

## УТВОРЕННЯ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ СІРКОВІДНОВЛЮВАЛЬНИМИ БАКТЕРІЯМИ ЗА ВПЛИВУ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

О. Мороз

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

Показано, що сірковідновлювальні бактерії у середовищі Кравцова-Сорокіна з сіркою синтезують у півтора разу менше гідроген сульфід, ніж сульфатвідновлювальні бактерії в аналогічному середовищі зі сульфатами. Сірковідновлювальні бактерії порівняно із сульфатвідновлювальними бактеріями виявилися більш стійкими до високих концентрацій солей важких металів. Найбільш токсичними для сірковідновлювальних бактерій є іони свинцю, нікелю, кобальту і кадмію. Продемонстровано, що підвищення інтенсивності процесу дисиміляційної сіркоредакції в результаті збільшення у середовищі концентрації донора електронів цього процесу, а також густини засіву клітин сприяє підвищенню ефективності зв'язування іонів важких металів гідроген сульфідом, утвореним бактеріями. За наявності у середовищі 2 мМ  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  та  $Cu^{2+}$  вони повністю зв'язуються гідроген сульфідом у вигляді нерозчинних сульфідів. Доведено, що сірковідновлювальні бактерії перспективні для використання у біотехнологіях очищення стічних вод, збагачених органічними сполуками, від гідроген сульфід та важких металів.

*Ключові слова:* сірковідновлювальні бактерії, дисиміляційна сіркоредакція, гідроген сульфід, важкі метали.

Сірковідновлювальні бактерії, представники роду *Desulfuromonas*, здійснюють дисиміляційне відновлення сульфур, а також сполук, що містять полі- або дисульфідні зв'язки (полісульфід, цистин, окиснений глутатіон) до гідроген сульфід, окиснюючи при цьому органічні субстрати (етанол, ацетат, пропанол, піруват, лактат, пропіонат, вищі жирні кислоти, глутамат) до  $CO_2$  і  $H_2O$  [20]. Утворений бактеріями гідроген сульфід пригнічує процеси анаеробного дихання у мікроорганізмів; механізм його дії полягає у пошкодженні метало- та дисульфідвмісних білків [1, 12]. Гідроген сульфід порушує мітохондріальне дихання у еукаріот у зв'язку з деполіаризацією мітохондріальних мембран або інгібуванням цитохромоксидази – ключового ферменту дихального ланцюга [13].

Загочлені кар'єри та стоки промислових підприємств поряд із гідроген сульфідом, сульфатами та іншими агресивними сполуками сульфур містять великі кількості важких металів, радіонуклідів, а також їхніх сполук [6]. Залежно від концентрації важкі метали можуть впливати на мікроорганізми як стимулятори (невисокі концентрації, стимулюють метаболізм у зв'язку з порушенням бар'єрної функції мембрани і збільшенням надходження поживних речовин у клітину), помірні інгібітори або виявляють токсичну дію. Нестача металів у середовищі є причиною порушення функціонування ферментних систем, до складу яких входять металоферменти, тоді як їх надлишок призводить до витіснення або заміщення необхідних іонів з активних центрів ферментів, зв'язування з функціональними групами (наприклад, із гідроксильними, карбоксильними, фосфатними, аміногрупами, сульфгідрильними групами) багатьох важливих клітинних метаболітів, блокування транспортних систем, модифікації активної конформації та денатурації білкових молекул

і нуклеїнових кислот, зміни поверхневого заряду й електрофізіологічних властивостей плазматичної мембрани, руйнування поверхневих структур клітинної стінки, інгібування реплікації ДНК, синтезу РНК, білка, рибофлавіну, вітаміну В<sub>12</sub>, пригнічення дихання, порушення функції цитоплазми, процесів фотосинтезу й азотфіксації [2, 6].

Зв'язування металів біомасою мікроорганізмів буває активним (воно відоме як біоаккумуляція та залежить від метаболічної активності клітин) і пасивним (воно відоме як сорбція (біосорбція), або комплексація, і відбувається в основному на рівні мембрани клітини) [15]. Крім акумуляції та сорбції, існують інші види взаємодії мікроорганізмів з металами: мобілізація, утворення летких сполук та іммобілізація, наприклад, осадження сполук металів у формі нерозчинних сульфідів [6, 18]. Сульфіди металів нетоксичні, можуть бути легко видалені з розчину. Існує досвід промислового використання подібних осадів для виділення металів [10]. Дисиміляційні металовідновлювальні бактерії, до яких належать сірководновлювальні бактерії, можуть ферментативно відновлювати Fe (III), U (VI), Cr (VI), Mn (IV), Tc (VI), Pd (II) та ін. і при цьому переводити їх у менш токсичні малорозчинні форми [17]. Утворення сульфідів металів – це основний шлях, за допомогою якого сірководновлювальні бактерії усувають важкі метали з водного доквілля, тому ці бактерії є перспективними для використання в технологічних схемах очищення стічних вод від гідроген сульфідів і важких металів [18].

Вивчення біогенезу гідроген сульфідів сірководновлювальними бактеріями у техногенних водоймах на території Прикарпатського сірководобувного регіону, забруднених токсичними сполуками сульфуру та важкими металами, важливе для розробки ефективних і рентабельних біологічних шляхів регулювання рівня небезпечних забруднювачів доквілля. Метою роботи було дослідити умови утворення максимальної кількості гідроген сульфідів сірководновлювальними бактеріями, виділеними з води Яворівського озера, і оцінити ефективність їх потенційного використання у біотехнологічних процесах очищення вод, збагачених органічними сполуками, від гідроген сульфідів та важких металів.

#### Матеріали та методи

Об'єктом досліджень були сірководновлювальні бактерії *Desulfuromonas acetoxidans* Yavor-12, *Desulfuromonas* sp. Yavor-5, *Desulfuromonas* sp. Yavor-7, сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6. Штами виділені з води Яворівського озера, ідентифіковані і зберігаються в колекції кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка [5, 9].

Клітини сірководновлювальних бактерій вирощували у середовищі Кравцова-Сорокіна [3] без солі заліза (II) у формі FeCl<sub>2</sub> × 4 H<sub>2</sub>O та без сульфатів такого складу (г/л): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O – 0,84; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,5; NH<sub>4</sub>Cl – 0,16; MgCl<sub>2</sub> × 6 H<sub>2</sub>O – 0,1; C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Na – 2,0. Суху сірку стерилізували при 0,5 атм, у середовище вносили не менш ніж 0,1 г/л (3,5 мМ). Сульфатвідновлювальні бактерії вирощували у середовищі Кравцова-Сорокіна без солі Мора такого складу (г/л): Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> × 10 H<sub>2</sub>O – 0,5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O – 0,84; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,5; NH<sub>4</sub>Cl – 0,16; MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O – 0,1; C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Na – 2,0. Перед висівом у середовище вносили 0,05 мл стерильного розчину Na<sub>2</sub>S × 9 H<sub>2</sub>O (1%), для доведення рН середовища до 7,2 використовували стерильний 10 н розчин NaOH. Бактерії вирощували за анаеробних умов упродовж 10 діб у пробірках, об'ємом 25 мл, доверху заповнених середовищем і щільно закритих гумовими корками, в атмосфері аргону при 30°C.

Для перевірки здатності сірко- і сульфатвідновлювальних бактерій відновлювати елементну сірку та сульфати до гідроген сульфідів клітини вносили в середовище у кількості 10% (об'ємна частка) до початкової концентрації 10<sup>8</sup> КУО/мл. На 2, 5 та 10-ту доби культивування визначали біомасу. Клітини осаджували при 6000 об/хв впродовж 15 хв, відділяли, а у супернатанті визначали вміст гідроген сульфідів.

Біомасу визначали за мутністю суспензії клітин шляхом її фотометрування на фотоелектроколометрі КФК-3 при 340 нм, у кюветі з оптичним шляхом 3 мм і розраховували за формулою:  $C, \text{ г/л} = (E_{340} \times n) / K$ , де  $E$  – екстинкція при 340 нм;  $n$  – фактор розведення;  $K$  – коефіцієнт перерахунку, отриманий за калібрувальною кривою залежності екстинкції від маси сухих клітин, визначеної ваговим методом, рівний 0,72 і 0,19 для сірко- та сульфатвідновлювальних сіркобактерій, відповідно.

Концентрацію гідроген сульфід у культуральній рідині, відокремленій від клітин центрифугуванням при 6 тис. об/хв впродовж 15 хв, визначали спектрофотометричним методом, основою якого є реакція взаємодії  $n$ -аміно-диметиланіліну ( $N, N$ -диметил- $n$ -феніламіні дигідрохлориду) та гідроген сульфід утворенням метиленою сині [21].

Для дослідження впливу різних концентрацій лактату на утворення гідроген сульфід сірковідновлювальні бактерії висівали у середовище Кравцова-Сорокіна без сульфатів зі сіркою, у якому вміст лактату натрію було збільшено у чотири (8 г/л), шість (12 г/л), вісім (16 г/л), десять (20 г/л), одинадцять разів (22 г/л) порівняно із його стандартним вмістом у середовищі (2 г/л). Початкова концентрація клітин –  $10^8$  КУО/мл. На 2, 5, 10-ту доби росту визначали біомасу та вміст гідроген сульфід.

З метою визначення впливу різної кількості клітин при засіві на сіркоредакцію для засіву використовували біомасу густиною 0,5, 1, 2, 3 г/л (контроль: 0,05 г/л). На 2, 5 та 10-ту доби культивування визначали біомасу та вміст гідроген сульфід.

Для визначення мінімальних інгібуючих рід концентрацій солей важких металів сульфат- і сірковідновлювальні бактерії осаджували центрифугуванням (центрифуга ОС-6М) впродовж 20 хв при 6 тис. об/хв, ресуспендували у стерильному розчині NaCl (0,9%) та за стерильних умов інкубували впродовж 1 год із різними об'ємами стерильних 1 М водних розчинів  $Pb(NO_3)_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $NiCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $FeCl_2 \times 4 H_2O$ ,  $CdCl_2 \times H_2O$ ,  $MgCl_2 \times 6 H_2O$ ,  $CuCl_2$  за концентрацій у інкубаційній суміші 0 (контроль); 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4 мМ, осаджували центрифугуванням впродовж 20 хв при 6 тис. об/хв, двічі відмивали стерильним фізіологічним розчином і висівали у пробірки об'ємом 25 мл, доверху заповнювали середовищем зі сульфатами чи сіркою і щільно закривали гумовими корками. Культивували при 30°C за початкової концентрації клітин  $10^8$  КУО/мл. Після 10 діб росту визначали біомасу.

Для визначення впливу солей важких металів на ріст і рівень утворення гідроген сульфід сірковідновлювальними бактеріями клітини осаджували центрифугуванням впродовж 20 хв при 6 тис. об/хв, ресуспендували у стерильному розчині NaCl (0,9%), за стерильних умов інкубували впродовж 1 год зі стерильними розчинами  $Pb(NO_3)_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $NiCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $FeCl_2 \times 4 H_2O$ ,  $CdCl_2 \times H_2O$ ,  $MgCl_2 \times 6 H_2O$ ,  $CuCl_2$  за концентрацій 0 (контроль); 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4 мМ, осаджували центрифугуванням впродовж 20 хв при 6 тис. об/хв, двічі відмивали стерильним розчином NaCl (0,9%) і висівали у середовища стандартного або оптимізованого складу (густина засіву – 0,05 чи 3 г/л), після 10 діб росту визначали біомасу і вміст гідроген сульфід у культуральній рідині. Визначали рівень зв'язування  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  та  $Cu^{2+}$  продукованим клітинами сірковідновлювальних бактерій гідроген сульфідом. Для цього бактерії вирощували впродовж 10 діб у середовищах стандартного чи оптимізованого складу зі солями важких металів:  $Pb(NO_3)_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $NiCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $FeCl_2 \times 4 H_2O$ ,  $CdCl_2 \times H_2O$ ,  $MgCl_2 \times 6 H_2O$ ,  $CuCl_2$  за концентрацій 0 (контроль); 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4 мМ. Для засіву використовували суспензію добової культури мікроорганізмів концентрацією 0,05 г/л, що становить близько  $10^8$  КУО/мл, або в окремих експериментах (культивування за оптимізованих умов) – 3 г/л. Після 10-ї доби росту визначали біомасу. Суміш клітин і сульфідів металів осаджували центрифугуванням впродовж 20 хв при 6 тис.

об/хв, у культуральній рідині визначали якісно наявність катіонів металів [4] і кількісно вміст гідроген сульфід, сумарну концентрацію якого розраховували як суму концентрацій вільного гідроген сульфід та зв'язаного у формі металосульфід (MeS). Вміст металосульфідів визначали ваговим методом, для цього суміш клітин і MeS зважували, масу сульфід металу вираховували як різницю між масою суміші та сухих клітин (вирощених після інкубації зі сіллю металу) і компонентів середовища. Відносну концентрацію (%) зв'язаного гідроген сульфідом катіону металу розраховували, виходячи зі співвідношення молярних концентрацій утвореного металосульфід й іона металу, внесеного до середовища на початку культивування бактерій, приймаючи її за 100%.

Статистичну обробку результатів проводили загальноприйнятими методами з використанням програми "Microsoft Excel 2003". Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками альтернативних сукупностей даних обраховували коефіцієнт Стьюдента, достовірною вважалася різниця при рівні значимості  $p \leq 0,05$ .

### Результати і їхнє обговорення

Як і сульфатвідновлювальні бактерії, сірководновлювальні бактерії як продуценти гідроген сульфід є перспективними для застосування у біотехнологіях очищення стічних вод, які містять органічні сполуки у поєднанні з агресивними для довкілля сполуками сульфур, від важких металів [8]. Однак закономірності дисиміляційної сіркоредакції, а також чутливість сірководновлювальних бактерій до важких металів залишаються маловивченими.

При рості у середовищі Кравцова-Сорокіна сірководновлювальні бактерії *D. acetoxidans* Yavor-12 нагромаджують майже таку ж біомасу, як і сульфатвідновлювальні бактерії *D. desulfuricans* IMB K-6 (2,97 та 3,01 г/л на 10 добу відповідно), але рівень утворення ними гідроген сульфід виявився у півтора разу нижчим, ніж сульфатвідновлювальними бактеріями (рис. 1), що, можливо, пов'язано з особливостями метаболізму *D. acetoxidans* Yavor-12, зокрема, з нижчою розчинністю сірки у середовищі порівняно зі сульфатами. Елементна сірка малорозчинна у воді, тонкодисперсна елементна сірка з водою утворює колоїдний розчин [11, 16]. У водному середовищі сірка також може перебувати у гідрофільній формі, наприклад, у формі політіонатів ( $O_3S-S_n-SO_3$ ) [16] або у вигляді полісульфідів, які утворюються при розчиненні елементної сірки у водному розчині сульфід [11, 16]. Колоїдна або розчинна сірка є субстратом для полісульфідредуктази – ключового ферменту сіркового дихання [11, 19]. Донором електронів процесів сульфат- і сіркоредакції є органічні сполуки, зокрема, лактат натрію, метаболізм якого у досліджуваних бактерій відмінний: неповне окиснення лактату з утворенням ацетату і  $CO_2$  у сульфатвідновлювальних бактерій і повне його окиснення з утворенням  $CO_2$  у сірководновлювальних бактерій, що є причиною утворення різної кількості відновних еквівалентів [7]. Рівень утворення гідроген сульфід під час росту бактерій у середовищі Кравцова-Сорокіна, яке містить однакову кількість сульфат-іонів чи сірки (3,5 мМ), можливо, залежить від окисно-відновного потенціалу акцептора електронів, який вищий у окисно-відновної пари  $HSO_3^- / HS^-$  ( $E_0' = -0,12$  В) і нижчий у  $S^0 / HS^-$  ( $E_0' = -0,27$  В) [7]. Використання акцепторів електронів з вищим окисно-відновним потенціалом дає бактеріям змогу здійснювати анаеробне дихання із запасанням більшої кількості енергії у вигляді електрохімічного протонного потенціалу і в результаті реакцій електронтранспортного фосфорилування отримувати вищий вихід АТФ.

Раніше нами з водойми Яворівського сіркового родовища виділено 10 чистих культур сірководновлювальних бактерій, які за морфологічними, культуральними та фізіологічними особливостями віднесено до роду *Desulfuromonas* [9]. Штами *Desulfuromonas* sp. Yavor-5 та *Desulfuromonas* sp. Yavor-7 виявилися найбільш активними продуцентами гідроген

сульфіду. За 10 діб росту клітини штампів *D. acetoxidans* Yavor-12, *Desulfuromonas* sp. Yavor-5 та *Desulfuromonas* sp. Yavor-7 нагромаджували майже однакову біомасу (2,98; 2,91 та 3,05 г/л відповідно). За цей час клітини штаму *D. acetoxidans* Yavor-12 утворювали 1,65 мМ гідроген сульфід, а штампів *Desulfuromonas* sp. Yavor-5 та *Desulfuromonas* sp. Yavor-7 – у 1,1 і 1,2 разу більше: до 2,06 мМ (рис. 2).

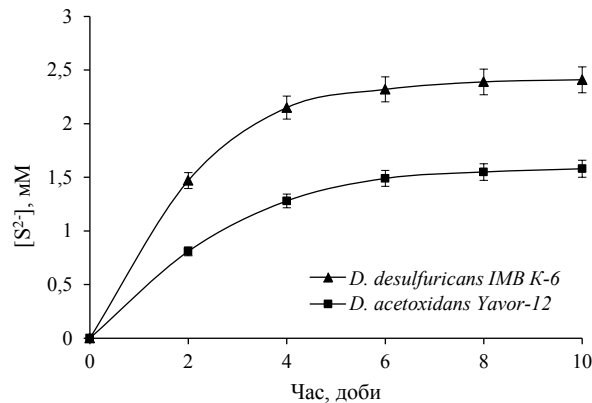


Рис. 1. Утворення гідроген сульфід сульфат- і сірководновловальними бактеріями під час росту в середовищі зі сульфатами або сіркою.

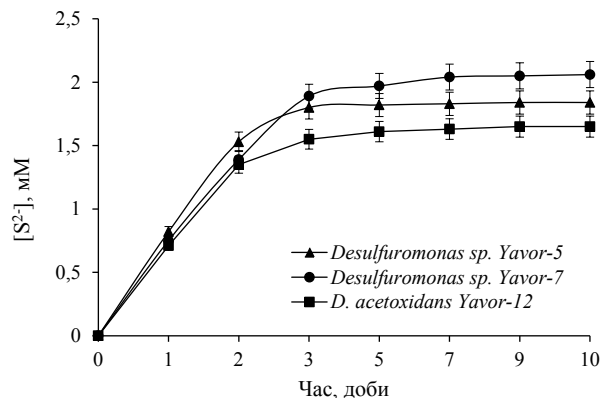


Рис. 2. Утворення гідроген сульфід сірководновловальними бактеріями під час росту в середовищі зі сіркою.

Збільшення вмісту лактату натрію у середовищі – у чотири (8 г/л), шість (12 г/л), вісім (16 г/л), десять (20 г/л), одинадцять разів (22 г/л) порівняно із його стандартним вмістом у середовищі (2 г/л) стимулювало процес сіркоредакції, здійснюваний сірководновловальними бактеріями (рис. 3), однак не пропорційно до зростання вмісту лактату в середовищі. Найбільша кількість гідроген сульфід (2,49 мМ) та біомаса (3,16 г/л) виявлені при культивуванні *D. acetoxidans* Yavor-12 у середовищі, яке містило 12 г/л лактату натрію. Подальше підвищення концентрації лактату натрію до 16, 20 та 22 г/л у середовищі культивування не сприяло збільшенню вмісту гідроген сульфід та росту сірководновловальних бактерій. Хоча збільшення вмісту донора електронів сіркоредакції призводило до підвищення кількості утвореного бактеріями гідроген сульфід, це підвищення було незначним, можливо, у зв'язку з токсичністю гідроген сульфід для бактерій.

При збільшенні кількості клітин при засіві у 10, 20, 40 і 60 разів спостерігали вищий вихід біомаси та вищий рівень утвореного клітинами гідроген сульфіду (рис. 4). Найбільшу кількість гідроген сульфіду (2,63 мМ) виявлено у середовищі, де початкова концентрація клітин становила 3 г/л, що майже у 1,5 разу більше, ніж у контрольному варіанті.

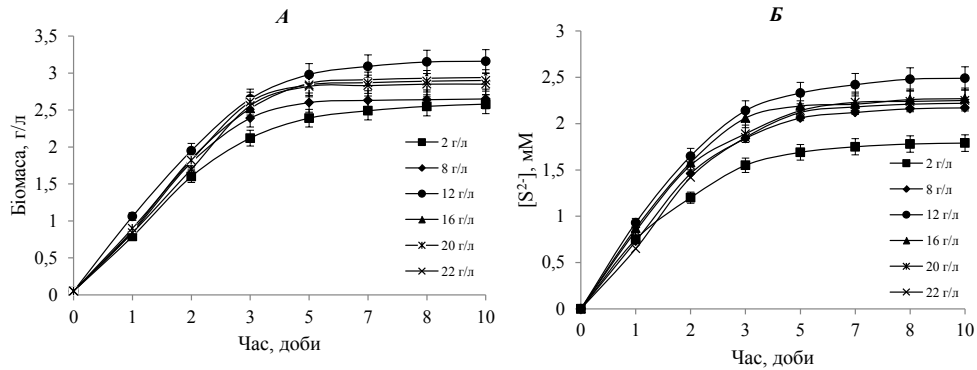


Рис. 3. Біомаса (А) та утворення гідроген сульфіду (Б) *D. acetoxidans* Yavor-12 під час росту в середовищі з різними концентраціями лактату натрію.

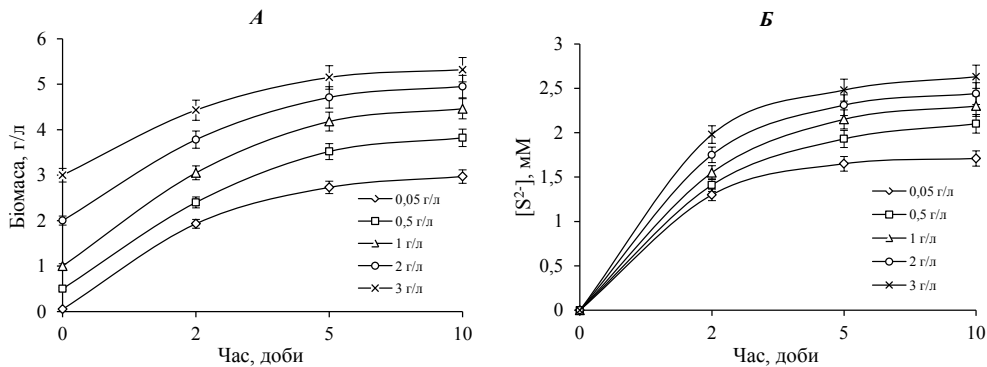


Рис. 4. Біомаса (А) та утворення гідроген сульфіду (Б) *D. acetoxidans* Yavor-12 під час росту в середовищі з різною кількістю клітин при засіві.

За оптимізованих умов культивування (середовище зі збільшеним у шість разів вмістом лактату натрію, густина засіву – 3 г/л) спостерігали підвищення інтенсивності процесу дисиміляційної сіркоредакції у сірквідновлювальних бактерій (рис. 5). Найвищу біомасу (5,55 г/л) і найбільшу кількість гідроген сульфіду (3,25 мМ) порівняно з іншими досліджуваними штамми нагромаджували клітини *Desulfuromonas* sp. Yavor-7.

Токсичність іонів важких металів та гідроген сульфіду за високих концентрацій є значною перешкодою використання бактерій циклу сульфуру в очисних технологіях. Найчастіше достатньо п'яти хвилин для повного поглинання металів бактеріями, проте цей час може коливатися від кількох секунд до години після контакту з токсикантом [6, 15, 18]. Тому для вивчення впливу солей важких металів на ріст і рівень утворення гідроген сульфіду сульфат- і сірквідновлювальними бактеріями клітини інкубували впродовж 1 години зі солями важких металів за стерильних умов і культивували впродовж 10 діб у середовищі зі сульфат-іонами чи сіркою без іонів металів, щоб уникнути утворення у культуральній рідині їх нерозчинних сульфідів.



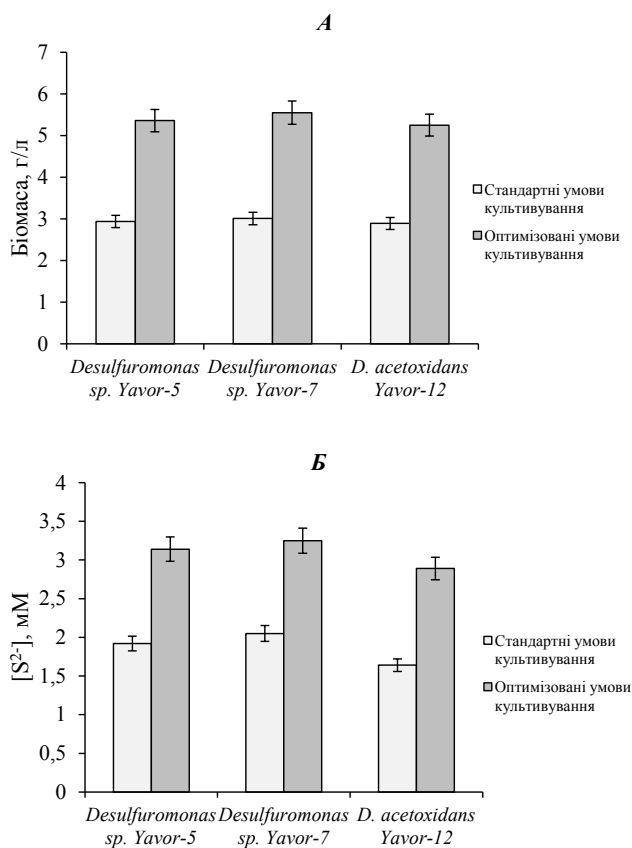


Рис. 5. Біомаса (А) та утворення гідроген сульфід (Б) сірководновловальними бактеріями після 10 діб росту за стандартних і оптимізованих умов культивування.

Соли важких металів за концентрацій 0,5–1,5 мМ не здійснювали значного негативного впливу на нагромадження біомаси *D. desulfuricans* ІМВ К-6 та *D. acetoxidans* Yavor-12. Встановлено мінімальні інгібуючі ріст концентрації солей важких металів для сульфатвідновлювальних і сірководновловальних бактерій:  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (2 і 3 мМ),  $\text{ZnCl}_2$  (3 і 4 мМ),  $\text{NiCl}_2$  (2 і 3 мМ),  $\text{CoCl}_2$  (2 і 3 мМ),  $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$  (3 і 3 мМ),  $\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$  (2 і 3 мМ),  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  (3 і 3 мМ),  $\text{CuCl}_2$  (3 і 4 мМ) (табл. 1). Як видно з отриманих результатів, штам *D. acetoxidans* Yavor-12 виявився більш стійким до високих концентрацій солей важких металів, ніж *D. desulfuricans* ІМВ К-6, що демонструє перевагу сірководновловальних бактерій порівняно зі сульфатвідновлювальними бактеріями у разі їх потенційного застосування у біотехнологіях очищення стічних вод від важких металів.

Взаємодія гідроген сульфід з іонами важких металів, результатом якої є утворення нерозчинних сульфідів металів, є основним способом усунення їх із середовища. Для вивчення рівня зв'язування іонів важких металів гідроген сульфідом, продукованим клітинами штаму *Desulfuromonas sp. Yavor-7*, бактерії вирощували в середовищі стандартного складу у присутності солей важких металів за концентрацій 0,5–4 мМ. Для засіву використовували суспензію добової культури мікроорганізмів, початкова концентрація клітин у середовищі становила 0,05 г/л. За впливу іонів усіх досліджуваних металів за концентрацій 2–4 мМ ріст бактерій

та утворення ними гідроген сульфідом значно пригнічувалися (табл. 2). Найбільш токсичними для сірководновловальних бактерій виявилися іони плюмбуму, нікелю, кобальту й кадмію. За наявності у середовищі 0,5–1,5 мМ іонів металів ефективність їхнього зв'язування гідроген сульфідом сягала 100%. Рівень зв'язування іонів металів, внесених на початку культивування за концентрації 2 мМ, утвореним бактеріями гідроген сульфідом не перевищував 82,5%, оскільки його кількості виявилася недостатньою для повної взаємодії з іонами металів.

Таблиця 1

Вплив солей важких металів на нагромадження біомаси сульфат- і сірководновловальними бактеріями після 10 діб росту в середовищі зі сульфатами або сіркою (г/л)

Штам	Концентрація солі, мМ	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	ZnCl <sub>2</sub>	NiCl <sub>2</sub>	CoCl <sub>2</sub>	FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	CdCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	CuCl <sub>2</sub>
<i>D. desulfuricans</i> ІМВ К-6	0	3,18±0,13	3,20±0,09	3,11±0,04	3,22±0,14	3,20±0,11	3,17±0,13	3,25±0,11	3,27±0,07
	2	1,34±0,11*	1,84±0,09	1,54±0,10*	1,41±0,04*	1,80±0,07	1,51±0,08*	1,83±0,06	1,86±0,02
	2,5	0,96±0,07*	1,69±0,15	1,42±0,04*	1,05±0,09*	1,60±0,11	1,14±0,12*	1,77±0,19	1,78±0,14
	3	0,86±0,09*	1,36±0,18*	1,28±0,09*	0,93±0,14*	1,31±0,08*	0,92±0,07*	1,21±0,12*	1,35±0,18*
	4	0,78±0,08*	1,16±0,05*	0,94±0,11*	0,84±0,08*	1,08±0,06*	0,85±0,12*	1,13±0,16*	1,18±0,09*
<i>D. acetoxidans</i> Yavor-12	0	3,04±0,04	2,95±0,07	3,08±0,11	2,98±0,06	3,04±0,12	3,08±0,15	2,99±0,13	3,07±0,04
	2	2,51±0,08	2,61±0,07	2,50±0,09	2,59±0,07	2,59±0,07	2,55±0,09	2,55±0,13	2,64±0,11
	2,5	2,28±0,07	2,38±0,10	2,25±0,08	2,34±0,08	2,31±0,08	2,32±0,07	2,44±0,17	2,33±0,17
	3	0,89±0,09*	1,94±0,04	0,98±0,05*	0,99±0,18*	1,52±0,16*	0,96±0,09*	1,25±0,11*	1,72±0,08
	4	0,84±0,04*	1,21±0,09*	0,91±0,04*	0,89±0,16*	1,14±0,07*	0,93±0,08*	1,14±0,08*	1,37±0,15*

Примітка. \* – p≤0,05.

За умов культивування клітин штаму *Desulfuromonas* sp. Yavor-7 у середовищі зі збільшеним у шість разів вмістом донора електронів сіркоредукції – лактату натрію, при густині засіву 3 г/л бактерії утворювали в 1,6 разу більше гідроген сульфідом, ніж за стандартних умов культивування (див. рис. 5). Припускали, що підвищення інтенсивності процесу дисиміляційної сіркоредукції у бактерій дасть змогу вилучити зі середовища більшу кількість іонів важких металів, осаджених у формі сульфідів. Бактерії вирощували у середовищі оптимізованого складу у присутності солей важких металів за концентрацій 2–3 мМ. Для засіву використовували суспензію добової культури мікроорганізмів концентрацією 3 г/л. За наявності у середовищі 2 мМ іонів важких металів ефективність їхнього зв'язування гідроген сульфідом виявилася рівною 100% (табл. 3). За концентрації іонів металів 2,5 мМ рівень зв'язування металів утвореним бактеріями гідроген сульфідом сягав 80,8–90,0%.

Таким чином, доведено, що підвищення інтенсивності процесу дисиміляційної сіркоредукції в результаті збільшення у середовищі концентрації донора електронів процесу, а також густини засіву клітин сприяє підвищенню ефективності зв'язування іонів важких металів утвореним бактеріями гідроген сульфідом. За наявності у середовищі 2 мМ Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> та Cu<sup>2+</sup> вони повністю зв'язуються утвореним сірководновловальними бактеріями гідроген сульфідом у вигляді нерозчинних сульфідів. Сірководновловальні бактерії перспективні для використання у технологіях, спрямованих на біоремедіацію забруднених органічними сполуками та важкими металами водних ресурсів.



Таблиця 2

Утворення гідроген сульфідів і сульфідів металів *Desulfurohalobium* sp. Уагов-7 після 10 діб  
росту в середовищі зі солями важких металів за стандартних умов культивування

Соли металів	Вміст солі, мм	[S <sup>2-</sup> ], мм	Біомаса, г/л	[MeS], мм	Рівень зв'язування металу, %	Якісний аналіз наявності катіонів	Соли металів	Вміст солі, мм	[S <sup>2-</sup> ], мм	Біомаса, г/л	[MeS], мм	Рівень зв'язування металу, %	Якісний аналіз наявності катіонів
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0	2,02±0,05	2,95±0,03	—	—	—		0	2,06±0,03	3,14±0,05	—	—	—
	2	1,39±0,05	2,45±0,07	1,37±0,01	68,5±0,1	+		2	1,56±0,03	2,64±0,08	1,54±0,03	77,0±0,2	+
	3	1,34±0,07	2,25±0,07	1,33±0,01	53,2±0,4	+	FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	2,5	1,38±0,07	2,42±0,03	1,37±0,09	54,8±0,2	+
	4	0,85±0,02*	1,37±0,02*	0,84±0,01	28,0±0,2	+		3	0,95±0,02*	1,54±0,05*	0,93±0,05	31,0±0,5	+
ZnCl <sub>2</sub>	0	0,81±0,03*	0,82±0,03*	0,80±0,01	20,0±0,4	+		4	0,88±0,02*	0,90±0,03*	0,87±0,04	21,8±0,2	+
	2	2,05±0,08	3,04±0,01	—	—	—		0	2,06±0,06	2,97±0,16	—	—	—
	3	1,67±0,04	2,65±0,03	1,65±0,07	82,5±0,5	+		2	1,42±0,07	2,65±0,07	1,42±0,01	71,0±0,3	+
	4	1,52±0,05	2,32±0,06	1,50±0,05	60,0±0,2	+	CdCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	2,5	1,32±0,09	2,31±0,06	1,31±0,03	52,4±0,2	+
NiCl <sub>2</sub>	0	1,17±0,04	1,88±0,06	1,15±0,06	38,3±0,3	+		3	0,92±0,01*	1,26±0,07*	0,90±0,06	30,0±0,4	+
	2	0,98±0,07*	1,09±0,05*	0,97±0,07	24,3±0,1	+		4	0,84±0,05*	0,73±0,04*	0,83±0,02	20,8±0,7	+
	3	2,03±0,07	2,99±0,01	—	—	—		0	2,10±0,07	2,75±0,03	—	—	—
	4	1,42±0,05	2,53±0,04	1,41±0,06	70,5±0,6	+		2	1,59±0,07	2,35±0,03	1,57±0,05	78,5±0,4	+
CoCl <sub>2</sub>	0	1,35±0,06	2,33±0,05	1,35±0,03	54,0±0,2	+		2,5	1,46±0,06	2,23±0,07	1,46±0,06	58,4±0,3	+
	2	0,95±0,08*	1,35±0,07*	0,93±0,07	31,0±0,3	+	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	3	0,98±0,06*	1,35±0,06*	0,97±0,04	32,3±0,5	+
	3	0,86±0,07*	0,89±0,09*	0,85±0,01	21,3±0,5	+		4	0,91±0,04*	0,95±0,07*	0,90±0,03	22,5±0,2	+
	4	2,08±0,07	2,82±0,01	—	—	—		0	2,09±0,01	2,85±0,09	—	—	—
CuCl <sub>2</sub>	0	1,41±0,06	2,51±0,03	1,40±0,08	70,0±0,3	+		2	1,65±0,06	2,45±0,15	1,64±0,06	82,0±0,2	+
	2	1,34±0,05	2,31±0,05	1,32±0,05	52,8±0,7	+		2,5	1,55±0,09	2,22±0,18	1,54±0,06	61,6±0,7	+
	3	0,96±0,07*	1,29±0,14*	0,94±0,03	31,3±0,5	+	CuCl <sub>2</sub>	3	1,24±0,07*	1,30±0,02*	1,24±0,02	41,3±0,2	+
	4	0,89±0,07*	0,83±0,12*	0,89±0,05	22,3±0,7	+		4	0,98±0,04*	0,97±0,06*	0,97±0,05	24,3±0,8	+

Примітки. \* – p≤0,05; “+” – наявність іона металу; “-” – відсутність іона металу.

Таблиця 3

Утворення гідроген сульфідів і сульфідів металів *Desulfuromonas* sp. Yavor-7 після 10 діб росту в середовищі зі солями важких металів за оптимізованих умов культивування

Соли металів	Вміст солі, мМ	[S <sup>2-</sup> ], мМ	Біомаса, г/л	[MeS], мМ	Рівень зв'язування металу, %	Якісний аналіз наявності катіонів
Контроль	0	3,16±0,02	5,32±0,04	—	—	—
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2	2,18±0,05	4,43±0,06	2,00±0,02	100,0±0,5	—
	2,5	2,11±0,06	4,06±0,06	2,09±0,08	83,6±0,4	+
	3	1,32±0,06*	2,47±0,06*	1,31±0,03	43,7±0,6	+
ZnCl <sub>2</sub>	2	2,27±0,05	4,64±0,03	2,00±0,04	100,0±0,3	—
	2,5	2,25±0,02	4,14±0,04	2,24±0,05	89,6±0,06	+
	3	1,62±0,02	2,82±0,02	1,61±0,02	53,7±0,01	+
NiCl <sub>2</sub>	2	2,24±0,03	4,45±0,03	2,00±0,05	100,0±0,1	—
	2,5	2,09±0,02	4,09±0,05	2,08±0,09	83,2±0,3	+
	3	1,47±0,06*	2,42±0,04*	1,45±0,03	48,3±0,9	+
CoCl <sub>2</sub>	2	2,10±0,07	4,34±0,05	2,00±0,09	100,0±0,3	—
	2,5	2,03±0,05	4,23±0,03	2,02±0,07	80,8±0,8	+
	3	1,49±0,05*	2,52±0,02*	1,48±0,06	49,3±0,2	+
FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	2	2,36±0,04	4,43±0,02	2,00±0,09	100,0±0,2	—
	2,5	2,11±0,04	4,23±0,04	2,10±0,03	84,0±0,4	+
	3	1,56±0,09*	2,55±0,06*	1,55±0,04	51,7±0,5	+
CdCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	2	2,16±0,05	4,38±0,05	2,00±0,03	100,0±0,7	—
	2,5	2,05±0,03	4,05±0,04	2,03±0,07	81,2±0,4	+
	3	1,41±0,07*	2,18±0,03*	1,40±0,02	46,7±0,5	+
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	2	2,45±0,04	4,64±0,05	2,00±0,07	100,0±0,5	—
	2,5	2,19±0,05	4,43±0,08	2,17±0,04	86,8±0,5	+
	3	1,57±0,08*	2,55±0,06*	1,55±0,04	51,7±0,8	+
CuCl <sub>2</sub>	2	2,28±0,05	4,66±0,04	2,00±0,08	100,0±0,3	—
	2,5	2,27±0,04	4,21±0,05	2,25±0,09	90,0±0,2	+
	3	1,58±0,09*	2,65±0,08*	1,57±0,03	52,3±0,1	+

Примітки. \* –  $p \leq 0,05$ ; “+” – наявність іона металу; “–” – відсутність іона металу.

Окрім ферментативного відновлення ряду важких металів зі змінною валентністю [14], ці бактерії у процесі відновлення елементної сірки утворюють гідроген сульфід, який осаджує широкий спектр важких металів до нерозчинних сульфідів, вилучаючи їх таким чином з природного кругообігу.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Галушка А. А., Гудзь С. П. Структурно-функціональні зміни в клітинах мікроорганізмів при дії гідроген сульфідів // Біологічні студії. 2009. Т. 3. № 2. С. 141–148.
2. Бухтіяров А. Є. Резистентність гетеротрофних морських бактерій Одеського прибережжя до важких металів: автореф. дис. ... канд. біол. наук. Севастополь, 2006. 19 с.
3. Каравайко Г. И., Кузнецов С. И., Голомзик А. И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. М.: Наука, 1972. С. 190–221.
4. Крешков А. П. Основы аналитической химии. М.: Госхимиздат, 1961. Кн. 1. 636 с.
5. Перетятко Т. Б., Гнатуш С. О., Гудзь С. П. Сульфатвідновлювальні бактерії водойм Яворівського сіркового родовища // Мікробіол. журн. 2006. Т. 68. № 5. С. 87–93.
6. Перетятко Т., Гудзь С., Галушка А. Використання металів як кінцевих акцепторів електронів сульфатвідновлювальними бактеріями // Біологічні студії. 2009. Т. 3. № 3. С. 141–158.

7. Современная микробиология. Прокариоты / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. Т. 1. 654 с.
8. Франк Ю. А., Лушников С. В. Биотехнологический потенциал сульфатредуцирующих бактерий // Экология и промышленность. 2006. Т. 1 С. 10–13.
9. Юринець Х. Є., Мороз О. М., Кулачковський О. Р., Звір Г. І. Морфологія і фізіологія сірководновловальних бактерій озера Яворівське // VIII Міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”. Львів. 2012. С. 267–268.
10. Hao O. J. Metal effects on sulfur cycle bacteria and metal removal by sulfate-reducing bacteria // Environmental technologies to treat sulfur pollution. Principles and engineering / P. N. L. Lens, P. L. Hulshoff eds. London: IWA publishing, 2000. P. 393–414.
11. Hedderich R., Klimmek O., Kroger A. et al. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides // FEMS Microbiol. Reviews. 1999. Vol. 22. P. 353–381.
12. Hydrogen sulfide: human health aspects [Electronic resource]. World health organization. Geneva. 2003. Available from: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad53.htm>.
13. Julian D., April K. L., Patel S. et al. Mitochondrial depolarization following hydrogen sulfide exposure in erythrocytes from a sulfide-tolerant marine invertebrate // J. Experim. Biol. 2005. Vol. 208. N 21. P. 4109–4122.
14. Lovley D. R. Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction // Microbiol. Rev. 1991. Vol. 55. P. 259–287.
15. McEldowney S. Microbial biosorption of radionuclides in liquid effluent treatment // Appl. Biochem. and Biotechnol. 1990. Vol. 5. P. 159–179.
16. Schauder R., Müller E. Polysulfide as a possible substrate for sulfur-reducing bacteria // Arch. Microbiol. 1993. Vol. 160. P. 377–382.
17. Tebo B. M., Obratsova A. Y. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr (VI), U (VI), Mn (IV), and Fe (III) as electron acceptors // FEMS Microbiology Letters. 1998. Vol. 162. P. 193–198.
18. White C., Sayer J. A., Gadd G. M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination // FEMS Microbiol. Ecol. 2000. Vol. 33. P. 197–208.
19. Widdel F., Hansen T. The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria // **The prokaryotes** / A. Balows ed. N.Y.: Springer-Verlag, 1992. P. 583–624.
20. Widdel F., Pfennig N. The genus *Desulfuromonas* and other gram-negative sulfur-reducing eubacteria // **The prokaryotes** / A. Balows, H. Truper, M. Dworkin et al. eds. N.Y.: Springer-Verlag, 1992. Vol. 4. P. 3379–3389.
21. Pat. 6340596 B1 USA, Int. U.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.

Стаття: надійшла до редакції 30.11.12

доопрацьована 12.02.13

прийнята до друку 13.02.13

---

**HYDROGEN SULFIDE PRODUCTION BY SULFUR REDUCING BACTERIA UNDER INFLUENCE OF HARD METALS****О. Мороз**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: moroz\_oksana@yahoo.com*

Sulfur reducing bacteria in Kravtsov-Sorokin medium with sulfur synthesized hydrogen sulfide at 1.5 fold less than sulfate reducing bacteria in analogous medium with sulfates it was shown. Sulfur reducing bacteria when compared with sulfate reducing bacteria appeared more resistance to high concentrations of hard metals salts. Most toxic to sulfur reducing bacteria are plumbum, nickel, cobalt and cadmium ions. Increasing of dissimilatory sulfur reduction intensity as result of rising of process donor electrons concentration in medium and also cells density during sowing contribute to increasing of binding efficiency of hard metals ions by produced by bacteria hydrogen sulfide was shown. At presence in medium 2 mM  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  it bind completely by hydrogen sulfide in form of no soluble sulfides. It was proved, that sulfur reducing bacteria are perspective to using in biotechnologies of purification of wastewaters with organic compounds from hydrogen sulfide and hard metals.

*Keywords:* sulfur reducing bacteria, dissimilatory sulfur reduction, hydrogen sulfide, hard metals.

**ОБРАЗОВАНИЕ ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА СЕРОВОССТАНАВЛИВАЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ ПОД ВЛИЯНИЕМ СОЛЕЙ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ****О. Мороз**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, г. Львов, 79005, Украина  
e-mail: moroz\_oksana@yahoo.com*

Показано, что серовосстанавливающие бактерии в среде Кравцова-Сорокина с серой синтезируют в полтора раза меньше гидроген сульфида, чем сульфатвосстанавливающие бактерии в аналогичной среде с сульфатами. Серовосстанавливающие бактерии по сравнению с сульфатвосстанавливающими бактериями оказались более устойчивыми к высоким концентрациям солей тяжёлых металлов. Наиболее токсичными для серовосстанавливающих бактерий оказались ионы плумбума, никеля, кобальта и кадмия. Показано, что повышение интенсивности процесса диссимиляционной сероредукции в результате увеличения в среде концентрации донора электронов этого процесса, а также густоты посева клеток увеличивает эффективность связывания ионов тяжёлых металлов гидроген сульфидом, образованным бактериями. При наличии в среде 2 мМ  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и  $Cu^{2+}$  они полностью связываются гидроген сульфидом в форме нерастворимых сульфидов. Доказано, что серовосстанавливающие бактерии перспективны для использования в биотехнологиях очистки сточных вод, содержащих органические соединения, от гидроген сульфида и тяжёлых металлов.

*Ключевые слова:* серовосстанавливающие бактерии, диссимиляционная сероредукция, гидроген сульфид, тяжёлые металлы.