ВІСНИК ЛЬВІВ. УН-ТУ *VISNYK OF LVIV UNIV.*
Серія біологічна. 2008. Вип. 48. С. 129-134 *Biology series. 2008. Is. 48. P. 129-134*

Мікробіологія

УДК 579.842.11:579.243:579.23:579.26

ВПЛИВ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА *ESCHERICHIA COLI*[*]

А. Галушка, Т. Перетятко, С. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: a_halushka@mail.ru

Гідроген сульфід концентрацією 18,8 мМ повністю пригнічує ріст бактерій *Escherichia coli* в аеробних умовах. За анаеробних умов вони виявилися стійкішими до цієї сполуки. При контакті з гідроген сульфідом концентрацією 94 мМ протягом 10 хв спостерігається загибель 50% клітин бактерій. При дії гідроген сульфіду у клітинах *E. coli* відбувається відшарування внутрішньої мембрани клітинної стінки та нагромадження електроннощільних речовин.

Ключові слова: гідроген сульфід, *Escherichia coli*, токсичність, ріст, виживання, ультраструктура.

Гідроген сульфід виявляє токсичну та мутагенну дію на живі організми. Зокрема, він спричиняє неврологічні, очні, нюхові розлади, може призводити до змін у нервовій, серцево-судинній і сечостатевій системах тварин та людини. Високі концентрації гідроген сульфіду можуть спричинити летальні наслідки [7]. Встановлена його мутагенна дія на дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* [6].

Проблема забруднення повітря гідроген сульфідом актуальна в місцях діяльності нафтопереробних, гумових заводів тощо. Особливо актуальною ця проблема стає в сірковидобувних регіонах, де внаслідок окиснення сірки нагромаджується велика кількість сульфатів. За наявності органічних сполук вони перетворюються сульфатвідновлювальними бактеріями до H_2S [3], вміст якого у середовищі часто перевищує гранично допустимі концентрації [2]. Як результат, спостерігається хронічна інтоксикація працівників підприємств і жителів прилеглих територій.

Механізми впливу гідроген сульфіду на живі організми досліджені недостатньо [7]. Зручними моделями для вивчення дії цієї сполуки можуть бути мікроорганізми. У цій роботі наведені результати дослідження впливу гідроген сульфіду на *Escherichia coli*.

Об'єктом досліджень були бактерії *E. coli*.

Бактерії вирощували у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) та на м'ясо-пептонному агарі (МПА) при температурі 37ºС.

Для дослідження впливу гідроген сульфіду на ріст бактерій в аеробних умовах їх вирощували у 50 мл колбах Ерленмейєра, закритих ватно-марлевими корками, у яких містилося 15 мл середовища із різними концентраціями гідроген сульфіду: 0, 9,4, 18,8 та 25 мМ. У процесі вирощування бактерій, що тривало 80 год, вимірювали біомасу та концентрацію гідроген сульфіду. Для створення анаеробних умов бактерії вирощували у пробірках, вщерть заповнених середовищем і закритих гумовими корками.

Біомасу вимірювали турбідиметрично за допомогою КФК-3 при довжині хвилі 520 нм.

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

© Галушка А., Перетятко Т., Гудзь С., 2008

Концентрацію гідроген сульфіду у культуральній рідині визначали турбідиметрично [5, 12] на КФК-3. Клітини відділяли центрифугуванням при 8 000 об/хв протягом 20 хв. Для визначення кількості гідроген сульфіду, що випаровується у процесі роботи, ставили контрольний варіант без клітин.

Виживання *E. coli* під впливом гідроген сульфіду визначили в середовищі, що містило 94 мМ цієї сполуки. У цих експериментах використовували однодобову культуру *E. coli*, вирощену на МПА. Суспензію клітин, змитих з агару, стерильно розливали в 10 пробірок по 3 мл в кожну і вносили розчин натрій сульфіду. Час, протягом якого клітини обробляли гідроген сульфідом, становив 12, 15, 18, 23, 30 та 60 хв. Контролем були клітини, до яких Na_2S не додавали. Оброблену в такий спосіб суспензію використовували для посіву на чашки Петрі з агаризованим середовищем. Чашки поміщали в термостат на 2 доби при 37ºС.

Зміни у структурі клітин вивчали за допомогою електронної мікроскопії. Для цього двічі відмиті стерильною водопровідною водою клітини осаджували цетрифугуванням при 10 000 об/хв протягом 15 хв. Клітини фіксували в 1,5% розчині OsO_4 у какодилатному буфері (рН 7,2) протягом 90 хв при 0ºС. Фіксовані клітини зневоднювали у розчинах зі зростаючими концентраціями етанолу і пропілен оксиду та переносили в епоксидну смолу Embed 812. Ультратонкі зрізи клітин отримували на ультрамікротомі УМТП–6 і контрастували плюмбум цитратом за Рейнольдсом [11]. Перегляд і фотографування зразків проводили на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 при прискорюючій напрузі 75 кВ.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми “Origin 6,1”. Вибір тактики статистичної обробки і підготовку даних для аналізу здійснювали, базуючись на загальноприйнятих методах [1] при рівні достовірності $P<0,05$.

Спочатку дослідили чутливість бактерій до гідроген сульфіду. Для цього вивчали ріст і виживання *E. coli* під дією цієї сполуки. Оскільки бактерії *E. coli* – це факультативні анаероби, дослідження росту культури проводили в аеробних і анаеробних умовах.

Як видно із рис. 1, в аеробних умовах за концентрації гідроген сульфіду 9,4 мМ відбувалося незначне пригнічення росту бактерій, зниження рівня біомаси становило лише 26%. За концентрації 18,8 мМ спостерігалося повне пригнічення росту бактерій. Ріст бактерій при цьому частково відновлювався лише після повного звільнення середовища від гідроген сульфіду. За наявності в середовищі 25 мМ гідроген сульфіду росту бактерій протягом трьох діб не спостерігалось.

За анаеробних умов культивування гідроген сульфід також мав виражений інгібуючий ефект. За концентрації гідроген сульфіду в середовищі 18,8 мМ на 32-гу год рівень біомаси становив 39% від контролю (рис. 2), на відміну від аеробних умов, коли ріст пригнічувався повністю (рис. 1, *в*). За концентрації гідроген сульфіду 25 мМ за анаеробних умов росту бактерій не спостерігалось (рис. 2).

Таким чином, бактерії *E. coli* виявилися стійкішими до дії гідроген сульфіду при рості в анаеробних умовах, ніж в аеробних. Очевидно, у цих бактерій гідроген сульфід пригнічує процес дихання. Подібні результати отримані Кханом зі співавторами [8], які показали, що токсичність гідроген сульфіду в основному пов’язана з інгібуванням цитохромоксидази – ключового ферменту дихального ланцюга.

Порівняно з іншими мікроорганізмами, бактерії *E. coli* виявилися значно стійкішими до цієї сполуки, ніж представники деяких родів ціанобактерій [4, 10], проте набагато чутливішими, ніж представники археїв (зокрема, *Methanocaldococcus jannaschii* та *Archaeoglobus profundus*, які здатні до росту при концентраціях гідроген сульфіду до 80 та 60 мМ, відповідно) [9].

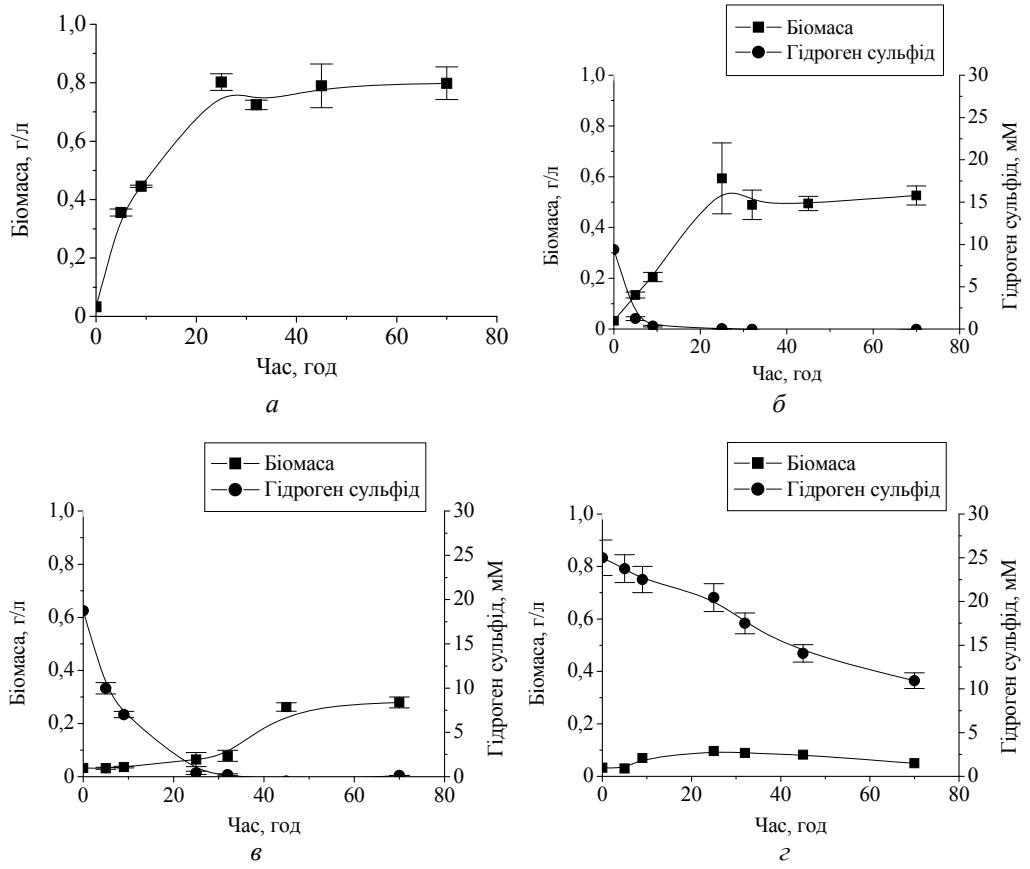

Рис. 1. Ріст бактерій *E. coli* за аеробних умов у середовищах із різними концентраціями гідроген сульфіду: *а* – без гідроген сульфіду (контроль); *б* – 9,4 мМ; *в* – 18,8 мМ; *г* – 25 мМ.

Іншим критерієм чутливості організмів до дії токсичних речовин є їх виживання за наявності цих речовин. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження виживання *E. coli* під впливом гідроген сульфіду. Як уже згадувалося, при рості в аеробних умовах гідроген сульфід концентрацією 9,4 мМ спричиняв часткове пригнічення росту. Для дослідження виживання клітин концентрацію гідроген сульфіду збільшили в 10 разів.

При обробленні клітин бактерій гідроген сульфідом у концентрації 94 мМ протягом 15 хв кількість клітин, які вижили, становила 39%. При збільшенні часу інкубації клітин до 60 хв показник виживання знижувався до 4,5% (рис. 3).

Щоб з'ясувати, які структурні зміни виникають у клітинах за дії H_2S, були проведені електронно-мікроскопічні дослідження клітин, оброблених гідроген сульфідом. Оброблення клітин проводили гідроген сульфідом у концентраціях, які забезпечували приблизно 50 і 10% виживання (94 мМ протягом 10 та 25 хв, відповідно).

При обробленні клітин гідроген сульфідом даної концентрації протягом 10 хв було виявлено відшарування внутрішньої мембрани клітинної стінки (рис. 4). При контакті клітин з гідроген сульфідом протягом 25 хв у клітинах спостерігали нагромадження електронощільних речовин, які заповнювали весь вміст клітини. Їхня природа невідома (рис. 4).

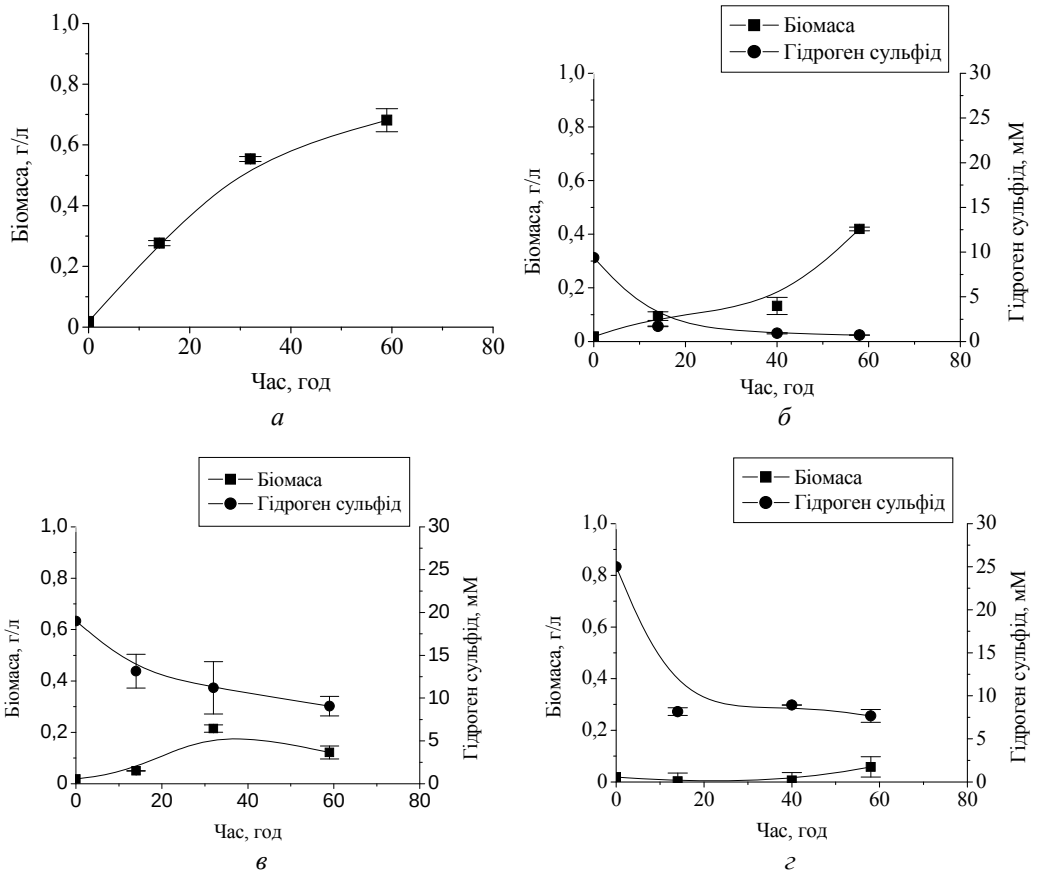

Рис. 2. Ріст бактерій *E. coli* за анаеробних умов у середовищах із різними концентраціями гідроген сульфіду: *а* – без гідроген сульфіду (контроль); *б* – 9,4 мМ; *в* – 18,8 мМ; *г* – 25 мМ.

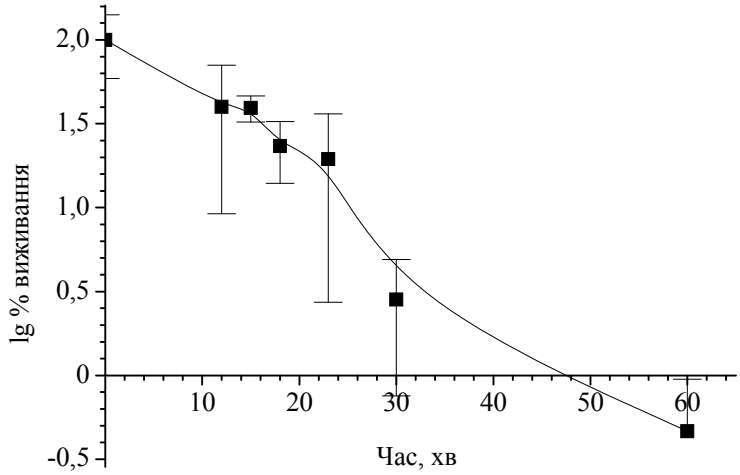

Рис. 3. Виживання бактерій *E. coli* при дії гідроген сульфіду концентрацією 94 мМ.

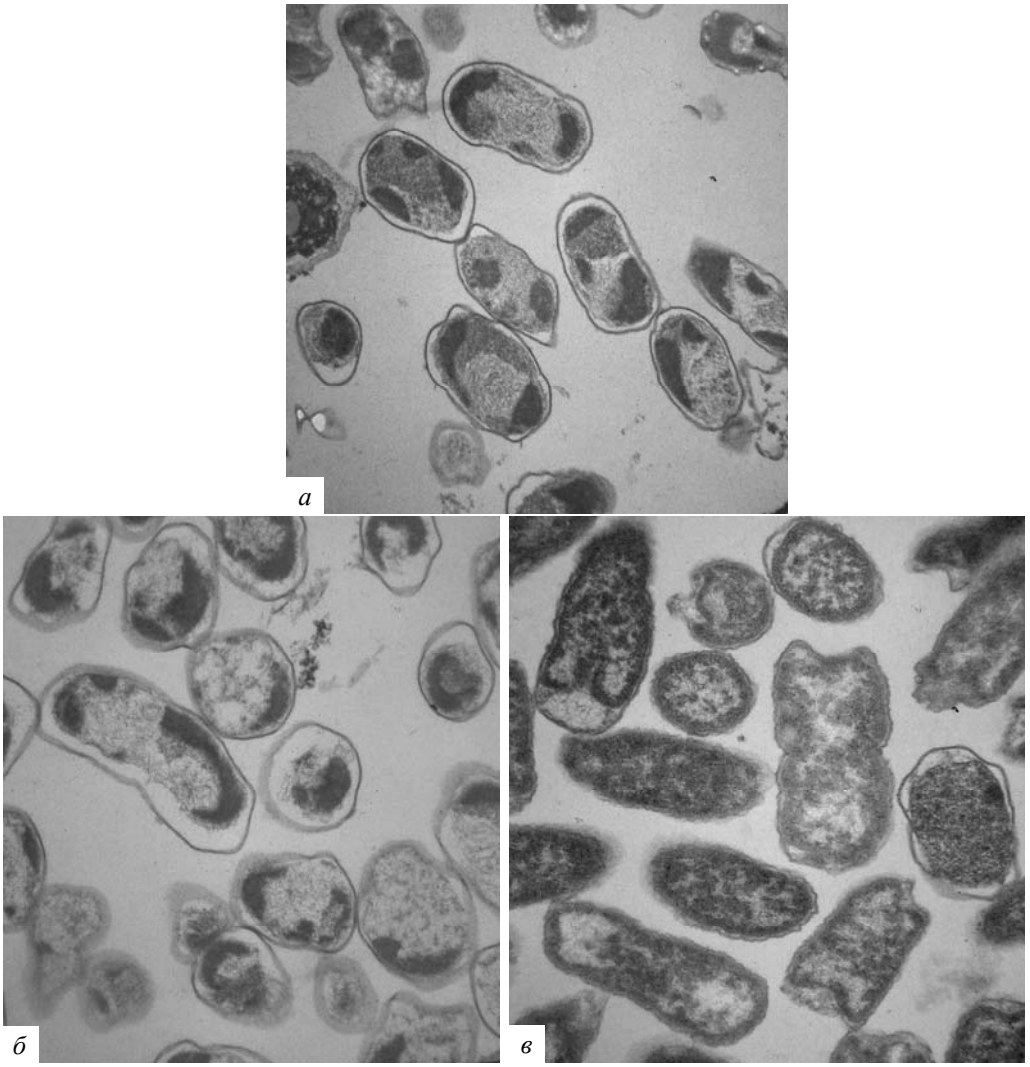

Рис. 4. Зміни в ультраструктурі клітин бактерій *E. coli* при дії гідроген сульфіду концентрацією 94 мМ. Час інкубації: *а* – контроль (без гідроген сульфіду); *б* – 10 хв; *в* – 25 хв. Збільшення ×8000.

Таким чином, клітини *E. coli* виявили різну чутливість до гідроген сульфіду середовища. Більш чутливими бактерії виявилися при культивуванні в аеробних умовах. Гідроген сульфід спричиняє суттєві зміни в ультраструктурі клітин. При короткотривалому контакті клітин із цією сполукою спостерігається відшарування внутрішньої мембрани клітинної стінки, збільшення розмірів периплазми. Збільшення тривалості взаємодії клітин із H_2S призводить до появи в клітині електроннощільних речовин невідомої природи, що наповнюють клітину.

Автори висловлюють щиру подяку провідному науковому співробітнику міжфакультетської лабораторії електронної мікроскопії Львівського національного університету імені Івана Франка О. Р. Кулачковському за проведення електронно-мікроскопічних досліджень.

1. *Лакин Г. Ф.* Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
2. *Перетятко Т., Гнатуш С., Гудзь С.* Сульфатвідновлювальні бактерії Яворівського сіркового родовища // Мікроб. журн. 2006. Т. 68. № 5. С. 84–91.
3. *Перетятко Т. Б., Галушка А. А., Гнатуш С. О.* та ін. Використання органічних сполук сульфатвідновлювальними бактеріями роду *Desulfovibrio* // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. 2006. Вип. 18. С. 157–160.
4. *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. Vol. 51. N 2. P. 398–407.
5. *Dean G. A.* A simple colorymetric finish for the Johnson-Nishita micro-distillation of sulfur // Analist. 1966. Vol. 91. N 1085. P. 530–532.
6. *Halushka A., Peretjatko T., Gudz S.* About the ability of hydrogen sulfide to cause mutations in Saccharomyces cerevisiae // Modern problems of microbiology and biotechnology: The young scientist's and student's international scientific conference: book of abstracts. Odessa. 2007. P. 15.
7. 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
8. *Khan A. A., Schuler M. M., Prior M. G.* et al. Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats // Toxicol. Applied Pharmacol. 1990. Vol. 103. P. 482–490.
9. *Lloyd K. G., Edgcomb V. P., Molyneaux S. J.* et al. Effects of dissolved sulfide, pH, and temperature on growth and survival of marine hyperthermophilic Archaea // Appl. Env. Microbiol. 2005. Vol. 71. N 10. P. 6383–6387.
10. *Miller S. R., Bebout B. M.* Variation in sulfide tolerance of photosystem II in phylogenetically diverse cyanobacteria from sulfidic habitats // Appl. Env. Microbiol. 2004. Vol. 70. N 2. P. 736–744.
11. *Reynolds E. S.* The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol. 1963. Vol. 17. P. 208–212.
12. 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; НКИ 436/121. 9 с.

INFLUENCE OF HYDROGEN SULFIDE ON *ESCHERICHIA COLI*

A. Halushka, T. Peretyatko, S. Gudz

Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: a_halushka@mail.ru

Hydrogen sulfide at concentration 18,8 mM fully inhibits the growth of *Escherichia coli* in aerobic conditions. In anaerobic conditions they are more stable to this compound. During the 10 min contact of cells with hydrogen sulfide at concentration 94 mM the survival of 50% of cells is observed. Hydrogen sulfide causes the exfoliation of the cell wall internal membrane and accumulation of electronopaque compounds in *E. coli* cells.

Key words: hydrogen sulfide, Escherichia coli, toxicity, growth, survival, ultrastructure.

Стаття надійшла до редколегії 01.09.08
Прийнята до друку 12.09.08