

**А.А. Галушка, Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь**

Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського, 4, м. Львів, 79005, Україна,  
тел. 8 (032) 239 40 53, e-mail: a\_halushka@mail.ru

## **ВПЛИВ СІРКОВОДНЮ НА *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

*Досліджено ріст Saccharomyces cerevisiae у середовищах з різними концентраціями сірководню. Сірководень концентрацією 9,4 мМ повністю пригнічує ріст дріжджів у аеробних та анаеробних умовах. На електронномікроскопічних фотографіях клітин, оброблених сірководнем, добре помітні зміни у клітинній стінці, цитоплазматичній мембрані та вакуолі. Оброблення клітин сірководнем в концентрації 31,3 мМ протягом 45 хв забезпечує 16 % виживання дріжджів. Виділені ауксотрофні мутанти з клітин, оброблених сірководнем.*

*К л ю ч о в і с л о в а: сірководень, Saccharomyces cerevisiae, токсичність, мутагенність, ультраструктура.*

Гострою екологічною проблемою у західних регіонах України є нагромадження сірководню у водоймах, що утворилися на місці колишніх сірководобувних кар'єрів. Сірководень виявляє високу токсичність для тварин та людей, включаючи порушення функціонування різних органів та систем [9]. Хронічна інтоксикація сірководнем небезпечна для здоров'я людини навіть за таких концентрацій, коли його запах не відчутний.

Сірководень виявляє генотоксичну [4] та канцерогенну [8] дію. Він пригнічує люмінесценцію у *Vibrio fischeri* [12], пригнічує ріст археобактерій [13] та ціанобактерій [6, 14]. Вважають, що механізм дії сірководню полягає у пошкодженні метало- та дисульфідвмісних білків [9], він викликає деполяризацію мітохондріальних мембран у морських безхребетних [10]. Багато аспектів дії сірководню залишаються нез'ясованими.

Мікроорганізми є зручними об'єктами для вивчення механізму дії різних сполук. В цій роботі представлені результати вивчення впливу сірководню на факультативно анаеробні дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*.

### **Матеріали і методи**

Об'єктом досліджень були дріжджі *S. cerevisiae*. Дріжджі вирощували у середовищі Беркгольдера [5] при температурі 30 °С.

Біомасу вимірювали турбідиметрично за допомогою КФК-3 при довжині хвилі 540 нм. Концентрацію сірководню у культуральній рідині визначали турбідиметрично [7] на КФК-3. Клітини відділяли центрифугуванням при 5 тис. об/хв протягом



15 хв. Для визначення кількості сірководню, що випаровується в процесі роботи, ставили контрольний дослід без клітин.

Для визначення мутагенної дії сірководню на дріжджі використовували штамп *S. cerevisiae* ВКМ У-416 D-67-S. Вживання дріжджів під впливом сірководню визначали в середовищі, що містило 1,56; 31,3 і 156 мМ сірководню. Обробіток клітин сірководнем проводили протягом 0, 5, 15, 25, 35 і 45 хв. Використовували однодобову культуру дріжджів, вирощених у середовищі ҀЕРD такого складу: 1 % дріжджового екстракту, 2 % пептону, 2 % глюкози. До суспензії клітин додавали натрій сульфід і після відповідного періоду інкубації, двічі відмивали стерильною водопровідною водою, осаджували при 3000 об/хв протягом 10 хв і ресуспендували в 3 мл стерильної водопровідної води. Суспензію використовували для посіву на чашки Петрі з агаризованим середовищем Беркгольдера, що містило дріжджовий екстракт (500 мг/л) і 1 % глюкозу (максимальне середовище). Мінімальне середовище містило глюкозу, біотин та тіамін. Біотин додавали у концентрації 5 мкг/л, тіамін — 400 мкг/л. Чашки поміщали в термостат на 3 доби при 30 °С. Контролем служила кількість колоній дріжджів, що вирости на цьому ж середовищі, засіяному не обробленими сірководнем клітинами.

Для виділення ауксотрофних мутантів дріжджів колонії, що вирости на максимальному середовищі, переносили на мінімальне середовище, використовуючи метод відбитків [2]. Колонії, що не вирости на мінімальному середовищі, відсівали у пробірки з трьома мілілітрами мінімального чи максимального середовища. Колонії, що не росли у мінімальному середовищі, вважали мутантними.

Зміни в структурі клітин вивчали за допомогою електронної мікроскопії. Для цього двічі відмиті стерильною водопровідною водою клітини осаджували центрифугуванням при 10 тис. об/хв протягом 15 хв. Клітини фіксували в 1,5 % розчині калій перманганату. Фіксовані клітини обезводнювали у розчинах із зростаючими концентраціями етанолу і пропілен оксиду та переносили в епоксидну смолу Ероп 812. Ультратонкі зрізи клітин отримували на ультрамікромомі УМТП–6 і контрастували плюмбум цитратом за Рейнольдсом [16]. Перегляд і фотографування зразків проводили на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 при прискорюючій напрузі 75 кВ.

Статистичне оброблення отриманих результатів проводили з використанням програми “Origin 6.1”. Вибір тактики статистичного оброблення і підготовку даних для аналізу здійснювали, базуючись на загальноприйнятих методах [1] при рівні достовірності  $P < 0,05$ .

### Результати та їх обговорення

Одним із механізмів негативного впливу сірководню на живі організми є взаємодія з метало- та дисульфідвмісними ферментами [9]. Деякі автори вважають, що токсичність сірководню в першу чергу пов'язана з інгібуванням цитохромоксидази — ключового ферменту дихального ланцюга [11]. Тому доцільно було дослідити ріст дріжджів в присутності сірководню за аеробних та анаеробних умов. Дріжджі *S. cerevisiae* є зручним об'єктом для таких досліджень, оскільки вони, як відомо, є факультативними анаеробами. Для визначення впливу сірководню на ріст дріжджів їх вирощували у 50 мл колбах, закритих ватно-марлевими корками, із 15 мл середовища без перемішування (аеробні умови). Для створення анаеробних умов пробірки повністю заповнювали середовищем та закривали гумовими корками.



За аеробних умов вже при концентрації сірководню 1,56 мМ рівень нагромадження біомаси був нижчим, ніж у контрольному варіанті (рис. 1, а, б).

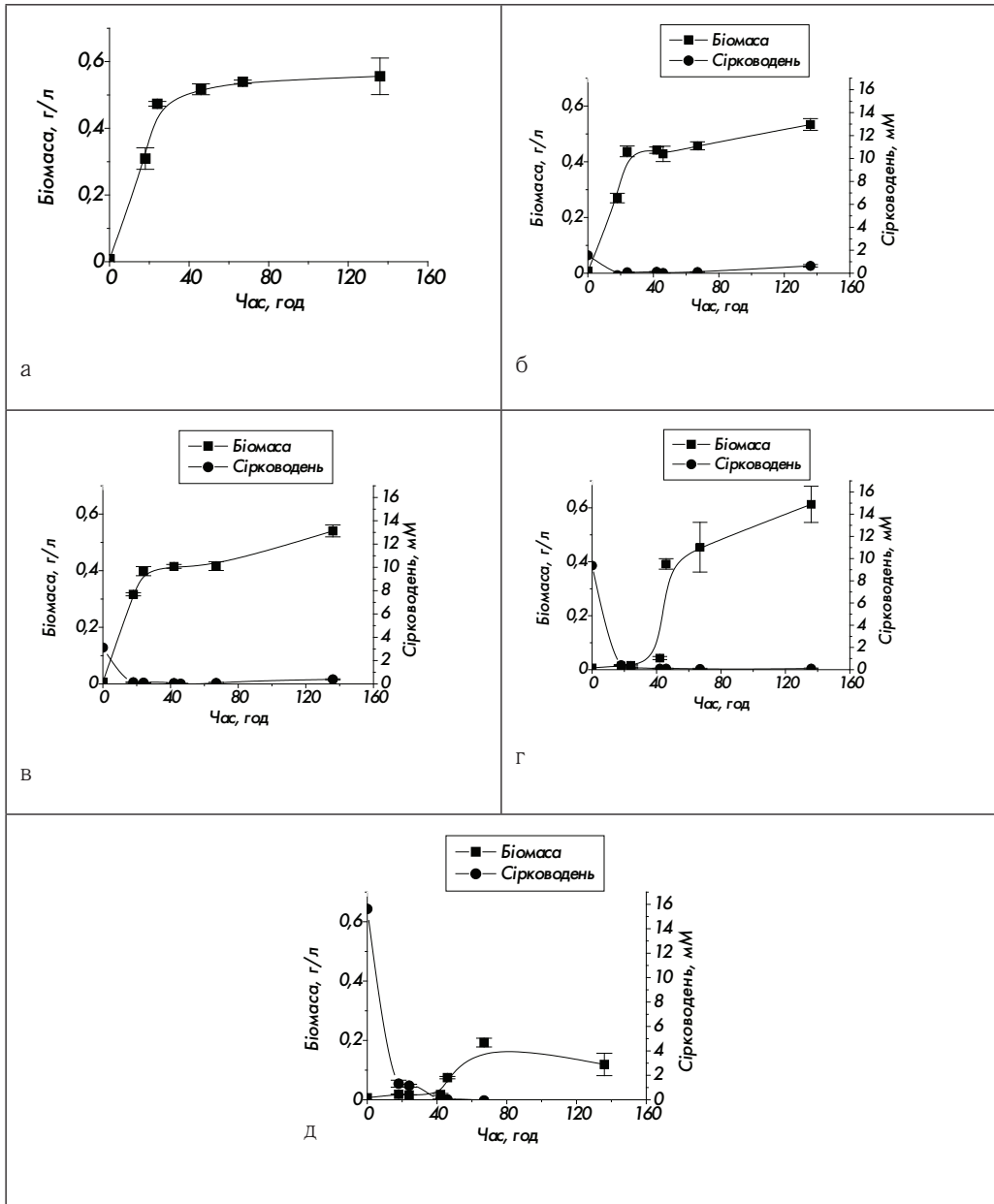


Рис. 1. Ріст *S. cerevisiae* у середовищах з різними концентраціями сірководню: а – без сірководню (контроль), б – 1,56 мМ, в – 3,1 мМ, г – 9,4 мМ, д – 15,6 мМ (аеробні умови)

Fig. 1. *S. cerevisiae* growth in media with different concentrations of hydrogen sulfide under aerobic conditions: а – without hydrogen sulfide (control), б – 1.56 mM, в – 3.1 mM, г – 9.4 mM, д – 15.6 mM (aerobic conditions)

Збільшення концентрації цієї сполуки до 3,1 мМ суттєво не впливало на ріст дріжджів (рис. 1, в). При вихідній концентрації сірководню 9,4 мМ ріст дріжджів протягом першої доби був практично відсутній (рис. 1, г). Однак, на другу добу культивування ріст дріжджів відновлювався і досягав рівня контрольного варіанту. Більш висока концентрація сірководню в середовищі (15,6 мМ) інгібувала ріст дріжджів. Деяке відновлення росту спостерігали після 40 годин культивування, але рівень нагромадження біомаси був майже в 4 рази меншим, ніж у контрольному варіанті (рис. 1, д). Очевидно, в клітинах за наявності високих концентрацій сірководню відбувалися незворотні зміни, які позначалися на ростових процесах.

Відновлення росту *S. cerevisiae* у середовищі з концентрацією сірководню 9,4 мМ, очевидно, пов'язане з його випаровуванням і окисненням за аеробних умов. У зв'язку з цим був проведений експеримент, у якому концентрацію сірководню в середовищі підтримували на постійному рівні протягом усього часу культивування, для чого вимірювали вміст сірководню в середовищі через кожні 8 - 10 год і доводили його вміст до вихідної концентрації. На рис. 2 показано ріст дріжджів *S. cerevisiae* за наявності 9,4 мМ сірководню в середовищі. Результати цього експерименту показали, що рівень сірководню в середовищі в процесі культивування дріжджів швидко знижується, однак додаткове внесення  $\text{Na}_2\text{S}$  до вихідного рівня (9,4 мМ) супроводжується повним інгібуванням росту культури.

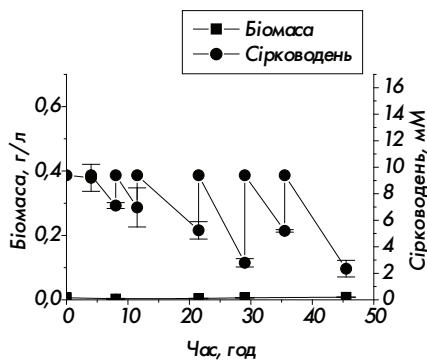


Рис. 2. Ріст *S. cerevisiae* у середовищі з концентрацією сірководню 9,4 мМ.

Через 8-10 год концентрацію сірководню доводили до початкової

Fig. 2. *S. Cerevisiae* grown in media with 9,4 mM hydrogen sulfide concentration. In 8-10 hours hydrogen sulfide concentration was reduced to initial concentration

За анаеробних умов (рис. 3) сірководень уже за концентрації 1,56 мМ інгібував ріст дріжджів приблизно в 4 рази. Ще більше пригнічення росту культури спостерігалось при концентрації  $\text{H}_2\text{S}$  3,1 мМ (рис. 3, в). Подальше зростання концентрації сірководню супроводжувалося повним інгібуванням росту дріжджів *S. cerevisiae* (рис. 3, г, д). Можливо, що в аеробних умовах дія сірководню скерована на зв'язування заліза цитохромоксидази [11], а в анаеробних — цинку алкогольдегідрогенази [3]. Пригнічення росту може бути також пов'язане із комплексною дією сірководню на різні ферменти [15]. Крім того, токсична дія сірководню може бути наслідком деполіаризації мембран [10].



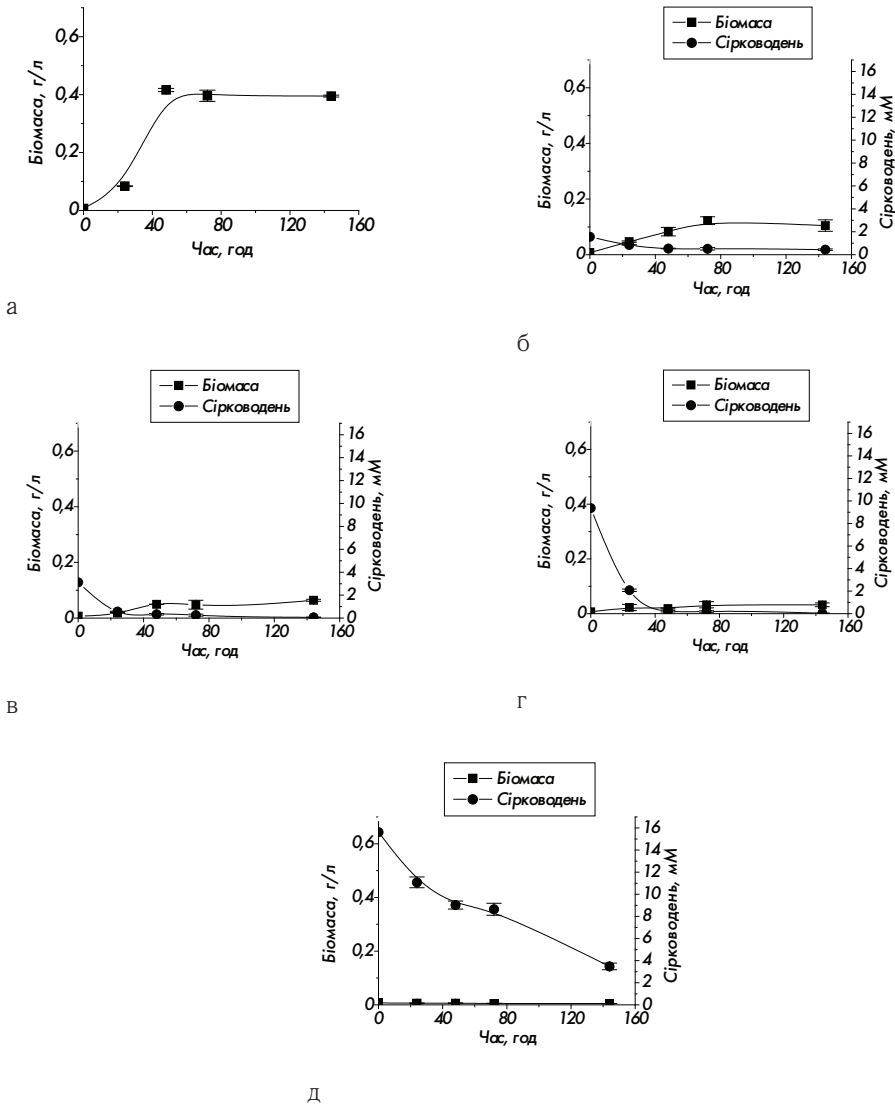
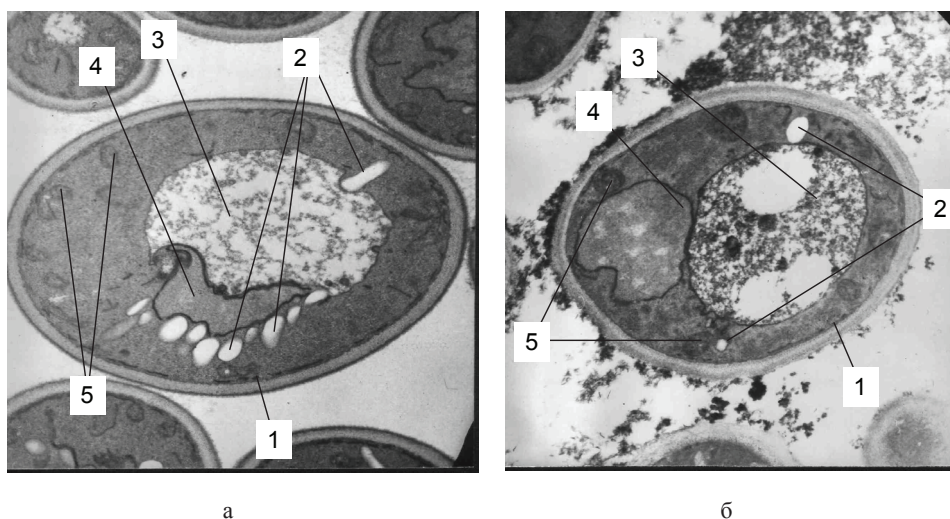


Рис. 3. Ріст *S. cerevisiae* у середовищах з різними концентраціями сірководню: а – без сірководню (контроль), б – 1,56 мМ, в – 3,1 мМ, г – 9,4 мМ, д – 15,6 мМ (анаеробні умови)

Fig. 3. *S. cerevisiae* growth in media with different concentrations of hydrogen sulfide under anaerobic conditions: а – without hydrogen sulfide (control), б – 1.56 mM, в – 3.1 mM, д – 9.4 mM, е – 15.6 mM (anaerobic conditions)

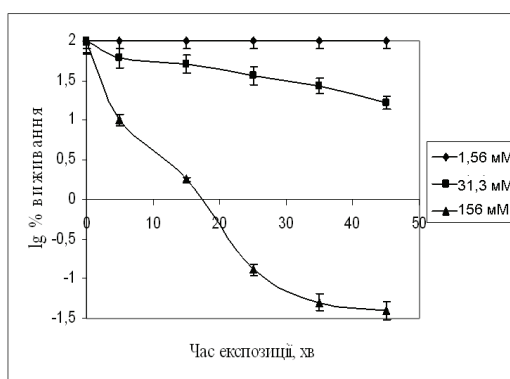
На електронномікроскопічних фотографіях досліджуваних дріжджів після їх оброблення гідроген сульфідом концентрацією 9,4 мМ видно, що в ультраструктурі клітин відбуваються помітні зміни. Вони, як видно з рис. 4, торкаються в першу чергу змін зовнішнього мананопротейінового шару клітинної стінки, а також цитоплазматичної мембрани. Помітні зміни спостерігаються у вакуолі.



**Рис. 4.** Вплив сірководню на ультраструктуру клітин *S. cerevisiae*  
 а — клітини, вирощені без сірководню (контроль), б — клітини, вирощені при концентрації сірководню 9,4 мМ  
 1 — цитоплазматична мембрана, 2 — включення жиру, 3 — вакуоля, 4 — ядро, 5 — мітохондрії

**Fig. 4.** Hydrogen sulfide effect upon cell ultrastructure of *S. cerevisiae*:  
 а — cells grown without hydrogen sulfide (control), б — cells grown under hydrogen sulfide concentration 9.4 mM  
 1 — cytoplasmic membrane, 2 — fat inclusions, 3 — vacuole, 4 — nucleus, 5 — mitochondria

Оскільки сірководень виявляє генотоксичну [4] та канцерогенну [8] дію, нами було досліджено мутагенну активність цієї сполуки. Для цього спочатку дослідили вплив різних концентрацій сірководню на виживання дріжджів за різного часу контакту клітин з ним. Сірководень в концентрації 1,56 мМ при 45 хв інкубації не спричиняв загибелі клітин (рис. 5).



**Рис. 5.** Вплив різних концентрацій сірководню на виживання *S. cerevisiae* D-67-S  
**Fig. 3.** Hydrogen sulfide different concentrations effect upon *S. cerevisiae* D-67-S survival



Збільшення концентрації сірководню до 31,3 мМ при такому ж часі експозиції спричиняло загибель клітин на рівні 84 %, а при концентрації 156 мМ він спричиняв загибель 98 % клітин протягом 15 хв. Для дослідження мутагенної дії сірководню використовували 45-хвилинне оброблення клітин сірководнем в концентрації 31,3 мМ, що забезпечувало 16 % виживання клітин (рис. 5.)

Було обстежено 93 тис. колоній і виявлено, що 21 з них при перенесенні у мінімальне середовище не росла. Багаторазові пересіви їх у рідке мінімальне середовище підтвердило, що вони втратили здатність синтезувати певні метаболіти і, таким чином, є ауксотрофними мутантами (табл. 1).

Частота виникнення ауксотрофних мутацій під впливом сірководню становила  $2,26 \cdot 10^{-4}$ .

Таблиця 1

**Ріст індукованих сірководнем мутантів *S. cerevisiae* D-67-S у рідких середовищах**

Table 1

**Growth of *S. cerevisiae* D-67-S mutants induced by hydrogen sulfide**

Штам	Біомаса після 24 год росту, г/л	
	Максимальне середовище	Мінімальне середовище
<i>S. cerevisiae</i> D-67-S	0,588 ± 0,007	0,493 ± 0,031
1	0,629 ± 0,011	0,023 ± 0,001
2	0,634 ± 0,007	0,019 ± 0,001
3	0,676 ± 0,004	0,023 ± 0,001
4	0,591 ± 0,019	0,028 ± 0,001
5	0,644 ± 0,006	0,028 ± 0,001
6	0,668 ± 0,003	0,024 ± 0,002
7	0,529 ± 0,009	0,021 ± 0,001
8	0,460 ± 0,003	0,013 ± 0,001
9	0,377 ± 0,024	0,011 ± 0,001
10	0,628 ± 0,006	0,027 ± 0,001
11	0,615 ± 0,007	0,010 ± 0,001
12	0,652 ± 0,006	0,013 ± 0,001
13	0,605 ± 0,010	0,011 ± 0,001
14	0,623 ± 0,003	0,010 ± 0,002
15	0,465 ± 0,003	0,013 ± 0,001
16	0,632 ± 0,006	0,013 ± 0,001
17	0,461 ± 0,005	0,022 ± 0,001
18	0,605 ± 0,004	0,016 ± 0,001
19	0,590 ± 0,009	0,014 ± 0,001
20	0,455 ± 0,010	0,009 ± 0,001
21	0,464 ± 0,002	0,011 ± 0,001



Таким чином, одержані нами результати показують, що сірководень виявляє і токсичну, і мутагенну дію на дріжджі *S. cerevisiae*. Токсична дія цієї сполуки проявляється як у аеробних, так і у анаеробних умовах. Крім того, сірководень спричиняє зміни в ультраструктурі клітинної стінки, цитоплазматичної мембрани та вакуолі.

*Автори висловлюють щире подяку провідному науковому співробітнику міжфакультетської лабораторії електронної мікроскопії Львівського національного університету імені Івана Франка О. Р. Кулачковському за проведення електронномікроскопічних досліджень.*

*Робота частково виконана за рахунок коштів Державного бюджету України в рамках проекту Державного фонду фундаментальних досліджень.*

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Лакин Г. Ф.* Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
2. *Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под. ред. Н. С. Егорова.* — М.: МГУ, 1983. — 215 с.
3. *Страер Л.* Биохимия: Пер. с англ. — М.: Мир, 1984. — Т. 1. — 232с.
4. *Attene-Ramos M. S., Wagner E. D., Plewa M. J., Gaskins H. R.* Evidence that hydrogen sulfide is a genotoxic agent // *Mol. Cancer Res.* — 2006. — V. 4, № 1. — P. 9–14.
5. *Burkholder P.* Influence of some environmental factors upon the production of riboflavin by yeasts // *Arch. Biochem.* — 1943. — V. 1, № 1. — P. 121–130.
6. *Cohen Y., Jorgensen B. B., Revsbech N. P., Poplawski R.* Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria // *Appl. Env. Microbiol.* — 1986. — V. 51, № 2. — P. 398-407.
7. *Dean G. A.* A simple colorimetric finish for the Johnson-Nishita micro-distillation of sulfur // *The Analyst.* — 1966 — V. 91, № 1085. — P. 530-532.
8. *Huycke M. M., Gaskins H. R.* Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models // *Experimental Biology and Medicine.* — 2004. — V. 229. — P. 586–597.
9. *Hydrogen sulfide: human health aspects [Electronic resource] / World health organization: Cicads 53.* — Geneva, 2003. — Access mode: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad53.htm>
10. *Julian D., April K L., Patel S., Stein J. R., Wohlgemuth S. E.* Mitochondrial depolarization following hydrogen sulfide exposure in erythrocytes from a sulfide-tolerant marine invertebrate // *Journ. Experim. Biol.* — 2005. — V. 208, № 21. — P. 4109-4122.
11. *Khan A. A., Schuler M. M., Prior M. G., Yong S., Coppock R. W., Florence L. Z., Lillie L. E.* Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats // *Tox. Appl. Pharm.* — 1990. — V. 103. — P. 482–490.
12. *Kuster E., Dorusch F., Altenburger R.* Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, and *Daphnia Magna* // *Environ. Toxicol. Chem.* — 2005. — V. 24, № 10. — P. 2621-2629.
13. *Lloyd K. G., Edgcomb V. P., Molyneaux S. J., Boer S., Wirsen C. O., Atkins M. S., Teske A.* Effects of dissolved sulfide, pH, and temperature on growth and survival of marine hyperthermophilic Archaea // *Appl. Env. Microbiol.* — 2005. — V. 71, № 10. — P. 6383–6387
14. *Miller S. R., Bebout B. M.* Variation in sulfide tolerance of photosystem II in phylogenetically diverse cyanobacteria from sulfidic habitats // *Appl. Env. Microbiol.* — 2004. — V. 70, № 2. — P. 736-744.
15. *Reiffenstein R. J., Hulbert W. C., Roth S. H.* Toxicology of hydrogen sulfide // *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.* — 1992. — V.32. — P. 109–134.
16. *Reynolds E. S.* The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // *J. Cell. Biol.* — 1963. — V. 17. — P. 208-212.





А. А. Галушка, Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,  
ул. Грушевского, 4, г. Львов, 79005, Украина, e-mail: a\_halushka@mail.ru

## ВЛИЯНИЕ СЕРОВОДОРОДА НА *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

### Реферат

Исследован рост *Saccharomyces cerevisiae* в средах с различными концентрациями сероводорода. Сероводород при концентрации 9,4 мМ полностью угнетает рост дрожжей в аэробных и анаэробных условиях. На электронно-микроскопических фотографиях клеток, обработанных сероводородом, хорошо видны изменения в клеточной стенке, цитоплазматической мембране и вакуоле.

Обработка клеток сероводородом концентрацией 31,3 мМ на протяжении 45 мин обеспечивает 16 % выживания дрожжей. Выделены ауксотрофные мутанты из клеток, обработанных сероводородом.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** сероводород, *Saccharomyces cerevisiae*, токсичность, мутагенность, ультраструктура.

A. A. Halushka, T. B. Peretyatko, S. P. Gudz

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Grushevskiy st., Lviv, 79005, Ukraine,  
tel.: 8 (032) 239 40 53, e-mail: a\_halushka@mail.ru

## INFLUENCE OF HYDROGEN SULFIDE ON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

### Summary

The growth of *Saccharomyces cerevisiae* in media with different hydrogen sulfide concentrations is investigated. At concentration of 9.4 mM hydrogen sulfide fully inhibited the growth of yeasts under aerobic and anaerobic conditions. On electron-microscopic photographs of the cells, treated with hydrogen sulfide, the changes in the cell wall, cytoplasmic membrane and vacuole are observed.

Cells treatment by hydrogen sulfide at concentration of 31.3 mM for 45 min caused 16 % of yeasts' survival. The auxotrophic mutants have been isolated from cells treated by hydrogen sulfide.

**K e y w o r d s:** hydrogen sulfide, *Saccharomyces cerevisiae*, toxicity, mutagenicity, ultrastructure.

