

ВПЛИВ КАЛІЙ БІХРОМАТУ НА ДЕЯКІ ФІЗІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ БАКТЕРІЙ ЦИКЛУ СУЛЬФУРУ ОЗЕРА ЯВОРІВСЬКЕ

О. Мороз, С. Гнатуш, Х. Богославець, Г. Яворська, Г. Звір, Б. Борсукевич

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

Встановлено, що за впливу 2–3 мМ $K_2Cr_2O_7$ у інкубаційній суміші сповільнюється нагромадження біомаси й окиснення гідроген сульфід *Thiocapsa* sp. Ya-2003, *Lamprocystis* sp. Ya-2003 і *Chlorobium limicola* IMB K-8 у середовищі ван Ніля з 4–10 мМ $Na_2S \times 9H_2O$. У клітинах *C. limicola* IMB K-8, інкубованих з 3 мМ $K_2Cr_2O_7$, до 20 % знижується вміст глюкози та глікогену. $K_2Cr_2O_7$ за концентрації 3,5 мМ у інкубаційній суміші майже удвічі пригнічує ріст і сульфідогенну активність *Desulfuromonas acetoxidans* IMB B-7384, *Desulfuromonas* sp. Yavor-5, *Desulfuromonas* sp. Yavor-7, *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yavor-6, *Desulfovibrio* sp. Yavor-8. Досліджені бактерії з різною інтенсивністю використовують Cr (VI) як єдиний акцептор електронів у процесі анаеробного дихання за концентрацій 1,74–10,41 мМ $K_2Cr_2O_7$ у середовищі Кравцова-Сорокіна. Найвищу біомасу бактерії *Desulfovibrio* sp. Yavor-7 і *Desulfovibrio* sp. Yavor-8 нагромаджували в середовищі з 1,74 мМ $K_2Cr_2O_7$ (до 1,52 і 1,55 г/л, відповідно), яка виявилася в півтора разу нижчою, ніж у середовищі з фумаратом за цієї ж концентрації. Завдяки стійкості до $K_2Cr_2O_7$ бактерії родів *Thiocapsa*, *Lamprocystis*, *Chlorobium*, *Desulfuromonas* і *Desulfovibrio*, виділені з озера Яворівське, можуть бути використані у технологіях, спрямованих на детоксикацію середовищ від гідроген сульфідів і сполук шестивалентного хрому.

Ключові слова: фототрофні сіркобактерії, сірко- і сульфатвідновлювальні бактерії, гідроген сульфід, йони біхромату

Сульфат- і сірковідновлювальні бактерії родів *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobacterium*, *Desulfocapsa*, *Desulfofrigus*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfobacter*, *Desulfurella*, *Desulfuromusa*, *Desulfuromonas*, *Geobacter*, *Wolinella* у нішах із низьким окисно-відновним потенціалом беруть участь у трансформації органічних сполук, використовуючи їх як донори електронів дисиміляційної сульфат-, сірко- чи металоредукції [19, 22]. Утворений бактеріями H_2S взаємодіє з йонами металів, осаджуючи їх у формі сульфідів.

Надлишок H_2S в освітленій анаеробній зоні водойм утилізують фототрофні сіркобактерії, що значною мірою сприяє зниженню рівня гідроген сульфідів в доквіллі [18]. Ці бактерії беруть участь у нагромадженні органічних речовин у водоймах, збагачують середовище сполуками нітрогену, здійснюючи азотофіксацію, і можуть засвоюватись іншими організмами. Бактерії родин *Chromatiaceae* та *Chlorobiaceae* у процесі аноксигенного фотосинтезу окиснюють H_2S спочатку до сірки, а пізніше до сульфатів [18]. Фототрофні сіркобактерії стимулюють розвиток сірко- і сульфатвідновлювальних бактерій, постачаючи їм органічні речовини, сірку й сульфати [2, 18]. Під час асиміляції CO_2 та деяких органічних речовин бактерії роду *Chlorobium* синтезують ендогенні вуглеводи – глюкозу та глікоген [2].

Хром є одним із найпоширеніших важких металів у літосфері ($69 \text{ мкг} \times \text{г}^{-1}$), він потрапляє у доквілля з природних джерел (унаслідок виверження вулканів, лісових пожеж,

погодних катаклізмів), але в основному внаслідок промислового і побутового застосування (гальванічні, металургійні, машинобудівні, лісопереробні, шкіряні підприємства, фарби, пластик тощо) [24]. Cr (VI) – розчинний, дуже токсичний для живих організмів, мутагенний і канцерогенний для людини. Cr (III) – відносно нерозчинний за природних умов і тому менш токсичний, ніж Cr (VI) [23, 24]. Cr (VI), проникаючи крізь клітинну мембрану *Shewanella oneidensis* MR-1, *Pseudomonas putida* F1, *Cupriavidus metallidurans* CH34, *Arthrobacter* sp. FB24 системою ABC транспортерів сульфату [14], взаємодіє з внутрішньоклітинними відновниками (т. я. амінокислоти, нуклеотиди, цукри, органічні кислоти, глутатіон, флавоензими, вітаміни) і генерує хімічно активні інтермедіати Cr (V) і/або Cr (IV), вільні радикали і Cr (III) як кінцевий продукт [24]. Відновлення Cr (VI) до Cr (V) поєднується з утворенням H_2O_2 . Взаємодія Cr (V) з H_2O_2 призводить до утворення гідроксил-радикалів. Вважають, що генотоксичність і токсичність Cr (VI) обумовлена пошкодженням ДНК та білків, відповідно, кисневими радикалами, утвореними у результаті його відновлення. Cr (III) пошкоджує реплікацію ДНК, спричиняє мутагенез, змінює структуру й активність ферментів, взаємодіючи з карбоксильними і тіоловими групами [23].

Хоча ріст мікроорганізмів стимулюють низькі концентрації Cr (VI) у середовищі, його наявність модифікує експресію генів, продукти яких задіяні у метаболізмі вуглеводів, перетворенні амінокислот, утворенні й використанні енергії у формі АТФ тощо. За впливу 1 і 5 мМ Cr (VI) у *S. oneidensis* MR-1 і *Arthrobacter* sp. FB24, відповідно, зменшується кількість ферментів, задіяних у синтезі фосфоенолпірувату і пірувату, компонентів піруватдегідрогеназного комплексу, альдегіддегідрогенази, що призводить до зниження нагромадження біомаси [24].

Для виживання у забрудненому Cr (VI) довкіллі мікроорганізми мають ефективні системи нейтралізації його негативних впливів [24]. Описано локалізовані у хромосомній і/або плазмідній ДНК детермінанти стійкості до хроматів і біхроматів (гени, що кодують протеїни, задіяні у їх транспорті крізь мембрану) [17]. Інші відомі механізми стійкості до Cr (VI) – це специфічне видалення йонів хромату з цитоплазми системами викачування або позаклітинне відновлення Cr (VI) до Cr (III) [15, 22, 24]. За анаеробних умов *Deinococcus radiodurans* R1, *S. oneidensis* MR-1 і інші використовують Cr (VI) як акцептор електронів [15]. Цитохроми MtrA, MtrB, MtrC та ОмсА *S. oneidensis* MR-1 задіяні у дисиміляційній редукції не лише Cr (VI), але і Fe (III), U (VI), Tc (VII), причому встановлено, що MtrC та ОмсА є термінальними редуктазами Cr (VI) [15]. Мембранозв'язані металоредуктази у грамнегативних бактерій асоційовані зі зовнішнім боком мембрани для відновлення йонів металів поза клітиною [9, 22]. Три-, тетра- і декагемові цитохроми типу *c* у *Shewanella frigidimarina*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfuromonas acetoxidans* локалізовані між внутрішньою та зовнішньою мембранами й у периплазмі, через які електрони з цитоплазми від реакцій окиснення органічних сполук передаються назовні клітини, де власне і відновлюються йони металів [20].

Значення сульфат-, сірковідновлювальних і фототрофних сіркобактерій, виділених із техногенно змінених територій, у відновленні забруднених H_2S та сполуками шестивалентного хрому біоценозів досліджене недостатньо. Тому метою роботи було вивчити вплив калій біхромату на утилізацію H_2S і синтез внутрішньоклітинної глюкози та глікогену фототрофними пурпуровими й зеленими сіркобактеріями, а також дослідити його вплив на сульфідогенну активність і детоксикацію $Cr_2O_7^{2-}$ за використання Cr (VI) як акцептора електронів сірко- та сульфатвідновлювальними бактеріями, виділеними з озера Яворівське, для оцінки ефективності можливого використання бактерій циклу сульфуру в технологіях очищення довкілля від токсичних сульфур- і металовмісних сполук.

Матеріали та методи

Фототрофні пурпурові сіркобактерії *Thiocapsa* sp. Ya-2003 і *Lamprocystis* sp. Ya-2003, зелені сіркобактерії *Chlorobium limicola* IMB K-8, сірковідновлювальні бактерії *Desulfuromonas acetoxidans* IMB B-7384, *Desulfuromonas* sp. Yavor-5, *Desulfuromonas* sp. Yavor-7 та сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-8 виділені з озера Яворівське, ідентифіковані та зберігаються в колекції кафедри мікробіології ЛНУ імені Івана Франка [5–7, 10–12].

Фототрофні сіркобактерії культивували впродовж 10 діб у пробірках об'ємом 25 мл за анаеробних умов, температури 25–28 °С та постійного освітлення в модифікованому середовищі ван Ніля [3] такого складу (г/л): NH_4Cl – 0,4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,33; KH_2PO_4 – 0,4; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; NaHCO_3 – 6,0; $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ – 1,0 (контроль); 1,25; 1,5; 2; 2,5 (4; 5; 6; 8; 10 мМ); CH_3COONa – 2,55; $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3\text{Na}$ – 1,0; вода дистильована – 1 л; мікроелементи SL10 – 2,0 мл; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ – 1,0 г/л. Вітамін B_{12} (5 мкг/л), розчини (10 %) NaHCO_3 , CH_3COONa , $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3\text{Na}$, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ та $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ стерилізували окремо і вносили у середовище перед посівом бактерій (густина засіву – 0,5 г/л). Значення рН середовища було слаболужним (рН~7,5) для пурпурових і нейтральним (рН~7,0) – для зелених сіркобактерій. Склад розчину мікроелементів SL10 (мг/л): HCl (25 %) – 10 мл; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2000; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 190; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 100; ZnCl_2 – 70; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 36; $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 24; H_3BO_3 – 6; $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 2. Пурпурові сіркобактерії вирощували за освітлення 500–700 лк і довжини хвиль понад 800 нм, зелені – за освітлення 40 лк і довжини хвиль 700–800 нм. Інтенсивність освітлення вимірювали люксометром Ю-116.

Для вивчення впливу $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ на нагромадження біомаси, утилізацію H_2S , синтез внутрішньоклітинної глюкози та глікогену клітини *Thiocapsa* sp. Ya-2003, *Lamprocystis* sp. Ya-2003 та *C. limicola* IMB K-8 вирощували до середини експоненційної фази росту, осаджували центрифугуванням (6 тис. об./хв, 30 хв), ресуспендували у стерильному розчині NaCl (0,9 %), інкубували годину [13] зі стерильним розчином $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (0; 1; 2; 3 мМ). Клітини двічі відмивали розчином NaCl (0,9 %), осаджували центрифугуванням, висівали у пробірки і вирощували в середовищі з $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ за різних концентрацій (4 (контроль); 5; 6; 8; 10 мМ). Культивували 10 діб, визначали біомасу турбідиметричним методом з використанням фотоелектроколориметра КФК-3 за довжини хвилі 660 нм для пурпурових сіркобактерій і 450 нм для зелених та оптичного шляху 3 мм [3]. Вміст гідроген сульфідів вимірювали в культуральній рідині спектрофотометричним методом за утворенням метиленової сині [3]. Вміст глюкози та глікогену в безклітинних екстрактах *C. limicola* IMB K-8 визначали ферментативно, за допомогою аналітичного набору “Діаглюк-2” [1].

Сірко- та сульфатвідновлювальні бактерії вирощували 10 діб у пробірках об'ємом 25 мл за анаеробних умов, температури 30 °С у модифікованому середовищі Кравцова-Сорокіна [3] такого складу (г/л): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,84; K_2HPO_4 – 0,5; NH_4Cl – 0,16; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$ – 2,0. Перед посівом у середовище вносили 0,05 мл стерильного розчину $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ (1 %). Для доведення рН середовища до 7,2 використовували стерильний 10 н розчин NaOH . Клітини вносили в середовище у кількості 10 об. % до початкової концентрації 10^8 КУО/мл (0,05 г/л). Розчин Na_2SO_4 стерилізували окремо та вносили в середовище культивування *Desulfovibrio* sp. за концентрації 3,47 мМ. Сірку стерилізували окремо (0,7 атм) і вносили в середовище культивування *Desulfuromonas* sp. за концентрації не меншої, ніж 0,1 г/л (3,47 мМ – концентрація SO_4^{2-} у середовищі стандартного складу).

Для визначення впливу $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ на нагромадження біомаси й утворення H_2S сірко- та сульфатвідновлювальними бактеріями клітини, попередньо вирощені у середовищі з цистеїном ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$) за концентрації 0,2 г/л [9] для задоволення асиміляційних потреб

бактерій у сульфурі та фумаратом ($C_4H_4O_4$) як акцептором електронів (3,47 мМ), осаджували центрифугуванням (6 тис. об./хв, 20 хв), ресуспендували в розчині NaCl (0,9 %), інкубували годину [13] зі стерильним розчином $K_2Cr_2O_7$ (0 (контроль); 0,5; 2,5; 3,5 мМ), осаджували центрифугуванням, двічі відмивали розчином NaCl (0,9 %) і висівали в середовище з S^0 або Na_2SO_4 . Після 10 діб росту визначали вміст гідроген сульфід у біомасу турбідиметричним методом з використанням КФК-3 за довжини хвилі 340 нм та оптичного шляху 3 мм [3].

Для дослідження нагромадження бактеріями біомаси за використання $C_4H_4O_4$ (контроль) і $K_2Cr_2O_7$ як акцепторів електронів клітини висівали в середовище з $C_3H_7NO_2S$ (0,2 г/л). Стерильні 1 М розчини фумарату і калій біхромату вносили в середовище до їхніх кінцевих концентрацій, які у 0,5; 1 (контроль); 1,5; 2 і 3 рази відрізнялися від стандартного вмісту акцептора електронів середовища Кравцова-Сорокіна (1,74; 3,47; 5,21; 6,94; 10,41 мМ). Попередньо бактерії вирощували в середовищі з цистеїном (0,2 г/л) і фумаратом (3,47 мМ) до середини експоненційної фази росту. На 2, 4, 6, 8, 10 добу визначали біомасу. У культуральній рідині якісно визначали наявність біхромат-йонів [21].

Досліди повторювали тричі з трьома паралельними постановками для кожного варіанта експериментальних і контрольних умов. Отримані дані опрацьовували з використанням програми Microsoft Excel 2010. Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента t . Достовірною вважалася різниця з рівнем значимості $p \leq 0,05$ [4].

Результати і їхнє обговорення

Окиснені форми важких металів, зокрема, Cr (VI), Mn (IV), Fe (III), U (VI), є токсичнішими для мікроорганізмів, ніж відновлені [20]. Після потрапляння в клітину вони виявляють негативний вплив на метаболічні перетворення у ній, генеруючи активні інтермедіати й кисневі радикали, що призводить до інгібування конструктивних і енергетичних процесів [22]. Йони біхромату є одними з найтоксичніших для бактерій [24], тому перевіряли рівень інгібування ними росту і здатності фототрофних сіркобактерій здійснювати детоксикацію водних середовищ від гідроген сульфід, зокрема, за високих його концентрацій у середовищі. Вивчали також вплив $Cr_2O_7^{2-}$ на синтез глюкози та глікогену клітинами зелених сіркобактерій, оскільки відомо, що у цих бактерій зміщення метаболізму в бік анаболізму вуглеводів поєднується зі зниженням росту [2]. Інкубовані впродовж години з $K_2Cr_2O_7$ (0; 1; 2; 3 мМ) пурпурові та зелені сіркобактерії вирощували у середовищі ван Ніля зі збільшеним у 1,25; 1,5; 2,0; 2,5 рази вмістом $Na_2S \times 9H_2O$.

Збільшення вмісту $Na_2S \times 9H_2O$ у середовищі від 4 до 10 мМ пригнічувало нагромадження біомаси не інкубованими (до 1,8 разу) та інкубованими з $K_2Cr_2O_7$ (до 5,2 разу) клітинами бактерій усіх досліджених штамів (рис. 1, А, Б, В). $K_2Cr_2O_7$ за концентрації 1 мМ у інкубаційній суміші незначно інгібував нагромадження біомаси *Thiocapsa* sp. Ya-2003, *Lamprocystis* sp. Ya-2003 та *C. limicola* IMB K-8 під час росту в середовищах з 4–10 мМ $Na_2S \times 9H_2O$. Йони біхромату за концентрації 2 мМ не інгібували росту бактерій *Thiocapsa* sp. Ya-2003, вирощених у середовищах з 4, 5 і 6 мМ $Na_2S \times 9H_2O$, але пригнічували його у бактерій, вирощених у середовищах з 8 та 10 мМ $Na_2S \times 9H_2O$, на 59,6 і 52,9 % відповідно. $K_2Cr_2O_7$ за концентрації 2 мМ інгібував ріст бактерій *Lamprocystis* sp. Ya-2003, вирощених у середовищах з 8 та 10 мМ $Na_2S \times 9H_2O$, на 53,8 і 57,1 % відповідно, але значно не пригнічував його у бактерій *C. limicola* IMB K-8, вирощених у середовищах з 4–10 мМ $Na_2S \times 9H_2O$. За впливу 3 мМ $K_2Cr_2O_7$ нагромадження біомаси бактеріями *Thiocapsa* sp. Ya-2003 і *Lamprocystis* sp. Ya-2003, вирощеними у середовищах із різними концентраціями $Na_2S \times 9H_2O$, значно знижувалося (до 4,7 та 7,7 рази відповідно). Нагромадження біомаси

C. limicola ІМВ К-8 за впливу 3 мМ $K_2Cr_2O_7$ знижувалося (до 3,4 разу) лише після культивування їх у середовищі з підвищеним вмістом (6–10 мМ) $Na_2S \times 9H_2O$.

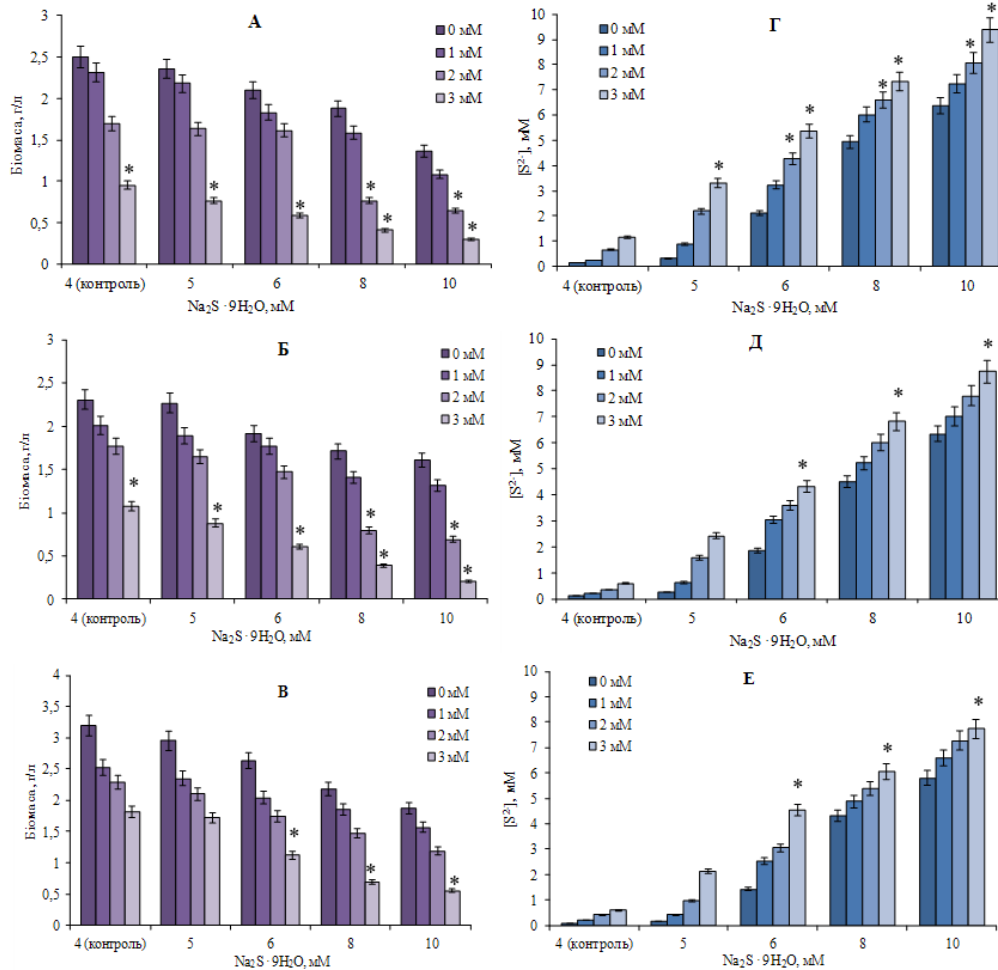


Рис. 1. Вплив $K_2Cr_2O_7$ на нагромадження біомаси (А, Б, В) та утилізацію H_2S (Г, Д, Е) *Thiocapsa* sp. Ya-2003 (А, Г), *Lamprocystis* sp. Ya-2003 (Б, Д) і *C. limicola* ІМВ К-8 (В, Е) після 10 діб росту в середовищі з $Na_2S \times 9H_2O$ за різних концентрацій. * – $p \leq 0,05$

Отже, пурпурові сіркобактерії *Thiocapsa* sp. Ya-2003 та *Lamprocystis* sp. Ya-2003, вирощені у середовищах з 8 та 10 мМ $Na_2S \times 9H_2O$, виявилися менш стійкими до 2 мМ $K_2Cr_2O_7$, порівняно із зеленими сіркобактеріями *C. limicola* ІМВ К-8, ріст яких значно знижувався за впливу 3 мМ $Cr_2O_7^{2-}$ під час культивування у середовищі з вмістом $Na_2S \times 9H_2O$ понад 6 мМ. $K_2Cr_2O_7$ за концентрацій 2–3 мМ виявляв токсичнішу дію на клітини бактерій, вирощених у середовищах зі збільшеним у 1,5–2,5 разу вмістом $Na_2S \times 9H_2O$, що може бути обумовлено негативним впливом на мікроорганізми і $Cr_2O_7^{2-}$, і гідроген сульфід.

Рівень утилізації H_2S клітинами всіх штамів, не інкубованими з $K_2Cr_2O_7$, залежить від початкового вмісту $Na_2S \times 9H_2O$ у середовищі (рис. 1, Г, Д, Е). Якщо вміст $Na_2S \times 9H_2O$ у середовищі становив 4 мМ, то за 10 діб клітини *Thiocapsa* sp. Ya-2003 окиснювали 96,3 %, *Lamprocystis* sp. Ya-2003 – 97,3 % і *C. limicola* ІМВ К-8 – 97,8 % наявного у середовищі

гідроген сульфід. Якщо його вміст у середовищі становив 10 мМ, то за 10 діб клітини бактерій окиснювали лише 36,1; 36,5 і 42,1 % відповідно наявного у середовищі H_2S . $K_2Cr_2O_7$ за концентрації 1 мМ не впливав на окиснення H_2S *Thiocapsa* sp. Ya-2003, *Lamprocystis* sp. Ya-2003 і *C. limicola* IMB K-8, вирощеними у середовищах з усіма досліджуваними концентраціями $Na_2S \times 9H_2O$. 2 мМ $K_2Cr_2O_7$ у 1,9–2,3 разу пригнічував рівень окиснення H_2S лише клітинами *Thiocapsa* sp. Ya-2003, вирощеними у середовищі з 6–10 мМ $Na_2S \times 9H_2O$. $K_2Cr_2O_7$ за концентрації 3 мМ знижував рівень утилізації H_2S бактеріями *Thiocapsa* sp. Ya-2003, вирощеними у середовищі з 5–10 мМ $Na_2S \times 9H_2O$, у 2,8–6,0 разу. *Lamprocystis* sp. Ya-2003 і *C. limicola* IMB K-8, інкубовані з 3 мМ $K_2Cr_2O_7$ та вирощені у середовищі з 6–10 мМ $Na_2S \times 9H_2O$, окиснювали H_2S у 2,5–2,9 і 1,9–3,1 разу менш ефективно, ніж неінкубовані.

Отже, за умови збільшення в 1,25–2,5 разу концентрації $Na_2S \times 9H_2O$ у середовищі та за впливу 2–3 мМ $K_2Cr_2O_7$ утилізація H_2S *Thiocapsa* sp. Ya-2003, *Lamprocystis* sp. Ya-2003 і *C. limicola* IMB K-8 сповільнюється. Пурпурові фототрофні сіркобактерії *Thiocapsa* sp. Ya-2003, вирощені у середовищах з 5–10 мМ $Na_2S \times 9H_2O$, за здатністю окиснювати гідроген сульфід виявилися чутливішими до 2–3 мМ $K_2Cr_2O_7$, порівняно із *C. limicola* IMB K-8 та *Lamprocystis* sp. Ya-2003. Утилізація H_2S клітинами цих штамів, інкубованими з 3 мМ $K_2Cr_2O_7$, значно знижувалася під час культивування у середовищі з вмістом $Na_2S \times 9H_2O$ понад 6 мМ.

Оскільки ріст і утилізація H_2S клітинами *C. limicola* IMB K-8 за впливу 3 мМ $K_2Cr_2O_7$ значно знижувалися, досліджували його вплив за цієї концентрації на синтез ендогенних вуглеводів клітинами цих бактерій, вирощеними у середовищах з різним вмістом $Na_2S \times 9H_2O$. Виявлено, що вміст внутрішньоклітинної глюкози і глікогену практично не залежать від початкової концентрації $Na_2S \times 9H_2O$ у середовищі культивування бактерій (рис. 2, А). Якщо у клітинах, вирощених у середовищі з 4 мМ $Na_2S \times 9H_2O$, вміст глюкози становив 7,9 мг/г сухої маси клітин (с. м. к.), то у клітинах, вирощених у середовищі з 10 мМ $Na_2S \times 9H_2O$, її вміст становив 11,0 мг/г с. м. к. Вміст глікогену зі зростанням концентрації $Na_2S \times 9H_2O$ у середовищі незначно зростає: від 44,1 мг/г с. м. к. у бактерій, вирощених у середовищі з 4 мМ $Na_2S \times 9H_2O$, до 62,7 мг/г с. м. к. у бактерій, вирощених у середовищі з 10 мМ $Na_2S \times 9H_2O$. За впливу $K_2Cr_2O_7$ вміст глюкози та глікогену в клітинах, вирощених у середовищі зі зростаючим вмістом $Na_2S \times 9H_2O$, незначно знижувався, порівняно з неінкубованими клітинами (рис. 2, Б). Вміст глюкози у клітинах, вирощених у середовищі з 4 мМ $Na_2S \times 9H_2O$, становив 6,9 мг/г с. м. к., а у клітинах, вирощених у середовищі з 10 мМ $Na_2S \times 9H_2O$, її вміст сягав 8,9 мг/г с. м. к. Вміст глікогену у бактерій, вирощених у середовищі з 4 мМ $Na_2S \times 9H_2O$, становив 38,1 мг/г с. м. к., а у бактерій, вирощених у середовищі з 10 мМ $Na_2S \times 9H_2O$, його рівень не перевищував 50,5 мг/г с. м. к.

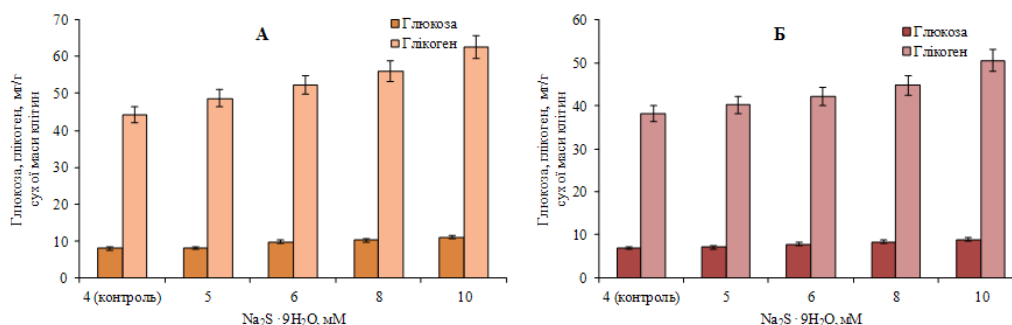


Рис. 2. Вміст внутрішньоклітинної глюкози та глікогену у *C. limicola* IMB K-8 без (А) і за впливу 3 мМ $K_2Cr_2O_7$ (Б) після 10 діб росту в середовищі з $Na_2S \times 9H_2O$ за різних концентрацій

Отже, інгібування росту *C. limicola* ІМВ К-8 йонами біхромату не супроводжується синтезом клітинами підвищених кількостей глікогену, очевидно, у зв'язку з блокуванням у них окремих ланок анаболізму вуглеводів. Вміст глюкози та глікогену в клітинах бактерій, інкубованих з 3 мМ $K_2Cr_2O_7$ та вирощених у середовищах зі зростаючим вмістом $Na_2S \times 9H_2O$, знижується на 11,1–20,0 % і 13,6–20,1 %, відповідно, порівняно з неінкубованими клітинами.

Вивчали вплив $K_2Cr_2O_7$ на нагромадження біомаси і сульфیدогенну активність *Desulfuromonas* sp. та *Desulfovibrio* sp. Для цього клітини інкубували впродовж години з розчином $K_2Cr_2O_7$ за різних концентрацій (0 (контроль); 0,5; 2,5; 3,5 мМ), відмивали і вирощували впродовж 10 діб у середовищі з сіркою або Na_2SO_4 (рис. 3). Встановлено, що зі зростанням концентрацій $K_2Cr_2O_7$ під час інкубації клітин нагромадження ними біомаси й утворення H_2S знижувалися. Клітини сірко- та сульфатвідновлювальних бактерій, не інкубовані з $K_2Cr_2O_7$, за 10 діб нагромаджували біомасу до 2,62 та 3,12 г/л, відповідно. Нагромадження біомаси клітинами, інкубованими з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ $K_2Cr_2O_7$, знижувалося на 20,2 і 16,3; 37,4 і 36,2; 50,8 і 47,4 %, відповідно (рис. 3, А, В). Якщо клітини, не інкубовані з $K_2Cr_2O_7$, за 10 діб утворювали до 1,69 і 2,49 мМ гідроген сульфід, відповідно, то клітини, інкубовані з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ $K_2Cr_2O_7$, утворювали в 1,3 і 1,1; 1,6 і 1,8; 2,0 і 2,2 рази, відповідно, менше H_2S , ніж не інкубовані (рис. 3, Б, Г). $K_2Cr_2O_7$ за концентрації 3,5 мМ у інкубаційній суміші виявився найтоксичнішим для бактерій усіх штамів, оскільки майже удвічі інгібував ріст *Desulfuromonas* sp. та *Desulfovibrio* sp. і рівень утворення ними H_2S .

Отже, йони біхромату за концентрації 3,5 мМ в інкубаційній суміші пригнічували ріст і сульфідогенну активність сірко- та сульфатвідновлювальних бактерій. Досліджені нами штами виявилися стійкими до $K_2Cr_2O_7$ за концентрацій 0,5–2,5 мМ у інкубаційній суміші, тому вони можуть бути перспективними для використання в технологіях ремедіації довкілля від сполук металів біологічними методами.

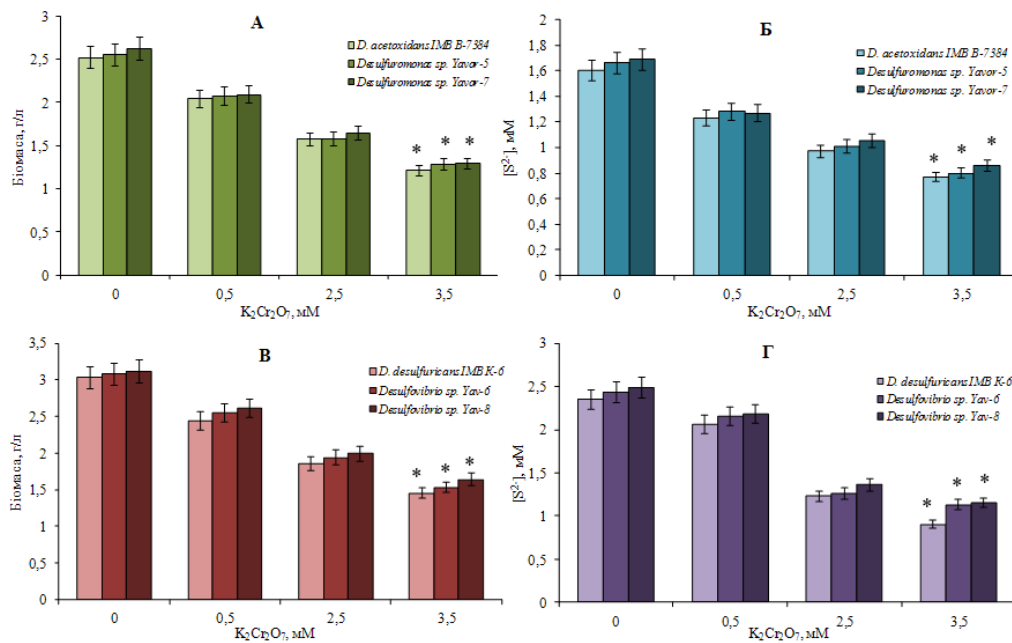


Рис. 3. Вплив $K_2Cr_2O_7$ на нагромадження біомаси (А, В) та утворення H_2S (Б, Г) *Desulfuromonas* sp. (А, Б) та *Desulfovibrio* sp. (В, Г) після 10 діб росту в середовищі з S^0 або Na_2SO_4 . * – $p \leq 0,05$

Відомо, що Cr (VI) та інші метали зі змінною валентністю (Fe (III), Mn (IV), U (VI), Tc (VII), Pd (II), V (V), Mo (VI), Cu (II) тощо) можуть бути використані сірко- та сульфат-відновлювальними бактеріями як акцептори електронів у процесі анаеробного дихання, що є одним із механізмів захисту клітин від їхньої токсичної дії [20, 22, 24]. Відновлення йонів металів мембранозв'язаними металоредуктазами здійснюється поза клітиною, що супроводжується вивільненням у середовище значної кількості електронів, тому бактерії з екзоелектрогенними властивостями розглядають як можливі анодні біокатализатори у мікробних паливних елементах [9, 16, 22]. За високих концентрацій йони перехідних металів дуже токсичні для живих організмів, тому ефективність біологічних методів очищення довкілля від забруднювачів залежить від стійкості відібраних штамів бактерій до сполук металів. Досліджували вплив $K_2Cr_2O_7$ за концентрацій, які у 0,5; 1 (контроль); 1,5; 2; 3 рази відрізнялися від вмісту сульфат-йонів у стандартному середовищі Кравцова-Сорокіна, на нагромадження біомаси сірко- та сульфатвідновлювальними бактеріями. Клітини вирощували в середовищах з цистеїном як джерелом сульфуру та калій бихроматом за концентрацій 1,74–10,41 мМ. Контрольним було середовище з цистеїном і фумаратом за аналогічних концентрацій. Відомо, що $C_4H_4O_4$ бактерії відновлюють до сукцинату у процесі фумаратного дихання за участю ланцюга транспортування електронів, у складі якого є низка дегідрогеназ і фумаратредуктаза, зв'язані між собою пулом цитохромів типу *b* і менахінонів [9]. У середовищі з $C_4H_4O_4$ не утворюється токсичний для клітин гідроген сульфід, а вихід біомаси майже такий, як у середовищі з елементною сіркою або йонами сульфату.

Встановлено, що *Desulfuromonas* sp. і *Desulfovibrio* sp. використовують йони бихромату як акцептор електронів за всіх його концентрацій у середовищі. Із зростанням концентрацій $K_2Cr_2O_7$ у середовищі культивування виявлено зниження рівня нагромадження біомаси клітинами усіх штамів (рис. 4, А–В, рис. 5, А–В). Найвищу біомасу бактерії нагромаджували на 8–10 добу в середовищі з найнижчою концентрацією $Cr_2O_7^{2-}$ – 1,74 мМ (до 1,52 і 1,55 г/л, відповідно), і найнижчу – з найвищою – 10,41 мМ (до 1,28 і 1,29 г/л, відповідно), що можна пояснити токсичним впливом $Cr_2O_7^{2-}$ на клітини бактерій. На відміну від росту бактерій у середовищі з $K_2Cr_2O_7$, зі зростанням концентрацій фумарату в середовищі культивування від 1,74 до 3,47 мМ спостерігали зростання нагромадження біомаси бактеріями усіх штамів, але найвищу біомасу (до 2,54 і 2,57 г/л, відповідно) бактерії нагромаджували у середовищі з $C_4H_4O_4$ за концентрації 5,21 мМ (рис. 4, Г–Е; рис. 5, Г–Е). Із подальшим зростанням концентрацій $C_4H_4O_4$ у середовищі від 6,94 до 10,41 мМ біомаса знижувалася і не перевищувала 2,29 і 2,32 г/л, відповідно, можливо, у зв'язку з лімітуванням росту бактерій іншими факторами середовища. Хоча окисно-відновний потенціал у пари $Cr_2O_7^{2-}/Cr^{3+}$ ($E_0' = +1,33$ В) значно вищий, ніж у пари фумарат/сукцинат ($E_0' = +0,03$ В) [9], використання $K_2Cr_2O_7$ мікроорганізмами виявилось дуже сповільненим. За наявності в середовищі $K_2Cr_2O_7$ за концентрації 1,74 мМ біомаса бактерій була приблизно у півтора разу нижчою, ніж у середовищі з $C_4H_4O_4$ за цієї ж концентрації. Йони бихромату якісно виявляли в середовищі впродовж усього часу культивування бактерій усіх штамів, що свідчить про неповне їх використання клітинами у процесі анаеробного дихання, очевидно, у зв'язку з високою токсичністю для них $K_2Cr_2O_7$ за концентрацій 1,74–10,41 мМ.

Отже, сірко- і сульфатвідновлювальні бактерії використовують Cr (VI) у складі $Cr_2O_7^{2-}$ як акцептор електронів у процесі анаеробного дихання за концентрацій 1,74–10,41 мМ $K_2Cr_2O_7$ у середовищі. Із зростанням концентрації $K_2Cr_2O_7$ у середовищі інтенсивність росту бактерій знижується. Найвищу біомасу бактерії нагромаджують у середовищі з 1,74 мМ $K_2Cr_2O_7$, найнижчу – з 10,41 мМ калій бихромату у зв'язку з його токсичністю для бактерій. Виявлено майже у півтора разу нижчий вихід біомаси за використання бактерія-

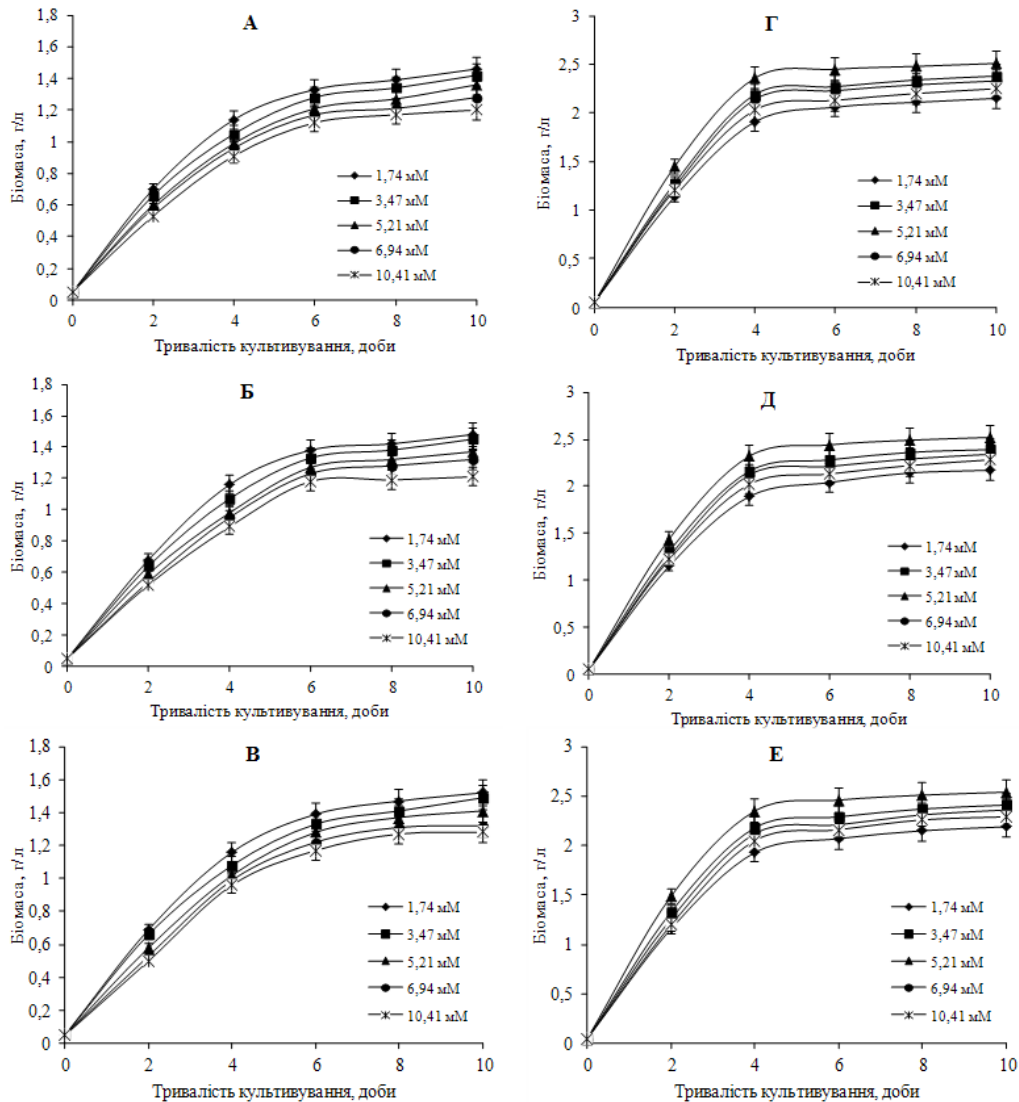


Рис. 4. Нагромадження біомаси *D. acetoxidans* IMB В-7384 (А, Г), *Desulfuromonas* sp. Yavor-5 (Б, Д), *Desulfuromonas* sp. Yavor-7 (В, Е) під час росту в середовищі з цистеїном і $K_2Cr_2O_7$ (А, Б, В) або $C_4H_4O_4$ (Г, Д, Е) за різних концентрацій

ми $K_2Cr_2O_7$, порівняно з використанням ними $C_4H_4O_4$ за концентрації 1,74 мМ акцепторів електронів у середовищі. Найінтенсивніший ріст у середовищі з $K_2Cr_2O_7$ та $C_4H_4O_4$ за всіх концентрацій виявили бактерії *Desulfuromonas* sp. Yavor-7 і *Desulfovibrio* sp. Yav-8. Найвищу біомасу вони нагромаджували у середовищі з 1,74 мМ $K_2Cr_2O_7$ (до 1,52 і 1,55 г/л, відповідно). За 10 днів росту всі досліджені бактерії повністю не відновили наявні у середовищі йони біхромату.

Незважаючи на те, що відновлення йонів біхромату за різних концентрацій у процесі анаеробного дихання бактеріями родів *Desulfuromonas* і *Desulfovibrio* відбувається з низькою інтенсивністю, у донних відкладах відновлення сполук шестивалентного хрому

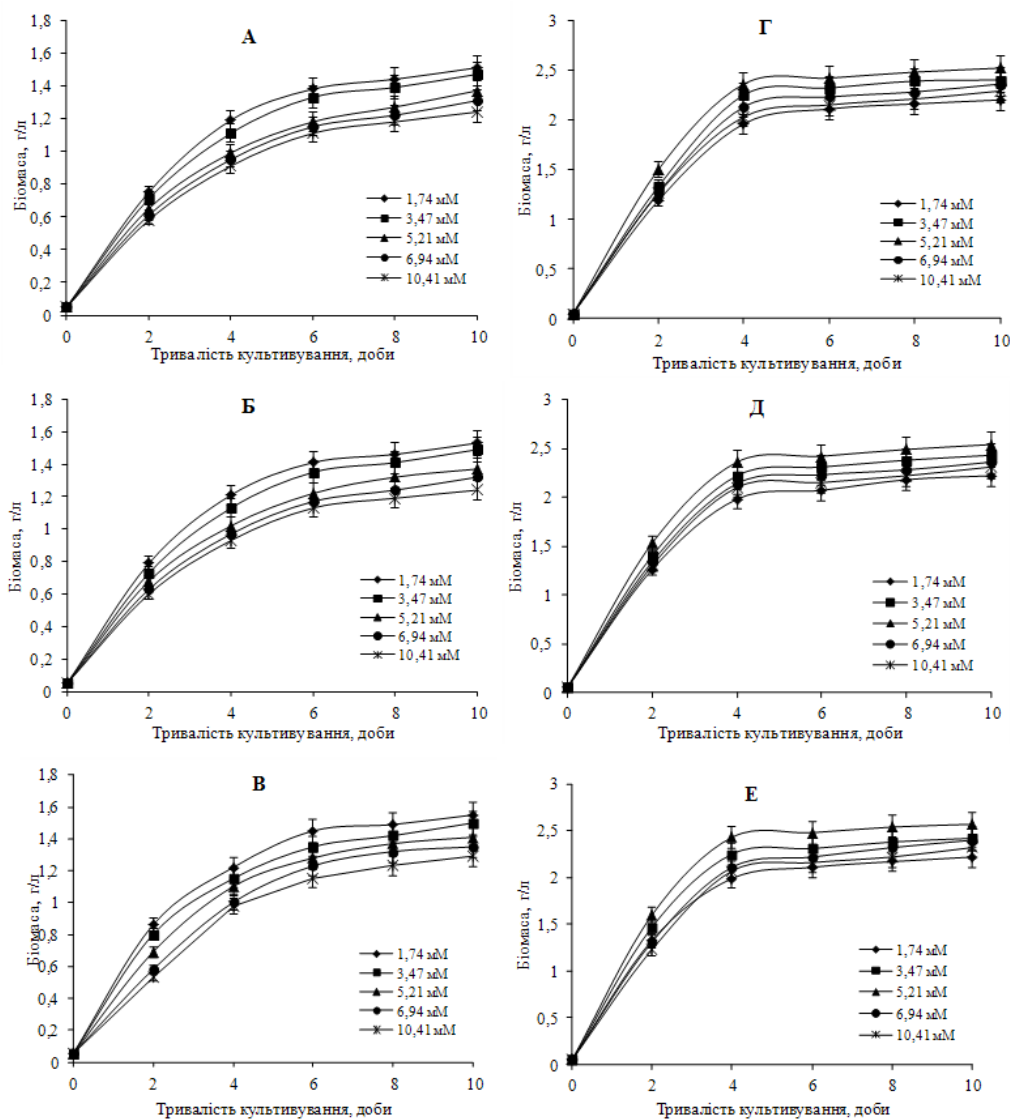


Рис. 5. Нагромадження біомаси *D. desulfuricans* IMB K-6 (А, Г), *Desulfovibrio* sp. Yav-6 (Б, Д) та *Desulfovibrio* sp. Yav-8 (В, Е) під час росту в середовищі з цистеїном і $K_2Cr_2O_7$ (А, Б, В) або S_4O_4 (Г, Д, Е) за різних концентрацій

мікроорганізмами відіграє важливу роль у процесі окиснення органічних субстратів [20, 22]. Сірко- та сульфатвідновлювальні бактерії, виділені з озера Яворівське, виявилися стійкими до йонів біхромату за концентрацій до 10,41 мМ у середовищі, тому вони можуть бути використані в технологіях очищення довкілля від токсичних сполук хрому. Вивчення фізіолого-біохімічних властивостей бактерій *Desulfuromonas* sp. Yavor-7 і *Desulfovibrio* sp. Yav-8, які нагромаджували найбільшу біомасу під час росту в середовищі з йонами біхромату за усіх концентрацій, порівняно з іншими штамами, перспективне для подальших досліджень з метою повнішого розкриття їхнього біотехнологічного потенціалу.

Отже, виявлено, що за впливу 2–3 мМ $K_2Cr_2O_7$ у інкубаційній суміші сповільнюються ріст і окиснення H_2S клітинами фототрофних сіркобактерій родів *Thiocapsa*, *Lamprocystis* і *Chlorobium* у середовищі з 4–10 мМ $Na_2S \times 9H_2O$. У клітинах *C. limicola* ІМВ К-8, інкубованих з 3 мМ $K_2Cr_2O_7$, знижується вміст глюкози та глікогену. Припускаємо, що йони біхромату, які потрапляють у клітину бактерій під час інкубації, виявляють негативний вплив на метаболічні перетворення у ній, зокрема, блокуючи аноксигенний фотосинтез, у процесі якого здійснюється детоксикація докільця від H_2S , та окремі ланки анаболізму вуглеводів. Йони біхромату за концентрації 3,5 мМ у інкубаційній суміші інгібують ріст і сульфیدогенну активність бактерій *Desulfuromonas* sp. та *Desulfovibrio* sp. Можливо, йони біхромату, проникаючи крізь клітинну мембрану бактерій і взаємодіючи з внутрішньоклітинними метаболітами, генерують хімічно активні радикали та хром (III) як кінцевий продукт, що спричиняє інгібування процесів сіркового або сульфатного дихання, наслідком яких є утворення H_2S і нагромадження біомаси. Сіркові та сульфатвідновлювальні бактерії з різною інтенсивністю використовують Cr (VI) у складі $Cr_2O_7^{2-}$ за концентрацій 1,74–10,41 мМ у середовищі як єдиний акцептор електронів у процесі анаеробного дихання. Завдяки екзоелектрогенним властивостям цих бактерій Cr (VI) відновлюється мембранозв'язаними металоредуктазами поза клітиною, що забезпечує їм стійкість до сполук шестивалентного хрому за концентрацій понад 10 мМ і здатність виживати у забруднених середовищах. Завдяки стійкості до $Cr_2O_7^{2-}$ за концентрацій до 2–2,5 мМ бактерії родів *Thiocapsa*, *Lamprocystis*, *Chlorobium*, *Desulfuromonas* і *Desulfovibrio*, виділені з озера Яворівське, які беруть участь у різних ланках метаболізму сполук сульфуру, можуть бути використані у технологіях, спрямованих на детоксикацію забруднених середовищ від гідроген сульфідів і біхроматів, оскільки біогенний гідроген сульфід взаємодіє з йонами металів з утворенням їхніх нерозчинних сульфідів, а його надлишок у освітленій зоні водойм утилізують фототрофні сіркові бактерії. У процесі дисиміляційної металоредукції бактерії родів *Desulfuromonas* і *Desulfovibrio* відновлюють Cr (VI) у складі йонів біхромату (до 10,41 мМ) і переводять його до менш токсичної форми (Cr (III) [8, 24]), що є незаперечною їхньою перевагою у практичному застосуванні.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гончар М. В. Чутливий метод кількісного визначення пероксиду водню та субстратів оксидаз у біологічних об'єктах // Укр. біохім. журнал. 1998. Т. 70. № 5. С. 157–163.
2. Горішний М., Гудзь С., Гнатуш С. Метаболізм глюкози та глікогену у клітинах зелених фотосинтезувальних сіркових бактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002 // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 46. С. 129–136.
3. Гудзь С. П., Гнатуш С. О., Яворська Г. В., Білінська І. С., Борсукевич Б. М. Практикум з мікробіології: підручник. Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2014. 436 с.
4. Деркач М. П., Гумецький Р. Я., Чабан М. Є. Курс варіаційної статистики. К.: Вища школа, 1977. 208 с.
5. Кім Л. Я., Гудзь С. П. Пурпурові сіркобактерії з водойм Яворівського родовища сірки // Мікробіол. журнал. 2007. Т. 69. № 1. С. 12–19.
6. Мороз О. М. Закономірності утворення сірководню сульфатвідновлювальними бактеріями водойми кар'єру Яворівського сіркового родовища // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. біол. 2010. Вип. 27. С. 56–63.
7. Мороз О. М., Перетятко Т. Б., Клим І. Р. та ін. Сірковідновлювальні бактерії озера Яворівське: деякі морфологічні, культуральні і фізіологічні особливості // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. біол. 2013. Вип. 35. С. 34–41.

8. Перетятко Т., Гудзь С. Відновлення сполук шестивалентного хрому сульфатвідновлювальними бактеріями // Біологічні студії / *Studia biologica*. 2010. Т. 4. № 2. С. 53–62.
9. Современная микробиология. Прокариоты / ред. Й. Ленгелер, Г. Древе, Г. Шлегель; пер. с англ. М.: Мир, 2005. Т. 1. 654 с.
10. Свідоцтво про депонування асоціації сульфатвідновлювальних бактерій Ya-11 (*Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 і *Pseudomonas* sp.) / Т.Б. Перетятко, А.А. Галушка, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш. Реєстр. ном. ІМВ К-6 від 21.01.09.
11. Свідоцтво про депонування консорції бактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002 і *Pseudomonas* sp / М.Б. Горішний, С.О. Гнатуш, О.М. Мороз, О.В. Левицька, С.П. Гудзь. Реєстр. ном. ІМВ К-8 від 02.11.10.
12. Свідоцтво про депонування штаму бактерій *Desulfuromonas acetoxidans* Ya-2006 / С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш, О.М. Мороз, Т.Б. Перетятко, О.М. Василів. Реєстр. ном. ІМВ В-7384 від 10.04.13.
13. Таширев А. Б. Взаимодействие микроорганизмов с металлами // Микробиол. журнал. 1995. Т. 57. № 2. С. 95–104.
14. Aguilar-Barajas E., Diaz-Perez C., Ramirez-Diaz M. I. et al. Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions // *Biometals*. 2011. Vol. 24. P. 687–707.
15. Belchik S. M., Kennedy D. W., Dohnalkova A. C. et al. Extracellular reduction of hexavalent chromium by cytochromes MtrC and OmcA of *Shewanella oneidensis* MR-1 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. Vol. 77. P. 4035–4041.
16. Bilyy O. I., Vasylyv O. M., Hnatysh S. O. The anode biocatalyst with simultaneous transition metals pollution control. Technology and Application of Microbial Fuel Cells. Rijeka, Croatia: InTech, 2014. 96 p.
17. Caballero-Flores G. G., Costa-Navarrete Y. M., Ramirez-Diaz M. I. et al. Chromate-resistance genes in plasmids from antibiotic-resistant nosocomial enterobacterial isolates // *FEMS Microbiol. Lett.* 2012. Vol. 327. P. 148–154.
18. Caumet P. Ecology and general physiology of anoxygenic phototrophic bacteria in benthic environments. In: *Microbial mats: physiological ecology of benthic microbial communities* / X. Coren and E. Rosenberg Eds. Washington: American Soc. for Microbiology, 2003. P. 383–404.
19. Fonseca B. M., Paquete C. M., Neto S. E. et al. Mind the gap: cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1 // *Biochem. J.* 2013. Vol. 449. N 1. P. 101–108.
20. Gescher J., Kappler A. Microbial metal respiration: from geochemistry to potential applications. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. Vol. 8. 236 p.
21. Harris D. C. Quantitative Chemical Analysis. 6-th ed. 2003. 928 p.
22. Richter K., Schicklberger M., Gescher J. Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. Vol. 78. N 4. P. 913–921.
23. Sobol Z., Schiestl R. H. Intracellular and extracellular factors influencing Cr (VI) and Cr (III) genotoxicity // *Environ. Mol. Mutagen.* 2012. Vol. 53. P. 94–100.
24. Viti C., Marchi E., Decorosi F., Giovannetti L. Molecular mechanisms of Cr (VI) resistance in bacteria and fungi // *FEMS Microbiol. Rev.* 2014. Vol. 38. N 4. P. 633–659.

Стаття: надійшла до редакції 02.09.16

доопрацьована 23.12.16

прийнята до друку 12.01.17

POTASSIUM DICHROMATE INFLUENCE ON SOME PHYSIOLOGICAL PECULIARITIES OF SULFUR CYCLE BACTERIA FROM YAVORIVSKE LAKE

O. Moroz, S. Hnatush, Ch. Bohoslavets, G. Yavorska, G. Zvir, B. Borsukevych

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

It was established that under the influence of 2–3 mM $K_2Cr_2O_7$ in incubation mixture biomass accumulation and hydrogen sulfide oxidation by *Thiocapsa* sp. Ya-2003, *Lamprocystis* sp. Ya-2003 and *Chlorobium limicola* IMV K-8 in van Niel medium with 4–10 mM $Na_2S \times 9H_2O$ are slow down. In cells of *C. limicola* IMV K-8, incubated with 3 mM $K_2Cr_2O_7$, up to 20 % decreased content of glucose and glycogen. $K_2Cr_2O_7$ at concentration of 3.5 mM in incubation mixture approximately twice inhibited biomass accumulation and sulfidogenic activity of *Desulfuromonas acetoxidans* IMV V-7384, *Desulfuromonas* sp. Yavor-5, *Desulfuromonas* sp. Yavor-7, *Desulfovibrio desulfuricans* IMV K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-8. Investigated bacteria with different intensity used Cr (VI) as sole electron acceptor in process of anaerobic respiration at concentrations of 1.74–10.41 mM of $K_2Cr_2O_7$ in Kravtsov-Sorokin medium. Highest biomass bacteria *Desulfuromonas* sp. Yavor-7 and *Desulfovibrio* sp. Yav-8 accumulated in medium with 1.74 mM $K_2Cr_2O_7$ (up to 1.52 and 1.55 g/l, accordingly), which revealed approximately at 1.5 fold lower than in medium with fumarate at same concentration. Owing to $K_2Cr_2O_7$ resistance bacteria of *Thiocapsa*, *Lamprocystis*, *Chlorobium*, *Desulfuromonas* and *Desulfovibrio* genera, isolated from Yavorivske Lake, may be used in technologies, directed on environment detoxication from hydrogen sulfide and hexavalent chromium compounds.

Keywords: phototrophic sulfur bacteria, sulfur and sulfate reducing bacteria, hydrogen sulfide, dichromate ions