад пігментів мікроорганізмів може суттєво змінюватися залежно від компонентів середовища та параметрів культивування. Тому дуже важливо дотримуватися сталих умов вирощування бактерій та дріжджів при спостереженні за такою індикаційною ознакою, як пігмент. Саме однакові фізико-хімічні фактори середовища контрольних і дослідних зразків (аерація, температура, світло, реакція середовища) під час експерименту дозволять об'єктивно оцінити токсичність досліджуваного об'єкта.

*Вплив світла.* Дослідниками відмічено, що яскраве світло пригнічує пігментоутворення дріжджів, слабке – інколи стимулює його. Інтенсивність освітлення також впливає на якісний склад каротиноїдів. Вплив світла різного спектрального складу на ріст мікроскопічних грибів був вивчений Ю.В. Карпенко [15].

*Вплив аерації.* Аерація є одним із найважливіших чинників у регулюванні утворення таких продуктів метаболізму дріжджів, як каротиноїди [16].

*Вплив температури.* Температура, як одна з важливих умов для регулювання росту мікроорганізмів, впливає не лише на швидкість розмноження клітини, але і на швидкість біосинтетичних процесів у ній, а в результаті – на склад продуктів, що синтезуються. Літературні дані про вплив температури на каротиногенез в основному зводяться до того, що каротиноїдний склад у дріжджів залишається незмінним у досить широких межах коливань температури [17].

*Вплив складу поживного середовища.* Процес біосинтезу каротиноїдів дуже лабільний та у великій мірі залежить від складу поживного середовища і властивостей мікробної клітини. Для синтезу каротиноїдів важливе значення має джерело вуглецевого живлення. Джерела Нітрогену також чинять істотний вплив на каротиногенез мікроорганізмів. Надлишок Нітрогену у середовищі пригнічує пігментоутворення. Відсутність Нітрогену в момент активного розмноження клітин змінює напрям обміну речовин, перемикаючи його з синтезу білкових сполук на утворення безазотистих речовин, якими є, зокрема, каротиноїди. Для процесу каротиногенезу важливе значення має співвідношення у середовищі Карбону до Нітрогену, що було встановлене ще Шопфером у дослідах з культурами *Phycomyces blakesleanus*. Оптимальним співвідношенням Карбону до Нітрогену для каротиногенезу є 40:1. За такого співвідношення краще засвоюється глюкоза [18]. Щодо зміни водневого показника, дріжджі здатні рости в широкому діапазоні значень рН від 2 до 6. Але різке коливання цього параметру може відобразитись на активності ферментів та порушенні біосинтетичної активності дріжджів [19].

Відомо також, що при зберіганні культур мікроорганізмів в умовах колекції внаслідок випадкових ненаправлених мутацій виникають дисоціанти (S-, R-, M-форми) вихідного штаму, які відрізняються не тільки морфологією колоній, кольором пігментів, але й синтезом специфічних метаболітів [20].

Отже, вплив фізико-хімічних факторів на синтез пігментів мікроорганізмами вивчений відносно добре, тому є певна зацікавленість у дослідженні впливу на них антропогенних стресорів, зокрема таких розповсюджених полютантів як важкі метали.

## **ВПЛИВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ЖИТТЄДІЯЛЬНІСТЬ БАКТЕРІАЛЬНИХ ТА ДРІЖДЖОВИХ КЛІТИН**

Концентрація металів в живих організмах значно збільшується при переході з одного трофічного рівня на інший, і залежить також від видової приналежності організму [21].

Як відомо, Україна надзвичайно насичена промисловими та видобувними підприємствами (налічується понад 1,5 тис.) і має розгалужену мережу (понад 165 тис. км) автомобільних доріг [11, 22]. Тому однією з найважливіших екологічних проблем сьогодення є накопичення важких металів у довкіллі. Гранично допустимі концентрації (ГДК) важких металів у навколишньому середовищі мають досить низькі значення, але дуже часто їх концентрація у довкіллі перевищена в десятки, а то й сотні разів [22].

Одним із етапів виконання багатьох екологічних завдань є дослідження характеру впливу іонів металів на мікроорганізми, серед яких здійснюється пошук біологічних індикаторів техногенного забруднення [23]. У доступній нам літературі зустрічається безліч публікацій щодо механізмів дії важких металів на клітини мікроорганізмів, особливо прокариот [24]. Ряд експериментальних досліджень пов'язаний з вивченням впливу іонів металів на мікобіоту ґрунтів [25]. Бактерії мають декілька механізмів стійкості до іонів важких металів (позаклітинний бар'єр, ефлюкс, позаклітинна секвестрація, внутрішньоклітинна секвестрація та відновлення бактеріями іонів металів [26].

Від іонного радіуса металу залежить, із йонами яких есенціальних елементів буде відбуватися конкуренція за внутрішньоклітинні сайти зв'язування. Внаслідок стереохімічної аналогії мікроорганізми взаємодіють з металами. Як правило, макроелементи і метали із близькими іонними радіусами активують ферменти та можуть заміщувати один одного в активних центрах ферментів [27].

Однією із найбільш важливих груп мікроорганізмів, здатних сорбувати іони важких металів ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ), є дріжджі [28]. Зв'язування металів за допомогою біомаси може проходити двома способами: активне зв'язування (біоаккумуляція), що залежить від метаболічної активності клітин [29], та пасивне зв'язування (сорбція або комплектація), відоме як біосорбція (ці процеси проходять в основному на рівні мембрани клітин) [30].

Отже, вивчення біосорбційних властивостей бактерій дріжджів викликає в останній час великий інтерес. Тому що вони здатні виводити із водних розчинів важких металів більше, ніж інші сорбенти. Внаслідок чого їх рекомендують в очистці стічних вод від даних забруднень. Проте невивченими залишаються біоіндикативні властивості прокариот та одноклітинних еукаріот, які здатні сорбувати іони металів. Розробка методів подвійної селекції мікроорганізмів-індикаторів і сорбентів забруднень є найголовнішим завданням сучасної біотехнології та теорії біоіндикації.

## **БІОЛОГІЧНІ ТА АНАЛІТИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ СТАНУ ЕКОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ**

В деякій науковій літературі та загальному користуванні терміни «біоіндикація» та «біомоніторинг» є взаємозамінними [31]. Проте слід розрізняти ці поняття. Біоіндикація – це якісне оцінювання біотичної відповіді на екологічних стрес (наявність індикаторних організмів, їх морфологічні зміни, порушення у функціонуванні угруповань, відхилення від нормального розвитку тощо) [32]. Тільки біоіндикатори можуть надати інформативну відповідь про кінцеві фізіологічно активні форми забруднень, які неможливо ідентифікувати інструментальними методами. Тому біоіндикація, як прогресивний метод оцінки якості об'єктів навколишнього середовища, потребує подальшого вивчення та пошуку найбільш інформативних експрес-методів аналізу. В той же час за допомогою методів біомоніторингу

обов'язково проводиться кількісний вимір показників, який включає постійний контроль методами біоіндикації та біотестування за станом екосистем відповідно чітко розробленій програмі польових і лабораторних досліджень [33]. Саме дані біомоніторингу надають значення та правомірність таким нормативам як гранично допустимі концентрації (ГДК), ГДР (гранично допустимі рівні) тощо.

Отже, біологічні методи оцінки стану екосистеми дозволяють вирішити задачі, рішення яких за допомогою фізичних і хімічних методів неможливо. Одним із таких напрямків є дослідження використання пігментосинтезувальних бактерій для індикації стану середовища.

### **ПІГМЕНТОСИНТЕЗУВАЛЬНІ МІКРООРГАНІЗМИ – БІОІНДИКАТОРИ ЗАБРУДНЕННЯ ДОВКІЛЛЯ**

Для біоіндикації необхідно обирати чутливі угруповання, якими є мікроорганізми. Частіше за все в якості індикаторних мікроорганізмів використовують бактерії родів *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Photobacterium*, а також актиноміцети, плісняві гриби, дріжджі, ціанобактерії [34, 35].

На сьогодні відомо багато робіт присвячених вивченню проблеми акумуляції та адсорбції іонів важких металів клітинами грибів, бактерій, рослин тощо [11, 26, 29, 30, 36]. Однак нещодавно були проведені дослідження щодо втрати пігментосинтезувальної здатності бактерій за впливу різних токсикантів, зокрема важких металів [1, 37]. Слід відмітити, що на одноклітинних еукаріотах подібні системні дослідження не проводяться, хоча відомо, дріжджі є найбільш близькими до царства *Protista* [1]. Крім того, пігментосинтезувальні дріжджі можуть добре рости на харчових продуктах, їх виділяють з води, ґрунту, наземних частин рослин [7]. Висока розповсюдженість дріжджів у біотопах є найголовнішою вимогою для індикаторних організмів. Їх клітинний рівень організації дає змогу екстраполювати результати біоіндикації на інших представників еукаріотичних організмів, що робить дріжджі інформативними сигналізаторами забруднень.

Візуальне спостереження за зміною яскравості пігменту за впливу різних концентрацій іонів металів та інших токсикантів має помітну перевагу перед моніторингом стану природного середовища фізико-хімічними методами, зважаючи на велику вартість реагентів та обладнання, які при цьому використовуються [38, 39]. При цьому втрата пігменту за наявності небезпечної концентрації металів передусь загибелі клітин.

У зв'язку з тим, що на сьогодні практично не вивчені індикаторні ознаки пігментосинтезувальних одноклітинних еукаріот, авторами розроблений експрес-метод визначення забруднення води важкими металами та їх сполуками з використанням дріжджових клітин, що синтезують пігменти. Визначення забруднення води включає наступні етапи: відбір проби, приготування на її основі твердого поживного середовища Сабуро, засівання на нього дріжджових клітин суцільним газомом, інкубування культури в термостаті за температури 27-28 °С. Облік результатів досліджень проводять візуально на 3-ю добу культивування за 4-х бальною системою: 1 – суцільне пігментоутворення; 2 – добре; 3 – помірне; 4 – слабе; - – відсутнє пігментоутворення. Для кількісного вираження різниці в інтенсивності кольору пігментів контрольні та дослідні зразки фотографують при заданому освітленні (150 лк на відстані 30 см від об'єкта зйомки), передають цифрове зображення в графічний редактор Adobe Photoshop, визначають показники каналів кольорової моделі Lab, отримані значення контрольних і дослідних зразків порівнюють у програмі CIEDE2000. Таким чином, чим більше чисельне значення різниці в інтенсивності кольору пігментів (dE, ум. од.), тим токсичніше є водне середовище [40]. Спосіб дозволяє підвищити достовірність результатів та надає можливість створювати відповідну базу даних, на відміну від інших

методів біоіндикаційних досліджень, де якісні індикаційні ознаки не мають кількісного вираження.

Перспективою подальших досліджень є вивчення реакції пігментосинтезувальних дріжджових та бактеріальних клітин за дії поллютантів з метою їх використання в біоіндикації.

### УЗАГАЛЬНЕННЯ

Іони важких металів займають особливе місце серед багатьох забруднень навколишнього середовища. Це пов'язано з їх акумуляцією у живих організмах, передачею по харчових ланцюгах, а також високою токсичністю. Виходячи з цього, перспективним на сьогодні є скринінг чутливих індикаторів забруднення довкілля важкими металами, якими, зокрема, є мікроорганізми, що швидко реагують на перші, часто малопомітні, забруднення середовища. Закордонними та вітчизняними вченими активно проводиться вивчення індикаторних та сорбційних ознак редуцентів-прокаріот, проте недостатньо дослідженими з точки зору сигналізаторів забруднень є пігментосинтезувальні бактеріальні та дріжджові клітини.

Дріжджі та бактерії широко розповсюджені в природних біотопах, що є найголовнішою вимогою для індикаторних організмів. Візуальне спостереження за зміною яскравості пігментів за впливу різних концентрацій поллютантів має помітну перевагу перед індикацією стану довкілля за допомогою інструментальних методів, зважаючи на велику вартість реагентів та обладнання, які при цьому використовуються. Виходячи з вищезазначеного, пігментовані мікроорганізми можуть слугувати інформативними біоіндикаторами забруднення довкілля важкими металами та іншими поллютантами.

Розроблений авторами метод ідентифікації важких металів та їх сполук у воді пігментованими дріжджовими клітинами дозволяє швидко визначити фізіологічно активні форми поллютантів та оцінити екологічний стан водної екосистеми, на відміну від аналітичних методів, за допомогою яких не завжди вдається встановити сумарний ефект впливу речовин на живі організми.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Рильський О.Ф. Наукове обґрунтування прокаріотичної біоіндикації забруднення важкими металами природного середовища : дис. ... д-ра біол. наук : 03.00.16. Київ, 2012. 351 с.
2. Saud Hanan M., Mouruj A. Alaubydi. Production, extraction and partial of melanin pigment from pathogenic *Klebsiella pneumoniae* HM isolated from clinical samples. *Microbiology*. 2016. Vol. 5, № 10. P. 910–919.
3. Феофилова Е.П. Пигменты микроорганизмов. Москва : Наука, 1974. 242 с.
4. Tarangini K., Mishra S. Production of melanin by soil microbial isolate on fruit waste extract: two step optimization of key parameters. *Biotechnology*. 2014. № 4. P. 139–146.
5. Квасников Е.И., Васкивнюк В.Г., Суденко В.И., Гринберг Т.А. Каротинсинтезирующие дрожжи. Киев : Наукова думка, 1980. 171 с.
6. McCartney K.L., [Ligon R.A.](#), [Butler M.W.](#), [Denardo D.F.](#) The effect of carotenoid supplementation on immune system development in juvenile male veiled chameleons (*Chamaleo calyptratus*). *Frontiers in Zoology*. 2014. № 11. P. 11–26.
7. Кирица Е. Направленный синтез каротиноидов у дрожжей и перспектива ихиспользования : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.23. Молдова, 2005. 129 с.



8. Steiger S., Perez-Fons L., Cutting S. M. Annotation and functional assignment of the genes for the C<sub>30</sub> carotenoid pathways from the genomes of two bacteria: *Bacillus indicus* and *Bacillus firmus*. *Microbiology*. 2015. № 161. P. 194–202.
9. Фирсов Н.Н. Микробиология : Словарь терминов. Москва : Дрофа, 2006. 260 с.
10. Нечипуренко О.О. Авдеева Л.В., Хархота М.А. Каротинсинтезувальна здатність та пробіотичні властивості бактерій роду *Bacillus*. *Наукові записки*. 2013. Т. 142. С. 25–35.
11. Кушкевич І.В., Гнатуш С.О., Гудзь С.П. Вплив деяких важких металів на фотосинтезувальні сіркобактерії *Lamprocystis* sp. *Біологічні Студії*. 2009. Т. 3, № 2. С. 71–80.
12. Зобнина В. П., Морковина Э. А. Микробиология. Москва. : АН СССР, 1971. 96 с.
13. Феофилова Е. П. Каротиноиды грибов: биологические функции и практическое использование. *Прикладная Биохимия и Микробиология*. 1994. Вып. 30, № 2. С. 181–195.
14. Ragul K., Syiem I., Sundar K. Characterization of probiotic potential of *Bacillus* species isolated from a traditional brine pickle. *Food Science Technology*. 2017. Vol. 54. P. 4473–4483.
15. Карпенко Ю.В. Вплив світла різного спектрального складу на показники росту мікроскопічних грибів. *Мікробіологічний Журнал*. 2010. Т. 72, № 6. С. 36–42.
16. Emelina D. Simova, Ginka I. Frengova, Dora M. Beshkova. Effect of aeration on the production of carotenoid pigments by *Rhodotorula rubra-Lactobacillus casei* subsp. *casei* co-cultures in whey ultrafiltrate. *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung*. Tubingen, 2003. № 6(3). P. 225–229.
17. Калюжин В.А. Терморезистентность у дрожжей *Saccharomyces cerevisia*. *Журнал Общей Биологии*. 2011. Т. 72, № 2 (март – апрель). С. 140–149.
18. Avalos J., Carmen L.M. Biological roles of fungal carotenoids. *Current Genetics*. 2015. Vol. 61. P. 309–324.
19. Меледина Т.В., Давыденко С.Г., Васильева Л.М. Физиологическое состояние дрожжей : учебное пособие. СПб. : НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. 48 с.
20. Акулинин Г.Е. Влияние водорастворимых полимеров на уровень пигментообразования у диссоциантов бактерий *Pseudomonas aureofaciens* шт. 2687 в процессе хранения. *Агроэкологический Журнал*. 2003. № 4. С. 53–56.
21. Домніч В.І., Лозицька Н.І. Особливості накопичення Рb та Cd в органах акумулянтах хижих та копитних ссавців південно-східної частини України. *Сучасні проблеми біології, екології та хімії* : зб. тез IV Міжнар. наук.-практ. конф., м. Запоріжжя, 13–15 трав. 2015 р. Запоріжжя, 2015. С. 112–114.
22. Лиштван И.И., Абрамец А.М., Янута Ю.Г. Отходы целлюлозно-бумажной промышленности и утилизация их в земледелии. *Природопользование*. Часть II 2012. Вып. 21. С. 237–243.
23. Монин А.С., Шишков Ю.А. Глобальные экологические проблемы. Москва : Знание, 1990. С. 124–147. (Серия «Науки о Земле»).
24. Янева О.Д. Механизмы устойчивости бактерий к ионам тяжелых металлов. *Мікробіологічний Журнал*. 2009. Т. 71, № 6. С. 54–65.
25. Chu D. Effects of heavy metals on soil microbial community. *Earth and Environmental Science*. 2018. Vol. 113. P. 1–5.

26. Jon L. Hobman, Lisa C. Crossman. Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *Journal of Medical Microbiology*. 2014. № 64. P. 471–497.
27. Таширеві А.Б. Концепція інтегральних механізмів акумуляції металів синтрофними мікробними асоціаціями. *Мікробіологічний Журнал*. 1999. Т. 61, № 5. С. 78–84.
28. Godwin E. Udofia, Joseph P. Essien, Samuel I. Eduok. Bioaccumulation of heavy metals by yeasts from Qua Iboe estuary mangrove sediment ecosystem, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*. 2009. Vol. 3 (12). P. 862–869.
29. Rayssa P.V. Tolerance to and accumulation of Cadmium, Copper, and Zinc by *Cupriavidus necator*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 2018. Vol. 42. P. 1–11.
30. Tieshan Wang. Different biosorption mechanisms of Uranium(VI) by live and heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* under environmentally relevant conditions. [\*Journal of Environmental Radioactivity\*](#). 2017. Vol. 167. P. 92–99.
31. Белюченко И.С., Федоненко Е.В., Смагина А.В. Биомониторинг состояния окружающей среды: учебное пособие. Краснодар : КубГАУ, 2014. 153 с.
32. Pamar T.K., Rawtani D., Agrawal Y.K. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Science*. 2016. Vol. 9 (2). P. 110–118.
33. Моніторинг довкілля: підручник / В.М. Боголюбов та ін. 2-ге вид. ; під ред. В.М. Боголюбова. Вінниця : ВНТУ, 2010. 232 с.
34. Кацев А.М., Макемсон Дж. Идентификация светящихся бактерий, выделенных их Черного и Азовского морей. *Ученые записки ТНУ им. В.И. Вернадского*. 2006. Т. 19 (58), № 4. С. 111–116. (Биология, химия).
35. Білий О.І., Василів О.М., Гетьман В.Б. Вплив важких металів на світлорозсіюючі властивості бактерій циклу сірки *Desulfuromonas acetoxidans*. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2011. Т. 2 (8) 4. С. 20–24.
36. Биологическая очистка хромсодержащих промышленных сточных вод / Е.И. Квасников и др. ; под. ред. Е.И. Квасникова. Київ : Наукова думка, 1990. 112 с.
37. Рильський О.Ф., Масікевич Ю.Г. Мікробіологічна біоіндикація довкілля, забрудненого важкими металами та іншими ксенобіотиками. *Вісник Запорізького національного університету*. 2012. № 3. С. 139–147.
38. Рыльский А.Ф. Действие тяжелых металлов на пигментсинтезирующие грамотрицательные бактерии. *Вісник Донецького Національного Університету*. 2009. Вип. 2. С. 260–264. (Серія А: Природничі науки).
39. Крупей К.С., Скокова А.О. Пігменти бактерій – остання лінія оборони при тривалому стресі. *Екологія, неоекологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування: матеріали II Міжнар. наук. конфер., м. Запоріжжя, 5-6 груд. 2013 р. Харків, 2013. С. 103–104.*
40. Спосіб визначення забруднення води важкими металами: пат. 108287 Україна: МПК G01N 33/18, G01N 33/20, G01N 21/75, G01N 21/84, C12Q 1/04 (2006.01). № a201309338; заявл. 25.07.2013; опубл. 10.04.2015, Бюл. № 7. 6 с.

## REFERENCES

1. Rylskiy O.F. Naukove obgruntuvannya prokariotychnoi bioindykatsii zabrudnennia vazhkymy metalamy pryrodnoho seredovishcha : dys. ... d-ra biol. nauk : 03.00.16. Kyiv, 2012. 351 s.
2. Saud Hanan M., Mouruj A. Alaubydi. Production, extraction and partial of melanin pigment from pathogenic *Klebsiella pneumoniae* HM isolated from clinical samples. *Microbiology*. 2016. Vol. 5, № 10. P. 910–919.
3. Feofilova E.P. Pyhmenty mikroorhanizmov. Moskva : Nauka, 1974. 242 s.
4. Tarangini K., Mishra S. Production of melanin by soil microbial isolate on fruit waste extract: two step optimization of key parameters. *Biotechnology*. 2014. № 4. P. 139–146.
5. Kvasnikov E.Y., Vaskivniuk V.H., Sudenko V.Y., Hrinberh T.A. Karotinsinteziruiushchie drozhzhy. Kyev : Naukova dumka, 1980. 171 s.
6. McCartney K.L., Ligon R.A., Butler M.W., Denardo D.F. The effect of carotenoid supplementation on immune system development in juvenile male veiled chameleons (*Chamaleo calyptratus*). *Frontiers in Zoology*. 2014. № 11. P. 11–26.
7. Kiritsa E. Napravlenyi sintez karotinoidov u drozhzhei i perspektyva ih ispolzovaniya : dis. ... d-ra biol. nauk : 03.00.23. Moldova, 2005. 129 s.
8. Steiger S., Perez-Fons L., Cutting S. M. Annotation and functional assignment of the genes for the C30 carotenoid pathways from the genomes of two bacteria: *Bacillus indicus* and *Bacillus firmus*. *Microbiology*. 2015. № 161. P. 194–202.
9. Firsov N.N. Mikrobiolohiya : Slovar terminov. Moskva : Drofa, 2006. 260 s.
10. Nechypurenko O.O. Avdieieva L.V., Kharkhota M.A. Karotynsytezuvalna zdatnist ta probiotychni vlastyvyosti bakterii rodu *Bacillus*. *Naukovi zapysky*. 2013. T. 142. S. 25–35.
11. Kushkevych I. V., Hnatush S. O., Hudz S. P. Vplyv deiakykh vazhkykh metaliv na fotosyntezuvalni sirkobakterii *Lamprocystis sp.* *Biologichni Studii*. 2009. T. 3, № 2. S. 71–80.
12. Zobnina V. P., Morkovina Э. A. Mikrobiolohiya. Moskva. : AN SSSR, 1971. 96 s.
13. Feofilova E. P. Karotinoidy hribov: biologicheskie funktsii i prakticheskoe ispolzovanie. *Prikladnaia Biokhimiya i Mikrobiolohiya*. 1994. Vyp. 30, № 2. S. 181–195.
14. Ragul K., Syiem I., Sundar K. Characterization of probiotic potential of *Bacillus* species isolated from a traditional brine pickle. *Food Science Technology*. 2017. Vol. 54. P. 4473–4483.
15. Karpenko Yu.V. Vplyv svitla riznoho spektralnoho skladu na pokaznyky rostu mikroskopichnykh hrybiv. *Mikrobiolohichni Zhurnal*. 2010. T. 72, № 6. S. 36–42.
16. Emelina D. Simova, Ginka I. Frengova, Dora M. Beshkova. Effect of aeration on the production of carotenoid pigments by *Rhodotorula rubra-Lactobacillus casei* subsp. *casei* co-cultures in whey ultrafiltrate. *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung*. Tubingen, 2003. № 6(3). P. 225–229.
17. Kaliuzhyn V.A. Termorezistentnost u drozhzhei *Saccharomyces cerevisia*. *Zhurnal Obshchei Byolohyy*. 2011. T. 72, № 2 (mart – aprel). S. 140–149.
18. Avalos J., Carmen L.M. Biological roles of fungal carotenoids. *Current Genetics*. 2015. Vol. 61. P. 309–324.
19. Meledina T.V., Davydenko S.H., Vasileva L.M. Fiziologicheskoe sostoianie drozhzhei : uchebnoe posobie. Spb. : NYU YTMO; YKhyBT, 2013. 48 s.

20. Akulinin H.E. Vliianye vodorastvorimykh polimerov na uroven pyhmentoobrazovaniya u dissotsiantov bakteriyi *Pseudomonas aureofaciens* sht. 2687 v protsesse khraneniya. *Ahroekologicheskii Zhurnal*. 2003. № 4. S. 53–56.
21. Domnich V.I., Lozytska N.I. Osoblyvosti nakopychennia Pb ta Cd v orhanakh akumuliantakh khyzhykh ta kopytnykh ssavtsiv pivdenno-skhidnoi chastyny Ukrainy. *Suchasni problemy biolohii, ekolohii ta khimii* : zb. tez IV Mizhnar. nauk.-prakt. konf., m. Zaporizhzhia, 13–15 trav. 2015 r. Zaporizhzhia, 2015. S. 112–114.
22. Lishtvan Y.Y., Abramets A.M., Yanuta Yu.H. Otkhody tselliulozno-bumazhnoi promyshlennosti i utilizatsiia ih v zemledelii. *Prirodopolzovanie*. Chast II 2012. Vyp. 21. S. 237–243.
23. Monin A.S., Shishkov Yu.A. Hlobalnie ekolohicheskiye problemy. Moskva : Znanie, 1990. S. 124–147. (Seriia «Nauki o Zemle»).
24. Ianeva O.D. Mekhanizmy ustoichyvosti bakteriy k ionam tiazhelyh metallov. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*. 2009. T. 71, № 6. S. 54–65.
25. Chu D. Effects of heavy metals on soil microbial community. *Earth and Environmental Science*. 2018. Vol. 113. P. 1–5.
26. Jon L. Hobman, Lisa C. Crossman. Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *Journal of Medical Microbiology*. 2014. № 64. P. 471–497.
27. Tashirev A.B. Kontseptsyia intehralnyh mekhanizmov akumuliiatsii metallov sintrofnymi mikrobnymi assotsiatsiyami. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*. 1999. T. 61, № 5. S. 78–84.
28. Godwin E. Udofia, Joseph P. Essien, Samuel I. Eduok. Bioaccumulation of heavy metals by yeasts from Qua Iboe estuary mangrove sediment ecosystem, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*. 2009. Vol. 3 (12). P. 862–869.
29. Rayssa P.V. Tolerance to and accumulation of Cadmium, Copper, and Zinc by *Cupriavidus necator*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 2018. Vol. 42. P. 1–11.
30. Tieshan Wang. Different biosorption mechanisms of Uranium(VI) by live and heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* under environmentally relevant conditions. *Journal of Environmental Radioactivity*. 2017. Vol. 167. P. 92–99.
31. Beliuchenko Y.S., Fedonenko E.V., Smahina A.V. Biomonitorinh sostoiannya okruzhaiushchei sredi: uchebnoe posobie. Krasnodar : KubHAU, 2014. 153 s.
32. Pamar T.K., Rawtani D., Agrawal Y.K. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Science*. 2016. Vol. 9 (2). P. 110–118.
33. Monitorynh dovkillia: pidruchnyk / V.M. Boholiubov ta in. 2-he vyd. ; pid red. V.M. Boholiubova. Vinnytsia : VNTU, 2010. 232 s.
34. Katsev A.M., Makemson Dzh. Identifikatsyia svetiashchihsia bakteriy, vydelennyh iz Chernoho i Azovskoho morei. *Uchenye zapiski TNU im. V.Y. Vernadskoho*. 2006. T. 19 (58), № 4. S. 111–116. (Biolohiya, khimiya).
35. Bilyi O.I., Vasyliv O.M., Hetman V.B. Vplyv vazhkykh metaliv na svitlorozsiuiuchi vlastyivosti bakterii tsykladu sirky *Desulfuromonas acetoxidans*. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2011. T. 2 (8) 4. S. 20–24.
36. Biolohicheskaia ochystka khromsoderzhashchih promyshlennyh stochnykh vod / E.Y. Kvasnikov i dr. ; pod. red. E.Y. Kvasnikova. Kyiv : Naukova dumka, 1990. 112 s.



37. Rylskiy O.F., Masikevych Yu.H. Mikrobiolohichna bioindykatsiia dovkillia, zabrudnenoho vazhkymy metalamy ta inshymy ksenobiotykamy. *Visnyk Zaporizkoho natsionalnoho universytetu*. 2012. № 3. S. 139–147.
38. Rylskiy A.F. Deistvie tiazhelyh metallov na pihmentsinteziruiushchie hramotritsatelnye bakterii. *Visnyk Donetskoho Natsionalnoho Universytetu*. 2009. Vyp. 2. S. 260–264. (Seriya A: Pryrodnychi nauky).
39. Krupiei K.S., Skokova A.O. Pihmenty bakterii – ostannia liniia oborony pry tryvalomu stresi. *Ekolohiia, neoekolohiia, okhorona navkolyshnoho seredovyshcha ta zbalansovane pryrodokorystuvannia: materialy II Mizhnar. nauk. konfer., m. Zaporizhzhia, 5-6 hrud. 2013 r. Kharkiv, 2013. S. 103–104.*
40. Sposib vyznachennia zabrudnennia vody vazhkymy metalamy: pat. 108287 Ukraina: MPK G01N 33/18, G01N 33/20, G01N 21/75, G01N 21/84, C12Q 1/04 (2006.01). № a201309338; zaiavl. 25.07.2013; opubl. 10.04.2015, Biul. № 7. 6 s.

Рецензенти: Кожемякін Г.Б. к.т.н., зав. кафедри прикладної екології та охорони праці  
Запорізької державної інженерної академії  
Войтович О.М., к.б.н., доцент кафедри садово-паркового господарства та  
генетики ЗНУ