



УДК 579.266.4

ЗМІНИ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ КЛІТИН *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* IMB B-7384 ЗА ВПЛИВУ ФЕРУМ ЦИТРАТУ

О. Д. Масловська, С. О. Гнатуш, А. А. Галушка

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: Sosnovska.olga@yandex.ua

Бактерії *Desulfuromonas acetoxidans* IMB B-7384 є перспективними для розроблення біотехнології очищення стічних вод від іонів металів зі змінною валентністю. Дослідження механізмів захисту клітин *D. acetoxidans* IMB B-7384 за стресових умов, зокрема, від зростаючих концентрацій іонів важких металів, є важливим для розуміння способів регулювання метаболізму бактерій у процесі очищення стічних вод. Зміни жирнокислотного складу ліпідів розглядають як один із можливих способів захисту бактерійної клітини за умов стресу. Внесення ферум цитрату в середовище для вирощування бактерій *D. acetoxidans* IMB B-7384 зумовлювало зміни жирнокислотного складу, порівняно з контролем. За умови внесення різних концентрацій ферум цитрату спостерігали зниження вмісту насичених жирних кислот із непарною кількістю атомів карбону. За впливу солі металу в клітинах бактерій зафіксовано зростання вмісту насичених жирних кислот із парною кількістю атомів карбону, жирних кислот із циклопропановим кільцем і розгалуженим карбоновим ланцюгом. За цих умов знижується індекс ненасиченості жирних кислот. Ступінь *цис-транс* ізомеризації ненасичених жирних кислот клітин *D. acetoxidans* IMB B-7384 за впливу ферум цитрату не зростає.

Ключові слова: *Desulfuromonas acetoxidans*, ферум цитрат, жирні кислоти.

ВСТУП

Мікроорганізми у природі не завжди є в оптимальних умовах, особливо за антропогенного забруднення довкілля важкими металами. Одним із основних напрямів очищення навколишнього середовища від забруднення є застосування біотехнологій, які ґрунтуються на ефективних біологічних механізмах детоксикації небезпечних речовин мікроорганізмами. Бактерії здатні ензиматично відновлювати метали у метаболічних шляхах, які безпосередньо не пов'язані з асиміляцією цих металів. Представники класу *Deltaproteobacteria*, зокрема бактерії *Desulfuromonas acetoxidans*, здатні використовувати S⁰, Fe (III) і Mn (IV) як акцептори електронів у разі окиснення органічного карбону, що забезпечує їхню особливу адаптацію до змін довкілля. Ці бактерії є одними із перших мікроорганізмів, у яких встановлена здатність отримувати енергію для їхнього росту поєднанням повного окиснення

органічних сполук із відновленням Fe (III) та Mn (IV) у процесах дисиміляційної Fe (III)- чи Mn (IV)-редукції [12, 22]. Близькоспоріднений до *D. acetoxidans* вид *Geobacter metallireducens* здатний використовувати U (VI), Cr (VI), V (V), Ag (I) та Hg (II) як кінцеві акцептори електронів. Також бактерії *G. metallireducens* ензиматично відновлюють радіонукліди, зокрема Tc (VII), Np (V) та Pu (IV) [13]. Основне екологічне значення редукції металів бактеріями полягає у зменшенні розчинності сполук цих металів, а отже, і зниженні їхньої мобільності. Мікробне відновлення металів може бути використано для ремедіації середовищ, забруднених важкими металами й органічними сполуками [13]. Іншим способом очищення стічних вод, забруднених іонами важких металів і органічними сполуками, може бути створення мікробних паливних елементів. Бактерії *Desulfuromonas acetoxidans* IMB B-7384 розглядають як високоефективний біокаталізатор для мікробних паливних елементів, які забезпечують формування електричного струму в разі окиснення органічного карбону, внаслідок переміщення електронів під час процесів відновлення перехідних металів 3d-типу, зокрема феруму та мангану [21, 22, 23]. Іони важких металів можуть каталізувати утворення активних метаболітів кисню (АМО). Щоб протидіяти шкідливому впливу АМО, багато анаеробних мікроорганізмів виробили системи захисту. Однак, якщо збільшується генерація АМО чи знижується потужність систем їхньої деградації, або якщо ці два процеси відбуваються одночасно, то виникає оксидативний стрес [14]. За умов стресу активуються різні механізми захисту у клітинах. Одним із таких механізмів є зміни жирнокислотного складу клітинних ліпідів для підтримання відповідного рівня плинності цитоплазматичної мембрани. У відповідь на вплив АМО у клітинах бактерій модифікується структура ліпідів, про що свідчить зміна індексу ненасиченості жирних кислот, ступеня *цис-транс* ізомеризації подвійних зв'язків, співвідношення розгалужених/нерозгалужених жирних кислот. Також змінюється довжина ланцюга жирнокислотного залишку ліпідів [17]. Багато робіт присвячено дослідженню змін жирнокислотного складу ліпідів мембран бактерій за впливу температури, рН, вмісту токсичних речовин, зокрема ароматичних сполук, у культуральному середовищі [17]. Розуміння механізмів захисту бактерій від зростаючих концентрацій іонів важких металів може бути корисним для створення ефективних методів очищення стічних вод за участі бактерій. Перспективними мікроорганізмами для створення таких біотехнологій є сірковідновлювальні Fe (III)-редуктори *D. acetoxidans* IMB B-7384. У літературі недостатньо інформації про вплив феруму цитрату на композицію жирних кислот у ліпідах бактерій. У наших попередніх роботах доведено, що внесення феруму цитрату в середовище для вирощування бактерій *D. acetoxidans* IMB B-7384 спричиняє зростання вмісту у клітинах гідропероксидів ліпідів, дієнових кон'югатів і тіобарбітуратактивних продуктів [18]. Відомо, що продукти перекисного окиснення ліпідів, зокрема гідропероксиди ліпідів і дієнові кон'югати, можуть збільшувати проникність мембран пошкодженням як білкової, так і ліпідної частини мембрани [2]. Вплив феруму цитрату на жирнокислотний склад сірковідновлювальних бактерій не досліджено. Тому метою роботи було охарактеризувати зміни жирнокислотного складу клітин *D. acetoxidans* IMB B-7384 за впливу феруму цитрату.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі використовували бактерії *Desulfuromonas acetoxidans* IMB B-7384, виділені й ідентифіковані на кафедрі мікробіології ЛНУ імені Івана Франка. Штам

задепонований і зберігається в Українській колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України [3]. Бактерії вирощували упродовж чотирьох діб у модифікованому середовищі Постгейта С [19]. Як донор і акцептор електронів використовували фумарат натрію (6 г/л). Для досліджень впливу ферум цитрату на склад жирних кислот клітин *D. acetoxidans* ІМВ В-7384 у культуральне середовище вносили 10–20 мМ солі металу. Такі концентрації ферум цитрату зумовлювали інгібування нагромадження біомаси на 20–50 % [18]. У контроль ферум цитрату не вносили. Ферум цитрат було обрано як сіль Fe (III), яка у середовищі з нейтральним значенням рН не утворює нерозчинну сполуку Fe(OH)₃.

Клітини бактерій (1,5–2 мг сухої біомаси) з пізньої логарифмічної фази росту осаджували, двічі відмивали 0,9% розчином NaCl, ресуспендували у 50 мМ *трис*-HCl буфері (рН 7,5) і руйнували ультразвуком (дезінтегратор УЗДН – 1, 22 кГц, сила анодного струму 0,4–0,7 А, резонансні умови) 3,5 хв. Екстрагування ліпідів проводили за методом, описаним Bligh і Dyer [1]. Після екстрагування ліпідів суміш хлороформу з метанолом висушували на водяній бані. До сухого залишку додавали 2 мл гексану, перемішували. До суміші додавали 0,5 мл метилату натрію (2 моль/л), перемішували і нагрівали на водяній бані за температури +50 °С упродовж 5 хв. Відбирали верхній шар і відфільтровували його крізь паперовий фільтр. Гексан висушували на водяній бані за температури +100 °С. Метиллові ефіри жирних кислот розчиняли у метанолі. Отримані метиллові ефіри жирних кислот аналізували за допомогою газового хроматографа Agilent Technologies 7890A з полуменево-іонізаційним детектором і капілярною колонкою HP-1 (Agilent Technologies) розміром 50 м × 0,320 мм, товщина фази 1 мкм. Температурний режим +130...+250 °С, градієнт температури +4 °С/хв. Як газ-носії використовували гелій. Результати опрацьовували з використанням стандартного набору метилових ефірів жирних кислот (Supelco, США). Вміст окремих жирних кислот визначали у відсотках від загальної площі піків. Індекс ненасиченості жирних кислот визначали, як описано в роботі [4].

Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням програмних пакетів Microsoft Excel та Origin [9]. Обчислювали основні статистичні показники за безпосередніми даними (середнє арифметичне – *M*; стандартна похибка середнього арифметичного – *m*). Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками трьох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента. Достовірною вважалася різниця за показника достовірності *P*>0,95.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Основними жирними кислотами клітин *D. acetoxidans* ІМВ В-7384, вирощених у середовищі без внесення ферум цитрату, були *цис*-9-гексадеканова (16:1 ω9с), гексадеканова (16:0), *цис*-9,10-метилгексадеканова (су 17:0) та *транс*-9-октадеканова (*trans* 18:1 ω9с). Ці жирні кислоти становили до 89 % усіх жирних кислот клітин *D. acetoxidans* ІМВ В-7384. Також виявлено незначні кількості жирних кислот із розгалуженим ланцюгом. Це 12- і 13-метилтетрадеканова кислоти (ізо-15:0 та антеізо-15:0 відповідно) і 15-метилгексадеканова кислота (ізо-17:0). Вміст цих жирних кислот не перевищував 0,2 % від усіх жирних кислот клітини. Наявність у клітинах *D. acetoxidans* ІМВ В-7384 жирних кислот із прямим і розгалуженим ланцюгами вказує на ймовірне використання клітиною двох шляхів біосинтезу жирних кислот. Жирні кислоти ізо-15:0, антеізо-15:0 та ізо-17:0 синтезуються у шляху біосинтезу розгалужених жирних кислот, а кислоти 16:1 ω9с і *trans* 18:1 ω9с – в анаеробному десатуразному шляху [11].

Внесення ферум цитрату в середовище для культивування бактерій *D. acetoxidans* IMB B-7384 зумовлювало зміни жирнокислотного складу, порівняно з контролем. Для інтерпретації впливу ферум цитрату на бактерії *D. acetoxidans* IMB B-7384 ідентифіковані жирні кислоти були розділені на класи: насичені жирні кислоти з парною кількістю атомів карбону, насичені жирні кислоти з непарною кількістю атомів карбону, жирні кислоти з розгалуженим карбоновим ланцюгом, жирні кислоти, які містять циклопропанове кільце, гідроксикислоти і ненасичені жирні кислоти.

Серед насичених жирних кислот з парною кількістю атомів карбону в клітинах бактерій *D. acetoxidans* IMB B-7384 виявлено додеканову (12:0), тетрадеканову (14:0), гексадеканову (16:0), октадеканову (18:0) та ейкозанову кислоти (20:0). Вміст цих кислот, крім ейкозанової кислоти, у клітинах бактерій за впливу всіх досліджуваних концентрацій солі металу зростав (рис. 1, Б). За внесення ферум цитрату в концентраціях 10; 14 і 20 мМ вміст додеканової кислоти зростав, відповідно, в 3; 4 та 7 разів, порівняно з контролем. Також зафіксовано зростання вмісту тетрадеканової, гексадеканової й октадеканової кислот за впливу ферум цитрату. Вміст ейкозанової кислоти за впливу 10 і 12 мМ ферум цитрату знижувався на 51 та 67 %, відповідно. За зростання концентрації ферум цитрату до 20 мМ ейкозанову кислоту у клітинах бактерій *D. acetoxidans* IMB B-7384 не виявлено.

У клітинах бактерій *D. acetoxidans* IMB B-7384 ідентифіковано такі жирні кислоти з непарною кількістю карбонових атомів: тридеканова (13:0), пентадеканова (15:0) та гептадеканова кислоти (17:0). Вміст цих кислот у клітинах бактерій, вирощених у середовищі без внесення ферум цитрату, становить відповідно 0,06, 2,45 і 1,8 % від усіх клітинних жирних кислот (рис. 1, А).

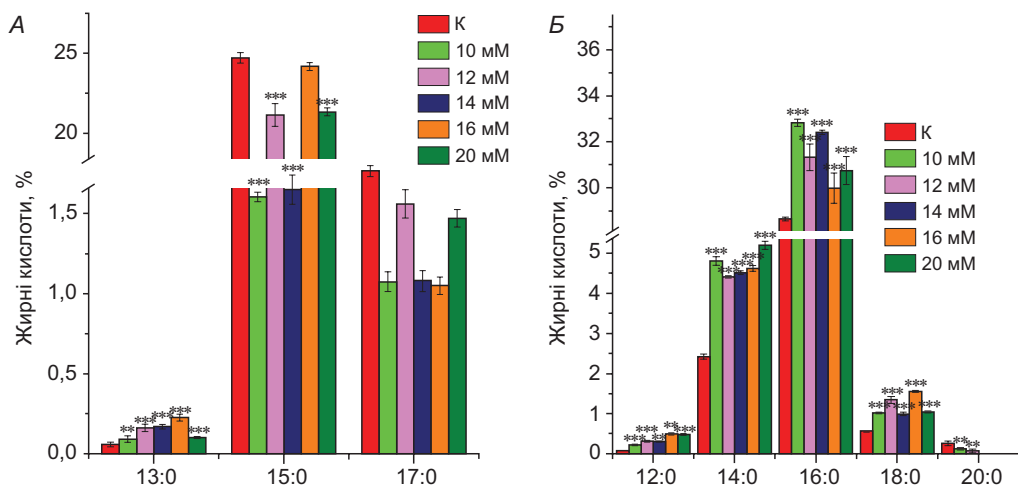


Рис. 1. Вміст насичених жирних кислот із непарною (А) і парною (Б) кількістю атомів карбону у клітинах бактерій *D. acetoxidans* IMB B-7384 за впливу ферум цитрату (** – $p \geq 0,99$, $n = 3$; *** – $p \geq 0,999$, $n = 3$ – тут і надалі вірогідні зміни порівняно з контролем)

Fig. 1. The content of saturated straight chain fatty acids with odd (A) and even (B) carbon number in *D. acetoxidans* IMB B-7384 cells under the influence ferric citrate (** – $p \geq 0.99$, $n = 3$; *** – $p \geq 0.999$, $n = 3$ – compared with control)

Вміст тридеканової кислоти за впливу всіх досліджуваних концентрацій ферум цитрату зростав. Зростання вмісту цієї кислоти залежало від концентрації

солі металу в середовищі. Внесення 10 мМ та 20 мМ ферум цитрату зумовлювало незначне зростання вмісту тридеканової кислоти, порівняно з контролем. Більш значне зростання вмісту 13:0 кислоти спостерігали за впливу 12–16 мМ ферум цитрату (рис. 1, А). За внесення таких концентрацій ферум цитрату вміст тридеканової кислоти зростав у 3–4 рази. Вміст пентадеканової та гептадеканової кислот у клітинах бактерій *D. acetoxidans* IMB B-7384 за впливу всіх досліджених концентрацій ферум цитрату знижувався. Наприклад, за внесення солі металу в концентраціях 10–20 мМ вміст пентадеканової кислоти знижувався на 13–33 %, а вміст гептадеканової – на 13–40 %.

Показано, що за впливу іонів кадмію, купруму, нікелю та цинку на клітини бактерій *Enterobacter intermedius* і *Klebsiella pneumoniae* вміст насичених жирних кислот із непарною кількістю атомів карбону знижувався, порівняно з контрольним зразком, а вміст насичених жирних кислот із парною кількістю атомів карбону в клітинах досліджуваних бактерій – зростав [17]. Подібні зміни у жирнокислотному складі ліпідів спостерігали й у психрофільних мікроорганізмів за впливу високих температур [14]. Припускають, що за умов стресу змінюється специфічність синтази жирних кислот до молекул-попередників синтезу (ацетил-КоА чи пропіоніл-КоА для жирних кислот із парною та непарною кількістю атомів карбону, відповідно) [16, 17]. Можливо, зміна вмісту жирних кислот із парною та непарною кількістю атомів карбону у клітинах бактерій *D. acetoxidans* IMB B-7384 за впливу ферум цитрату відбувається за подібним механізмом.

Внесення ферум цитрату зумовлювало зміни вмісту жирних кислот із циклопропановим кільцем. З цієї групи жирних кислот у клітинах *D. acetoxidans* IMB B-7384 виявлено *цис*-9,10-метиленгексадеканову (су17:0) та *цис*-9,10-метиленоктадеканову (су19:0) кислоти (рис. 2). Їхній вміст у клітинах бактерій, вирощених у середовищі без внесення ферум цитрату, становив, відповідно, 12 і 0,42 % усіх клітинних жирних кислот. Зміни вмісту *цис*-9,10-метиленгексадеканової кислоти у клітинах *D. acetoxidans* IMB B-7384 залежали від концентрації солі металу і середовища. За внесення ферум цитрату в концентраціях 10 і 12 мМ спостерігали незначне зростання (6–13 %) вмісту су17:0 кислоти, порівняно з контролем. За внесення 14 мМ солі металу вміст *цис*-9,10-метиленгексадеканової кислоти значно не відрізнявся від контролю, а за внесення 16 мМ ферум цитрату спостерігали зниження вмісту цієї кислоти на 9 %, порівняно з контролем. Збільшення вмісту су17:0 кислоти у клітинах *D. acetoxidans* IMB B-7384 на 35 % зафіксовано за внесення 20 мМ ферум цитрату в культуральне середовище (рис. 2).

Значне зростання вмісту, порівняно з контролем, спостерігали для су19:0 кислоти у клітинах бактерій за впливу різних концентрацій ферум цитрату. За внесення 10 мМ солі металу вміст цієї кислоти зростав у п'ять разів, порівняно з контролем. Варто відзначити, що за внесення 10; 12; 14 та 16 мМ ферум цитрату вміст су19:0 залишався на рівні 2 % від усіх клітинних жирних кислот. Значне зростання вмісту *цис*-9,10-метиленгексадеканової кислоти у 14 разів зумовлювало внесення 20 мМ ферум цитрату (рис. 2). Відомо, що жирні кислоти з циклопропановим кільцем збільшують стабільність цитоплазматичних мембран і знижують проникність протонів. Зростання вмісту су17:0 та су19:0 може бути зумовлене перетворенням мононенасичених жирних кислот у жирні кислоти з циклопропановим кільцем. Таке перетворення захищає клітину від пошкодження жирних кислот у ділянці подвійного зв'язку [10, 17].

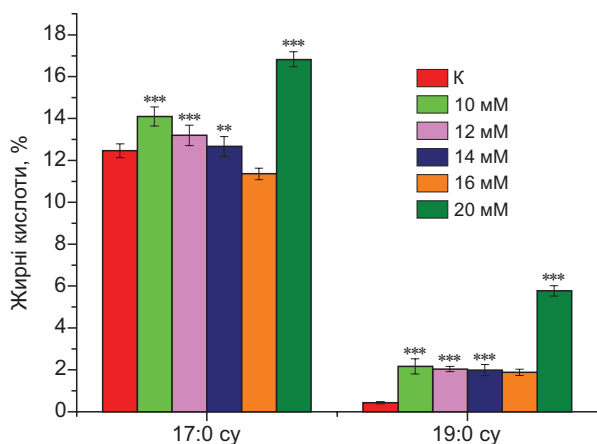


Рис. 2. Вміст жирних кислот із циклопропановим кільцем у клітинах *D. acetoxidans* IMV B-7384 за впливу ферум цитрату (** – $p \geq 0,99$, $n = 3$; *** – $p \geq 0,999$, $n = 3$)

Fig. 2. The content of cyclopropane fatty acids in *D. acetoxidans* IMV B-7384 cells under the influence of ferric citrate (** – $p \geq 0,99$, $n = 3$; *** – $p \geq 0,999$, $n = 3$)

З групи гідроксикислот у клітинах бактерій *D. acetoxidans* IMV B-7384 виявлено 2-гідрокситетрадеканову кислоту (14:0 2OH). Вміст цієї кислоти в клітинах *D. acetoxidans* IMV B-7384, вирощених без внесення ферум цитрату у ростове середовище, становив 0,066 % від усіх клітинних жирних кислот. За внесення солі металу у середовище для росту бактерій 14:0 2OH кислоту не виявлено за впливу жодної з досліджуваних концентрацій.

З групи ненасичених жирних кислот у клітинах *D. acetoxidans* IMV B-7384 ідентифіковано *цис*-9-гексадеканову (16:1 ω 9с), *цис,цис*-9,12-октадеканову (*cis, cis* 18:2 ω 9с, ω 12с), *цис*-9-октадеканову (*cis* 18:1 ω 9с) та *транс*-9-октадеканову (*trans* 18:1 ω 9с) кислоти (рис. 3). За внесення 10–16 мМ ферум цитрату вміст 16:1 ω 9с знижувався на 33–39 %, порівняно з контрольним зразком. За збільшення концентрації солі металу до 20 мМ вміст *цис*-9-гексадеканової кислоти зменшився на 61 %. Щодо *цис,цис*-9,12-октадеканової кислоти, то за внесення у ростове середовище 10 мМ ферум цитрату її вміст у клітинах бактерій зменшився на 13 %, порівняно з контролем. За впливу 12–20 мМ ферум цитрату *цис,цис*-9,12-октадеканову кислоту не виявлено.

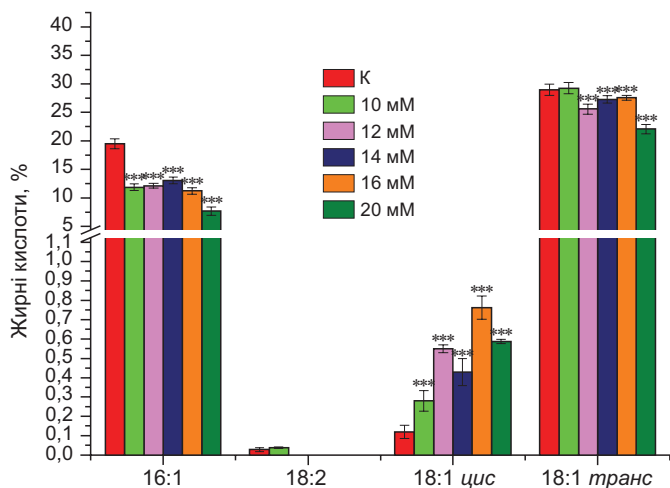


Рис. 3. Вміст ненасичених жирних кислот у клітинах *D. acetoxidans* IMV B-7384 за впливу ферум цитрату (** – $p \geq 0,99$, $n = 3$; *** – $p \geq 0,999$, $n = 3$)

Fig. 3. The content of unsaturated fatty acids in *D. acetoxidans* IMV B-7384 cells under the influence of ferric citrate (** – $p \geq 0,99$, $n = 3$; *** – $p \geq 0,999$, $n = 3$)

Перетворення *цис*-ізомерів у *транс*-ізомери ненасичених жирних кислот розглядають як альтернативний шлях регуляції плинності цитоплазматичної мембрани за впливу токсичних сполук [5]. Цей механізм забезпечує адаптацію бактерій до стресових умов. Досліджено *цис-транс* ізомеризацію ненасичених жирних кислот у бактерій *Pseudomonas putida* P8 за впливу токсичних концентрацій фенолу [5]. Показано зростання вмісту *транс*-ізомерів ненасичених жирних кислот з одночасним зниженням вмісту *цис*-ізомерів відповідних жирних кислот за впливу фенолу. Зростання ступеня *цис-транс* ізомеризації ненасичених жирних кислот у бактерій *P. putida* P8 корелювало зі зростанням акумуляції фенолу у клітинах. Подібні результати були отримані для інших бактерій роду *Pseudomonas* за впливу таких токсичних сполук як толуол, нітротолуол, 4-хлорофенол та інші [5, 6]. Однак не лише органічні розчинники здатні спричиняти зростання ступеня *цис-транс* ізомеризації ненасичених жирних кислот. З'ясовано зростання *цис/транс* індексу за впливу на клітину різних стресових чинників – осмотичний стрес, іони важких металів, тепловий шок і антибіотики, які руйнують мембрани [5, 8].

Внесення ферум цитрату в середовище для росту бактерій *D. acetoxidans* IMB B-7384 не спричиняло зростання рівня *цис-транс* ізомеризації ненасичених жирних кислот. За впливу усіх досліджених концентрацій ферум цитрату вміст *цис*-9-октадеканової кислоти у клітинах *D. acetoxidans* IMB B-7384 зростає. За внесення 10 мМ солі металу в середовище для росту бактерій вміст *cis* 18:1 ω 9с зростає у 2 рази, 14 мМ – у 4 та 16 мМ – у 6 разів, порівняно з контролем (рис. 3). Вміст *транс*-9-октадеканової кислоти за впливу 10–16 мМ ферум цитрату знижувався на 6–15 %, порівняно з контролем. Внесення 20 мМ ферум цитрату спричиняло зниження вмісту *trans*18:1 ω 9с кислоти на 24%. Процес *цис-транс* ізомеризації ненасичених жирних кислот контролює фермент *цис-транс* ізомераза [6]. Нами досліджено вплив ферум цитрату на процеси перекисного окиснення ліпідів у клітинах *D. acetoxidans* IMB B-7384. З'ясовано, що пошкодження клітинних ліпідів відбувається за вільнорадикальним механізмом [18]. Можливо, вільні радикали кисню, які утворюються за впливу ферум цитрату, пошкоджують *цис-транс* ізомеразу, внаслідок чого у клітинах нагромаджуються значні кількості *цис*-9-октадеканової кислоти.

Іншим механізмом регуляції плинності цитоплазматичної мембрани у клітинах бактерій є синтез жирних кислот із розгалуженим карбоновим ланцюгом. У регуляції плинності цитоплазматичної мембрани беруть участь 12- і 13-метил-тетрадеканові кислоти (ізо-15:0 і антеізо-15:0 відповідно). За внесення ферум цитрату в культуральне середовище вміст ізо-15:0 кислоти змінювався залежно від концентрації солі металу в середовищі. Наприклад, за впливу 10 і 20 мМ ферум цитрату вміст ізо-15:0 кислоти був дещо нижчий, порівняно з контрольним зразком. Внесення 12; 14 і 16 мМ спричиняло зростання вмісту ізо-15:0 кислоти зі зростанням концентрації солі металу в середовищі. За впливу цих концентрацій ферум цитрату вміст ізо-15:0 зростає відповідно на 66; 92 та 130 %. Вміст антеізо-15:0 кислоти у клітинах бактерій за впливу 10; 12; 14 і 20 мМ ферум цитрату був дещо нижчим або практично не відрізнявся від контрольного зразка (рис. 4). Зростання вмісту цієї кислоти зафіксовано лише за внесення 16 мМ ферум цитрату.

Крім ізо-15:0 й антеізо-15:0 жирних кислот у клітинах *D. acetoxidans* IMB B-7384 за впливу ферум цитрату ідентифіковано ще і 15-метил-гексадеканову кислоту (ізо-17:0). Варто відзначити, що вміст цієї кислоти у клітинах бактерій, вирощених у середовищі без внесення ферум цитрату невисокий, – 0,001 % клітинних жирних кислот. За впливу всіх досліджених концентрацій ферум цитрату вміст ізо-17:0 кислоти

значно зростає. Можливо, у клітинах бактерій *D. acetoxidans* IMB B-7384 за впливу ферум цитрату регуляція плинності цитоплазматичної мембрани відбувається синтезом жирних кислот з розгалуженим карбоновим ланцюгом, зокрема 15-метил-гексадеканової кислоти.

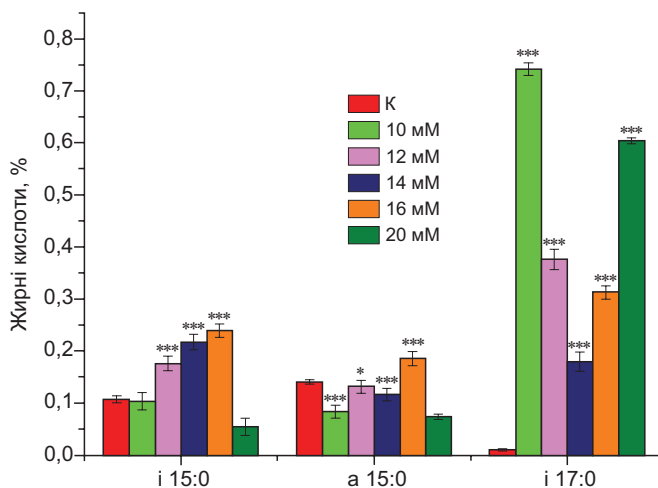


Рис. 4. Вміст жирних кислот з розгалуженим карбоновим ланцюгом у клітинах *D. acetoxidans* IMB B-7384 за впливу ферум цитрату (i 15:0 – ізо-12-метил-тетрадеканова кислота; a 15:0 – антеізо-13-метил-тетрадеканова кислота, i 17:0 – ізо-15-метил-гексадеканова кислота) (* – $p \geq 0,95$, $n = 3$; ** – $p \geq 0,99$, $n = 3$; *** – $p \geq 0,999$, $n = 3$)

Fig. 4. The content of branched fatty acids in *D. acetoxidans* IMV B-7384 cells under the influence of ferric citrate (i 15:0 – iso-12-methyl-tetradecanoic acid; a 15:0 – anteiso-13-methyl-tetradecanoic acid, i 17:0 – iso-15-methyl-hexadecanoic acid) (* – $p \geq 0.95$, $n = 3$; ** – $p \geq 0.99$, $n = 3$; *** – $p \geq 0.999$, $n = 3$)

Індекс ненасиченості жирних кислот у клітинах *D. acetoxidans* IMB B-7384 за впливу всіх досліджених концентрацій ферум цитрату знижується, порівняно з контрольним зразком. У клітинах бактерій *D. acetoxidans* IMB B-7384, вирощених у середовищі без внесення ферум цитрату, індекс ненасиченості жирних кислот становив 0,486.

За внесення ферум цитрату в концентраціях 10, 12, 14 та 16 мМ цей показник був відповідно 0,370; 0,384; 0,408 та 0,395. Найнижчим (0,303) цей показник був у клітинах бактерій, вирощених за впливу 20 мМ ферум цитрату. За впливу всіх досліджуваних концентрацій ферум цитрату вміст ненасичених жирних кислот знижувався (рис. 5). За цих умов вміст усіх насичених жирних кислот зростає. Також значно збільшується вміст жирних кислот із розгалуженим ланцюгом і жирних кислот, які містять циклопропанове кільце.

Відомо, що жирні кислоти з розгалуженим ланцюгом у клітинах бактерій синтезуються з коротколанцюгових молекул-попередників (амінокислот із розгалуженим ланцюгом – валіну, лейцину та ізолейцину, або карбоксикислот – ізовалеріанової, ізомасляної та ін.) та малоніл-КоА [8]. Утворення жирних кислот, які містять циклопропанове кільце, розглядають як постсинтетичну модифікацію, оскільки приєднання метильної групи до подвійного зв'язку ненасиченої жирної кислоти відбувається тоді, коли ця жирна кислота є у складі фосфоліпиду [15]. Припускаємо, що регуляція насиченості жирних кислот у *D. acetoxidans* IMB B-7384 за впливу ферум

цитрату відбувається як на біосинтетичному рівні (для жирних кислот із розгалуженим ланцюгом), так і на постсинтетичному (для жирних кислот, які містять циклопропанове кільце). Зниження рівня ненасиченості жирних кислот забезпечує зростання стійкості жирних кислот до впливу вільних радикалів кисню.

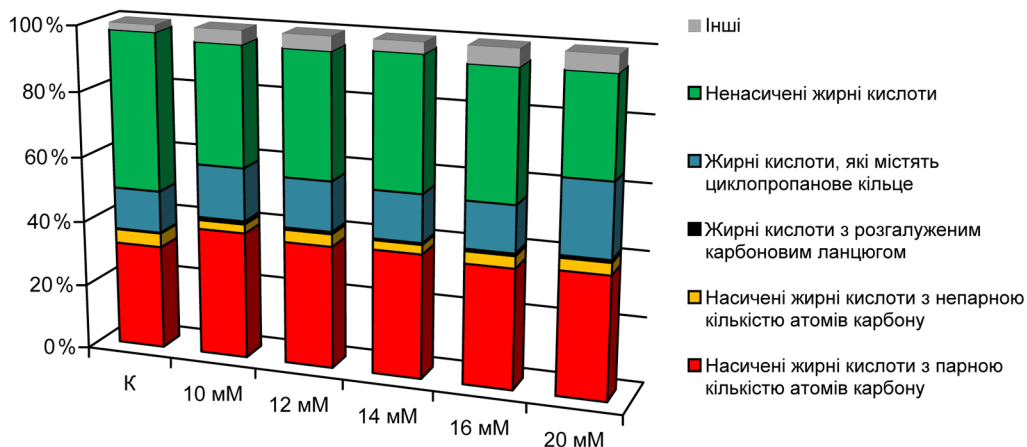


Рис. 5. Вміст різних класів жирних кислот клітин *D. acetoxidans* IMB B-7384 за впливу ферум цитрату

Fig. 5. The content of different classes of fatty acids of *D. acetoxidans* IMV B-7384 cells under the influence of ferric citrate

ВИСНОВКИ

Зміни жирнокислотного складу ліпідів розглядають як один із можливих способів захисту бактерійної клітини за умови стресу [4, 6, 9]. За впливу різних концентрацій ферум цитрату жирнокислотний склад клітин *D. acetoxidans* IMB B-7384 зазнає значних змін. За впливу всіх досліджених концентрацій ферум цитрату вміст насичених жирних кислот з непарною кількістю атомів карбону у клітинах бактерій *D. acetoxidans* IMB B-7384 знижувався з одночасним зростанням вмісту жирних кислот із парною кількістю атомів карбону. Внесення ферум цитрату в середовище для росту бактерій *D. acetoxidans* IMB B-7384 не спричиняло зростання рівня *цис-транс* ізомеризації ненасичених жирних кислот. Очевидно, регуляція плинності цитоплазматичної мембрани здійснюється зростанням вмісту жирних кислот із розгалуженим карбоновим ланцюгом та кислот із циклопропановим кільцем. Зростання вмісту жирних кислот із циклопропановим кільцем і розгалуженим карбоновим ланцюгом значно знижує індекс ненасиченості жирних кислот, у результаті чого зростає стійкість жирних кислот до впливу активних метаболітів кисню.

Припускаємо, що зростання вмісту насичених жирних кислот може бути зумовлене внесенням цитрату в середовище для вирощування бактерій у вигляді ферум цитрату. Відомо, що цитрат у клітинах синтезується з ацетил-КоА і оксалоацетату, тому надходження екзогенного цитрату в клітини може чинити інгібуючий вплив на цитратсинтазу, в результаті чого залишається вільний пул ацетил-КоА, який може слугувати субстратом для біосинтезу насичених жирних кислот [20]. Щоб проаналізувати окремо вплив іонів феруму, в подальших дослідках необхідно розглянути вплив цитрату натрію на композицію жирних кислот у клітинах *D. acetoxidans* IMB

В-7384. Також для більш поглибленого розуміння способів захисту клітин *D. acetoxidans* IMB В-7384 за впливу феруму цитрату в подальших роботах необхідно дослідити активність ферментів синтезу жирних кислот, зокрема синтази жирних кислот із парною та непарною кількістю атомів карбону, *цис–транс* ізомерази, синтази жирних кислот з циклопропановим кільцем і синтетази жирних кислот із розгалуженим карбоновим ланцюгом.

Бактерії *D. acetoxidans* IMB В-7384 є перспективними для очищення стічних вод від іонів металів зі змінною валентністю. Тому дослідження механізмів захисту бактерій *D. acetoxidans* IMB В-7384 від стресових умов, зокрема, від зростаючих концентрацій іонів важких металів, є важливим для розуміння механізмів регулювання метаболізму бактерій у процесі очищення стічних вод.

1. Bligh E., Dyer W. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, 1959; 37: 911–917.
2. Golovchak N., Tarnovs'ka A., Kocjumbas G., Sanagurs'kij D. **Lipid peroxidation in living organisms** Lviv: Ivan Franko National University of Lviv, 2012. 250 p. (In Ukrainian).
3. Gudz S., Hnatush S., Moroz O. et al. **Certificate of deposit strain of bacteria *Desulfuromonas acetoxidans* Ya-2006 in the Depository of Institute of Microbiology and Virology**. Zabolotny NAS of Ukraine on granting registration number IMV В-7384 of 10 April 2013.
4. Guerzoni M., Lanciotti R., Cocconcelli P. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. **Microbiology**, 2001; 147: 2255–2264.
5. Heipieper H., Diefenbach R., Kewelon H. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. **Applied and Environmental Microbiology**, 1992; 58 (6): 1847–1852.
6. Heipieper H., Meinhardt F., Segura A. The *cis–trans* isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. **FEMS Microbiology Letters**, 2003; 229: 1–7.
7. Heipieper H., Meulenbeld G., Oirschoot Q. et al. Effect of environmental factors on the *trans/cis* ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. **Applied and Environmental Microbiology**, 1996; 62 (8): 2773–2777.
8. Kaneda T. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. **Microbiological Reviews**, 1991; 55 (2): 288–302.
9. Lakin G. **Biometrics**. Moskva: Vysshaja shkola, 1990. 352 p. (In Russian).
10. Law J. Biosynthesis of cyclopropane rings. **Accounts of Chemical Research**, 1971; 4(6): 199–203.
11. Lovely D., Giovannoni S., White D. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. **Archives of Microbiology**, 1993; 159: 336–344.
12. Lovely D., Holmes D., Nevin K. Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction. **Advances in Microbial Physiology**, 2011; 59: 1–100.
13. Lovley D., Ueki T., Zhang T. *Geobacter*: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications. **Advances in Microbial Physiology**, 2004; 49: 219–286.
14. Lushchak V., Bagnyukova T., Lushchak O. Indices of oxidative stress. 1. TBA-reactive substrates and carbonylproteins. **Ukrainian Biochemical Journal**, 2004; 76 (3): 136–141. (In Ukrainian).
15. Magnuson K., Jackowski S., Rock C. et al. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, 1993; 57 (3): 522–542.
16. Mannisto M., Puhakka J. Temperature- and growth-phase-regulated changes in lipid fatty acid structures of psychrotolerant groundwater *Proteobacteria*. **Archives of Microbiology**, 2001; 177: 41–46.

17. Markowicz A., Plociniczak T., Piotrowska-Seget Z. Response of bacteria to heavy metals measured as changes in FAME profiles. **Polish Journal of Environmental Studies**, 2010; 19 (5): 957–965.
18. Maslovska O., Hnatush S. The intensity of lipid peroxidation and parameters of antioxidative defence system of *Desulfuromonas acetoxidans* IMV B-7384 under the influence of ferric (III) citrate. **Visnyk of the Lviv University. Series Biology**, 2014; 64: 270–278. (In Ukrainian).
19. Postgate J. **The sulfate-reducing bacteria**. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. 208 p.
20. Tang X., Feng H., Chen W. Metabolic engineering for enhanced fatty acids synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, 2013; 16: 95–102.
21. Vasylyv O., Bilyy O., Ferensovich Ja., Hnatush S. Electric current generation by sulfur-reducing bacteria in microbial-anode fuel cell. **Proceedings of the SPIE**, 2012; 8472: 84720Z-1–7.
22. Vasylyv O. The influence of 3d-type transition metals on physiological and biochemical properties of *Desulfuromonas acetoxidans* bacteria. **Dissertation Abstract of the Candidate of Biological Sciences**. Kyiv, 2013: 20 p. (In Ukrainian).
23. Zhang E., Xu W., Diao G. et al. Electricity generation from acetate and glucose by sedimentary bacterium attached to electrode in microbial-anode fuel cells. **Journal of Power Sources**, 2006; 161: 820–825.

FATTY ACIDS COMPOSITION OF *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* IMV B-7384 CELLS UNDER THE INFLUENCE OF FERRIC CITRATE

O. Maslovska, S. Hnatush, A. Halushka

*Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: Sosnovscka.olga@yandex.ua*

Desulfuromonas acetoxidans IMV B-7384 bacteria are perspective in the development of biotechnologies for remediation of wastewater from transitional metal ions. Investigation of defense mechanisms of *D. acetoxidans* IMV B-7384 cells from stress conditions, in particular from increasing concentrations of heavy metals is important for understanding pathways of regulation mechanisms of bacterial metabolism in the process of remediation of wastewater by bacteria. Changes in fatty acid composition of lipids are considered as one of possible ways of protection of bacterial cells under stress conditions. Addition of ferric citrate to the growth medium of *D. acetoxidans* IMV B-7384 bacteria caused changes in fatty acids composition compared to the control. Under the addition of ferric citrate in different concentrations the decrease of content of saturated fatty acids with odd carbon number was observed. The increase of content of saturated fatty acids with even carbon number, fatty acids with cyclopropane ring and branched fatty acids was observed under the influence of different concentrations of metal salt. Index of unsaturation fatty acids decreased under these conditions. The rate of *cis-trans* conversation of unsaturated fatty acids of *D. acetoxidans* IMV B-7384 cells did not increase under the influence of the ferric citrate.

Keywords: *Desulfuromonas acetoxidans* IMV B-7384, ferric citrate, fatty acids.

ИЗМЕНЕНИЯ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА КЛЕТОК *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* ИМВ В-7384 ПРИ ВЛИЯНИИ ФЕРРУМ ЦИТРАТА

О. Д. Масловская, С. А. Гнатуш, А. А. Галушка

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: Sosnovscka.olga@yandex.ua*

Бактерии *Desulfuromonas acetoxidans* ИМВ В-7384 перспективные для разработки биотехнологий очистки сточных вод от ионов металлов с переменной валентностью. Исследование механизмов защиты клеток *D. acetoxidans* ИМВ В-7384 в стрессовых условиях, в частности, от растущих концентраций ионов тяжелых металлов необходимо для понимания путей регуляции метаболизма бактерий в процессе очистки сточных вод. Изменения жирнокислотного состава липидов рассматривают как один из возможных способов защиты бактериальной клетки в условиях стресса. Внесение феррум цитрата в среду для роста бактерий *D. acetoxidans* ИМВ В-7384 приводило к изменениям жирнокислотного состава, по сравнению с контролем. При внесении различных концентраций феррум цитрата наблюдали снижение содержания насыщенных жирных кислот с нечетным количеством атомов карбона. При воздействии соли металла в клетках бактерий зафиксирован рост содержания насыщенных жирных кислот с четным количеством атомов карбона, жирных кислот с циклопропановым кольцом и с разветвленной карбоновой цепью. В этих условиях снижается индекс ненасыщенности жирных кислот. Степень *цис-транс* изомеризации ненасыщенных жирных кислот клеток *D. acetoxidans* ИМВ В-7384 под влиянием феррум цитрата не возрастает.

Ключевые слова: *Desulfuromonas acetoxidans*, феррум цитрат, жирные кислоты.

Одержано: 25.07.2014