

УДК 579.[222.[4:3]:243]:546.[4:562]

АКУМУЛЮВАННЯ Cu^{2+} ТА Cd^{2+} КЛІТИНАМИ *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* ЗА РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ МЕТАЛІВ У СЕРЕДОВИЩІ**І. Кушкевич, С. Гнатуш, С. Гудзь, О. Василів**

Львівський національний університет імені Івана Франка

вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net

Досліджено ріст культури *D. acetoxidans* у рідкому модифікованому середовищі Постгейта за впливу різних концентрацій купрум сульфату і кадмій сульфату. Показано, що внесення 1,0 мМ CuSO_4 чи 0,5 мМ CdSO_4 у середовище пригнічує ріст сірковідновлювальних бактерій. Відмиті клітини *D. acetoxidans* акумулюють Cu^{2+} при його концентрації в середовищі, що не перевищує 25 мМ. Максимальна концентрація Cd^{2+} , при якій спостерігали його акумуляцію, – 5 мМ. Подальше зростання вмісту металів у середовищі не супроводжувалося збільшенням їх акумуляції.

Ключові слова: сірковідновлювальні бактерії, *Desulfuromonas acetoxidans*, купрум, кадмій, токсичність, акумуляція.

Іони купруму та кадмію виявляють високу токсичність на мікроорганізми [1]. Процес індустріалізації призвів до значного підвищення концентрації важких металів у біосфері. Забруднення середовища важкими металами потребує розробки методів прогнозування взаємодії з ними живих організмів для створення систем очищення довкілля від цих елементів [6]. Розроблені технологічні схеми з використанням сульфатвідновлювальних бактерій для осадження іонів металів із промислових стічних вод. При цьому ефективність очищення досягає 98% [5].

Бактерії переважно акумулюють метали, відкладаючи їх на поверхні клітин. Крім того, метали можуть зв'язуватися капсульними полісахаридами, при цьому в капсулі можуть акумулюватись декілька металів. Для клітин *Bacillus megaterium* ATCC 19213 описано одночасне нагромадження Купруму, Меркурію, Аргентуму, Феруму, Цинку і Мангану [8].

Метали можуть нагромаджуватись на поверхні клітин у формі нерозчинних сполук: PbHPO_4 , CdHPO_4 , $\text{Pb}(\text{OH})_2$, сульфідів металів [1]. Акумуляція металів мікроорганізмами відбувається за участю структур клітинної стінки та ферментів бактерій [6].

Метали можуть нагромаджуватись і всередині клітин. Описано внутрішньоклітинне нагромадження Аргентуму, Цинку, Кобальту, Кадмію [7]. Нагромадження металів усередині клітин, очевидно, обумовлене функціонуванням транспортних систем. При цьому в поглинанні металу можуть брати участь системи як активного, так і пасивного транспорту [1]. Після проникнення в клітину іони металів зв'язуються з білками цитоплазми і внутрішніми мембранними структурами або утворюють нерозчинні продукти всередині клітини, наприклад, сульфіді [10].

Описана здатність сірковідновлювальних бактерій *Desulfuromonas acetoxidans* відновлювати сполуки Fe (III) і Mn (IV) та одержувати при цьому енергію для росту [9]. Бактерії *Desulfuromonas acetoxidans* здатні відновлювати молекулярну сірку до сірководню, який, взаємодіючи з іонами важких металів, утворює нерозчинні сульфіді. Вплив Купруму та Кадмію на ріст і акумуляційну здатність сірковідновлювальних бактерій у літературі не описано.

Метою нашої роботи було дослідити вплив різних концентрацій купрум сульфату та кадмій сульфату на ріст *D. acetoxidans* і акумуляцію цих металів клітинами бактерій.

Об'єктом досліджень була культура *Desulfuromonas acetoxidans*, виділена з водойм Яворівського сіркового родовища.

Культуру пересівали з агаризованого середовища у рідке селективне [4, 11]. Перед посівом зразків у середовище стерильно вносили сірку (20 г/л), біотин (20 мкг/л), а також 10% розчини (мл/л): натрій ацетату – 5,5; натрій гідрокарбонату – 40; натрій сульфід наногідрату – 3.

Бактерії *D. acetoxidans* вирощували у 20 мл пробірках, заповнених середовищем Постгейта без сульфатів [12]. Час культивування – 10 діб за анаеробних умов при температурі 30°C. Сірку вносили у середовище стерильно перед засівом. Крім цього, до середовища додавали біотин (20 мкг/л), а також з 10% розчини (мл/л): натрій ацетату – 5,5; натрій гідрокарбонату – 40; натрій сульфід наногідрату – 3.

Біомасу визначали турбідиметрично на КФК-3 ($\lambda=395$ нм, оптичний шлях 3 мм). Для розрахунку використовували формулу:

$$C = \frac{E_{395} \cdot n}{K} \quad (\text{г/л}),$$

де E_{395} – екстинкція при 395 нм; n – фактор розведення, разів; $K=0,65 \pm 0,15$ – коефіцієнт перерахунку.

Для дослідження здатності акумулювати іони важких металів культуру *D. acetoxidans* зі середини експоненціальної фази росту відмивали 0,9% розчином NaCl та інкубували протягом 3 год у середовищах, які містили різні концентрації купрум сульфату чи кадмій сульфату: 5, 10, 15, 20 та 25 мМ (у перерахунку на концентрацію іонів металу).

Для отримання безклітинних екстрактів відмиті клітини переносили в калій-фосфатний буфер (рН 7,5) і руйнували на ультразвуковому гомогенізаторі УЗДН-2Т при 22 кГц протягом 5 хв при 0°C. Незруйновані клітини та їх уламки відокремлювали центрифугуванням при 12–15 тис. об/хв при 4°C протягом 30 хв.

Концентрацію акумульованих металів визначали у безклітинних екстрактах на іонOMETRІ (рН-150М) за допомогою іонселективних електродів на Купрум і Кадмій, використовуючи калібрувальні криві.

Основні статистичні показники вираховували за безпосередніми даними (середнє арифметичне – M ; стандартна похибка середнього арифметичного – m). Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента [3]. Достовірною вважалася різниця при показнику достовірності $P > 0,95$. Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програми Excel та Origin.

Солі важких металів у малих концентраціях необхідні для нормального функціонування мікроорганізмів, бо їхні іони входять до складу ферментних систем. У високих концентраціях важкі метали спричиняють денатурацію білків і нуклеїнових кислот, порушують бар'єрну функцію цитоплазматичної мембрани, впливають на клітинний поділ, процеси транспорту [1].

Бактерії *Acidithiobacillus ferrooxidans* толерантні до 800 мМ Cu^{2+} . Серед ацидофільних архебактерій найстійкішими до дії Купруму є бактерії *Metallosphaera sedula*. Ці мікроорганізми залишаються життєздатними при концентрації Купруму 16 мМ [2].

Кадмій є токсичнішим для клітин, ніж Купрум. Він описується як токсичний елемент без біологічної користі, який завжди викачується з клітини. Бактерії, що є стійкими до Cd^{2+} , мають значні переваги для виживання. Найстійкішими до дії Cd^{2+} є бактерії *Sulfolobus acidocaldarius* та *S. solfataricus*. Ці мікроорганізми залишаються життєздатними при концентрації кадмію 10 мМ, а бактерії *Acidithiobacillus ferrooxidans* не гинуть у середовищі, яке містить 500 мМ кадмію [2].

Для дослідження здатності сірководновловлювальних бактерій рости в присутності важких металів культуру *D. acetoxidans* вирощували за різних концентрацій купрум сульфату або кадмій сульфату: 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 та 2,5 мМ. У контрольне середовище солі металу не вносили.

Бактерії вирощували протягом 10 діб при температурі 30°C за анаеробних умов. У процесі культивування через певні проміжки часу визначали біомасу культури.

Як видно з рис. 1, А, при вирощуванні *D. acetoxidans* у присутності 0,5 мМ CuSO_4 на першу добу спостерігали зростання біомаси до $0,4 \pm 0,0035$ г/л. На другу і третю доби біомаса бактерій *D. acetoxidans* зростає у 3,9 рази порівняно з початковою. Найбільшу біомасу відмічено на восьму добу – $1,98 \pm 0,052$ г/л. Після цього ріст культури уповільнюється.

Внесення в середовище 1,0 мМ і більше CuSO_4 пригнічувало ростові процеси. На шосту добу культивування біомаса мало відрізнялася від початкової і становила тільки 10% від контролю (рис. 1, А).

Внесення у середовище солі кадмію вже в концентрації 0,5 мМ пригнічувало ріст бактерій на 60% (рис. 1, Б).

Збільшення у середовищі концентрації CdSO_4 до 1,5 мМ зумовило інгібування росту досліджуваної культури. При культивуванні *D. acetoxidans* за вмісту 2,5 мМ солі кадмію біомаса на восьму добу росту була менша у 6 разів, порівняно з контролем (рис. 1, Б).

Таким чином, внесення у середовище 0,5 мМ CdSO_4 чи 1,0 мМ CuSO_4 і вище спричиняє інгібування росту *D. acetoxidans*.

Для визначення акумуляційної здатності *D. acetoxidans* використовували відмиті клітини, які інкубували протягом трьох годин у середовищі з різними концентраціями досліджуваних солей. Для побудови калібрувальної кривої визначали напругу Е (mV) між іонселективним і порівняльним електродами у розчинах CuSO_4 та CdSO_4 з концентраціями від 0,0001 до 1 моль/л (у перерахунку на концентрацію іонів металу).

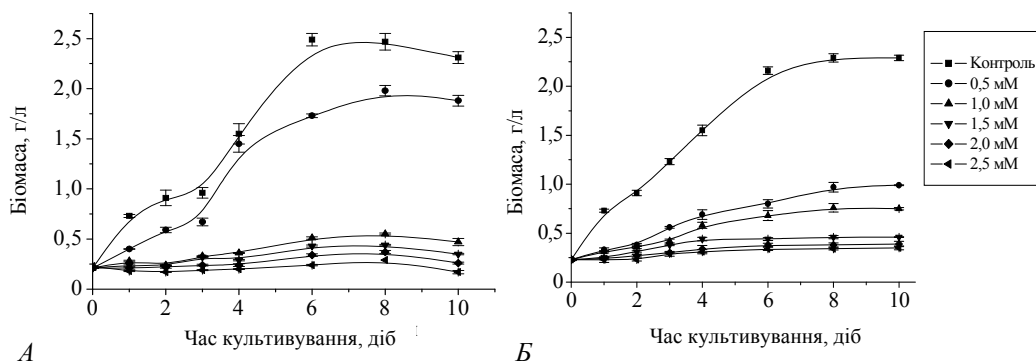


Рис. 1. Ріст бактерій *D. acetoxidans* за різних концентрацій солей важких металів: А – купрум сульфату; Б – кадмій сульфату.

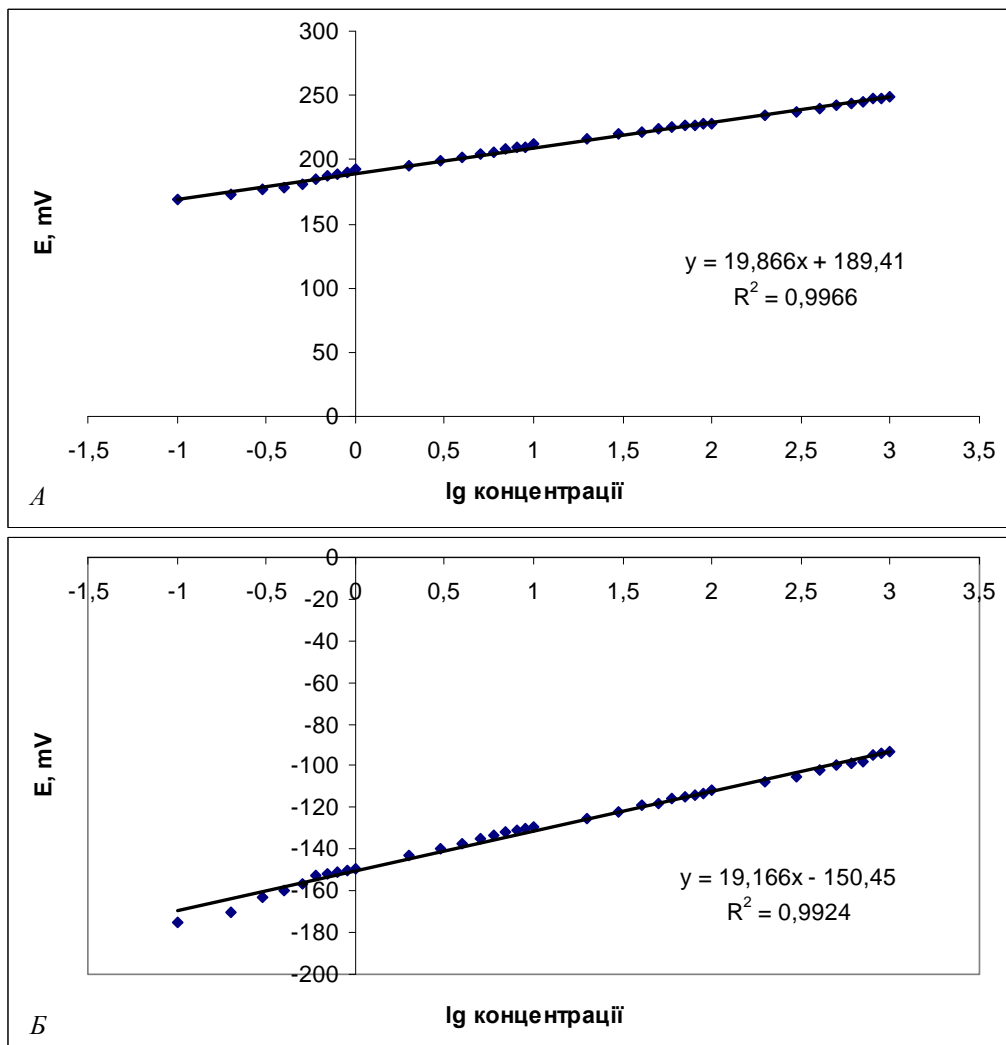


Рис. 2. Калібрувальні криві для визначення концентрації важкого металу: *A* – іонів Купруму; *B* – іонів Кадмію.

У координатах $E(\lg C)$ отримали лінійну залежність, яка описується рівнянням $y=19,866x+189,41$, де $y=E(\text{mV})$; $x=\lg C$ для іонів купруму та $y=19,166x-150,45$, де $y=E(\text{mV})$; $x=\lg C$ – для іонів Кадмію (рис. 2). Концентрацію акумульованих іонів Купруму та Кадмію в клітинах розраховували за формулами, одержаними з рівнянь калібрувальних

кривих: $C = e^{\frac{E-189,41}{8,6275}}$ – для іонів Купруму та $C = e^{\frac{E-150,45}{8,3235}}$ – для іонів Кадмію.

Досліджували нагромадження Cd^{2+} і Cu^{2+} клітинами *D. acetoxidans* протягом трьох годин інкубування. У пробірки вносили відмиті вирощені протягом чотирьох діб клітини з розрахунку 3,1 та 3,4 г/л – для дослідження акумуляції Cd^{2+} та Cu^{2+} відповідно.

Як видно з рис. 3, A концентрація Cu^{2+} у клітинах залежить від їх вмісту в середовищі інкубування. Зокрема, зі збільшенням концентрації Cu^{2+} до 15 мМ акумуля-

ція іонів металу бактеріями зростає, а при вмісті купруму від 15 до 25 мМ – зменшується протягом трьох годин. Максимум поглинання при 15 мМ Cu^{2+} становив $0,185 \pm 0,0012$ ммоль/г клітин на першу годину (рис. 3, А). Збільшення часу інкубування приводить до зменшення концентрації Cu^{2+} у клітинах. У клітинах контрольних зразків іонів металу не виявлено.

При інкубуванні бактерій *D. acetoxidans* у середовищі з іонами кадмію незначну акумуляцію спостерігали лише при 5 мМ металу (рис. 3, Б). Поглинання було відмічене лише на першу годину інкубування ($0,163 \pm 0,056 \times 10^{-13}$ ммоль/г клітин). На другу і третю години воно було меншим порівняно з акумуляцією Cu^{2+} .

Можливо, клітини *D. acetoxidans* викачують Кадмій аналогічно до *K. pneumoniae*. При цьому вони можуть утворювати позаклітинний кадмій сульфід [10].

Таким чином, кадмій сульфат у концентрації 0,5 мМ і купрум сульфат у концентрації 1 мМ пригнічують ріст сірководновловальних бактерій *D. acetoxidans*. Наявність у середовищі солей в концентрації 1 мМ практично повністю пригнічує ріст культури. Відмиті клітини *D. acetoxidans* здатні акумулювати Cu^{2+} та Cd^{2+} . Встановлено, що акумуляція металів залежить від їх концентрації у середовищі. Максимальна акумуляція іонів Купруму досягається при його концентрації в середовищі 15 мМ, а Кадмію – при 5 мМ. Подальше зростання концентрації солі Купруму супроводжувалося зменшенням

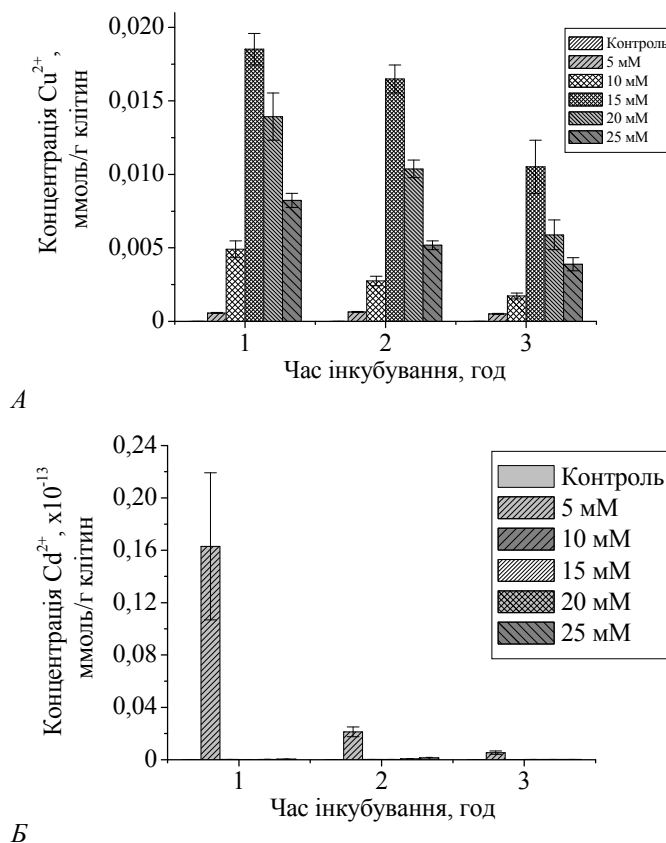


Рис. 3. Акумуляція іонів важких металів клітинами *D. acetoxidans*: А – Купруму; Б – Кадмію.

рівня акумуляції металу, а у випадку внесення кадмій сульфату у концентрації 10 мМ і більше акумуляцію не спостерігали.

1. Авакян З. А. Токсичность тяжелых металлов для микроорганизмов // Микробиология. 1973. Т. 2. С. 5–46.
2. Кушкевич І., Гнатуш С., Гудзь С. Вплив важких металів на клітини мікроорганізмів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2007. Вип. 45. С. 3–28.
3. Лакін Г. Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
4. Розанова Е. П. Методы культивирования и идентификации анаэробных бактерий, восстанавливающих серу и ее окисленные соединения / Институт микробиологии АН СССР. М., 1979. С. 128.
5. Таширеві А. Б. Взаимодействие микроорганизмов с металлами // Микроб. журн. 1995. № 2. С. 95–101.
6. Таширеві А. Б. Теоретические аспекты взаимодействия микроорганизмов с металлами. Восстановительная трансформация металлов // Микроб. журн. 1994. № 6. С. 76–87.
7. Таширеві А. Б. Теоретические аспекты взаимодействия микроорганизмов с металлами. Микробная аккумуляция металлов, обусловленная их стереохимической аналогией с макроэлементами // Микроб. журн. 1994. № 6. С. 89–97.
8. Таширеві О. Б. Біотехнології очищення промислових стічних вод на основі термодинамічного прогнозування взаємодії мікроорганізмів з металами та радіонуклідами: Автореф. дис. ... д-ра техн. наук. К., 2005. 42 с.
9. Eric E. Roden, Derek R. Lovley. Dissimilatory Fe(III) Reduction by the Marine Microorganism *Desulfuromonas acetoxidans* // Appl. Env. Microbiol. Mar. 1993. P. 734–742.
10. Holmes J. D., Richardson D. J., Saed S. et al. Cadmium-specific formation of metal sulfide 'Q-particles' by *Klebsiella pneumoniae* // Microbiol. 1997. Vol. 143. P. 2521–2530.
11. Pfennig N., Biebl H. *Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium // Arch. Microbiol. 1976. Vol. 110. P. 3–12.
12. Postgate J. R. The sulfate-reducing bacteria. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. 208 p.

ACCUMULATION OF Cu^{2+} AND Cd^{2+} BY THE CELLS OF *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* AT DIFFERENT METALS CONCENTRATIONS IN THE MEDIUM

I. Kushkevych, S. Hnatysh, S. Gudzy, O. Vasylyv

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net*

The growth of *D. acetoxidans* is investigated in the rare modified Postgate medium under the influence of different copper and cadmium sulfate concentrations. Addition of 1.0 mM CuSO_4 or 0.5 mM CdSO_4 to the medium inhibits the growth of sulfur-reducing bacteria. The washed cells of *D. acetoxidans* accumulate Cu^{2+} at its concentrations that doesn't exceed 25 mM. The maximal concentration of Cd^{2+} , at which its accumulation was observed, was equal to 5 mM. The further increase of metals' content in the medium didn't lead to the increase of their accumulation.

Key words: sulfur-reducing bacteria, *Desulfuromonas acetoxidans*, copper, cadmium, toxicity, accumulation.

Стаття надійшла до редколегії 08.10.08

Прийнята до друку 23.10.08