



УДК 579.[26:23]:576.31:546.221.1

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ В КЛІТИНАХ МІКРООРГАНІЗМІВ ПРИ ДІЇ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ

А. А. Галушка, С. П. Гудзь

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна*

Досліджено вплив гідроген сульфїду на виживання клітин дріжджів *Pichia guilliermondii* та бактерій *Bacillus subtilis* і *Desulfovibrio desulfuricans*. Найбільш чутливими до дії гідроген сульфїду виявилися *D. desulfuricans*, а найбільш стійкими – *P. guilliermondii*. Гідроген сульфїд спричиняє суттєві зміни в ультраструктурі клітин. У *B. subtilis* і *P. guilliermondii* спостерігали відшарування цитоплазматичної мембрани, руйнування мембранних структур і клітинної стінки та нагромадження сульфїдів металів у цитоплазмі.

Ключові слова: гідроген сульфїд, токсичність, виживання, ультраструктура.

ВСТУП

Гідроген сульфїд – високотоксична сполука для всіх живих організмів. Утворення гідроген сульфїду має місце на деяких промислових виробництвах, очисних спорудах тощо [11]. Проблема забруднення довкілля гідроген сульфїдом стоїть особливо гостро у сірковидобувних регіонах Прикарпаття [5, 6].

Найбільш чутливими до дії гідроген сульфїду серед мікроорганізмів виявилися ціанобактерії. Ця сполука в мікромолярних концентраціях пригнічує оксигенний фотосинтез [8, 10, 13]. Окремі представники ціанобактерій здійснюють аноксигенний фотосинтез за наявності H_2S . Вони виявилися менш чутливими до гідроген сульфїду порівняно з іншими ціанобактеріями [8]. Досить стійкими до дії H_2S є археї *Archaeoglobus profundus* та *Methanocaldococcus jannaschii*, які здатні рости при концентраціях гідроген сульфїду 60–80 мМ. Проте за відсутності джерела енергії наявність гідроген сульфїду в середовищі підвищувала загибель клітин цих мікроорганізмів [12].

Механізм дії гідроген сульфїду на живі організми досліджений недостатньо. Вважають, що можливою мішенню дії цієї сполуки є метало- та дисульфїдвмісні білки [11]. Мікроорганізми можуть виявитися зручними об'єктами для вивчення та розв'язання цієї проблеми.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктами досліджень були дріжджі *Pichia guilliermondii* ATCC 9058, бактерії *Bacillus subtilis* ВКМ-В-428 та *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11. Останні виділені й ідентифіковані на кафедрі мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка.

Дріжджі вирощували на середовищі Беркгольдера з дріжджовим екстрактом [7], бактерії *B. subtilis* – на середовищі Спіцайзена з дріжджовим екстрактом та глюкозою [1] при температурі +30°C за аеробних умов (на качалці при 150 об./хв у колбах, на третину заповнених середовищем і закритих ватно-марлевими корками). *D. desulfuricans* культивували на середовищах Постгейта В та С [14] при температурі +27°C за анаеробних умов. Для створення анаеробних умов пробірки повністю заповнювали середовищем і закривали гумовими корками, а чашки поміщали в генбокси з генераторами для анаеробів (Biomeieux, Франція).

Концентрацію клітин і гідроген сульфїду визначали турбідиметрично на КФК-3 [9, 16].

Для дослідження виживання мікроорганізмів використовували культуру з експоненційної фази росту. Клітини осаджували, відмивали і ресуспендували у стерильному фосфатному буфері (рН 7,0). До отриманої суспензії вносили розчин натрій сульфїду у відповідній концентрації. Після відповідного періоду інкубації розведену суспензію клітин використовували для посіву на чашки Петрі з агаризованим середовищем. Контролем були клітини, інкубовані без Na_2S .

Для дослідження ультраструктурних змін відмиті клітини дріжджів і бактерій інкубували за наявності відповідних концентрацій гідроген сульфїду протягом такого часу, що забезпечує 50 і 10% виживання. Після цього клітини двічі відмивали стерильною водопровідною водою й осаджували центрифугуванням при 10 тис. об./хв протягом 15 хв. Клітини дріжджів фіксували в 1,5% розчині калій перманганату, а клітини бактерій – в 1,5% розчині OsO_4 у какодилатному буфері (рН 7,2) протягом 90 хв при 0°C. Фіксовані клітини зневоднювали у розчинах зі зростаючими концентраціями етанолу і пропілен оксиду та переносили в епоксидну смолу Embed-812. Ультратонкі зрізи клітин отримували на ультрамікромомі УМТП–6 і контрастували плюмбум цитратом за Рейнольдсом [15]. Перегляд і фотографування зразків здійснювали на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 при прискорювальній напрузі 75 кВ.

Для дослідження впливу гідроген сульфїду на нагромадження сульфїдів у клітинах *P. guilliermondii* їх інкубували з гідроген сульфїдом концентрацією 125 мМ протягом 23 та 54 хв. Після цього клітини осаджували, двічі відмивали дистильованою водою і руйнували на ультразвуковому дезінтеграторі УЗДН-2Т при 22 кГц протягом 5 хв при 0°C. До зруйнованих клітин додавали HCl до кінцевої концентрації 15% [3] і вимірювали концентрацію утвореного при цьому гідроген сульфїду турбідиметричним методом [16].

Статистичне оброблення отриманих результатів проводили з використанням програми „Origin 6.1”. Вибір тактики статистичного оброблення й підготовку даних для аналізу здійснювали, базуючись на загальноприйнятих методах [4] при рівні достовірності $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Спочатку дослідили вплив гідроген сульфїду на виживання *P. guilliermondii*. Попередньо встановлено [2], що в концентрації 31,3 мМ гідроген сульфїд спричиняє загибель 84% клітин *Saccharomyces cerevisiae* протягом 45 хв. Тому виживання *P. guilliermondii* досліджували за концентрації 30 мМ, але протягом 1 год. За цих умов гідроген сульфїд не спричиняв суттєвого зменшення відсотка виживання (рис. 1), і подальші дослідї проводили при вищих концентраціях цієї сполуки. За концентрації гідроген сульфїду 125 мМ спостерігається загибель 50% дріжджїв протягом 23 хв, а збільшення часу інкубації до 54 хв викликає загибель 90% клітин (рис. 1).

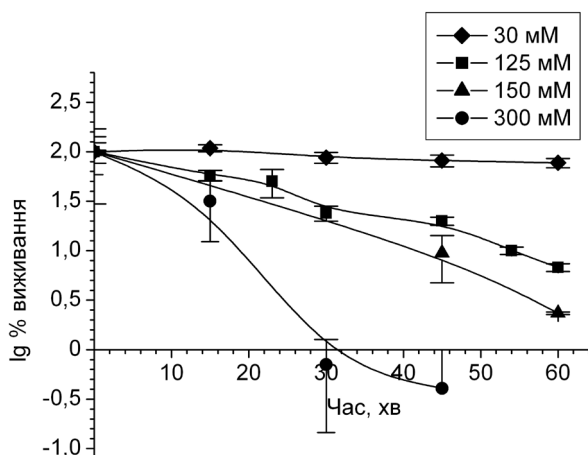


Рис. 1. Вплив гідроген сульфїду на виживання дріжджїв *P. guilliermondii*

Fig. 1. Effects of hydrogen sulfide on *P. guilliermondii* yeasts survival

Для дослідження змін в ультраструктурі дріжджїв *P. guilliermondii* клітини обробляли гідроген сульфїдом концентрацією 125 мМ протягом 23 та 54 хв.

Інкубація клітин протягом 23 хв з такою концентрацією гідроген сульфїду призводила до зміни структури клітинної стінки та форми вакуолі, на її поверхні з'являлися численні інвагінації. Всередині клітин спостерігалось нагромадження електроннощільних речовин (рис. 2, б).

Збільшення часу інкубації до 54 хв призводило до набухання та руйнування клітинної стінки, відшарування цитоплазматичної мембрани від неї. Значно зростала електронна щільність цитоплазми. У цитоплазмі не було помітно жодних внутрішньоклітинних структур, окрім ядра (рис. 2, в). Причиною цього може бути невідоме нагромадження електроннощільних речовин у всіх структурах, або ж руйнування останніх.

Для встановлення природи електроннощільних речовин клітини інкубували у середовищі з гідроген сульфїдом, потім руйнували і визначали виділення гідроген сульфїду після додавання хлоридної кислоти. Виявилось (табл. 1), що при інкубації клітин з гідроген сульфїдом у концентрації 125 мМ протягом 23 хв відбувалося незначне зростання кількості H_2S після додавання HCl , а при інкубації клітин протягом 54 хв спостерігали збільшення концентрації гідроген сульфїду майже утричі, що

Таблиця 1. Утворення H_2S при обробленні зруйнованих клітин хлоридною кислотою
 Table 1. Production of H_2S after the treatment of destroyed cells with hydrochloric acid

Час інкубування клітин із 125 мМ H_2S , хв	$[H_2S]$, ммоль/г клітин
0	$0,359 \pm 0,002$
23	$0,492 \pm 0,003$
54	$1,004 \pm 0,002$

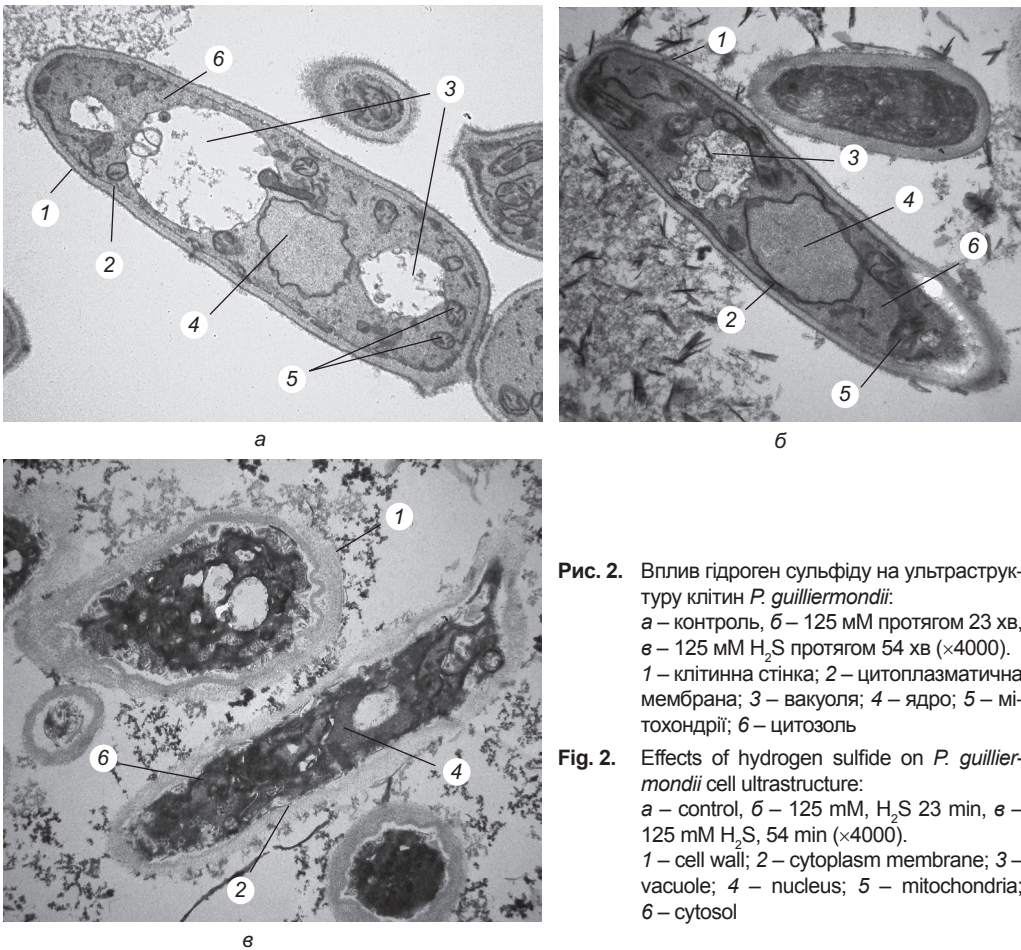


Рис. 2. Вплив гідроген сульфїду на ультраструктуру клітин *P. guilliermondii*: а – контроль, б – 125 мМ протягом 23 хв, в – 125 мМ H_2S протягом 54 хв ($\times 4000$). 1 – клітинна стінка; 2 – цитоплазматична мембрана; 3 – вакуоля; 4 – ядро; 5 – мітохондрії; 6 – цитозоль

Fig. 2. Effects of hydrogen sulfide on *P. guilliermondii* cell ultrastructure: а – control, б – 125 mM, H_2S 23 min, в – 125 mM H_2S , 54 min ($\times 4000$). 1 – cell wall; 2 – cytoplasmic membrane; 3 – vacuole; 4 – nucleus; 5 – mitochondria; 6 – cytosol

свідчить про збільшення вмісту сульфїдів у клітинах. Саме за цієї концентрації гідроген сульфїду виявлено високий вміст електроннощільних речовин у клітинах (див. рис. 2). Очевидно, основну кількість електроннощільних речовин, що нагромаджуються в клітинах при їх інкубуванні з H_2S , становлять сульфїди металів.

Іншими об'єктами досліджень були бактерії *B. subtilis* і *D. desulfuricans*. При дії гідроген сульфїду концентрацією 125 мМ на клітини *B. subtilis* через 15 хв інкубації спостерігали виживання лише 40% клітин. При збільшенні часу інкубації до 30 хв практично всі клітини гинули (рис. 3, а).

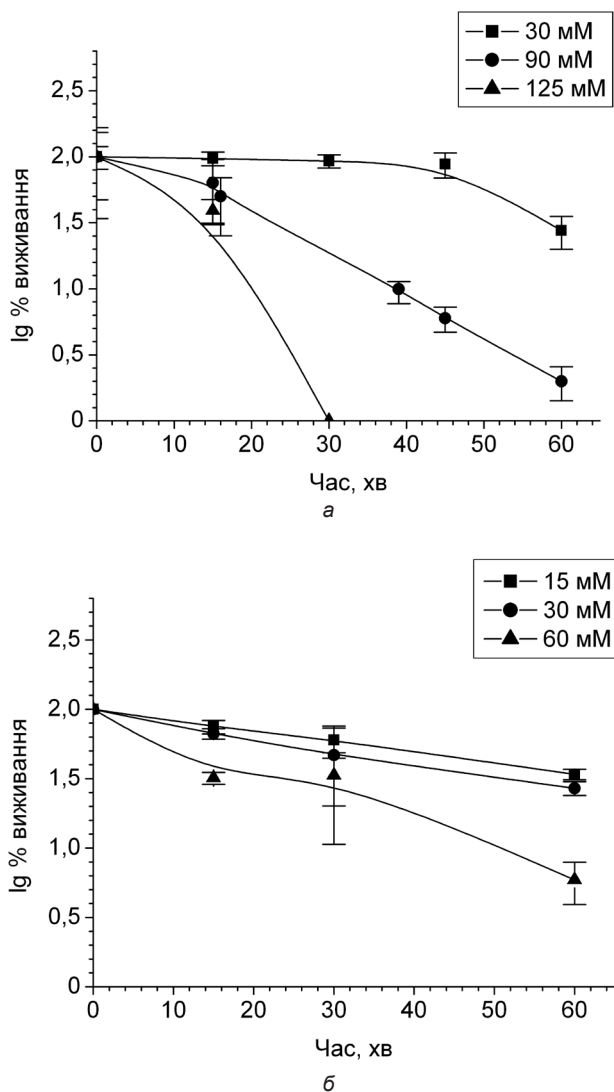


Рис. 3. Вплив гідроген сульфїду на виживання бактерій *B. subtilis* (а) і *D. desulfuricans* (б)
Fig. 3. Effects of hydrogen sulfide on *B. subtilis* (a) and *D. desulfuricans* (б) bacteria survival

На відміну від *B. subtilis*, бактерії *D. desulfuricans*, що є природними продуцентами H_2S , виявилися значно чутливішими до наявності цієї сполуки в середовищі. Якщо в *B. subtilis* спостерігалася повна загибель клітин при концентрації гідроген сульфїду 125 мМ, то у *D. desulfuricans* повна загибель клітин спостерігалася вже при концентрації 90 мМ. 50% клітин виживало при дії 30 мМ гідроген сульфїду протягом 30 хв (рис. 3, б). Подібно, як у *P. guilliermondii*, у *B. subtilis*, оброблених H_2S , спостерігається порушення форми клітини, що, можливо, пов'язано з втратою жорсткості клітинної стінки, та нагромадження в цитоплазмі електроннощільних речовин. Характерно, що останні розсіяні по всій цитоплазмі, однак їхня концентрація значно менша в зоні нуклеоїда і перисептального кільця (рис. 4).

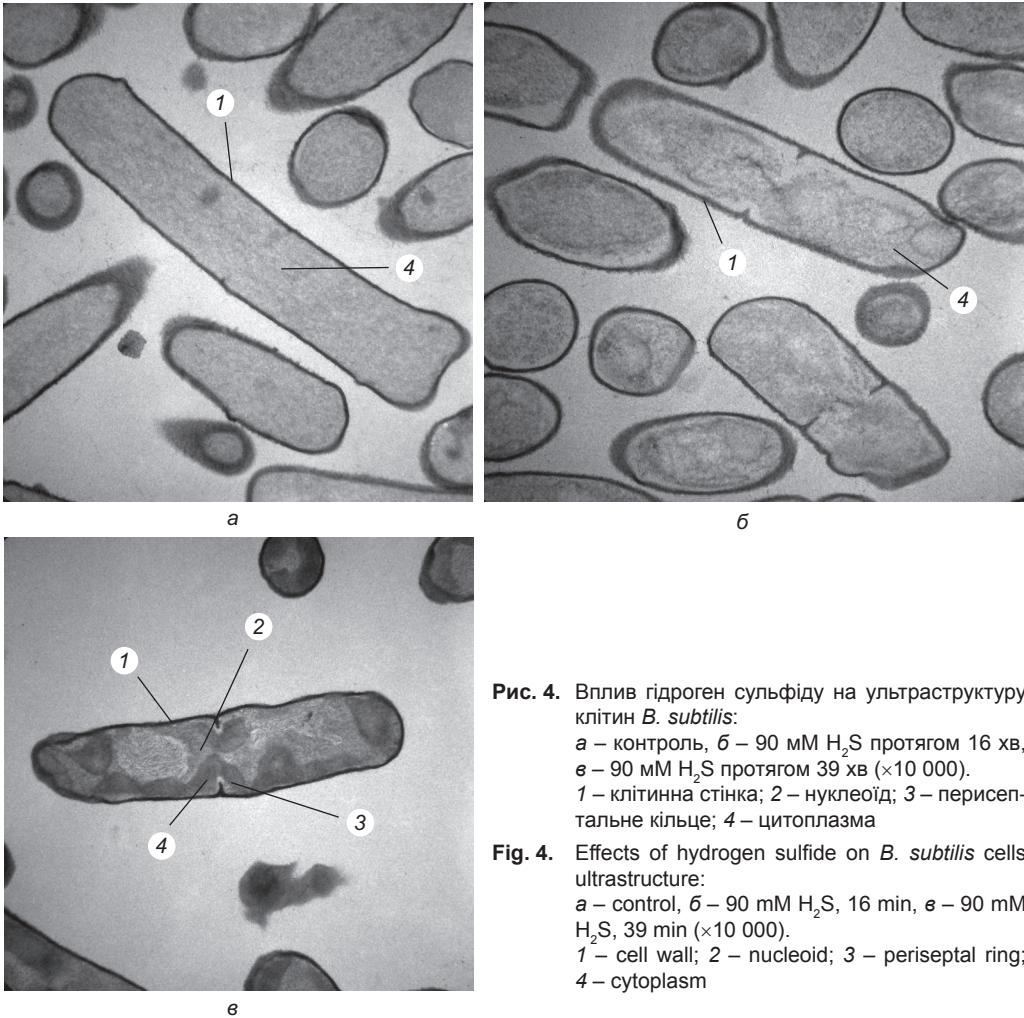


Рис. 4. Вплив гідроген сульфїду на ультраструктуру клітин *B. subtilis*:

а – контроль, б – 90 мМ H_2S протягом 16 хв, в – 90 мМ H_2S протягом 39 хв ($\times 10\ 000$).

1 – клітинна стінка; 2 – нуклеоїд; 3 – перисептальне кільце; 4 – цитоплазма

Fig. 4. Effects of hydrogen sulfide on *B. subtilis* cells ultrastructure:

а – control, б – 90 mM H_2S , 16 min, в – 90 mM H_2S , 39 min ($\times 10\ 000$).

1 – cell wall; 2 – nucleoid; 3 – periseptal ring; 4 – cytoplasm

Таким чином, різні мікроорганізми виявляють різну чутливість до гідроген сульфїду в середовищі. Найстійкішими до цієї сполуки виявилися дріжджі *P. guilliermondii*, а найбільш чутливими – *D. desulfuricans*. У всіх досліджуваних мікроорганізмів за інгібуючих концентрацій гідроген сульфїду спостерігається дезорганізація клітинної стінки, зміни в мембранних структурах і нагромадження сульфїдів, які викликають зміни у структурі цитоплазми. Всі перелічені зміни у клітині можуть спричинити їхню загибель.

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

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

1. Бреслер Е.Г., Переумов Д.А., Глазунов Е.А. Исследование оперона биосинтеза рибофлавина у *Vacillus subtilis*. Определение содержания АТФ: рибофлавин-5'-фосфотрансферазы в клетках с различным фенотипом. **Генетика**, 1997; 13: 880–887.
2. Галушка А.А., Перетятко Т.Б., Гудзь С.П. Вплив сірководню на *Saccharomyces cerevisiae*. **Мікробіологія і біотехнологія**, 2008; 3: 49–57.
3. Крешков А.И. **Основы аналитической химии. Теоретические основы. Качественный анализ**. Книга первая. Изд. 4-е, перераб. М.: Химия, 1976. 472 с.
4. Лакин Г.Ф. **Биометрия**. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
5. Перетятко Т., Гнатуш С., Гудзь С. Сульфатвідновлювальні бактерії Яворівського сіркового родовища. **Мікроб. журнал**, 2006; 68 (5): 84–91.
6. Перетятко Т.Б., Гнатуш С.О., Гудзь С.П. Утворення сульфїду *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 за різних умов культивування. **Вісник Львів. ун-ту. Серія біол.**, 2007; 43: 180–184.
7. Burkholder P. Influence of some environmental factors upon the production of riboflavin by yeasts. **Arch. Biochem**, 1943; 1 (1): 121–130.
8. 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; 51 (2): 398–407.
9. Dean G.A. A simple colorimetric finish for the Johnson-Nishita micro-distillation of sulfur. **Analyst**, 1966; 91 (1085): 530–532.
10. Espie G.S., Miller A.G., Canvin D.T. Selective and reversible inhibition of active CO₂ transport by hydrogen sulfide in a cyanobacterium. **Plant Physiol**, 1989; 91: 387–394.
11. **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>
12. 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; 71(10): 6383–6387.
13. Miller S.R., Bebout B.M. Variation in sulfide tolerance of photosystem II in phylogenetically diverse cyanobacteria from sulfidic habitats. **Appl. Env. Microbiol.**, 2004; 70 (2): 736–744.
14. Postgate J. R. **The sulfate-reducing bacteria, 2nd ed.** Cambridge: Cambridge University Press, 1984. 208 p.
15. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. **J. Cell. Biol.**, 1963; 17: 208–212.
16. 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.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES IN THE CELLS OF MICROORGANISMS UNDER THE INFLUENCE OF HYDROGEN SULFIDE

A. A. Halushka, S. P. Gudzy

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

Influence of hydrogen sulfide on the survival of *Pichia guilliermondii* yeasts and *Bacillus subtilis* і *Desulfovibrio desulfuricans* bacteria cells was investigated. The most sensitive to the influence of hydrogen sulfide were *D. desulfuricans*, and the most resistant – *P. guilliermondii*. Hydrogen sulfide caused changes in cell ultrastructure. In *B. subtilis* and *P. guilliermondii*, the plasmolysis, membrane structures and cell wall destruction and accumulation of metals sulfides in the cytoplasm were observed.

Key words: hydrogen sulfide, toxicity, survival, ultrastructure.

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТКАХ
МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СЕРОВОДОРОДА****А. А. Галушка, С. П. Гудзь***Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина*

Исследовано влияние сероводорода на выживание клеток дрожжей *Pichia guilliermondii* и бактерий *Bacillus subtilis* и *Desulfovibrio desulfuricans*. Наиболее чувствительными к действию сероводорода оказались *D. desulfuricans*, а наиболее стойкими – *P. guilliermondii*. Сероводород вызывает существенные изменения в ультраструктуре клеток. У *B. subtilis* и *P. guilliermondii* наблюдали отслоение цитоплазматической мембраны, разрушение мембранных структур и клеточной стенки, а также накопление сульфидов металлов в цитоплазме.

Ключевые слова: сероводород, токсичность, выживание, ультраструктура.

Одержано: 04.08.2009