УДК 579.266:579.222.2

Використання фумарату бактеріями *Desulfuromonas sp.*

О. Чайка, Т. Перетятко, С. Гудзь, А. Галушка

Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, Україна

Досліджено використання фумарату бактеріями *Desulfuromonas sp.* за різних умов культивування та сульфідогенну активність мікроорганізмів у середовищах з елементною сіркою та різними донорами електронів. Найвищу сульфідогенну активність бактерій *Desulfuromonas sp.* виявлено у середовищі з натрій лактатом і натрій піруватом. За наявності елементної сірки бактерії найкраще ростуть у середовищі з натрій лактатом, малатом і фумаратом. Бактерії *Desulfuromonas sp.* за відсутності у середовищі елементної сірки здатні використовувати фумарат як донор і акцептор електронів. За росту бактерій у середовищі з фумаратом у культуральній рідині нагромаджується сукцинат і в малій кількості – ацетат. Наявність останнього, можливо, пов'язана з особливостями функціонування циклу трикарбонових кислот у бактерій роду *Desulfuromonas*. Одночасне внесення двох акцепторів електронів (фумарату та елементної сірки) супроводжувалось інгібуванням сіркоредакції. За внесення у середовище з фумаратом додаткового джерела карбону (натрій лактату) та акцептора електронів (елементної сірки) спостерігали зростання сульфідогенної активності у п'ять разів.

Ключові слова: сіркєвідновлювальні бактерії; сукцинат; фумаратредуктаза; гідрогеназа; фумаратне дихання

Utilization of fumarate by sulfur-reducing bacteria *Desulfuromonas sp.*

O. Chayka, T. Peretjatko, S. Gudz, A. Halushka

Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine

The main goal of the work was to study the utilization of fumarate by sulfur-reducing bacteria *Desulfuromonas sp.* under different growth conditions and accumulation of hydrogen sulfide by bacteria in the media with sulfur and different electron donors. Sulfur-reducing bacteria *Desulfuromonas sp.*, isolated from soil in Yazivske sulfur deposit, were used in the research. Bacteria were grown in the medium Postgate C without sulfates. The content of hydrogen sulfide was determined by formation of methylene blue. The content of organic acids (fumarate, succinate, lactate, acetate) was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The biomass of cells was determined by the photoelectrocolorimetry method using KFK-3. The highest level of accumulation of hydrogen sulfide by bacteria *Desulfuromonas sp.* was found in media with sodium lactate and sodium pyruvate. The maximal concentration of hydrogen sulfide was 1.9 mM. Maximal accumulation of biomass was observed in the media with malate, lactate and fumarate with the presence of elemental sulfur. Sulfur-reducing bacteria *Desulfuromonas sp.* are able to utilize fumarate as an electron donor and acceptor in the absence of elemental sulfur in the medium. After the incubation of *Desulfuromonas sp.* in the medium with fumarate, chromatographic analysis of culture liquid showed that fumarate is converted to succinate and small quantities of acetate. The presence of acetate is, probably, due to the particularities of the functioning of citric acid cycle in bacteria of the genus *Desulfuromonas*. Consequently, the results indicate that the fumarate serves as a donor and acceptor of electrons. The simultaneous introduction of two electron donors – fumarate and elemental sulfur – was accompanied by inhibition of sulfur reduction. After an additional source of carbon (sodium lactate) and electron acceptor (elemental sulfur) was added to the medium with fumarate a fivefold increase of sulfidogenic activity was observed. Thus, regulation of respiration in bacteria *Desulfuromonas sp.* is directed to the primary utilization of the most energetically favorable electron acceptors.

Keywords: reducing bacteria; succinate; fumarate reductase; hydrogenase; fumarate respiration

Вступ

Бактерії здійснюють анаеробне дихання, за якого замість кисню термінальними акцепторами електронів слугують фумарат, нітрат, полісульфід чи інші окиснені неорганічні та органічні сполуки (Kroger et al., 2002). Для більшості мікроорганізмів використання фумарату як акцептора електронів при диханні – лише додатковий механізм, що дозволяє здобути більшу кількість енергії за анаеробних умов (Lancaster and Simon, 2002). Фумаратне дихання характерне для багатьох факультативно анаеробних (*Escherichia coli*, *Proteus rettgeri*, *Salmonella sp.*, *Klebsiella sp.*) і облигатно-анаеробних бактерій (*Clostridium formoaceticum*, *Desulfovibrio gigas*, *Propionibacterium sp.*, *Vibrio succinogenes*, *Wolinella succinogenes*) (Hedderich et al., 1999).

Для сульфатвідновлювальних бактерій ключовий фермент фумаратного дихання – фумаратредуктаза (сукцинат : хінооксидоредуктаза) (EC 1.3.5.1), яка може виконувати функцію сукцинатдегідрогенази під час окиснення сукцинату, а також хінон: фумаратредуктази під час фумаратного дихання (Lemos, 2002; Zaunmüller et al., 2006).

Lancaster and Simon (2002) показали, що фумаратредуктаза такого типу наявна у більшості сульфат- і сірководновлювальних бактерій, зокрема, *Desulfovibrio desulfuricans*, *D. vulgaris* і в інших протеобактеріях. У бактерій *Geobacter sulfurreducens* виділено фермент, який діє як термінальна фумаратредуктаза та сукцинатдегідрогеназа у циклі трикарбонових кислот (Butler et al., 2006).

Gebhardt et al. (1985) показали, що сірководновлювальні бактерії *Desulfuromonas acetoxidans* містять сукцинатдегідрогеназу (EC 1.3.99.1), яка за наявності НАДН⁺ може відновлювати фумарат до сукцинату. Використовуючи базу даних NCBI (www.ncbi) у бактерій *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684, ідентифікували амінокислотну послідовність фумаратредуктази (чи сукцинатдегідрогенази), яка має подібність із фумаратредуктазою *W. succinogenes* на 28%, *Desulfovibrio sp.* – 29%, *Geobacter sulfurreducens* – 82%.

Найкраще досліджено механізм відновлення фумарату мезофільними бактеріями *W. succinogenes*, які використовують молекулярний водень або форміат як донор електронів (Hedderich et al., 1999). У відновленні фумарату беруть участь два інтегровані в мембрану ферменти: фумаратредуктаза та гідрогеназа (чи форміатгідрогеназа). Під час окиснення гідрогену чи форміату електрони транспортуються від гідрогенази через цитохром *b* і хінон до фумаратредуктази, створюючи електрохімічний градієнт (Kroger et al., 2002).

Шляхи відновлення фумарату в сірководновлювальних бактерій роду *Desulfuromonas* не з'ясовані, тому мета цієї статті – з'ясувати деякі закономірності використання фумарату сірководновлювальними бактеріями *Desulfuromonas sp.*

Матеріал і методи досліджень

У дослідженні використали сірководновлювальні бактерії *Desulfuromonas sp.*, виділені з території Язівського сіркового родовища (Chayka et al., 2010). Бактерії вирощували у модифікованому середовищі Постгейта С

(г/л): KH_2PO_4 – 0,5, NH_4Cl – 1,0, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,06, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,05, натрій лактат (40%) – 12 мл, дріжджовий екстракт – 1,0, натрій лимоннокислий – 0,3, аскорбінова кислота – 1,0, елементна сірка – 1,0, вода дистильована до 1 л; pH = 7,5 (Postgate, 1984). Середовище стерилизували за 1 атм протягом 30 хв і розливали у пробірки (25 мл), закривали стерильними гумовими корками, так щоб у них не залишилося повітря. Біомасу клітин визначали турбідиметрично на фотоелектроколориметрі, використовуючи КФК – 3 ($\lambda = 340$ нм, кювета 3 мм). Вміст гідроген сульфід визначали за утворенням метиленової сині (Sugiyama, 2002).

Вміст органічних кислот (фумарату, сукцинату, лактату, ацетату) визначали методом вискоєфективної рідинної хроматографії (HPLC). Хроматографічна система складалася з двох pomp VarianProStar 210, хроматографічної колонки Polaris 5 C18-A, $250 \times 4,6$ мм у модулі колонок VarianProStar 500, спектрофотометричного детектора з фотодіодною матрицею VarianProStar 335. Як рухоми фазу використовували 0,2% розчин трифтороцтової кислоти (AppliChem) у воді (отриманій із допомогою системи очищення води AdronaCrystalCreBio з ультрафільтром Milipore). Хроматографічне розділення здійснювали у 0,2% розчині трифтороцтової кислоти протягом 8 хв. Потік розчинника становив 1,5 мл/хв (Kerem et al., 2004). Хроматограми записували за довжини хвилі 212 нм. Температура колонки становила 35 °C.

Результати представлені як середнє значення з поправкою на стандартну похибку ($M \pm m$). Досліди повторювали тричі з трьома паралельними постановками для кожного варіанта. Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програму Origin 6.1.

Результати та їх обговорення

У попередніх дослідженнях ми встановили, що бактерії *Desulfuromonas sp.* добре ростуть у середовищі з фумаратом за відсутності елементної сірки (Chayka et al., 2010). При цьому фумарат повністю забезпечує клітини органічним карбоном. За наявності елементної сірки *Desulfuromonas sp.* як джерело карбону використовують етанол, натрій ацетат, натрій лактат, натрій піруват, сукцинат, фумарат, малат. Дослідження сульфідогенної активності бактерій *Desulfuromonas sp.* у середовищах з елементною сіркою та різними донорами електронів показало, що максимальне нагромадження гідроген сульфід відбувається на 6–12-й добі культивування. Найвищу сульфідогенну активність бактерій *Desulfuromonas sp.* виявлено у середовищі з натрій лактатом і натрій піруватом (рис. 1). Максимальна концентрація гідроген сульфід становила 1,9 мМ. Бактерії *Desulfuromonas sp.* найкраще ростуть у середовищі з натрій лактатом, малатом і фумаратом за наявності елементної сірки (рис. 2).

Досліджувані бактерії можуть використовувати фумарат як акцептор електронів і, одночасно, як джерело карбону. Тому в наступних експериментах дослідили деякі закономірності використання фумарату бактеріями *Desulfuromonas sp.* за наявності у середовищі додаткових донорів і акцепторів електронів.

За анаеробного дихання бактерії використовують акцептори електронів із різними значенням окисно-

відновного потенціалу. Значення окисно-відновного потенціалу термінального акцептора електронів визначає місце виходу електрона з дихального ланцюга, а отже, кількість АТФ, що утворюється в результаті окисного фосфорилування. Чим вище значення окисно-відновного потенціалу акцептора, тим більше енергії отримує мікроорганізм унаслідок дихання. У природних умовах, де зазвичай одночасно присутні декілька можливих акцепторів електронів, факультативні анаероби спочатку використовують найвигодніші з них (із найвищими значеннями

окисно-відновного потенціалу), облігатні – лише низькопотенціальні акцептори. Послідовність використання різних акцепторів електронів у кожного мікроорганізму детермінована генетично, контролюється складними регуляторними механізмами (Kozlova, 2008). Окисно-відновний потенціал окисно-відновної пари фумарат / сукцинат вищий за окисно-відновний потенціал окисно-відновної пари S_0/HS^- , тому за одночасної наявності у середовищі фумарату та елементної сірки бактерії спочатку відновлювали фумарат.

Рис. 1. Нагромадження біомаси бактеріями *Desulfuromonas sp.* за наявності у середовищі елементної сірки та різних донорів електронів ($M \pm m$, $n = 3$)

Рис. 2. Нагромадження гідроген сульфід у бактеріями *Desulfuromonas sp.* за наявності у середовищі елементної сірки та різних донорів електронів ($M \pm m$, $n = 3$)

Хроматографічний аналіз культуральної рідини після вирощування *Desulfuromonas sp.* у середовищі з фумаровою кислотою показав, що бактерії нагромаджують сукцинат і, в незначних кількостях, ацетат (рис. 3). За цих умов у середовищі виявлено 0,9 г/л ацетату, як проміжної сполуки окиснення фумарату у циклі трикарбонових кислот (ЦТК). Бактерії *D. acetoxidans* здійснюють анаеробне окиснення ацетату за участі модифікованого ЦТК (Thauer, 1988). Ці мікроорганізми містять сукциніл-КоА: ацетат-КоА-трансферазу замість ацетил-КоА-синтетази та сукциніл-КоА-синтетази, які є у більшості аеробних і анаеробних мікроорганізмів (Thauer, 1988). Сукциніл-КоА: аце-

тат-КоА-трансфераза забезпечує утворення сукцинату з сукциніл-КоА і активацію ацетату (Thauer, 1988; Gebhardt et al., 1985). За внесення у середовище культивування фумарату та елементної сірки бактерії відновлюють фумарат до сукцинату. За цих умов вміст гідроген сульфід незначний (0,15 mM) (рис. 4). Отже, одночасне внесення двох акцепторів електронів, фумарату та елементної сірки, супроводжується інгібуванням сіркоредакції.

Бактерії *D. acetoxidans* окиснюють лактат до ацетату, який перетворюється через ацетил-КоА у модифікованому ЦТК до CO_2 (Gebhardt et al., 1985; Thauer, 1988). У процесі росту бактерій *Desulfuromonas sp.* у середовищі

з натрій лактатом і елементною сіркою спостерігається повне використання лактату та нагромадження ацетату в концентрації 1 г/л. За наявності у середовищі натрій лактату (як донора електронів) і фумарату після 14 діб культивування бактерії *Desulfuromonas sp.* нагромаджують сукцинат (рис. 5) і в малих кількостях ацетат. За цих умов спостерігається повне відновлення фумарату до сукцина-

ту та повне використання лактату. Одержані результати вказують на те, що досліджувані бактерії здатні використовувати фумарат як акцептор електронів за наявності у середовищі лактату. Наявність малої кількості ацетату, можливо, вказує на те, що лактат окиснюється до ацетату (проміжний продукт), який перетворюється через ацетил-CoA на ЦТК.

Рис. 3. Використання фумарату (—■—), нагромадження сукцинату (—●—) та ацетату (—▲—) бактеріями *Desulfuromonas sp.* ($M \pm m$, $n = 3$)

Рис. 4. Використання фумарату (—■—), нагромадження сукцинату (—●—), ацетату (—▲—) та гідроген сульфід (—◆—) бактеріями *Desulfuromonas sp.* у середовищі з фумаратом і елементною сіркою ($M \pm m$, $n = 3$)

Хроматографічний аналіз культуральної рідини після вирощування *Desulfuromonas sp.* у середовищі з фумаратом, натрій лактатом і елементною сіркою показав, що бактерії нагромаджують сукцинат і, в малих кількостях, ацетат (рис. 6). За цих умов відбувається повне відновлення фумарату до сукцинату та повне використання лактату. Однак у середовищі із фумаратом, натрій лактатом і елементною сіркою бактерії у 4 рази більше продукують гідроген сульфід, ніж у середовищі із фумаратом і елементною сіркою (рис. 4 і 6).

Відновлення фумарату мікроорганізмами з використанням різних донорів електронів відбувається за участі двох інтегрованих у мембрану ферментів – фумаратре-

дуктази та гідрогенази, які пов'язані між собою менахіном (Hedderich et al., 1999). Нагромадження сукцинату в результаті відновлення фумарату свідчить про те, що бактерії використовують фумарат як акцептор електронів (Kozlova, 2008). За використання фумарату бактеріями *Desulfuromonas sp.* як донора електронів відбувається його окиснення в циклі трикарбонових кислот до вуглекислого газу, при цьому у середовищі нагромаджується незначна кількість ацетату. Отримані результати вказують на те, що досліджувані бактерії використовують фумарат як акцептор і як донор електронів за анаеробних умов. Зазвичай у природних умовах одночасно виявляється декілька потенційних акцепторів електронів (Kozlova,

2008). Мікроорганізмам енергетично вигідніше спершу використати акцептори електронів із вищим окисно-відновним потенціалом. Дослідження використання фумарату *Desulfuromonas sp.* за наявності інших акцепторів електро-

нів показало, що бактерії спершу використовують акцептори електронів із вищим окисно-відновним потенціалом. Така властивість мікроорганізмів – адаптивна відповідь на мінливі умови навколишнього середовища.

Рис. 5. Використання фумарату (—■—), нагромадження сукцинату (—●—) та ацетату (—▲—) бактеріями *Desulfuromonas sp.* у середовищі з фумаратом і натрій лактатом ($M \pm m$, $n = 3$)

Рис. 6. Використання фумарату (—■—) та нагромадження сукцинату (—●—), ацетату (—▲—) та гідроген сульфід (—◆—) бактеріями *Desulfuromonas sp.* у середовищі з фумаратом, натрій лактатом (—▼—) і елементною сіркою ($M \pm m$, $n = 3$)

Висновки

Досліджено сульфідогенну активність бактерій *Desulfuromonas sp.* у середовищах з елементною сіркою та різними донорами електронів. Найвищу сульфідогенну активність бактерій *Desulfuromonas sp.* виявлено у середовищі з натрій лактатом і натрій піруватом. Бактерії найкраще ростуть у середовищі з малатом, натрій лактатом і фумаратом за наявності у середовищі елементної сірки.

Дослідження закономірностей використання фумарату бактеріями *Desulfuromonas sp.* за різних умов культивування показало, що за росту бактерій у середовищі з фумаратом у культуральній рідині нагромаджується сукцинат і незначна кількість ацетату. Наявність останнього, можливо, пов'язана з особливостями функціонування циклу трикарбонових кислот у бактерій роду

Desulfuromonas sp. Фумарат у концентрації 6 г/л пригнічує сульфідогенну активність досліджуваних бактерій. За внесення у середовище з фумаратом додаткового джерела карбону (натрій лактату) та акцептора електронів (елементної сірки) спостерігали зростання сульфідогенної активності у п'ятеро. Таким чином, регуляція дихання у бактерій *Desulfuromonas sp.* спрямована на те, що спершу відновлюються енергетично найвигідніші акцептори електронів.

Бібліографічні посилання

Butler, J.E., Glaven, R.H., Esteve-Nunez, A., Nunez, C., Sholobolina, E.S., Bond, D.R., Lovley, D.R., Butler, J.E., 2006. Genetic characterization of a single bifunctional enzyme for fumarate reduction and succinate oxidation in *Geobacter sulfurreducens* and engineering of fumarate reduction in *Geobacter metallireducens*. J. Bacteriol. 188(2), 450–455.

- Gebhardt, N.A., Thauer, R.K., Linder, D., Kaulfers, P.-M., Pfennig, N., 1985. Mechanism of acetate oxidation to CO₂ with elemental sulfur in *Desulfuromonas acetoxidans*. Arch. Microbiol. 141, 392–398.
- Hedderich, R., Klimmek, O., Kroger, A., Dirmeier, R., Keller, M., Stetter, K.O., 1999. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. FEMS Microbiol. Rev. 22, 353–381.
- Kerem, Z., Bravdo, B., Shoseyov, O., Tugendhaft, Y., 2004. Rapid liquid chromatography – ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must. J. Chromatogr. A. 1052, 211–215.
- Kozlova, I.P., Radchenko, O.S., Stepura, L.G., Kondratyuk, T.O., Pilyashenko-Novokhatnyy, A.I., 2008. Geokhimična diyalnist mikroorganizmiv ta yiyi prykladni aspekty [The geochemical activity of microorganisms and its practical aspects]. Naukova Dumka, Kyiv (in Ukrainian).
- Kröger, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Uden, G., Lancaster, C., Roy, D., 2002. Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: Enzymology, energetics and coupling mechanism. Biochim. Biophys. Acta 1553, 23–38.
- Lancaster, C., Roy, D., Simon, J., 2002. Succinate: Quinone oxido-reductases from e-proteobacteria. Biochim. Biophys. Acta 1553, 84–101.
- Lemos, R.S., Fernandes, A.S., Pereira, M.M., Gomes, C.M., Teixeira, M., 2002. Quinol:fumarate oxidoreductases and succinate:quinone oxidoreductases: Phylogenetic relationships, metal centres and membrane attachment. Biochim. Biophys. Acta 1553, 158–170.
- Postgate, J.R., 1984. The sulfate-reducing bacteria. 2nd ed. Cambridge University, Cambridge.
- Sugiyama, M., 2002. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen sulfide. United States Patent, №6340596.
- Thauer, R.K., 1988. Citric-acid cycle, 50 years on modifications and an alternative pathway in anaerobic bacteria. Eur. J. Biochem. 176, 497–508.
- Zaunmüller, T., Kelly, D.J., Glöckner, F.O., Uden, G., 2006. Succinate dehydrogenase functioning by a reverse redox loop mechanism and fumarate reductase in sulphate-reducing bacteria. Microbiology 152, 2443–2453.
- Chayka, O., Peretjatko, T., Gudz, S., 2010. Sirkovidnovlyuval'ni bakteriyi vodoym Yazivs'koho sirkovoho rodovyshcha [Sulfur reducing bacteria of Yazivske sulfur deposit]. Nauk. Visn. Uzhhorod. Univ. Ser. Biol. 28, 52–55 (in Ukrainian).

Надійшла до редколегії 07.08.2016