

ЗМІНИ РОЗМІРНОГО РОЗПОДІЛУ ТА ВІДНОСНОГО ВМІСТУ КЛІТИН СІРКОВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* ЗА ВПЛИВУ СОЛЕЙ ПЕРЕХІДНИХ МЕТАЛІВ

О. Василів¹, С. Гнатуш¹, О. Білий², В. Гетьман², Я. Ференсович²

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
біологічний факультет, кафедра мікробіології
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: oresta.vasyliv@gmail.com

²Львівський національний університет імені Івана Франка
факультет електроніки, кафедра фізичної та біомедичної електроніки
вул. Драгоманова, 5, Львів 79005, Україна

Досліджено зміни розмірного розподілу та відносного вмісту клітин сірковідновлювальних бактерій *D. acetoxidans* упродовж п'яти діб їхнього культивування за впливу 0,01–10 мМ CoCl₂, NiCl₂ та MnCl₂. Максимум розмірного розподілу клітин бактерій змінювався у межах 0,55–0,70 мкм за наявності MnCl₂ в середовищі, 0,49–0,70 мкм – за впливу CoCl₂ та 0,55–0,62 мкм – за внесення NiCl₂. Зменшення півширини кривих розмірного розподілу та зростання відносного вмісту клітин із максимумом розмірного розподілу на третю добу культивування бактерій за впливу 0,01 мМ досліджуваних солей металів свідчило про найінтенсивніший поділ клітин протягом цього етапу культивування за наведених умов. Внесення 10 мМ MnCl₂ у ростове середовище *D. acetoxidans* зумовлювало підвищення поділу бактерій, порівняно з впливом аналогічних концентрацій NiCl₂ та CoCl₂.

Ключові слова: *Desulfuromonas acetoxidans*, максимум розмірного розподілу, півширина кривих розмірного розподілу, перехідні метали.

Проблема захисту навколишнього середовища від антропогенного забруднення різними металами надзвичайно актуальна. Одним із основних напрямів її розв'язання є застосування екологічних біотехнологій, що ґрунтуються на ефективних біологічних механізмах детоксикації небезпечних речовин мікроорганізмами [1, 11]. *Desulfuromonas acetoxidans* – безбарвні сірковідновлювальні бактерії розміром 0,4–0,8×1–4 мкм, що населяють збагачені сіркою водні середовища. Взаємодія гідроген сульфідів, який утворюється цими бактеріями, з іонами металів зумовлює їхнє часткове зв'язування та утворення нерозчинних осадів у формі метал сульфідів, що нівелює їхній токсичний вплив на живі організми.

Дослідження розмірного розподілу та відносного вмісту клітин бактерій нормальної мікрофлори природних середовищ, зокрема *D. acetoxidans*, за впливу різних концентрацій перехідних металів дасть змогу здійснити цілісний аналіз змін поділу та росту клітин за наведених умов із можливим встановленням механізмів їхньої резистентності за дії цих елементів. Визначення розмірного розподілу клітин оптичними методами, за літературними даними, можливе лише в рамках теорій Релея, Релея-Ганса і теорії розсіяння Мі [7, 14].

Для визначення вмісту клітин мікроорганізмів у середовищі використовують різноманітні методи їхньої реєстрації. Серед методів швидкої реєстрації наявності та кількості мікроорганізмів найширшого впровадження набули імунологічні методи із застосуванням різноманітних оптичних, електрохімічних, імуномагнітних методик з

використанням мікропроточних приладів і без їхнього застосування [9, 12]. До них належать метод розсіювання світла [13] та флуоресцентні методи, що ґрунтуються на аналізі зміни інтенсивності свічення молекул-маркерів при їхній взаємодії із клітинами бактерій. Поєднання флуоресцентних методів аналізу з методом розсіювання світла використовується у методі проточної цитометрії. Також широкого застосування набув метод визначення біомаси мікроорганізмів, що базується на реєстрації змін мутності рідкого поживного середовища у процесі культивування мікроорганізмів [10]. Недоліком вказаного способу реєстрації кількості мікроорганізмів є довготривалість аналізу та значні похибки вимірювань при низькій вихідній концентрації клітин мікроорганізмів на початку їхнього культивування. Метод швидкої реєстрації кількості бактерій, що базується на аналізі зміни інтенсивності свічення флуоресцентних молекул-маркерів у поєднанні із молекулярними фрагментами клітин бактерій значно чутливіший, порівняно з методом реєстрації мутності бактерійної суспензії. Флуоресцентні методи при певному підборі молекул-маркерів дають змогу реєструвати бактерійні культури на рівні 10 клітин/мл. Але складність і значна собівартість аналізу заважають його широкому використанню.

Розробка нових методів швидкої реєстрації змін розмірного розподілу та відносного вмісту клітин мікроорганізмів з високою чутливістю і низькою собівартістю є актуальною проблемою цитометричних досліджень.

Тому метою нашої роботи було дослідити зміни розмірного розподілу та відносного вмісту клітин сірководновольовальних бактерій *D. acetoxidans* за впливу кобальт (II) хлориду, нікель (II) хлориду та манган (II) хлориду в процесі їхнього культивування протягом п'яти діб за допомогою нового методу швидкої реєстрації клітин мікроорганізмів на основі змін їхніх світлорозсіювальних властивостей.

Матеріали та методи

Для визначення змін розмірного розподілу та відносного вмісту клітин бактерій *D. acetoxidans* запропоновано метод, що базується на реєстрації змін інтенсивності розсіяного світла шляхом статистичного набору змін амплітуди і тривалості імпульсів для частинок заданого розміру, побудові на основі одержаних даних вимірювання кореляційної функції, що виражає статистичні характеристики інтенсивності розсіювання світла досліджуваними клітинами, і одержання розподілу клітин за розмірами шляхом розв'язування інтегрального рівняння Фредгольма першого роду (1) [4, 8]:

$$F(U, t) = \int_{r_{\min}}^{r_{\max}} K(U, t, r) n(r) d(r), \quad (1)$$

де: r_{\min} і r_{\max} – верхня й нижня межі діапазону розмірів частинок, що реєструються; $n(r)$ – функція розподілу частинок за розмірами; $K(U, t, r)$ – функція розподілу нормованих значень амплітуд і тривалості реєстрованих імпульсів розсіяного світла калібрувальних частинок, отримана в результаті попереднього зондування потоку рідини монохроматичним когерентним світлом полімерних латексів заданого розміру, і відомим показником заломлення.

Бактерії *D. acetoxidans* культивували у модифікованому середовищі Постгейта С [3] протягом п'яти діб, визначаючи часову залежність зміни кількості клітин і фонових часток та їхніх розмірів у культуральному середовищі. Для цього поживне середовище з клітинами і без них розводили в однакових пропорціях у високоочищеній деіонізованій воді. Окремо визначали загальну кількість бактерійних клітин і фонових часток у пробах з клітинами, а також загальний розмірний розподіл фонових часток у пробах без клітин.

У вибраному інтервалі розмірів визначали кількість клітин бактерій і їхній відносний вміст шляхом розрахунку відношення кількості клітин у певному розмірному діапазоні до їхнього загального вмісту. Відносний вміст клітин вимірювали у відносних одиницях. На основі отриманих даних одержували залежності змін розмірного розподілу клітин і їхнього відносного вмісту у вибраному інтервалі розмірів з часом культивування.

При дослідженні впливу CoCl_2 , NiCl_2 та MnCl_2 на світлорозсіювальні параметри клітин *D. acetoxidans* з використанням описаного методу бактерії вирощували у пробірках об'ємом 20 мл у модифікованому середовищі Постгейта С при 28°C за анаеробних умов. У середовище вносили 0,01; 0,1; 1,0 та 10 мМ досліджуваних солей металів. Відбирали 1 мл суспензії бактерій через 1, 2, 3 та 4 доби культивування, розводили у 100 разів і проводили вимірювання за допомогою пристрою ПРМ-6М, розробленого на кафедрі фізичної та біомедичної електроніки факультету електроніки ЛНУ імені Івана Франка. Отримані результати порівнювали з контролем № 1 (середовище культивування бактерій, у яке додатково не вносили солей досліджуваних металів).

Основні характеристики пристрою швидкої реєстрації мікроорганізмів ПРМ-6М методом розсіювання світла наведені нижче:

Розмірний діапазон реєстрованих мікроорганізмів, мкм	0,2-10,0
Похибка вимірювання розмірів частинок, %	5,0
Концентрація мікрочастинок, клітин/мл	≥ 1000

З метою уникнення похибок, зумовлених додатковим світлорозсіянням частинками утворених метал сульфідів при дослідженні розмірного розподілу та відносного вмісту клітин *D. acetoxidans* за впливу CoCl_2 , NiCl_2 та MnCl_2 використовували контрольні проби № 2. Вони містили солі досліджуваних металів у відповідних концентраціях і середовище культивування бактерій в однакових об'ємах, порівняно з дослідними зразками, й еквівалентну кількість $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ до утвореного гідроген сульфід іону *D. acetoxidans* на певному етапі вирощування за відповідних умов культивування.

Кількість HS^- у культуральній рідині визначали фотометрично з використанням фотоелектроколориметра КФК-3 ($\lambda=665$ нм, кювета з оптичним шляхом 30 мм) за рівнем утворення метиленової сині в результаті взаємодії HS^- з п-аміно-диметиланіліном [2].

Результати і їхнє обговорення

Для цілісного аналізу особливостей росту й поділу клітин бактерій *D. acetoxidans* у процесі їхнього росту протягом п'яти діб за впливу 0,01–10 мМ CoCl_2 , MnCl_2 та NiCl_2 досліджували кореляцію між змінами їхнього максимуму розмірного розподілу, відносного вмісту з максимумом розмірного розподілу та півширини кривих розмірного розподілу.

Діапазон розмірного розподілу клітин *D. acetoxidans* становив 0,3–1,9 мкм. У контрольних зразках максимум розмірного розподілу клітин набував значень 0,49–0,55 мкм, а відносний вміст клітин із максимумом розмірного розподілу змінювався від 0,275 до 0,398 відносних одиниць при зростанні часу вирощування з першої до п'ятої доби (табл. 1). Півширина кривих розмірного розподілу зменшувалася від 0,23 до 0,14 мкм зі збільшенням часу культивування бактерій з першої по третю доби, що свідчить про звуження вибірки розмірів клітин зі зростанням часу їхнього вирощування. Це явище, очевидно, зумовлено інтенсивним поділом бактерій на третю-четверту доби культивування, у результаті чого підвищується відносний вміст клітин із нижчим максимумом розмірного розподілу (0,49 мкм), порівняно з його вихідним значенням (0,55 мкм). Ймовірне пригнічення поділу бактерій на п'яту добу призводило до зростання відносного вмісту клітин із максимумом розмірного розподілу (0,55 мкм).

Таблиця 1

Зміни максимуму розмірного розподілу клітин бактерій *D. acetoxidans*, їхнього відносного вмісту з максимумом розмірного розподілу та півширини кривих розмірного розподілу протягом п'яти діб культивування у контрольних зразках без додаткового внесення солей металів

Тривалість культивування, доба	Максимум розмірного розподілу клітин бактерій <i>D. acetoxidans</i> , мкм	Відносний вміст клітин із максимумом розмірного розподілу, відносні од.	Півширина кривих розмірного розподілу, мкм
1	0,55	0,275	0,23
2	0,55	0,268	0,23
3	0,55	0,420	0,14
4	0,49	0,383	0,14
5	0,55	0,398	0,16

Встановлено, що максимум розмірного розподілу клітин *D. acetoxidans* зменшувався від 0,62 до 0,49 мкм зі збільшенням тривалості культивування досліджуваних бактерій з першої по третю доби за впливу 0,01 мМ CoCl_2 у середовищі (табл. 2). Відносний вміст клітин із максимумом розмірного розподілу підвищився на 32% на третю добу вирощування бактерій, порівняно з його початковим значенням, а півширина кривої розмірного розподілу клітин зменшилася від 0,25 до 0,17 мкм, що свідчить про звуження вибірки клітин різних розмірів на цій фазі росту.

Таблиця 2

Зміни максимуму розмірного розподілу клітин бактерій *D. acetoxidans*, їхнього відносного вмісту з максимумом розмірного розподілу та півширини кривих розмірного розподілу протягом п'яти діб культивування за впливу 0,01 мМ та 10 мМ CoCl_2 у середовищі

Тривалість культивування, доба	Максимум розмірного розподілу клітин бактерій <i>D. acetoxidans</i> , мкм		Відносний вміст клітин із максимумом розмірного розподілу, відносні од.		Півширина кривих розмірного розподілу, мкм	
	Концентрація CoCl_2 у середовищі, мМ					
	0,01	10	0,01	10	0,01	10
1	0,62	0,55	0,249	0,329	0,25	0,19
2	0,62	0,55	0,261	0,266	0,25	0,26
3	0,49	0,62	0,328	0,259	0,17	0,25
4	0,49	0,70	0,289	0,176	0,22	0,43
5	0,55	0,62	0,415	0,320	0,15	0,19

Наведені зміни, очевидно, обумовлені зростанням інтенсивності поділу бактерій протягом цього часового періоду. Відомо, що іони Кобальту відіграють важливу роль у регуляції активності ферментів, зокрема тих, що здійснюють процеси трансамінування амінокислот [6]. Очевидно, за низьких концентрацій Co^{2+} зумовлюють пришвидшення поділу клітин досліджуваних бактерій порівняно з їхнім культивуванням за відсутності цього металу в середовищі.

Показано зміни світлорозсіювальних параметрів клітин сірковідновлювальних бактерій *D. acetoxidans* за впливу 10 мМ CoCl_2 у середовищі (табл. 2). Встановлено, що за наведених умов максимум розмірного розподілу клітин збільшувався від 0,55 до 0,70 мкм з першої по четверту доби культивування. Відносний вміст клітин із максимумом розмірного розподілу зменшувався на 87%, а півширина кривої розмірного розподілу зростала у 2,3 разу відповідно, порівняно з їхніми початковими значеннями протягом наведеного часу вирощування бактерій. Очевидно, за цього впливу солі Кобальту інтенсивно пригнічувалися процеси поділу клітин *D. acetoxidans*, унаслідок чого розмір

їхньої найвищої частки становив 0,70 мкм, що було більшим на 27%, порівняно з контролем. Можливо, це обумовлено відсутністю розходження клітин після поділу їхнього нуклеоїда внаслідок тривалого впливу високих концентрацій CoCl_2 на досліджувані бактерії. Високе значення півширини кривої розмірного розподілу, отримане на четверту добу культивування бактерій, свідчило про значну варіабельність розмірів клітин на цьому етапі вирощування. Отримані дані демонструють пригнічення процесів поділу клітин, порівняно з контрольними зразками. Інтенсивне зменшення півширини кривої розмірного розподілу клітин на п'яту добу культивування свідчить про зростання частки клітин із максимумом розмірного розподілу, що становив 0,62 мкм. Це показує наявність прямо пропорційної залежності пригнічення процесів поділу клітин *D. acetoxidans* при збільшенні тривалості впливу високого вмісту CoCl_2 у середовищі (10 мМ).

Досліджено вплив 0,01–10 мМ NiCl_2 на зміни максимуму розмірного розподілу клітин, їхнього відносного вмісту з максимумом розмірного розподілу та півширину кривих розмірного розподілу протягом п'яти діб культивування (табл. 3). Встановлено, що за внесення нікель (II) хлориду в концентрації 0,01 мМ у середовище вирощування бактерій максимум розмірного розподілу клітин змінювався у межах 0,55–0,62 мкм. Зменшення півширини кривої розмірного розподілу на 57% на третю добу культивування, порівняно з її початковим значенням, свідчить про низьку варіабельність розмірів клітин на цьому етапі вирощування. При цьому спостерігали інтенсивне зростання відносного вмісту клітин із максимумом розмірного розподілу, що становив 0,55 мкм. Отримані дані демонструють підвищення інтенсивності процесів поділу клітин на третю добу їхнього культивування. Максимум розмірного розподілу клітин не змінювався, порівняно з його значенням, отриманим у контрольних зразках на цьому етапі вирощування бактерій, що свідчить про відсутність негативного впливу наведеної концентрації солі Нікелю (0,01 мМ) на процеси росту й поділу *D. acetoxidans*. Часткове збільшення максимуму розмірного розподілу клітин протягом першої та другої діб культивування бактерій, порівняно з контролем, імовірно, зумовлене інтенсивнішим зростанням розмірів клітин за наявності іонів Нікелю у середовищі, що можуть використовуватись *D. acetoxidans* як мікроелементи, необхідні для функціонування їхніх ферментів, зокрема NiFe-гідрогенази тощо [5].

Таблиця 3

Зміни максимуму розмірного розподілу клітин бактерій *D. acetoxidans*, їхнього відносного вмісту з максимумом розмірного розподілу та півширини кривих розмірного розподілу протягом п'яти діб культивування за впливу 0,01 мМ та 10 мМ NiCl_2 у середовищі

Тривалість культивування, доба	Максимум розмірного розподілу клітин бактерій <i>D. acetoxidans</i> , мкм		Відносний вміст клітин із максимумом розмірного розподілу, відносні од.		Півширина кривих розмірного розподілу, мкм	
	Концентрація NiCl_2 у середовищі, мМ					
	0,01	10	0,01	10	0,01	10
1	0,55-0,62	0,49-0,55	0,165-0,171	0,178-0,179	0,36	0,34
2	0,55-0,62	0,55-0,62	0,183-0,175	0,173-0,168	0,32	0,31
3	0,55	0,55	0,249	0,200	0,23	0,28
4	0,55	0,55	0,187	0,172	0,30	0,33
5	0,55	0,55	0,254	0,237	0,21	0,27

Показано, що півширина кривих розмірного розподілу клітин *D. acetoxidans* не знає суттєвих змін протягом п'яти діб культивування бактерій за впливу 10 мМ нікель (II) хлориду в середовищі (табл. 3). Це свідчить про незначну варіабельність вибірки розмірів

клітин протягом досліджуваного часу культивування, що обумовлено низькою інтенсивністю процесів їхнього поділу. Незначне зростання відносного вмісту клітин із максимумом розмірного розподілу на третю і п'яту доби культивування, ймовірно, обумовлено частковим підвищенням проходження їхнього поділу, в результаті чого максимум розмірного розподілу клітин набував стабільного значення – 0,55 мкм.

Отже, NiCl_2 зумовлює часткове інгібування поділу *D. acetoxidans* за високих концентрацій, тоді як за низького вмісту в середовищі сприяє зростанню розмірів їхніх клітин на початкових етапах впливу та подальший інтенсивний поділ.

Досліджено зміни максимуму розмірного розподілу клітин *D. acetoxidans*, їхнього відносного вмісту з максимумом розмірного розподілу та півширини кривих розмірного розподілу за впливу 0,01 мМ MnCl_2 протягом п'яти діб культивування (табл. 4). Встановлено, що за наявності мінімальної досліджуваної концентрації манган (II) хлориду в середовищі максимум розмірного розподілу клітин зменшувався з 0,55 до 0,49 мкм на третю добу їхнього культивування з одночасним зменшенням півширини кривої розмірного розподілу на 83% та збільшенням відносного вмісту клітин із максимумом розмірного розподілу на 32%, порівняно з їхніми вихідними значеннями. Це, очевидно, свідчить про високу активність процесів поділу клітин *D. acetoxidans* за наведених умов культивування протягом досліджуваного часового періоду внаслідок інтенсивного зростання частки клітин однакового розміру, значення якого є меншим, порівняно з даними, отриманими на початкових етапах їхнього вирощування.

Таблиця 4

Зміни максимуму розмірного розподілу клітин бактерій *D. acetoxidans*, їхнього відносного вмісту з максимумом розмірного розподілу та півширини кривих розмірного розподілу протягом п'яти діб культивування за впливу 0,01 та 10 мМ MnCl_2 у середовищі

Тривалість культивування, доба	Максимум розмірного розподілу клітин бактерій <i>D. acetoxidans</i> , мкм		Відносний вміст клітин із максимумом розмірного розподілу, відносні од.		Півширина кривих розмірного розподілу, мкм	
	Концентрація MnCl_2 у середовищі, мМ					
	0,01	10	0,01	10	0,01	10
1	0,55	0,70	0,344	0,224	0,22	0,34
2	0,55	0,55	0,277	0,450	0,22	0,14
3	0,49	0,62	0,453	0,252	0,12	0,26
4	0,49	0,49	0,247	0,419	0,25	0,14
5	0,55	0,55	0,378	0,373	0,16	0,16

Зростання часу культивування бактерій до п'ятої доби зумовлювало підвищення відносного вмісту клітин із максимумом розмірного розподілу, що становив 0,55 мкм, з одночасним зменшенням півширини кривої розмірного розподілу. Отримані дані свідчать про пригнічення інтенсивності процесів поділу клітин зі збільшенням часу культивування та зростання частки клітин більшого розміру, порівняно з попередніми етапами культивування за наведених умов. Отже, низький вміст MnCl_2 у середовищі не виявляє негативного впливу на процеси поділу досліджуваних бактерій.

Проаналізовано зміни світлорозсіювальних властивостей клітин *D. acetoxidans* за впливу 10 мМ MnCl_2 у середовищі (табл. 4). Встановлено зменшення максимуму розмірного розподілу клітин від 0,70 до 0,55 мкм та відповідне звуження півширини кривої розмірного розподілу в 2,4 рази з першої по другу доби їхнього культивування. Це свідчить

про швидке зростання розміру клітин на початкових етапах дії солі Мангану та про їхній подальший інтенсивний поділ зі зменшенням значення максимуму розмірного розподілу на 27%, порівняно з першою добою. При подальшому культивуванні бактерій цей параметр підвищувався від 0,55 до 0,62 мкм з одночасним зростанням півширини кривої розмірного розподілу як результату пригнічення поділу клітин. На четверту добу вирощування спостерігали зменшення значення максимуму розмірного розподілу до 0,49 мкм та звуження півширини кривої розмірного розподілу на 86%, порівняно з попередньою добою, що, очевидно, свідчить про ймовірне відновлення поділу клітин. Подальше культивування бактерій продемонструвало зростання максимуму розмірного розподілу клітин від 0,49 до 0,55 мкм з незначним підвищенням півширини кривої розмірного розподілу, що, ймовірно, є результатом часткового пригнічення процесів поділу *D. acetoxidans*. Очевидно, за високого вмісту манган (II) хлориду в середовищі скорочуються фази росту досліджуваних бактерій, порівняно з контролем, внаслідок чого пришвидшуються процеси їхнього поділу.

Отже, внаслідок проведених досліджень встановлено, що за впливу 0,01–10 мМ солей Мангану, Кобальту й Нікелю на сірковідновлювальні бактерії *D. acetoxidans* протягом п'яти діб вирощування максимум розмірного розподілу клітин змінювався у межах 0,55–0,70 мкм за впливу $MnCl_2$, 0,49–0,70 мкм – за наявності $CoCl_2$ у середовищі вирощування бактерій та 0,55–0,62 мкм – за впливу досліджуваних концентрацій $NiCl_2$. За внесення 0,01 мМ досліджуваних солей металів у середовище культивування бактерій найнижче значення півширини кривих розмірного розподілу клітин було зафіксовано на третю добу культивування, що свідчить про вузьку вибірку їхніх розмірів і відповідно інтенсивний поділ за цих умов. Це підтверджується інтенсивним підвищенням відносного вмісту клітин із максимумом розмірного розподілу протягом цього періоду вирощування бактерій, порівняно з першою та другою добами їхнього культивування. Наявність 10 мМ $MnCl_2$ у середовищі культивування *D. acetoxidans* зумовлювала значну мінливість максимуму розмірного розподілу клітин, півширини кривих їхнього розмірного розподілу та відносного вмісту з максимумом розмірного розподілу, порівняно з впливом наведеної концентрації інших солей металів протягом п'яти діб культивування. Очевидно, високі концентрації Мангану зумовлюють пришвидшення перебігу процесів поділу клітин бактерій *D. acetoxidans*.

Отримані результати можуть стати основою для розробки нових високочутливих селективних біосенсорів забруднення навколишнього середовища різними металами на підставі аналізу залежностей між змінами розмірів клітин нормальної мікрофлори навколишнього середовища, зокрема сірковідновлювальних бактерій, і наявністю різних концентрацій Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} тощо у їхніх екологічних нішах. Також наведений метод дає можливість простежувати зміни поділу клітин мікроорганізмів, що може використовуватися для аналізу цих процесів за різних умов їхнього культивування, а також для розробки ефективних цитометрів із низькою собівартістю й високою швидкодією.

Вперше застосовано новий високочутливий метод визначення змін світлорозсіювальних параметрів клітин для дослідження впливу солей перехідних металів на розмірний розподіл і відносний вміст клітин бактерій *D. acetoxidans*. Встановлено, що за впливу 0,01–10 мМ солей перехідних металів протягом п'яти діб культивування бактерій максимум розмірного розподілу клітин змінюється у межах 0,55–0,70 мкм за наявності $MnCl_2$ у середовищі, 0,49–0,70 мкм – за впливу $CoCl_2$ та 0,55–0,62 мкм – за внесення $NiCl_2$. Значення півширини кривих розмірного розподілу клітин *D. acetoxidans* суттєво знижуються на третю добу їхнього культивування з одночасним підвищенням відносного вмісту клітин

із максимумом розмірного розподілу за впливу 0,01 мМ досліджуваних солей металів, що свідчить про найінтенсивніший поділ бактерій за наведених умов протягом цього періоду росту. За дії 10 мМ $MnCl_2$ на *D. acetoxidans* швидкість поділу їхніх клітин зростає, порівняно з впливом цих концентрацій $NiCl_2$ та $CoCl_2$.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Таширеєв А. Б.* Взаимодействие микроорганизмов с металлами // Микробиол. журн. 1995. Т. 57. № 2. С. 95–104.
2. Пат. 6340596 США, МКИ G 01 N 33/00 Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen sulfide / Sugiyama M. (Японія); Fujirebio Inc. N 6340596; Заявл. 11.02.1999; Опубл. 22.01.2002; НКИ 436/121. 9 с.
3. *Biebl H., Pfenning N.* Growth of sulfate-reducing bacteria with sulfur as electron acceptor // Arch. Microbiol. 1977. Vol. 112. P. 115–117.
4. *Bilyy O. I., Getman V. B., Kostyukevych S. O.* New method for investigation of cells and other biological objects in analytical cytology // Proc. SPIE. 2001. Vol. 4260. P. 249–254.
5. *Brugna M., Nitschke W., Toci R.* et al. First evidence for the presence of a hydrogenase in the sulfur-reducing bacterium *Desulfuromonas acetoxidans* // J. Bacteriol. 1999. Vol. 181. N 17. P. 5505–5508.
6. *Cavet S. J., Borrelly G. M., Robinson N. J.* Zn, Cu, Co in cyanobacteria: selective control of metal availability // FEMS Microbiol. Reviews. 2003. Vol. 27. P. 165–181.
7. *Katz A., Alimova A., Xu M.* Bacteria size determination by elastic light scattering // IEEE J. Selected Topics in Quantum Electronics. 2003. Vol. 9. N 2. P. 277–287.
8. *Kotsyumbas I. Ya., Kushnir I. M., Bilyy R. O.* et al. Light scattering application for bacterial cell monitoring during cultivation process // Proc. SPIE. 2007. Vol. 6631. P. 66311I–8I – 8.
9. *Lazcka O., Campob F., Munoz F.* Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors // Biosensor and Bioelectronics. 2007. Vol. 22. N 7. P. 1205–1217.
10. *Marcelis J. H., Versteeg H., Beck H. J., Vinke D.* Semielectronic turbidimeter for automated monitoring of bacterial growth in test tubes // Appl. Environ. Microbiol. 1980. Vol. 39. N 2. P. 281–284.
11. *Nies D. H.* Minireview: microbial heavy-metal resistance // Appl. Microbial Biotechnol. 1999. Vol. 51. P. 730–750.
12. *Sakamoto C., Yamaguchi N., Yamada M.* et al. **Rapid quantification of bacterial cells in portable water using a simplified microfluidic device** // J. Microbiolog. Methods. 2007. Vol. 68. N 3. P. 643–647.
13. *Wang R., Liow E., Keay P.* Detection of *Escherichia coli* O157 in raw beef using a ccd based light scattering instrument // J. Rapid Methods and Automation in Microbiol. 2002. Vol. 10. N 4. P. 245–254.
14. *Yguerabide J., Yguerabide E.* Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications // Analytical Biochem. 1998. Vol. 262. N 2. P. 137–156.

Стаття: надійшла до редакції 14.09.12

прийнята до друку 16.11.12

**CHANGES OF SIZE DISTRIBUTION AND RELATIVE CONTENT
OF SULFUR-REDUCING *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* BACTERIAL
CELLS UNDER THE INFLUENCE OF TRANSITION METAL SALTS**

O. Vasyliv¹, S. Hnatush¹, O. Bilyy², V. Hetman², Ya. Ferensovych²

¹*Ivan Franko National University of Lviv
Biological Faculty, Department of Microbiology
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: oresta.vasyliv@gmail.com*

²*Ivan Franko National University of Lviv
Faculty of Electronics, Department of Physical and Biomedical Electronics
50, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

Changes of cell size distribution and their relative content of sulfur-reducing *Desulfuromonas acetoxidans* bacteria under the influence of 0.01–10 mM of CoCl₂, NiCl₂ and MnCl₂ have been investigated during five days of bacterial cultivation. Cell size distribution maximum changed in the range of 0.55–0.70 μm under the addition of MnCl₂ into growth medium, 0.49–0.70 μm under the influence of CoCl₂ and 0.55–0.62 μm under the addition of NiCl₂. Decreasing of half-width of cell size distribution curve and increasing of cells relative content with size distribution maximum by third day of bacterial cultivation under the influence of 0.01 mM of investigated metal salts showed the most intensive cells division during this stage of their growth under chosen cultivation conditions. Addition of 10 mM of MnCl₂ into *D. acetoxidans* growth medium caused enhancement of bacterial division in comparison with the influence of the same NiCl₂ and CoCl₂ concentrations.

Keywords: *Desulfuromonas acetoxidans*, size distribution maximum, half-width of size distribution curves, transition metals.

**ИЗМЕНЕНИЕ РАЗМЕРНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ОТНОСИТЕЛЬНОГО
СОДЕРЖАНИЯ КЛЕТОК СЕРОВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ
БАКТЕРИЙ *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* ПРИ ВЛИЯНИИ
СОЛЕЙ ПЕРЕХОДНЫХ МЕТАЛЛОВ**

О. Васи́ливі, С. Гнатуш, А. Білий, В. Гетьман, Я. Ференсович

¹*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
биологический факультет, кафедра микробиологии
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: oresta.vasyliv@gmail.com*

²*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
факультет электроники, кафедра физической и биомедицинской
электроники
ул. Драгоманова, 50, Львов 79005, Украина*

Исследовано изменение размерного распределения и относительного содержания клеток серовосстанавливающих бактерий *D. acetoxidans* при воздействии 0,01–10 мМ CoCl₂, NiCl₂ и MnCl₂ в течение пяти суток их культивирования. Максимумы

размерного распределения клеток бактерий наблюдали в пределах 0,55–0,70 мкм при наличии $MnCl_2$ в среде, 0,49–0,70 мкм – при влиянии $CoCl_2$ и 0,55–0,62 мкм – при внесении $NiCl_2$. Уменьшение полуширины кривой размерного распределения и увеличение относительного содержания клеток с максимумом размерного распределения на третьи сутки культивирования бактерий при воздействии 0,01 мМ исследуемых солей металлов свидетельствовало о наиболее интенсивном делении клеток на этом этапе культивирования при заданных условиях. Внесение 10 мМ $MnCl_2$ в ростовую среду *D. acetoxidans* приводило к повышению деления бактерий по сравнению с влиянием аналогичных концентраций $NiCl_2$ и $CoCl_2$.

Ключевые слова: *Desulfuromonas acetoxidans*, максимум размерного распределения, полуширина кривых размерного распределения, переходные металлы.