DOI https://doi.org/10.26661/2312-2056/2018-23/1-15
УДК 582.282.23:547.992:549.28

ДЕТОКСИКАЦІЙНА ДІЯ ГУМАТУ НАТРІЮ НА КАРОТИНВМІСНІ ДРІЖДЖІ-ІНДИКАТОРИ В ПРИСУТНОСТІ ЙОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Крупєй К. С., Поваляєва А. А.
Запорізький національний університет
krupeyznu@gmail.com

Вивчено вплив важких металів I (Купрум) та II (Кадмій, Хром) класу небезпеки на клітини каротиносинтезувальних дріжджів-індикаторів сумісно з гуміновими кислотами в поживному середовищі Сабуро. Виявлено детоксикаційну дію гумату Натрію на життєдіяльність та утворення пігментів дріжджами *Rhodotorula aurantiaca* Y–1193 в присутності важких металів. За концентрації 5 мг/дм^3 Cr^{6+} без гумінових кислот був відмічений слабкий ріст дуже дрібних та напівпрозорих колоній дріжджів, проте в присутності гуматів за тієї самої концентрації йонів Хрому спостерігався ріст помірно пігментованих колоній *Rh. aurantiaca* Y–1193. При повторному пересіванні *Rh. aurantiaca* Y–1193 з відновленим синтезом пігментів на середовище Сабуро з концентраційним рядом йонів Кадмію (в присутності/без гумату Натрію) спостерігали підвищення порогу виживання культури.

Дріжджі, пігменти, важкі метали, гумат Натрию

Сучасні відомості щодо природи та властивостей гумінових речовин (ГР), особливо їх цінної складової – гумінових кислот (ГК), досить широко відображені в різноманітних джерелах інформації [3, 8]. Відомо, що ГР приймають участь у нормалізації стану агроекосистем та є модифікаторами фітотоксичної дії пестицидів [2]. Мікроорганізми-нафтодеструктори здатні використовувати ГР в якості джерел вуглецю та азоту [4]. ГР активно застосовують у сільському господарстві, рослинництві, тваринництві, медицині та інших галузях народного господарства. В останні роки в Україні та за кордоном все більша увага приділяється дослідженням щодо дії ГР на клітини мікроорганізмів різних таксономічних груп, оскільки до теперішнього часу недостатньо вивченим є детоксикаційний ефект ГР (у присутності йонів важких металів) на останніх [1]. Проведені попередні дослідження на каротиносинтезувальних дріжджах показали, що їх можна використовувати для біоіндикації стану забруднення довкілля [5]. Тому метою роботи було дослідити вплив йонів важких металів на життєдіяльність каротинвмісних дріжджів-індикаторів у присутності ГК.

Матеріали та методи дослідження

Об’єктом дослідження були каротиносинтезувальні дріжджі *Rhodotorula aurantiaca* Y–1193, надані нам із колекції музейних культур Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Тверде поживне середовище Сабуро готували на основі води з певним вмістом солей ВМ (у перерахунку на катіон). Солі, які використовували в дослідженнях: $Cu(NO_3)_2$, $K_2Cr_2O_7$, $CdCl_2$. Контролем слугувало поживне середовище Сабуро без додавання солей. Після застигання середовища на нього суцільним газоном засівали 18-годинну колекційну культуру дріжджів (0,2 $см^3$ на 1-у чашку Петрі). Щільність суспензії становила 10^7 $кл/см^3$. Інкубування проводили в термостаті за температури 27–28 °С. На 3-ю добу культивування проводили облік результатів.

Пігментосинтезувальну активність визначали візуально, порівнюючи дослідні зразки з контролем.

Для розрахунку різниці в інтенсивності кольору між дослідними і контрольними зразками чашки Петрі з дріжджовими колоніями фотографували, розміщували фотографії у графічний редактор Adobe Photoshop, визначали показники каналів кольорової моделі (Lab), потім у програмі CIEDE 2000 розраховували різницю в інтенсивності кольору пігментів (dE) [6]. dE розраховували між дослідними зразками та контролем без ГК.

Для приготування водної витяжки із торфу використовували перехідний торф, що відібраний з Мащанського урочища Костопільського району Рівненської області. Торф подрібнювали до розмірів приблизно 1 мм, просіювали через сито та фасували разом з NaOH в пакети з нетканного гігроскопічного матеріалу. До 1 кг торфу додавали 50 гNaOH. Пакет щільно зав'язували. Для отримання маточного розчину пакет поміщали в ємність із водопровідною кип'яченою водою, яка була охолоджена до температури 70–80 °С (співвідношення вихідного матеріалу до рідини 1:20–1:25). Рідину перемішували протягом 10–15 хв шляхом віджимання пакету до появи піни коричневого кольору, потім ємність щільно закривали та запарювали протягом 2–3 год, знову ретельно перемішували рідину в ємності, пакет витягували з ємності та ретельно віджимали. Надалі розливали отриману рідину в колби місткістю по 250 $см^3$ [7]. Співвідношення поживного середовища до водної витяжки із торфу було 9:1.

Результати та їх обговорення

Есенціальні (Купрум, Хром) та неесенціальні метали (Кадмій) проявили токсичну дію на ріст та пігментоутворення дріжджів. З підвищенням концентрації металів різниця в інтенсивності кольору пігментів (dE) між контролем та дослідними зразками збільшувалася. Проте за концентрацій 25–50 мг/$дм^3$ Cu^{2+} у дослідних зразках як з ГК, так і без них, спостерігався суцільний ріст інтенсивно пігментованих колоній дріжджів *Rh. aurantiaca* Y–1193 (dE

за концентрацій йонів Купруму 25 та 50 мг/дм^3 без ГК дорівнювала 4,54 та 6,78 ум. од., відповідно, з ГК – 4,47 та 5,70 ум. од., відповідно) (табл. 1, 2).

Концентрація 75 мг/дм^3 Cu^{2+} спричинила помітне зниження інтенсивності пігментоутворення колоній дріжджів у зразках без ГК, порівняно з пробами в присутності ГК, де колонії були інтенсивно пігментовані (dE становила 9,90 та 6,42 ум. од., відповідно). Однак, за концентрації 100 мг/дм^3 Cu^{2+} без ГК був відмічений добрий ріст добре пігментованих колоній, а за тієї самої концентрації йонів Купруму в присутності ГК зареєстровано ріст помірно пігментованих колоній (dE складала 10,23 та 12,67 ум. од., відповідно). Відомо, що Купрум належить до есенціальних елементів, який у певній концентрації здатний проявляти стимулюючу дію на клітини мікроорганізмів (МО).

Таблиця 1 – Вплив Cu^{2+} на інтенсивність пігментоутворення *Rh. aurantiaca* Y–1193 в присутності ГК

Table 1 – Influence of Cu^{2+} on intensity of pigmentation of *Rh. aurantiaca* Y–1193 in the presence of HA

Концентрація Cu^{2+}, мг/дм^3	без ГК		з ГК	
	Р*	П**	Р	П
Контроль	++++	++++	++++	++++
25	++++	++++	++++	++++
50	++++	++++	++++	++++
75	++++	+++	++++	++++
100	+++	+++	++	++
150	-	-	-	-

Примітка (тут та далі): *Ріст: ++++ – суцільний, +++ – добрий, ++ – помірний, + – слабкий, - – відсутній; **Пігментоутворення: ++++ – інтенсивне, +++ – добре, ++ – помірне, + – слабке, - – відсутнє, ± – наявність пігментних та безпігментних колоній; ГК – гумінові кислоти

Проте в надлишковій концентрації йонів Купруму детоксикаційний вплив ГК не спостерігається, навпаки,

відмічається їх синергічний ефект на ріст і каротиноутворення дріжджів.

Таблиця 2 – Оцінка різниці в інтенсивності кольору пігментів *Rh. aurantiaca* Y–1193 за дії йонів Купруму та ГК

Table 2 – Estimation of the difference in the intensity of the color of pigments of *Rh. aurantiaca* Y–1193 under influence of Copper and HA

Концентрація Cu^{2+}, мг/дм^3	Без ГК				З ГК			
	L	a	b	dE (ум. од.)	L	a	b	dE (ум. од.)
Контроль	55,6	5,2	18,2		40,6	10,0	22,5	
25	58,6	2,0	16,0	4,54±0,03	51,0	5,4	22,5	4,47±0,05
50	61,8	9,4	19,0	6,78±0,09	51,0	9,0	20,6	5,70±0,04
75	46,4	5,0	12,2	9,90±0,14	46,2	6,2	20,6	6,42±0,19
100	45,8	3,4	13,6	10,23±0,23	45,4	0,4	9,0	12,67±0,87

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

Йони Хрому (I клас небезпеки) виявилися токсичнішими для дріжджів, ніж йони Купруму (II клас небезпеки) (табл. 3).

Таблиця 3 – Вплив Cr^{6+} на інтенсивність пігментоутворення *Rh. aurantiaca* Y–1193 в присутності ГК

Table 3 – Influence of Cr^{6+} on the intensity of pigmentation of *Rh. aurantiaca* Y–1193 in the presence of HA

Концентрація Cr^{6+}, мг/дм^3	без ГК		з ГК	
	Р	П	Р	П
Контроль	++++	++++	++++	++++
5	+	-	++	++
10	+	-	+	-
15	-	-	+	-

За концентрацій 5–10 мг/дм^3Cr^{6+} без ГК був відмічений слабкий ріст дуже дрібних та напівпрозорих колоній, проте в присутності ГК за концентрації йонів Хрому 5 мг/дм^3 спостерігався ріст помірно пігментованих колоній, за концентрації 10 мг/дм^3Cr^{6+} – слабкий ріст безпігментних колоній.

Концентраційний інтервал (КІ) між втратою пігментів та затримкою росту дорівнював 50 та 33,3 % (для зразків без/з ГК, відповідно). Концентрація 15 мг/дм^3 Cr^{6+} без ГК блокувала ріст та пігментоутворення *Rh. aurantiaca* Y–1193, порівняно з дослідними зразками в присутності ГК, де відмічався слабкий ріст дуже дрібних та напівпрозорих колоній.

У присутності йонів Кадмію ГК здатні також проявляти детоксикаційну дію на каротиносинтезувальні дріжджі *Rhodotorula aurantiaca* Y–1193. З підвищенням концентрації Cd^{2+} зменшується ріст, пігментоутворення колоній дріжджів та збільшується значення різниці в інтенсивності кольору пігментів (dE) (табл. 4, 5).

Таблиця 4 – Вплив Cd^{2+} на інтенсивність пігментоутворення *Rh. aurantiaca* Y–1193 в присутності ГК

Table 4 – Influence of Cd^{2+} on the intensity of pigmentation of *Rh. aurantiaca* Y–1193 in the presence of HA

Концентрація Cd^{2+}, мг/дм^3	без ГК		з ГК	
	Р	П	Р	П
Контроль	++++	++++	++++	++++
25	+++	+	++++	++
50	+++	-	+++	+
100	+++	-	+++	±
150	+++	-	+++	±
200	++	-	+++	-
250	++	-	+++	-
275	+	-	++	-

КІ між втратою пігментів та затримкою росту для дріжджів, які культивували на середовищі Сабуро без

додавання ГК, становив 81,8 %, проте в присутності ГК КІ був у 3 рази меншим (27,3 %).

Йони Кадмію проявили найменш токсичний ефект на клітини дріжджів, хоча відомо, сполуки Кадмію, як і Хрому (VI), відносять до І класу небезпеки.

Таблиця 5 – Оцінка різниці в інтенсивності кольору пігментів *Rh. aurantiaca* Y–1193 зі дії йонів Кадмію та ГК

Table 5 – Estimation of the difference in the intensity of the color of pigments of *Rh. aurantiaca* Y–1193 under influence of Cadmium and HA

Концентрація Cd^{2+}, мг/дм^3	Без ГК				З ГК			
	L	a	b	dE	L	a	b	dE
Контроль	64,6	10,8	23,4	(ум. од.)	40,6	10	22,5	(ум. од.)
25	54,6	8,0	30,2	11,77±0,04	52,2	4,6	23,2	10,77±0,07
50	50,2	5,8	15,6	14,13±0,07	54,4	0,6	17,4	13,36±0,03
100	47,4	3,8	15,2	17,45±0,45	48,8	0,6	21,0	17,40±0,81
150	46,0	1,4	15,4	19,84±0,23	48,4	1,0	13,2	18,15±0,56
200	38,2	0,4	13,4	28,39±0,93	47,0	-0,8	12,2	20,74±0,99
250	33,8	1,2	12,6	32,37±1,23	40,0	0,0	10,2	27,15±1,06
275	33,8	0,9	10,3	32,71±1,25	38,9	0,2	13,7	27,7±1,07

За концентрації 25 мг/дм^3 Cd^{2+} без ГК спостерігався добрий ріст слабко пігментованих колоній, порівняно із тією самою концентрацією Cd^{2+}, але в присутності ГК, де був зареєстрований суцільний ріст помірно пігментованих колоній дріжджів (dE для зразків без/з ГК дорівнювала 11,77 та 10,77 ум. од., відповідно). За концентрації 50 мг/дм^3 Cd^{2+} без ГК спостерігався добрий ріст безпігментних колоній, проте в присутності ГК та йонів Кадмію був відмічений добрий ріст слабко пігментованих колоній (dE у зразках без/з ГК для цих концентрацій Cd^{2+} складала 14,13 та13,36 ум. од., відповідно).

Концентрація 100 мг/дм^3 Cd^{2+} без ГК спричинила добрий ріст безпігментних колоній *Rhodotorula aurantiaca* Y–1193, порівняно із тією самою концентрацією Cd^{2+} в присутності ГК, де спостерігався ріст пігментних та безпігментних колоній (dE для зразків без/з ГК для даної концентрації Cd^{2+} була 17,45 та 17,40 ум. од., відповідно). За концентрації 200–

275 мг/дм^3 Cd^{2+} без ГК та з ГК пігментоутворення колоній було відсутнє, проте ріст був інтенсивнішим у дослідних зразках з ГК.

Наступним етапом дослідження було з'ясування здатності дріжджових клітин, які втратили пігменти за впливу йонів Кадмію (в присутності/без ГК), відновлювати пігментоутворення при пересіванні їх на тверде поживне середовище Сабуро без металу та ГК.

Тест-культурою були дріжджі *Rh. aurantiaca* Y–1193, які повністю втрачали здатність накопичувати каротиноїди за концентрації 50 мг/дм^3 Cd^{2+} (без ГК) та за концентрації 200 мг/дм^3 Cd^{2+} (з ГК). Після пересівання безпігментної культури з середовища Сабуро (з концентрацією іонів Кадмію 250 мг/дм^3 (в присутності/без ГК)) в середовище без металу інтенсивність пігментонакопичення повністю поновлювалася на 3-ю добу культивування.

При повторному пересіванні *Rh. aurantiaca* Y–1193 з відновленим синтезом пігментів на середовище Сабуро з концентраційним рядом йонів Кадмію (в присутності/без ГК) на 3-ю добу спостерігали підвищення порогу виживання культури, проте, слід відмітити, що попередні пересіви не призвели до інтенсифікації пігментоутворення культури (табл. 6).

Так, за впливу йонів Кадмію (з/без ГК) поріг виживання культури *Rh. aurantiaca* Y–1193 збільшився в 1,4 та 1,3 рази, відповідно, порівняно із зразками без попередніх пересівів дріжджів. У присутності ГК за концентрацій йонів Кадмію 250–300 мг/дм^3 спостерігався добрий ріст безпігментних колоній *Rh. aurantiaca* Y–1193, проте в дослідних зразках без ГК за тих самих концентрацій йонів Кадмію колоній було майже в 2 рази менше, більшість з яких були дрібні та напівпрозорі з опалесцентним нальотом.

Отже, дріжджі *Rh. aurantiaca* Y–1193, які зазнали впливу 250 мг/дм^3 Cd^{2+}, володіли здатністю поновлювати синтез пігментів при пересіванні їх на тверде поживне середовище Сабуро без металу, а після повернення їх знову в токсичне середовище з більшими концентраціями йонів Кадмію (з/без ГК) підвищувався поріг виживання культури.

Таблиця 6 – Ріст та пігментоутворення *Rh. aurantiaca* Y–1193 при повторному пересіванні з поновленим синтезом пігментів на середовище Сабуро з концентраційним рядом йонів Кадмію в присутності ГК

Table 6 – Growth and pigmentation of *Rh. aurantiaca* Y–1193 when reseeded with restored synthesis of pigments on the Saburound medium with a concentration series of Cadmium ions in the presence of HA

Концентрація Cd^{2+}, мг/дм^3	Без ГК		В присутності ГК	
	Р	П	Р	П
Контроль	++++	++++	++++	++++
250	++	-	+++	-
275	++	-	+++	-
300	++	-	+++	-
325	+	-	++	-
350	+	-	+	-
375	-	-	+	-

Отримані результати спонукають нас продовжувати дослідження щодо з'ясування вірогідних механізмів детоксикаційної дії гумінових кислот, а саме гумату Натрію, на пігментосинтезувальні мікроорганізми в присутності важких металів.

Висновки

1. Гумінові кислоти, а саме гумат Натрію, здатні проявляти детоксикаційну дію на каротиносинтезувальні дріжджі *Rh. aurantiaca* Y–1193 в присутності йонів Купруму, Хрому та Кадмію. Останні проявили найменш токсичний ефект на клітини дріжджів, незважаючи на І клас небезпеки сполук Кадмію.

2. Культура *Rh. aurantiaca* Y–1193, яка зазнала впливу 250 мг/дм^3 Cd^{2+}, володіла здатністю поновлювати синтез пігментів при пересіві її на твердне поживне середовище Сабуро без металу, а при повторному поверненні в токсичне

середовище з концентраційним рядом йонів Кадмію (з/без ГК) у *Rh. aurantiaca* Y–1193 підвищувався поріг виживання.

Література:

1. *Детоксицирующая способность гуминовых веществторфов различного происхождения по отношению к ионамтяжелых металлов / Е. В. Акатова и др. Химия растительного сырья. 2017. № 1. С. 119–127.*

2. *Горовая А. И., Орлов Д. С., Щербенко О. В. Гуминовые вещества. Киев : Наук. думка, 1995. 304 с.*

3. *Закорчевный И. И., Михальская Л. Н., Швартау В. В. Гуминовые вещества и удобрения на их основе. Ґрунтознавство. 2012. Т. 13, № 1–2. С. 60–78.*

4. *Каримова В. Т., Дмитриева Е. Д., Нечаева И. А. Влияние гуминовых веществ торфов Тульской области на рост микроорганизмов деструкторов нефти Rhodococcus erythropolis S67 и Rhodococcus erythropolis X5. Естественные науки. 2017. Вып. 2. С. 60–68.*

5. *Крупєй К. С. Біоіндикація забруднення води пігментосинтезувальними дріжджами: дис. … канд. біол. наук: 03.00.16 / Чернівецький нац. ун-т ім. Юрія Федьковича. Чернівці, 2017. 158 с.*

6. *Спосіб визначення інтенсивності пігментоутворення у бактерій: пат. 49812 Україна: МПК (2009), C12Q 1/00, C12M 1/00, C12M 1/34. № u200912311; заявл. 30.11.09; опубл. 11.05.10, Бюл. № 9. 10 с.*

7. *Способ получения гумата натрия: пат. 2150484 Россия: C10F7/00. № 99108141/13; заявл. 21.04.1999; опубл. 10.06.2000, Бюл. № 1, 10 с.*

8. *Perdue E. M. Analytical constraints on the structural features of humic substances. Geochimica et Cosmochimica Acta. 1984. Vol. 48. P. 1435–1442.*

DETOXICATION ABILITY OF SODIUMHUMATE ON CAROTIN-CONTAINING YEASTS-INDICATORS IN THE PRESENCE OF IONS OF HEAVY METALS

Krupey K. S., Povalyaeva A. A.
Zaporizhzhya National University
krupeyznu@gmail.com

Bioindication of microorganisms of heavy metals and study of the mechanisms of body detoxification under the influence of metal ions are currently of great interest to scientists.

The purpose of the work was to investigate the detoxification potential of humic substances, namely humate sodium, on carotene-containing yeasts that were exposed to heavy metal ions (HM) (Cadmium, Copper, Chromium).The object of the study was culture *Rh. aurantiaca* Y–1193.

Solid nutrient medium Saburound was prepared on the basis of water with a certain content of salts HM (in terms of cation). Salt used in research: $Cu(NO_3)_2$, $K_2Cr_2O_7$, $CdCl_2$. The control of Saburound nutrient medium was without the addition of salts. After settling the medium, a 18-hour collecting culture of yeasts was sown on a solid lawn. The incubation was carried out in a thermostat at the temperature of 27–28° C. On the 3rd day of cultivation the results were recorded. Pigment-synthetic activity was determined visually by comparing test samples with control.

To calculate the difference in the intensity of colors between experimental and control samples petri dishes with yeasts colonies were photographed, placed in the Adobe Photoshop graphic editor, determined the indicators of the channels of the color model (Lab), then the CIEDE 2000 program counted the difference in the color intensity of the pigments (dE). dE is counted between the trial and control without humic acids (HA).To prepare a water extract from the peat Vecher's technique (1967) was used.

It was found out that HA, especially Sodium humate, is capable of detoxifying effect on carotensinting yeast *Rh. aurantiaca* Y–1193 in the presence of ions of Cadmium, Copper, Chromium.

With increasing metal concentration, the difference in the intensity of pigment color (dE) between control and experimental samples increased.

Concentration of 75 mg/dm^3Cu^{2+} it caused a marked decrease in the intensity of the pigmentation of yeast colonies in samples without HA compared to the samples with the presence of the HA, where the colonies were intensively pigmented (dE equals 9,90 and 6,42 conventional units in accordance). However at concentration of 100 mg/dm^3 Cu^{2+} without HA good growth of well-pigmented colonies was noted, but at the same concentration ions Copper with HA moderate growth of moderately pigmented colonies is registered (dE equals 10,23 and 12,67 conventional units in accordance).

Ions Chromium (I hazard class) were more toxic for yeast than ions Copper (II hazard class). At concentration 5–10 mg/dm^3 Cr^{6+} without HA the weak growth of very small and translucent colonies was noted, however with HA at concentration ions Chromium 5 mg/dm^3 moderate growth of moderately pigmented colonies was observed, atconcentration 10 mg/dm^3 Cr^{6+} – weak growth of non-pigmented colonies.

At concentration 25 mg/dm^3 Cd^{2+} without HA there was a good growth of weakly pigmented colonies, compared with the same concentration Cd^{2+}, but with HA, where the continuous growth of moderately pigmented colonies of yeasts was recorded (dE for samples without/with HA equals 11,77 and 10,77 conventional units in accordance).

Ions Cadmium showed the least toxic effect on yeast cells, but it is known, compounds Cadmium, which Chromium (VI) is, belong to I hazard class.

It was found out that the culture *Rh. aurantiaca* Y–1193 that was affected by 250 mg/dm^3 Cd^{2+} it had the ability to regenerate the synthesis of pigments when it was transplanted into a solid nutrient medium Saburound without metal, and when re-returning to a toxic medium with a concentration seriesions Cadmium (with/without HA) in *Rh. aurantiaca* Y–1193 the threshold of survival was raised.

The obtained results obtained lead us to continue research on the identification of possible mechanisms of detoxification action

of humic substances, namely Sodium humate, on pigment-synthesizing microorganisms in the presence of heavy metals.