

Г. М. Дмитренко

Закономірності безкисневого дихання аеробних бактерій

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Ю. Євтушенком)

The ability to perform anaerobic respirations of a collection of strains of the obligate aerobic bacteria of different genera is studied. It is established that the sequence of usages of the elements with variable oxidation degree as the terminal acceptors of electrons by the microorganisms complies with the following electrochemical pattern regularity: the bacteria start to reduce the substance, which has the highest standard electrode potential of reduction.

Поділ бактерій на фізіологічні групи за їх здатністю використовувати кисень як термінальний акцептор електронів — анаероби та аероби — один з найбільш важливих принципів ідентифікації мікроорганізмів [1].



Згідно з нині існуючою гіпотезою, у ході еволюції бактерії з окислювальним метаболізмом виникли в різні періоди: анаероби (сульфат- та карбонатредуктори) — до появи фотосинтезу, аероби — після його виникнення (рис. 1) [2]. Здатність же аеробів до анаеробного дихання вважається вторинною ознакою цих бактерій [1]. За цією гіпотезою, аеробні бактерії більше ніж на 1 млрд років “молодші” за первинні анаероби. Так сталося тому, що, на переконання мікробіологів, існують бактерії, які можуть дихати тільки киснем, так

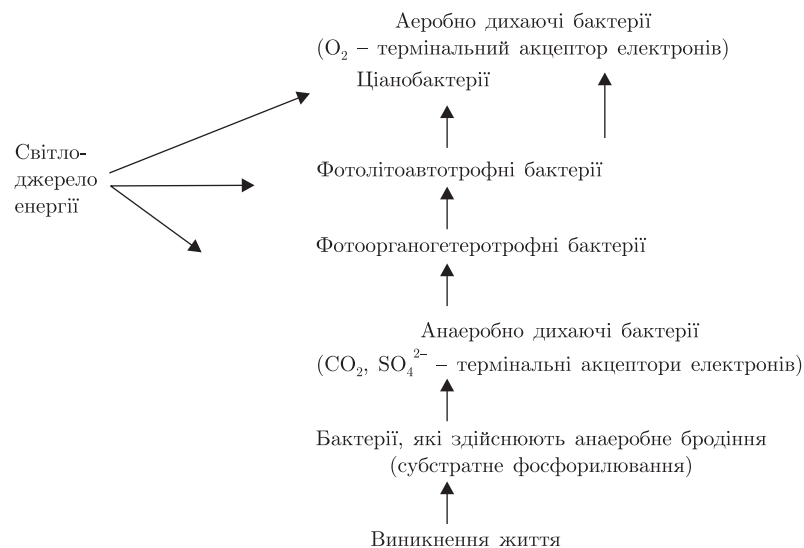
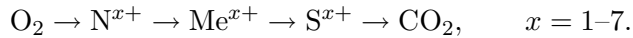


Рис. 1. Гіпотетичні етапи еволюції метаболізму у прокаріот (за Шлегелем [2])

звані облігатні, або строгі, аероби, які могли з'явитись тільки в кисневмісній атмосфері, що утворилась у результаті фотосинтезу.

Використання мікроорганізмами термінальних акцепторів електронів підпорядковано такій загальноприйнятій біологічній редокс-послідовності [3]:



Ця послідовність означає, що якщо природна популяція мікроорганізмів має можливість вибору термінального акцептора електронів, то спочатку популяція буде використовувати кисень, потім нітрат та інші окислені сполуки азоту, далі оксиди металів, сірки і, наостанку, карбонат.

За даною біологічною редокс-послідовністю межа поділу аеробних бактерій на облігатних та анаеробно дихаючих лежить між киснем та окисленими сполуками азоту. Штами, які не використовують нітрат як термінальний акцептор електронів, не можуть залучати з цієї метою окислені сполуки інших хімічних елементів, бо останні в такій редокс-послідовності знаходяться після сполук азоту. Саме здатність аеробних бактерій використовувати нітрат як окисник лежить в основі їх поділу на облігатних і анаеробно дихаючих, і ця ознака внесена у "Визначник бактерій Берджі" [4]. У цьому всевітньо визнаному довідникові з мікробіології описано багато родів грампозитивних та грамнегативних бактерій, які визначено як облігатні аероби. До них віднесено шість родів Γ^+ коків, зокрема *Micrococcus*. Облігатними є також Γ^+ бактерії родів *Caryophanon*, *Kurthia*, *Brevibacterium*. Серед Γ^- аеробних мікроорганізмів облігатними названо представників родів *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* і т. д. Всередині інших аеробних родів з окислювальним метаболізмом поділ на облігатні та анаеробно дихаючі види здійснюється саме за ознакою використання нітрату як термінального акцептора електронів — з повною денітрифікацією, чи редукцією, нітрату в нітрит.

Передача електронів по ланцюгу переносу в бактеріальній клітині відбувається від сполуки з найбільш низьким окисно-відновним потенціалом (NADH_2) по градієнту редокс-потенціалу на термінальний акцептор за участю ряду переносників (флавопротеїни, цитохроми і т. п.). У цьому ланцюгу кожний наступний переносник електронів має більш високий потенціал окислення-відновлення, ніж попередній. Цей процес здійснюється в електрон-транспортній системі, яка міститься в мембрані клітини. Саме тут відбувається електрохімічне перетворення енергії руху електронів у внутрішню енергію мембрани шляхом синтезу АТФ.

Аналіз величин стандартних електродних потенціалів (E^0) різних окисно-відновних систем [5] дозволив нам скласти електрохімічну редокс-послідовність реакцій, що їх здійснюють мікроорганізми (табл. 1). Наведені в таблиці значення електродних потенціалів окисно-відновних систем визначені в стандартних умовах. Абсолютні величини потенціалів цих окисно-відновних реакцій змінюються при зміні умов (рН, температура), але їх відносний порядок не порушується [6].

Як видно з табл. 1, електрохімічна редокс-послідовність відрізняється від загальноприйнятої біологічної тим, що в ній реакції відновлення деяких окислених сполук металів (Mn(IV) , Cr(VI) та ін.) знаходяться не тільки перед реакціями відновлення окислених форм азоту, але й самого кисню. Якщо допустити, що біологічна редокс-послідовність аналогічна електрохімічній, то так звані облігатні аероби при диханні повинні були б використовувати Mn(IV) та Cr(VI) як термінальні акцептори електронів, тобто дихати анаеробно (без кисню), бо значення E^0 цих реакцій таке ж саме, як і E^0 реакції відновлення O_2 , або вище за нього.

При аеробному диханні мікроорганізми здійснюють саме реакцію 4 (5). У своєму метаболізмі аеробні бактерії використовують ще одну реакцію відновлення кисню (див. табл. 1,

реакція 12). Але мікроорганізми здійснюють її не в процесі дихання при перенесенні електронів на термінальний акцептор — O_2 , а в підготовчому метаболізмі для введення реакційного атома кисню, що утворюється при розкладі пероксиду водню, у молекулу деяких органічних сполук, наприклад насичених вуглеводнів.

Нами проведено дослідження здатності облігатно аеробних бактерій до анаеробного дихання. На прикладі діоксиду марганцю, значення E^0 відновлення якого, як і E^0 редукції кисню, дорівнює 1228 мВ (див. табл. 1, реакції 4 і 5), нами показано, що неадаптовані до MnO_2 колекційні штами “строгих аеробів”, представники родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, при диханні ефективно використовують $Mn(IV)$ як термінальний акцептор електронів [7]. Таким чином, у дійсності термін “облігатні (строгі) аероби” безпідставний, бо ці бактерії можуть дихати й за відсутності кисню — анаеробно, передаючи електрони на $Mn(IV)$. Більше того, відновлення $Mn(IV)$ неадаптовані до MnO_2 колекційні штами проводять практично без лаг-фази, тобто процес є неспецифічним [8].

Нашими дослідженнями також показано, що неадаптовані колекційні штами бактерій, які ідентифікуються як облігатні аероби, відновлюють шестивалентний хром біхромат- і хромат-іонів у реакціях, значення E^0 яких вищі за такі редукції кисню та дорівнюють відповідно 1333 і 1477 мВ (див. табл. 1, реакції 2 і 3) [9]. Використання цих окисників як термінальних акцепторів електронів підтверджується приростом біомаси мікроорганізмів та припиненням процесу їх відновлення при внесенні в культуральне середовище дихальної отрути — азиду натрію (NaN_3).

Здатність мікроорганізмів здійснювати реакції, значення E^0 яких знаходиться за верхньою теоретичною межею термодинамічної стійкості води, пояснюється тим, що реальні межі стійкості води приблизно на 400 мВ ширші в кожний бік, ніж теоретичні (рис. 2) [10]. Тому бактерії здатні використовувати як термінальні акцептори електронів елементи зі змінним ступенем окислення, значення E^0 реакцій відновлення яких вищі за величину верхньої теоретичної межі (1228 мВ) стійкості води (див. табл. 1 — $Cr(VI)$, $Au(III)$).

У зв'язку з відмінностями в розташуванні деяких окислених форм металів по відношенню до окислених сполук азоту в загальноприйнятій біологічній та одержаній нами елект-

Таблиця 1. Електрохімічна редокс-послідовність реакцій, що здійснюють мікроорганізми

№ п/п	Реакція	E^0 , мВ
1	$Au^{3+} + 3e^- \rightarrow Au$	1498
2	$CrO_4^{2-} + 8H^+ + 3e^- \rightarrow Cr^{3+} + 4H_2O$	1477
3	$Cr_2O_7^{2-} + 14H^+ + 6e^- \rightarrow 2Cr^{3+} + 7H_2O$	1333
4 (5)	$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$	1228
5 (4)	$MnO_2 + 4H^+ + 2e^- \rightarrow Mn^{2+} + 2H_2O$	1228
6	$SeO_4^{2-} + 4H^+ + 2e^- \rightarrow H_2SeO_3 + H_2O$	1150
7	$ClO^- + H_2O + 2e^- \rightarrow Cl^- + 2OH^-$	880
8	$2NO_2 + 2e^- \rightarrow 2NO_2^-$	880
9	$NO_3^- + 2H^+ + e^- \rightarrow NO_2 + H_2O$	780
10	$Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+}$	771
11	$TcO_4^- + 2H^+ + e^- \rightarrow TcO_3 + H_2O$	700
12	$O_2 + 2H^+ + 2e^- = H_2O_2$	682
13	$ClO_3^- + 3H_2O + 2e^- \rightarrow Cl^- + 6OH^-$	630
14	$UO_2^{2+} + 2e^- \rightarrow UO_2$	450
15	$2NO_2^- + 4H_2O + 6e^- \rightarrow N_2 + 8OH^-$	410
16	$SO_4^{2-} + 10H^+ + 8e^- \rightarrow H_2S + 4H_2O$	311
17	$CO_3^{2-} + 3H^+ + 2e^- \rightarrow HCOO^- + H_2O$	227

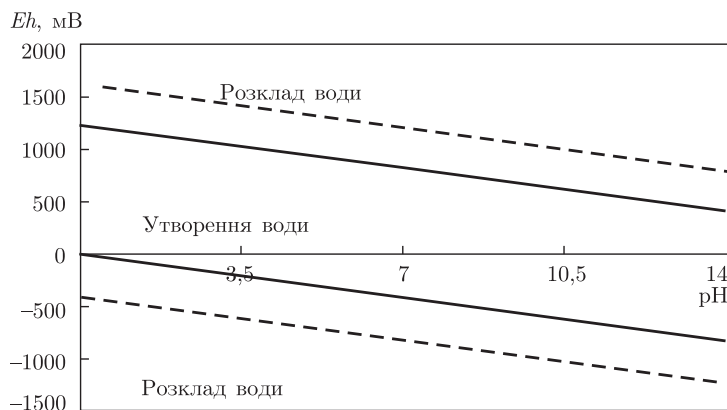


Рис. 2. Межі термодинамічної стійкості водних систем (за Шульц та ін. [10]). Суцільні лінії відповідають теоретичним межам стійкості води, штрихові — реальним межам стійкості води

рохімічній редокс-послідовностях становило інтерес вивчити послідовність використання елементів зі змінним ступенем окислення — Cr(VI) і NO_3^- чи Mn(IV) як термінальних акцепторів електронів при їх сумісній присутності в культуральному середовищі колекційними штамами денітрифікуючих бактерій роду *Pseudomonas* [11]. Отримані результати вказують на те, що біологічна редокс-послідовність аналогічна електрохімічній: при одночасній присутності в середовищі кількох елементів зі змінним ступенем окислення в першу чергу бактерії здійснюють ті реакції, стандартний електродний потенціал яких вищий. Незважаючи на те що денітрифікація для досліджених штамів є ідентифікаційною ознакою, при одночасній присутності в середовищі Cr(VI) і NO_3^- хроматредукція переважає дисимілярному відновленню нітрату. При використанні як термінальних акцепторів електронів Cr(VI) і Mn(IV) досліджені штами в першу чергу здійснюють реакцію з більш високим E^0 , тобто хроматредукцію, лише потім — відновлення Mn(IV).

Відомо, що бактеріальна денітрифікація здійснюється у дві стадії: спочатку нітрат редукується в нітрит, далі NO_2^- перетворюється в N_2 . Аналіз стандартних електродних потенціалів відновлення окислених сполук азоту (табл. 2) дозволив нам зробити припущення, що перша стадія мікробної денітрифікації ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$) проходить у дві реакції: у першій утворюється діоксид азоту ($E^0 = 780$ мВ), у другій — нітрит-іон ($E^0 = 880$ мВ). Вірогідно, що бактерії каталізують лише першу реакцію, бо чотиривалентний азот у діоксиді азоту (NO_2) хімічно нестійка сполука, яка легко розпадається на п'ятивалентний азот (нітрат) і тривалентний (нітрит).

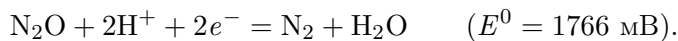
Таблиця 2. Стандартні електродні потенціали деяких реакцій відновлення сполук азоту

№ п/п	Електрохімічна реакція	E^0 , мВ
1	$2\text{NO}_3^- + 12\text{H}^+ + 10e^- \rightarrow \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$	1246
2	$2\text{NO}_3^- + 10\text{H}^+ + 8e^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} + 5\text{H}_2\text{O}$	1116
3	$\text{NO}_3^- + \text{H}^+ + 3e^- \rightarrow \text{NO} + 2\text{H}_2\text{O}$	957
4	$\text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} + 2e^- \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{OH}^-$	940
5	$2\text{NO}_2 + 2e^- \rightarrow 2\text{NO}_2^-$	880
6	$\text{NO}_3^- + 10\text{H}^+ + 8e^- \rightarrow \text{NH}_4^+ + 3\text{H}_2\text{O}$	870
7	$\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + e^- \rightarrow \text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	780
8	$2\text{NO}_3^- + 4\text{H}_2\text{O} + 6e^- \rightarrow \text{N}_2 + 8\text{OH}^-$	410

Нашими дослідженнями доведено, що при одночасній присутності в розчині нітрату та нітриту денітрифікуючі бактерії спочатку відновлюють нітрат. При цьому в середовищі зростає кількість нітриту. Після значного зниження концентрації нітрату денітрифікуючі псевдомонади починають одночасно з нітратом використовувати і нітрит як окисник.

У табл. 2 привертає до себе увагу реакція 1. Здавалося б, якщо денітрифікуючі бактерії здійснюють реакцію з більш високим стандартним електродним потенціалом — Cr(VI) у Cr(III), то чому вони не здатні відновлювати нітрат в елементний азот за цією реакцією в одну стадію? Вірогідно, це пов'язано з тим, що для її здійснення клітині необхідно накопичити велику кількість протонів та електронів. Можливо також, що у межах стандартних електродних потенціалів реакцій, що здійснюють мікроорганізми, існують діапазони оптимальних для бактерій значень E^0 .

Цікавою є також реакція 4, наведена в табл. 2. Крім неї існує ще одна можливість електрохімічного відновлення N_2O [5]:



Проте біохімічне здійснення її неможливе через величину E^0 — реакція відбувається за реальною межею термодинамічної стійкості води. Підтвердженням того, що бактерії відновлюють N_2O за наведеною в табл. 2 реакцією, є припинення останньої при навіть незначних концентраціях O_2 у середовищі культивування мікроорганізмів.

Залежність послідовності відновлення елементів зі змінним ступенем окислення від величини E^0 відповідних реакцій спостерігається також при культивуванні “облігатно аеробних” бактерій роду *Acinetobacter* у присутності Cr(VI) і Mn(IV) [8]. Така ж закономірність спостерігається і у представників родів *Micrococcus* та *Rhodococcus*.

Аналогічна мікробна редокс-послідовність описана в науковій літературі для інших елементів зі змінним ступенем окислення [12–14]. Відомо також, що сульфатвідновлюючі бактерії (див. табл. 1, реакція 16) є конкурентоспроможними по відношенню до карбонатредукуючих (див. табл. 1, реакція 17), і це пов'язано саме з величинами стандартних електродних потенціалів відповідних реакцій.

Здатність бактерій здійснювати реакцію відновлення CO_2 стала, вірогідно, у процесі еволюції перехідним етапом від субстратного фосфорилування до окислювального. Відомо, що підготовчий і основний метаболізм мікробних клітин супроводжується утворенням “зайвих” H_2 і CO_2 [2], тому карбонатредукція була для бактерій реальною можливістю регенерації коферментів ($NADH_2 \rightarrow NAD$ і т. п.). У тому випадку, коли джерелом живлення бактерій була сильно відновлена органічна сполука, кількість “зайвих” H_2 була більшою, ніж CO_2 , і бактеріальна клітина змушена була залучати до карбонатредукції екзогенний карбонат. Це стало поштовхом до виникнення окислювального фосфорилування — до використання позаклітинних неорганічних сполук як термінальних акцепторів електронів. Можливість залучення з цією метою елементів зі змінним ступенем окислення, значення E^0 реакцій відновлення яких було більш високим, привело до утворення всередині клітини ланцюга перенесення електронів.

Отримані нами та описані в науковій літературі результати вказують на те, що біологічна редокс-послідовність насправді не є такою, як вважалося раніше. Вона підпорядкована електрохімічним закономірностям [15].

Таким чином, враховуючи результати досліджень, можна стверджувати, що:

облігатно аеробних бактерій не існує. Не відновлюючі нітрату аеробні бактерії, які традиційно належать до строгих аеробів, здатні використовувати як термінальні акцептори

електронів ті елементи зі змінним ступенем окислення, величини E^0 реакцій відновлення яких вищі за E^0 відновлення кисню або близькі до них. Звичайно, O_2 — енергетично вигідний окисник, бо має високий стандартний електродний потенціал реакції відновлення і належить до тих небагатьох речовин, які легко проникають у клітину і так само легко виводиться зовні у вигляді H_2O . Використання ж мікроорганізмами Cr(VI) і Mn(IV) як термінальних акцепторів електронів пов'язано з необхідністю передачі електронів крізь цитоплазматичну мембрану з витрачанням на це, вірогідно, значної частини отриманої енергії, яку можна було б використати клітині в конструктивному метаболізмі;

відновлення мікроорганізмами елементів зі змінним ступенем окислення при їх одночасній присутності в середовищі подпорядковано електрохімічним закономірностям, згідно з якими в першу чергу як термінальний акцептор електронів бактерії використовують ту речовину, значення E^0 реакції відновлення якої вище. Бактерій з окислювальним метаболізмом можна, вірогідно, розподілити за діапазонами величин стандартних електродних потенціалів реакцій, у межах яких вони використовують елементи зі змінним ступенем окислення як термінальні акцептори електронів;

якщо відповідає дійсності те, що перші організми виникли в анаеробних умовах, то аеробні бактерії в процесі еволюції з'явилися як анаеробно дихаючі до виникнення фотосинтезу. Після появи в атмосферному повітрі молекулярного кисню вони набули здатності до аеробного дихання, тобто анаеробіоз у аеробних бактерій є, вірогідно, первинною, а не вторинною ознакою по відношенню до аеробіозу. Це підтверджується тим, що всі досліджені нами колекційні штами аеробних бактерій, в тому числі і облигатно аеробні, виявилися здатними до Cr(VI)- та Mn(IV)-редукції. З появою вільного кисню вже існуючі анаеробно дихаючі бактерії, що використовували Mn(IV) як термінальний акцептор електронів, потенційно були здатні залучати з цією метою O_2 , бо значення E^0 реакції відновлення кисню дорівнює значенню E^0 реакції відновлення Mn(IV) — 1228 мВ. У дійсності, для клітини “не існує” назви хімічного елемента, її “цікавить” величина стандартного електродного потенціалу відновлення цього елемента — чи зможе вона (клітина) передати на нього зайві електрони;

викликає деякий сумнів гіпотеза, що перші організми на Землі з'явилися в анаеробних умовах. Можна допустити, що в процесі хімічної еволюції сліди кисню в атмосфері були і перші мікроорганізми з окислювальним фосфорилуванням повністю використали його як економічно і екологічно найбільш вигідний термінальний акцептор електронів. Ці переваги кисню стали, вірогідно, поштовхом в еволюційному процесі до необхідності відтворення цього окисника, тобто до виникнення фотосинтезу, і визначило подальший аеробний шлях розвитку живих організмів.

1. Заварзин Г. А., Колотилова Н. Н. Введение в природоведческую микробиологию. — Москва: КД “Университет”, 2001. — 256 с.
2. Шлегель Н. Г. Общая микробиология. — Москва: Мир, 1987. — 566 с.
3. Zehnder A. J., Svensson B. H. Life without oxygen: What can and what cannot? // *Experientia*. — 1986. — **42**, No 11–12. — P. 1197–1205.
4. *Определитель* бактерий Берджи. В 2 т. / Пер. с англ. под ред. Г. А. Заварзина. — Москва: Мир, 1997. — 800 с.
5. Рабинович В. А., Хавин З. Я. Краткий химический справочник. — Ленинград: Химия, 1978. — С. 311–333.
6. Антропов Л. И. Теоретическая электрохимия. — Москва: Химия, 1975. — 568 с.
7. Дмитренко Г. Н., Шум О. А. Диссимиляционное восстановление Mn(IV) аэробными бактериями // *Химия и технология воды*. — 2002. — **24**, № 1. — С. 80–86.

8. Дмитренко Г. М. Cr(VI) та Mn(IV) – термінальні акцептори електронів для *Acinetobacter calcoaceticus* Ac-1 // Доп. НАН України. – 2003. – № 4. – С. 181–184.
9. Дмитренко Г. М., Коновалова В. В., Шум О. А. Восстановление Cr(VI) бактериями рода *Pseudomonas* // Микробиология. – 2003. – **72**, № 3. – С. 370–373.
10. Шульц М. М., Писаревский А. М., Полозова И. Р. Окислительный потенциал. – Ленинград: Химия, 1984. – 160 с.
11. Dmytrenko G. M., Ereshko T. V., Konovalova V. V. The successive reduction of Cr(VI) and NO₃⁻ or Mn(IV) ions present in the cultivation medium of denitrifying bacteria // Microbiology. – 2006. – **75**, No 2. – P. 125–128.
12. Myers C. R., Nelson K. H. Microbial reduction of manganese oxides: Interactions with iron and sulfur // Geochim. et cosmochim. acta. – 1988. – **52**. – P. 2727–2732.
13. Nelson K. H., Saffarini G. Iron and manganese in anaerobic respiration: environmental significance, physiology and regulation // Annu. Rev. Microbiol. – 1994. – **48**. – P. 311–343.
14. Spear J. R., Figueroa L. A., Honeyman B. D. Modeling reduction of uranium U(VI) under variable sulfate concentration by sulfate-reducing bacteria // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – **66**, No 9. – P. 3711–3721.
15. Дмитренко Г. М. Чи існує облигатний аеробіоз у бактерій? // Доп. НАН України. – 2004. – № 6. – С. 177–180.

Національний аграрний університет України, Київ

Надійшло до редакції 25.02.2008

УДК 57.033.084.2.577.112

© 2008

О. В. Міщук, О. Б. Столяр, В. О. Арсан

Властивості металотіонеїнів прісноводного двостулкового молюска як біомаркерів стану водного середовища

(Представлено академіком НАН України В. Д. Романенком)

*We have investigated freshwater bivalves *Anodonta cygnea* from the native population of the Gnizna river (the basin of the Dniester river) in a rural area (N group) and after their dislocation for 30 days in the urban zone of the Gnizna river (U group) and in the recreation zone of the Ternopil Lake (R group). The mussels' dislocation under new conditions in both cases caused the changes of the chromatography behavior of metallothioneins (MTs) and a decrease of the metal-binding function of MTs alongside with an increase of the zinc content in the mussels' tissues. A decrease of the copper content in the tissues of the mussels of U and R groups was observed. Moreover, the part of copper in MTs of mussels from the Ternopil Lake and the river was increased and decreased, respectively. The variation of the ratio of the zinc and copper contents in MTs of mussels can be a potential biomarker of the changes in water conditions.*

Розвиток адаптаційних відповідей до факторів середовища, як природного, так і техногенного походження, у різних організмів, у тому числі й гідробіонтів, пов'язаний переважно з молекулярними механізмами, що відповідають за збереження гомеостазу [1]. В умовах зростання забруднення водних екосистем різноманітними токсикантами, зокрема важкими металами, становить інтерес вивчення системи регуляції гомеостазу металів у тканинах гідробіонтів та використання цих механізмів у біоіндикації стану природних водойм [2].