

ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ БІОЛОГІЧНИЙ

Кафедра загальної та прикладної екології і зоології

Кваліфікаційна робота
магістра

на тему ВПЛИВ Hg^{2+} ТА Ag^+ НА СИНТЕЗ ПІГМЕНТУ ДРІЖДЖОВИХ
КУЛЬТУР *RHODOTORULA AURANTIACA* ТА *RHODOTORULA GLUTINIS*

Виконала: студентка 2 курсу, групи 8.1018

спеціальності 101 екологія, освітньої програми екологія та
охорона навколишнього середовища

_____ Валерченко Ю.В.

Керівник _____ проф., д.б.н. Рильський О.Ф.

Рецензент _____ доц., доц., к.б.н. Воронова Н.В.

Запоріжжя – 2020

ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет біологічний

Кафедра загальної та прикладної екології і зоології

Освітній рівень магістр

Спеціальність 101 екологія

Освітня програма екологія та охорона навколишнього середовища

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри загальної та прикладної
екології і зоології,
д.б.н., проф.

_____ О.Ф. Рильський

« _____ » _____ 2019 року

ЗАВДАННЯ

на дипломну роботу студентці

Валерченко Юлії Вікторівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Вплив Hg^{2+} та Ag^+ на синтез пігменту дріжджових культур *Rhodotorula aurantiaca* та *Rhodotorula glutinis*

керівник роботи Рильський Олександр Федорович, д.б.н., професор

затверджена наказом ЗНУ від « 12 » червня 2019 р. № 940 -с

2. Строк подання студентом роботи грудень 2019 року

3. Вихідні дані до роботи кваліфікаційна робота на тему «Скринінг пігментосинтезувальних дріжджів-біоіндикаторів іонів Хрому (VI)»

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): 1) дослідити вплив йонів Hg^{2+} та Ag^+ на пігментосинтезувальну здатність дріжджів; 2) перевірити детоксикаційну дію гумату Натрію на дріжджові клітини в присутності йонів важких металів; 3) розрахувати різницю в інтенсивності кольору пігментів контрольних та дослідних зразків дріжджів.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень) таблиці: табл. 3.1 Вплив Ag^+ на інтенсивність пігментоутворення дріжджів *Rhodotorula glutinis* Y-1333 та *Rh. aurantiaca* Y-1193.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	КОНСУЛЬТАНТ	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
4	Притула Н.М., доцент		

7. Дата видачі завдання 11.02.2018р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

з/п	Назва етапів дипломної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітки
1	Підбір культур для дослідження. Написання глави «Охорона праці»	жовтень- грудень 2018	Виконано
2	Поповнення літературних джерел за темою кваліфікаційної роботи. Формування розділу «Матеріали та методи дослідження»	січень-лютий 2018-2019	Виконано
3	Проведення експериментальних досліджень, аналіз отриманих даних. Написання відповідного розділу	березень- квітень 2019	Виконано
4	Оформлення кваліфікаційної роботи магістра	травень- вересень 2019	Виконано
5	Передзахист. Рецензування кваліфікаційної роботи	жовтень – грудень 2019	Виконано
6	Захист кваліфікаційної роботи	січень 2020	Виконано

Студентка _____
(підпис)

Валерченко Ю.В.
(прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____
(підпис)

Рильський О.Ф.
(прізвище та ініціали)

Нормоконтроль пройдено
Нормоконтролер _____
(підпис)

Притула Н.М.
(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Дана робота розміщена на 58 сторінках друкованого тексту, містить 9 таблиць, 3 фотокартки. Список літератури включає 70 джерел.

Об'єкт досліджень – пігментосинтезувальні дріжджі роду *Rhodotorula*.

Мета роботи – дослідити вплив йонів важких металів на каротиносинтезувальну здатність дріжджів роду *Rhodotorula* у присутності гумінових речовин.

В результаті проведення дослідження було встановлено, що пігментосинтезувальні дріжджі втрачали здатність до утворення пігментів з певних концентраційних рівнів йонів Меркурію та Аргентуму, а також, що гумінові речовини здатні проявляти детоксикаційну дію на каротиносинтезувальні дріжджі роду *Rhodotorula* в присутності йонів важких металів.

Новизна роботи – вперше проведено дослідження впливу йонів Меркурію та Аргентуму на пігментосинтезувальну здатність штамів *Rhodotorula aurantiaca* Y-1193 та *Rhodotorula glutinis* Y-1333 у присутності гумінових речовин.

Значущість роботи – результати дослідження поширюють уявлення про використання дріжджів з точки зору сигналізаторів забруднень, що дозволяє застосовувати їх для біоіндикації водних об'єктів, а також результати можна використовувати для екстраполяції отриманих результатів на інші живі об'єкти для їх детоксикації за впливу важких металів.

Результати дослідження можуть бути використані для біоіндикації стічних вод та детоксикації живих організмів за впливу важких металів.

ДРІЖДЖІ-БІОІНДИКАТОРИ, ПІГМЕНТ, ВАЖКІ МЕТАЛИ, ГУМІНОВІ РЕЧОВИНИ.

ABSTRACT

This work is presented on 58 printed text, contains 9 tables, 3 photographs. List of references to include 70 sources.

The object of the study is pigment synthesizing yeasts of the genus *Rhodotorula*.

The purpose of the work is to investigate the influence of heavy metal ions on carotenogenising capacity of yeasts in the presence of humic substances.

As a result of the study, it was found that pigment-synthesizing yeast lost the ability to form pigments from certain concentration levels of Mercury and Argentum ions, and that humic substances were able to have a detoxifying effect on the carotene-synthesizing yeast.

The novelty of the work – for the first time investigated the influence of Mercury and Argentum ions on the pigment synthesizing ability of *Rhodotorula aurantiaca* Y-1193 and *Rhodotorula glutinis* Y-1333 strains in the presence of humic substances

Significance of work – the results of the study extend the idea of using yeasts from the point of view of pollution sensors, which allows them to be used for bioindication of water, and the results can be used to extrapolate the results to other living objects for their detoxification by the influence of heavy metal ions.

The results of the study can be used for for wastewater bioindication and detoxification of living organisms under the influence of heavy metals.

YEASTS BIOINDUCTORS, PIGMENT, HEAVY METALS, HUMIN SUBSTANCE

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА ВИЗНАЧЕНЬ.....	7
ВСТУП	8
1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	10
1.1 Загальна характеристика дріжджових клітин	10
1.2 Характеристика дріжджових пігментів	13
1.3 Вплив важких металів на живі організми.....	15
1.3.1 Біологічна дія Меркурію та Аргентуму	18
1.3.2 Механізми стійкості мікроорганізмів до дії важких металів	24
1.4 Біоіндикація стану довкілля за допомогою мікроорганізмів	25
1.5 Функції та захисний ефект гумінових речовин.....	27
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	31
2.1 Методи культивування пігментосинтезувальних дріжджів	31
2.2 Методи приготування витяжки гумату Натрію з торфу	31
2.3 Метод оцінки різниці в інтенсивності кольору пігментів дріжджових клітин.....	32
3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	34
3.1 Вплив концентраційного ряду йонів Меркурію та Аргентуму на інтенсивність пігментоутворення дріжджів роду <i>Rhodotorula</i>	34
3.2 Детоксикаційна дія гумату Натрію на дріжджові клітини в присутності йонів важких металів.....	37
4 ОХОРОНА ПРАЦІ ТА БЕЗПЕКА В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ	43
ВИСНОВКИ.....	48
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	49
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	50
ДОДАТКИ.....	56

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА ВИЗНАЧЕНЬ

БАР – біологічно активні речовини

ВМ – важкі метали

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ГДК – гранично допустимі концентрації

ГР – гумінові речовини

КІ – концентраційний інтервал

МО – мікроорганізми

ОР – органічна речовина

ВСТУП

Важкі метали є найсильнішими за негативним впливом на живі організми і найбільш поширеними хімічними забруднювачами. Тому, накопичення важких металів (ВМ) є однією з серйозніших екологічних проблем у довкіллі, зокрема і водних об'єктів. Їх сполуки утворюють значну групу токсикантів, які негативно впливають не тільки на природне середовище, але й на людину [1]. Гранично допустимі концентрації (ГДК) металів у навколишньому середовищі мають, як правило, досить низькі концентрації, проте на сьогоднішній день дуже часто їх концентрація може перевищувати у десятки та сотні разів.

Один з найбільш токсичних металів, який широко розповсюджений у навколишньому середовищі є Меркурій (Hg). Він має здатність до біоаккумуляції і руху по трофічних ланцюгах. Дуже небезпечні органічні сполуки Меркурію, що утворюються у водних системах і внаслідок процесів біохімічного метилування [2].

Аргентум вважається не найтоксичнішим з важких металів, можливо завдяки тому, що в звичайних умовах ми отримуємо його в незначних дозах. У той же час за нормами йому присвоєно II клас небезпеки – «високо небезпечна речовина», поряд з іншими загальноновизнаними токсичними важкими металами, такими як Плюмбум, Кобальт, Кадмій тощо. Це пов'язано з тим, що накопичення срібла в організмі людини в надмірних кількостях може викликати специфічне захворювання, зване «аргіроз» або «аргірія» [3].

Зі зростанням такого навантаження на довкілля виникає необхідність моніторингу та індикації шкідливих речовин, найбільш чутливими до яких є мікроорганізми (МО) [4].

Таким чином актуальним є дослідження біоіндикації сполук ВМ мікроорганізмами та дослідження направлені на вивчення зниження токсичності важких металів. Останнім часом приділяється велика увага зниження токсичності ВМ гуміновими речовинами.

Гумінові речовини – необхідна і обов'язкова складова частина всіх процесів у біосфері. Вони виконують ряд найважливіших функцій. Взаємодіючи з живими організмами, гумінові речовини в малих кількостях впливають на їх ріст, пригнічуючи або стимулюючи його. Механізм подібної різноспрямованої дії не зрозумілий до сьогодні. З одного боку, гумінові речовини можуть виступати додатковим джерелом вуглецю та азоту для мікроорганізмів, а з іншого, як речовини, збагачені стабільними вільними радикалами, що запускають ланцюгові радикальні реакції, можуть призводити до окиснення органічного матеріалу, викликаючи пошкодження живих клітин [5].

Метою роботи було дослідити вплив іонів важких металів на інтенсивність пігментонакопичення дріжджів та перевірити детоксикаційну дію гумінових речовин в присутності йонів Меркурій та Аргентуму.

Виходячи з вищезазначеної мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити вплив йонів Hg^{2+} та Ag^+ на пігментосинтезувальну здатність дріжджів.
2. Перевірити детоксикаційну дію гумату Натрію на дріжджові клітини в присутності йонів важких металів.
3. Розрахувати різницю в інтенсивності кольору пігментів контрольних та дослідних зразків дріжджів.

Об'єкт дослідження: дріжджі роду *Rhodotorula*.

Предмет дослідження: пігментосинтезувальна здатність дріжджів за дії важких металів у присутності гумінових речовин.

Результати попередніх досліджень апробовані в періодичному науковому виданні «Питання біоіндикації та екології» 2018, вип.23 (листопад 2018 р.).

1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальна характеристика дріжджових клітин

Дріжджі – позатаксономічна група одноклітинних грибів, які втратили міцеліальну будову у зв'язку з переходом до проживання у рідких і напіврідких, багатих на органічні речовини (ОР) субстратах. Об'єднує близько 1500 видів, що належать до аскоміцетів та базидіоміцетів та домінують серед грибів у водних середовищах [6].

Дріжджі являють собою одноклітинні нерухомі організми різноманітної форми (паличкоподібні, шаровидні, овальні тощо), які широко розповсюджені в природі; вони зустрічаються в ґрунті, на листях, стеблах і плодах рослин, в різноманітних харчових субстратах рослинного та тваринного походжень. Розміри дріжджових клітин зазвичай становлять 3-7 мкм у діаметрі, тоді як деякі види здатні зростати до 40 мкм [7]. Форма і розміри дріжджових клітин непостійні і залежать від роду, виду, умов культивування, складу поживного середовища тощо [8].

Будова клітини дріжджів схожа з будовою клітини грибів. Вона складається з клітинної оболонки, цитоплазматичної мембрани, цитоплазми або протоплазми, де розташовуються органоїди (ядро, комплекс Гольджі, мітохондрії, рибосомний апарат). В якості запасних поживних речовин в клітинах є включення у вигляді крапель жиру, зерен глікогену та волютину [9].

Окремі види мають в складі пігменти. У молодих дріжджів цитоплазма є гомогенною. В процесі зростання всередині них з'являються вакуолі (містять органічні і мінеральні компоненти). У процесі росту спостерігається утворення зернистості, відбувається збільшення вакуолей. Деякі дріжджі можуть мати ослизнену оболонку, внаслідок чого клітини склеюються один з одним й при розвитку в рідких середовищах утворюють пластівці, які осідають на дно.

Клітини багатьох видів дріжджів утворюють капсулу – слизистий полісахаридний чохол навколо клітини, може бути дуже тонким (мікрокапсула), але іноді його товщина перевищує діаметр клітини.

Склад позаклітинних капсульних полісахаридів варіює залежно від виду дріжджів.

Функції капсули різноманітні. Капсули сприяють закріпленню клітин до поверхні твердого субстрату, створюють особливе міжклітинне середовище, сприяють поліпшенню водного постачання клітини. В природних середовищах капсули можуть служити місцями акумуляції бактерій-супутників і асоціантів дріжджових клітин.

Клітинна оболонка – тонка та еластична, зберігає форму клітини, регулює обмінні процеси, підтримує осмотичний тиск. Вона складається з двох шарів, різних за складом, глюкану і маннану. Внутрішній шар – цитоплазматична мембрана, яка складається з нуклеїнових кислот, протеїнів і полісахаридів – пропускає воду та розчинені в ній речовини невеликої молекулярної маси, зовнішній – значно більше речовин.

Цитоплазма клітини здатна до руху, стискання і розправлення, в результаті чого змінюється форма центральної вакуолі.

Ядро має вигляд округлого або овального пухирця діаметром близько 2-х мкм, оточеного тонкою оболонкою. Містить прозору рідину – нуклеоплазму і більш щільну каріосому (ядерце). При розмноженні ядро ділиться на дві частини, а при спороутворенні – на кількість частин, що дорівнюють кількості спор.

Невеличкі двошарові структури довжиною до 1 мкм (мітохондрії) утримують в собі окиснюючі ферменти. В складі органел 30% ліпідів і 50% білка.

Обов'язковими органоидами також є рибосоми і вакуоль. Округлі дріжджові клітини містять одну вакуоль, продовгуваті – дві.

Кількість волютину коливається в залежності від складу поживного середовища, стадії розвитку дріжджів. Особливо багато його перед брунькуванням. Волютин – комплекс ліпопротеїдів, РНК, поліфосфатів.

Глікоген – полісахарид, близький до крохмалю, не перевищує 40% сухої маси клітини. Накопичується в період бродіння.

Жирові включення містяться у вакуолях у вигляді крапель, які збільшуються з ростом клітини [8, 10].

Найбільш характерним і широко розповсюдженим у дріжджів є вегетативне розмноження (брунькування або простим поділом) або за допомогою спор.

Процес брунькування полягає в тому, що на материнській клітині утворюється нарост – брунька, яка росте і відокремлюється від материнської клітини, коли досягне певних розмірів. Брунькуванню передуює поділ ядра на дві частини, і воно разом з частиною цитоплазми та іншими клітинними елементами переходить в молодшу клітину, що формується. За сприятливих умов брунькування триває близько двох годин. У деяких дріжджів дочірні клітини не відокремлюються, а залишаються з'єднаними, утворюючи несправжній міцелій (дріжджі родів *Pichia hansen*, *Hansenula sydow*, *Candida berkhout*).

У більшості дріжджів при несприятливих умовах відбувається утворення спор, але існують й аспорогенні дріжджі, котрі ніколи не утворюють спор (роди *Candida*, *Torulopsis*).

Більшість спор утворюються безстатевим шляхом, але ядро перед цим підлягає редуруючому діленню, тому спори мають гаплоїдний набір хромосом.

Статеве розмноження дріжджів відбувається шляхом копуляції. Внаслідок копуляції можуть утворюватися аскоспори (у аскоміцетів) або екзогенні спори (у базидіоміцетів) [11].

Дріжджі відносять до класу сумчатих грибів (*Ascomycetes*), до підкласу голосумчатих, які не утворюють міцелій. В основі класифікації на порядки, сімейства, роди лежить спосіб їх розмноження, деякі морфологічні, фізіологічні та біохімічні ознаки. Наприклад, за типом пігментосинтезувальної здатності розрізняють каротиноїдні, пульхеримінові (*Rhodotorula*, *Sporobolomyces salmonicolor*), меланінові (*Nadsoniella nigra*), феназинові (*Pseudomonas aeruginosa*) та інші дріжджі.

Найбільше практичне значення мають пекарські або пивні дріжджі (*Saccharomyces cerevisiae*). Деякі види є факультативними і умовними патогенами.

Крім того, деякі види надзвичайно важливі як модельні організми у клітинній біології. Так, *S. cerevisiae* є найбільш дослідженим МО. Ці дослідження проводяться з метою збору інформації про біологію еукаріотичних клітин і, врешті-решт, про біологію людини. Інші види дріжджів, наприклад *Candida albicans*, є опортуністичними патогенами і можуть викликати інфекції у людини. Зараз повністю розшифрований геном дріжджів *S. cerevisiae* і *Schizosaccharomyces pombe* – вони стали першими еукаріотами, чий геном був повністю секвенований [7].

Також в останні десятиріччя активно проводяться дослідження щодо використання пігментосинтезувальних бактерій у якості біоіндикаторів забруднення довкілля ВМ [12].

1.2 Характеристика дріжджових пігментів

Пігменти мікроорганізмів – вторинні метаболіти, тобто вони не є речовинами, обов'язково присутніми у всіх МО. Наприклад, навіть всередині одного виду *Serratia marcescens* є пігментосинтезувальні та безпігментні штами.

Мікроорганізми здатні синтезувати велику кількість різноманітних пігментів, що пов'язано з виділенням фарбувальних речовин різних класів хімічних сполук в середовище або входять до складу клітин. Основною фізичною властивістю пігменту є здатність поглинати певні промені спектру [13, 14]. Саме це є основною діагностичною ознакою при ідентифікації пігментів [15].

Пігменти бактерій представлені різними речовинами – каротиноїдами, феназиновими похідними, меланіном тощо. Серед пігментів переважають жовті, помаранчеві і червоні каротиноїдні пігменти.

Здатність до пігментоутворення виражена у мікроорганізмів таких родів *Sarcina*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* тощо. Ця ознака генетично детермінована, тому її використовують при визначенні виду.

Питання про функції пігментів в клітинах мікроорганізмів залишається не до кінця з'ясованим. Вважається, що основна їх функція – це захист бактерій від дії видимого світла та від природної ультрафіолетової радіації [13].

Багато пігментів можуть бути фізіологічно активними речовинами (антибіотиками, ферментами, вітамінами, фітонцидами, стимуляторами росту). Між пігментацією і утворенням вторинних метаболітів існує така тісна кореляція, що при наявності пігментів можна з великою часткою ймовірності очікувати утворення антибіотиків і інших біологічно активних речовин (БАР).

Каротиносинтезувальні дріжджі зайняли міцну позицію у сучасній біотехнології. Ще в ХХ столітті дослідники звернули увагу на каротиносинтезувальні дріжджі, представники деяких з них (*Sporobolomyces*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* *Sporidiobolus* тощо) синтезують широкий спектр каротиноїдів [10]. 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. В багатьох країнах каротиноїди використовуються як добавки до харчових продуктів [16].

Каротиноїди залучаються до різних захисних механізмів:

1) завдяки наявності сполучених подвійних зв'язків, можуть зв'язувати синглетний кисень і пригнічують утворення вільних радикалів, попереджаючи їх негативну дію на організм;

2) забезпечують захист від УФ-випромінювання, так як можуть трансформувати енергію УФ-світла у видиме світло, що проявляється в явищі

флуоресценції (наприклад, світіння пилку деяких квіткових рослин, спор грибів і водоростей тощо);

3) виступають в ролі антиоксидантів, захищаючи чутливі тканини і лабільні з'єднання від окислення.

Однією з найважливіших функцій каротиноїдів є здатність утворювати комплекси з протеїнами. Відомо, що маленькі молекули (алостеричні ефектори) змінюють агрегаційний стан протеїнів, тим самим, стабілізуючи їх протеїнову і ферментну активність. Ця здатність також обумовлює зміну проникності мембран. Встановлено імунностимулюючу роль каротиноїдів [17].

1.3 Вплив важких металів на живі організми

Важкі метали є найсильнішими за негативним впливом на живі організми і найбільш поширеними хімічними забруднювачами. Потрапляння ВМ до біосфери відбувається постійно у результаті вулканічного виверження, а також магнітної і гідротермальної активності. Проте рівень техногенного забруднення ВМ значно більший та постійно зростає разом з розвитком промисловості [18].

Серед різноманітних забруднюючих речовин ВМ (в тому числі Меркурій, Плюмбум, Кадмій, Цинк, Арсен) та їх сполуки виділяються поширеністю та високою токсичністю, багато з них – також здатністю до накопичення в живих організмах.

Вони широко застосовуються в різних промислових виробництвах, тому, незважаючи на очисні заходи, вміст сполук важких металів у промислових стічних водах досить високий. Вони також надходять в навколишнє середовище з побутовими стоками, з димом і пилом промислових підприємств. Багато металів утворюють стійкі органічні сполуки, добра розчинність цих комплексів сприяє міграції важких металів в природних водах.

ВМ відносяться до пріоритетних забруднюючих речовин, спостереження за якими обов'язкове у всіх середовищах.

Термін ВМ, що характеризує широку групу забруднюючих речовин, набув останнім часом значного поширення. У різних наукових і прикладних роботах автори по-різному трактують значення цього поняття.

У зв'язку з цим кількість елементів, що відносяться до групи ВМ, змінюється в широких межах. В якості критеріїв належності використовуються численні характеристики: атомна маса, густина, токсичність, поширеність у природному середовищі, ступінь залученості в природні та техногенні цикли. У деяких випадках під визначення важких металів потрапляють елементи, які відносяться до крихких (наприклад, Бісмут) чи металоїдів (наприклад, Арсен).

Важкі метали є найсильнішими за негативним впливом на живі організми і найбільш поширеними хімічними забруднювачами. Харчові продукти і питна вода сприяють надходженню в організм майже всіх хімічних елементів, в тому числі і тих, що в певних концентраціях, є токсичними.

Важкі метали, потрапляючи в наш організм, залишаються там назавжди, вивести їх можна тільки за допомогою білків молока і білих грибів. Досягаючи певної концентрації в організмі, вони починають свій згубний вплив – викликають отруєння, мутації. Крім того, що самі вони отруюють організм людини, вони ще і механічно засмічують його – йони ВМ осідають на стінках найтонших систем організму і засмічують ниркові канали, канали печінки, таким чином, знижуючи фільтраційну здатність цих органів. Відповідно, це призводить до накопичення токсинів і продуктів життєдіяльності клітин нашого організму, тобто самоотруєння організму, тому що саме печінка відповідає за переробку отруйних речовин, що потрапляють в наш організм, і продуктів життєдіяльності організму, а нирки – за їх виведення назовні.

ВМ є протоплазматичними отрутами, токсичність яких зростає в міру збільшення атомної маси. Їх токсичність проявляється по-різному. Багато металів при токсичних рівнях концентрацій інгібують діяльність ферментів (Купрум, Меркурій).

Таблиця 1.1 – Metали та їх летальна доза [19]

Елемент	Доза, мг/кг		
	Нормальна	Токсична	Летальна
Миш'як	0,04-1,4	5-50	50-340
Ртуть	0,004-0,02	0,4	150-300
Мідь	0,5-6	3,3-8,3	175-250
Алюміній	0,0014-0,08	60	1300-6200
Кадмій	0,07-0,3	3-330	1500-9000
Фтор	0,3-5	20	2000
Хром	0,01-1,2	200	3000-8000
Цинк	5-40	150-600	6000
Свинець	0,06-0,5	1	10000
Залізо	6-40	200	7000-35000

Деякі з них утворюють хелатоподібні комплекси зі звичайними метаболітами, порушуючи нормальний обмін речовин (Ферум). Такі метали, як Кадмій, Купрум, Ферум, взаємодіють з клітинними мембранами, змінюючи їх проникність [20].

За токсичністю важкі метали розташовуються у такій послідовності: Меркурій, Аргентум, Купрум, Кадмій, Цинк, Плюмбум, Хром, Нікель, Кобальт [21]. Проте цей порядок може змінюватися залежно від виду організму і від того, присутні ці елементи в розчині у вигляді вільних йонів чи входять до складу органічних або неорганічних сполук.

Токсичність у відповідних концентраціях для людини проявляють Алюміній, Барій, Берилій, Кадмій, Купрум, Арсен, Нікель, Селен, Плюмбум, Аргентум, Стронцій, Меркурій, Хром. Концентрація елемента має суттєве значення, оскільки Кадмій, Купрум, Арсен, Нікель, Селен, Хром відносяться до життєво необхідних для організму людини елементів. Для нормального функціонування організму людини необхідне досягнення збалансованого обміну

мікроелементів, порушення якого призводить до важких захворювань та отруєнь [22].

ВМ пригнічують життєдіяльність усіх вищих і нижчих організмів: вони блокують ферментні системи, вступаючи у взаємодію з сульфідними групами ключових ферментів і порушуючи цілісність клітинних стінок.

Найстійкішими до забруднення йонами ВМ є мікроміцети, дріжджі, деякі тіонові бактерії та патогенні МО. Одним із пояснень стійкості МО до йонів металів є їх здатність акумулювати останні у клітинах. Рівень нагромадження цих йонів у клітинах мікроорганізмів може перевищувати їх вміст у середовищі в сотні разів [23].

1.3.1 Біологічна дія Меркурію та Аргентуму

Меркурій – один з найбільш токсичних металів, широко розповсюджений у навколишньому середовищі, має здатність до біоаккумуляції і руху по трофічних ланцюгах [24]. Меркурій може перебувати в трьох основних формах: елементарної ртуті – Hg^0 , неорганічної ртуті – Hg (I) і Hg (II) та органічної – наприклад, метил-, етил-, фенілртуть [25]. Дуже небезпечні органічні сполуки Меркурію, що утворюються у водних системах і внаслідок процесів біохімічного метилування. У навколишнє середовище Меркурій надходить при видобутку і виплавки ртутьвмісної руди, виплавці кольорових металів із сульфідних руд, добуванні золота з руд, відбілюванні целюлози, при виробництві хлору, вінілхлориду, електричного обладнання, приладів вимірювання та контролю (термометрів, манометрів), медичних препаратів, що містять ртуть, цементу, при застосуванні ртутьвмісних пестицидів, спалюванні вугілля і мазуту [26, 27].

У світовій економіці ртуть широко використовується в електротехнічній промисловості та приладобудуванні, лабораторній і медичній практиці, у виробництві хлору/лугів, сільському господарстві (входить до складу добрив),

у дрібномасштабному видобутку золота і срібла та інших сферах. Значна кількість ртуті надходить в навколишнє середовище при спалюванні відходів [28].

Жоден інший хімічний елемент, що належить до першого класу небезпеки, не має такого широкого застосування у виробничих процесах, виробках, речовинах і такої багатоваріантної можливості проникнення в організм (із повітрям, продуктами харчування, водою, через шкіру), як ртуть та її сполуки.

Меркурій характеризується високою летючістю, може випаровуватися навіть при мінусовій температурі, має здатність до утворення джерел вторинного забруднення (так зване депо сорбованої ртуті), його пари не мають ані кольору, ані запаху, ані смаку.

Потрапивши в навколишнє середовище, Меркурій назавжди залишається в ньому, циркулює в повітрі, воді, відкладеннях, ґрунті та біоті в різних неорганічних й органічних формах. Меркурій може переноситися на великі відстані, тобто її випаровування, що були викинуті в атмосферу на одному континенті, можуть випасти разом з опадами на будь-яких інших континентах.

Меркурій в атмосферному повітрі присутній переважно в газоподібній формі. У повітрі промислових районів концентрація Меркурію значно вище. Дальність розповсюдження її в атмосферному повітрі від джерел забруднення визначають за вмістом ртуті в опадах.

У ґрунті накопичення Меркурію визначається рівнем вмісту органічного вуглецю і сірки. Природний вміст ртуті в ґрунті, успадкований від материнської породи, коливається в межах від 0,02 до 0,3 мг/кг, складаючи в середньому 0,06 мкг/кг, і залежить від типу ґрунтів. У містах концентрація ртуті в ґрунті трохи вище, що пов'язано з наявністю великої кількості різних викидів.

У воді Меркурій може перебувати в органічному і неорганічному стані. Основне джерело ртуті в питній воді – водні джерела, забруднені стічними водами, наприклад, від хлор-лужного виробництва, далі атмосфера і, нарешті, реагенти, використовувані при водопідготовці.

Відомо, що водна і ґрунтова мікрофлора легко перетворює металеву ртуть і її неорганічні сполуки в метилртуть, найбільш стійку в воді і повітрі і найбільш токсичну органічну форму ртуті [29].

В організмі людини міститься приблизно 13 мг Меркурію, проте він не виконує ніякої фізіологічної ролі. Принаймні, життєва необхідність цього металу для людини та інших організмів не доведена. Останнім часом у медичній літературі стали з'являтися повідомлення про те, що Меркурій володіє певним біотичним ефектом і надає стимулюючу дію на процеси життєдіяльності (в кількостях, відповідних фізіологічним). Є відомості про присутність Меркурію в ядерній фракції живих клітин і про значення цього металу в реалізації інформації, закладеної в ДНК, і її передачі за допомогою транспортних РНК. Також, у деяких літературних джерелах зустрічаються відомості про те, що незважаючи на високу токсичність, Меркурій є життєво необхідним мікроелементом для живих організмів, його малі концентрації стимулюють фагоцитарну активність лейкоцитів і інтенсивність обміну речовин, а також деякі фізіологічні процеси, пов'язані з явищем дезінтоксикації організмів. Однак при збільшенні вмісту Меркурію ці ефекти знижуються поступово зникають і поступаються місцем токсичного впливу [30,31].

Прийом всередину 1 г ртутної солі смертельний. У перерахунку на «чисту» ртуть для цього достатньо 150-300 мг; шкідливі ефекти проявляються при дозі «чистої» ртуті в 0,4 мг. Встановлено максимально допустиму концентрацію парів Меркурію: для житлових, дошкільних, навчальних і робочих приміщень – 0,0003 мг/м³; для виробничих приміщень – 0,0017 мг/м³. Концентрація парів Меркурію в повітрі понад 0,2 мг/м³ викликає гостре отруєння організму людини.

З точки зору патології людини, Меркурій відрізняється надзвичайно широким спектром і великою різноманітністю проявів токсичної дії в залежності від властивостей речовин, у вигляді яких він надходить в організм (пари металевої ртуті, неорганічні або органічні сполуки), шляхів надходження і дози.

Меркурій належить до числа тіолових отрут, які блокують сульфгідрильні групи білкових з'єднань і цим порушують білковий обмін і ферментативну

діяльність організму [32]. Особливо сильно вона вражає нервову і видільну системи. При впливі Меркурію можливі гострі (проявляються швидко і різко, зазвичай при великих дозах) і хронічні (вплив малих доз протягом тривалого часу) отруєння. Пари і неорганічні сполуки Меркурію викликають контактний дерматит. При вдиханні ртутні пари поглинаються і накопичуються в мозку і нирках. В організмі людини затримуються приблизно 80% вдихається парів Меркурію. У шлунково-кишковому тракті відбувається практично повне всмоктування метилртути. Є відомості, що багато форм Меркурію здатні проникати в організм людини через шкіру. У вагітних жінок Меркурій долає плацентарний бар'єр, вражаючи плід. Метилртуть потрапляє і в грудне молоко, накопичуючись до небезпечних рівнів в крові дітей [33]. Меркурій проникаючи в середину клітин, зв'язуються з певними функціональними групами, зокрема з SH-групами, інактивуючи таким чином молекули ферментів, або відкладаються у металічній формі [34].

Аеробні та факультативно анаеробні мікроорганізми, як правило, при взаємодії з Меркурієм (II) відновлюють його до легкого елементарного Меркурію, а облігатно анаеробні (сульфатредуктори і метаногени) – метилують Меркурій (II) з утворенням монометил- і диметилртуть (II) за участю метилкобаламіну або близької до нього сполуки [35].

Аргентум – рідкісний елемент. У природі зустрічається як в самородному вигляді (вкрай рідко), так і у вигляді самостійних мінералів, яких відомо понад 50-ти. Видобуток Аргентуму власне з срібних руд становить лише 10-20% від її загального обсягу. Основна ж маса Аргентуму (80-90%) витягується попутно з свинцево-цинкових, мідних і золото-срібних руд.

Аргентум, як консервант, використовують у технологічних процесах виробництва харчів і напоїв. Розчини Аргентуму, отримані електрохімічним шляхом, є дуже ефективними і надійними консервантами питної води та незаражуючими агентами [36].

Основним джерелом надходження Аргентуму в підземні води є стічні води копалень, гірничо-збагачувальних підприємств, відходи виробництва і обробки

фотоматеріалів, а також в результаті попадання в воду бактерицидних і альгіцидних (призначених для знищення водних рослин) препаратів. У стічних водах Аргентум може бути присутнім як в розчиненому, так і в зваженому (колоїдному) стані, здебільшого у вигляді галоїдних солей.

Основним шляхом природного надходження Аургентум в організм є їжа. Внесок води в цю кількість можна вважати незначним, за винятком випадків, коли для пиття і приготування їжі використовується вода, оброблена йонами Аргентуму. У цьому випадку частка води стає визначальною.

Аргентум – важко засвоюваний елемент. Масова доля Аргентуму в організмі людини складає $1 \times 10^{-6} \%$ і накопичується в печінці, нирках, кістковій тканині, залозах внутрішньої секреції [37]. У добу людина з їжею приймає в середньому 0,088 мг Аргентуму [38].

Антимікробна дія Аргентуму вивчена доволі повно, механізм його дії на клітину ще не встановлений. Він не грає відому природну біологічну роль в організмі людини, і можливі наслідки для здоров'я срібла є спірним. Невідомо жодного біологічного процесу в людському тілі, в якому Аргентум брав би участь. Сам Аргентум нетоксичний, але деякі його сполуки мають токсичну дію, деякі є канцерогенними. Аргентум з білками утворює нерозчинні альбуміни [37]. У залежності від концентрації Аргентум може пришвидшувати чи вповільнювати біохімічні реакції з участю ферментів, з різною швидкістю пригнічувати ріст пухлинних тканин, сприяти імунітету проти багатьох захворювань.

З організму (в основному через шлунково-кишковий тракт) видаляється від 90% і більше надійшовшого Аргентуму. Проте, частина його абсорбується в шлунково-кишковому тракті, легко зв'язується з білками (глобуліном і гемоглобіном крові тощо), і розноситься по організму. Головним сховищем цього елемента в організмі є печінка. Зосереджується Аргентум в підвищених концентраціях також в шкірних покривах, слизових, і в меншій мірі в інших органах (нирки, селезінка, кістковий мозок, стінки капілярів, ендокринні залози). Печінка є і основним органом, відповідальним за виведення Аргентуму з

організму. Як і всі ВМ, Аргентум виводиться з організму досить повільно, хоча і не так довго, як багато інших – період його «напіввиведення» з печінки може досягати 50 днів. Разом з жовчю Аргентум потрапляє в шлунково-кишковий тракт і далі виводиться з фекаліями. Однак при постійному його надходженні в організм все одно спостерігається тенденція до його поступового накопичення.

Аргентум вважається не найтоксичнішим з важких металів, можливо завдяки тому, що в звичайних умовах ми отримуємо його в незначних дозах. У той же час за нормами йому присвоєно II клас небезпеки – «високо небезпечна речовина», поряд з іншими загальноновизнаними токсичними важкими металами, такими як Плюмбум, Кобальт, Кадмій тощо. Це пов'язано з тим, що накопичення Аргентуму в організмі людини в надмірних кількостях може викликати специфічне захворювання, зване «аргироз» або «аргірія» [3, 38]. Виявляється воно в зміні кольору райдужної оболонки очей і очного дна, а також в пігментації слизових і шкіри. Прояву ознак захворювання сприяє недолік в організмі вітаміну Е і Селену, а також вплив сонячних променів. В останньому випадку шкіра, насичена йонами Аргентум «засвічується» як фотографія. Разова доза AgNO_3 в 10 грам (6,35 г в перерахунку на Аргентум) оцінюється ВООЗ як летальна.

Аргентум володіє бактерицидною, антисептичною, протизапальною, в'яжучою дією; є природним бактерицидним металом [36]. В багатьох роботах показано, що він має інгібуючу дію щодо широкого спектра бактерій та ефективно використовується для антибактеріальної терапії при опіках, загостренні хронічного остеомієліту, інфекціях сечовидільної системи тощо. Встановлено, що ключовою стадією в механізмі бактерицидної дії цього металу є зв'язування Ag^+ з тіольними групами білкових молекул, що відповідають за електронний транспорт в клітині, тим самим викликаючи їх інактивацію [39, 40].

Важливим є те, що Аргентум впливає на клітинні стінки, збільшуючи їх проникність, тоді як Меркурій такого впливу не має [41].

Аргентум – постійна складова в організмах всіх вищих живих істот від рослин до тварин і людини. Однак його фізіологічна роль в організмі людини і

тварин на даний момент вивчена недостатньо. Таке явище, як дефіцит Аргентум в організмі ніде не описано [37].

Можливо, цей елемент виконує в організмі роль інгібітору ферментів. Встановлено, що Аргентум здатний блокувати сульфгідридні (HS) групи, які беруть участь в утворенні активного центру багатьох ферментів, «гальмуючи», таким чином, їх активність. Наприклад, Аргентум блокує аденозинтрифосфатну діяльність міозину. А міозин – це основний білок м'язової тканини людини, здатний розщеплювати АТФ – нуклеотид, що виконує у всіх живих організмах роль універсального акумулятора і переносника енергії. Саме завдяки цій властивості міозину, хімічна енергія макроенергетичних зв'язків АТФ перетворюється в механічну енергію м'язових скорочень. Тобто Аргентум здатний «приглушати» енергопостачання організму. Як вважають вчені, аналогічним є і механізм бактерицидної (знезаражуючого) дії йонів Аргентуму. Вони проникають всередину бактеріальної клітини, блокують SH-групи ферментів мікроорганізмів (а багато бактерій, зокрема жгутикові і війчасті, і багато найпростіші мають ферменти аналогічні міозину), в результаті чого бактерія гине [42].

1.3.2 Механізми стійкості мікроорганізмів до дії важких металів

МО найбільш швидко реагують на зміни навколишнього середовища. Їх розвиток та активність знаходяться в прямій залежності від складу органічних і неорганічних речовин у середовищі, тому що вони здатні руйнувати сполуки природного та антропогенного походження. На цьому базується принцип використання їх у біоіндикації [43]. Одним із етапів виконання багатьох екологічних завдань є дослідження характеру впливу ВМ на МО.

Відомо, що бактерії мають декілька механізмів стійкості до йонів ВМ [44, 45]:

- позаклітинний бар'єр (клітинна стінка, мембрана або капсула перешкоджають потраплянню йонів металів у клітину);
- ефлюкс (активний транспорт йонів металів із клітини). Ефлюксні системи можуть кодуватися як хромосомними [46], так і плазмідними генетичними детермінантами [47];
- позаклітинна секвестрація (зв'язування йонів металів специфічними компонентами клітини в периплазматичному просторі або зовнішній мембрані);
- внутрішньоклітинна секвестрація (зв'язування йонів металів біополімерами в цитоплазмі клітини). В еукаріот відомі два типи білків, які здатні секвеструвати йони металів – металотіонеїни та фітохелатини (низькомолекулярні білки), які містять велику кількість залишків цистеїну та зв'язують йони металів сульфгідрильними групами [48].
- відновлення бактеріями йонів ВМ.

Однією із найбільш важливих груп мікроорганізмів, здатних сорбувати йони ВМ (Cu, Zn, Mn, Cr, Cd, Pb, Ag, Ca, U, Co), є дріжджі. Здатність металів до сорбції залежить від будови їхньої клітинної стінки. Вона складається з фібрилярних вуглеводних полімерів – глюканів та мананів, які утворюють комплекси з білками та ліпідами, хітину та галактозаміну [49].

Відомо, що будова клітини дріжджів дуже подібна до клітини тваринного організму. Вони можуть добре рости на харчових продуктах, їх виділяють із води, ґрунту, наземних частин рослин [8], звідси зрозуміло, що дріжджі можуть бути об'єктивними індикаторами стану забруднення довкілля.

1.4 Біоіндикація стану довкілля за допомогою мікроорганізмів

Оцінкою якості середовища існування або його окремих компонентів за станом біоти у природних умовах називають біоіндикацію. Головна мета біоіндикації – діагностика стану екосистем шляхом встановлення здатності

організмів до адаптації у відповідних умовах довкілля. Основним завданням біоіндикації є виявлення видів-біоіндикаторів, які реагують на зміни у стані довкілля, що виникли під дією природних і антропогенних факторів, і добір індикаторів-тестерів з високим порогом чутливості до змін у стані довкілля [50].

Біоіндикатори – види, групи видів або угруповання, за наявності, ступенем розвитку, зміною морфологічних, структурно-функціональних, генетичних характеристик яких роблять висновок про стан довкілля. Як біоіндикатори часто виступають лишайники та мохоподібні, у водних екосистемах – угруповання бактеріопланктону, фітопланктону, зоопланктону, зообентосу, фітобентосу, перифітону [44].

Виявлення мікроорганізмів і їх облік можна зробити шляхом висіву проб в рідкі й щільні поживні середовища.

На сучасному етапі розвитку науки, техніки та сільського господарства неможливо уявити собі галузь, де мікробіологічні процеси не мали б значення. На властивостях і життєдіяльності мікроорганізмів засновані технологічні процеси в різних галузях промисловості та сільськогосподарського виробництва. Мікроорганізми беруть активну участь у колообігу речовин в природі. Можливо, саме вони можуть вирішити проблеми харчування, охорони навколишнього середовища.

Ще в 1906 р. відомий радянський мікробіолог В.Л. Омелянський відмітив дві основні особливості мікроорганізмів:

- високу специфічність дії;
- виключну чутливість.

Під специфічністю він розумів виборчу спорідненість мікроорганізмів, а під чутливістю – здатність виявляти незначну кількість різних речовин.

За наступний період наука і практика збагатилась великою кількістю даних, які підтверджують особливості мікроорганізмів. В даний час показано, що індикація забруднення навколишнього середовища з використанням мікробіологічних показників в більшості випадків перевершує за чутливістю більшість хімічних і фізичних методів. Мікроорганізми володіють надзвичайно

лабільною біохімічною організацією клітин, яка виражається в перебудові ферментного апарату і синтезі по мірі необхідності нових ферментів. Завдяки цьому бактерії швидко адаптуються до змін умов середовища проживання і появи нових екологічних факторів як природного, так і антропогенного походження [51,52].

Особливості використання мікроорганізмів в якості біоіндикаторів наступні:

1. Функціональна структура груп гетеротрофних організмів.
2. Грунтові мікроорганізми – індикатори екологічного стресу.
3. Мікробна індикація в водоймах.
4. Мікроорганізми – індикатори санітарного стану об'єктів зовнішнього середовища [52].

1.5 Функції та захисний ефект гумінових речовин

ГР складають 85-90% від загального вмісту ОР ґрунтів [53]. Також ГР присутні в інших природних об'єктах, таких як торф, вугілля, прісні і морські води. Розчинена ОР поверхневих вод на 60-80% складається з ГР [54]. За даними Тишковича (1984) вміст ГР в торфі становить близько 55% на суху речовину і досягає 73% від ОР торфу [55]. ГР, що входять до складу органічної маси вугілля, становлять від 5-15% в блискучих бурих і до 60% в окисленому кам'яному вугіллі [56]. Фракція ГР кислотної природи отримала загальну назву гумусових кислот, до яких в даний час відносять гумінові, гіматомеланові і фульвокислоти.

Гумінові речовини – високомолекулярні сполуки, які здатні накопичувати енергію та елементи живлення. Вони значною мірою нівелюють вплив токсичних речовин на живі організми. ГР підвищують активність ферментів, внаслідок чого покращується газообмін та дихання тканин. Отже, ГР активізують метаболізм та процеси регенерації.

До гумінових речовин відносять

- прогумінові речовини;
- гуміни;
- гумусові кислоти.

Найактивніші серед гумінових речовин є гумусові кислоти, до яких відносяться гумінові кислоти та фульвові кислоти. Саме солі цих кислот складають основу органічних добрив нового покоління.

ГР виконують в біосфері безліч функцій, з яких найважливіші наступні.

1. Акумулятивна функція. ГР здатні накопичувати енергію та хімічні елементи (вуглець, азот, кисень, фосфор, катіони металів, мікроелементи тощо). Віддаючи накопиченні елементи живим організмам вони здатні стимулювати та підтримувати повноцінне живлення. Не випадково темно-сірі та чорні за кольором ґрунти в народі завжди вважали родючими і називали, хоча і не завжди правильно, чорноземами. Забарвлення таким ґрунтам надають гумусові речовини [54, 57].

ГР віддають живим організмам необхідні їм елементи живлення поступово, у міру їх споживання, зберігаючи тим самим необхідний запас цих елементів для наступних поколінь. Цим вони істотно відрізняються від багатьох мінеральних сполук, які можуть постачати рослинам елементи живлення, але представлені, як правило, легкорозчинними речовинами, які швидко витрачаються або вимиваються з ґрунту. Водночас частина мінеральних елементів входить в кристалічну решітку алюмосилікатів, вони недоступні живим організмам і тільки після руйнування мінералів споживаються рослинами.

2. Транспортна функція. Вона полягає у формуванні геохімічних потоків мінеральних і органічних речовин, переважно у водних середовищах, шляхом утворення стійких, але порівняно легкорозчинних комплексних сполук гумусових кислот з катіонами металів або гідроксидами.

3. Регуляторна функція. Ця функція об'єднує безліч різних явищ і процесів і відноситься до ґрунтів, вод та інших природних тіл. У регуляторної функції ГР можна виділити кілька головних складових:

- формування ґрунтової структури й водно-фізичних властивостей ґрунтів;
- регулювання реакцій йонного обміну між твердими й рідкими фазами;
- вплив на кислотно-основні та окисно-відновні режими;
- регулювання умов харчування живих організмів шляхом зміни розчинності мінеральних компонентів;
- регулювання теплового режиму ґрунтів і атмосфери, включаючи прояви парникового ефекту.

4. Протекторна функція, яка полягає в здатності ГР зв'язувати в малорухливі або складнодисоціюючі з'єднання токсичні та радіоактивні елементи, а також сполуки, що негативно впливають на екологічну ситуацію в природі, в тому числі вони можуть інкорпорувати деякі пестициди, вуглеводні, феноли. Захисна функція гумінових речовин настільки велика, що багаті ними ґрунту можуть повністю запобігти надходженню в ґрунтові води йонів Плюмбуму та інших токсичних речовин.

5. Фізіологічна функція. Багатьма дослідниками встановлено, що різні ГР, особливо гумінові кислоти і їх солі, можуть стимулювати проростання насіння, активізувати дихання рослин, підвищувати продуктивність великої рогатої худоби, птиці. Більш того, було показано, що деякі препарати ГР стримують розвиток злоякісних пухлин, підвищують стійкість організмів до різного роду запальних процесів [58, 59].

Встановлено також, що гумати пов'язують присутні у воді шкідливі домішки (Ca, Fe, Al тощо) і таким чином можуть використовуватися для очищення води від забруднень і блокування їх надходження в рослину як з ґрунту, так і з атмосфери (кислотні дощі, атмосферні викиди тощо).

Детоксикаційна дія гуматів по відношенню до іонів ВМ пов'язано з наявністю в ГР широкого набору функціональних груп (карбокисильних гідрокисильних, карбонільних тощо), які відповідають за зв'язування іонів металів

з утворенням нерозчинних комплексів [60]. Зв'язування ГР з токсичними речовинами призводить до зниження їх концентрації в розчиненій формі, а отже і до зниження токсичності цих речовин по відношенню до різних організмів [61].

Активність ГР по відношенню до різних організмів вивчається протягом тривалого часу. За результатами багатьох досліджень можна зробити висновок, що різні живі організми позитивно реагують на присутність малих доз ГР в навколишньому середовищі, при високих концентраціях ГР проявляють бактерицидну дію по відношенню до живих організмів. Крім того ГР можуть виконувати і протекторну функцію, захищаючи живі організми від впливу різних токсикантів.

Взаємодіючи з живими організмами, гумінові речовини в малих кількостях впливають на їх ріст, пригнічуючи або стимулюючи його. Механізм подібної різноспрямованої дії не зрозумілий до сьогодні. З одного боку, гумінові речовини можуть виступати додатковим джерелом вуглецю та азоту для мікроорганізмів, а з іншого, як речовини, збагачені стабільними вільними радикалами, що запускають ланцюгові радикальні реакції, можуть призводити до окиснення органічного матеріалу, викликаючи пошкодження живих клітин.

В останні роки в Україні та за кордоном все більша увага приділяється дослідженням у сфері застосування та використання ГР на МО різних груп, оскільки до теперішнього часу недостатньо вивченою є дія фульвових та гумінових речовин на них. Дослідження Т. С. Петренко [62] щодо впливу гумінових та фульвових речовин на ріст та розмноження бактеріальної культури *B. subtilis* показали, що водний розчин гумінових кислот торфу «Гумінат», володіє стимулюючим ефектом на ріст культури *B. subtilis* на рідкому середовищі субстрату.

Проте недостатньо вивчено механізми стійкості МО до ВМ в присутності ГР, що спонукає нас до дослідження їхнього захисного ефекту.

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Методи культивування пігментосинтезувальних дріжджів

Об'єктом дослідження були каротиносинтезувальні дріжджі *Rhodotorula glutinis* Y-1333 та *Rhodotorula aurantiaca* Y-1193.

Тверде поживне середовище Сабуро готували на основі води з певним вмістом солей VM. Контролем слугувало поживне середовище Сабуро без солей. Після застигання середовища на нього суцільним газоном засівали 18-годинні колекційну культуру дріжджів роду *Rhodotorula* (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 добу культивування візуально проводили облік результатів.

Пігментосинтезувальну активність визначали візуально, порівнюючи дослідні зразки з контролем, за 5-тибальною системою: ріст – наявність росту культури (++++ – суцільний, +++ – добрий, ++ – помірний, + – слабкий, – – відсутній); пігментоутворення – наявність пігментації колоній (++++ – інтенсивне, +++ – добре, ++ – помірне, + – слабе, – – відсутнє, ± – наявність пігментних та безпігментних колоній).

2.2 Методи приготування витяжки гумату Натрію з торфу

Для приготування витяжки з торфу останній подрібнювали до розмірів приблизно 1 мм, просіювали через сито та фасували разом з NaOH в пакети з нетканного гігроскопічного матеріалу. На 1 кг торфу брали 50 г NaOH. Пакет щільно зав'язували. Для отримання маточного розчину пакет поміщали в ємність з водопровідною кип'яченою водою, яка була охолоджена до температури 70-80

градусів (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. Потім розливали отриману рідину у колби місткістю по 250 мл [63].

2.3 Метод оцінки різниці в інтенсивності кольору пігментів дріжджових клітин

Різницю в інтенсивності кольору контрольних та дослідних культур визначали наступним способом. Цифрову камеру закріплювали на штативі на висоті 25-30 см від об'єкта зйомки. Вмикали цифрову камеру в режимі «Макрозйомка», та робили декілька (5-7) знімків з інтервалом 30-40 с, щоб дати вийти пристрою із зарядним зв'язком (ПЗЗ) матриці фотокамери на стабільний режим роботи. Після цього встановлювали баланс цифрової фотокамери (ЦФК) за допомогою ручного методу. Для цього у режимі камери «Встановити баланс білого» робили знімок білого аркушу паперу. Це потрібно для подальшої вірної передачі кольору об'єктів зйомки цифровою камерою за даних умов освітлення. Фокусну відстань та час експозиції також встановлювали вручну і тому усі важливі показники зйомки (баланс білого, фокусна відстань, час експозиції) однакові для всіх об'єктів зйомки. Після проведення вищевказаних операцій здійснювали знімки колоній МО на поверхні живильного середовища у чашках Петрі. Знімки у форматі JPEG, кольоровий профіль: червоний, зелений, блакитний (RGB), розрядністю 8 біт, завантажували у комп'ютерну програму Adobe Photoshop. Зображення RGB переводили у кольорову модель CIE Lab (Меню «Зображення» → «Режим» → «Lab»). Для усунення незначного цифрового шуму в зображенні ми використовували фільтр «Розмивання за

Гаусом» з параметром «Радіус», що дорівнює 20 пікселям. Отримували параметри кожного з трьох каналів: L – яскравість; a – величина червоно-зеленої складової; b – величина жовто-синьої складової (Lab). Дані ми отримували у 10 довільних точках зображення колонії МО. Розраховували середній показник для кожного з каналів. Порівняння кольору здійснювали з використанням формули кольорової відмінності, яка дозволяє за показниками каналів кольорової моделі CIE (кольорова модель Міжнародної комісії з освітлення) Lab чисельно виразити відмінності між двома кольорами, та за різницею між кольорами ΔE_{ab} дослідного та контрольного зразків визначати в умовних одиницях інтенсивність пігментосинтезувальної активності МО. Розрахунки ΔE_{ab} проводили за допомогою електронної таблиці Excel. Таким чином, графічний редактор Adobe Photoshop дозволяє визначити відтінки для кожного первинного кольору і порівняти його у контрольних та дослідних зразках з використанням кольорової моделі CIE Lab [64].

Різницю в інтенсивності кольору розраховували між дослідними зразками та контролем без ГР.

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Вплив концентраційного ряду йонів Меркурію та Аргентуму на інтенсивність пігментоутворення дріжджів роду *Rhodotorula*

Результати дослідження показали, що пігментосинтезувальні дріжджі втрачали здатність до утворення пігментів із певних концентраційних рівнів йонів Меркурію та Аргентуму (див. табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Вплив Ag^+ на інтенсивність пігментоутворення дріжджів *Rhodotorula glutinis* Y-1333 та *Rh. aurantiaca* Y-1193 (3 доба культивування)

Концентрація Ag^+ , мг/дм ³	<i>Rh. glutinis</i> Y-1333		<i>Rh. aurantiaca</i> Y-1193	
	Ріст*	Пігмент**	Ріст	Пігмент
Контроль	++++	++++	++++	++++
25	++++	++++	+++	+
30	++++	+	+++	±
35	+++	±	++	–
40	++	±	+	–
45	+	–	+	–
50	–	–	+	–
55	–	–	–	–

Примітка тут та далі:

1. *Ріст: +++++ – суцільний, +++ – добрий, ++ – помірний, + – слабкий, – – відсутній;

2. **Пігментоутворення: +++++ – інтенсивне, +++ – добре, ++ – помірне, + – слабке, – – відсутнє, ± – наявність пігментних та безпігментних колоній.

У дріжджів *Rhodotorula glutinis* Y-1333 за концентрації йонів Аргентуму 25 мг/дм^3 спостерігався суцільний ріст та інтенсивне пігментоутворення колоній. За концентрації $30 \text{ мг/дм}^3 \text{ Ag}^+$ відмічався суцільний ріст слабо пігментованих колоній. Добрий ріст пігментованих та безпігментних колоній спостерігався за концентрації Ag^+ 35 мг/дм^3 . За концентрації $40 \text{ мг/дм}^3 \text{ AgNO}_3$ відмічався помірний ріст пігментованих та безпігментних колоній. Слабкий ріст безпігментних колоній спостерігався за концентрації $45 \text{ мг/дм}^3 \text{ Ag}^+$. Повна втрата росту та пігментоутворення колоній відмічалася за концентрації 50 мг/дм^3 йонів Аргентуму.

За концентрації $25 \text{ мг/дм}^3 \text{ Ag}^+$ спостерігався добрий ріст слабо пігментованих колоній *Rh. aurantiaca* Y-1193. Добрий ріст пігментованих та безпігментних колоній був відмічений за концентрації Ag^+ 30 мг/дм^3 . За концентрації йонів Аргентуму 35 мг/дм^3 спостерігався помірний ріст безпігментних колоній. За концентрацій $40\text{-}50 \text{ мг/дм}^3 \text{ AgNO}_3$ відмічався слабкий ріст безпігментних колоній. Повне блокування росту та пігментоутворення дріжджових клітин *Rh. aurantiaca* Y-1193 був відмічений за концентрації $55 \text{ мг/дм}^3 \text{ Ag}^+$. КІ між втратою пігментів та затримкою росту дорівнював 30%.

Отже, культура *Rh. aurantiaca* Y-1193 виявилася більш стійкою до йонів Аргентуму, ніж *Rh. glutinis* Y-1333 (втрата росту спостерігалась за концентрацій 55 та 50 мг/дм^3 , відповідно). Проте *Rh. aurantiaca* Y-1193 втрачала пігмент з більш низької концентрації, ніж *Rh. glutinis* Y-1333 (35 та 45 мг/дм^3 , відповідно).

Суцільний ріст та інтенсивне пігментоутворення дріжджових колоній *Rh. glutinis* Y-1333 спостерігався за концентрації Hg^{2+} 20 мг/дм^3 . За концентрації 25 мг/дм^3 йонів Меркурію відмічався добрий ріст помірно пігментованих колоній. Помірний ріст слабо пігментованих колоній спостерігався за концентрації $30 \text{ мг/дм}^3 \text{ HgSO}_4$. За концентрації 35 мг/дм^3 був відмічений слабкий ріст безпігментних колоній. Повна втрата росту та пігментоутворення спостерігалася за концентрації $40 \text{ мг/дм}^3 \text{ Hg}^{2+}$.

Таблиця 3.2 – Вплив Hg^{2+} на інтенсивність пігментоутворення дріжджів *Rh. glutinis* Y-1333 та *Rh. aurantiaca* Y-1193 (3 доба культивування)

Концентрація Hg^{2+} , мг/дм ³	<i>Rh. glutinis</i> Y-1333		<i>Rh. aurantiaca</i> Y-1193	
	Ріст*	Пігмент**	Ріст	Пігмент
Контроль	++++	++++	++++	++++
20	++++	++++	+++	+
25	+++	++	++	–
30	++	+	+	–
35	+	–	+	–
40	–	–	–	–

Примітка. Умовні позначення такі ж, як у табл.3.1.

У дріжджів *Rh. aurantiaca* Y-1193 за концентрації 20 мг/дм³ Hg^{2+} був відмічений добрий ріст слабо пігментованих колоній. За концентрації 25 мг/дм³ HgSO_4 спостерігався помірний ріст безпігментних колоній. Слабкий ріст безпігментних колоній відмічався за концентрацій 30-35 мг/дм³ йонів Меркурію. Концентрація 40 мг/дм³ Hg^{2+} інгібувала ріст та пігментоутворення колоній *Rh. aurantiaca* Y-1193. КІ між втратою пігментів та затримкою росту дорівнював 28,5%.

Отже, відносно росту культур йони Меркурію проявили однаковий вплив (втрата росту спостерігалась за концентрації 40 мг/дм³), відносно пігментоутворення більший вплив Hg^{2+} проявив на культуру *Rh. aurantiaca* Y-1193, ніж на *Rh. glutinis* Y-1333 (втрата пігменту спостерігалась за концентрацій 25 та 35 мг/дм³, відповідно).

3.2 Детоксикаційна дія гумату Натрію на дріжджові клітини в присутності йонів важких металів

Результати проведених досліджень впливу йонів Аргентуму та Меркурію на дріжджові клітини підтвердили детоксикаційну дію гумату Натрію. З підвищенням концентрацій Ag^+ пригнічувався ріст, пігментоутворення колоній та зростало значення різниці в інтенсивності кольору пігментів (dE) (див. табл. 3.3-3.5 та дод. А).

Таблиця 3.3 – Вплив Ag^+ на інтенсивність пігментоутворення *Rh. glutinis* Y-1333 в присутності ГР

Концентрація Ag^+ , мг/дм ³	без ГР		з ГР (1:9)	
	Р*	П**	Р	П
Контроль	++++	++++	++++	++++
25	++++	++++	++++	++++
30	++++	+	++++	++
35	+++	±	++++	+
40	++	±	+++	±
45	+	–	++	±
50	–	–	+	–
55	–	–	–	–

Примітка тут та далі: *Ріст: +++++ – суцільний, +++ – добрий, ++ – помірний, + – слабкий, – – відсутній; **Пігментоутворення: +++++ – інтенсивне, +++ – добре, ++ – помірне, + – слабе, – – відсутнє, ± – наявність пігментних та безпігментних колоній; ГР – гумінові речовини.

За концентрації $25 \text{ мг/дм}^3 \text{ Ag}^+$ у дослідних зразках як з ГР, так і без них, спостерігався суцільний ріст інтенсивно пігментованих колоній дріжджів *Rh. glutinis* Y-1333 (dE для зразків без/з ГР для даної концентрації складала 4,5 та 3,9 ум. од., відповідно). Суцільний ріст слабо пігментованих колоній відмічався за концентрації $30 \text{ мг/дм}^3 \text{ Ag}^+$ у зразках без ГР, у зразках з ГР спостерігався суцільний ріст помірно пігментованих колоній (dE для зразків без/з ГР для даної концентрації складала 9,7 та 36,7 ум. од., відповідно). Наявність пігментованих та безпігментних колоній у культурі *Rh. glutinis* Y-1333 у зразках без ГР спостерігалася за концентрацій $35\text{-}40 \text{ мг/дм}^3 \text{ AgNO}_3$, однак у зразках з ГР такий процес був відмічений за концентрацій $40\text{-}45 \text{ мг/дм}^3$. Повна втрата росту та пігментоутворення колоній у зразках без ГР спостерігалась за концентрації 50 мг/дм^3 Аргентуму нітрату, однак у зразках з ГР така дія була відмічена за концентрації $55 \text{ мг/дм}^3 \text{ Ag}^+$.

Таблиця 3.4 – Вплив Ag^+ на інтенсивність пігментоутворення *Rh. aurantiaca* Y-1193 в присутності ГР

Концентрація Ag^+ , мг/дм ³	без ГР		з ГР	
	Р*	П**	Р	П
Контроль	++++	++++	++++	++++
25	+++	+	++++	++
30	+++	±	+++	+
35	++	–	+++	±
40	+	–	++	±
45	+	–	+	–
50	+	–	+	–
55	–	–	+	–
60	–	–	–	–

Примітка. Умовні позначення такі ж, як у табл.3.3.

Добрий ріст слабо пігментованих колоній *Rh. aurantiaca* Y-1193 був відмічений за концентрації 25 мг/дм³ Ag⁺ без ГР, проте в присутності ГР за тієї ж концентрації йонів Аргентуму спостерігався суцільний ріст помірно пігментованих колоній. За концентрації 30 мг/дм³ AgNO₃ без ГР був відмічений добрий ріст пігментованих та безпігментних колоній, однак в зразках з ГР за тієї ж концентрації спостерігався добрий ріст слабо пігментованих колоній. За концентрації 35 мг/дм³ без ГР спостерігався помірний ріст безпігментних колоній, у зразках з ГР – добрий ріст пігментованих та безпігментних колоній. Повне блокування росту та пігментоутворення дріжджових клітин *Rh. aurantiaca* Y-1193 відбувалося у присутності в середовищі 55 мг/дм³ йонів Аргентуму без ГР, порівняно з ГР, де відмічався слабкий ріст дрібних та напівпрозорих колоній.

Таблиця 3.5 – Вплив Ag⁺ на інтенсивність пігментоутворення *Rh. glutinis* Y-1333 в присутності ГР

Концентрація Ag ⁺ , мг/дм ³	без ГР				з ГР			
	L	a	b	dE (ум. од.)	L	a	b	dE (ум. од.)
Контроль	66,2	24	31,6		64,5	23,8	31	
25	61	20,7	29	4,5 ± 0,04	62,4	18,1	30,2	3,9±0,34
30	55,8	17,7	25,1	9,7 ± 0,14	59,4	15,2	27,9	6,7±0,46
35	51,3	18	22,4	14,04 ± 0,02	55,1	17	26	9,08±0,12
40	48	7,9	25	19,6 ± 0,07	53	13,1	24,9	12,03±0,24
45	46,9	9,3	20,4	20 ± 0,96	50,2	11	26,3	15,3±0,39
50	–	–	–	–	47	9	21	18,77±0,14
55	–	–	–	–	–	–	–	–

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.

За концентрації 60 мг/дм³ Ag⁺ ріст та пігментоутворення колоній *Rh. aurantiaca* Y-1193 були відсутні як в контрольних зразках, так і в досліді. КІ між втратою пігментів та затримкою росту дорівнював 30% та 18% (для зразків без/з ГР, відповідно).

Гумінові речовини також проявляли детоксикаційну дію на каротиносинтезувальні дріжджі *Rh. glutinis* Y-1333 та *Rh. aurantiaca* Y-1193 в присутності іонів Меркурію. З підвищенням концентрацій Hg²⁺ пригнічувався ріст, пігментоутворення колоній та зростало значення різниці в інтенсивності кольору пігментів (dE) (див. табл. 3.6-3.8 та дод. Б1, Б2).

Таблиця 3.6 – Вплив Hg²⁺ на інтенсивність пігментоутворення *Rh. glutinis* Y-1333 в присутності ГР

Концентрація Hg ²⁺ , мг/дм ³	без ГР		з ГР (1:9)	
	Р*	П**	Р	П
Контроль	++++	++++	++++	++++
25	+++	++	++++	+++
30	++	+	+++	++
35	+	–	++	±
40	–	–	+	–
45	–	–	–	–

Примітка. Умовні позначення такі ж, як у табл.3.3.

За концентрації 25 мг/дм³ Hg²⁺ без ГР був відмічений добрий ріст помірно пігментованих колоній, а за тієї ж концентрації йонів Меркурію в присутності ГР спостерігався суцільний ріст добре пігментованих колоній *Rh. glutinis* Y-1333 (dE для зразків без/з ГР для даної концентрації складала 9,55 та 8,05 ум. од., відповідно). За концентрації 30 мг/дм³ Hg²⁺ без ГР був відмічений помірний ріст слабо пігментованих колоній, а за тієї ж концентрації йонів Меркурію в присутності ГР спостерігався добрий ріст помірно пігментованих колоній

Rh. glutinis Y-1333 (dE для зразків без/з ГР для даної концентрації складала 15,43 та 10,93 ум. од., відповідно).

Слабкий ріст безпігментних колоній відмічався за концентрації 35 мг/дм³ HgSO₄ у зразках без ГР, однак в подібній концентрації у зразках із ГР спостерігався помірний ріст пігментованих та безпігментних колоній (dE для зразків без/з ГР для даної концентрації складала 22,02 та 14,25 ум. од., відповідно). Концентрація 40 мг/дм³ Hg²⁺ без ГР інгібувала ріст та пігментоутворення, порівняно зі зразками з ГР, де відмічався слабкий ріст безпігментних колоній. За концентрації 45 мг/дм³ Hg²⁺ пігментоутворення та ріст *Rh. glutinis* Y-1333 були відсутні як в контрольних зразках, так і в досліді.

Таблиця 3.7 – Вплив Hg²⁺ на інтенсивність пігментоутворення *Rh. aurantiaca* Y-1193 в присутності ГР

Концентрація Hg ²⁺ , мг/дм ³	без ГР		з ГР (1:9)	
	Р*	П**	Р	П
Контроль	++++	++++	++++	++++
20	+++	+	++++	++
25	++	–	+++	±
30	+	–	++	–
35	+	–	+	–
40	–	–	+	–
45	–	–	–	–

Примітка. Умовні позначення такі ж, як у табл.3.3.

У дріжджів *Rh. aurantiaca* Y-1193 за концентрації 20 мг/дм³ Hg²⁺ без ГР спостерігався добрий ріст слабо пігментованих колоній, у зразку з ГР за тієї ж концентрації був відмічений суцільний ріст помірно пігментованих колоній. За концентрації 25 мг/дм³ HgSO₄ у зразках без ГР спостерігався помірний ріст безпігментних колоній, а у зразках з ГР – добрий ріст пігментованих та

безпигментних колоній. Концентрація 30 мг/дм³ йонів Меркурію спричинила помітне зниження росту та повне припинення пігментоутворення колоній у зразках без ГР, в порівнянні зі зразками з ГР, у яких спостерігався помірний ріст безпигментних колоній.

Повне блокування росту та пігментоутворення дріжджових клітин *Rh. aurantiaca* Y-1193 відбувалося у присутності в середовищі 40 мг/дм³ Hg²⁺ без ГР, порівняно з ГР, де відмічався слабкий ріст дрібних та напівпрозорих колоній. За концентрації 45 мг/дм³ HgSO₄ ріст та пігментоутворення колоній були відсутні як в контрольних зразках, так і в досліді. КІ між втратою пігментів та затримкою росту дорівнював 28,5% та 25% (для зразків без/з ГР, відповідно).

Таблиця 3.8 – Оцінка різниці в інтенсивності кольору пігментів *Rh. glutinis* Y-1333 в присутності ГР

Концентрація Hg ²⁺ , мг/дм ³	без ГР				з ГР			
	L	a	b	dE (ум. од.)	L	a	b	dE (ум. од.)
Контроль	67	22	32		67,1	20	35	
25	56,7	18	24	9,55 ± 0,07	58,1	19	29,3	8,05±0,16
30	50,4	15,1	25,2	15,43 ± 0,05	55	15,9	28	10,93±0,2
35	44,9	10,5	19	22,02±0,23	51,8	15	25	14,25±0,25
40	–	–	–	–	46,4	11,3	18,7	20,6±0,88
45	–	–	–	–	–	–	–	–

Примітка. Умовні позначення такі ж, як у табл.3.5.

Отже, гумінові речовини підтвердили детоксикаційну дію на життєздатність та пігментоутворення дріжджів *Rh. aurantiaca* Y-1193 та *Rh. glutinis* Y-1333 за впливу йонів Аргентуму та Меркурію.

4 ОХОРОНА ПРАЦІ ТА БЕЗПЕКА В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ

Знання, отримані з курсів «Охорона праці» я застосовувала при виконанні експериментальної частини моєї кваліфікаційної роботи, яка проводилась на кафедрі екології та охорони навколишнього середовища в лабораторії № 206. Матеріал для виконання експериментальної частини моєї кваліфікаційної роботи отримувала у лабораторії.

Перед початком роботи в умовах лабораторії я була проінструктована щодо правил безпеки: при користуванні електроприладами інструктаж № 153, при роботі з скляним посудом інструктаж № 154, та правилами пожежної безпеки. Крім того статистична обробка отриманих результатів вимагала роботи з комп'ютерною технікою, то питанням безпечного виконання зазначених робіт я присвятила даний розділ.

Умови праці в лабораторії. Техніка безпеки вимагала виконання операцій, що зводили до мінімуму ризик при виконанні експерименту. Безпека у лабораторії забезпечувалася відповідно до вимог ДСТ 12.3.002-75 та інших діючих нормативних актів [65].

Відповідність санітарно-гігієнічного режиму лабораторії встановленим нормам було запорукою моєї безпечної роботи. У робочій зоні лабораторії і дотримувалися визначені параметри температури (20-22°C), вологості (40-60%), освітлення, швидкість переміщення повітря та усе відповідало вимогам ДНАОП 0.03-3.15-86 [66].

У приміщенні не створювався застій повітря. Повітря робочої зони відповідало ДСТ 12.1.005-86 [67].

У лабораторії згідно СНіП 2.04.85-86 «Опалення, вентиляція, кондиціонування» і ДОСТ 12.04.021-75 «Системи вентиляційні. Загальні вимоги безпеки» були раціонально спроектовані механічно і правильно експлуатована природна вентиляційна система.

Перед початком роботи в лабораторії було створено оптимальні умови мікроклімату, згідно ДОСТ 12.1.005-88 «Загальні санітарно–гігієнічні вимоги до повітря робочої зони».

Важливе значення має створення нормальної освітленості робочого місця. Освітлення створювалося сонцем і за допомогою ламп накаливання або люмінесцентних ламп. Природне і штучне освітлення лабораторії відповідало вимогам СНП 11-4-79 [68].

З метою уникнення нещасних випадків, пов'язаних з ураженням електричним струмом у лабораторії користувалися обладнанням тільки заводського виготовлення. До експлуатації приборів приступала лише після ретельного ознайомлення з паспортом та інструкцією заводу – виготовлювача. Електропостачання приладів відбувалося від електричної мережі із глухо заземленою нейтраллю 380/220В. Заземлення електрообладнання було виконане відповідно до ДОСТу 12.1.019-79 «Електробезпека». Загальні вимоги й номенклатура видів захисту [69].

В ході виконання практичної роботи були використанні такі індивідуальні та комплексні засоби захисту як: марлеві пов'язки, прихвати, білий х/б халат.

Правила роботи та техніка безпеки в мікробіологічній лабораторії [70].

1) В лабораторію заборонялося входити у верхньому одязі та класти на столи сумки, портфелі та інші особисті речі.

2) В мікробіологічній лабораторії заборонялося працювати без халату, який захищає одяг від забруднення мікроорганізмами, а також перешкоджає їх поширенню за межі лабораторії.

3) За мною закріплювалось постійне робоче місце та мікроскоп. Робоче місце під час роботи було охайним.

4) На всіх пробірках та чашках обов'язково писали назву мікроорганізму, дата його висіву, П.І.Б. та номер групи.

5) Протягом роботи бактеріологічні петлі, голки знезаражувалися – прожарювались у полум'ї пальника. Використані шпателі, предметні та накривні

скельця, піпетки переносили у циліндри з дезінфікуючим розчином. Не клали згадані предмети на стіл.

6) В разі попадання матеріалу, що досліджується, або культури мікроорганізмів на руки, стіл, халат або взуття негайно попереджувала викладача і під його керівництвом (контролем) проводили дезінфекцію.

7) В лабораторії категорично не приймали їжу, тому що не допускаються зайві ходіння, різкі рухи, сторонні розмови, особливо під час висіву мікроорганізмів.

8) Після закінчення дослідження (заняття) робоче місце дезінфікувалося, матеріал та предмети, що використовувалися, здавали лаборанту та обов'язково мили руки з милом.

9) Результати досліджень заносилися у протокол, де записувалася тема заняття, задачі та коротке описання ходу роботи. При мікроскопічному дослідженні препаратів мікроорганізмів результати заносилися до протоколу у вигляді малюнка з повною назвою об'єкта на латинській мові, давалася його загальна характеристика. За результатами досліджень робили висновки.

Техніка безпеки при роботі зі скляним посудом та іншими виробами зі скла.

1) Під час проведення робіт зі скляним посудом та іншими виробами зі скла в лабораторії № 206 усі працюючі повинні були забезпечені засобами індивідуального захисту (халатами, гумовими рукавицями та фартухами) за нормами що передбачені положенням.

2) До миття посуду допускалися особи, які пройшли інструктаж з ТБ з записом у журнал «Охорони праці».

3) Для миття посуду відводилася частина приміщення, обладнаного для цього.

4) Використовували тільки спеціальний хімічний посуд.

5) Не використовували брудний посуд, або той, що має тріщини або відбиті краї.

6) Кінці скляних трубок і паличок, що застосовувались для розмішування розчинів та іншої мети, були оплавлені.

7) Марка скла посуду суворо відповідала характеру роботи, що виконувалася з нею.

8) Посуд з нетерmostійкого скла використовувався переважно для робіт, що не потребували нагрівання. Допускалося рівномірне, без різких температурних перепадів, нагрівання нетерmostійкого посуду приблизно до 100 °С. Не нагрівали нетерmostійкі стакани та колби на відкритому вогні або безпосередньо на електроплитці, а також різко не охолоджували нагрітий посуд.

9) Терmostійкий посуд використовували у більш жорстких температурних режимах, однак, проте мали на увазі, що різке нагрівання або охолодження з перепадом температур більше 150-200 °С може викликати розтріскування, особливо при неякісному його виготовленні.

10) Враховували терmostійкість посуду (тобто здатність матеріалу витримувати без пошкоджень різкі температурні перепади), при інших рівних умовах, обернено пропорційна товщині стінок.

11) Для змішування або розбавлення речовин, що супроводжуються виділенням теплоти, а також для нагрівання хімічних речовин слід використовували фарфоровий або тонкостінний скляний посуд [70].

12) Пробірки, круглодонні колби, фарфорові чашки нагрівали на відкритому вогні, плоскодонні колби й стакани нагрівали тільки на металевому розсікачі полум'я або з застосуванням азбестової сітки.

13) У робочому столі або шафі тримали тільки необхідний посуд, яким постійно користувалися. Посуд у столі тримався у порядку, дрібні деталі – у неглибоких коробках в один шар на ваті. При висуванні ящиків стола посуд не вдарявся один об один.

14) Посуд, призначений для зберігання реактивів, не використовувався для зберігання харчових продуктів.

Техніка безпеки при роботі з електричними приладами.

1) Щоб запобігти виникненню нещасних випадків, враження електричним струмом, пожеж тощо ми вивчили і виконували правила з техніки безпеки при роботі на електрообладнанні, правила виробничої санітарії й пожежної профілактики.

2) Відповідально ставилися до навчальної лабораторії загальної та прикладної екології та зоології та систематично слідкувати за справністю електричної апаратури, яка використовувалася в роботі. При виявленні пошкоджень негайно повідомляли відповідного фахівця та контролювали своєчасний її ремонт .

3) Не користувалися несправним електроустаткуванням.

4) Профілактичний огляд і ремонт електроустаткування (електроплити, муфельна піч, сушильна шафа і та ін.), яке використовувався в науково–дослідній роботі, робили тільки відповідні фахівці.

5) У лабораторії № 206 використовували електронагрівальні прилади закритого типу та інше електричне обладнання тільки заводського виготовлення. При експлуатації користувалися паспортом та інструкцією заводу–виготовлювача.

6) Після закінчення експерименту подача струму негайно припинялася.

7) Шафи з розподільними пристроями були замкнені на замок.

8) Усі прилади, в яких це передбачено, були заземлені [70].

Отже, дотримання правил техніки безпеки допомогло мені уникнути травмування під час виконання кваліфікаційної роботи.

ВИСНОВКИ

1. Результати дослідження показали, що пігментосинтезувальні дріжджі втрачали здатність до утворення пігментів із певних концентраційних рівнів йонів Меркурію та Аргентуму. Так, культура *Rh. aurantiaca* Y-1193 втрачала пігмент за концентрацій $35 \text{ мг/дм}^3 \text{ Ag}^+$ та $25 \text{ мг/дм}^3 \text{ Hg}^{2+}$, а культура *Rhodotorula glutinis* Y-1333 – за концентрацій $45 \text{ мг/дм}^3 \text{ Ag}^+$ та $35 \text{ мг/дм}^3 \text{ Hg}^{2+}$.

2. Результати проведених досліджень впливу йонів Аргентуму та Меркурію на дріжджові клітини у присутності гумінових речовин підтвердили детоксикаційну дію гумату Натрію. Так, у культурі *Rh. aurantiaca* Y-1193 повна втрата росту та пігментоутворення колоній в присутності йонів Аргентуму у зразках без ГР спостерігалася за концентрації 55 мг/дм^3 , а у зразках з ГР – за концентрації 60 мг/дм^3 . В присутності йонів Меркурію інгібування росту та пігментоутворення у зразках без ГР відмічалася за концентрації 40 мг/дм^3 , у зразках з ГР – за концентрації 45 мг/дм^3 .

У культури *Rhodotorula glutinis* Y-1333 повне блокування росту та пігментоутворення в присутності йонів Ag^+ у зразках без ГР спостерігалася за концентрації 50 мг/дм^3 , а у зразках з ГР – за концентрації 55 мг/дм^3 . В присутності йонів Меркурію повна втрата росту та пігментоутворення у зразках без ГР відмічалася за концентрації 40 мг/дм^3 , у зразках з ГР – за концентрації 45 мг/дм^3 .

3. З підвищенням концентрації йонів важких металів різниця в інтенсивності кольору пігментів між контролем та дослідними зразками зростала. Так, dE для концентрацій 25 та 30 мг/дм^3 йонів Аргентуму без гумінових речовин дорівнювала 4,5 та 9,7 ум. од., відповідно, та у зразках з гуміновими речовинами – 3,9 та 6,7 ум. од., відповідно.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Дана кваліфікаційна робота має велике практичне значення. Воно полягає в тому, що проведені дослідження дозволять оцінити ступінь забруднення стічних вод за дії Аргентуму та Меркурію. Дріжджі можуть бути іммобілізовані на штучні носії та розміщені у стічних водах, що дозволить проводити миттєву індикацію стану забруднення води.

2. Результати дослідження можуть бути використані для зниження токсичного впливу важких металів з подальшим застосуванням виявлених закономірностей в заходах по ремедіації.

3. Результати проведених в кваліфікаційній роботі досліджень можна включати в лекційний матеріал та лабораторні роботи таких дисциплін як, «Біоіндикація та біотестування» та «Біологічні методи очистки стічних вод». Вони поширять уявлення про використання дріжджів з точки зору сигналізаторів забруднень та використання гумінових речовин в якості детоксиканта важких металів.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Жовинский Э.Я., Кураева И.В. Геохимия тяжелых металлов в почвах Украины. Київ : Наукова думка, 2002. 213 с.
2. Ullrich S.M., Tanton T.W., Abdrashitova S.A. Mercury in the Aquatic Environment: A Review of Factors Affecting Methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2001. Vol. 31, № 3. P. 241–293.
3. Блажитко Е.М., Бурмистров В.А., Колесников А.П., Михайлов Ю.И. Серебро в медицине. Новосибирск : Наука-Центр, 2004. 254 с
4. Оказова З.П., Автаева Т.А. Использование микроорганизмов в качестве биоиндикаторов загрязнения окружающей среды. *Современные проблемы науки и образования*. 2015. №5. С.5–21.
5. Орлов Д.С. Свойства и функции гуминовых веществ. Гуминовые вещества в биосфере. Москва : Наука, 1993. 238 с.
6. Bass D., Howe A., Brown N., Barton H. Yeast forms dominate fungal diversity in the deep oceans. *Proc Biol Sci*. 2007. Vol. 274. P. 3069–3077.
7. Walker K, Skelton H, Smith K. Cutaneous lesions showing giant yeast forms of *Blastomyces dermatitidis*. *Journal of Cutaneous Pathology*. 2002. Vol. 29. P. 616–618.
8. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. Москва : Мир, 2004. 239 с.
9. Шеховцева Т.Н. Биологические методы анализа. *Соровский образовательный журнал*. 2000. Т. 6. № 11. С. 17–21.
10. Квасников Е.И., Васкивнюк В.Т., Суденко В.И. Каротинсинтезирующие дрожжи. Киев : Наукова думка, 1980. 171 с.
11. Чернов И.Ю. Дрожжи в природе. Москва : КМК, 2013. 332 с.
12. Крупей К. С., Рыльский А. Ф. Дрожжи рода *Rhodotorula* – биоиндикаторы загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами. *Биоразнообразие и рациональное использование природных ресурсов* : материалы

II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, 21 июня 2014 г. : тезисы док. Махачкала : АЛЕФ (ИП Овчинников М.А.), 2014. С. 167–169.

13. Феофилова Е.П. Пигменты микроорганизмов. Москва : Наука, 1974. С. 143.

14. Joshi V K. Microbial Pigments. *Indian J. of Biotechnol.* 2003. Vol. 2. P. 362–369.

15. Смирнов В.В., Киприанов Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев : Наукова думка, 1990. 262 с.

16. Кирица Е. Направленный синтез каротиноидов у дрожжей и перспектива их использования: дисс. ... доктора биологии : 03.00.23. Кишинев, 2005. 129 с.

17. Никитюк В. Г. Каротиноиды и их значение в живой природе и для человека. *Провизор*. Харьков, 1999. № 6. 18 с.

18. Жовинский Э.Я., Кураева И.В. Геохимия тяжелых металлов в почвах Украины. Киев : Наукова думка, 2002. 213 с.

19. Беспамятнов Г.П., Кротов Ю.А. Гранично допустимі концентрації хімічних речовин у навколишньому середовищі. *Довідник*. Л. : «Хімія», 1985. 528 с.

20. Никитина Л.П., Никифорова Е.И. Химия, окружающая среда и здоровье: учебное пособие. Чита : ЧИПКРО, 2006. 160 с.

21. Авакян З. А. Сравнительная токсичность тяжелых металлов для некоторых микроорганизмов. *Микробиология*. 1967. Т. 36. С. 5–46.

22. Bruins M.R., Kapil S., Oehme F.W. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2000. Vol. 45. № 2. P. 198 – 207.

23. Авакян З. А. Токсичность тяжелых металлов для микроорганизмов. *Микробиология*. 1973. Т. 2. С. 7–43.

24. Шинетова Л.Е. Бекеева С.А. Современные представления о влиянии различных форм ртути на организм. *Вестник КазНМУ*. 2017. №1. С. 370–375.

25. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for mercury. In *Department of Health and Human Services*. 1999. P. 182.
26. Swain E. B., Jakus P.M., Rice G. Socioeconomic consequences of mercury use and pollution. *Ambio*. 2007. Vol. 36. № 1. P. 45–61.
27. Янин Е.П. Ртуть в окружающей среде промышленного города. Москва : ИМГРЭ, 1992. 169 с.
28. Pai Prasad, Heisler Dteven, Joshi Aruna. An emissions inventory for regional atmospheric modeling of mercury. *Water, Air, and Soil Pollut.* 1998. Vol. 101. №1-4. С.289–308.
29. Савченко М.Ф., Рукавишников В.С., Ефимова Н.В. Ртуть в кружающей среде и ее влияние на здоровье населения. *Сибирский медицинский журнал*. 2010. № 8. С. 9–11.
30. Трахтенберг И.М Коршун М.Н. Ртуть и её соединения в окружающей среде. Киев: Высшая школа, 1990. 232 с.
31. Лапердина Т. Г. Определение ртути в природных водах. Новосибирск: Наука, 2000. 222 с.
32. Филатов Б.Н., Чарова Т.А. Особенности диагностики и экспертизы поражений ртутью. *Загрязнение ртутью окружающей среды: эмиссия в атмосферу, восстановление территорий и влияние на здоровье: материалы международного семинара, г. Астана, 28 мая-1 июня. 2007 г. Астана, 2007. С. 43–44.*
33. Лопатин В. В. Ртуть и здоровье. *Молодой ученый*. 2016. №9. С. 393–396.
34. Nahne H. C., Kroontje H. W. Significance of pH and chloride concentration on behavior of heavy metal pollutants: mercury (II), cadmium (II), zinc (II), and lead (II). *J. Environ. Qual.* 1973. Vol. 2. P. 444–450.
35. Aiking H., Govers H., J. van't Riet. Detoxification of mercury, cadmium and lead in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985. Vol. 50. P. 1262–1267.

36. Кульский Л.А. Серебряная вода. *Химия и жизнь*. 1972. №1. С. 49–52.
37. Кулик М.Ф., Засуха Т.В., Луцюк М.Б. Сапоніт і аеросил у тваринництві та медицині. Вінниця : ФОП Рогальська І.О., 2012. 362 с.
38. Кульский Л. А. Серебряная вода. Пятое дополненное и переработанное издание. Киев: Наукова думка, 1968. 99 с.
39. Ji G., Silver S. Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. *J. Indust. Microbiol.* 1995. Vol. 14. P. 61–75.
40. Feng Q. L, Wu J., Chen G. Q. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *E. coli* and *S. aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000. Vol. 52. P. 662–668.
41. Kim J. S. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2007. №5. P. 95–101.
42. Большая советская энциклопедия / редкол.: А.М. Прохоров и др. Москва : Изд-во «Советская энциклопедия», 1976. Т. 23. С. 297-299.
43. Ашихмина Т.Я., Алалыкина Н.М., Кантор Г. Я. Биоиндикация и биотестирование методы познания экологического состояния окружающей среды. Киров : ВГГУ, 2005. 52 с.
44. Мелехова О.П., Егорова Е.И. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. Москва : Изд. центр «Академия», 2007. 288 с.
45. Bruins M. R., Kapil S., Oehme F. W. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2000. № 2. P. 198–207.
46. Franke S., Grass G., Nies D. H. The product of the *ybdE* gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiology*. 2001. № 4. P. 965–972
47. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. A. Gupta et al. *Nat. Med.* 1999. № 2. P. 183–188.
48. Pinto E. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* 2003. № 6. P. 1008–1018.

49. Подгорский В. С., Касаткина Т. П., Лозовая О. Г. Дрожжи – биосорбенты тяжелых металлов. *Мікробіологічний журнал*. 2004. Т. 66, № 1. С. 91-103.
50. Шуберт Р. Биоиндикация загрязнений наземных экосистем. Москва : Мир, 1988. 348 с.
51. Клименко М. О., Прищепя А. М., Вознюк Н. М. Моніторинг довкілля. Київ : Академія, 2006. 360 с.
52. Кондакова Г.В. Биоиндикация. Микробиологические показатели: учеб.пособие. Ярославль: Яросл. гос. ун-т., 2007. 136 с.
53. Орлов Д.С. Химия почв. Москва: Изд-во МГУ, 1992. 259 с.
54. Орлов Д. С. Гуминовые вещества в биосфере. Москва : Наука. 1993. 238 с.
55. Белькевич П.И., Чистова Л.Р. Торф и проблема защиты окружающей среды. Минск : .Наука и техника., 1979, 64 с.
56. Аронов С.Г. Гуминовые кислоты. Химическая энциклопедия. М. : Советская энциклопедия, т. 1, с. 618, 1988.
57. Орлов Д. С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. Москва : Изд-во МГУ, 1990. 325 с.
58. Грядских Д. А., Брыкалов А. В. Экспериментальное исследование действия гуминсодержащего агрохимиката на рост и развитие растений. *Развитие науки и техники: механизмы выбора и реализации приоритетов*: сборник статей Международной научно-практической конференции (25 декабря 2017 г., г. Омск). АЭТЕРНА, 2017. С. 37-38
59. Тейт Р. Ш. Органическое вещество почвы. Москва : Мир, 1991. 237 с.
60. Kaschl A., Chen Y. Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice. *Nato Science Series*. 2005. Vol. 52. P. 83–115.
61. Suffet I.H., MacCarthy P. Aquatic humic substances: Influence on fate and treatment of pollutants. *Environmental Progress*. 1989. Vol. 8. № 4.
62. Петренко Т. Вплив гумінових та фульвових речовин на бактеріальну біоту. *Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих, медичних та*

фармацевтичних наук: IV Регіональна науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих учених Запоріжжя, 2015. С. 252-254.

63. Способ получения гумата Натрия: пат. 2150484 Россия: С10F7/00. № 99108141/13; заявл. 21.04.1999; опубл. 10.06.2000, 2000 г.

64. Спосіб визначення інтенсивності пігментоутворення у бактерій: пат. 49812 Україна: МПК (2009), С12Q 1/00, С12М 1/00, С12М 1/34. № u200912311; заявл. 30.11.09; опубл. 11.05.10, Бюл. № 9. 10 с.

65. Кучерявий В. О. Охорона праці. Львів: Ороїяна-Нова, 2007. 368 с.

66. Керб Л. П. Основи охорони праці. Київ : КНЕУ, 2006. 216 с.

67. Кодекс законів про працю України: за станом на 22 квіт. 2008 р. Київ : Парлам. вид-во, 2008 р. 75 с.

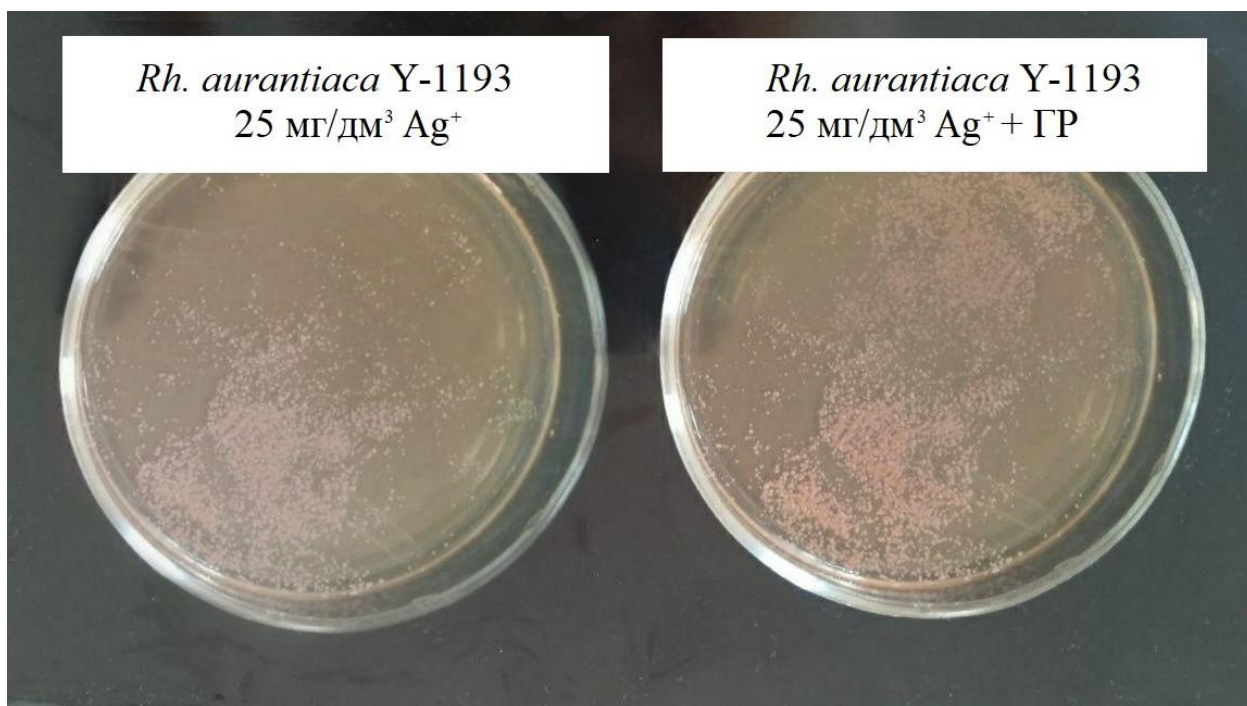
68. ДСТУ 2293-99. Охорона праці. Терміни та визначення основних понять. К. : Держстандарт України, 1999. 22 с. (Національний стандарт України).

69. Кузнєцов В. А. Пожежна безпека. Харків : Фактор, 2008. 575 с.

70. Ткачук К.Н., Халімовський М.О., Зацарний В.В. Охорона праці та промислова безпека: навчальний посібник. Київ : Основа, 2006. 448 с.

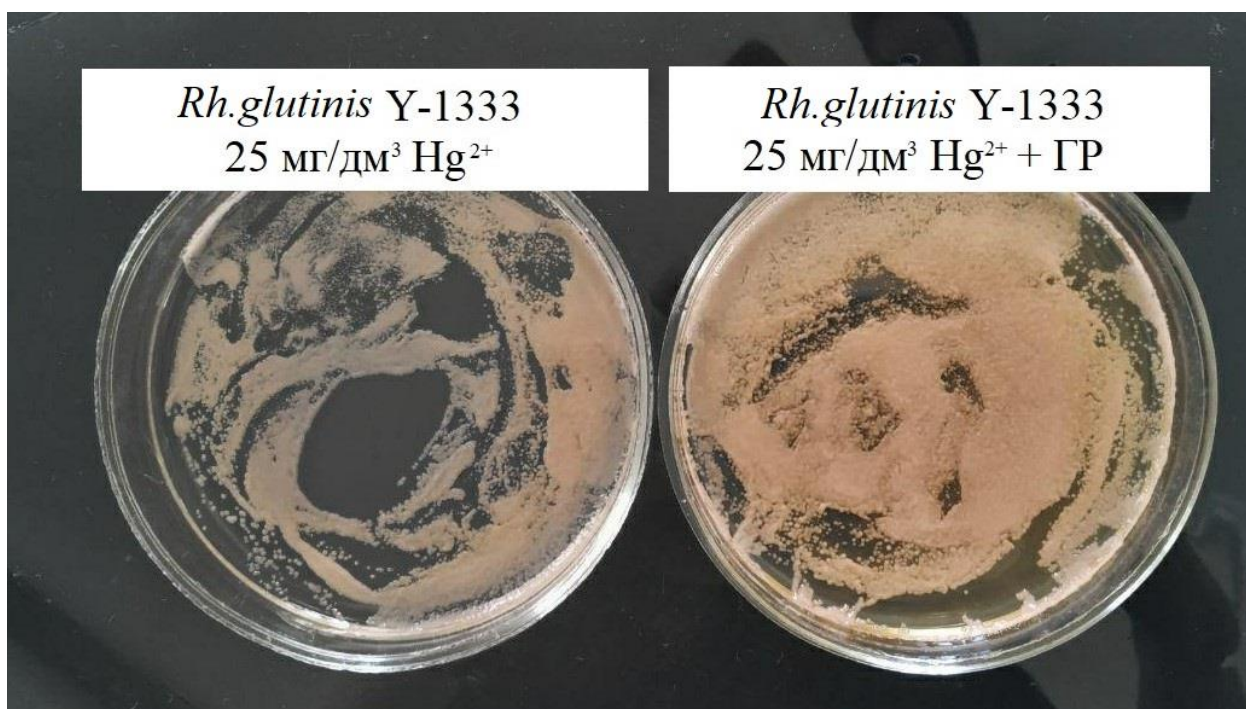
ДОДАТКИ
ДОДАТОК А

Вплив Ag^+ на інтенсивність пігментоутворення *Rh. aurantiaca* Y-1193 в
присутності ГР



ДОДАТОК Б1

Вплив Hg^{2+} на інтенсивність пігментоутворення *Rh. glutinis* Y-1333 в присутності ГР



ДОДАТОК Б2

Вплив Hg^{2+} на інтенсивність пігментоутворення *Rh. aurantiaca* Y-1193 в присутності ГР

