

КАРОТИНОСИНТЕЗУВАЛЬНІ ДРІЖДЖІ ЯК МОДЕЛЬНІ ОРГАНІЗМИ ДЛЯ БІОІНДИКАЦІЇ СОЛЕЙ КУПРУМУ (II) У ВОДНИХ ЕКОСИСТЕМАХ

Крупей К.С.¹, Рильський О.Ф.², Количева Н.Л.¹, Бобровська О.Д.¹

¹Запорізький державний медико-фармацевтичний університет
пр. Маяковського, 26, 69000, м. Запоріжжя

²Запорізький національний університет
вул. Університетська, 66, 69600, м. Запоріжжя

krupeyznu@gmail.com, rylsky@ukr.net, nkolyceva68@gmail.com, bobrovska.o.d@mphu.edu.ua

Пігменти, які синтезуються дріжджами, є важливою індикаційною ознакою, оскільки інтенсивність їх кольору та концентрація змінюються залежно від концентрації і типу забруднень. У цьому контексті дослідження впливу важких металів, таких як Купрум (II), на синтез каротиноїдів у дріжджах набуває особливого значення, оскільки дозволяє використовувати їх як біоіндикатори забруднення води важкими металами.

У роботі досліджено вплив солей Купруму (II) на синтез каротиноїдних пігментів у дріжджів *Rhodotorula glutinis* УКМ-1333 та *Rhodospiridium sphaerocarpum* УКМ-44. Проведено спектрофотометричне визначення концентрації каротиноїдів у клітинах дріжджів та встановлено сильний кореляційний зв'язок ($r = 0,8$; $p < 0,05$) між візуальною оцінкою кольору колоній і концентрацією β -каротину, що підтверджує ефективність візуальної оцінки як методу біоіндикації.

Виявлено, що концентрація β -каротину у контрольних зразках була в 1,6 раза вищою у *R. sphaerocarpum* (0,268 мкг/см³) ніж у *Rh. glutinis* (0,179 мкг/см³). Іони Купруму (II) у складі солей $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ та $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ спричинили дозозалежне пригнічення пігментоутворення. Для *Rh. glutinis* мінімальні концентрації йонів Cu^{2+} , за яких повністю блокувався синтез каротиноїдів, становили 200–300 мг/дм³ для $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 300 мг/дм³ – для $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ та 100 мг/дм³ – для $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$.

Дріжджі *R. sphaerocarpum* показали більшу стійкість до дії солей Купруму у порівнянні з *Rh. glutinis*. Повне припинення синтезу пігментів за дії $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ та $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ спостерігалось за концентрації 400 і 300 мг/дм³ йонів Купруму (II), відповідно. Найбільш токсичною сполукою для обох видів дріжджів була $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, але повністю культура *R. sphaerocarpum* втрачала здатність до утворення пігментів за концентрації Cu^{2+} 300 мг/дм³.

Дослідження підтвердило, що візуальна оцінка пігментоутворення є надійним методом для оцінки впливу важких металів, таких як Купрум (II), на каротиносинтезувальні дріжджі *Rh. glutinis* та *R. sphaerocarpum*. Перспективою подальших досліджень є вивчення дозозалежного впливу інших солей важких металів на синтез каротиноїдних пігментів дріжджів різних видів, що дозволить розширити спектр біоіндикаторів стану водних екосистем. **Ключові слова:** дріжджі, пігмент, каротиноїди, біоіндикація, Купрум (II), водні екосистеми.

Carotenoid-synthesizing yeasts as model organisms for bioindication of Copper (II) salts in aquatic ecosystems. Krupiec K., Rylsky O., Kolycheva N., Bobrovska O.

The pigments synthesized by yeast are an important indicator feature, as their color intensity and concentration change depending on the concentration and type of contaminants. In this context, the study of the effect of heavy metals, such as Cu (II), on the synthesis of carotenoids in yeast is of particular importance, as it allows them to be used as bioindicators of water pollution by heavy metals.

The influence of Cu (II) salts on the synthesis of carotenoid pigments in the yeasts *Rhodotorula glutinis* UKM-1333 and *Rhodospiridium sphaerocarpum* UKM-44 was studied. The spectrophotometric determination of carotenoid concentration in yeast cells was performed, and a strong correlation ($r = 0.8$; $p < 0.05$) was found between the visual assessment of colony color and β -carotene concentration, which confirms the effectiveness of visual assessment as a bioindication method.

It was found that the concentration of β -carotene in the control samples was 1.6 times higher in *R. sphaerocarpum* (0.268 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) than in *Rh. glutinis* (0.179 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$). Copper (II) ions in the composition of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ salts caused a dose-dependent inhibition of pigment formation. For *Rh. glutinis*, the minimum concentrations of Cu^{2+} ions at which the synthesis of carotenoids was completely blocked were 200-300 mg/dm³ for $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 300 mg/dm³ for $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, and 100 mg/dm³ for $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$.

The yeast *R. sphaerocarpum* showed greater resistance to the action of Cu salts compared to *Rh. glutinis*. The complete cessation of pigment synthesis under the influence of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ was observed at a concentration of 400 and 300 mg/dm³ of Cu(II) ions, respectively. The most toxic compound for both species of yeast was $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, but the culture of *R. sphaerocarpum* completely lost the ability to form pigments at a concentration of 300 mg/dm³ of Cu(II) ions.

The study confirmed that visual assessment of pigment formation is a reliable method for assessing the effect of heavy metals, such as Cu (II), on carotenoid-synthesizing yeasts *Rh. glutinis* and *R. sphaerocarpum*. The prospect of further research is to study the dose-dependent effect of other heavy metal salts on the synthesis of carotenoid pigments in yeasts of other species, which will expand the range of bioindicators of the state of aquatic ecosystems. **Key words:** yeasts, pigment, carotenoids, bioindication, Copper (II), aquatic ecosystems.

Постановка проблеми. Забруднення навколишнього середовища в Україні стало особливо серйозною проблемою після повномасштабного вторгнення росії в Україну у 2022 році, коли військові дії спричинили значний вплив на водні та наземні екосистеми [1]. Моніторинг токсичності водних екосистем потребує інноваційних підходів, які враховують складні взаємодії забруднень. Серед перспективних методів оцінки стану водного середовища слід виділити біоіндикацію з використанням мікроорганізмів, що забезпечує аналіз на рівні клітин, організмів і популяцій одночасно.

Дріжджі та бактерії є чутливими до присутності важких металів у середовищі і проявляють зміни фізіологічних та біохімічних параметрів, що робить їх цінними біоіндикаторами. Попри це, більшість досліджень зосереджена на таких видах, як *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* та *Saccharomyces cerevisiae*. Вивчення пігментосинтезувальних дріжджів як модельних організмів є новим напрямком у біоіндикації. Ці еукаріотичні одноклітинні організми дозволяють оцінювати синергічний вплив забруднень, що важливо для точного визначення токсичності середовища, оскільки традиційні методи встановлення гранично допустимих концентрацій не завжди враховують ці аспекти [2–4].

Актуальність дослідження полягає у вивченні індикаторних ознак пігментосинтезувальних дріжджів для оцінки токсичного впливу важких металів на водні екосистеми.

Зв'язок авторського доробку із важливими науковими та практичними завданнями. Дослідження пігментосинтезувальних дріжджів як модельних організмів для біоіндикації важких металів у водних екосистемах відповідає сучасним науковим завданням з вивчення адаптаційних механізмів мікроорганізмів до токсичних умов та їхньої ролі у моніторингу стану довкілля. Практична значущість роботи полягає у розробці нових підходів до оцінки екотоксичності, які можуть бути застосовані для вдосконалення системи екологічного контролю в умовах багатфакторного антропогенного навантаження.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Купрум (II) широко використовується в очищенні води, обробці деревини для захисту від гниття, у виробництві барвників, добрив, фунгіцидів для сільського господарства, текстильної промисловості, гальванічних покриттях і хімічному синтезі [5]. Виходячи з цього, розробка інформативних методів щодо екологічного моніторингу цього політанта в довкіллі має важливе практичне значення. Токсичні властивості Купрум (II) на мікроорганізми пов'язані з інгібуванням росту через вплив на різні біохімічні процеси [6]. Один із основних шляхів, через який важкі метали впливають на організми, у тому числі на мікроорганізми, є порушення функціонування клітинних мембран. Купрум (II) може взаємодіяти

з ліпідами мембран, змінюючи їх структуру та проникність. Це веде до порушення транспорту йонів та молекул через мембрану, що своєю чергою впливає на метаболічні процеси в клітинах. Дослідження показують, що високі концентрації Купруму (II) можуть викликати оксидативний стрес, спричинений накопиченням вільних радикалів, що пошкоджує білки, ліпіди та нуклеїнові кислоти, а також активує механізми апоптозу у мікроорганізмах [6, 7]. Водночас деякі дріжджі можуть накопичувати Купрум (II) у вигляді комплексів з білками, знижуючи його токсичність. Це дозволяє їм виживати в умовах високих концентрацій металу, але зменшує загальний ріст і продуктивність [8]. Дослідження сполук, що містять Купрум, також привертають увагу клінічних фармакологів, оскільки вони мають гіпотензивну, гепатопротекторну й протипухлинну дію [9]. Проте вплив Купруму (II) та інших важких металів на інтенсивність пігментоутворення бактерій та дріжджів вивчений недостатньо, тому обране дослідження є актуальним.

Мета. Дослідити вплив солей Купруму (II) на пігментоутворення та ріст дріжджів родів *Rhodotorula* та *Rodosporidium*.

Об'єкт дослідження – втрата здатності дріжджів до пігментоутворення у відповідь на вплив солей важких металів (Cu^{2+}) у водному середовищі.

Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми, котрим присвячується означена стаття. Більшість досліджень, присвячених біоіндикації важких металів та інших забруднень із використанням мікроорганізмів, зосереджені на стандартних модельних організмах, ігноруючи дріжджі, що здатні синтезувати пігменти, у тому числі каротиноїдні. Крім того, відсутні методологічні підходи, які б дозволяли враховувати зміни індикаторних показників цих мікроорганізмів у комплексному екологічному моніторингу.

Новизна. Вперше вивчений вплив солей Купруму (II) на інтенсивність пігментоутворення та ріст дріжджів *Rhodotorula* та *Rodosporidium*.

Методологічне або загальнонаукове значення. Дослідження сприяє вдосконаленню методологічних підходів до використання дріжджів як модельних організмів для біоіндикації забруднень водних екосистем, зокрема важкими металами. Результати роботи розширюють наукові уявлення про механізми пігментоутворення та адаптаційні реакції дріжджів під дією токсичних факторів, що може бути застосовано в екологічному моніторингу та біотехнологіях.

Матеріали та методи дослідження. Об'єктами досліджень були дріжджі *Rhodotorula glutinis* УКМ-1333 та *Rhodosporidium sphaerocarpum* УКМ-44, які були надані із колекції музейних культур Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

У дослідженнях використовували такі солі Купруму (II): $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, оскільки ці

сполуки найчастіше зустрічаються в стічних водах промислових підприємств. Солі Купруму (II) мали маркування ЧДА (чисті для аналізу).

Мікробіологічні методи. У дослідженнях використовували щільне поживне середовище Сабуро, яке готували на основі відстояної водогінної води. Перед внесенням по 20 мл стерильного та охолодженого до 45 °С середовища в чашки Петрі вносили необхідні концентрації солей важких металів (у перерахунок на катіон). Контролем було поживне середовище Сабуро без солей Купруму (II). Після того, як середовище застигло, на нього суцільним газоном засівали 18-годинні колекційні культури каротинвмісних дріжджів (0,2 мл в 1 чашку Петрі). Щільність суспензії становила 10^7 кл/см³. Інкубування проводили в термостаті за температури 27-28 °С. Облік результатів здійснювали на 3, 6 та 9 добу інкубації дріжджів. Пігментосинтезувальну активність визначали візуально, порівнюючи дослідні зразки з контролем, за 5-тибальною системою (див. примітку в табл. 1) [7].

Метод визначення інтенсивності каротиноутворення дріжджів. Після візуальної оцінки інтенсивності пігментоутворення проводили розрахунок різниці в інтенсивності кольору пігментів між контролем (без Купруму) та дослідними зразками (dE, умовні одиниці). Для цього завантажували фото культур у програму Adobe Photoshop 2021, визначали показники кольорової моделі Lab (у 10-ти довільних точках), переносили значення у програму CIEDE 2000 та на основі цих показників розраховували значення dE (див. рис. 1).

Кількість зразків у вибірці – 5 чашок Петрі на кожну концентрацію йонів Купруму) [10]. Приклад

розрахунку представлений на рис. 2. Після цього розраховували середнє арифметичне значення dE.

Метод спектрофотометричного визначення кількісного вмісту каротиноїдів у дріжджових клітинах. Для визначення продуктивності каротинвмісних дріжджів, а саме концентрації каротиноїдів у біомасі за впливу Купруму (II), використовували загальновідомий спектрофотометричний метод (без попереднього розділення) [11].

Методи статистичного аналізу результатів досліджень. Статистичну обробку отриманих результатів проводили із використанням програми для роботи з електронними таблицями «Microsoft Office Excel 2010» та «Statistica 10» [12]. Для підтвердження кореляційного зв'язку між візуальною оцінкою пігментоутворення та концентрацією каротиноїдів у культурах дріжджів в онлайн-калькуляторі розраховували коефіцієнт рангової кореляції r-Спірмена, який являє собою непараметричний метод, що широко використовується для визначення кореляційного зв'язку між 2-ма ранговими змінними.

Виклад основного матеріалу. Вплив солей Купруму (II) на синтез каротиноїдних пігментів дріжджів-індикаторів. Однією з головних вимог біоіндикаторних організмів є поступова зміна індикаційної ознаки/ознак у відповідь на вплив різного роду забруднень. Пошук індикаторів серед мікроорганізмів є актуальною задачею, оскільки на сьогодні недостатньо вивчені індикаційні ознаки прокариот та одноклітинних еукаріотів. Біоіндикація з використанням бактерій/дріжджів має безліч переваг, основна з яких – це можливість проведення індикації відразу на трьох рівнях організації живої природи – клітини, організму та популяції. Окрім того, саме живі мікро-



Рис. 1. Визначення показників Lab у програмі Adobe Photoshop 2021

Рис. 2. Результати розрахунку dE (в ум. од.) в програмі CIEDE2000

організми-індикатори демонструють токсичність фізіологічно активних сполук, які безпосередньо можуть чинити негативний ефект на мікро-, макроорганізм (з урахуванням ефекту сумації інших забруднень/токсинів), що унеможливлене при визначенні гранично допустимих концентрацій полутантів.

Йони Купруму (II) у складі солей $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ та $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ за концентрацій 50-100 мг/дм³ мали незначний токсичний вплив на ріст та пігментоутворення *Rh. glutinis*, але з підвищенням концентраційного рівня металу негативний ефект поступово збільшувався (див. табл. 1-4, рис. 3).

Rh. glutinis починала повністю втрачати пігмент на 3 добу за концентрацій Cu^{2+} 350 та 300 мг/дм³, у складі солей Купрум (II) хлориду та сульфату, відповідно (dE при цьому складала 24,4 та 21,7 ум. од.).

Вплив йонів Cu^{2+} (у складі хлориду) на синтез каротиноїдів у дріжджів *Rh. glutinis* був помітний з концентрацій 200-300 мг/дм³, за яких протягом 9 діб спостерігався ріст дрібних молочних та великих слабо-рожевих колоній.

При концентрації 350 мг/дм³ йонів Купруму (II) на 3 добу росли апігментні колонії (dE дорівнювала

Таблиця 1

Вплив Cu^{2+} на ріст та пігментоутворення *Rh. glutinis* УКМ-1333

Соли Купруму (II)	Концентрація йонів Cu ²⁺ , мг/дм ³ *	3 доба		6 доба		9 доба	
		Р**	П***	Р	П	Р	П
Контроль		++++	++++	++++	++++	++++	++++
CuCl ₂ ·2H ₂ O	50	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	100	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	200	++	-/+	++	+/-	++	+/-
	300	+	-/+	+	+/-	+	+/-
	350	+	-	+	+/-	+	+/-
	400	-	-	+	-	+	+/-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	50	++++	+++	++++	++++	++++	++++
	100	+++	+++	+++	+++	++++	++++
	200	+++	+	+++	++	++++	+++
	300	++	-	++	-	++	+
	350	+	-	++	-	++	-
	400	-	-	-	-	-	-
Cu(NO ₃) ₂	50	++	+	+++	++	+++	++
	100	++	-	++	+/-	++	+/-
	200	+	-	+	-	++	+/-
	300	-	-	-	-	-	-

Примітка тут та далі: *При вивченні солей Купруму (II) у всіх дослідженнях перерахунок здійснювали за катіоном.

Ріст: ++++ – суцільний, +++ – добрий, ++ – помірний, + – слабкий, – – відсутній. *Пігментоутворення: ++++ – інтенсивне, +++ – добре, ++ – помірне, + – слабке, – – відсутнє, +/- – наявність пігментних та апігментних колоній.

Таблиця 2

Вплив Cu^{2+} на ріст та пігментоутворення *R. sphaerocarpum* УКМ-44

Солі Купруму (II)	Концентрація йонів Cu ²⁺ , мг/дм ³	3 доба		6 доба		9 доба	
		Р	П	Р	П	Р	П
Контроль		++++	++++	++++	++++	++++	++++
CuCl ₂ ·2H ₂ O	50	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	200	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	300	+++	+/-	+++	++	+++	+++
	350	++	+/-	+++	+	+++	++
	400	++	-	++	+/-	+++	+/-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	50	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	100	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	200	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	300	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	350	+++	++	+++	++	++++	++++
	400	+	+/-	++	++	+++	++
Cu(NO ₃) ₂	50	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	100	++	++	+++	+++	++++	+++
	200	++	+/-	++	+/-	+++	++
	300	+	-	++	-	++	+/-

Таблиця 3

Оцінка інтенсивності кольору пігментів (3 доба культивування)
на концентраційний ряд Cu^{2+} у *Rh. glutinis* УКМ-1333

Cu^{2+} , мг/дм ³	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$				$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$				$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$			
	L	a	b	dE	L	a	b	dE	L	a	b	dE
Конт-роль	64	23	29		66	22	29		66	20	31	
50	63	18	29	3,4±0,02	55	24	18	12,01±0,1	45	15	25	20,0±0,8
100	59	19	33	6,0±0,04	53	22	37	12,2±0,04	39	24	33	26,6±1,3
200	46	18	22	17,4±0,3	47	17	16	18,8±0,2	38	22	33	27,7±1,0
300	46	20	35	17,6±0,9	44	16	17	21,7±1,2	-	-	-	-
350	40	14	28	24,4±1,2	42	15	19	23,6±0,9	-	-	-	-

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

Таблиця 4

Оцінка інтенсивності кольору пігментів (3 доба культивування)
на концентраційний ряд Cu^{2+} у *R. sphaerocarpum* УКМ-44

Cu^{2+} , мг/дм ³	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$				$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$				$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$			
	L	a	b	dE	L	a	b	dE	L	a	b	dE
Конт-роль	41	29	33		42	28	33		42	30	34	
50	37	20	30	5,9±0,02	43	13	18	8,8±0,01	37	15	18	9,7±0,05
100	35	19	31	7,6±0,03	43	13	18	8,8±0,09	46	8	23	13,4±0,4
200	34	19	31	8,2±0,03	40	14	18	8,5±0,1	54	10	25	16,5±0,8
300	54	17	28	14,3±0,4	49	13	21	10,6±0,04	56	9	27	18,7±0,8
350	55	14	28	16,2±0,8	52	15	14	13,8±0,3	-	-	-	-
400	55	12	31	17,5±0,4	54	17	12	16,0±0,4	-	-	-	-

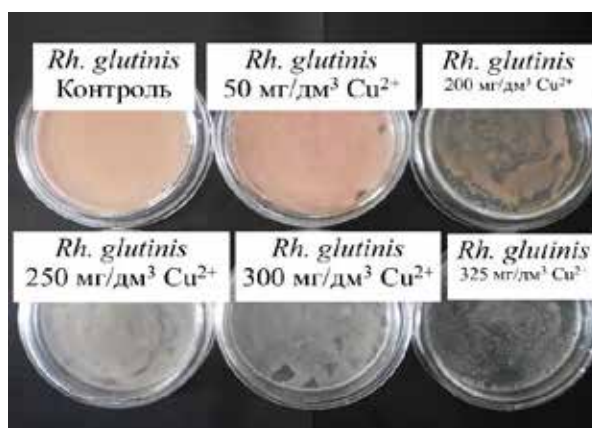
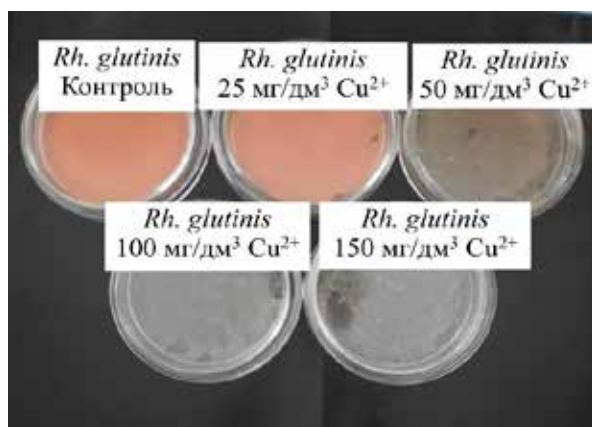
Сіль – CuCl₂·2H₂OСіль – CuSO₄·5H₂OСіль – Cu(NO₃)₂

Рис. 3. Вплив йонів Купруму (II) у складі різних солей на ріст та інтенсивність каротиноутворення дріжджів *Rh. glutinis* УКМ-1333 та *R. sphaerocarpum* УКМ-44 (3 доба культивування)

24,4 ум. од.), а на 6 та 9 добу з'являлися також слабо пігментовані колонії.

Концентрація 400 мг/дм³ Купруму (II) викликала на 6 добу слабкий ріст апігментних колоній, а на 9 добу колонії ставали слабо-рожевими. При концентрації йонів Купруму 450 мг/дм³ росту *Rh. glutinis* не спостерігалось протягом 9 діб. В дослідях з іншими солями Купруму (II) тенденція до поновлення синтезу пігментів у дріжджів з часом була менш помітною.

Сіль $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ демонструвала високий рівень токсичності на ріст та синтез каротиноїдів навіть у низьких концентраціях (слабке пігментоутворення за концентрації Cu^{2+} 50 мг/дм³, dE = 20 ум. од.). Втрата пігменту відбувалася на 50 % нижче тих концентрацій йонів Купруму, за яких блокувався ріст дріжджових клітин. У дослідях з Купрум (II) сульфатом цей показник значно менший (15 %). Отримані результати дозволяють використовувати дріжджі *Rh. glutinis* у біоіндикації Купруму (II) нітрату в водних екосистемах, оскільки вони реагують поступово втратою пігментів на збільшення концентрації йонів Купруму в середовищі, що є важливою вимогою для індикаторних організмів.

Для дріжджів *R. sphaerocarpum* найменш токсичною для каротиноутворення виявилася сіль $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. За концентрацій Купрум (II) 300 мг/дм³ спостерігався добрий ріст та пігментоутворення (dE = 10,6 ум. од.), а за концентрації Cu^{2+} 400 мг/дм³ були наявні пігментні та апігментні колонії, dE = 16 ум. од. Проте *R. sphaerocarpum* реагували олігодинамічною дією на збільшення концентраційного ряду металу, тому можуть бути рекомендовані для біоіндикації Купрум (II) сульфату у прісних водоймах.

Купрум (II) хлорид проявив більш токсичну дію на пігмент, за концентрації Cu^{2+} 300 мг/дм³ зустрічалися колонії з пігментом та без кольору, dE = 14,3 ум. од. Проте за концентрації Cu^{2+} 600 мг/дм³

ріст повністю не пригнічувався і подекуди виявлялися апігментні колонії.

При спостереженні за ростом та каротиноутворенням дріжджів *R. sphaerocarpum* у динаміці (протягом 9 діб) також була відмічена тенденція до поновлення росту та здатності до синтезу пігментів. Найбільш токсичною була сіль $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$. За концентрації Cu^{2+} 100 мг/дм³ у складі цієї солі був помірний ріст та пігментоутворення дріжджів, dE = 13,4 ум. од. Повністю культура втрачала здатність до утворення каротиноїдів за концентрації Купруму (II) нітрату 300 мг/дм³, dE = 18,7 ум. од.

Отже, для біоіндикації Купруму (II) у складі $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ можуть бути рекомендовані культури каротиносинтезувальних дріжджів *Rh. glutinis* УКМ-1333 та *R. sphaerocarpum* УКМ-44, для біоіндикації Купрум (II) сульфату – *R. sphaerocarpum* УКМ-44. Купрум (II) хлорид не проявив олігодинамічної дії на каротиноутворення обох досліджуваних штамів дріжджів, тому не може бути рекомендованим для визначення у водних екосистемах цими мікроорганізмами. Проте перспективою подальших досліджень є вивчення менших концентраційних рядів Купруму (II) у складі хлориду (125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 мг/дм³) на каротиносинтезувальну здатність дріжджів *Rh. glutinis* УКМ-1333 та *R. sphaerocarpum* УКМ-44.

Визначення концентрації каротиноїдів у біомасі дріжджів за впливу солей Купруму (II). Для підтвердження ефективності використання шкали візуальної оцінки пігментоутворення мікроорганізмів було проведено дослідження щодо спектрофотометричного визначення кількісного вмісту каротиноїдів у дріжджах *Rh. glutinis* УКМ-1333 та *R. sphaerocarpum* УКМ-44. При порівнянні візуальної оцінки кольору пігментів дріжджів (у %, див. табл. 5, 6) та концентрації каротиноїдів в клітинах було встановлено наявність сильного кореляційного зв'язку ($r = 0,8$). Залежність ознак статистично значуща ($p < 0,05$).

Таблиця 5

**Продуктивність каротинвмісних дріжджів *Rh. glutinis* УКМ-1333
за впливу концентраційного ряду солей Купруму (II) (3 доба культивування)**

Сіль	Концентрація йонів Купруму (II), мг/дм ³	Візуальна оцінка інтенсивності пігментоутворення дріжджів, %	β-каротин, мкг/см ³
Контроль (без солей Купруму)		++++ (100 %)	0,179±0,002
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50	++++ (100 %)	0,166±0,0034
	100	++++ (100 %)	0,124±0,0009
	200	+/- (50 %)	0,0087±0,0004
	300	+/- (50 %)	0,0062±0,0001
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	50	+++ (75 %)	0,099±0,0011
	100	+++ (75 %)	0,082±0,0013
	200	+ (25 %)	0,0038±0,0001
	300	– (0 %)	0,0011±0,0000
	350	– (0 %)	0,0011±0,0000
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	50	+ (25 %)	0,0029±0,0001
	100	– (0 %)	0,0018±0,0000
	200	– (0 %)	0,0022±0,0002

Таблиця 6

**Продуктивність каротинвмісних дріжджів *R. sphaerocarpum* УКМ-44
за впливу концентраційного ряду солей Купруму (II) (3 доба культивування)**

Сіль	Концентрація йонів Купруму (II), мг/дм ³	Візуальна оцінка інтенсивності пігментоутворення дріжджів, %	β-каротин, мкг/см ³
Контроль (без солей Купруму)		++++ (100 %)	0,268±0,003
CuCl ₂ ·2H ₂ O	50	++++ (100 %)	0,212±0,0047
	100	++++ (100 %)	0,200±0,0055
	200	++++ (100 %)	0,189±0,0061
	300	+/- (50 %)	0,062±0,0002
	350	+/- (50 %)	0,033±0,0001
	400	– (0 %)	0,0014±0,0000
CuSO ₄ ·5H ₂ O	50	++++ (100 %)	0,199±0,0012
	100	++++ (100 %)	0,181±0,0023
	200	++++ (100 %)	0,177±0,0001
	300	+++ (75 %)	0,051±0,0002
	350	++ (50 %)	0,0020±0,0000
	400	+/- (50%)	0,0014±0,0001
Cu(NO ₃) ₂	50	++++ (100 %)	0,208±0,0019
	100	++ (50 %)	0,0018±0,0000
	200	+/- (50 %)	0,0015±0,0001
	300	– (0 %)	0,00063±0,0000

Концентрація β-каротину в контрольних зразках (без впливу солей металів) була в 1,6 раза більшою у дріжджів *R. sphaerocarpum* УКМ-44 (0,268 мкг/см³) ніж у *Rh. glutinis* УКМ-1333 (0,179 мкг/см³). При візуальній оцінці ступеня пігментоутворення також було помічено, що *R. sphaerocarpum* мають більш насичений колір.

Так, мінімальні концентрації йонів Купруму (II) у складі солей CuCl₂·2H₂O, за яких *Rh. glutinis* починали повністю втрачати пігмент (з невеликою кількістю слабо пігментованих колоній), складали 200 та 300 мг/дм³ (концентрація β-каротину була 0,0087 та 0,0062 мкг/см³, відповідно, що в 20,6 та 28,9 раза менше ніж в контролі).

Йони Купруму (II) у складі CuSO₄·5H₂O починали пригнічувати пігментоутворення *Rh. glutinis* з концентрації 50 мг/дм³ (+++), концентрація β-каротину в клітинах була майже у 2 рази менше ніж в контрольному зразку без Cu²⁺. Повністю синтез каротиноїдів блокувався за концентрації йонів Купруму 300 мг/дм³ (концентрація β-каротину складала 0,0011 мкг/см³, що в 162,7 раза менше ніж в контролі). Найбільш токсичну дію на культуру *Rh. glutinis*, як було зазначено вище, спричинили йони Cu²⁺ у складі нітрату. За концентрації 100 та 200 мг/дм³ концентрація β-каротину складала 0,0018 мкг/см³ та 0,0022 мкг/см³, відповідно (колонії були безбарвні). На 9 добу синтез пігментів подекуди поновлювався, проте за концентрації 300 мг/дм³ йонів Купруму росту культури не було протягом всього періоду спостережень.

Йони Купруму (II) у складі CuCl₂·2H₂O проявили помірно токсичну дію на дріжджі *R. sphaerocarpum*. За концентрації 300 мг/дм³ Cu²⁺ концентрація β-каро-

тину була лише в 4,3 раза менша за контроль. Проте за концентрації йонів Купруму 400 мг/дм³ (повне припинення синтезу пігментів) β-каротину було в 191,4 раза менше ніж в контрольному зразку. Слід зазначити, що за концентрацій катіону 50-200 мг/дм³ колір пігментів колоній *R. sphaerocarpum* не відрізнявся від контрольного зразка, проте результати вивчення вмісту каротиноїдів показали, що їх концентрація незначно зменшується. Купрум (II) сульфат проявив олігодинамічну дію на дріжджі *R. sphaerocarpum*. Помірне пігментоутворення спостерігалось за концентрації 300 мг/дм³ Cu²⁺ (+++), а пігментні колонії з'являлися при 400 мг/дм³ катіону (концентрація β-каротину була в 36,4 раза меншою порівняно з помірно пігментованими колоніями культури). Сіль Cu(NO₃)₂ проявила найбільш токсичну дію на *R. sphaerocarpum*, так само як і на *Rh. glutinis*. Культура повністю припиняла синтез каротиноїдів за концентрації Cu²⁺ 300 мг/дм³ (вміст β-каротину становив лише 0,00063 мкг/см³, що в 425,4 раза менше ніж в контролі).

Головні висновки. При концентраціях 50-100 мг/дм³ солей CuCl₂·2H₂O та CuSO₄·5H₂O спостерігався незначний токсичний ефект на обидва види модельних культур дріжджів, тоді як Cu(NO₃)₂ значно знижував пігментоутворення при цих концентраціях. *Rh. glutinis* були найбільш чутливими до Cu(NO₃)₂, а *R. sphaerocarpum* – до CuSO₄·5H₂O, тому ці дріжджі можна використовувати для біоіндикації Купрум (II) нітрату та сульфату, відповідно. Встановлено сильний кореляційний зв'язок між візуальною оцінкою кольору пігментів та концентрацією каротиноїдів, що підтверджує ефективність візуальної шкали для біоіндикації.

Перспективи використання результатів дослідження. Перспективою подальших досліджень є вивчення впливу інших солей важких металів на синтез пігментів дріжджами, що

належать до різних таксономічних груп з метою використання у біоіндикації, а також порівняння отриманих результатів з попередніми дослідженнями.

Література

1. Луцька М. П. Екологічні наслідки військового вторгнення в Україну. *Theoretical foundations of scientists and modern opinions regarding the implementation of modern trends* : Proceedings of the XXV International Scientific and Practical Conference (San Francisco, June 27–30, 2023). San Francisco, 2023. С. 54–58. DOI: 10.46299/ISG.2023.1.25
2. Яковишина Т. Ф. Використання мікроорганізмів, як біоіндикаторів забруднення важкими металами, в системі екологічного моніторингу ґрунтів. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія : Агрономія і біологія*. 2012. Вип. 2. С. 197–201. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vsna_agro_2012_2_44
3. Мікробіологія і хімія води : конспект лекцій з дисципліни для студентів 1-2 курсів денної і заочної форм навчання галузі знань 19 – Архітектура та будівництво, спеціальності 192 – Будівництво та цивільна інженерія, спеціалізація (освітня програма) «Гідротехніка» (Водні ресурси) / І. М. Чуб. Харків : ХНУМГ ім. О. М. Бекетова, 2019. 122 с.
4. Крупей К. С. Біоіндикація та біометрія : навчально-методичний посібник для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра напряму підготовки «Екологія, охорона навколишнього природного середовища та збалансоване природокористування» (затверджено вченою радою ЗНУ від 26 квітня 2016 р., протокол № 10). Запоріжжя : ЗНУ, 2016. 80 с.
5. Щербина О. М. Ідентифікація і визначення Купруму в рослинній сировині. *Вісник ЛДУ БЖД*. 2018. № 17. С. 58–62.
6. Лозовая О. Г., Касаткина Т. П., Подгорский В. С. Поиск биосорбентов тяжелых металлов среди дрожжей различных таксономических групп. *Микробиологический журнал*. 2004. Т. 66, № 2. С. 92–101.
7. Крупей 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.
8. Bahafid W., Joutey N. T., Asri M., Sayel H., Tirry N., Ghachtouli N. E. Yeast Biomass: An Alternative for Bioremediation of Heavy Metals [Internet]. *Yeast – Industrial Applications*. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.70559>
9. Паніотова Г. П., Антоненко П. Б., Годован В. В., Сейфулліна І. Й., Чебаненко О. А., Лобашова К. Г. Визначення гострої токсичності нових гетерометалічних сполук – тартратогерманатів купруму та цинку. *Запорізький медичний журнал*. 2017. Т. 19, № 6(105). С. 813–818. DOI: 10.14739/2310-1210.2017.6.115271
10. Спосіб визначення інтенсивності пігментоутворення у бактерій: пат. на корисну модель 49812 Україна. № u200912311; заявл. 30.11.2009; опубл. 11.05.2010, Бюл. № 9, 2010 р., 12 с.
11. Мусієнко М. М., Паршикова Т. В., Славний П. С. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин. К. : Фітосоціоцентр, 2001. 245 с.
12. Голованова І. А., Белікова І. В., Ляхова Н. О. Основи медичної статистики : навчальний посібник для аспірантів та клінічних ординаторів. Полтава : ВДНЗУ «УМСА», 2017. 113 с. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://elib.umsa.edu.ua/bitstream/umsa/10614/1/Posibnik_Statistika_17.pdf