

## МЕТОДИ ОЦІНКИ ІНТЕНСИВНОСТІ ПІГМЕНТОУТВОРЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ ТА ЇХ ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Крупей К. С.

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

krupeygnu@gmail.com

Наведено спробу оцінити інтенсивність пігментоутворення мікроорганізмів, які зазнали впливу важких металів, в онлайн-програмі «ColorHexa». Проведено порівняльний аналіз методів визначення інтенсивності пігментоутворення бактерій та дріжджів. Розроблено простий спосіб ідентифікації пігментосинтезуючих мікроорганізмів у природних біотопах. Показано, що навіть серед однієї систематичної групи мікроорганізмів зустрічаються штами, які продукують різний якісний склад пігментів, внаслідок чого різниця в інтенсивності контрольного кольору та дослідного зразка (dE) між ними сильно відрізняється. Так, для дріжджів *Sporobolomyces roseus* Y-1443 dE становила 33,93 ум. од., а для штаму *Sp. roseus* Y-1444 dE була на 10 одиниць більшою (43,55 ум. од.).

*Ключові слова:* мікроорганізми, ідентифікація, пігменти, комп'ютерні програми.

Krupey K. S. METHODS OF ESTIMATION OF INTENSITIVITY OF PIGMENT FORMATION OF MICROORGANISMS AND THEIR IDENTIFICATION / Zaporizhzhya National University; 69900, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky str. 66.

Previous studies on pigmentation bacteria and yeast have shown that they can be used for bioindication of compounds of heavy metals (HM) in the environment. The intensity of the color of pigments allows us to make a visual assessment of the influence of environmental factors on the cells of microorganisms. For the quantitative expression of the difference in the intensity of the color of the pigments between the control and experimental samples of microorganisms using computer software AdobePhotoshop and CIEDE2000. In this paper, an attempt was made to evaluate the intensity of pigmentation of microorganisms by other methods and to develop a method for the identification of pigmented forms of microflora. Therefore, the purpose of our research was to create a table-determinant of pigment-synthesizing microorganisms using known computer programs.

For the compilation of a table-determinant of microorganisms, a digital image of samples of microorganisms culture was performed. The digital image was transferred to the computer in the AdobePhotoshop program, and they determined the colors of the colonies of microorganisms. Then, using the CIE Lab program packages, the color model values were calculated: the colors of the test samples of microorganisms compared with the control color (violet), with the values of the color model  $L = 16$ ,  $a = 37$ ,  $b = -18$  were compared. It is the comparison with this color of orange and red hues that provides the greatest difference in the intensity of color between colonies of microorganisms. For example, a very slight difference in the color intensity between the studied cultures was observed for the black ( $L = 0$ ,  $a = 0$ ,  $b = 0$ ), white ( $L = 99$ ,  $a = 0$ ,  $b = 0$ ) and green ( $L = 31$ ,  $a = -33$ ,  $b = 22$ ) colors. After that, the index of investigated microorganisms was compared with the indicators of earlier identified species, the species composition of pigment-synthesizing microorganisms was identified by this indicator.

The basis of our patent was the task of developing a method for identifying pigment-synthesizing microorganisms, by growing microorganisms on the nutrient medium, detecting the shades of their color in a digital form, determining the difference in the color intensity of the colonies compared with the standard, comparing the data obtained with the data of already identified microorganisms will increase the speed and visibility of the method, simplify the process of identification of microorganisms. Also, this method will provide the opportunity to perform other stages of identification of the species belonging to microorganisms, and to create an appropriate database of pigment-synthesizing microorganisms according to these indicators.

In developing the method, we drew attention to the known method of determining the intensity of pigmentation in bacteria, which, however, does not allow to identify the species composition of microorganisms.

Even among one systematic group of microorganisms there are strains that produce different qualitative composition of pigments, as a result of which dE is very different between them. So, for spores *Sporobolomyces roseus* Y-1443 dE was 33,93 and for strain *Sp. roseus* Y-1444 dE was 10 units bigger (43,55).

*Key words:* microorganisms, identification, pigments, computer programs.

## ВСТУП

Проведені попередні дослідження на пігментосинтезувальних бактеріях і дріжджах показали, що їх можна використовувати для біоіндикації сполук важких металів (ВМ) у довкіллі [1, 2]. Інтенсивність кольорів пігментів дозволяє проводити візуальну оцінку впливу факторів середовища на клітини мікроорганізмів. Для кількісного вираження різниці в інтенсивності кольорів пігментів між контрольними та дослідними зразками мікроорганізмів використовують комп'ютерні програми AdobePhotoshop і CIEDE2000 [3]. У роботі здійснено спробу оцінити інтенсивність пігментоутворення мікроорганізмів іншими методами та розробити спосіб ідентифікації пігментованих форм мікрофлори, тому метою наших досліджень є створення таблиці-визначника пігментосинтезувальних мікроорганізмів із використанням відомих комп'ютерних програм.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для інкубування пігментосинтезувальних мікроорганізмів використовували тверді поживні середовища Сабуро та м'ясо-пептонний агар (МПА), на які суцільним газоном засівали дослідні зразки дріжджів та бактерій, відповідно. Інкубування проводили за температури 28-30 °С протягом трьох діб. Усі досліди здійснювали в п'ятикратній повторності.

Визначення кольорів пігментів дріжджових клітин, які зазнали впливу металів, проводили в онлайн-програмі «ColorHexa» (табл. 1). Перш ніж почати вказувати кольори в HTML (від англ. HyperText Markup Language – «мова гіпертекстової розмітки») за допомогою шістнадцятиричної системи числення, спершу визначали значення палітри RGB (скорочення від слів Red Green Blue – Червоний Зелений Синій). Шістнадцятиричне представлення RGB – це колір у форматі HEX.

Для визначення шістнадцятиричного цифрового коду прийнятий такий синтаксис: на початку коду ставили символ «#», потім вводили шестизначний набір символів у шістнадцятиричній системі числення. Перша пара символів відповідала за червоний колір, друга – за зелений, третя – за синій, тобто це та сама RGB-палітра, тільки в іншому позначенні [4, 5].

Проте для ідентифікації пігментованих форм мікрофлори користувалися способом, який дозволяє кількісним шляхом виразити різницю кольору між контролем та дослідними зразками мікроорганізмів (рис. 1) [3].

Для складання таблиці-визначника мікроорганізмів здійснювали цифрове зображення зразків культур мікроорганізмів (рис. 2 А-Г), при рівні освітлення 83 лк, з відстані 30 см від об'єкта зйомки без спалаху цифрового фотоапарата.

Цифрове зображення передавали на комп'ютер у програму AdobePhotoshop, та визначали відтінки кольору колоній мікроорганізмів. Далі, за допомогою пакета програм CIE Lab, розраховували показники кольорової моделі: порівнювали відтінки кольору дослідних зразків мікроорганізмів відносно контрольного кольору (фіолетового (рис. 2 Д), зі значеннями кольорової моделі  $L=16$ ,  $a=37$ ,  $b=-18$ ). Шляхом порівняння показників досліджуваних мікроорганізмів з показниками раніш ідентифікованих видів, наведених в табл. 2, можна ідентифікувати видовий склад пігментосинтезувальних мікроорганізмів.

Статистичну обробку проводили за допомогою комп'ютерних програм «Microsoft Office Excel 2007» і «Statistica 10».

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**  
**ОЦІНКА ІНТЕНСИВНОСТІ ПІГМЕНТОУТВОРЕННЯ ДРІЖДЖІВ**  
**ЗА ДОПОМОГОЮ КОМП'ЮТЕРНИХ ПРОГРАМ**

Програмісти та дизайнери для позначення кольорів використовують в основному шістнадцятирічну систему числення (представлення двійкового коду десятковими символами та буквами, які необхідні розробникам програм для скороченого запису двійкового коду). За допомогою цієї системи числення можна визначити шістнадцятирічні коди 16 млн кольорів, проте недоліком є, по-перше, те, що не для всіх кольорів є опис, тобто назва кольору або відтінку. По-друге, декілька відтінків кольорів можуть об'єднуватися в загальний опис (хоча візуально вони відрізняються). У таблиці 1 наведено спробу визначення кольорів пігментів дріжджових клітин, які зазнали впливу металів, за допомогою шістнадцятирічної системи числення (в онлайн-програмі «ColorHexa»).

Таблиця 1 – Значення шістнадцятирічного цифрового коду кольорів пігментів контрольних і дослідних культур дріжджів

Концентрація Cd <sup>2+</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	Шістнадцятирічний код кольору пігментів	Опис кольору	Концентрація Zn <sup>2+</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	Шістнадцятирічний код кольору пігментів	Опис кольору
<i>Rh. aurantiaca</i> Y-1195			<i>Rh. glutinis</i> Y-1333		
Контроль (без металу)	#d4a592	Slightly desaturated orange <sup>1</sup>	Контроль (без металу)	#c87950	Moderate orange <sup>4</sup>
10	#d4ab8b	Slightly desaturated orange <sup>1</sup>	20	#c39379	Slightly desaturated orange <sup>1</sup>
50	#a3856d	Mostly desaturated dark orange <sup>2</sup>	70	#ab998b	Dark grayish orange <sup>3</sup>
100	#95856c	Mostly desaturated dark orange <sup>2</sup>	100	#979088	Dark grayish orange <sup>3</sup>
200	#a09c93	Dark grayish orange <sup>3</sup>	150	#ada8a2	Dark grayish orange <sup>3</sup>

Примітки: <sup>1</sup> дещо ненасичений помаранчевий; <sup>2</sup> здебільшого ненасичений темний помаранчевий; <sup>3</sup> темний сіруватий помаранчевий; <sup>4</sup> помірно помаранчевий.

Перед тим, як вводити значення шістнадцятирічного коду в «ColorHexa», в програму Adobe Photoshop завантажували фотографії та визначали показники RGB. У контролі та досліді (10 мг/дм<sup>3</sup> Cd<sup>2+</sup>) у культури *Rh. aurantiaca* Y-1195 система визначила кольори як «дещо ненасичені помаранчеві». У дослідних зразках із концентраціями 50 і 100 мг/дм<sup>3</sup> Cd<sup>2+</sup> колір називався «здебільшого ненасичений темний помаранчевий», хоча візуально зразки дуже відрізнялися в обох випадках.

Те саме відмічено для дріжджів *Rh. glutinis* Y-1333. За концентрацій 70–150 мг/дм<sup>3</sup> Zn<sup>2+</sup> у культури колір пігментів визначений як «темний сіруватий помаранчевий».

Отже, ця система не є об'єктивною для оцінки кольору пігментів, тому ми звернули увагу на відомий спосіб визначення різниці в інтенсивності кольору пігментів (dE) мікроорганізмів між контролем та дослідом [3].

Отримане чисельне значення dE найбільш точно демонструє різницю кольорів пігментів та дозволяє об'єктивно оцінити вплив металів на інтенсивність кольору пігментів мікроорганізмів (рис. 1).

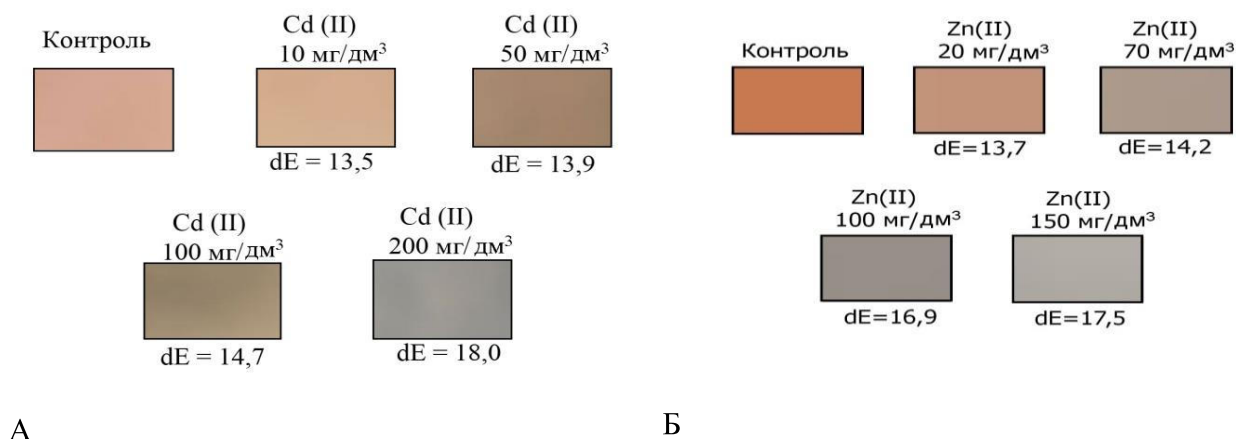


Рис. 1. Значення різниці в інтенсивності кольору пігментів dE на концентраційний ряд металів у дріжджів *Rh. aurantiaca* Y-1195 (A) та *Rh. glutinis* Y-1333 (B)

Результати розрахунку dE показали, що чим більшою є різниця в інтенсивності кольорів контрольних та дослідних культур, тим більше значення dE.

Так, за концентрації 10 мг/дм³ Cd<sup>2+</sup> у культури *Rh. aurantiaca* Y-1195 зафіксовано помірне пігментоутворення колоній при візуальній оцінці (++) , значення dE дорівнювало 13,5 ум. од.

За концентрації 200 мг/дм³ іонів Кадмію колонії були без пігментів (-), тому dE складала 18,0 ум. од. Таку саму закономірність прослідкували в досліді із дріжджами *Rh. glutinis* Y-1333 в присутності іонів Цинку.

За концентрації 20 мг/дм³ іонів Цинку пігментоутворення колоній характеризувалося як помірне (++) , dE складала 13,7 ум. од., за 150 мг/дм³ Zn<sup>2+</sup> зустрічалися пігментні та безпігментні колонії (±), тому значення dE було більшим (17,5 ум. од.).

Отже, за допомогою такого способу надається можливість кількісно виразити відмінності в інтенсивності кольору пігментів, який, однак, не дозволяє ідентифікувати видовий склад мікроорганізмів. Проте при розробці методу ідентифікації пігментованих форм мікроорганізмів ми звернули увагу на деякі аспекти його методології.

### МЕТОД ІДЕНТИФІКАЦІЇ ПІГМЕНТОСИНТЕЗУВАЛЬНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Розроблений метод відноситься до мікробіології, екології, харчової промисловості та може бути використаний для швидкої ідентифікації пігментосинтезуювальних мікроорганізмів.

Існує багато способів ідентифікації мікроорганізмів, заснованих на визначенні їхньої хімічної будови, спектральних та хроматографічних властивостей.

Відомий спосіб ідентифікації мікроорганізмів [6], який включає відбір та підготовку проб; вирощування мікроорганізмів на поживному середовищі; газово-хромато-мас-спектрометричний або газово-хроматографічний аналіз біомаси на вміст компонентів мікробних клітин: жирних кислот, оксикислот, альдегідів та інших хімічних компонентів мікробних клітин; введення отриманих даних в комп'ютер для розрахунку, де простежується закономірність і повторюваність хімічного складу певного виду мікроорганізмів і адитивність профілів окремих мікроорганізмів в їх сумарній біомасі; порівняння отриманих даних з базами даних, які попередньо створені; виявлення маркерів мікроорганізмів та ідентифікація видового складу мікроорганізмів.

Однак недоліком цього способу є потреба у висококваліфікованому персоналі, використання спеціального високовартісного обладнання, складність та тривалість способу. Крім того, спосіб має недостатню наочність ідентифікації видового складу мікроорганізмів.

Найбільш близьким до нашого методу є спосіб ідентифікації мікроорганізмів [7], який включає відбір проб; приготування поживних середовищ; засівання проб; інкубування; мікроколориметричне дослідження кривих росту бактерій; цифрову обробку мікроколориметричних кривих росту бактерій; порівняння отриманих даних із даними вже ідентифікованих видів та ідентифікацію видового складу мікроорганізмів. Проте цей спосіб потребує застосування вартісного спеціалізованого обладнання, значно трудомісткий та тривалий у використанні.

В основу нашого методу поставлено завдання розробити спосіб ідентифікації пігментосинтезувальних мікроорганізмів, який шляхом вирощування мікроорганізмів на поживному середовищі, виявлення відтінків їх кольору у цифровому вигляді, визначення різниці інтенсивності кольору колоній у порівнянні з еталонном, співставлення отриманих даних з даними вже ідентифікованих мікроорганізмів дозволить підвищити експресність та наочність способу, спростити процес ідентифікації мікроорганізмів; також цей спосіб надасть можливість виконувати інші етапи ідентифікації видової приналежності мікроорганізмів, і створювати за цими показниками відповідну базу даних пігментосинтезувальних мікроорганізмів [8].

Контрольним кольором обраний фіолетовий із показниками кольорової моделі  $L=16$ ,  $a=37$ ,  $b=-18$ . Саме порівняння з цим кольором помаранчевих і червоних відтінків надає найбільшу різницю інтенсивності кольору між колоніями мікроорганізмів. Наприклад, відносно чорного ( $L=0$ ,  $a=0$ ,  $b=0$ ), білого ( $L=99$ ,  $a=0$ ,  $b=0$ ) та зеленого ( $L=31$ ,  $a=-33$ ,  $b=22$ ) кольорів спостерігалася незначна відмінність у різниці інтенсивності кольору між досліджуваними культурами.

Після цього оцінювали різницю в інтенсивності кольору колоній мікроорганізмів відносно контрольного кольору (рис. 2 Д). Отримані значення наведені в табл. 2.

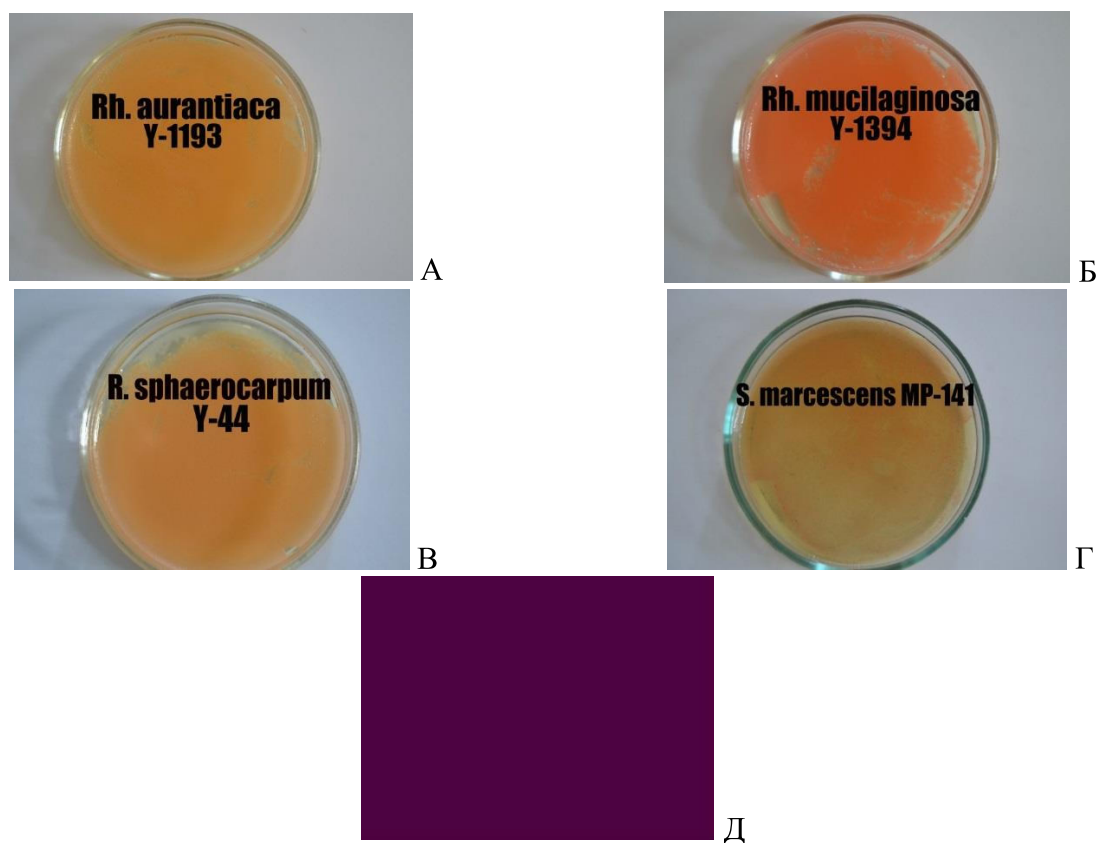


Рис. 2. Колекційні культури дріжджів (А-В) та бактерій (Г) після триденного інкубування; контрольний фіолетовий колір, зі значеннями кольорової моделі  $L=16$ ,  $a=37$ ,  $b=-18$  (Д)

Навіть серед однієї систематичної групи мікроорганізмів зустрічаються штами, які продукують різний якісний склад пігментів, внаслідок чого dE між ними дуже відрізняється. Так, для дріжджів *Sporobolomyces roseus* Y-1443 dE становила 33,93 ум. од., а для штаму *Sp. roseus* Y-1444 dE була на 10 одиниць більшою (43,55 ум. од.).

Проте не для всіх мікроорганізмів можна встановити видову приналежність: за даними результатів досліджень дріжджі *Rh. mucilaginosa* Y-1395 і *Rh. glutinis* Y-1335 та *Rh. aurantiaca* Y-1195 і *Rh. glutinis* Y-1333 мають близькі значення dE, тому ми можемо визначити тільки родову приналежність (*Rhodotorula*). У цьому випадку доцільним буде проведення інших етапів ідентифікації видової приналежності мікроорганізмів.

Таблиця 2 – Різниця в інтенсивності кольорів пігментосинтезувальних мікроорганізмів

№ з/п	Вид мікроорганізму	Значення dE, ум. од. M ± m
Контроль (фіолетовий колір, L=16 a=37 b=-18)		
Дріжджі		
1	<i>Rhodotorula aurantiaca</i> Y-1193	51,40 ± 0,47
2	<i>Rh. aurantiaca</i> Y-1195	45,64 ± 0,25
3	<i>Rh. glutinis</i> Y-1333	45,68 ± 0,37
4	<i>Rh. glutinis</i> Y-1335	44,76 ± 0,28
5	<i>Rh. mucilaginosa</i> Y-1394	41,89 ± 0,07
6	<i>Rh. mucilaginosa</i> Y-1395	44,12 ± 0,22
7	<i>Rhodospiridium sphaerocarpum</i> Y-44	48,30 ± 0,53
8	<i>R. diobovatum</i> Y-42	46,59 ± 0,34
9	<i>R. diobovatum</i> Y-43	35,40 ± 0,40
10	<i>Sporobolomyces roseus</i> Y-1443	33,93 ± 0,37
11	<i>Sp. roseus</i> Y-1444	43,55 ± 0,28
12	<i>Metchnikowia pulcherrima</i> sp.	37,37 ± 0,32
13	<i>Nadsoniella nigra</i>	25,65 ± 0,45
Бактерії		
14	<i>Serratia marcescens</i> MP-141	36,30 ± 0,44
15	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	62,57 ± 1,21
16	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	60,76 ± 0,91
17	<i>Sarcina lutea</i>	77,97 ± 1,42
18	<i>Chromobacterium violaceum</i>	13,19 ± 0,03

Отже, головною перевагою цього способу є його економічність та простота реалізації, а також відсутність потреби в обов'язковій наявності спеціалізованого обладнання, що дозволяє швидко визначати родову (видову) приналежність мікроорганізмів.

Перспективою подальших досліджень є розширення таблиці-визначника шляхом визначення різниці в інтенсивності кольору пігментів між колекційними культурами мікроорганізмів та контрольним кольором-еталоном.

## ВИСНОВКИ

1. Розглянуті методи визначення інтенсивності пігментоутворення мікроорганізмів дозволили виявити недоліки у використанні онлайн-програми «ColorHexa». По-перше, у цій програмі не всім кольорам та їх відтінкам присвоєно назву, по-друге, декілька відтінків кольорів об'єднуються в загальний опис, хоча візуально зразки значно відрізняються.
2. Розроблений спосіб експрес-ідентифікації пігментованих форм мікроорганізмів без значних ускладнень, додаткових систематичних дій, фінансових та енергетичних затрат. Складено таблицю-визначник пігментосинтезувальних дріжджів та бактерій.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Рильський О. Ф. Наукове обґрунтування прокаріотичної біоіндикації забруднення важкими металами природного середовища: дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.16 / Нац. аграр. ун-т. К., 2011. 351 с.
2. 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.
3. Спосіб визначення інтенсивності пігментоутворення у бактерій: пат. 49812 Україна: МПК (2009), C12Q 1/00, C12M 1/00, C12M 1/34. № u200912311; заявл. 30.11.09; опубл. 11.05.10, Бюл. № 9. 10 с.
4. Хвоць С. Т., Варлинский Н. Н., Попов Е. А. Микропроцессоры и микро-ЭВМ в системах автоматизированного управления / под. общ. ред. С. Т. Хвоць. Львов: Машиностроение, 1987. 645 с.
5. Гук М. Аппаратные средства IBM PC. / под. ред. М. Гук. Санкт-Петербург: Питер, 2006. 1072 с.
6. Способ определения родового (видового) состава ассоциации микроорганизмов: пат. 2086642 Россия: C12N1/00, C12N1/20, C12Q1/04. № 93057595/13; заявл. 24.12.93; опубл. 10.08.97, Бюл. № 1. 10 с.
7. Vinas L. D. M., Loren J. G. J. Bermudes. Analysis of microcalorimetric curves for bacterial identification. *Canadian Journal of Microbiology*. Canada, 1987. Vol. 33. № 1. P. 6-11.
8. Спосіб ідентифікації пігментосинтезувальних мікроорганізмів: пат. 117350 Україна: МПК (2017.01) C12N 1/00 G01N 21/00 C12Q 1/02 (2006.01) C12R 1/00 (2006.01). № u201613543; заявл. 28.12.16; опубл. 26.06.17, Бюл. № 12. 8 с.