



УДК 579.[222.[4:3]:243]:546.[4:562]

ВПЛИВ СПОЛУК ФЕРУМУ ТА МАНГАНУ НА ВМІСТ ГЛУТАТІОНУ В КЛІТИНАХ СІРКОВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS*

О. М. Василів, С. О. Гнатуш

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

Desulfuromonas acetoxidans – грамнегативні облигатно анаеробні сірковідновлювальні бактерії, клітини яких розглядають як високоефективний матеріал для мікробно-анодних паливних елементів, що забезпечують перетворення більше 80% електронів, утворених при окисненні ацетату, до електричного струму внаслідок їх переміщення при процесах відновлення сірки та деяких перехідних металів $3d^3$ типу, зокрема Феруму і Мангану. Глутатіон (GSH: l-γ-глутаміл-l-цистеїніл гліцин) виконує роль головного редокс-буфера й антиоксиданта, що забезпечує захист клітин від оксидативного стресу та дії токсичних сполук. Досліджено залежність між вмістом глутатіону в клітинах бактерій *D. acetoxidans* і наявністю ферум (II) сульфату, ферум (III) хлорид гексагідрату, манган (II) хлорид тетрагідрату й манган (IV) оксиду в різних концентраціях у середовищі культивування. Максимальний вміст глутатіону було зафіксовано за впливу 2,5 мМ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ та 0,5 мМ $FeSO_4$ на другу добу і 1,0 і 0,5 мМ MnO_2 та $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ відповідно на третю добу культивування.

Ключові слова: глутатіон, сіркобактерії, *Desulfuromonas acetoxidans*, Ферум, Манган.

ВСТУП

Утворення активних радикалів, відомих як прооксиданти, спостерігають при багатьох метаболічних процесах, що відбуваються у клітинах. Постійне утворення прооксидантів у живих організмах регулюється їх деактивацією антиоксидантами, тому для підтримки гомеостазу необхідна безперервна регенерація антиоксидантної системи захисту клітин. При порушенні її функціонування у клітинах накопичуються різноманітні пошкодження, що зумовлюють оксидативний стрес. Важливу роль в антиоксидантному захисті й підтриманні окисно-відновного балансу клітин відіграють білки, що легко окиснюються, та пептиди, до складу яких входять SH-вмісні амінокислоти, а саме цистеїн і метіонін [2]. Особливе значення має глутатіон, а саме L-γ-глутаміл-L-цистеїнілгліцин. Основний антиоксидантний ефект даного трипептиду реалізується внаслідок його участі як донора електронів у роботі ферментативних антиоксидантів, зокрема глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази [6]. Глутатіон має велике значення у підтримці тіол-дисульфідної рівноваги у білках, захисті

клітин від оксидативного стресу та дії токсичних сполук. Даний трипептид та SH-вмісні білки підтримують стабільність мембран і відіграють важливу роль у регуляції реплікативної системи клітини [4]. Дефіцит глутатіону, за умов підвищеного утворення активних метаболітів кисню чи токсичного впливу високих концентрацій іонів переходних металів, зумовлює пригнічення синтезу білків і ДНК. Останнім часом детально досліджують роль даного трипептиду у функціонуванні клітинних сигнальних шляхів, регуляції апоптозу й активності ферментів та інших клітинних процесів [3].

Desulfuromonas acetoxidans – грамнегативні облигатно анаеробні еубактерії, що населяють збагачені сіркою водні середовища та здатні до відновлення S^0 до H_2S . Вони не відновлюють сульфати чи інші оксоаніони Сульфуру [7]. Досліджувані бактерії містять специфічну металоредуктазу, що забезпечує відновлення Fe(III) та Mn(IV) до магнетиту (Fe_3O_4) й сидериту ($FeCO_3$) та родохрозиту ($MnCO_3$) як кінцевих продуктів дисиміляційної Fe (III) – та Mn (IV) – редукції відповідно [5, 9]. Встановлено, що бактерії *D. acetoxidans* здатні одержувати енергію за анаеробних умов при перетворенні ацетату до діоксиду карбону в циклі трикарбонових кислот шляхом взаємодії процесів окиснення ацетату й відновлення сірки. Окиснення ацетату й інших органічних речовин, зокрема пірувату, етанолу, пропанолу, бутанолу тощо, за участю бактерій *D. acetoxidans* є значно інтенсивнішим за наявності Fe (III) і Mn (IV) у середовищі, які є акцепторами електронів і відновлюються за даних умов [5]. Ці процеси забезпечують підтримання життєздатності бактерій і є важливою складовою процесів окиснення органічних речовин у морських осадах. Fe (III) і Mn (IV) також здатні неензиматично окиснювати сульфід, утворюючи молекулярну сірку. Тому за наявності S^0 та Fe^{3+} чи Mn^{4+} в анаеробних осадах сульфід-іон (S^{2-}), що дифундує із зони відновлення сульфату (SO_4^{2-}), зв'язується з Ферумом чи Манганом, у результаті чого відбувається його детоксикація [5].

Властивість бактерій *D. acetoxidans* використовувати S^0 , Fe (III) і Mn (IV) як акцептори електронів при окисненні органічного Карбону забезпечує їхню особливу адаптацію до змін довкілля. Клітини цих бактерій розглядають як високоефективний матеріал мікробно-анодних паливних елементів, що дає змогу перетворювати більше 80% електронів у процесі окиснення ацетату до електричного струму. Встановлено, що чиста культура сірковідновлювальних бактерій *D. acetoxidans* утворює електричний струм потужністю 14 мВт/м² у двокамерних повітряних катодах [8]. Бактерії *D. acetoxidans* як мікробно-анодні паливні елементи можуть використовуватись як альтернативний матеріал для зарядних пристроїв у побутових і промислових масштабах.

Відсутність ефективних механізмів захисту від токсичного впливу неповного відновлення O_2 у клітинах анаеробів довгий час вважалася поясненням їхньої чутливості до кисню та загибелі у повітрі. Проте останнім часом отримано численні дані про наявність у облигатних анаеробів складових антиоксидантної системи захисту, зокрема універсального донора електронів – глутатіону.

Тому метою нашої роботи було дослідження вмісту глутатіону в клітинах сірковідновлювальних бактерій *Desulfuromonas acetoxidans* за впливу різних концентрацій сполук Феруму та Мангану, зокрема ферум (II) сульфату, ферум (III) хлорид гексагідрату, манган (II) хлорид тетрагідрату та манган (IV) оксиду.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для досліджень використовували бактерії *Desulfuromonas acetoxidans*, виділені з водойм Яворівського сіркового родовища, одержані в чистій культурі й ідентифіковані на кафедрі мікробіології Львівського національного університету імені Івана

Франка. Бактерії вирощували протягом чотирьох діб за різних концентрацій FeSO_4 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, MnO_2 та $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мМ). У контроль солей металів не вносили. Після другої, третьої та четвертої діб вирощування клітини відмивали 0,9%-ним розчином NaCl , руйнували на ультразвуковому гомогенізаторі УЗДН-2Т при 22 кГц протягом 5 хв при 0°C . Уламки клітин відокремлювали центрифугуванням при 12–15 тис. об/хв при 4°C протягом 30 хв. До 1 мл отриманого супернатанту вносили 2 мл 1,5 мМ дитіонітробензойної кислоти (ДТНБ) у 0,1 М калій-фосфатному буфері та 1 мл дистильованої води. Оптичну густину одержаного розчину вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 412 нм [2]. Концентрацію глутатіону в клітинах обчислювали за формулою:

$$C = \frac{E_{412}}{l \cdot \varepsilon \cdot B},$$

де C – концентрація глутатіону, ммоль/г клітин; E_{412} – оптична густина розчину при довжині хвилі 412 нм; l – довжина оптичного шляху, 1 см; ε – молярний коефіцієнт екстинкції, $13\,600\ \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; B – біомаса клітин, г/л.

Вираховували основні статистичні показники за безпосередніми даними (середнє арифметичне – M ; стандартна похибка середнього арифметичного – m). Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента. Достовірною вважалася різниця при показнику достовірності $P > 0,95$ [1].

Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програму Origin.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Досліджено вміст глутатіону в клітинах сірковідновлювальних бактерій *D. acetoxidans* за впливу різних концентрацій FeSO_4 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, MnO_2 та $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Показано, що зі збільшенням концентрації MnCl_2 у середовищі від 0,5 до 1,5 мМ вміст глутатіону знижується, а від 2,0 до 2,5 мМ – зростає (рис. 1, А). За впливу 0,5 мМ MnCl_2 вміст даного трипептиду підвищується на 44, 20 і 8% відповідно на другу, третю та четверту доби культивування, порівняно з контролем. При внесенні 2,5 мМ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ у середовище культивування концентрація глутатіону підвищується в 1,7, 1,6 та 1,3 рази відповідно впродовж другої, третьої та четвертої діб культивування порівняно з контролем.

Встановлено, що за впливу 0,5 мМ FeSO_4 концентрація L- γ -глутаміл-L-цистеїнілгліцину підвищується в 1,8; 1,6 та 1,5 рази відповідно на другу, третю і четверту доби вирощування, порівняно з контролем (рис. 1, Б)

За наявності 2,5 мМ ферум (II) сульфату в середовищі вміст глутатіону підвищується в 1,5; 1,6 та 2,3 рази на другу, третю і четверту доби культивування порівняно з контролем.

Отримані результати можна пояснити тим, що іони Феруму (II) та Мангану (II) як кінцеві продукти дисиміляційної Fe^{3+} - та Mn^{4+} -редукції необхідні для підтримання функціонального стану клітин *D. acetoxidans*, тому за низьких концентрацій Fe^{2+} та Mn^{2+} не виявляють токсичного впливу на досліджувані бактерії. Тривала дія цих металів на модельний об'єкт дослідження та підвищення концентрації ферум сульфату й манган хлорид тетрагідрату в середовищі до 2,5 мМ стимулює зростання біомаси досліджуваних бактерій або не виявляє суттєвого впливу відповідно, у результаті чого, ймовірно, стимулюється біохімічна активність клітин, що пояснює підвищення вмісту глутатіону в *D. acetoxidans* за даних умов.

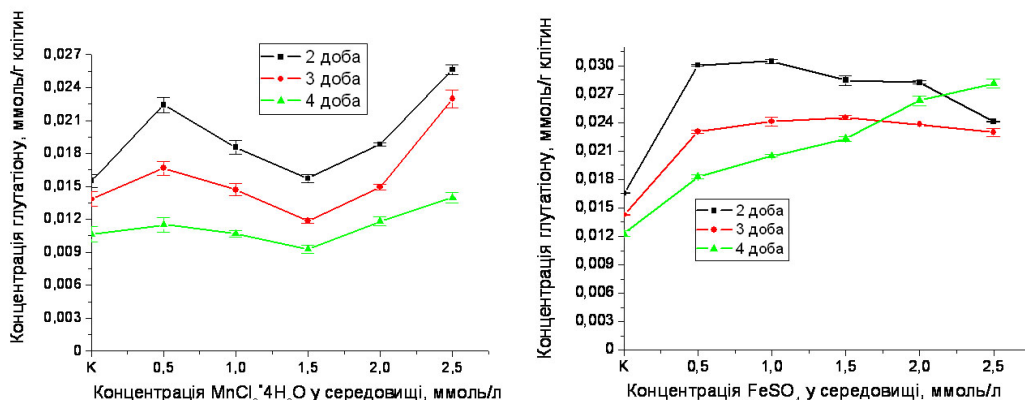


Рис. 1. Вплив манган (II) хлорид тетрагідрату (А) та ферум (II) сульфату (Б) на вміст глутатіону в клітинах *D. acetoxidans* протягом чотирьох діб культивування

Fig.1. The influence of manganese (II) chloride tetrahydrate (A) and ferrum (II) sulfate (B) on glutathione content in cells of *D. acetoxidans* during four day cultivation

При дослідженні впливу MnO_2 на біосинтез глутатіону бактеріями *D. acetoxidans* максимальний вміст даного трипептиду було зафіксовано на третю добу культивування (рис. 2, А). Найнижчу концентрацію глутатіону було відзначено на четверту добу росту за даних умов. Протягом другої та третьої діб культивування вміст глутатіону зростає на 22% при збільшенні концентрації манган (IV) оксиду до 1,0 мМ у середовищі, порівняно з контролем. За впливу 2,5 мМ MnO_2 вміст глутатіону зменшується на 6, 5 та 17% відповідно на другу, третю та четверту доби вирощування порівняно з контролем.

За внесення різних концентрацій $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ максимальний вміст глутатіону, що становив $0,04345 \pm 0,0004$ $\mu\text{mol/g}$ клітин, зафіксовано за впливу 0,5 мМ солі металу в середовищі на третю добу культивування (рис. 2, Б).

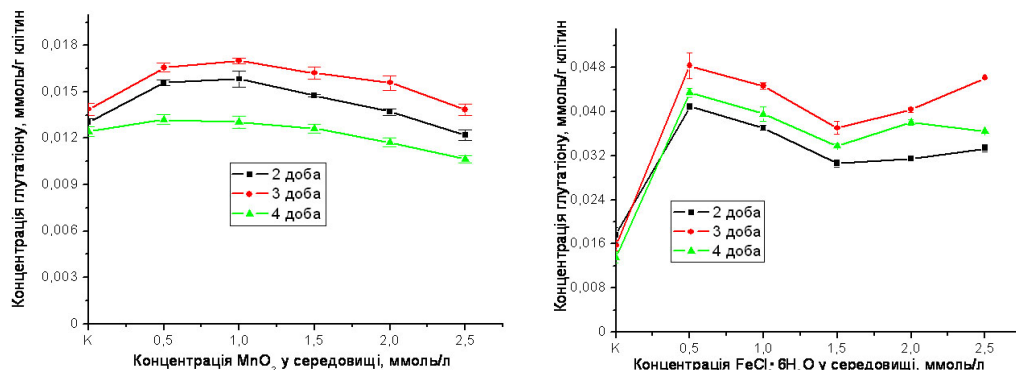


Рис. 2. Вплив манган (IV) оксиду (А) та ферум (III) хлорид гексагідрату (Б) на вміст глутатіону в клітинах *D. acetoxidans* протягом чотирьох діб культивування

Fig. 2. The influence of manganese (IV) oxide (A) and ferrum (III) chloride hexahydrate (B) on glutathione content in cells of *D. acetoxidans* during four day cultivation

За даних умов вміст досліджуваного трипептиду збільшується у 2,3; 3 та 3,2 рази відповідно на другу, третю і четверту доби вирощування порівняно з контролем.

При збільшенні концентрації ферум (III) хлорид гексагідрату в середовищі до 2,5 мМ вміст глутатіону в клітинах досліджуваних бактерій підвищується у 3 рази на третю добу вирощування порівняно з контролем.

Досліджено, що ферум (III) хлорид гексагідрат і у низьких концентраціях манган (IV) оксид стимулюють зростання біомаси сірковідновлювальних бактерій *D. acetoxidans*. Очевидно, дані сполуки Феруму та Мангану у низьких концентраціях необхідні для нормального функціонування клітин живих організмів, у результаті чого вміст глутатіону в клітинах суттєво не змінюється. Підвищення тривалості їхнього впливу, ймовірно, зумовлює порушення фізіологічних і метаболічних процесів клітин, наслідком чого є посилення синтезу досліджуваного трипептиду як одного з механізмів захисту клітин у відповідь на дію стресових факторів навколишнього середовища.

ВИСНОВКИ

Досліджено вплив різних концентрацій ферум (II) сульфату, ферум (III) хлорид гексагідрату, манган (II) хлорид тетрагідрату та манган (IV) оксиду на вміст глутатіону в клітинах сірковідновлювальних бактерій *D. acetoxidans* протягом чотирьох діб культивування. Максимальний вміст досліджуваного трипептиду було зафіксовано за впливу 2,5 мМ $MnCl_2 \times 4H_2O$ та 0,5 мМ $FeSO_4$ на другу добу та 1,0 і 0,5 мМ MnO_2 і $FeCl_3 \times 6H_2O$ відповідно на третю добу культивування. Зі збільшенням часу культивування концентрація глутатіону в клітинах зменшувалася за впливу всіх досліджуваних сполук металів. Найвищу концентрацію глутатіону було зафіксовано за менш тривалої дії $MnCl_2 \times 4H_2O$ та $FeSO_4$, порівняно з впливом MnO_2 і $FeCl_3 \times 6H_2O$.

1. *Лакін Г.Ф. Биометрия*. Москва: Высшая школа, 1990. 352 с.
2. *Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К.* и др. **Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты**. Москва: Слово, 2006. 556 с.
3. *Bartsch R., Newton G., Sherrill Ch., Fahey R.* Glutathione amide and its perthiol in anaerobic sulfur bacteria. **J. Bacteriol**, 1996; 178: 4742–4746.
4. *Dolphin D., Poulson R., Avramovic O.* Glutathione chemical, biochemical and medical aspects. **J. Bacteriol**, 1989; 123: 203–211.
5. *Eric E., Derek R.* Dissimilatory Fe (III) - reduction by the marine microorganism *Desulfuromonas acetoxidans*. **Applied and Environmental Microbiology**, 1993; 59(3): 734–742.
6. *Kosower N., Kosower E.* The glutathione status of cells. **Int. Rev. Cytol**, 1978; 54:109–160.
7. *Pfennig N., Biebl H.* *Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium. **Arch. Microbiol**, 1976; 110: 3–12.
8. *Tender L.M., Gray S.A., Groveman E.G.* The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy. **J. Power Sources**, 2008; 179(3): 571–575.
9. *Tugel, J.B., Hines M.E., Jones G.E.* Microbial iron reduction by enrichment cultures isolated from estuarine sediments. **Appl. Environ. Microbiol**, 1986; 52: 1167–1172.

EFFECT OF FERRUM AND MANGANESE COMPOUNDS ON THE GLUTATHIONE CONTENT IN CELLS OF SULFURREDUCING BACTERIA *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS*

O. M. Vasylyv, S. O. Hnatysh

*Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: oresta.vasylyv@gmail.com*

Desulfuromonas acetoxidans are uncoloured gram-negative obligatory anaerobic sulfur-reducing bacteria that are considered to be used as microbial-anode fuel cells with

high electron recovery (>80%) from acetate oxidation to electric current as a result of their transfer in the processes of sulfur and some $3d^3$ type transition metals reduction, such as Ferrum and Manganese. Glutathione (GSH: I- γ -glutamyl-I-cysteinilglycyn) plays the main role in redox buffer and antioxidant. This has a great sense in supporting thiol-disulfide equilibrium in the proteins and also at defense of cells against oxidative stress and the influence of different toxic compounds. The dependence between glutathione content in *D. acetoxidans* cells and different concentrations of ferrous (II) sulfate, ferrous (III) chloride hexahydrate, manganese (II) chloride tetrahydrate and manganese (IV) oxide in growth medium has been investigated. Maximal concentration of this tripeptide in cells of investigated bacteria has been observed under the influence of 2.5 mM $MnCl_2 \times 4H_2O$ and 0.5 mM $FeSO_4$ on the second day of growth and under the influence of 1.0 and 0.5 mM MnO_2 and $FeCl_3 \times 6H_2O$, respectively, on the third day of bacteria growth.

Key words: glutathione, sulfurbacteria, *Desulfuromonas acetoxidans*, Ferrum, Manganese.

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЙ ФЕРРУМА И МАНГАНА НА СОДЕРЖАНИЕ ГЛУТАТИОНА В КЛЕТКАХ СЕРОВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS*

О. М. Васи́лів, С. А. Гнатуш

Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: oresta.vasyliv@gmail.com

Desulfuromonas acetoxidans – граммотрицательные облигатно анаэробные серовосстанавливающие бактерии, клетки которых рассматривают как высокоэффективный материал для микробно-анодных топливных элементов, обеспечивающих превращение более 80% электронов, образованных при окислении ацетата, в электрический ток вследствие их перемещения при процессах восстановления серы и некоторых переходных металлов $3d^3$ типа, в частности Феррума и Мангана. Глутатион (GSH: I- γ -глутамил-I-цистеинил глицин) является главным редокс-буфером и антиоксидантом, который обеспечивает защиту клеток от оксидативного стресса и действия токсических соединений. Исследована зависимость между содержанием глутатиона в клетках бактерий *D. acetoxidans* и наличием феррум (II) сульфата, феррум (III) хлорид гексагидрата, манган (II) хлорид тетрагидрата и манган (IV) оксида в различных концентрациях в среде культивирования. Максимальное содержание глутатиона было зафиксировано при влиянии 2,5 mM $MnCl_2 \times 4H_2O$ и 0,5 mM $FeSO_4$ на вторые сутки и 1,0 и 0,5 mM MnO_2 и $FeCl_3 \times 6H_2O$ соответственно на третьи сутки культивирования.

Ключевые слова: глутатион, серобактерии, *Desulfuromonas acetoxidans*, Феррум, Манган.

Одержано: 13.01.2011