

**ВІДНОВЛЕННЯ ХРОМАТ- І СУЛЬФАТ-ІОНІВ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИМИ  
БАКТЕРІЯМИ *DESULFOMICROBIUM* SP. CrR3 ЗА ВПЛИВУ ОРГАНІЧНИХ  
РЕЧОВИН – ЗАБРУДНЮВАЧІВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА**

**К. Шоляк, С. Гнатуш, Т. Перетятко, С. Гудзь**

*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: Sholjak@gmail.com*

Досліджено вплив різних органічних речовин – забруднювачів навколишнього середовища – на відновлення сульфат-іонів і утворення гідроген сульфід у хроматорезистентними сульфатвідновлювальними бактеріями *Desulfomicrobium* sp. CrR3. Показано, що за наявності у середовищі культивування гідрохінону, гліфосату, казеїну, алкілсульфокислоти, нафти й сорбінової кислоти досліджені бактерії не росли. Незначне нагромадження біомаси, використання сульфат-іона та утворення гідроген сульфід спостерігали за внесення у середовище культивування крохмалю, молочної сироватки, ніпагіну і пальмітату. Повне відновлення Cr (VI) у концентрації 0,25 мМ спостерігали за наявності глюкози, натрій малату, пірувату, фруктози, натрій цитрату. Збільшення концентрації Cr (VI) спричинило пригнічення росту бактерій і відновлення Cr (VI).

*Ключові слова:* органічні речовини, хроматорезистентні сульфатвідновлювальні бактерії, відновлення Cr (VI), відновлення  $SO_4^{2-}$ .

Наявність у навколишньому середовищі різноманітних органічних речовин зумовлена впливом техногенних процесів. Найбільш поширеними полутантами органічної природи у стічних водах є вуглеводні, нафтопродукти, пестициди, феноли, ПАВ, консерванти, відходи молочного виробництва тощо [3, 5]. Більшість органічних речовин, які здатні засвоювати представники роду *Desulfomicrobium*, описали Е. П. Розанова і спів-авт. Однак серед них немає речовин, які спричиняють забруднення навколишнього середовища [6].

Одним із найширше використовуваних у світі неселективних гербіцидів системної дії є гліфосат. Він зберігає стабільність у воді, що призводить до забруднення підземних вод [1, 3]. Ніпагін і сорбінова кислота – консерванти; молочна сироватка, казеїн, олія – побічні продукти харчової промисловості; пальмітат – побічний продукт косметичної галузі; гідрохінон, пірогалол – фенольні сполуки [5]. Ці речовини потрапляють у стічні води через недотримання правил їх використання чи утилізації, несанкціоновані скиди. Потенційно органічні речовини можуть бути використані мікроорганізмами як джерело карбону, однак їх вплив на процеси сульфат- і хроматредукції залишаються маловивченими.

**Матеріали і методи**

У роботі використовували хроматорезистентні сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfomicrobium* sp. CrR3, виділені нами зі стічних вод міста Львова [7]. Для культивування сульфатвідновлювальних бактерій використовували середовище Постгейта В [11]. Для дослідження здатності сульфатвідновлювальних бактерій засвоювати різні джерела карбону їх вирощували у середовищі Постгейта С зі сульфатами. Замість натрій лактату в еквімолярних кількостях (за карбоном) вносили гідрохінон, казеїн, гліфосат, крохмаль, алкілсульфокислоту, нафту, ніпагін, пальмітат, пірогалол, сорбінову кислоту. Для

дослідження впливу різних концентрацій Cr (VI) на мікроорганізми за використання різних органічних сполук використовували модифіковане середовище Постгейта С без  $\text{SO}_4^{2-}$ . Cr (VI) вносили як водний розчин  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  після стерилізації у концентраціях 0,25–1 мМ. Замість натрій лактату в еквімолярних кількостях вносили аланін, глюкозу, етанол, крохмаль, натрій малат, пальмітат, піруват, натрій сукцинат, фруктозу, фумарат, натрій цитрат.

Біомасу бактерій визначали турбідиметрично, фотометруванням на фотоелектроколориметрі КФК-3 ( $\lambda = 340$  нм, оптичний шлях 3 мм). Вміст Cr (VI) у культуральній рідині визначали дифенілкарбазидним методом ( $\lambda = 540$  нм, кювета 10 мм) [9]. Cr (III) визначали колориметрично ( $\lambda = 590$  нм, кювета 10 мм) з використанням хромазурулу S [8]. Вміст сульфатів визначали турбідиметрично ( $\lambda = 520$  нм, кювета 10 мм) після їх осадження барій хлоридом [2]. Для стабілізації суспензії використовували гліцерин [2]. Кількість гідроген сульфід визначали у культуральній рідині фотометрично з використанням *n*-амінодиметиланіліндігідрохлориду ( $\lambda = 665$  нм, кювета з оптичним шляхом 30 мм) [10]. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за Лакінім [4].

### Результати і їх обговорення

Попередньо нами встановлено, що сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfomicrobium* sp. CrR3 здатні використовувати різні органічні речовини як джерела карбону [7].

Для дослідження здатності сульфатвідновлювальних бактерій використовувати різні органічні речовини, що належать до основних класів забруднювачів навколишнього середовища (пестициди, феноли, консерванти, відходи молочного виробництва тощо), *Desulfomicrobium* sp. CrR3 культивували у модифікованому середовищі Постгейта С, у якому лактат був замінений на гідрохінон, “Ураган” (діюча речовина гліфосат), казеїн, крохмаль, ніпагін, сорбінову кислоту, молочну сироватку, олію тощо.

Як видно з результатів, наведених на рис. 1, найкращий ріст бактерій спостерігали у середовищі з натрій лактатом (контроль).

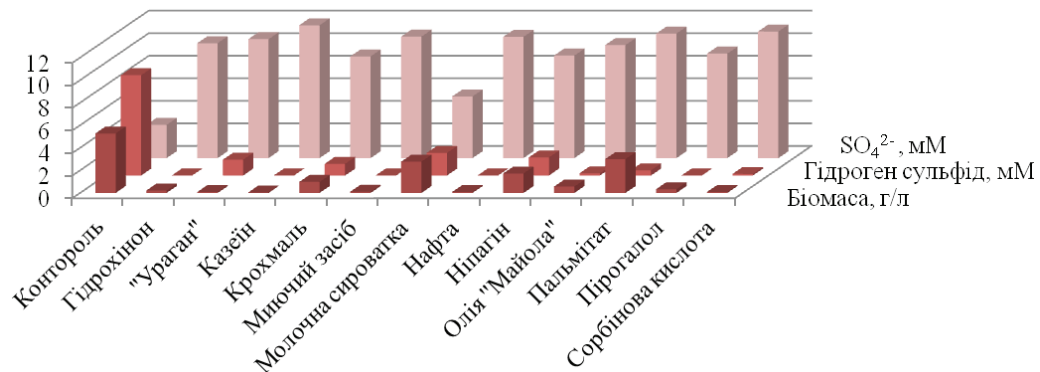


Рис. 1. Нагромадження біомаси і сульфідогенна активність *Desulfomicrobium* sp. CrR3 за внесення різних полютантів ( $p \leq 0,05$ )

У середовищі з молочною сироваткою і пальмітатом ріст бактерій характеризувався як “хороший”. Однак рівень нагромадження біомаси був майже удвічі нижчий, порівняно з контролем. Незначне нагромадження біомаси було виявлено у середовищі з крохмалем і ніпагіном (0,75-1,5 г/л). Гідрохінон, пірогалол, “Ураган”, казеїн, сорбінова кислота, нафта, олія, мийний засіб (діюча речовина алкілсульфо кислота) не забезпечували росту досліджених бактерій.

Отримані результати показали, що бактерії *Desulfomicrobium* sp. CrR3 не нагромаджували біомасу за наявності у середовищі фенольних сполук, нафтопродуктів, деяких пестицидів і консервантів.

Наявність різних органічних речовин у середовищі культивування впливала на відновлення сульфат-іонів і утворення гідроген сульфід у дослідженими бактеріями (див. рис. 1). У середовищі з натрій лактатом відбувалася інтенсивна сульфатредукція. Упродовж культивування (7 діб) вихідна концентрація сульфат-іонів зменшилась у 4,5 рази і становила 2,9 мМ. За цих умов у середовищі спостерігали нагромадження гідроген сульфід (8,9 мМ). Дещо нижча сульфатвідновлювальна активність бактерій була у середовищі з молочною сироваткою та крохмалем. За наявності у середовищі гідрохінону, пірогалолу, гліфосату, гліцерину, казеїну, сорбінової кислоти, нафти, олії, мийного засобу використання  $\text{SO}_4^{2-}$  бактеріями не спостерігалось, оскільки кінцева концентрація сульфатів майже не відрізнялась від вихідної і становила близько 11 мМ.

Незважаючи на те, що за наявності “Урагану” концентрація  $\text{SO}_4^{2-}$  не знижувалась, у середовищі виявляли гідроген сульфід у концентрації 1,4 мМ. Ймовірно, це обумовлено тим, що сам препарат містить незначну кількість сульфат-іонів. У середовищі з лактатом, що було контролем, концентрація гідроген сульфід на сьому добу культивування була удвічі вищою (2,9 мМ).

Таким чином, більшість із досліджених нами речовин (нафта, пестициди, консерванти, феноли, ПАР), що є поліюгантами навколишнього середовища, негативно впливають на ріст хроматорезистентних штамів виділених сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfomicrobium* sp. CrR3. Однак у середовищах, що містили молочну сироватку, пальмітат і ніпагін, ці бактерії виявляли сульфідогенну активність.

Дослідження закономірностей дисиміляційної сульфатредукції, яку здійснюють сульфатвідновлювальні бактерії, є актуальним для розроблення ефективних біоремедіаційних схем, спрямованих на очищення забруднених стічних вод, які містять органічні речовини у поєднанні зі сульфатами, на основі використання метаболічної активності цих бактерій.

Досліджено відновлення Cr (VI) за різних концентрацій (0,25; 0,5; 1 мМ) до Cr (III) хроматорезистентними сульфатвідновлювальними бактеріями *Desulfomicrobium* sp. CrR3 за наявності у середовищі культивування різних органічних речовин.

Встановлено, що за наявності натрій лактату (контроль), натрій малату, фумарату, пірувату, натрій сукцинату, натрій цитрату, глюкози та фруктози досліджені бактерії нагромаджують біомасу до 3,5–4 г/л на десяту добу культивування. За цих умов спостерігається відновлення 0,25 мМ токсичного Cr (VI) до менш токсичного Cr (III) (рис. 2).

У середовищах з аланіном, етанолом, крохмалем, пальмітатом і ніпагіном бактерії росли, однак хроматредукція сповільнювалася, порівняно з контролем. Після десяти діб культивування у середовищах із натрій лактатом, глюкозою, натрій малатом, фруктозою, піруватом, натрій цитратом виявлено залишкові концентрації Cr (VI) та 0,2–0,25 мМ Cr (III).

За умови підвищення вихідної концентрації Cr (VI) у середовищі до 0,5 мМ відновлення Cr (VI) сповільнювалось, а нагромадження біомаси бактеріями знижувалось (рис. 3).

Біомаса бактерій у середовищі з лактатом, глюкозою, піруватом, фруктозою та фумаратом за впливу 0,5 мМ хромату коливалась у межах 2,5–3 г/л, що в 1,5 рази менше, порівняно з цим самим показником за концентрації 0,25 мМ хромату. Концентрація Cr (VI) на десяту добу культивування знизилась у п'ять разів, порівняно із вихідною. У середовищі з аланіном, етанолом, крохмалем, пальмітатом, натрій сукцинатом і натрій цитратом за

впливу 0,5 мМ хромату біомаса становила 1 г/л. За цих умов спостерігали відновлення 0,25–0,3 мМ Cr (VI) та утворення Cr (III).

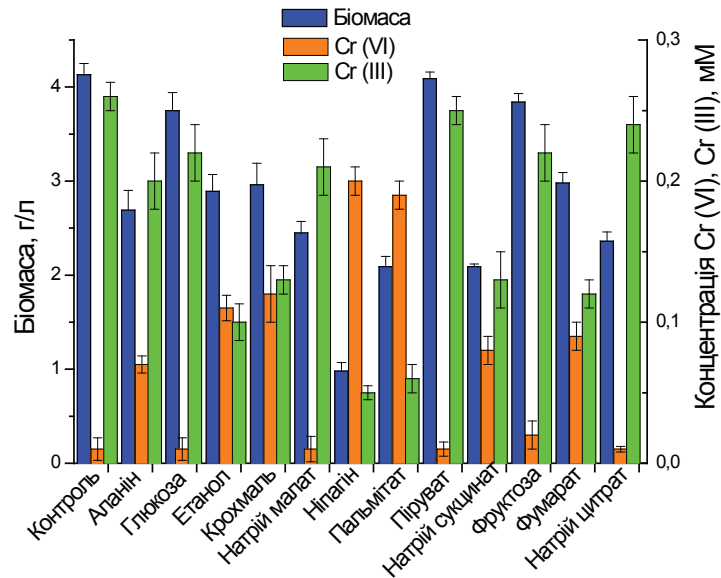


Рис. 2. Вміст Cr (VI) і Cr (III) у культуральній рідині за умови росту *Desulfomicrobium* sp. CrR3 у середовищі з різними органічними сполуками, що містило 0,25 мМ Cr (VI)

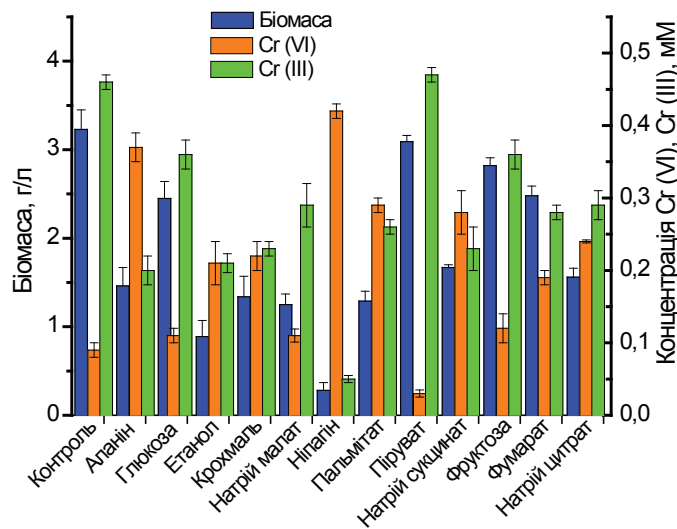


Рис. 3. Вміст Cr (VI) і Cr (III) у культуральній рідині за росту *Desulfomicrobium* sp. CrR3 у середовищі з різними органічними сполуками, що містило 0,5 мМ Cr (VI)

За наявності в середовищі нітрагину хромат пригнічував ріст бактерій. Після десяти діб культивування концентрація Cr (VI) знизилася з 0,5 до 0,42 мМ.

За внесення калій біхромату в концентрації 1 мМ у середовище, що містило як джерело карбону аланін, етанол, крохмаль, натрій малат, нітрагін, пальмітат, натрій сукцинат, натрій цитрат, росту бактерій і відновлення хромату не спостерігали (рис. 4).

За наявності у середовищі культивування глюкози, фруктози, пірувату, фумарату на десяту добу культивування виявили зниження концентрації Cr (VI) на 40–60% від вихідної концентрації. За цих умов бактерії нагромаджували приблизно 1 г/л біомаси.

Нагромадження біомаси бактерій *Desulfomicrobium* sp. CrR3 залежить не лише від внесеної концентрації хромату, а й від наявності тієї чи іншої органічної речовини у середовищі культивування. За наявності у середовищі низьких концентрацій Cr (VI) (0,25 мМ), сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfomicrobium* sp. CrR3 повністю відновлювали високотоксичний Cr (VI) до Cr (III), нагромаджуючи біомасу до 3,5–4 г/л у середовищах із натрій лактатом, глюкозою, піруватом, фруктозою, фумаратом.

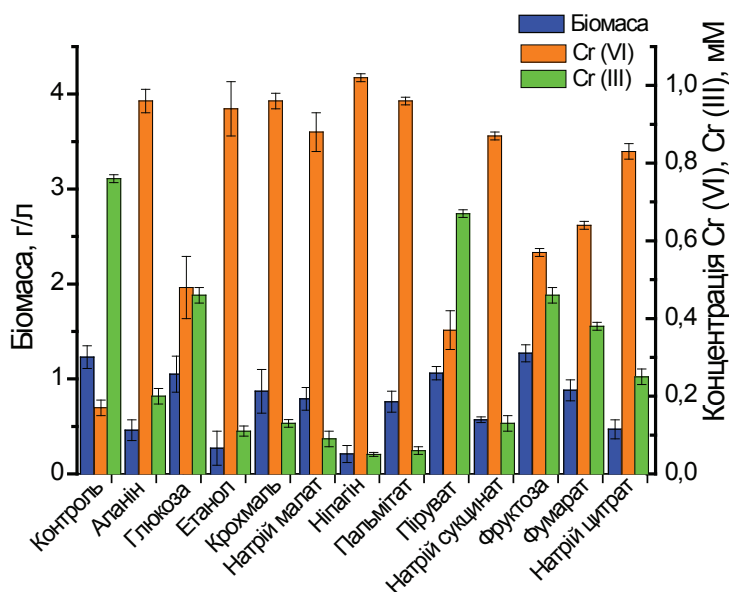


Рис. 4. Вміст Cr (VI) і Cr (III) у культуральній рідині за росту *Desulfomicrobium* sp. CrR3 у середовищі з різними органічними сполуками, що містило 1 мМ Cr (VI)

Підвищення концентрації Cr (VI) до 0,5 мМ та 1 мМ спричинило зниження нагромадження біомаси бактеріями, а процеси відновлення Cr (VI) та утворення Cr (III) уповільнювались.

Отже, бактерії *Desulfomicrobium* sp. CrR3 не можуть використовувати як джерело карбону фенольні сполуки, нафтопродукти, деякі пестициди та консерванти. Сульфатредукція за цих умов пригнічується. У середовищі з молочною сироваткою та пальмітатом нагромадження біомаси було удвічі нижчим, порівняно з контролем – середовищем із натрій лактатом. Крохмаль і ніпагін забезпечують незначне нагромадження біомаси. У більшості випадків наявність різних поліюгантів негативно впливає на сульфідогенну та хроматредуктазну активності.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бакулин В. М., Мартинсон Е. А., Мячина Н. С. та ін. Использование почвенных глифосатустойчивых изолятов бактерий рода *Pseudomonas* в биотехнологии деградации фосфонометилглицина // Ветеринарная медицина. 2012. № 3–4. С. 17–19.

2. ГОСТ 26426-85. Почвы. Метод определения ионов сульфата в водной вытяжке. М. : Изд-во стандартов, 1985.
3. Кузнецова Е. М., Чміль В. Д. Глифосат: поведение в окружающей среде и уровни остатков // Современные проблемы токсикологии. 2010. № 1. С. 87–95.
4. Лакин Г. Ф. Биометрия / Лакин Г. Ф. М. : Высшая школа, 1990. 352 с.
5. Прибилова В. М. Стан забруднення питних підземних вод органічними сполуками // Вісник Харк. нац.ун-ту. 2011. № 986. С. 238–242.
6. Розанова Е. П. Методы культивирования и идентификации анаэробных бактерий, восстанавливающих серу и ее окисленные соединения // Теоретические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов. 1978. С. 123–136.
7. Шоляк К. В., Перетятко Т. Б., Гудзь С. П. Сульфатвідновлювальні бактерії, стійкі до підвищених концентрацій шестивалентного хрому // Мікробіологія і біотехнологія. 2013. № 2. С. 66–76.
8. Honchar T. M., Ksheminska H. P., Patsay I. O. et al. Assay of chromium (III) in microbial cultures using chromazurol S and surfactants for monitoring chromate remediation processes // Біотехнологія. 2008. Т. 1, № 4. С. 85–94.
9. Marchart H. Über die Reaktion von Chrom mit Diphenylcarbazon und Diphenylcarbazol // Anal. Chim. Acta. 1964. Vol. 196, № 30. S.11–17.
10. Pat. 6,340,596 B1 USA, Int. Cl. G 01 N 33/00. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen / M. Sugiyama; assignee Fujirebio Inc. – № 09/248,316; fil. 02.11.1999; date of pat. 22.01.2002.
11. Postgate J. R. The sulfate-reducing bacteria. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: Cambridge Univ. press, 1984. 199 p.

**ВОССТАНОВЛЕНИЕ ХРОМАТ- И СУЛЬФАТ-ИОНОВ  
СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ  
DESULFOMICROBIUM SP. CrR3 ПРИ ВЛИЯНИИ ОРГАНИЧЕСКИХ  
ВЕЩЕСТВ – ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

**Е. Шоляк, С. Гнатуш, Т. Перетятко, С. Гудзь**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: Sholjak@gmail.com*

Исследовано влияние различных органических веществ – загрязнителей окружающей среды – на восстановление сульфат-ионов и образование сероводорода хромоторезистентными сульфатвосстанавливающими бактериями *Desulfomicrobium* sp. CrR3. Показано, что при наличии в среде культивирования гидрохинона, глифосата, казеина, алкилсульфонокислоты, нефти и сорбиновой кислоты исследованные бактерии не росли. Незначительное накопление биомассы, использование сульфат-иона и образование сероводорода наблюдали при внесении в среду культивирования крахмала, молочной сыворотки, нипагина и пальмитата. Полное восстановление Cr (VI) в концентрации 0,25 мМ наблюдали при наличии глюкозы, натрий малата, пирувата, фруктозы, натрий цитрата. Увеличение концентрации Cr (VI) вызывало угнетение роста бактерий и восстановления Cr (VI).

*Ключевые слова:* органические вещества, хромоторезистентные сульфатвосстанавливающие бактерии, восстановление Cr (VI), восстановление SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

**CHROMATE- AND SULFATE-IONS REDUCTION BY SULPHATE-REDUCING BACTERIA *DESULFOMICROBIUM* SP. CrR3 UNDER THE INFLUENCE OF VARIOUS ORGANIC COMPOUNDS – ENVIRONMENTAL POLLUTANTS****K. Sholiak, S. Hnatush, T. Peretyatko, S. Gudz**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: Sholjak@gmail.com*

It was investigated the influence of different organic compounds, which caused environmental pollution, on reduction of sulfate ions and formation of hydrogen sulfide by chrome-resistant sulfate-reducing bacteria *Desulfomicrobium* sp. CrR3. It has been shown that under the presence of hydroquinone, glyphosate, casein, alkil sulfo-acid, oil and sorbic acid in the growth medium bacteria did not show any growth. Slight accumulation of biomass and usage of sulfate ions with formation of hydrogen sulfide were observed under addition of starch, whey, nipagin and palmitate into the growth medium. Complete reduction of Cr (VI) at the concentration of 0.25 mM was observed under the presence of glucose, sodium malate, pyruvate, fructose, sodium citrate. Gradual increasing of Cr (VI) concentrations caused its reduction and inhibition of bacterial growth.

*Keywords:* organic compounds, chrome-resistant sulphate-reducing bacteria, Cr (VI)-reduction, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-reduction.