

DOI <https://doi.org/10.26661/2312-2056/2018-23/1-13>

УДК 546.76:628.3:582.282.23

**СКРИНІНГ ПІГМЕНТОСИНТЕЗУВАЛЬНИХ
ДРІЖДЖІВ – БІОІНДИКАТОРІВ ЙОНІВ ХРОМУ (VI)****Валерченко Ю. В., Крупей К. С.****Запорізький національний університет***julia1881881@gmail.com*

Зроблено порівняльний аналіз візуальної оцінки пігментонакопичення дріжджів *Rhodotorula mucilaginosa* Y-1394 та концентрації каротиноїдів у клітинах. Встановлена наявність сильного кореляційного зв'язку. Рекомендовано для використання у біоіндикації йонів Хрому пігментовані дріжджові культури, а саме: *Sporobolomyces roseus* Y-333, *Rh. glutinis* Y-1333, *Rh. glutinis* Y-1335, *Rh. mucilaginosa* Y-1394 та *Rh. aurantiaca* Y-1195, які проявили олігодинамічну дію в присутності Калію біхромату. Відносно пігментоутворення найбільш токсичну дію йони Хрому спричинили на дріжджі *Sp. roseus* Y-1443, які виявилися у 40 разів чутливіше, ніж *Rhodospiridium sphaerocarpum* Y-44. Повна втрата пігментів спостерігалася за концентрації Cr^{6+} у дріжджі *R. sphaerocarpum* Y-44 – 200 мг/дм³.

Хром, пігмент, дріжджі-біоіндикатори

Хром – це один із біогенних хімічних елементів, що входить до складу рослинних і тваринних тканин. Найважливіша його біологічна роль полягає в регуляції вуглеводного обміну і рівня глюкози в крові. Крім того, Хром бере участь у регуляції обміну холестерину і є активатором деяких ферментів [11].

Найбільш широке розповсюдження мають дві форми Хрому – Cr^{3+} і Cr^{6+} . Незамінну функцію в живому організмі виконує тільки тривалентний Хром. Сполуки на основі шестивалентного Хрому токсичні та канцерогенні [2, 6, 9].

У питній воді ГДК Cr^{6+} – 0,05, а Cr^{3+} – 0,5 мг/дм³. Для наземних диких тварин токсична питна вода з вмістом Хрому 1,0 мг/дм³, для домашньої худоби – 0,5 мг/дм³ [2].

Сполуки Хрому за концентрації 0,1 мг/ дм³ глибоко діють на флору і фауну водойм, гальмують процеси самоочищення [4]. Хром надає токсичну дію на мікробіоту біологічної очистки стічних вод у концентрації 2–5 мг/дм³. Встановлено,

що 10 % Cr^{6+} у промислових стоках знижують потужність установки до 5 % [9].

Мікроорганізми, а саме дріжджі, найбільш чутливі до дії важких металів (ВМ) [7]. Вони здатні виводити із водних розчинів більше ВМ, ніж інші сорбенти. Візуальне спостереження за зміною яскравості пігментів за дії різних концентрацій ВМ має перевагу перед індикацією стану довкілля за допомогою фізичних і хімічних методів, внаслідок чого пігментосинтезувальних дріжджів рекомендують в очистці та біоіндикації стічних вод. Тому метою роботи було провести скринінг каротин- та пульхериміносинтезувальних дріжджів-індикаторів Cr^{6+} .

Матеріали та методи досліджень

Об'єктом дослідження були каротиносинтезувальні дріжджі родів *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* та *Sporobolomyces*, а також пульхеримінові штами дріжджів роду *Metschnikowia*, 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 Калію біхромату (в перерахунку на катіон). Контролем слугувало поживне середовище Сабуро без додавання солей. Після застигання середовища на нього суцільним газоном засівали 18-годинні колекційні культури дріжджів (0,2 мл на 1 чашку Петрі). Щільність суспензії становила 10^7 кл/см³. Інкубування проводили в термостаті за температури 27–28 °С. На 3-ю добу культивування візуально проводили облік результатів шляхом порівняння дослідних зразків із контролем.

Для визначення концентрації каротиноїдів у біомасі дріжджів використовували спектрофотометричний метод. Концентрацію β -каротину, торуліну та торулародіну визначали при довжині хвиль 450, 509, 537 нм, відповідно [3].

Для розрахунку різниці в інтенсивності кольору між дослідними і контрольними зразками чашки Петрі з дріжджовими колоніями фотографували, завантажували

фотографії у графічний редактор Adobe Photoshop, визначали показники каналів кольорової моделі (Lab), потім у програмі CIEDE 2000 розраховували різницю в інтенсивності кольору пігментів (dE) [10].

Результати та їх обговорення

Результати дослідження показали, що пігментосинтезувальні дріжджі втрачали здатність до утворення пігментів із певних концентраційних рівнів йонів Хрому.

Для підтвердження ефективності використання широко застосовуваної шкали для візуальної оцінки пігментонакопичення мікроорганізмів [1, 8] було проведене дослідження щодо спектрофотометричного визначення кількісного вмісту каротиноїдів у дріжджах *Rh. mucilaginosa* Y-1394, які синтезують декілька типів пігментів (табл. 1).

При порівнянні візуальної оцінки пігментонакопичення дріжджів та концентрації каротиноїдів було встановлено наявність сильного кореляційного зв'язку $r = +1$.

За концентрації Cr^{6+} 5 мг/дм³ був відмічений суцільний ріст помірно пігментованих колоній (++) *Rh. mucilaginosa* Y-1394. Концентрація каротиноїдів (β -каротину, торуліну та торулародіну) була в 2 рази нижчою, порівняно з контролем. За концентрації Cr^{6+} 10 мг/дм³ спостерігався суцільний ріст безпігментних колоній *Rh. mucilaginosa* Y-1394 (концентрація β -каротину була в 10,3 рази меншою, ніж у контролі).

У дріжджів *Rhodospiridium sphaerocarpum* Y-44 за концентрації йонів Хрому 150 мг/дм³ спостерігався добрий ріст пігментованих та безпігментних колоній. За концентрації йонів Хрому 200–300 мг/дм³ був відмічений ріст безпігментних колоній. Повна втрата росту та пігментоутворення колоній відмічена за концентрації йонів Хрому (VI) 350 мг/дм³ (табл. 2).

Таблиця 1 – Продуктивність каротинвмісних дріжджів *Rh. mucilaginosa* Y-1394 за дії Cr⁶⁺

Table 1 – Productivity of carotene containing yeast *Rh. mucilaginosa* Y-1394 for the effects of Cr⁶⁺

Концентрація Cr ⁶⁺ , мг/дм ³	Візуальна оцінка пігментонакопичення дріжджів	β-каротин, мкг/см ³	Торулін, мкг/см ³	Торулародін, мкг/см ³
Контроль (без металу)	П * ++++ (100 %)	0,195±0,001	0,079±0,0013	0,311±0,0052
2,5	+++ (75 %)	0,144±0,0023	0,058±0,002	0,252±0,0018
5	++ (50 %)	0,098±0,0011	0,0385±0,0006	0,149±0,0031
7,5	+ (25 %)	0,045±0,003	0,0191±0,0012	0,075±0,002
10	- (0 %)	0,019±0,00041	0,0097±0,000	0,028±0,0004

Примітка: *Пігментоутворення: ++++ – інтенсивне, +++ – добре, ++ – помірне, + – слабке, - – відсутнє; p<0,05

Добрий ріст помірно пігментованих колоній *R. diobovatum* Y-43 був відмічений за концентрації 25 мг/дм³. За концентрацій йонів Хрому 50–150 мг/дм³ зареєстрований помірний ріст пігментованих та безпігментних колоній. Повна втрата росту та пігментоутворення спостерігалась за концентрації 200 мг/дм³ Cr⁶⁺.

Дріжджі роду *Metschnikowia* синтезують ферумвмісний червоно-вишневий пігмент пульхеримін у присутності в середовищі Сабуро FeSO₄. За концентрацій 10–75 мг/дм³ йонів Cr⁶⁺ та 1 мг/дм³ FeSO₄ спостерігався суцільний ріст безпігментних колоній *M. pulcherrima* Y-332, як і в контролі. Вірогідно це було спричинено виникненням дисоціантів внаслідок випадкових ненаправлених мутацій вихідного штаму. Проте культура *M. pulcherrima* Y-333 проявила олігодинамічну дію за умов присутності в середовищі металу. Синтез пульхериміну блокувався за концентрації 40 мг/дм³ йонів Хрому (табл. 3).

Таблиця 2 – Вплив Cr^{6+} на інтенсивність пігментоутворення дріжджів *Rhodosporidium*

Table 2 – Influence of Cr^{6+} on the intensity of pigmentation of *Rhodosporidium* yeast

Концентрація Cr^{6+} , мг/дм ³	<i>R. sphaerocarpum</i> Y-44		<i>R. diobovatum</i> Y-43	
	*Ріст	**Пігмент	Ріст	Пігмент
Контроль	++++	++++	++++	++++
10	++++	++++	++++	++++
25	++++	++++	+++	++
50	++++	++++	++	±
75	++++	++++	++	±
100	++++	+++	++	±
150	+++	±	++	±
200	++	–	–	–
250	++	–	–	–
300	+	–	–	–

Примітка (тут та далі): *Ріст: ++++ – суцільний, +++ – добрий, ++ – помірний, + – слабкий, – – відсутній; **Пігмент: ++++ – інтенсивний, +++ – добрий, ++ – помірний, + – слабкий, – – відсутній, ± – наявність пігментних та безпігментних колоній.

Повне блокування пігментоутворення та росту дріжджових клітин *Rh. mucilaginosa* Y-1395 відбувалося у присутності в середовищі 10 мг/дм³ йонів Хрому. Дріжджі *Sr. roseus* Y-1443 втрачали здатність до пігментоутворення за концентрації Хрому 5 мг/дм³ в поживному середовищі, а за концентрації 25 мг/дм³ металу ріст культури повністю блокувався (табл. 4).

Таблиця 3 – Вплив Cr^{6+} на інтенсивність пігментоутворення дріжджів *Metschnikowia*

Table 3 – Influence of Cr^{6+} on the intensity of pigmentation of *Metschnikowia* yeast

Концентрація Cr^{6+} , мг/дм ³	<i>M. pulcherrima</i> Y-332		<i>M. pulcherrima</i> Y-333	
	Ріст	Пігмент	Ріст	Пігмент
Контроль	++++	–	++++	++++
5	++++	–	++++	+++
10	++++	–	++++	++
20	++++	–	+++	++
30	++++	–	++	++
40	++++	–	++	–
50	++++	–	++	–
75	++++	–	–	–

Таблиця 4 – Вплив Cr^{6+} на інтенсивність пігментоутворення дріжджів

Table 4 – Influence of Cr^{6+} on the intensity of pigmentation of yeast

Концентрація Cr^{6+} , мг/дм ³	<i>Rh. mucilaginosa</i> Y-1395		<i>Sp. roseus</i> Y-1443	
	Ріст	Пігмент	Ріст	Пігмент
Контроль	++++	++++	++++	++++
1	++++	++++	++++	++
5	+	+	+++	–
10	–	–	+++	–
20	–	–	++	–
25	–	–	–	–

Дріжджі *R. diobovatum* Y-43, на відміну від інших досліджуваних культур, не втрачали здатність повністю накопичувати каротиноїди та не мали концентраційного

інтервалу (КІ) між втратою пігментів і затримкою росту, проте мали здатність поступово зменшувати інтенсивність кольору пігментів при підвищенні концентрації металу (рис. 1).

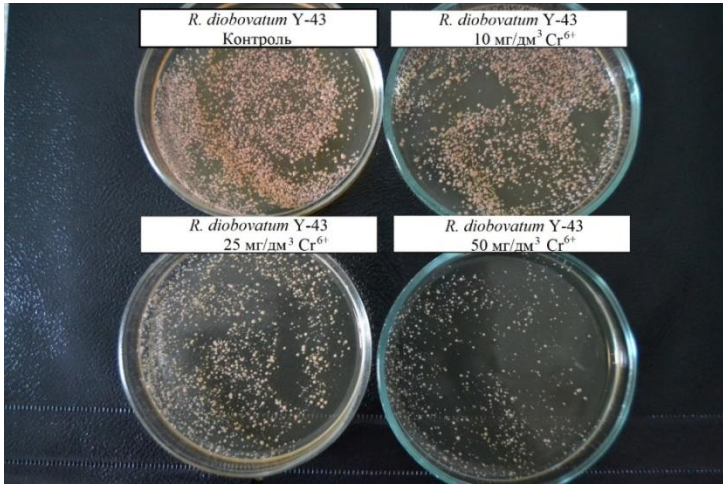


Рисунок 1 – Вплив йонів Хрому (VI) на інтенсивність пігментоутворення дріжджів *R. diobovatum* Y-43

Figure 1 – Influence of Chromium (VI) ions on the intensity of pigmentation of *R. diobovatum* Y-43 yeast

Отже, культури *R. sphaerocarpum* Y-44 та *R. diobovatum* Y-43 виявилися найбільш стійкими до дії йонів Хрому. На ріст дріжджів *Rh. mucilaginosa* Y-1395 йони Хрому (VI) проявили у 35 разів токсичнішу дію, ніж на *R. sphaerocarpum* Y-44. Проте відносно пігментоутворення найбільш токсичну дію йони Хрому спричинили на дріжджі *Sp. roseus* Y-1443, які виявилися у 40 разів чутливіше, ніж *R. sphaerocarpum* Y-44.

Проведені попередні дослідження на інших штаммах дріжджів *Rhodotorula* показали, що вони здатні також втрачати пігменти та затримувати ріст за дії важких металів [5].

Порівняльний аналіз щодо впливу йонів Хрому на пігментосинтезувальних мікроорганізмів показав, що дріжджі роду *Rhodospiridium* виявилися стійкішими, на відміну від інших досліджуваних пігментованих форм дріжджів. Найбільш токсичну дію йони Хрому проявили на дріжджі роду *Rhodotorula* і на *Sporobolomyces*, а саме *Sp. roseus* Y-333, *Rh. glutinis* Y-1333, *Rh. glutinis* Y-1335, *Rh. mucilaginosa* Y-1394, *Rh. mucilaginosa* Y-1395 і *Rh. aurantiaca* Y-1195.

Встановлено, що повна втрата пігментів спостерігалася за концентрації Cr^{6+} у дріжджів *R. sphaerocarpum* Y-44 – 200 мг/дм³, *M. Pulcherrima* Y-333– 40 мг/дм³, *Rh. rubra* RA-10 – 50 мг/дм³, *Rh. aurantiaca* Y-1195 – 10 мг/дм³, *Rh. glutinis* Y-1335 – 10 мг/дм³, *Rh. mucilaginosa* Y-1394 – 10 мг/дм³ та *Sp. roseus* Y-1443 – 5 мг/дм³ (що на 33,3; 20,0; 16,7; 50,0; 75,0; 50,0 та 87,5 % відповідно нижчі за ті концентрації, які повністю інгібували їх життєдіяльність).

Таблиця 5 – Вплив концентраційного ряду йонів Хрому на інтенсивність кольору каротиноїдних пігментів дріжджових клітин

Table 5 – Influence of the concentration range of chromium ions on the color intensity of carotenoid pigment yeast cells

Концентрація Cr^{6+} , мг/дм ³	<i>R. diobovatum</i> Y-43				<i>Rh. glutinis</i> Y-1333			
	L	a	b	dE	L	a	b	dE
Контроль	66,8	9,4	14		67	23	31	
10	61	11,4	11,8	6,65± 0,06	48	22	25	17,60 ± 1,10
25	59,6	4,6	7,8	8,26 ± 0,01	–	–	–	–
50	57	-0,6	4,8	15,12 ± 0,15	–	–	–	–
75	50,8	1,4	4	17,56 ± 0,97	–	–	–	–
100	47,2	0,8	6,8	20,64± 0,65	–	–	–	–
150	32,6	-0,4	5,2	36,30± 1,16	–	–	–	–

Примітка. 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

За концентрації йонів Хрому 10 мг/дм³ у дріжджів *Rh. glutinis* Y-1333 відмічався ріст безпігментних колоній (dE дорівнювала 17,6 ум. од.), проте у дріжджів *R. diobovatum* Y-

43 рiст безпiгментних колонiй, i подекуди пiгментованих, вiдмiчався за концентрацiй 50; 75; 100 i 150 мг/дм³ (dE складала 15,12; 17,56; 20,64 i 36,30 ум. од., вiдповiдно) (табл. 5).

Таким чином, iз пiдвищенням концентрацiї йонiв Хрому у поживному середовищi рiзниця в iнтенсивностi кольору пiгментiв мiж дослiдними та контрольними зразками (dE) збiльшувалася.

Змiна iнтенсивностi пiгментоутворення за впливу йонiв Хрому є ознакою, що добре спостерiгається, тому культури каротиносинтезувальних дрiжджiв рекомендованi авторами як iнформативнi бiоiндикатори забруднення води ВМ.

Висновки

1. Проведено скринiнг дрiжджiв – бiоiндикаторiв йонiв Хрому. Для бiоiндикацiї якостi води найбільш iнформативними, як iндикаторнi мiкроорганiзми, є культури *Sp. roseus* Y-333, *Rh. glutinis* Y-1333, *Rh. glutinis* Y-1335, *Rh. mucilaginoso* Y-1394 i *Rh. aurantiaca* Y-1195.

2. Дрiжджi *R. diobovatum* Y-43, на вiдмiну вiд дрiжджiвiнших родiв, не втрачали здатнiсть повнiстю накопичувати каротиноiди та не мали концентрацiйного iнтервалу мiж втратою пiгментiв i затримкою росту, проте поступово зменшували iнтенсивнiсть кольору пiгментiв при пiдвищеннi концентрацiї йонiв Хрому (в iнтервалi 10–150 мг/дм³), що є цiнною властивiстю для бiоiндикацiйних дослiджень.

3. В результатi проведення порiвняльного аналізу щодо впливу йонiв Хрому на дрiжджовi клiтини *Rhodospiridium*, *Metschnikowia*, *Sporobolomyces* та *Rhodotorula* можна зазначити, що рiд *Rhodospiridium* виявився стiйким за дiю йонiв Хрому, порiвняно з iншими представниками пiгментосинтезувальних дрiжджiв, проте рiд *Rhodotorula* проявив олігодинамiчну дiю в присутностi Калiю бiхромату, тому є iнформативним бiоiндикатором йонiв Хрому.

Література:

1. Акулинин Г. Е. Влияние водорастворимых полимеров на уровень пигментообразования у диссоциантов бактерий *Pseudomonas aureofaciens* шт. 2687 в процессе хранения. *Агроекол. журн.* 2003. № 4. С. 53–56.
2. Бессонова В. П., Иванченко О. Е. Хром в окружающей среде. Питання біоіндикації та екології. Запоріжжя: ЗНУ, 2011. Вип. 16, № 1. С. 13–29.
3. Вечер А. С. Спектрофотометрическое определение содержания каротиноидов в биомассе микроорганизмов. *Физиолого-биохимические исследования растений.* Минск, 1967. С. 44–54.
4. Квасников В. И. Биологическая очистка хромсодержащих промышленных сточных вод. К.: Наукова думка, 1990. 112 с.
5. Крупей К. С., Рильський О. Ф., Цимбалістий С. А. Вплив іонів Ni^{2+} , Al^{3+} та Cr^{6+} на каротиносинтезувальну здатність дріжджів. *Актуальні проблеми біології, екології та хімії.* Запоріжжя: ЗНУ. 2014. Т. 7. № 1. С. 23–32. URL: <http://sites.znu.edu.ua/bio-eco-chem-sci/issues/index>.
6. Лозовая О. Г. Касаткина Т. П., Подгорский В. С. Поиск биосорбентов тяжелых металлов среди дрожжей различных таксономических групп. *Микробиол. журн.* 2004. Т. 66, № 2. С. 92–101.
7. Оказова З. П. Использование микроорганизмов в качестве биоиндикаторов загрязнения окружающей среды. *Современные проблемы науки и образования.* 2015. № 5. С. 5–12.
8. Рильський О. Ф. Наукове обґрунтування прокаріотичної біоіндикації забруднення важкими металами природного середовища: дис. ... доктора біол. наук : 03.00.16. К., 2011. 351 с.
9. Смирнов М. И. Сравнительная гигиеническая оценка токсичности и опасности ионов хрома в воде с учетом влияния на развитие экспериментального атеросклероза: автор. дис. канд. мед. наук. М., 1984. 20 с.
10. Спосіб визначення інтенсивності пігментоутворення у бактерій: пат. на корисну модель 49812 Україна, МПК

(2009), C12Q 1/00, C12M 1/00, C12M 1/34. № u200912311; заявл. 30.11.2009; опубл. 11.05.2010, Бюл. №9, 2010 р.

11. Чистяков Ю. В. Основы бионеорганической химии. М.: Химия, КолосС, 2007. 539 с.

SCREENING OF PIGMENT-SYNTHESIZING YEASTS – BIOINDICATORS OF CHROMIUM IONS (VI)

Valerchenko Yu. V., Krupcy K. S.

Zaporizhzhya National University

julia1881881@gmail.com

Yeasts are most sensitive to the action of heavy metals (HM). They are capable of withdrawing more HM from aqueous solutions than other sorbents. The visual observation of the change in the brightness of pigments due to the effects of various concentrations of HMs has the advantage of indicating the state of the environment through physical and chemical methods, resulting in pigment-synthesizing yeasts being recommended in the purification and bioindication of sewage. Therefore, the purpose of the work was to screen for carotene- and pulcherrimine-synthesizing yeast – indicators Cr⁶⁺.

The object of the study was carotene-synthesizing yeast of the genera *Rhodospodium*, *Rhodotorula* and *Sporobolomyces*, as well as pulcherrimin's strains of yeasts of the genus *Metschnikowia*.

Solid nutrient medium Sabouraud was prepared on the basis of water with a certain content of potassium bichromate (in terms of cation). Nutrient medium Sabouraud without metals was used as a control. When Sabouraud set congeal, 18-days culture was seeded by solid lawn on it (0.2 ml per one Petri dish). Suspension density was 10⁷/ml. Yeasts incubated in the thermostat under the temperature 27–28 °C. Results were calculated on the 3rd day cultivation. Visual observation and comparison of the experimental samples with the control were 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

Spectrophotometric method was used to determine the concentration of carotenoids in yeast biomass. The concentration of β -carotene, torululin and torularodine was determined at 450, 509, 537 nm, respectively.

Comparison of the visual assessment of the pigment accumulation of yeast and the concentration of carotenoids was found to have a strong correlation $r=+1$. Dependence of signs is statistically significant, $p < 0.05$.

Screening of yeast – bioindicators of Chromium ions was researched. For bioindication of water quality, the most informative, as indicator microorganisms are *Sp. roseus* Y-333, *Rh. glutinis* Y-1333, *Rh. glutinis* Y-1335, *Rh. mucilaginoso* Y-1394 and *Rh. aurantiaca* Y-1195.

The yeast of *R. diobovatum* Y-43, unlike yeast of other genera, did not lose the ability to fully accumulate carotenoids and did not have a concentration interval between the loss of pigments and growth retardation, but gradually reduced the intensity of pigment color when the concentration of Chromium ions increased (in the range of 10–150 mg/dm³), which is a valuable property for bioindicative studies.

As a result of the comparative analysis of the influence of Chromium ions on yeast *Rhodospodium*, *Metschnikowia*, *Sporobolomyces* and *Rhodotorula*, it can be noted that the genus *Rhodospodium* was resistant to the effects of Chromium ions compared to other pigment-synthesizing yeast species, but the *Rhodotorula* species showed oligodynamic effect in the presence of potassium bichromate, therefore, there is an informative bioindicator of Chromium ions.