БІОХІМІЯ

УДК: 579.846.2:22

I. V. KUSHKEVYCH

Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno
Palackeho 1/3, CZ-61242 Brno, Czech Republic

EFFECT OF HYDROGEN SULFIDE AT DIFFERENTIAL CONCENTRATIONS ON THE PROCESS OF DISSIMILATORY SULFATE REDUCTION BY THE BACTERIA DESULFOVIBRIO PIGER

The influence of hydrogen sulfide at differential concentrations on the dissimilatory sulfate reduction process by bacteria Desulfovibrio piger Vib-7 isolated from the human intestine has been studied. The significant inhibition of bacterial growth (up to 21% on the 60th hour of cultivation, compared with control) and their sulfate and lactate consumption as well as hydrogen sulfide and acetate production has already been observed in concentration of 1 mM H_2S in the cultivation medium. In the presence of 2 and 3 mM H_2S, the bacterial growth is inhibited by 53 and 70%, respectively, on the 60th hour of cultivation. The increasing concentrations up to 4 and 5 mM hydrogen sulfide have caused a violation of the dissimilatory sulfate reduction process of the studied D. piger Vib-7 strain. Complete inhibition of bacterial growth and significant inhibition of sulfate reduction (up to 98%, compared with control) have been shown at the highest concentration (7 mM) of hydrogen sulfide in the cultivation medium. Based on experimental data, surface models of dissimilatory sulfate reduction parameters (bacterial growth, sulfate and lactate consumption, and accumulation of hydrogen sulfide and acetate) under the influence of hydrogen sulfide different concentration by the D. piger Vib-7 were constructed. The isolated bacteria D. piger Vib-7 producing hydrogen sulfide and acetate might cause various human and animal intestinal diseases (including ulcerative colitis and colon cancer) and other inflammatory bowel processes. Therefore these bacteria are quite interesting and promising for further studies.

Keywords: sulfate-reducing bacteria, Desulfovibrio piger, sulfates, hydrogen sulfide, ulcerative colitis, inflammatory bowel diseases

Hydrogen sulfide is the main product of the sulfate-reducing bacteria metabolism. It can also be created endogenously during trans-sulfurization, it is available in non-toxic concentrations in the brain, heart, blood vessels, genitourinary and gastrointestinal tract [9]. The hydrogen sulfide in higher concentrations inhibits the butyrate oxidation which is the main source of energy for intestine colonocytes of humans and animals as well as this compound can be cause hyperproliferation of cells and disruption of the mucosal colonocytes [2, 10]. Perfusion of rat colon by low concentrations of hydrogen sulfide leads to intestinal ulceration. It is believed that the sulfate-reducing bacteria have a significant influence on the development of the inflammatory bowel diseases. However, the intensity of the hydrogen sulfide concentration produced in the colon lumen by these bacteria is also an important factor [5]. It was detected significantly more in the distal intestine than in the proximal part of the intestine [4]. The sulfate-reducing bacteria form colonies and dense biofilms around ulcers [2]. The boundaries between the ulcer and the colonies of the bacteria probably depend on immune status of the macroorganism (host), the intestinal lumen pH and the availability of sulfate [8]. It has been shown that hydrogen sulfide increases the permeability of the epithelial barrier of the oral mucosa

cells and interferes with their function [3, 9, 10]. The relevance of this research is that the influence of hydrogen sulfide at differential concentrations on the dissimilatory sulfate reduction by the intestinal bacteria Desulfovibrio genus has been insufficiently studied. Since the sulfate-reducing bacteria are producers of hydrogen sulfide, it is very interesting to investigate their sensitivity to this highly toxic compound.

The aim of this work was to study the process of dissimilatory sulfate reduction by the Desulfovibrio piger Vib-7 under the influence of hydrogen sulfide at differential concentrations as well as the obtained data to compare with those from literature.

Material and methods

Object of the study was the sulfate-reducing bacteria of the Desulfovibrio piger strain Vib-7 isolated from the human large intestine [7]. The strain is kept in the collection of microorganisms at the Biotechnology laboratory of Pharmacy Faculty at the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno (Czech Republic).

The bacteria were grown in nutrition modified Kravtsov-Sorokin's liquid medium of such composition (g/l): Na_2SO_4 – 0.5; KH_2PO_4 – 0.3; K_2HPO_4 – 0.5; $(NH_4)_2SO_4$ – 0.2; NH_4Cl – 1.0; $CaCl_2 \times 6H_2O$ – 0.06; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.1; $C_3H_5O_3Na$ – 2.0; yeast extract – 1.0; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0.004; $C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$ – 0.3. The medium was heated in boiling water for 30 min in order to obtain an oxygen-free medium, and cooled to +30°C temperature.

To study the effect of hydrogen sulfide at differential concentrations on the growth bacteria D. piger Vib-7 and their process of dissimilatory sulfate reduction, a sterile solution of $Na_2S \times 9H_2O$ (1%) was added before bacterial seeding the Kravtsov-Sorokin's liquid medium. The final concentration of hydrogen sulfide in the medium was 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0; 6.0 and 7.0). The medium without added of $Na_2S \times 9H_2O$ was used as a control. The initial cells seeding was 0.5 mg/ml. The bacteria were grown for 72 hours at +37°C under anaerobic conditions. The tubes were brim-filled with medium and closed to provide anaerobic conditions.

Accumulation of biomass of the sulphate-reducing bacteria in liquid medium (without Mohr's salt) was determined by the turbidity of the dilute suspension of cells by the photometric method.

The sulfate ions concentration in the medium was determined by turbidymetric method after it had been precipitated with barium chloride. To stabilize the suspension, glycerol was used [6].

Hydrogen sulfide concentration in the culture medium was determined by the photometric method based on reaction of sulfide and n-aminodimethylaniline with methylene blue formation [11]. The concentration of hydrogen sulfide by calibration curve was established.

Measurements of lactate concentration were carried out through a dehydrogenation reaction of lactate by lactate dehydrogenase in the presence of NAD^+, with formation of pyruvate and NADH products [12].

Accumulation of acetate ions by the bacteria cultures during their growth in the medium was determined by titration.

Using the experimental data, the basic statistical parameters (M – mean, m – standard error, M±m) have been calculated. For the estimation of the reliability between the statistical characteristics, Student's t-test was used. The difference was reliable when $P \geq 0.95$ [1]. Statistical processing of the results was performed using packet Excel, Origin and Statistica computer programs.

Results and Discussion

The isolated sulfate-reducing bacteria the Desulfovibrio piger Vib-7 actively reduced sulfate and produced hydrogen sulfide (up to 3.16 mM on the 72^{th} hour of cultivation) assimilating lactate and accumulating acetate (up to 15.45 mM on the 72^{th} hour of cultivation) in the control medium (fig. 1).

The studied bacteria had accumulated biomass up to 3.7 mg/ml on the 60^{th} hour of cultivation. Adding different concentrations of hydrogen sulfide in the culture medium led to inhibition of bacterial growth and disruption of the sulfate reduction process. This process under the effect of different concentrations of hydrogen sulfide by the D. piger Vib-7 has been studied.

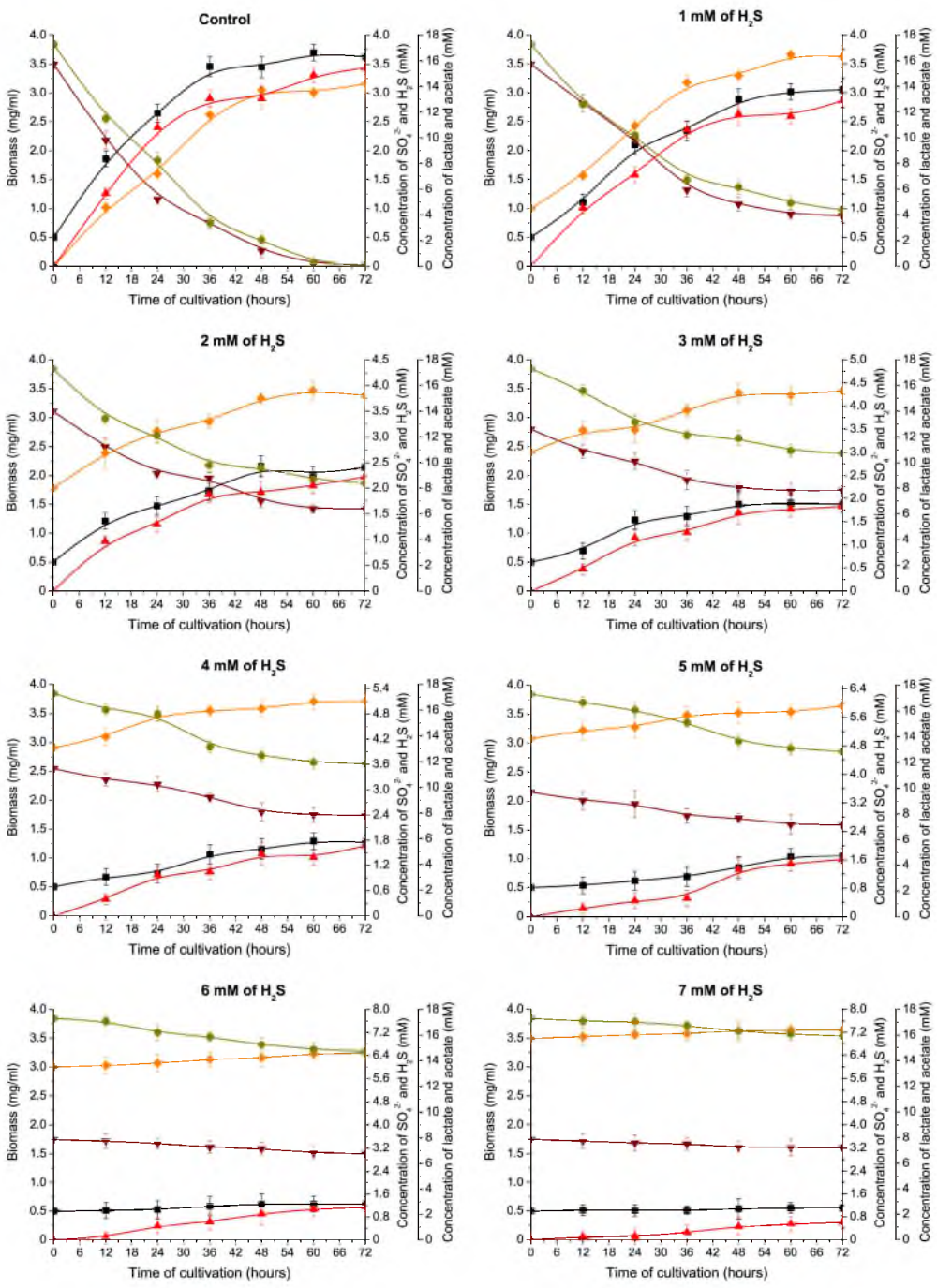

Fig. 1. The growth of Desulfovibrio piger Vib-7 and their process of dissimilatory sulfate reduction under influence of hydrogen sulfide at differential concentrations: –■– biomass; –▼– sulfate; –♦– sulfide; –●– lactate; –▲– acetate

Despite the fact that the studied sulfate-reducing bacteria produce hydrogen sulfide, their cells are highly sensitive to this compound. The significant inhibition of D. piger Vib-7 growth (up to 21% on the 60th hour of cultivation) is observed already in concentration of 1 mM hydrogen sulfide in the medium. The sulfate and lactate consumption has been inhibited by 98% on the 60th hour of cultivation under these conditions compared to the sulfate and lactate assimilation of bacteria grown in the medium without hydrogen sulfide.

The bacterial growth is inhibited by 53 and 70% at concentrations of 2 and 3 mM of H_2S, respectively, on the 60th hour of cultivation compared to the control. Increasing the concentration to 4

and 5 mM has caused bacterial growth retardation to 24 hour, and after that the biomass of D. piger Vib-7 slightly increased (up to 1.29 and 1.04 mg/ml on the 60th hour of cultivation, respectively).

The high concentrations of hydrogen sulfide (6 and 7 mM) in the medium are the most toxic. Bacterial growth under the influence of these concentrations of H_2S has been totally inhibited. However, insignificant dissimilation sulfate and lactate and the accumulation of hydrogen sulfide and acetate under these conditions have been observed. Apparently, the studied bacteria D. piger Vib-7 are viable under these toxic concentrations but they can not multiply.

Based on experimental data, surface models of the dissimilatory sulfate reduction parameters (bacterial growth, sulfate and lactate consumption, and accumulation of hydrogen sulfide and acetate) under the influence of hydrogen sulfide different concentration by the D. piger Vib-7 were constructed (fig. 2).

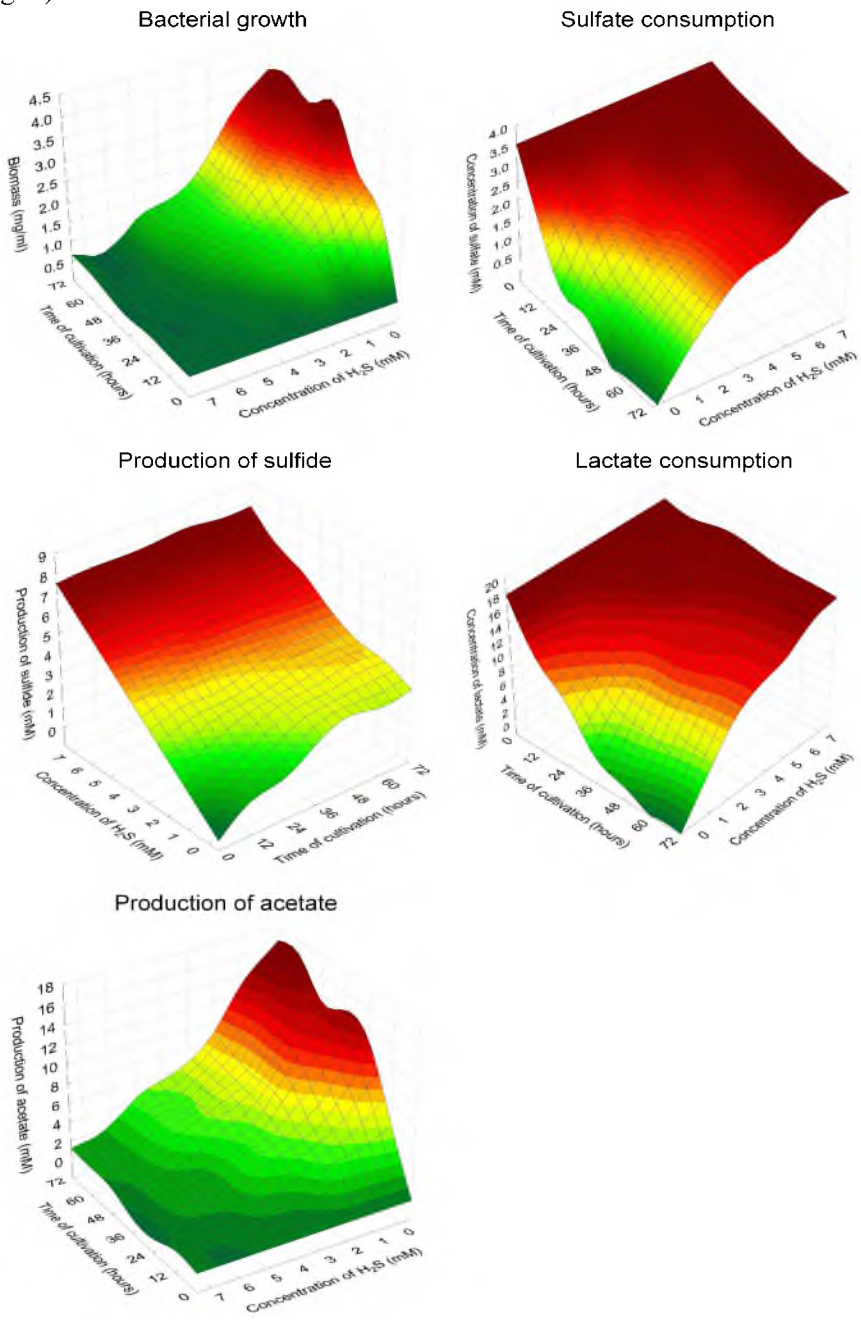

Fig. 2. The surface models of dissimilatory sulfate reduction parameters by the bacteria Desulfovibrio piger Vib-7 under the influence of hydrogen sulfide at differential concentrations (3D surface)

The obtained surface models show inhibited effect of hydrogen sulfide different concentrations on the D. piger Vib-7 growth and their sulfate reduction process. The inhibition of the process increases in proportion to the increase of hydrogen sulfide concentration in the medium.

Thus hydrogen sulfide is toxic for studied bacteria which are producers of this compounds. A limiting factor for their growth in the human intestine is the increase its concentration.

From the available literature data it is known that hydrogen sulfide is present in lumen of the human large intestine in millimolar concentrations (1.0–2.4 mM) [3]. However, the concentration of free (unbound) sulfide is in the micromolar range due to a large capacity of fecal components to bind the sulfide. The strain D. piger Vib-7 produce H_2S (up to 3.16 mM), actively assimilating sulfate and lactate, these compounds are contained in the food which the human has consumed.

Hydrogen sulfide can also be formed from endogenous sulfur-containing compounds including amino acids. At excessive concentration, H_2S is known to severely inhibit cytochrome c oxidase, the terminal oxidase of the mitochondrial electron transport chain, and thus mitochondrial oxygen consumption [9, 10]. Some experimental facts suggest that the capacity of colonocytes to metabolize H_2S is an important feature for their resistance toward an excessive concentration of free luminal sulfide [3]. The data which would allow implying prolonged excessive concentration of sulfide in the luminal content of the large intestine and/or defective expression of detoxifying catalytic activities in large intestine epithelium in the colon carcinogenesis are scarce. In view of this fact, the isolated bacteria D. piger Vib-7 are very promising for further studies.

Conclusions

The intensity of dissimilatory sulfate reduction (bacterial growth, sulfate and lactate assimilation and accumulation of H_2S and acetate) by the D. piger Vib-7 depends on the concentration of hydrogen sulfide in the cultivation medium. The highest concentration of hydrogen sulfide and acetate was produced in the medium without any initial hydrogen sulfide. Despite the fact, that the isolated D. piger Vib-7 can capable of rapidly producing hydrogen sulfide, high concentrations of which are toxic to its producers.

Taking into consideration all of the obtained results: studies of the strain D. piger Vib-7 growth in medium with hydrogen sulfide at differential concentrations, their sulfate and lactate assimilation as well as the accumulation of hydrogen sulfide and acetate, the isolated bacteria might cause various human intestinal diseases (including ulcerative colitis and colon cancer) and other inflammatory bowel processes. Therefore these bacteria are quite interesting and promising for further studies.

1. Bailey N.T.J. Statistical Methods in Biology. — Cambridge University Press. 3rd edition. — 1995. — 252 p.
2. Barton L.L., Hamilton W.A. Sulphate-reducing Bacteria. — Environmental and Engineered. — Cambridge University Press. — 2007. — 553 p.
3. Blachier F., Davila A.M., Mimoun S. Luminal sulfide and large intestine mucosa: friend or foe? Amino Acids. — 2010. — Vol. 39. — P. 335—347.
4. Cummings J.H., Macfarlane G.T., Macfarlane S. Intestinal Bacteria and Ulcerative Colitis. Curr Issues Intest Microbiol. — 2003. — Vol. 4. — P. 9—20.
5. Gibson G.R., Cummings J.H., Macfarlane G.T. Growth and activities of sulphate-reducing bacteria in gut contents of health subjects and patients with ulcerative colitis. FEMS Microbiol Ecol. — 1991. — Vol. 86. — P. 103—112.
6. Kolmert A., Wikstrom P., Hallberg K.B. A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. Jour of Microbiol Methods. — 2000. — Vol. 41. — P. 179—184.
7. Kushkevych I.V. Identification of sulfate-reducing bacteria strains of the human large intestine. Sci Int Jour Biological studies/Studia Biologica. — 2013. — Vol. 7. — No. 3. — P. 115—124.
8. Loubinoux J., Mory F., Pereira I.A., Le Faou A.E. Bacteremia caused by a strain of Desulfovibrio related to the provisionally named Desulfovibrio fairfieldensis. Jour Clin Microbiol. — 2000. — Vol. 38. — P. 931—934.
9. Pitcher M.C., Cummings J.H. Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? Gut. — 1996. — Vol. 39. — P. 1—4.
10. Rowan F.E., Docherty N.G., Coffey J.C., O'Connell P.R. Sulphate-reducing bacteria and hydrogen sulphide in the aetiology of ulcerative colitis. British Journal of Surgery. — 2009. — Vol. 96. — P. 151—158.

11. Sugiyama M. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen / U.S. Pat. 6340596 B1 USA, Int. Cl. G 01 N 33/00, — 2002.
12. Vlizlo V.V., Fedoruk R.S., Makar I.A. et al. Physiological and biochemical methods of researches in biology, stockbreeding and veterinary medicine. –Handbook Institute of Animal Biology. — Third Edition: revised and enlarged Lviv. — 2004. — 402 p.

І.В. Кушкевич
Фармацевтичний факультет університету ветеринарних та фармацевтичних наук Брно

ВПЛИВ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА ПРОЦЕС ДИСИМІЛЯЦІЙНОГО ВІДНОВЛЕННЯ СУЛЬФАТУ БАКТЕРІЯМИ DESULFOVIBRIO PIGER

Досліджено вплив різних концентрацій гідроген сульфіду на процес дисиміляційного відновлення сульфату бактеріями Desulfovibrio piger Vib-7, ізольовані з кишечника людини. Значне інгібування росту бактерій (до 21% на 60 годину культивування, порівняно з контролем), використання ними сульфату і лактату, а також утворення гідроген сульфіду і ацетату встановлено уже за концентрації 1 мМ H_2S у середовищі культивування. За наявності 2 і 3 мМ H_2S ріст бактерій інгібувався на 53 та 70%, відповідно, на 60 годину культивування. Збільшення концентрацій до 4 і 5 мМ гідроген сульфіду спричиняло порушення процесу дисиміляційного відновлення сульфату досліджуваним штамом D. piger Vib-7. Повне інгібування бактеріального росту і значне інгібування процесу сульфатредукції (до 98%, порівняно з контролем) встановлено за найвищої концентрації (7 мМ) гідроген сульфіду у середовищі культивування. На основі експериментальних даних (бактеріального росту D. piger Vib-7, використання ними сульфату і лактату, а також накопичення гідроген сульфіду та ацетату), побудовано моделі поверхонь параметрів дисиміляційного відновлення сульфату бактеріями за впливу різних концентрацій гідроген сульфіду. Ізольовані бактерії D. piger Vib-7, продукуючи гідроген сульфід і ацетат, можуть спричиняти різні кишкові захворювання людини і тварин (у тому числі виразковий коліт та рак товстої кишки), а також інші запальні процеси кишечника. Тому ці бактерії є досить цікавими та перспективний для подальших досліджень.

Ключові слова: *сульфатвідновлювальні бактерії*, Desulfovibrio Piger, *сульфати*, *гідроген сульфід*, *виразковий коліт*, *запальні захворювання кишечника*

И.В. Кушкевич
Фармацевтический факультет университету ветеринарных и фармацевтических наук Брно

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА НА ПРОЦЕСС ДИССИМИЛЯЦИОННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ СУЛЬФАТА БАКТЕРИЯМИ DESULFOVIBRIO PIGER

Исследовано влияние разных концентраций гидроген сульфида на процесс диссимиляционного восстановления сульфата бактериями Desulfovibrio piger Vib-7, которые были изолированы из кишечника человека. Значительное ингибирование роста бактерий (до 21% на 60 час культивирования, по сравнению с контролем), использование ими сульфата и лактата, а также накопления гидроген сульфида и ацетата установлено уже при концентрации 1 мМ H_2S в среде культивирования. При наличии 2 и 3 мМ H2S рост бактерий ингибувався на 53 и 70%, соответственно, на 60 час культивирования. Увеличение концентраций до 4 и 5 мМ гидроген сульфида вызывало нарушение процесса диссимиляционного восстановления сульфата исследуемым штаммом D. piger Vib-7. Полное ингибирование бактериального роста и значительное ингибирование процесса сульфатредукции (до 98%, по сравнению с контролем) установлено по наивысшей концентрации (7 мМ) гидроген сульфида в среде культивирования. На основе экспериментальных данных (бактериального роста D. piger Vib -7, использование ими сульфата и лактата, а также накопление гидроген сульфида и ацетата), построены модели поверхностей параметров диссимиляционного восстановления сульфата бактериями под влиянием разных концентраций гидроген сульфида. Изолированные бактерии D. piger Vib-7, продуцируя гидроген сульфид и ацетат, могут вызывать разные кишечные заболевания человека и животных (в том числе язвенный колит и рак толстой кишки), а также другие

воспалительные процессы кишечника. Поэтому эти бактерии являются достаточно интересными и перспективный для дальнейших исследований.

Ключевые слова: *сульфат-восстановительные бактерии*, Desulfovibrio piger, *сульфаты*, *гидроген сульфид*, *язвенный колит*, *воспалительные заболевания кишечника*

Рекомендує до друку
О.Б. Столяр

Надійшла 16.10.2013

УДК 547.915: 639.215.2

Ю.І. СЕНИК[1], Б.З. ЛЯВРІН[1], І.Ю. НАЙКО[2], О.Б. ОСТАПЮК[1], Д.В. ГАЙДУК[1], В.Я. БИЯК[1], В.О. ХОМЕНЧУК[1], В.З. КУРАНТ[1]

[1]Тернопільський національний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027
[2]ПВНЗ "Буковинський університет"
вул. Дарвіна, 2а, Чернівці, 58000

ФОСФОЛІПІДНИЙ СКЛАД МІТОХОНДРІЙ КЛІТИН ГЕПАТОПАНКРЕАСУ РИБ ЗА ДІЇ ЙОНІВ Zn^{2+} ТА Cd^{2+}

Досліджено вплив Zn^{2+}(0,5 і 2 мг/дм^3) та Cd^{2+}(0,005 і 0,02 мг/ дм^3) на ліпідний склад мітохондрій клітин гепатопанкреасу коропа (Cyprinus carpio L.) та щуки (Esox lucius L.). Встановлено, що підвищені концентрації йонів металів у воді викликають структурно-функціональні зміни фосфоліпідного складу мітохондрій досліджуваних риб.

Вплив 0,5 мг/дм^3 йонів Zn^{2+} у обох видів риб та дія низьких концентрацій Cd^{2+} у щуки активував синтез ФХ, що призводить до зниження мікров'язкості мембрани, що, ймовірно, обумовлено збільшенням ролі фосфоліпідів у регуляції її проникності для йонів металів.

Дія обох досліджуваних концентрацій кадмію та вплив 2 мг/дм^3 йонів цинку викликала зростання кількості ФЕА, ЛФХ і СМ та зменшення вмісту ФХ і ФІ. Зниження вмісту ФХ і ФІ з паралельним накопичення ЛФХ вказує на активацію лізосомальної фосфоліпази A_2 і фосфоліпази С, тобто, деструкцію ліпідного шару мембран мітохондрій. Адаптивною відповіддю на такі зміни можна вважати накопичення СМ і ФЕА, що сприяє збільшенню щільності ліпідного бішару та, відповідно, зниженню його проникності. Незважаючи на адаптивну роль ФЕА, значне його накопичення з одночасним гідролізом ФХ сприяє можливій його появі на зовнішньому шарі мембран мітохондрій, внаслідок чого спостерігається зростання її проникності, що може бути однією з причин накопичення йонів Cd^{2+} і Zn^{2+} за дії їх високих концентрацій у воді.

Ключові слова: *щука*, *короп*, *цинк*, *кадмій*, *печінка*, *мітохондрії*, *мембрани*, *фосфоліпіди*

В організмах гідробіонтів еволюційно сформувалися механізми біохімічної адаптації до хімічних чинників різного типу і рівня. Одним із таких механізмів адаптації до надлишкового надходження іонів металів є структурна перебудова ліпідного бішару мембран [8]. Проте, незважаючи на актуальність, їх вплив на ліпідний обмін у водних організмів вивчено недостатньо, оскільки, більшість досліджень проведено на вищих хребетних тваринах [3]. Щодо риб, то у них досліджено роль ліпідів в адаптації до інших екологічних чинників [2, 4].

Враховуючи те, що йони металів можуть проникати з води в організм риб і змінювати спрямованість багатьох обмінних процесів [5], предметом цього дослідження стало вивчення участі ліпідів мітохондрій гепетоцитів коропа і щуки (відповідно, представника миролюбивих риб та хижака) в адаптації їх організму до дії йонів цинку і кадмію (есенціального та токсичного металу) механізм надходження яких в організм риб є подібним [12]. Також ці