

УДК [57.018.6:579.22]:004.4

ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ПІГМЕНТАЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ ЗА ДОПОМОГОЮ КОМП'ЮТЕРНОЇ ПРОГРАМИ ADOBE PHOTOSHOP

О. Рильський*, О. Шерстобосва*, П. Гвоздяк**, Є. Гороховський***

*Інститут агроекології УААН
вул. Метрологічна, 12, Київ 03143, Україна
e-mail: ovsher@ukr.net

**Інститут колоїдної хімії та хімії води НАН України
бульв. Вернадського, 42, Київ, ГСП 3142, Україна

***Запорізький національний університет
вул. Жуковського, 66, Запоріжжя 69000, Україна
e-mail: Rylsky@mail.ru

Розроблено спосіб, який дає змогу швидко й об'єктивно здійснювати оцінку кольору цифрового зображення за допомогою пакету програм CIE Lab. Використання комп'ютерної програми Adobe Photoshop забезпечує оцінку інтенсивності кольору пігменту у бактерій-індикаторів та екологічного стану довкілля.

Ключові слова: цифрова фотокамера, комп'ютерна програма Adobe Photoshop, інтенсивність пігментації.

Система оцінки стану довкілля за гранично допустимими концентраціями (ГДК) хімічних речовин, яка існує на даний момент, не є оптимальною, тому що це, насамперед, санітарно-гігієнічні ГДК для людини. Для оцінки стану природного середовища доцільно використовувати критерії, які не тільки характеризують концентрацію того чи іншого хімічного компонента, а ще й інформують про вплив техногенних факторів на характерні (специфічні) ознаки організмів-індикаторів.

Екологічний моніторинг як система спостережень, оцінки та прогнозу антропогенних змін у біологічних системах не може бути оптимізований без визначення строгого ряду індикаторних організмів. Тільки встановлення та глибоке вивчення індикаторних організмів у всіх трьох складових «живої речовини» біосфери – консументів, продуцентів, редуцентів, – може дати об'єктивну відповідь на запитання про ступінь впливу того чи іншого забруднювального, зокрема антропогенного, фактора на природне середовище. На сьогодні редуценти є групою живих організмів, яка найменш вивчена та представлена серед індикаторних організмів. Реального ряду індикаторів прокариот практично не існує, тому що він починається й закінчується представником бактерій кишкової групи *E. coli* як найбільш вивченого організму-сигналізатора забруднення навколишнього середовища.

Особливістю мікроорганізмів є висока стійкість до різних факторів антропогенного впливу на середовище, зокрема, до дії токсичних металів. Різноманіття мікроорганізмів дає змогу здійснювати пошук індикаторів саме серед них, але це ж різноманіття створює неможливість практичного встановлення ГДК для кожного з них. Це викликає необхідність пошуку таких мікроорганізмів, які могли б дати швидко й наочну інформацію про стан досліджуваного середовища. Такою групою організмів-індикаторів серед прокариот можуть бути пігментсинтезуючі бактерії. Саме яскравість кольору, його насиченість і стійкість синтезованого пігменту можуть бути визначальними у виборі цієї

групи для характеристики забруднення довкілля. Втрата пігменту у бактерій може слугувати не тільки добре спостережуваною зміною ознаки, а й показником значних змін на рівні біосинтезу компонентів клітин, тобто може бути об'єктивним індикатором екологічного стану як води, так і ґрунту екосистем.

Метою роботи було дослідження пігментоутворення у культури *Serratia marcescens* за дії важких металів і температурного фактора та визначення інтенсивності процесу за допомогою комп'ютерної програми Adobe Photoshop.

В основу способу визначення інтенсивності пігментоутворення у бактерій покладено використання цифрової фотокамери та комп'ютерних програм.

Об'єктом дослідження була пігментсинтезуюча здатність бактерій штаму *S. marcescens* MP-141 з колекції відділу мікробіології очищення води Інституту колоїдної хімії та хімії води НАН України. Культуру бактерій піддавали впливові підвищеної температури та цинку.

Чашки Петрі із м'ясо-пептонним агаром (МПА) засівали суцільним газоном 18-годинної культури *S. marcescens*. Дослідні зразки інкубували протягом 48 год у термостаті при температурі 35°C та 38°C. Контролем була культура бактерій *S. marcescens*, вирощена на МПА в чашках Петрі й інкубована протягом 48 год у термостаті при температурі 28°C. Вибрані значення температури для дослідних зразків зумовлені тим, що починаючи з 34°C суттєво наростає блокування одного з ферментів синтезу пігменту продигіозину, в результаті чого пігментсинтезуюча здатність бактерій зі зростанням температури різко падає і в подальшому припиняється зовсім [3, 1].

У дослідях із важким металом також використовували 18-годинну культуру *S. marcescens*. Бактерії культивували на поверхні МПА, приготування якого вели на розчинах хлориду цинку. Бактеріальну культуру засівали суцільним газоном зі щільністю бактеріальної суспензії 10^6 кл/мл. Облік результатів проводили через 48 год культивування бактерій у термостаті при температурі 28°C. У попередніх дослідях було встановлено, що *S. marcescens* значно втрачає пігментсинтезуючу здатність, починаючи з концентрації Zn^{2+} в МПА 250 мг/л [2], тому в дослідях використовували концентраційний інтервал іонів Zn^{2+} з 250 до 450 мг/л. Лимонну кислоту, яку також використовували в дослідях, додавали в поживне середовище у концентрації 0,01 моль/л.

Далі порівнювали інтенсивність пігментоутворення у контрольних культур бактерій з колоніями бактерій, що зазнали впливу важкого металу та підвищеної температури. Починали оцінку інтенсивності пігментоутворення в дослідних і контрольних зразках з отримання зображення предмету дослідження, яке здійснювали за допомогою цифрової фотокамери (ЦФК), закріпленої на висоті 30 см від об'єкта зйомки. Баланс білого кольору цифрової фотокамери встановлювали за допомогою ручного методу – у режимі камери «Встановити баланс білого» робили знімок білого аркуша паперу. Це потрібно для подальшої вірної передачі кольору об'єктів зйомки цифровою камерою за даних умов освітлення. Фокусну відстань і час експозиції також встановлювали вручну, тому всі важливі показники зйомки (баланс білого, фокусна відстань, час експозиції) однакові для всіх об'єктів зйомки. Після проведення вищевказаних операцій здійснювали знімки колоній бактерій на поверхні живильного середовища у чашках Петрі. Сталість освітлення досягали за допомогою спрямованого освітлювача з розсіяним світлом і вбудованого в камеру спалаху. Отримані знімки у форматі JPEG, кольоровий профіль RGB (червоний, зелений, блакитний), розрядністю 8 біт, завантажували у графічний редактор Adobe Photoshop для подальшої обробки й аналізу. Зображення з кольорової

моделі RGB переводили у кольорову модель CIE Lab (Меню «Зображення» → «Режим» → «Lab»). За допомогою інструменту «Піпетка» отримували у діалоговому вікні «Інфо» (виклик за допомогою функціональної клавіші F8) параметри кожного з трьох каналів кольору у відповідній точці зображення колонії *Serratia marcescens*: L – яскравість; a – розмір червоно-зеленої складової; b – розмір жовто-синьої складової. Дані отримували у 10 довільних точках зображення газону культури бактерій на чашках Петрі. Розраховували середнє значення для кожного з каналів зображення. Порівняння кольору здійснювали з використанням формули кольорової відмінності, яка дає змогу за показниками трьох каналів кольорової моделі CIE Lab чисельно виразити відмінності між двома кольорами через їхню відстань у декартовій системі координат і за різницею між кольорами (ΔE_{ab}^*) дослідного та контрольного зразків визначити зміну інтенсивності пігментоутворення, виразивши її в умовних одиницях [4]. Розрахунки ΔE_{ab}^* проводили за допомогою електронної таблиці Excel. Пакет Adobe Photoshop дає змогу визначити відтінки для кожного первинного кольору і порівняти його у досліджуваних та контрольних культур бактерій з використанням кольорової моделі CIE Lab.

На відміну від біотехнологічних виробництв, де існує необхідність вагової оцінки кількості синтезованого пігменту, в галузі захисту довкілля при оцінці впливу антропогенних факторів на мікроорганізми-індикатори достатньо буває провести відносно оцінювання інтенсивності пігменту мікроорганізму, який зазнав впливу такого фактора, до контрольної культури та виразити це відношення в об'єктивних одиницях. У сучасних дослідженнях для отримання пігментів мікроорганізмів і оцінки інтенсивності їх синтезу в різних умовах культивування та на різних стадіях розвитку культури використовують цілу низку прийомів і дій із залученням складної апаратури й реактивів.

Запропонований нами спосіб для оцінки інтенсивності пігментоутворення бактерій не потребує багато часу і значно простіший, ніж ті, що традиційно використовуються сьогодні.

Застосування запропонованого методу розглянемо на прикладі досліджень впливу різних концентрацій іонів цинку на інтенсивність синтезу пігменту культурою *S. marcescens* за наявності у поживному середовищі лимонної кислоти та без неї, а також впливу температури на синтез продигіозину.

При дослідженні впливу різних концентрацій іонів цинку на синтез пігменту у присутності лимонної кислоти бактерій *S. marcescens* (рис. 1) встановлено (табл. 1), що додавання у живильне середовище іонів цинку (250 мг/л) призводило до значного пригнічення пігментсинтезуючої здатності бактерій і що різниця (dE) між кольорами контрольних та дослідних зразків дорівнювала 36 одиниць, а така ж концентрація Zn^{2+} у присутності лимонної кислоти значно менше пригнічувала синтез продигіозину і в цьому випадку dE дорівнювала 14 одиниць. При збільшенні концентрації іонів цинку в середовищі до 350 мг/л відбулося майже повне пригнічення синтезу пігменту і різниця dE між контролем та дослідом становила 41 одиницю, а при культивуванні *S. marcescens* на МПА з доданою лимонною кислотою, при цій же концентрації іонів цинку (350 мг/л) dE була 25 одиниць. Це вказує на те, що синтез пігменту не був повністю заблокований. При концентрації цинку в середовищі 450 мг/л колір культури не змінився порівняно з попередньою концентрацією цинку (350 мг/л), і dE дорівнювала також 41 одиниці, але у середовищі з лимонною кислотою (концентрація Zn^{2+} 450 мг/л) колір був інтенсивнішим, і dE в цьому випадку становила 32 одиниці.

При дослідженні впливу температури на синтез пігменту *S. marcescens* послідовність операцій за запропонованим методом була аналогічною попередньому дослідю.

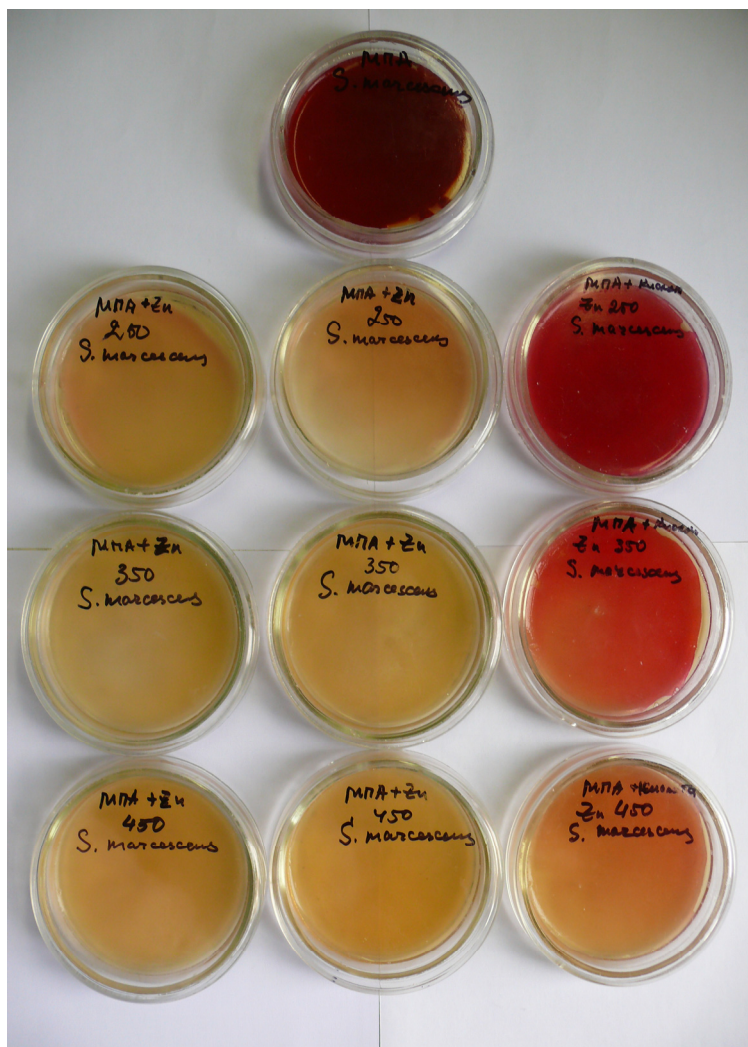


Рис. 1. Вплив різних концентрацій Zn^{2+} на синтез пігменту у *S. marcescens* в присутності лимонної кислоти.

Таблиця 1

Ступінь відмінності між кольорами дослідних і контрольних зразків культури *S. marcescens* при культивуванні з різними концентраціями Zn^{2+}

Варіанти	Концентрація Zn^{2+} , мг/л	L	a	b	dE
МПА (контроль)	0	9	25	13	0
МПА+Zn	250	48	14	43	36
МПА+Zn+кислота	250	23	43	34	14
МПА+Zn	350	54	9	37	41
МПА+Zn+кислота	350	38	53	45	25
МПА+Zn	450	55	16	43	41
МПА+Zn+кислота	450	47	37	46	32

Таблиця 2

Ступінь відмінності між інтенсивністю кольорів дослідних і контрольних зразків культури *S. marcescens* під впливом температури

Температура	Показники каналів кольорової моделі CIE Lab			dE
	L	a	b	
28°C	141	54	45	0
35°C	172	134	86	19.6
38°C	175	140	83	21.0

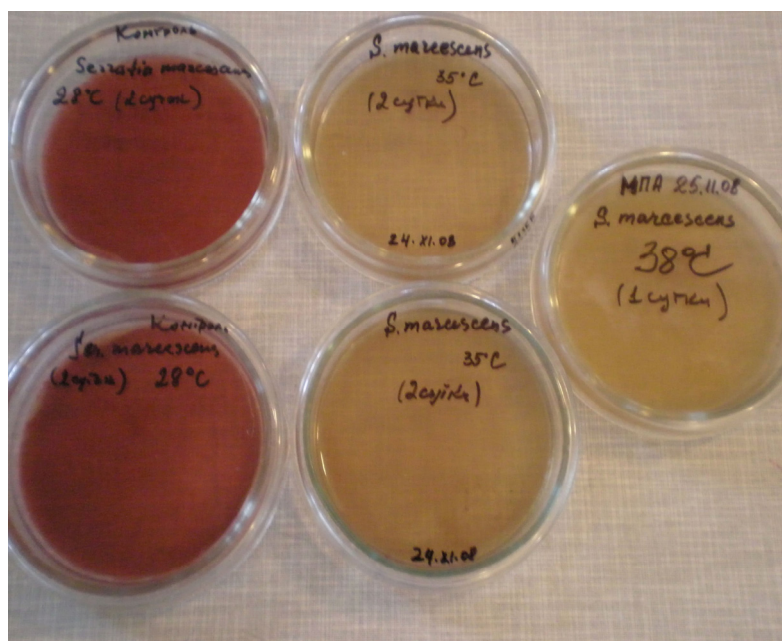


Рис. 2. Вплив температури на синтез пігменту у *S. marcescens*.

Отримані результати (рис. 2, табл. 2) показують, що підвищення температури до 35°C та 38°C блокує синтез пігменту продигіозину у *S. marcescens*, при цьому різниця між інтенсивністю кольорів (dE) для температури 35°C і 38°C щодо контролю (28°C) становила 19,6 та 21,0 одиницю, відповідно.

Запропонований спосіб визначення інтенсивності пігментоутворення у мікроорганізмів за допомогою цифрового фотоапарата і пакету програм CIE Lab дає змогу: по-перше, здійснювати оцінку інтенсивності кольору швидко й об'єктивно; по-друге, встановлювати інтенсивність пігментоутворення бактерій і визначати зміни в інтенсивності їхнього пігментоутворення за дії важких металів, температури та інших екологічних чинників; по-третє, через зміну інтенсивності кольору пігменту у бактерій оцінювати екологічний стан певного екотопу.

1. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. М.: Мир, 1986. 422 с.
2. Рильський О. Ф., Шерстобоева О. В. Лимонна кислота – чинник збереження різноманіття прокариот за умов забруднення // Агроеколог. журн. 2010. № 1. С. 56–60.

3. *Феофилова Е. П.* Пигменты микроорганизмов. М.: Наука, 1974. 242 с.
4. *Gaurav Sharma, Wencheng Wu., Edul N. Dalal* The CIEDE2000 Color-Difference Formula: Implementation Notes, Supplementary Test Data, and Mathematical Observations // Color Research and Application, 2004. P. 1–24.

DEFINITION OF PIGMENTATION INTENSITY IN MICROORGANISMS BY MEANS OF COMPUTER PROGRAM ADOBE PHOTOSHOP

A. Rylsky*, O. Sherstoboeva*, P. Gvozdyak, E. Gorohovsky*****

**Institute of Agroecology UAAN
12, Metrologichna St., Kyiv 03143, Ukraine
e-mail: ovsher@ukr.net*

***Institute of Colloid and Water Chemistry of NAS of Ukraine
42, Vernadskyi Blvd., Kyiv-142, GSP 03680, Ukraine*

****Zaporizhzhja National University
66, Zhukovskiy St., Zaporizhzhja 69000, Ukraine
e-mail: Rylsky@mail.ru*

The way allows to carry out quickly and objectively an estimation of the digital image colour by means of software package CIE Lab. Through use of Adobe Photoshop computer program it is possible to estimate intensity of a pigment colour in bacteria and an ecological state of environment.

Key words: a digital camera, computer program Adobe Photoshop, intensity of pigmentation.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ПИГМЕНТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ С ПОМОЩЬЮ КОМПЬЮТЕРНОЙ ПРОГРАММЫ ADOBE PHOTOSHOP

А. Рыльский*, Е. Шерстобоева*, П. Гвоздяк, Е. Гороховский*****

**Институт агроэкологии УААН
ул. Метрологическая, 12, Киев 03143, Украина*

***Институт коллоидной химии и химии воды НАН Украины
бул. Вернадского, 42, Киев, ГСП 3142, Украина*

****Запорожский национальный университет
ул. Жуковского, 66, Запорожье 69600, Украина
e-mail: Rylsky@mail.ru*

Способ позволяет быстро и объективно осуществлять оценку цвета цифрового изображения с помощью пакета программ CIE Lab. Благодаря использованию компьютерной программы Adobe Photoshop можно оценивать интенсивность цвета пигмента у бактерий и экологическое состояние окружающей среды.

Ключевые слова: цифровая фотокамера, компьютерная программа Adobe Photoshop, интенсивность пигментации.

Стаття надійшла до редколегії 26.04.10

Прийнята до друку 21.05.10