



УДК 579.2:579.695

АКЦЕПТОРИ ЕЛЕКТРОНІВ ДЛЯ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ *DESULFOMICROBIUM SP.* У ПРОЦЕСІ ОКИСНЕННЯ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК

К. В. Шоляк, Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь

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

За наявності в середовищі сульфату сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfomicrobium sp.* використовують його як кінцевий акцептор електронів, при цьому він відновлюється до гідроген сульфіду. Крім сульфату, як акцептори електронів при окисненні органічних сполук бактерії *Desulfomicrobium sp.* використовують нітрат, хромат, тривалентне залізо – (Fe (III)), фумарат і елементну сірку. Хромат і нітрат забезпечують ріст, який суттєво не відрізняється від росту бактерій у середовищі зі сульфатами. При цьому Cr^{+6} відновлюється до Cr^{+3} , а нітрати до нітритів і амонію. Тривалентний хром у концентрації 0,2–2 мМ не виявляє інгібуючої дії на ріст *Desulfomicrobium sp.* За наявності сульфату (5 мМ) і нітрату (5 мМ) у середовищі спостерігається одночасне використання обох акцепторів електронів бактеріями. За наявності у середовищі 0,5 мМ хромату та 5 мМ сульфату, Cr^{+6} пригнічував використання сульфатів клітиною. У разі одночасного внесення сульфатів (5 мМ), нітратів (5 мМ) і хромату (0,5 мМ) в середовище культивування, Cr^{+6} інгібував використання сульфату й нітрату сульфатвідновлювальними бактеріями *Desulfomicrobium sp.*

Ключові слова: сульфатвідновлювальні бактерії, сульфатредукція, акцептори електронів, хромати, нітрати, сульфати.

ВСТУП

У результаті діяльності людини в навколишнє середовище разом із промисловими та побутовими стічними водами надходить велика кількість різноманітних речовин, більшість із яких (нітрати, нітрити, сульфати, йони важких металів) виявляють токсичний вплив на живі організми. Значна частина важких металів не включається в природний кругообіг і накопичується в біосфері, зумовлюючи небажані екологічні наслідки [1, 3].

У широкому спектрі методів очищення навколишнього середовища від вищезазначених політантів особливе місце займають біологічні з використанням мікроорганізмів [3]. Більшість мікроорганізмів, що застосовуються в технологіях очищення стічних вод, чутливі до підвищеного вмісту в них різних забруднювачів [3].

Серед мікробного різноманіття особливої уваги заслуговують сульфатвідновлювальні бактерії, які здатні відновлювати сульфати (одні з найбільш поширених полютантів) до гідроген сульфіду в процесі дисиміляційної сульфатредукції. Останнім часом з'являються повідомлення, що ці бактерії, за відсутності сульфату як акцептора електронів, можуть використовувати інші сполуки (нітрати, нітрити й метали зі змінною валентністю (Pd (II), Fe (III), Mn (IV), Tc (VI), Cr (VI), і U (VI), переводячи їх у нетоксичні або менш токсичні форми [6, 8, 18, 20]. Описані приклади відновлення нітратів лише за відсутності сульфатів [11]. В інших випадках повідомлялося, що у штаму *D. desulfuricans* Essex сульфат необхідний для відновлення нітратів [12]. Недавно досліджені механізми регуляції експресії нітратредуктазного оперона у сульфатвідновлювальних бактерій і показано, що сульфід сильно інгібує відновлення нітратів у *D. desulfuricans*, а транскрипція *nar* оперона індукується нітратом і репресується сульфатом [18].

Метою цієї роботи було дослідити здатність сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfomicrobium* sp. використовувати різні акцептори електронів.

Ці бактерії виділені зі стічних вод Львова та володіють стійкістю до підвищених концентрацій хромату. За відсутності сульфату сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfomicrobium* sp. здатні до детоксикації високотоксичного хромату, однак у присутності сульфатів і нітратів процеси детоксикації хромату залишаються невідомими.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі використано бактерії *Desulfomicrobium* sp., виділені нами зі стічних вод очисних споруд м. Львова [10].

Бактерії культивували у середовищі Постгейта С [9] за температури 30°C у пробірках об'ємом 25 мл, в анаеробних умовах.

Нітрат, фумарат, вносили у середовище Постгейта С замість сульфату в концентрації 12 мМ. Концентрація Fe (III) і хромату становила 1 мМ. Елементну сірку вносили у формі кристалів (10 г/л).

Для дослідження впливу шестивалентного і тривалентного хрому на ріст бактерій їх культивували впродовж 7 діб у середовищі Постгейта С такого складу (г/л): калій дигідрофосфат – 0,5; амоній хлорид – 1,0; натрій хлорид – 3,7; кальцій хлорид гексагідрат – 0,06; магній хлорид гексагідрат – 0,055; натрій лактат – 6; дріжджовий екстракт – 1; натрій цитрат дигідрат – 0,3; рН середовища – 7,6. Cr⁺⁶ та Cr⁺³ вносили у формі водних розчинів K₂Cr₂O₇ та Cr(NO₃)₃ після стерилізації у концентраціях 0,2, 0,5, 1, 1,5, 2 мМ.

Для визначення впливу нітрату і хромату на використання сульфату в середовищі Постгейта С вносили сульфат у концентрації 5 мМ, нітрат – 5 мМ, хромат – 0,5 мМ.

Біомасу визначали турбідиметрично на фотоелектроколориметрі КФК-3 ($\lambda = 340$ нм, кювета 3 мм).

Вміст хромату визначали спектрофотометрично ($\lambda = 540$ нм, кювета 10 мм) дифенілкарбазидним методом [17]. Для визначення Cr (III) використовували хромазуrol S ($\lambda = 590$ нм, кювета 10 мм) [15]. Вміст сульфатів визначали турбідиметрично ($\lambda = 520$ нм, кювета 10 мм) після їх осадження барій хлоридом. Для стабілізації суспензії використовували гліцерин [2]. Кількість гідроген сульфіду визначали у культуральній рідині фотометрично з використанням *p*-амінодиметилу

ніліндігідрохлориду ($\lambda = 665$ нм, кювета з оптичним шляхом 30 мм) [19]. Вміст нітратів визначали спектрофотометрично ($\lambda = 540$ нм, кювета 10 мм) за допомогою *n*-нафтилетилендіаміндихлориду, після їх відновлення до нітритів цинковим порошком [13]. Концентрацію амонію визначали спектрофотометрично з використанням фенольного реактиву, нітропрусиду та гіпохлорату ($\lambda = 640$ нм, кювета 10 мм) [13].

Статистичне оброблення результатів проводили за Лакінім [5].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

У таблиці наведено результати наших досліджень щодо здатності бактерій *Desulfomicrobium* sp. рости у середовищі з різними акцепторами електронів. З цією метою бактерії *Desulfomicrobium* sp. вирощували у середовищі Постгейта С, у якому сульфат був замінений на нітрат, фумарат, хромат, ферум (III) і сірку як потенційні акцептори електронів.

Ріст бактерій у середовищі з різними акцепторами електронів

Growth of bacteria in the media supplemented with different electron acceptors

№ з/п	Акцептор електронів	Концентрація, мМ	Біомаса, г/л
1	Сульфат	12	4,04±0,12
2	Сірка	0,3	1,37±0,03
3	Хромат	1	3,60±0,27
4	Fe (III)	1	0,91±0,02
5	Нітрат	12	2,78±0,07
6	Фумарат	12	1,89±0.05

Встановлено, що бактерії *Desulfomicrobium* sp. найкраще ростуть у середовищі з хроматом або нітратом, їх біомаса лише приблизно на 15–30% менша, ніж у середовищі зі сульфатом. Фумарат, елементна сірка і тривалентне залізо також використовувалися бактеріями, однак вони виявилися менш ефективними акцепторами електронів і забезпечували у 2–3 рази менший ріст клітин.

Аналіз складу середовища культивування показав, що досліджувані акцептори електронів відновлювалися до гідроген сульфіду, Cr (III), нітритів і амонію у середовищах зі сульфатами, хроматами й нітратами відповідно (рис. 1, А, Б, В). Закономірності відновлення SO_4^{2-} , Cr_4^{2-} та NO_3^- показані на рис. 1.

Характер кривої росту в середовищі з різними акцепторами електронів суттєво відрізняється. У середовищі зі сульфатом крива росту має типовий характер, у середовищі, де сульфат замінений на хромат чи нітрат, спостерігається відхилення від експоненціальної кривої росту. На 4-ту добу культивування у середовищах з хроматом і нітратом спостерігається сповільнення росту сульфатвідновлювальних бактерій, що, можливо, пов'язано з нагромадженням у цей період росту токсичних проміжних сполук відновлення хромату (п'ятивалентний хром) [4] і нітратів (нітрити) [18]. Таким чином, досліджувані бактерії *Desulfomicrobium* sp. здатні відновлювати високотоксичні сполуки (хромати, нітрати) до менш токсичних. Продукт відновлення хромату – Cr (III) за різних концентрацій (0,2–2 мМ) не виявляє значного інгібуючого впливу на ріст сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfomicrobium* sp. (рис. 2) порівняно з хроматом, який за тих самих високих концентрацій призводить до практично повного припинення росту цих бактерій.

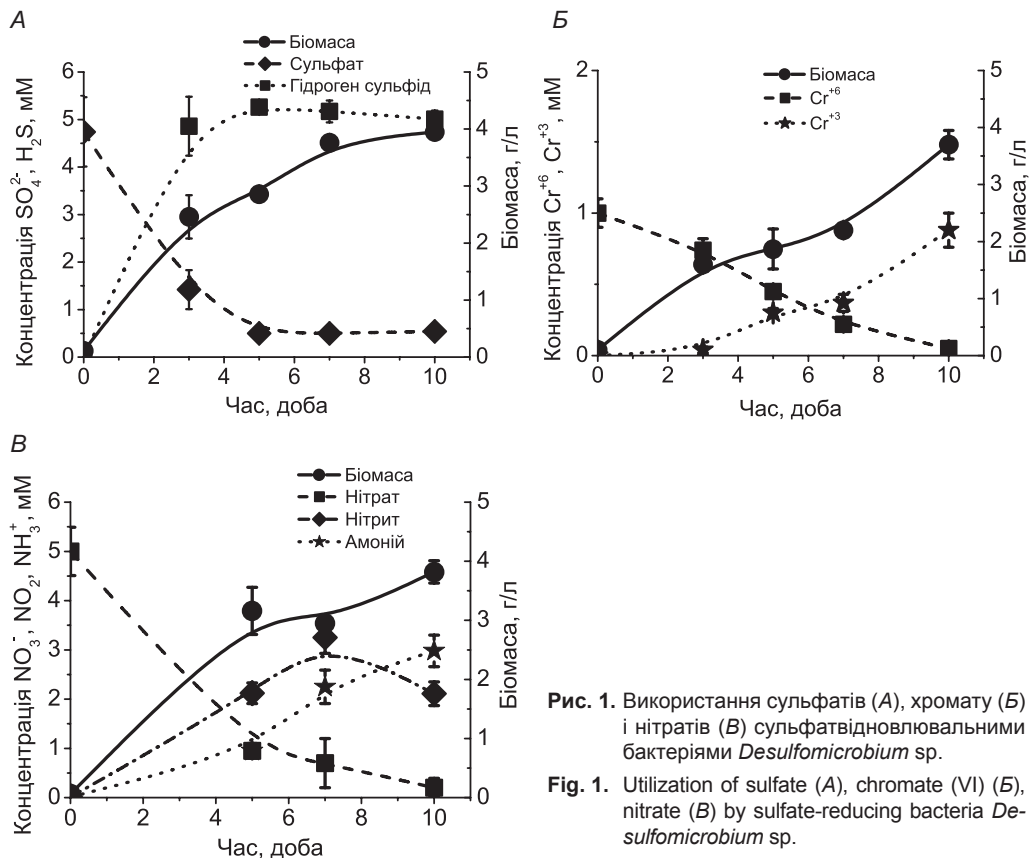


Рис. 1. Використання сульфатів (А), хромату (Б) і нітратів (Б) сульфатвідновлювальними бактеріями *Desulfomicrobium* sp.

Fig. 1. Utilization of sulfate (A), chromate (VI) (B), nitrate (B) by sulfate-reducing bacteria *Desulfomicrobium* sp.

Зазвичай серед поллютантів навколишнього середовища завжди виявляють багато речовин (нітрати, сульфати, солі важких металів), які по-різному взаємодіють з клітинами мікроорганізмів. Існує припущення, що при доступності більш ніж одного потенційного джерела енергії бактерії будуть використовувати першим термодинамічно найбільш сприятливий акцептор електронів [16, 21].

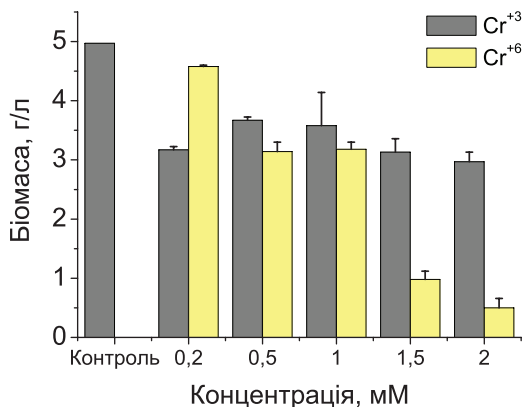
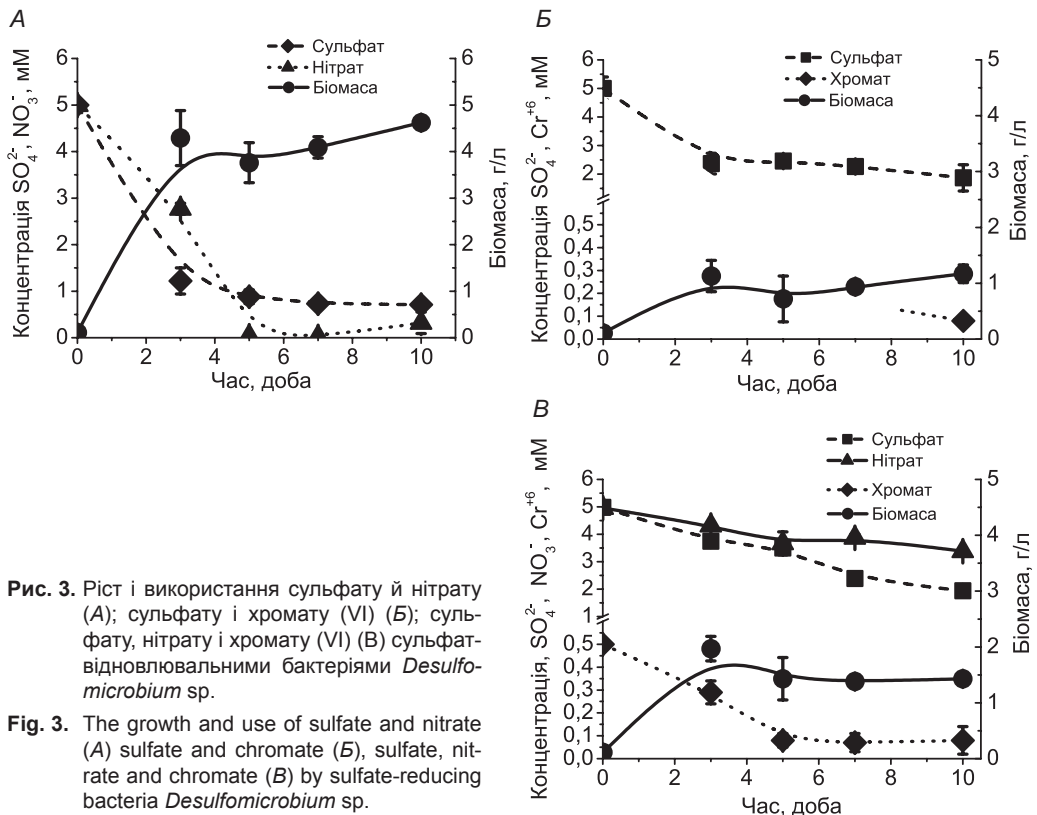


Рис. 2. Вплив різних концентрацій Cr⁺⁶, Cr⁺³ на ріст сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfomicrobium* sp.

Fig. 2. Influent of different concentration of Cr⁺⁶, Cr⁺³ on growth of sulfate-reducing bacteria *Desulfomicrobium* sp.

Ми дослідили закономірності використання різних акцепторів електронів (нітрати, сульфати, хромат) за умов їх одночасної присутності у середовищі культивування.

На рис. 3, А показано кінетику росту *Desulfomicrobium sp.* у середовищі зі сульфатом і нітратом, концентрація яких становить 5 мМ. За цих умов досліджувані бактерії одночасно використовували сульфати і нітрати, приблизно з однаковою швидкістю. Протягом культивування біомаса бактерій досягала рівня, який був вищим ніж при культивуванні у середовищах, що містили тільки сульфати (рис. 1, А) чи нітрати (рис. 1, В) як єдиний акцептор електронів. Отримані дані показують, що бактерії *Desulfomicrobium sp.* здатні використовувати нітрат у присутності сульфату, однак сульфат не є необхідним для відновлення нітрату як у *D. desulfuricans* Essex [12]. Крім того, на відміну від бактерій *D. desulfuricans* [18], у *Desulfomicrobium sp.* за досліджуваних концентрацій сульфату (5 мМ) і нітрату (5 мМ) не спостерігається інгібування використання нітрату гідроген сульфідом.



У разі внесення у середовище культивування сульфату і хромату спостерігається пригнічення росту бактерій (рис. 3, Б) порівняно з культивуванням у середовищах зі сульфатом чи хроматом (див. рис. 1). Швидкість використання сульфату і хромату сповільнюється, однак, починаючи з третьої доби культивування, використання сульфатів пригнічується й починається інтенсивне використання хромату. Голанд і співавт. встановили [14], що при дії хромату на бактерійну клітину

індукується синтез білків, що беруть участь у транспортуванні сульфату, однак виявляють більшу спорідненість до хромату. Ймовірно, таким чином можна пояснити характер кривої використання сульфатів бактеріями *Desulfomicrobium* sp. за наявності хромату.

За одночасного внесення в середовище сульфатів, нітратів і хромату (рис. 3, В) спостерігається пригнічення росту бактерій, як і при культивуванні у середовищі зі сульфатом і хроматом. Таким чином, можна говорити про інгібуючий вплив хромату на використання як сульфату, так і нітрату, оскільки у середовищі з нітратом і сульфатом без хромату інгібуючого ефекту не спостерігалось.

Закономірності використання хромату, сульфату і нітрату бактеріями *Desulfomicrobium* sp. обумовлені складними внутрішньоклітинними процесами та потребують подальших досліджень у цьому напрямі.

ВИСНОВОК

Сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfomicrobium* sp. крім сульфатів, як кінцеві акцептори електронів використовують нітрат, хромат, Fe (III), фумарат, елементну сірку.

Нітрат і хромат у концентраціях 12 і 1 мМ, відповідно, забезпечують ріст бактерій *Desulfomicrobium* sp., який суттєво не відрізняється від росту в середовищі зі сульфатом. Cr^{+6} відновлюється досліджуваними бактеріями до Cr^{+3} , який не виявляє помітної інгібуючої дії на їх ріст. У середовищі з нітратом спостерігається його відновлення до нітритів і амонію. За одночасного внесення у середовище сульфатів і нітратів спостерігається одночасне їхнє використання. За наявності у середовищі сульфатів, нітратів і хромату останній пригнічує використання як сульфатів, так і нітратів.

1. Буракаева А.Д., Русанов А.М., Лантух В.П. **Роль микроорганизмов в очистке сточных вод от тяжелых металлов:** метод. пособие. Оренбург: ОГУ, 1999. 54 с.
2. ГОСТ 26426-85. **Почвы. Метод определения ионов сульфата в водной вытяжке.** М.: Изд-во стандартов, 1985.
3. Джигирей В.С. **Екологія та охорона навколишнього середовища:** навч. посіб. К.: Знання, 2004. 309 с.
4. Кшеминская Г.П., Гайда Г.З., Иваш М.Ф. та ін. Хромат-резистентные мутанты дрожжей *Pichia guilliermondii*: получение и свойства. **Микробиология**, 2011; 80(3): 308–319.
5. Лакин Г. Ф. **Биометрия.** М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
6. Перетятко Т.Б., Галушка А.А., Гудзь С.П. Використання металів як кінцевих акцепторів електронів сульфатвідновлювальними бактеріями. **Біологічні студії**, 2009; 3(3): 131–148.
7. Перетятко Т.Б., Гудзь С.П. Відновлення сполук шестивалентного хрому сульфатвідновлювальними бактеріями. **Біологічні студії**, 2010; 4(2): 39–48.
8. Перетятко Т.Б., Гудзь С.П. Здатність сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 і *Desulfobacter* sp. використовувати нітрат як акцептор електронів. **Біологічні студії**, 2011; 5(2): 51–60.
9. Розанова Е. П. Методы культивирования и идентификации анаэробных бактерий, восстанавливающих серу и ее окисленные соединения. **Теоретические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов.** 1978: 123–136.
10. Шоляк К.В. Перетятко Т.Б., Гудзь С.П. Хромрезистентні сульфатвідновлювальні бактерії, виділені із стічних вод промислових підприємств. В кн. **Фундаментальні та прикладні дослідження в біології:** матер. II Міжнар. наук. конф. студентів, аспірантів та молодих учених (м. Донецьк 19–22 вересня 2011 р.). Донецьк, 2011. 269 с.

11. *Baumann A., Denk V.* The physiology of sulfate reduction. **Archives of Microbiology**, 1950; 15: 238–307.
12. *Dalgaard T. Friedhelm B.* Nitrate Reduction in a Sulfate-Reducing Bacterium, *Desulfovibrio desulfuricans*, Isolated from Rice Paddy Soil: Sulfide Inhibition, Kinetics, and Regulation. **Applied and Environmental Microbiology**, 1994; 1: 291–297.
13. *Granger D.L., Taintor R.R., Boockvar K.S.* et al. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. **Methods in Enzymology**, 1996; 268: 142–151.
14. *Holland S.L., Avery S.V.* Chromate toxicity and the role of sulfur. **Metallomics**, 2011; 3: 1119–1123.
15. *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; 1(4): 85–94.
16. *Keith S.M., Herbert R.A.* Dissimilatory nitrate reduction by a strain of *Desulfovibrio desulfuricans*. **FEMS Microbiology Letters**, 1983; 18: 55–59.
17. *Marchart H.* Über die Reaktion von Chrom mit Diphenylcarbazon und Diphenylcarbazol. **Analytica Chimica Acta**, 1964; 196(30):11–17.
18. *Marietou A., Griffiths L., Cole J.* Preferential Reduction of the Thermodynamically Less Favorable Electron Acceptor, Sulfate, by a Nitrate-Reducing Strain of the Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* 27774. **Journal of Bacteriology**, 2009; 3: 882–889.
19. Pat. 6,340,596 B1 USA, Int. Cl. G 01 N 33/00. **Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen** / Sugiyama M.; assignee Fujirebio Inc. – № 09/248,316 ; fil. 02.11.1999 ; date of pat. 22.01.2002.
20. *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; 162: 193–198.
21. *Uden G., Bongaerts J.* Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1997; 3: 217–234.

ELECTRON ACCEPTORS FOR SULPHATE-REDUCING BACTERIA *DESULFOMICROBIUM* SP. IN THE PROCESS OF OXIDATION OF ORGANIC COMPOUNDS

K. V. Sholiak, T. B. Peretyatko, S. P. Gudz

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

In the presence of sulfate in the medium? sulfate-reducing bacteria *Desulfomicrobium* sp. use it as a final electron acceptor with its reduction to hydrogen sulfide. Except sulfate, bacteria *Desulfomicrobium* sp. are able to use nitrate, chromate, trivalent iron – Fe (III), fumarate and elemental sulfur as electron acceptors in the process of organic compounds oxidation. Chromate and nitrate provide growth which does not significantly differ from bacterial growth in the medium with sulfate. Under these conditions, Cr⁺⁶ is reduced to Cr⁺³, and nitrates – to nitrite and ammonium. 0.2–2 mM of Cr (III) do not possess any inhibitory effect on the growth of *Desulfomicrobium* sp. In the presence of sulfate (5 mM) and nitrate (5 mM) in the growth medium, there was observed a simultaneous use of both acceptors of electrons by bacteria. Under the presence of 0.5 mM chromate and 5 mM sulfate in the medium, Cr⁺⁶ inhibited sulfate utilization the bacterial cells. Under

simultaneous addition of sulphate (5 mM), nitrate (5 mM) and chromate (0.5 mM) into the growth medium, Cr⁺⁶ inhibited utilization of sulfate and nitrate by sulfate-reducing bacteria *Desulfomicrobium* sp.

Keywords: sulfate-reducing bacteria, sulfate-reduction, electron acceptors, chromate, nitrate, sulfate.

АКЦЕПТОРЫ ЭЛЕКТРОНОВ ДЛЯ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ *DESULFOMICROBIUM* SP. В ПРОЦЕССЕ ОКИСЛЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

К. В. Шоляк, Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь

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

При наличии в среде сульфата сульфатредуцирующие бактерии *Desulfomicrobium* sp. используют его в качестве конечного акцептора электронов, при этом сульфат восстанавливается до сероводорода. Кроме сульфатов, в качестве акцепторов электронов при окислении органических соединений бактерии используют нитраты, хроматы, трехвалентное железо – Fe (III), фумарат и элементную серу. Хроматы и нитраты обеспечивают рост, существенно не отличающийся от роста бактерий в среде с сульфатами. При этом Cr⁺⁶ восстанавливается до Cr⁺³, а нитраты до нитритов и аммония. Cr (III) в концентрации 0,2–2 мМ не оказывает ингибирующего влияния на рост *Desulfomicrobium* sp. При наличии сульфата (5 мМ) и нитрата (5 мМ) в среде наблюдается одновременное использование обоих акцепторов электронов бактериями. При наличии в среде 0,5 мМ хромата и 5 мМ сульфатов Cr⁺⁶ подавлял использование сульфатов клетками. При одновременном добавлении в среду сульфатов (5 мМ), нитратов (5 мМ) и хромата (0,5 мМ) Cr⁺⁶ ингибировал использование сульфата и нитрата сульфатредуцирующими бактериями *Desulfomicrobium* sp.

Ключевые слова: сульфатредуцирующие бактерии, сульфатредукция, акцепторы электронов, хроматы, нитраты, сульфаты.

Одержано: 13.05.2013