

**І.В. Кушкевич, С.О. Гнатуш**

Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна,  
тел.: +38 (096) 107 42 39, e-mail: Ivan\_Kushkevych@ukr.net

## **ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРІЙ *THIOCAPSA SP. YA-2003* ЗА ВПЛИВУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ**

*Досліджено ріст фототрофних пурпурових сіркобактерій *Thiocapsa sp. Ya-2003* за впливу різних концентрацій гідроген сульфіді. Показано, що внесення 6, 8 та 10 мМ  $H_2S$  інгібує ріст досліджуваних сіркобактерій, а також утилізацію ними гідроген сульфіді. Визначено активність супероксиддисмутази і каталази клітин *Thiocapsa sp. Ya-2003*. Встановлено, що гідроген сульфід інгібує досліджуванні ферменти клітин сіркобактерій вже у концентрації 6 мМ.*

*Ключові слова: пурпурові сіркобактерії, токсичність, гідроген сульфід, каталаза, супероксиддисмутаза.*

Утворення гідроген сульфіді спостерігають у Чорному морі, а також у водоймах сірководобувних кар'єрів. У Яворівському районі (Львівська область) унаслідок затоплення сірчаного кар'єру утворилося озеро площею 1080 га [1]. Наявність органічних сполук у воді озера Яворівське спричиняє розвиток сульфат- та сірководновлювальних бактерій, продуктом життєдіяльності яких є гідроген сульфід. Останній також може утворюватися у результаті вивільнення сульфурі з органічних сполук у процесі мінералізації.

У літературі є багато даних про дію гідроген сульфіді на організм людини, тварин та деякі мікроорганізми [2, 10, 14], проте не описано його вплив на аноксигенні фототрофні бактерії.

Фотосинтезувальні пурпурові сіркобактерії здатні використовувати гідроген сульфід при аноксигенному фотосинтезі. При цьому вони очищають від нього водне середовище [5] і є кормом для риб. Відомо, що найінтенсивніший ріст цих мікроорганізмів спостерігають за концентрації 4 мМ  $H_2S$  [11]. Проте, не відомий вплив високих концентрацій цієї сполуки на фотосинтезувальні сіркобактерії.

Метою роботи було дослідити вплив різних концентрацій гідроген сульфіді на нагромадження біомаси, його утилізацію, а також активність деяких ферментів системи антиоксидантного захисту пурпурових сіркобактерій *Thiocapsa sp. Ya-2003*.



### Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були фототрофні аноксигенні пурпурові сіркобактерії *Thiocapsa* sp. Ya-2003. Штами сіркобактерій виділені з води Яворівського озера, одержані в чистій культурі та ідентифіковані на кафедрі мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка [3].

Фототрофні пурпурові сіркобактерії *Thiocapsa* sp. Ya-2003 культивували у середовищі Ван Ніля (рН 7,5) протягом 10 діб за анаеробних умов при температурі +25...+28 °С. Освітлення при вирощуванні бактерій було цілодобовим, забезпечувалось лампою розжарювання потужністю 75 Вт.

З метою дослідження здатності сіркобактерій *Thiocapsa* sp. Ya-2003 рости за різних концентрацій гідроген сільфіді, до середовища вносили 5, 6, 8 та 10 мМ Na<sub>2</sub>S. Останній у водному середовищі гідролізується з утворенням H<sub>2</sub>S. Середовище Ван Ніля у своєму складі містить 4 мМ гідроген сульфіді. Це середовище (без додаткового внесення H<sub>2</sub>S) було контрольним у дослідженнях.

Біомасу визначали за мутністю суспензії клітин шляхом її фотометрування на фотоелектроколориметрі КФК-3 (λ=660 нм, оптичний шлях 3 мм).

Концентрацію гідроген сульфіді визначали за зміною оптичної густини внаслідок відновлення метиленового синього [15].

Для отримання безклітинних екстрактів до осаджених і промитих 0,9% розчином NaCl клітин додавали охолоджений екстрагуючий буфер (50 мМ калій-фосатний буфер, рН 7,5, 10<sup>-5</sup> М етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) — для зв'язування іонів важких металів, 10<sup>-5</sup> М фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) — для інгібування протеаз, функціонуючих при рН, вищих 7,0 і отримували суспензію клітин у концентрації 50–100 мг/мл.

Клітини руйнували на ультразвуковому дезінтеграторі УЗДН–2Т при 22 кГц протягом 5 хв при 0 °С. Отриману суспензію переносили в центрифужні пробірки і відокремлювали безклітинний екстракт від клітинних уламків центрифугуванням при 12–15 тис. об/хв при 4 °С протягом 30 хв на центрифугі ЦР-2.

Для вивчення впливу гідроген сульфіді на активність ферментів, вирощену культуру бактерій за різних концентрацій (4; 5; 6; 8 та 10 мМ) H<sub>2</sub>S, відбирали в експоненційній фазі росту, після цього отримували безклітинні екстракти і визначали активність ферментів. Концентрацію білка визначали методом Лоурі.

Активність каталази визначали спектрофотометрично за кількістю ферментованого гідроген пероксиду [13]. Активність супероксиддисмутази визначали за ступенем інгібування нею автоокиснення кверцетину, концентрацію якого вимірювали спектрофотометрично [4].

Основні статистичні показники вираховували за безпосередніми даними (трьохкратна повторність, середнє арифметичне — *M*, стандартна



похибка —  $m$ ). Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками сукупностей даних обраховували коефіцієнт Стьюдента. Достовірною вважалася різниця при показнику достовірності  $p > 0,05$  [8]. Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програми Excel та Origin.

### Результати та їх обговорення

Виділені з Яворівського озера сіркобактерії *Thiocapsa* sp. Ya-2003 на середовищі Ван Ніля утворювали колонії рожево-пурпурового кольору, оточені слизом (рис. 1). Вони ростуть лише на світлі за наявності в середовищі гідроген сульфід. При мікроскопуванні їх клітини мають сферичну або овальну форми діаметром 1,0–3,0 мкм. Клітини не містять газових вакуолей, нерухомі. Спостерігається контрастування глобул сірки всередині клітин, як це описано для представників пурпурових сіркобактерій [5, 11]. Мікроорганізми розміщуються поодинокі або в агрегатах по 2–4 клітини.



Рис. 1. Колонії бактерій *Thiocapsa* sp. Ya-2003 на агаризованому середовищі Ван Ніля

Fig. 1. Colonies of *Thiocapsa* sp. Ya-2003 bacteria on the Van Niel medium

Як показали результати наших досліджень, найбільша біомаса ( $2,59 \pm 0,07$  г/л) була на десяту добу у контрольному варіанті за концентрації 4 мМ гідроген сульфід у середовищі. Збільшення концентрації цієї сполуки до 5 мМ стимулює нагромадження біомаси бактерій протягом другої — шостої діб культивування (рис. 2). Після чого, спостерігається незначне інгібування росту *Thiocapsa* sp. Ya-2003.

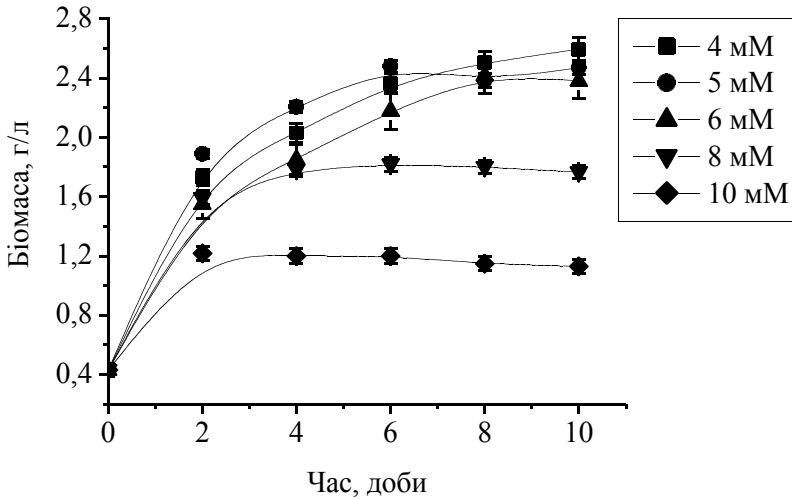


Рис. 2. Вплив гідроген сульфїду на рїст бактерїй *Thiocapsa* sp. Ya-2003

Fig. 2. The influence of hydrogen sulfide on the growth of *Thiocapsa* sp. Ya-2003 bacteria

Найбїльш виражене зниження бїомаси вїдбувалося за внесення 6, 8 та 10 мМ  $H_2S$  у середовище культивування. За цих концентрацїй рїст пригнїчувався на шосту добу, порївно з контролем, на 10, 29, 60%, вїдповїдно (рис. 2). Найменша бїомаса виявлялася за впливу 10 мМ гїдроген сульфїду.

Пригнїчення росту дослїджуваних бактерїй за впливу високих концентрацїй гїдроген сульфїду, можливо, обумовлено дїєю  $H_2S$  на мембрани цих клїтин та на їхнї компоненти: структурнї бїлки чи ферменти. Гїдроген сульфїд також впливає на мембранний чи внутрїшньоклїтинний транспорт [2], оскїльки вїдомо про його здатнїсть зв'язувати метали, якї можуть бути компонентами активних центрїв ферментїв, задїяних не лише у транспортї, але і в метаболїчних процесах.

Пурпуровї сїркобактерїї здїйснюють окиснення гїдроген сульфїду, який є донором електронїв у процесї аноксигенного фотосинтезу. У природнїх умовах цї бактерїї здїйснюють бїологїчне очищення води вїд цїєї токсичної сполуки [5, 11]. Як було показано, високї концентрацїї 6–10 мМ  $H_2S$  пригнїчують рїст пурпурових сїркобактерїй *Thiocapsa* sp. Ya-2003. Наступним завданням роботи було дослїдити використання гїдроген сульфїду дослїджуваними сїркобактерїями за рїзних його концентрацїй у середовищї.

Дослїдження показало, що найбїльше  $H_2S$  використовується сїркобактерїями *Thiocapsa* sp. Ya-2003 за його оптимальної концентрацїї — 4 мМ. На восьму добу його концентрацїя становила  $1,08 \pm 0,24$  мМ. За бїльших концентрацїй гїдроген сульфїд споживається менш інтенсивно, а при 8–10 мМ — практично не використовується (рис. 3).

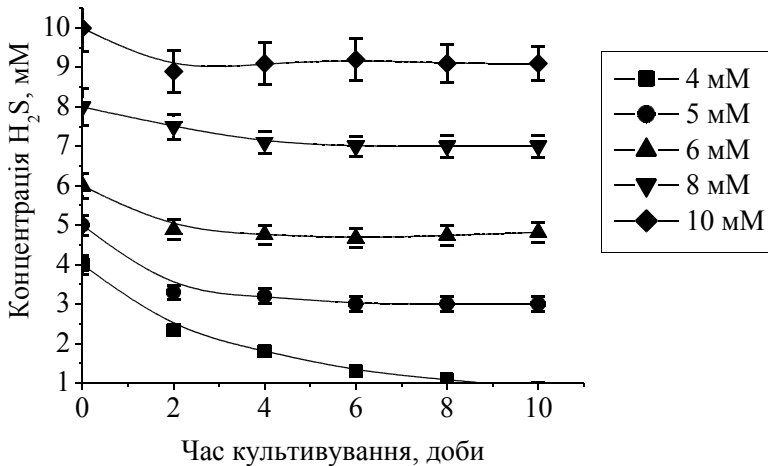


Рис. 3. Використання  $H_2S$  бактеріями *Thiocapsa* sp. Ya-2003 за впливу різних його концентрацій

Fig. 3. Utilization of  $H_2S$  by *Thiocapsa* sp. Ya-2003 bacteria under its different concentrations

Очевидно бактерії не використовують гідроген сульфід у високих концентраціях через пригнічення ростових процесів. За нижчих концентрацій  $H_2S$  (5 мМ) на восьму добу культура використала 60%  $H_2S$ , порівняно з початковою. Таким чином, за високих концентрацій утилізація гідроген сульфідом культурою значно сповільнюється. Можливо, зниження вмісту  $H_2S$  за його високих концентраціях обумовлене нагромадженням його у відмерлих клітинах за рахунок їх пошкодження.

Більшість пурпурових сіркобактерій є облигатними анаеробами [11]. Проте є дані, що окремі представники родини *Chromatiaceae*, зокрема *Thiocapsa roseopersicina*, здатні рости за аеробних або мікроаерофільних умов, що має важливе значення для розвитку та виживання цих мікроорганізмів у середовищах, де часто змінюється кисневий режим [9]. При цьому стійкість організмів до активних форм кисню обумовлена наявністю у них специфічної системи антиоксидантного захисту. Відомо, що основними ферментами цієї системи у пурпурових сіркобактерій є супероксиддисмутаза та каталаза [6, 7].

Як видно з результатів досліджень, гідроген сульфід у концентрації 5 мМ не впливав на активність супероксиддисмутази (СОД), а за 6–10 мМ  $H_2S$  у середовищі культивування, рівень активності фермента помітно зменшується (рис. 4). На шосту добу культивування при 8 мМ вона становила  $16,05 \pm 0,29$  ммоль/хв • мг білка, а при 10 мМ –  $13,11 \pm 0,24$  ммоль/хв • мг білка. У контрольному варіанті величина активності СОД на другу, четверту та шосту доби становила відповідно –  $18,34 \pm 0,38$ ;  $18,47 \pm 0,49$  та  $18,05 \pm 0,33$  ммоль/хв • мг білка. Можливо, супероксиддисмутаза активується певними кількостями сульфідом до межі, за якою починається інгібуючий вплив.

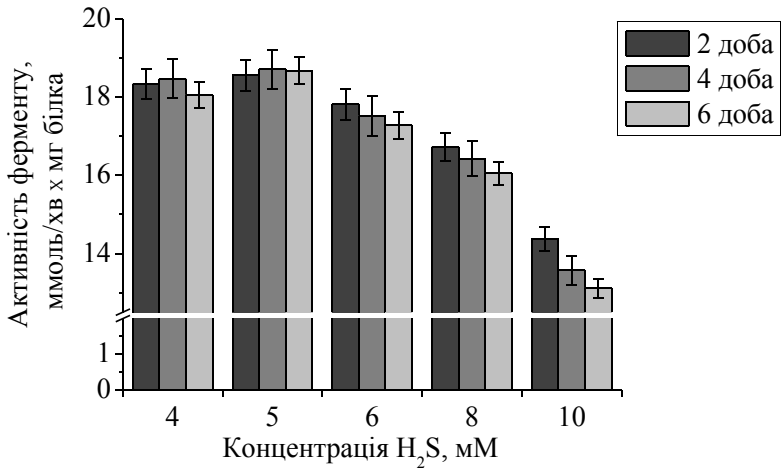


Рис. 4. Вплив гідроген сульфїду на активність супероксиддисмутази безклїтинних екстрактів сіркобактерїй *Thiocapsa sp. Ya-2003*

Fig. 4. The influence of hydrogen sulfide on superoxide dismutase activity of cell-free extracts sulfur *Thiocapsa sp. Ya-2003* bacteria

Отже, супероксиддисмутаза є чутливим ферментом до H<sub>2</sub>S у високих концентраціях.

Подібна закономірність спостерігається при дослідженні впливу різних концентрацій гідроген сульфїду на активність каталази (рис. 5). Отримані результати показали, що внесення у середовище гідроген сульфїду концентрацією 5 мМ, не спричиняло впливу на активність каталази у *Thiocapsa sp. Ya-2003*. Пригнічення активності відбувалося при додаванні в культуральне середовище 6, 8 і 10 мМ H<sub>2</sub>S.

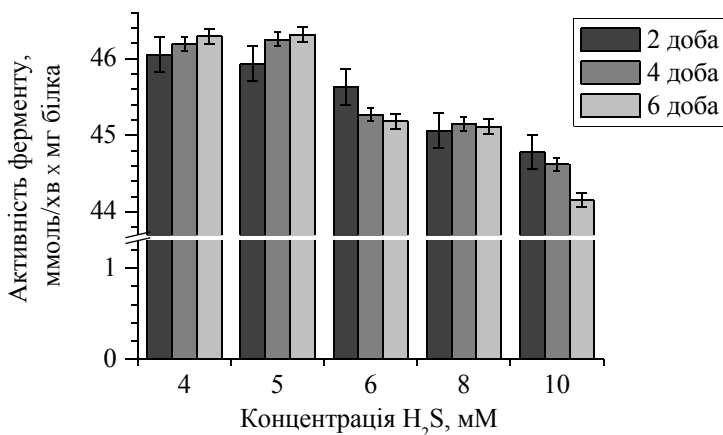


Рис. 5. Вплив гідроген сульфїду на активність каталази безклїтинних екстрактів сіркобактерїй *Thiocapsa sp. Ya-2003*

Fig. 5. The influence of hydrogen sulfide on the catalase activity of cell-free extracts sulfur *Thiocapsa sp. Ya-2003* bacteria



Таким чином, гідроген сульфід у концентрації 6, 8 та 10 мМ пригнічує нагромадження біомаси пурпуровими сіркобактеріями *Thiocapsa* sp. Ya-2003 на шосту добу на 10, 29, 60%, відповідно. У бактерій *Thiocapsa* sp. Ya-2003 інгібуючою концентрацією для СОД є 6 мМ  $H_2S$ . За впливу 10 мМ  $H_2S$  у середовищі активність ферменту інгібувалась на 28%. За цих умов також знижується активність каталази.

Припускаємо, що  $H_2S$  впливає на певний кофактор чи активний центр досліджуваних ферментів. Відомо, що транспорт металів в апобілки СОД здійснюють спеціальні білки, які належать до родини шаперонів — металошаперони. Їхня функція полягає у тому, щоб доставити метал-кофактор у фермент-мішень. У результаті цього фермент переходить з неактивного в активний стан [12]. Відомо, що існують кілька форм супероксиддисмутази залежно від перехідного металу-кофактора активного центру ферменту, який стабілізує конформацію: Cu, Mn, Zn-СОД, а також менш розповсюджені Fe-СОД та Ni-СОД. Каталаза в активному центрі містить іони феруму. Ферменти антиоксидантного захисту в пурпурових сіркобактерій є малодосліджені. Можливо, гідроген сульфід більш активно зв'язує іони металів з середовища, ніж білки, і вони не здатні потрапляти у клітини. Імовірно, дефіцит іонів металів у клітинах, які необхідні для ферментів, призводить до інгібування їх активності.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Гайдін А.М., Зозуля І.І. Яворівське озеро / Львів: ВАТ “Інститут гірничо-хімічної промисловості”. — 2007. — 70 с.
2. Галушка А., Перетятко Т., Гудзь С. Вплив гідроген сульфиду на *Escherichia coli* // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. — 2008. — Вип. 48. — С. 129–134.
3. Кім Л.Я. Пурпурові сіркобактерії водойм Яворівського сіркового родовища: морфологічна характеристика і роль у детоксикації сірководню. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. Львів, — 2009. — 20 с.
4. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы медицинской химии. — 1990. — Т. 36, № 2. — С. 88–91.
5. Кушкевич І.В., Гнатуш С.О. Аноксигенні фотосинтезувальні пурпурові бактерії. Біологічні Студії/Studia Biologica. — 2010. —Т. 4, № 3. —С. 137–154.
6. Кушкевич І.В., Кім Л.Я. Вплив атмосферного кисню на аноксигенні фототрофні пурпурові сіркобактерії. Матер. наук. конф. студентів біол. ф-ту ЛНУ імені Івана Франка. Львів, — 2004. — С. 47–51.
7. Кушкевич І.В., Кім Л.Я., Гнатуш С.О. Активність каталази та супероксиддисмутази у фототрофних сіркобактерій залежно від умов культивування: II Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів „Молодь і поступ біології”. Львів, — 2006. — С. 301–302.



8. Лакин Г.Ф. Биометрия // М.: Высш. шк., — 1990. — 352 с.
9. Петушкова Ю.П., Ивановский Р.Н. Дыхание клеток *Thiocapsa roseopersicina* // Микробиология. — 1976. — Вып. 1. — С. 389–395.
10. Beauchamp R.O., Bus J.S., Popp J.A. et al. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity / Critical reviews in toxicology. — 1984. — № 13. — P. 25–97.
11. Blankership R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Advances in Photosynthesis. USA. — 1995. — 1368 p.
12. Finney L.A., O'Halloran T.V. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors // Science. — 2003. — Vol. 300. — P. 931–936.
13. Luck H. Catalase // Methods in enzymatic analysis / H. — U. Bergmeyer ed. — London: Academic Press, — 1963. — P. 855–894.
14. Miller S.R. Variation in sulfide tolerance of photosystem II in phylogenetically diverse cyanobacteria from sulfidic habitats / S.R. Miller, B.M. Bebout // Applied and environmental microbiology. — 2004. — Vol. 70, № 2. — P. 736–744.
15. Пат. 6340596 США, МКИ G 01 N 33/00. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen / Masami Sugiyama (Японія); Fujirebio Inc. N248316; Заявл. 02.11.1999; Опубл. 22.01.2002; НКІ 436/121. — 9 с.

**И.В. Кушкевич, С.А. Гнатуш**

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,  
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина,  
тел.: +38 (096) 107 42 39, e-mail: Ivan\_Kushkevych@ukr.net

## **ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРИЙ *THIOCAPSA* SP. YA-2003 ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА**

### **Реферат**

Исследован рост фототрофных пурпурных серобактерий *Thiocapsa* sp. Ya-2003 под влиянием различных концентраций гидроген сульфида. Показано, что внесение 6, 8 и 10 мМ H<sub>2</sub>S ингибирует рост исследуемых серобактерий, а также утилизацию ими гидроген сульфида. Определены активность супероксиддисмутазы и каталазы клеток *Thiocapsa* sp. Ya-2003. Установлено, что гидроген сульфид ингибирует исследуемые ферменты клеток серобактерий уже в концентрации 6 мМ.

**К л ю ч е в ы е с л о в а :** пурпурные серобактерии, токсичность, гидроген сульфид, каталаза, супероксиддисмутаза.





**I.V. Kushkevych, S.O. Hnatysh**

Ivan Franko National University of Lviv,  
4, Hrushevski Str., Lviv 79005, Ukraine,  
tel.: +38 (096) 107 42 39, e-mail: Ivan\_Kushkevych@ukr.net

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS  
OF *THIOCAPSA* SP. YA-2003 BACTERIA UNDER THE  
INFLUENCE OF HYDROGEN SULFIDE**

**Summary**

The growth of phototrophic purple sulfur *Thiocapsa* sp. Ya-2003 bacteria under the influence of different concentrations of hydrogen sulfide was studied. The addition of 6, 8 and 10 mM H<sub>2</sub>S inhibited the growth of sulfur bacteria under study, as well as utilization of hydrogen sulfide by them was shown. Superoxide dismutase and catalase activity of *Thiocapsa* sp. Ya-2003 cells was determined. Hydrogen sulfide at concentration of 6 mM inhibits the investigated sulfur bacteria cell enzymes.

**Key words:** purple sulfur bacteria, toxicity, hydrogen sulfide, catalase, superoxide dismutase.

