

Ю.О. Павлова, С.П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна, тел.: 8 (0322)96 40 53,
e-mail: indrekis@icmp.lviv.ua

ВИКОРИСТАННЯ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ТА НАГРОМАДЖЕННЯ ЕЛЕМЕНТНОЇ СІРКИ В КЛІТИНАХ *THIOCYSTIS SP. YA 2006*

Досліджено закономірності утилізації сірководню та нагромадження сірки в клітинах пурпурових сіркових бактерій Thiocystis sp. Швидкість використання сірководню бактеріями залежить від його вмісту в середовищі. Освітлення культури 1000 лк та високі концентрації сірководню (понад 200 мг/л) сприяють більш швидкій його утилізації клітинами. Максимальне нагромадження елементної сірки спостерігається на 6 добу культивування. Інтенсивність освітлення та вміст сірководню в середовищі є тими факторами, які регулюють накопичення сірки в клітинах бактерій. Після використання сірководню із середовища гранули сірки в клітинах звільняються від білкової мембрани і сірка використовується в процесі аноксигенного фотосинтезу як донор електронів.

Ключові слова: пурпурові сіркобактерії, сірководень, елементна сірка.

Пурпурові сіркові бактерії (родина *Chromatiaceae*) використовують відновлені сполуки сірки, зокрема, сірководень, як донори електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу [8]. Більшість представників родини – облігатні фотолітоавтотрофи і ростуть за таких концентрацій сульфідів, які є згубними для інших фототрофних несіркових бактерій [2, 3, 11]. Окиснення сірководню (а, отже, його детоксикація) пурпуровими сірковими бактеріями супроводжується нагромадженням в клітинах елементної сірки [8, 9].

Здатність знешкоджувати сірководень і нагромаджувати сірку дозволяє розглядати пурпурові сіркові бактерії як перспективні модельні організми для різних біотехнологічних процесів, в тому числі і для одержання сірки.

Метою роботи було дослідити здатність фотосинтезувальних пурпурових сіркових бактерій *Thiocystis sp. Ya 2006* утилізувати сірководень середовища та нагромаджувати сірку.

Матеріали і методи

У дослідах використовували культуру пурпурових сіркобактерій *Thiocystis sp. Ya 2006*, виділену з води озера “Яворівське”, що розташоване на території Язівського сіркового родовища (Україна, Львівська область).

Культуру вирощували на рідкому середовищі АТСС № 1449 у пробірках об'ємом 20 мл, які закривали гумовими корками так, щоб не залишилося пухирців повітря. Час культивування 10 діб при температурі 28 °С за умов постійного освітлення.



Джерелом світла слугували лампи розжарювання різної потужності. Інтенсивність освітлення регулювали зміною відстані між джерелом світла і об'єктом дослідження. Інтенсивність освітлення вимірювали люксометром Ю116.

Біомасу клітин визначали турбідометрично на фотоколориметрі КФК-3 при 600 нм, кювета 3 мм.

Гранули сірки в клітинах виявляли за допомогою електронної мікроскопії. Фіксацію і контрастування клітин проводили як описано [1, 10]. Зразки переглядали і фотографували в електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 за прискорювальної напруги 75 кВ.

Кількість сірководню визначали фотоелектроколориметрично ($\lambda = 400$ нм) після його взаємодії з вісмутовим реактивом [5].

Кількість сірки визначали йодометрично [6].

Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням програм Excel та Origin.

Результати та їх обговорення

Сірководень виявляє токсичну дію на живі організми. Незначні його концентрації (0,06 – 0,2 ммоль) пригнічують розвиток деяких бактерій та найпростіших [7]. Пурпурові сіркобактерії виявляють підвищену стійкість до цієї сполуки і добре ростуть в широкому діапазоні концентрацій сірководню (0,5 – 11 ммоль) в середовищі [2, 3, 11]. Вони використовують його як донор електронів в реакціях відновлення CO_2 у процесі фотолітоавтотрофного росту.

Вивчення динаміки використання сірководню *Thiocystis sp. Ya 2006*, показало, що вже на третю добу культивування його концентрація у середовищі зменшується у 30 разів (рис. 1). На шосту добу культивування бактерії окиснюють практично весь наявний у середовищі сірководень.

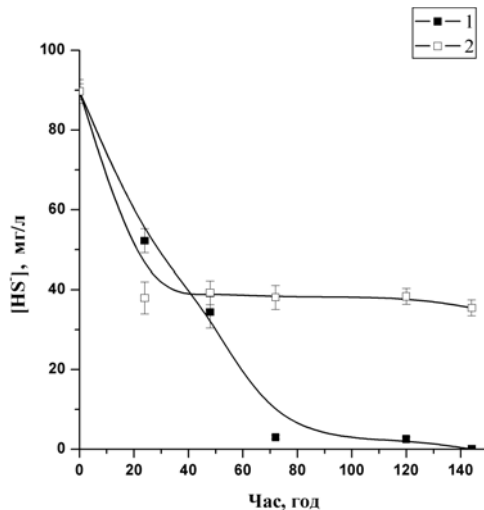


Рис. 1. Використання сірководню *Thiocystis sp. Ya 2006* в процесі росту культури (1). 2 – середовище без клітин.

Fig. 1. Hydrogen sulfide utilization during the *Thiocystis sp. Ya 2006* growth (1). 2 – the medium without cells.



У попередніх дослідженнях нами показано, що високі концентрації сірководню негативно впливають на ріст культури та викликають різні деструктивні зміни в клітинах бактерій [3]. *Thiocystis sp. Ya 2006* утилізує до 95 % сірководню середовища, якщо останній присутній у невеликих концентраціях (80 мг/л) (рис. 2, Б). Вища початкова концентрація сірководню (200 мг/л) сприяє кращому росту бактерій (рис. 2, А). При цьому сірководень окиснюється бактеріями в 1,5 рази швидше, порівняно із клітинами, вирощеними у середовищі із концентрацією H_2S 80 мг/л. В обидвох експериментах бактерії окиснювали сірководень швидше, ніж це відбувається за участю кисню повітря.

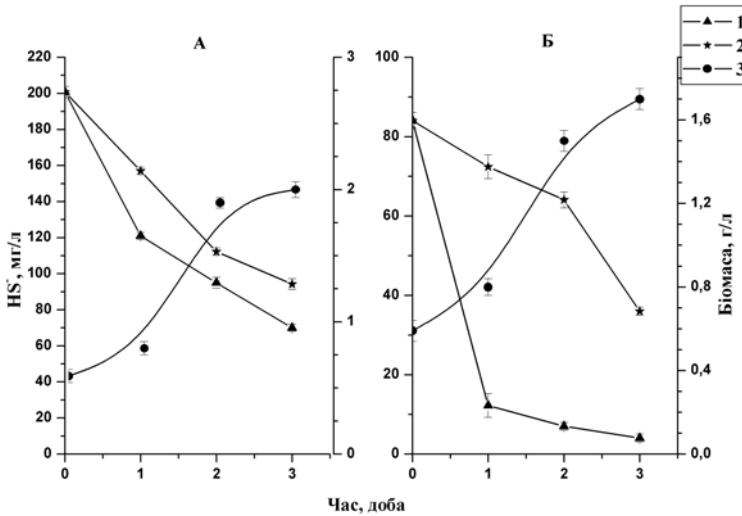


Рис. 2. Використання сірководню *Thiocystis sp. Ya 2006* із середовища з різними його концентраціями
 1 – окиснення сірководню в присутності клітин;
 2 – окиснення сірководню киснем повітря; 3 – ріст культури.

Fig. 2. The utilization of different hydrogen sulfide concentration by *Thiocystis sp. Ya 2006*

1 – hydrogen sulfide oxidation in cells presence; 2 -hydrogen sulfide oxidation by oxygen from the air; 3 – the growth of culture.

Аноксигенні фотосинтезувальні бактерії використовують енергію світла для перенесення електронів від сірководню до НАД(Ф)⁺ і ферредоксину [4]. Отже, утилізація сірководню пурпуровими сірковими бактеріями в першу чергу визначається інтенсивністю освітлення. На рис. 3 показана утилізація сірководню *Thiocystis sp. Ya 2006* за умов різної освітленості. Швидкій утилізації сульфідів сприяє вирощування культури за інтенсивності освітлення 1000 лк. Нами показано, що за таких умов, протягом двох діб культивування бактерії використовують понад 80 % сірководню (рис. 3). Зниження інтенсивності освітлення (700 лк, 300 лк) зумовлює сповільнення темпів окиснення сірководню. Недостатнє або надмірне освітлення (40 лк, 2000 лк) супроводжується суттєвим сповільненням його утилізації (рис. 3) та зменшенням кількості сірки в клітинах (рис. 4).

Різні сіркові бактерії у процесі росту використовують відновлені сполуки сірки як донор електронів для аноксигенного фотосинтезу або аеробного чи анаеробного хемотрофного росту [2, 4, 8, 9]. Як проміжний продукт окиснення сірководню чи

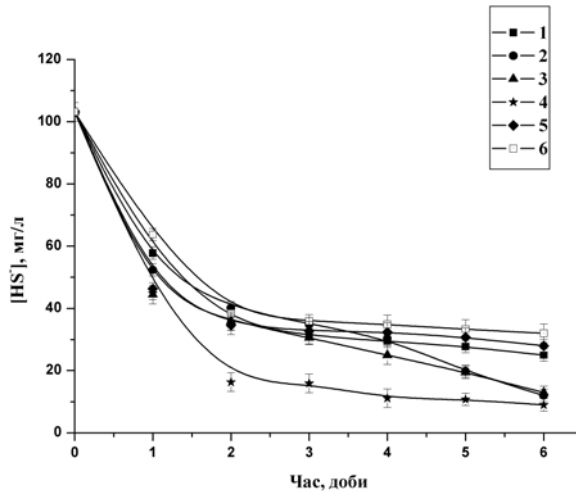


Рис. 3. Утилізація сірководню *Thiocystis sp. Ya 2006* за умов різної освітленості — 1 — 40 лк; 2 — 300 лк; 3 — 700 лк; 4 — 1000 лк; 5 — 2000 лк; 6 — середовище без клітин.

Fig. 3. Hydrogen *Thiocystis sp. Ya 2006* sulfide utilization under different light intensity condition — 1 — 40 lx; 2 — 300 lx; 3 — 700 lx; 4 — 1000 lx; 5 — 2000 lx; 6 — the medium without cells.

тіосульфату бактерії накопичують глобули “елементної” сірки в клітині (*Chromatiaceae*, *Beggiatoa sp.*) або виділяють її в навколишнє середовище (*Ectothiorhodospiraceae*, *Chlorobiaceae*) [8, 9].

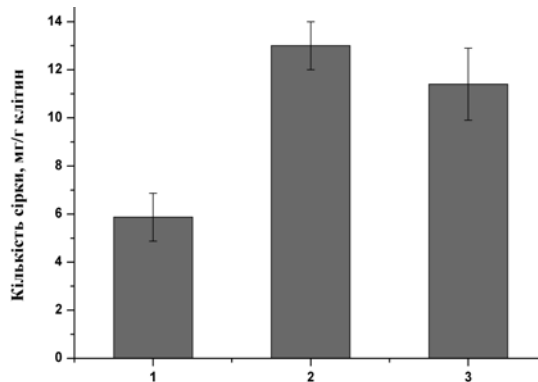


Рис. 4. Нагромадження сірки в клітинах *Thiocystis sp. Ya 2006* за умов різної освітленості: 1 — 40 лк; 2 — 700 лк; 3 — 2000 лк.

Fig. 4. Sulfur accumulation in *Thiocystis sp. Ya 2006* cells under different light intensity conditions: 1 — 40 lx; 2 — 700 lx; 3 — 2000 lx.

Утворена в клітинах сірка за дефіциту сірководню у зовнішньому середовищі служить джерелом електронів при фотосинтезі. Максимальне нагромадження сірки в клітинах *Thiocystis sp. Ya 2006* (13 мг/г клітин) спостерігається на 6 добу культивування (рис. 5).

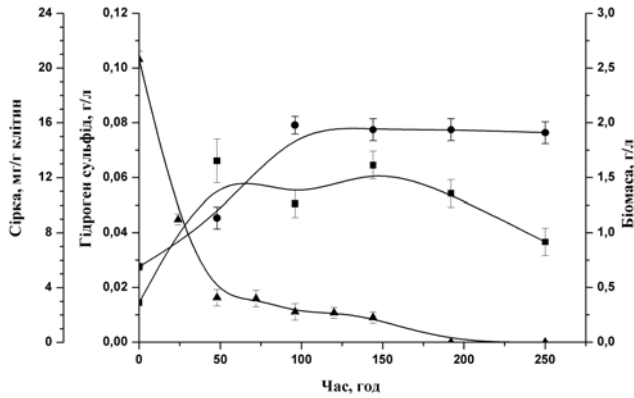


Рис. 5. Ріст (-●-) та нагромадження сірки (-■-) в клітинах *Thiocystis sp. Ya 2006* на середовищі із сульфідом. -▲- утилізація бактеріями сірководню.

Fig. 5. The growth (-●-) and sulfur accumulation (-■-) in *Thiocystis sp. Ya 2006* cells in the medium with hydrogen sulfide. -▲- hydrogen sulfide utilization by bacteria.

На цей час сірководень середовища повністю використовується клітинами і вони переходять в стаціонарну фазу росту. При сповільненні темпів росту бактерій спостерігається зниження вмісту сірки в клітинах, що, очевидно, пов'язане з її використанням в енергетичному метаболізмі.

На електронних фотографіях (рис. 6) видно наповнені гранулами сірки клітини. На початку їх формування — за наявності сірководню у середовищі — вони ото-

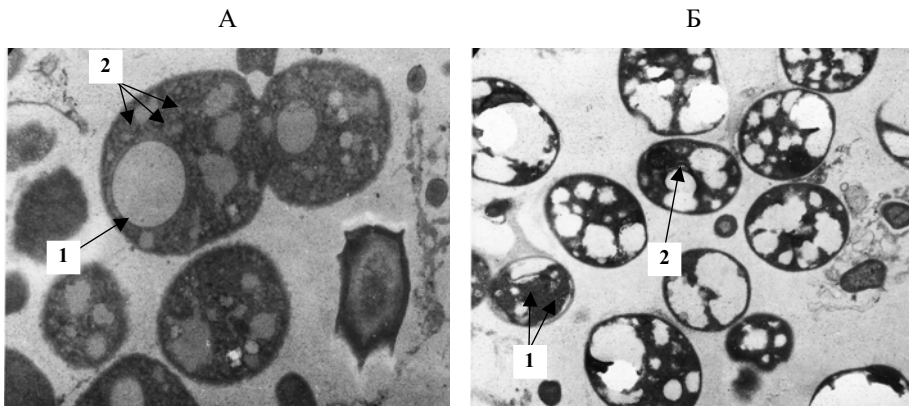


Рис. 6. Мікрофотографії клітин *Thiocystis sp. Ya 2006*, вирощених у середовищі із сірководнем до середини логарифмічної (А) та стаціонарної (Б) фази росту. 1 — білкова оболонка, 2 — фотосинтетичні везикули.

Fig. 6. Electron microscopic photomicrographs of *Thiocystis sp Ya 2006* cells, which were grown in the medium with hydrogen sulfide to middle of logarithmic (left) and stationary (right) stage of growth. 1 — protein membrane, 2 — photosynthetic vesicles.

чені добре помітною білковою мембраною. Використання сірководню середовища стимулює використання гранул сірки “нових” донорів електронів. При цьому мембрана, що оточує гранули руйнується і сірка вивільняється в цитоплазматичний простір. На електронних фотографіях видно, що із звільненою від мембран сіркою взаємодіють фотосинтетичні везикули, що очевидно, пов’язано з більш інтенсивним використанням сірки як донора електронів в процесі фотосинтезу.

Таким чином, в результаті приведених досліджень встановлено, що пурпурові сіркові бактерії роду *Thiocystis* здатні утилізувати сірководень і перетворювати його в сірку, яка нагромаджується в клітинах. Максимальне нагромадження сірки клітинами спостерігається на шосту добу культивування. Кількість утворюваної клітинами сірки регулюється інтенсивністю освітлення і концентраціями сірководню в середовищі. Описані бактерії слід розглядати як перспективні для біотехнологічного одержання сірки.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Кім Л.Я., Гудзь С.П.* Пурпурові сірковобактерії з водоєм Яворівського родовища сірки // Мікробіол. журн. — 2007. — 69, № 1 — С. 12-19.
2. *Кондратьева Е. Н.* Фотосинтезирующие микроорганизмы. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. — 374 с.
3. *Павлова Ю.О., Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Кулачковський О.Р.* Структурно-функціональні зміни в клітинах *Thiocystis* sp. викликані сірководнем і освітленістю // Агроекологічний журнал — в друці.
4. *Dahl Ch., Engels S., Pott-Sperling A., Schulte A., Sander A., Lübbe A., Deuster O., Brune D.* Novel genes of the *dsr* gene cluster and evidence for close interaction of *dsr* proteins during sulfur oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* // J. Bacteriol. — 2005 — 187, № 4. — P. 1392-1404.
5. *Dean G.A.* A simple colorimetric finish for the Johnson-Nishita micro-distillation of sulfur // The analyst: the journal of the society of Analytical Chemistry. — 1966. — 91, № 1085. — P. 530 — 532.
6. *Jorgensen B.B., Kuenen J., Cohen Y.* Microbial transformations of sulfur compounds in a stratified lake (Solar Lake, Sinai) // Limnol. Oceanogr. — 1979. — 24. — P. 799-822.
7. *Küster E., Dorusch F., Altenburger R.* Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, and *Daphnia magna* // Environ. Toxicol. Chem. — 2005. — 24. — P. 2621-2629.
8. *Phennig N., Tröper H.* The family *Chromatiaceae* // The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Ecophysiology, isolation, identification, applications. — 2nd edn. — New York: Spinger, 1992. — P. 3200-3221.
9. *Prange A., Chauvistre R., Modrow H., Hormes J., Tröper H., Dahl Ch.* Quantative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different species of sulfur // Microbiology — 2002 — 148. — P. 267-276.
10. *Reynolds E.S.* The use of lead citrate at pH as an electronopaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. — 1963. — 17. — P. 208—212
11. *Zaar A., Fuchs G., Golecki J., Overmann J.* A new purple sulfur bacterium isolated from littoral microbial mat, *Thiorhodococcus drewsii* sp. nov. // Arch. Microbiol. — 1979, №3. — P. 173-183.



Ю.А. Павлова, С.П. Гудзь

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина, тел. 8 (0322) 96 40 53,
e-mail: *indrekis@icmp.lviv.ua*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕРОВОДОРОДА И НАКОПЛЕНИЕ ЭЛЕМЕНТНОЙ СЕРЫ В КЛЕТКАХ *THIOCYSTIS SP. YA 2006*

Реферат

Исследованы закономерности утилизации сероводорода и накопления серы в клетках пурпурных серобактерий *Thiocystis sp. Ya 2006*. Скорость использования сероводорода бактериями зависит от его содержания в среде. Освещение культуры 1000 лк и высокие концентрации сероводорода (свыше 200 мг/л) содействуют более быстрой его утилизации клетками. Максимальное накопление элементной серы наблюдается на 6-е сутки культивирования. Интенсивность освещения и содержащее сероводорода в среде являются теми факторами, которые регулируют накопление серы в клетках бактерий. После использования сероводорода из среды, гранулы серы в клетках освобождаются от белковой мембраны, и сера используется в процессе бескислородного фотосинтеза как донор электронов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: пурпурные серобактерии, сероводород, сера.

Yu.O. Pavlova, S.P. Gudz

Ivan Franko Lviv National University,
Hrushevsky Str., 4, Lviv, 79005, Ukraine, тел. 8 (0322) 96 40 53,
e-mail: *indrekis@icmp.lviv.ua*

HYDROGEN SULFIDE UTILIZATION AND ACCUMULATION OF SULFUR IN *THIOCYSTIS SP. YA 2006* CELLS

Summary

The mechanisms of hydrogen sulfide utilization and accumulation of hydrogen sulfide in *Thiocystis sp. Ya 2006* cells were investigated. The intensity of hydrogen sulfide using depends on its quantity in the medium. The light intensity 1000 lx and high hydrogen sulfide concentration made the positive influence on hydrogen sulfide utilization by the cells. The maximum of sulfur accumulation was observed after six days of cultivation. The light intensity and hydrogen sulfide content in the medium have regulated the accumulation of sulfur in bacteria cells. When hydrogen sulfide was used from the medium, sulfur globules lost their protein membrane and then sulfur was used in the process of anoxic photosynthesis as electron donor.

К e y w o r d s: purple sulfur bacteria, hydrogen sulfide, sulfur.

