



УДК 579.[266.4:844.91]

ЗДАТНІСТЬ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ *DESULFOVIBRIO DESULFURICANS* YA-11 І *DESULFOBACTER* SP. ВИКОРИСТОВУВАТИ НІТРАТ ЯК АКЦЕПТОР ЕЛЕКТРОНІВ

Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: t_peretyatko@franko.lviv.ua

Досліджено здатність бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 використовувати нітрат як кінцевий акцептор електронів. Рівень нагромадження біомаси у середовищі з нітратом змінювався залежно від вихідної концентрації NO_3^- . За концентрації нітрату 5 мМ біомаса бактерій була такою ж, як у середовищі з SO_4^{2-} . Проміжним продуктом відновлення нітрату у *D. desulfuricans* Ya-11 є нітрит, а кінцевим – амоній. Високі концентрації нітрату в середовищі пригнічують процес дисиміляційної сульфатредукції. Відмиті клітини *D. desulfuricans* Ya-11 повністю відновлювали нітрит середовища до амонію. Показана здатність психрофільної сульфатвідновлювальної бактерії *Desulfobacter* sp. відновлювати нітрат за низьких температур.

Ключові слова: сульфатвідновлювальні бактерії, нітрат, акцептор електронів.

ВСТУП

У кругообігу сполук Нітрогену відомі два різні шляхи дисиміляційного відновлення нітратів: відновлення нітрату до молекулярного азоту (денітрифікація) і відновлення нітрату до амонію (нітратамоніфікація). Денітрифікацію здійснюють багато різних факультативно анаеробних бактерій, які відновлюють нітрати за одними і тими самими біохімічними механізмами [12]. Нітратамоніфікація може відбуватися різними шляхами. У клостридій, наприклад, нітрат може забезпечити додатковий рівень субстратного фосфорилування [8], сульфатвідновлювальні бактерії відновлюють нітрат до амонію у дихальному процесі, пов'язаному з транспортом електронів [18]. Серед сульфатвідновлювальних бактерій відновлювати нітрат можуть представники родів *Desulfovibrio* [11, 15, 16, 18], *Desulfobacterium* [20] і *Desulfobulbus* [21].

Умови культивування бактерій суттєво впливають на нітратредуктазну активність бактерій. За наявності у середовищі сульфату і нітрату бактерії *Desulfovibrio desulfuricans*, виділені з ґрунту рисових чеків, відновлювали тільки суль-

фат, за винятком, коли сульфат додавався у дуже низьких концентраціях (4 мкМ). За більш високих концентрацій сульфату (500 мкМ) відновлення нітрату тимчасово припинялося [9].

Описані різні шляхи регуляції нітратредукції у сульфатвідновлювальних бактерій. Нітрат, наприклад, є ефективнішим порівняно зі сульфатом, акцептором електронів для клітин *D. desulfuricans* C4S, однак індукцйбельна нітратредуктазна активність бактерій не виявлялася у клітинах, що ростуть у середовищі із надлишком сульфату [13]. Згідно з Н. Б. Тарасовою та ін., нітрат виявляє інгібуючий вплив на метаболізм *Desulfovibrio vulgaris* [6]. Деякі бактерії роду *Desulfovibrio*, у клітинах яких виявлена конститутивна нітратредуктазна активність, здатні відновлювати нітрат тільки у випадку, якщо середовище містить невелику кількість сульфату [15]. У *D. desulfuricans* DT101 нітрат і сульфат відновлювалися одночасно [11]. Нітратредуктаза *D. desulfuricans* FBA 20a індукувалася у присутності нітрату і репресувалася за наявності у середовищі сульфату [16], а у *D. desulfuricans* Essex 6 нітрат, навпаки, пригнічував сульфатредукцію [18]. Мак-Креді та ін. [15] встановили, що відновлення нітратів у бактерій роду *Desulfovibrio* пригнічує гідроген сульфід. Таку різноманітність у регуляції нітратредукції у штамів, які належать до одного виду, пов'язують з відмінностями у структурі нітратредуктази в різних штамів сульфатвідновлювальних бактерій [6].

Оскільки сульфатвідновлювальні бактерії здатні використовувати нітрат як кінцевий акцептор електронів, однак для них характерний широкий діапазон мінливості цього показника в межах одного виду [11, 15, 16, 18], метою цієї роботи було дослідити здатність сульфатвідновлювальних бактерій *D. desulfuricans* Ya-11 та *Desulfobacter* sp. відновлювати нітрати за різних умов культивування.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом дослідження були сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 та *Desulfobacter* sp.¹

Бактерії культивували у середовищі Постгейта С такого складу (г/л): калій дигідрофосфат – 0,5; амоній хлорид – 1,0; натрій сульфат – 4,5; кальцій хлорид гексагідрат – 0,06; магній сульфат гептагідрат – 0,06; натрій сульфат – 6; дріжджовий екстракт – 1; ферум сульфат гептагідрат – 0,004; натрій цитрат дигідрат – 0,3; рН середовища – 7,6 [17]. При дослідженні здатності сульфатвідновлювальних бактерій використовувати нітрати і нітрити як кінцеві акцептори електронів їх додавали у формі KNO_3 та NaNO_2 , відповідно, у модифіковане середовище Постгейта С без сульфат-йонів у концентраціях 1; 5 і 10 мМ. Бактерії вирощували у рідкому середовищі Постгейта С у пробірках об'ємом 20 мл, щільно закритих гумовими корками в атмосфері аргону при температурі +28°C, рН 7,0–7,6.

Біомасу клітин після їхнього вирощування визначали ваговим методом або турбідиметрично, використовуючи фотоелектроколориметр КФК-3 ($\lambda=340$ нм, кювета з оптичним шляхом 3 мм). Для фотоелектроколориметричного визначення біомаси клітин будували калібрувальну криву залежності екстинції від сухої маси клітин.

¹ Штами виділені із водойм Яворівського сіркового родовища і зберігаються в колекції кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка.

Кількість гідроген сульфід у культуральній рідині визначали фотометрично з використанням фотоелектроколориметра КФК-3 ($\lambda=665$ нм, кювета з оптичним шляхом 30 мм). Метод ґрунтується на взаємодії гідроген сульфід з *п*-амінодиметиланіліном з утворенням метиленової сині. Реакційна суміш мала такий склад: 0,16 мМ розчин цинк цитрату – 10 мл; дистильованої води – 1,98 мл; 4 мл розчину *п*-амінодиметиланіліну (1,15 г/л у 4 н розчині сульфатної кислоти) та 20 мкл досліджуваного розчину. Через 5 хв додавали 1 мл ферум (III) хлориду і фотометрували [19].

Сульфат у середовищі визначали турбідиметрично з використанням фотоелектроколориметра КФК-3 ($\lambda=520$ нм, кювета з оптичним шляхом 10 мм) після його осадження барій хлоридом. Для стабілізації суспензії використовували гліцерин [4].

Для визначення нітрату його попередньо відновлювали цинковим пилом до нітриту. З цією метою до проби додавали 0,3 г сухого відновника і 5 мл 12% розчину оцтової кислоти. Через 10 хв пробірки центрифугували; отриманий супернатант спектрофотометрували при $\lambda=540$ нм [5]. За калібрувальною кривою знаходили концентрацію нітриту.

Кількість амонію визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 640 нм. Для цього до 5 мл середовища додавали 5 мл фенольного реактиву (1,8% розчин фенолу), 5 мл 25%-ного розчину натрій гіпохлорату і 5 мл натрій нітропрусиду (5 мкг/мл) [7].

Для виявлення молекулярного азоту у пробірки зі середовищем з нітратом поміщали поплавки запаюючи кінцем догори.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програм Microsoft Excel 2003, OriginPro 7.0 та як описано [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Для встановлення здатності бактерій *D. desulfuricans* Ya-11 використовувати нітрат як акцептор електронів попередньо вирощені у середовищі з сульфатом клітини культивували у середовищі без SO_4^{2-} з додаванням NO_3^- у концентраціях 1; 2,5; 5 і 10 мМ. Контролем слугувало середовище, в якому єдиним акцептором електронів був сульфат. За наявності у середовищі різних концентрацій нітрату бактерії *D. desulfuricans* Ya-11 росли, а рівень нагромадження біомаси був дещо нижчим, ніж у середовищі зі сульфатами (рис. 1, а–в). Протягом чотирьох діб культивування нітрат середовища повністю відновлювався клітинами *D. desulfuricans* Ya-11 (рис. 1, б–д). Рівень нагромадження біомаси бактеріями у середовищі з 1 мМ NO_3^- був приблизно на 30% нижчим порівняно з ростом бактерій у середовищі зі сульфатом (рис. 1, а), а у середовищах з 5–10 мМ нітрату – наближався до показників контролю і становив 3–3,2 г/л (рис. 1, з–д).

Клітини бактерій, попередньо вирощені у середовищі зі сульфатом, повністю відновлювали NO_3^- (рис. 2) подібно до клітин, попередньо вирощених у середовищі, в якому єдиним акцептором електронів був нітрат. Це свідчить про конститутивну природу нітратредуктази у *D. desulfuricans* Ya-11, на відміну від штаму *D. desulfuricans* 27774 [14].

Дисиміляційна сульфат- і нітратредукція супроводжується нагромадженням у середовищі відновлених продуктів – гідроген сульфід у й амонію, відповідно.

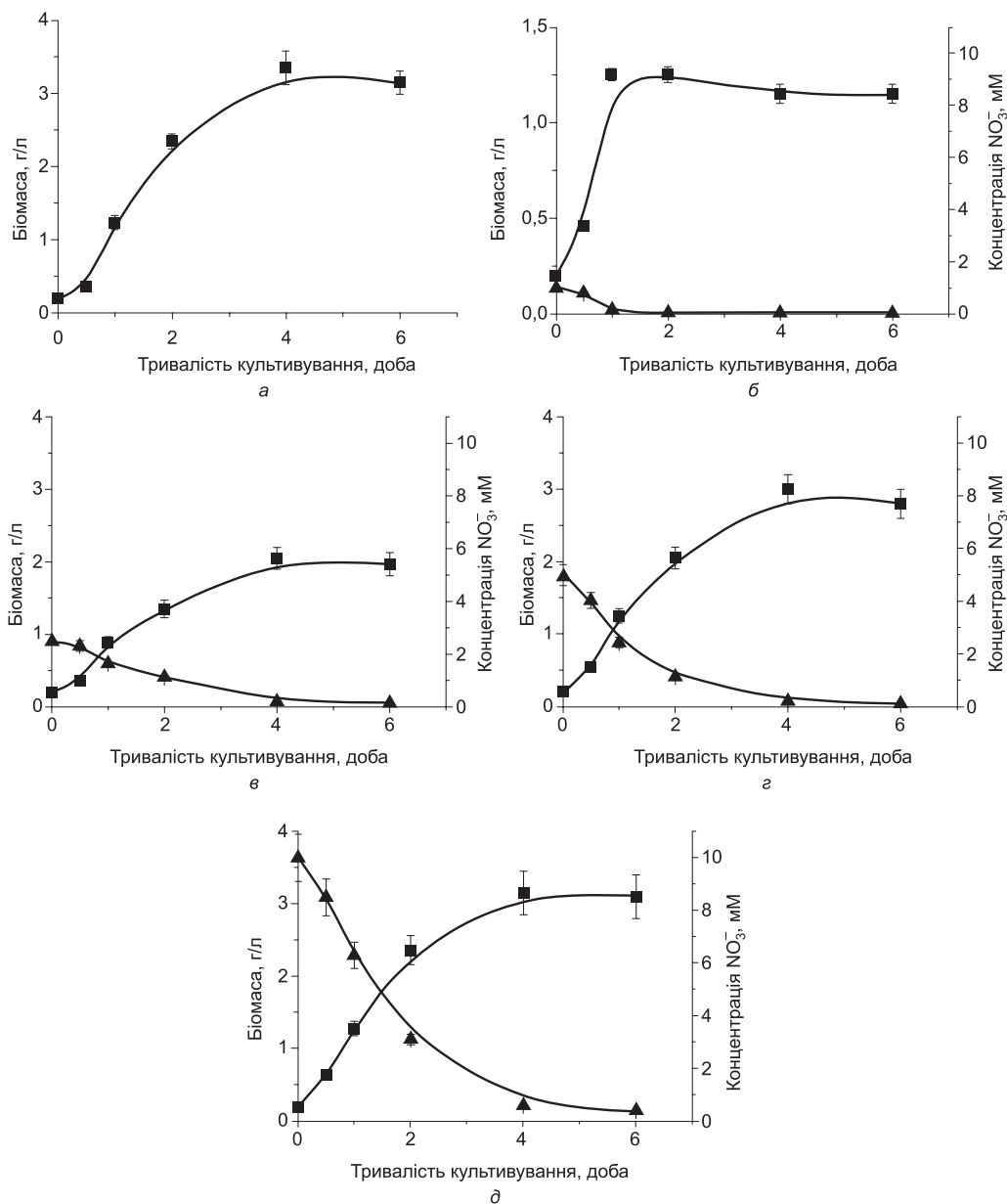


Рис. 1. Ріст (\blacksquare) та відновлення нітрату (\blacktriangle) *D. desulfuricans* Ya-11 за різної концентрації NO_3^- в середовищі: а – контроль (середовище без нітрату); б – 1 мМ; е – 2,5 мМ; з – 5 мМ; д – 10 мМ

Fig. 1. Growth (\blacksquare) and nitrate reduction (\blacktriangle) by *D. desulfuricans* Ya-11 at different NO_3^- concentrations in the medium: а – control (the medium without nitrate); б – 1 mM; е – 2.5 mM; з – 5 mM; д – 10 mM

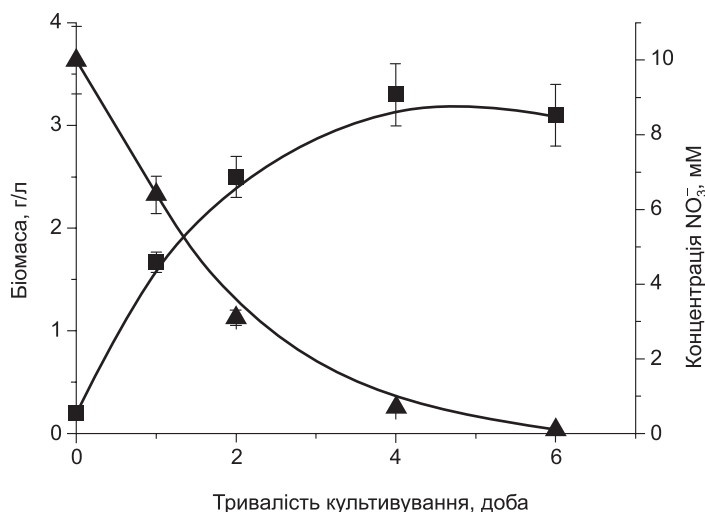


Рис. 2. Ріст (■-) і відновлення нітрату (-▲-) клітинами *D. desulfuricans* Ya-11, попередньо вирощеними у середовищі з сульфатом, за концентрації NO₃⁻ 10 мМ

Fig. 2. Growth (■-) and nitrate reduction (-▲-) by *D. desulfuricans* Ya-11 cells grown in the medium with sulfate at NO₃⁻ concentration 10 mM

Утворення гідроген сульфід у *D. desulfuricans* Ya-11 досліджено нами раніше [2, 10]. Щоб дослідити шлях редукції нітрату ми вивчали природу проміжних продуктів, що нагромаджувалися в середовищі при рості бактерій з NO₃⁻ як єдиним акцептором електронів. Оскільки в усіх експериментах з NO₃⁻ не спостерігали виділення газу, то можна вважати, що бактерії *D. desulfuricans* Ya-11 не здійснюють денітрифікації. Були визначені продукти відновлення нітрату в культурі *D. desulfuricans* Ya-11. Попередні якісні реакції на нітрити й амоній дали позитивні результати, тому в подальших експериментах була досліджена динаміка нагромадження цих сполук у процесі росту *D. desulfuricans* Ya-11 у середовищах з різними концентраціями нітрату. За наявності у середовищі нітрату в концентрації 1–2,5 мМ (рис. 3, а, б) бактерії практично повністю відновлювали його після 2–4 діб культивування, нагромаджуючи в кінцевому результаті до 2 мМ NH₄⁺. Зростання вихідної концентрації NO₃⁻ призводило до збільшення часу, необхідного для повного відновлення нітрату (рис. 3, в, г). Так, за концентрації нітрату 5, 10 мМ бактерії повністю його відновлювали через шість діб культивування, при цьому у середовищі нагромаджувалося до 3,6 і 8,5 мМ NH₄⁺, відповідно.

На ранніх етапах культивування бактерій у середовищі з нітратом у всіх випадках спостерігали нагромадження NO₂⁻ (див. рис. 3). Відмиті клітини *D. desulfuricans* Ya-11 використовували нітрит середовища і перетворювали їх до NH₄⁺ (рис. 4). За три доби інкубації суспензії клітин *D. desulfuricans* Ya-11 2,5 мг/мл повністю відновлювала NO₂⁻ середовища, де його концентрація становила 5 мМ.

Для дослідження здатності бактерій *D. desulfuricans* Ya-11 використовувати сульфати і нітрати за різної вихідної концентрації останніх їх культивували у середовищі з 1; 5 та 10 мМ NO₃⁻. Як видно з рис. 5, бактерії добре росли у контрольному середовищі (без нітрату) і протягом семи діб культивування використали 95%

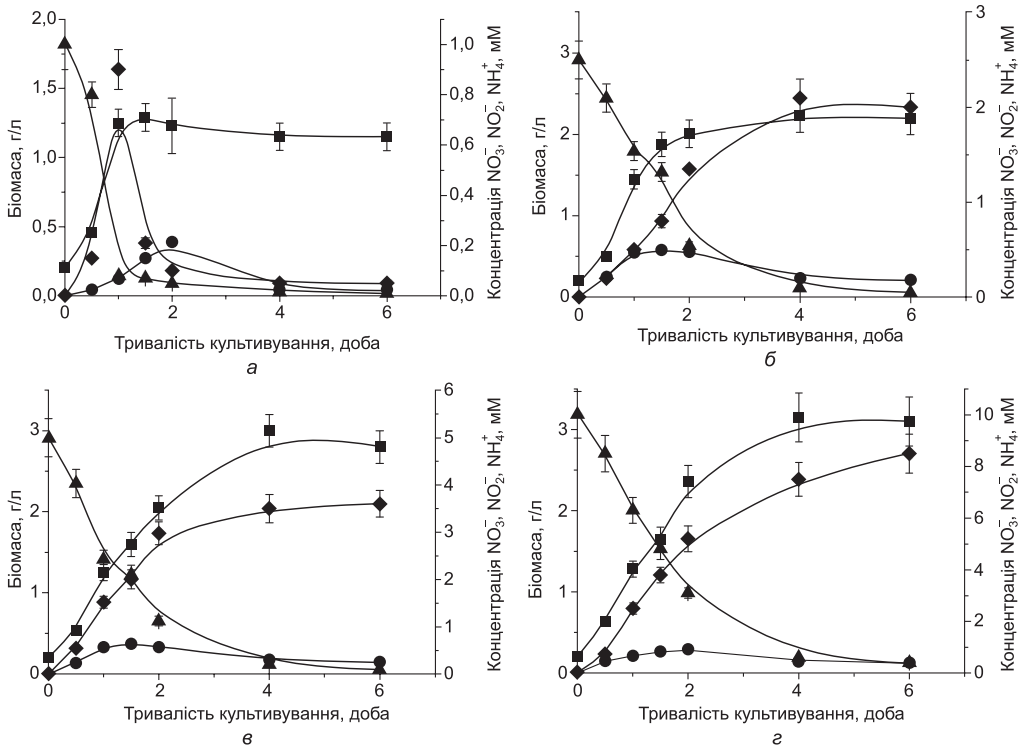


Рис. 3. Ріст бактерій *D. desulfuricans* Ya-11 (■-), використання нітрату (-▲-) утворення NO_2^- (-●-) та NH_4^+ (-◆-) у середовищі з різною концентрацією NO_3^- : а – 1 мМ; б – 2,5 мМ; в – 5 мМ; г – 10 мМ

Fig. 3. Growth of *D. desulfuricans* Ya-11 cells (■-), utilization of nitrate-ions (-▲-), production of NO_2^- (-●-) and NH_4^+ (-◆-) in the medium with different NO_3^- concentrations: а – 1 mM; б – 2.5 mM; в – 5 mM; г – 10 mM

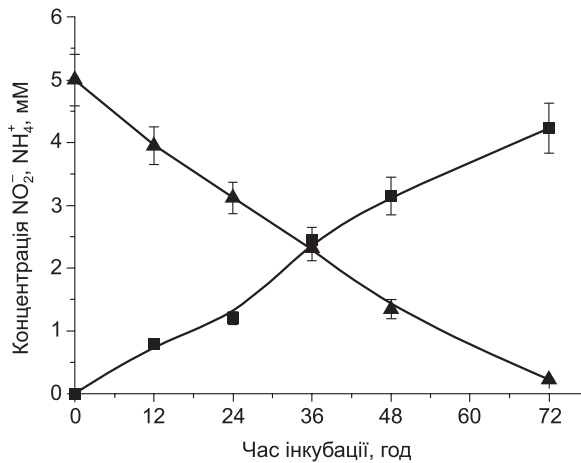


Рис. 4. Використання NO_2^- (-▲-) і утворення NH_4^+ (-■-) бактеріями *D. desulfuricans* Ya-11

Fig. 4. Consumption of NO_2^- (-▲-) and NH_4^+ production (-■-) by *D. desulfuricans* Ya-11 bacteria

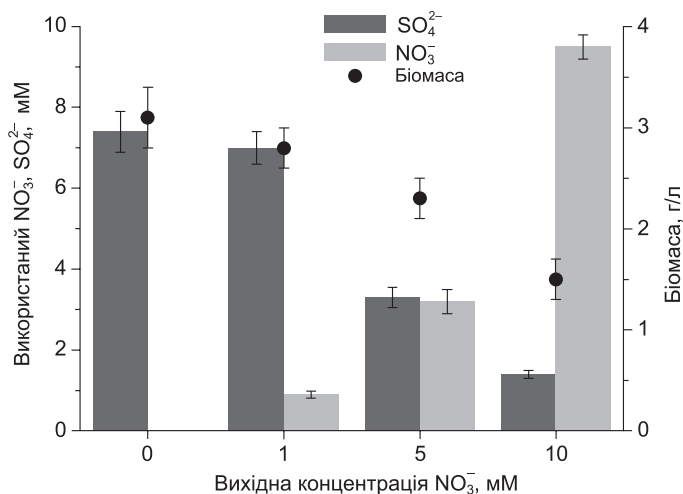


Рис. 5. Використання SO_4^{2-} і NO_3^- бактеріями *D. desulfuricans* Ya-11 за різних вихідних концентрацій нітрату

Fig. 5. Consumption of SO_4^{2-} and NO_3^- by *D. desulfuricans* Ya-11 bacteria at different initial concentrations of NO_3^- nitrate

внесеного сульфату. Додавання до середовища 1 мМ нітрату практично не впливало на рівень використання сульфату, а за наявності 5–10 мМ NO_3^- бактерії використали близько 40% SO_4^{2-} . Внесення 10 мМ нітрату призводило до суттєвого зменшення рівня використаного сульфату.

Нітрати належать до небезпечних забруднювачів навколишнього середовища. Зростання їхньої концентрації у ґрунтах і водоймах призводить до зниження вмісту кисню у ґрунті, а це сприяє підвищеному виділенню в атмосферу двох парникових газів – окису азоту і метану. Основні шляхи детоксикації нітратів у прокаріот – це денітрифікація і амоніфікація [8, 12]. Однак у зоні помірного клімату ці процеси сильно сповільнюються в холодну пору року. Раніше ми повідомляли про те, що з водойм Язівського сіркового родовища виділили психрофільні штами сульфатвідновлювальних бактерій, які інтенсивно відновлюють сульфати до гідроген сульфід у низьких температур [3]. Дослідження здатності відновлювати нітрат бактеріями *Desulfobacter* sp. показало, що максимальне відновлення нітрату спостерігали за температури +4...+12°C (рис. 6). Протягом семи діб культивування бактерії відновлювали понад 90% внесеного у середовище нітрату за температури +12°C.

Таким чином, сульфатвідновлювальні бактерії *D. desulfuricans* Ya-11 і *Desulfobacter* sp., крім сульфату, як акцептор електронів можуть використовувати нітрат. Засвоєння нітрату спостерігається як за відсутності сульфатів, так і за їхньої наявності у середовищі. Кінцевим продуктом цього процесу у *D. desulfuricans* Ya-11 є амоній. Високі концентрації нітратів інгібують процес сульфатредукції. За концентрації NO_3^- 1 мМ процес відновлення сульфатів не зазнає помітних змін.

Описані штами сульфатвідновлювальних бактерій можуть бути перспективними для біоремедіації середовища від нітратів і сульфатів.

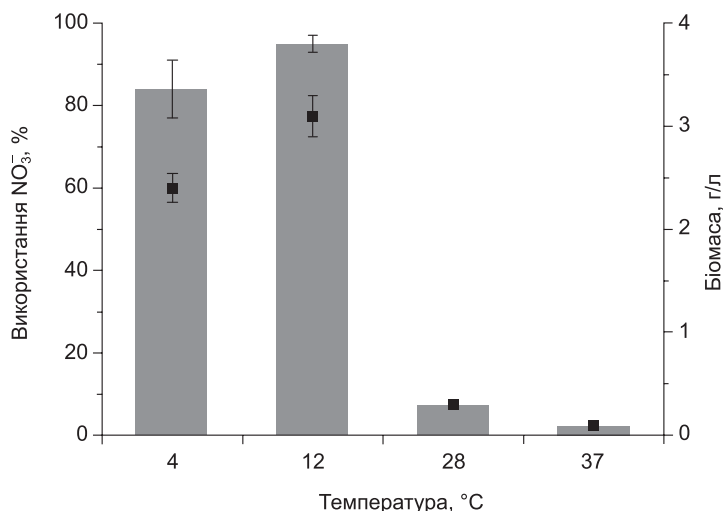


Рис. 6. Використання нітрату і нагромадження біомаси (■) психрофільними сульфатвідновлювальними бактеріями *Desulfobacter* sp. за різних температур (концентрація NO_3^- – 5 мМ)

Fig. 6. Nitrate consumption and growth (■) of psychrophilic sulfate-reducing bacteria *Desulfobacter* sp. at different temperatures (NO_3^- concentration – 5 mM)

1. **Лакин Г. Ф. Биометрия.** М.: Высш. школа, 1990. 352 с.
2. **Перетятко Т., Гнатуш С., Гудзь С.** Утворення сульфиду *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 за різних умов культивування. **Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.**, 2007; 43: 180–184.
3. **Перетятко Т. Б., Гудзь С. П.** Психрофільні штами сульфатвідновлювальних бактерій. **Мікробіологія і біотехнологія**, 2009; 3(7): 76–82.
4. **Почвы.** Метод определения ионов сульфата в водной вытяжке. **ГОСТ 26426-85.** М.: Изд-во стандартов, 1985.
5. **Сибірна Н. О., Маєвська О. М., Барська М. Л.** Дослідження окремих показників за умов окисативного стресу: Навч.-метод. посібник. – Львів: Видавн. центр ЛНУ імені Івана Франка, 2006. 60 с.
6. **Тарасова Н. Б., Горшков О. В., Петрова О. Е.** Нитратредуктазная активность *Desulfovibrio vulgaris* VKM 1388. **Мікробіологія**, 2009; 78(2): 192–196.
7. **Albert L.** Chemical laboratory. **McCollum-Pratt Institute**, 1961; 2: 16–36.
8. **Cole J.A.** Assimilatory and dissimilatory reduction of nitrate to ammonia / **The Nitrogen and Sulphur Cycles.** J.A. Cole and J. Ferguson (ed.). Society for General Microbiology Symposium 42. Cambridge University Press, 1987. P. 281–329.
9. **Dalsgaard T., Bak F.** Nitrate reduction in a sulfate-reducing bacterium, *Desulfovibrio desulfuricans*, isolated from rice paddy soil: sulfide inhibition, kinetics, and regulation. **Appl. Environ. Microbiol.**, 1994; 60(1): 291–297.
10. **Halushka A., Kushkevych I., Peretyatko T. et al.** Bacteria of sulfur cycle: morphological and physiological characteristics, the role in production and utilization of hydrogen sulfide. **2nd Polish-Ukrainian Weigl Conference „Microbiology in the XXI century”** (24–26 September 2007). Warsaw Agricultural University, SGGW, 2007. P. 100–103.
11. **Keith S.M., Herbert R.A.** Dissimilatory nitrate reduction by a strain of *Desulfovibrio desulfuricans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 1983; 18(1–2): 55–59.
12. **Knowles R.** Denitrification. **Microbiol. Rev.**, 1982; 46(1): 43–70.

13. Krekeler D., Cypionka H. The preferred electron acceptor of *Desulfovibrio desulfuricans* CSN. **FEMS Microbiol. Ecol**, 1995; 17(4): 271–278.
14. 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. **J. Bacteriol**, 2009; 191(3): 882–889.
15. McCready R.G.L., Gould W.D., Cook F.D. Respiratory nitrate reduction by *Desulfovibrio* sp. **Arch. Microbiol**, 1983; 135(3): 182–185.
16. Mitchell G.J., Jones J.G., Cole J.A. Distribution and regulation of nitrate and nitrite reduction by *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* species. **Arch. Microbiol**, 1986; 144(1): 35–40.
17. Postgate J.R. **The sulfate-reducing bacteria**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1984. 199 p.
18. Seitz H.J., Cypionka H. Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans* with hydrogen coupled to ammonification of nitrate or nitrite. **Arch. Microbiol**, 1986; 146(1): 63–67.
19. Sugiyama M. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen sulfide / **United States Patent № 6340596**, 2002.
20. Szewzyk R., Pfennig N. Complete reduction of catechol by the strictly anaerobic sulfate-reducing *Desulfohalobium* *catecholicum* sp. nov. **Arch. Microbiol**, 1987; 147(2): 163–168.
21. Widdel F., Pfennig N. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfohalobium propionicum* gen. nov., sp. nov. **Arch. Microbiol**, 1982; 131(4): 360–365.

THE ABILITY OF SULFATE-REDUCING BACTERIA *DESULFOVIBRIO DESULFURICANS* YA-11 І *DESULFOBACTER* SP. TO USE NITRATE AS ELECTRON ACCEPTOR

T. B. Peretyatko, S. P. Gudz

Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: t_peretyatko@franko.lviv.ua

The ability of *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 bacteria to use nitrate as terminal electron acceptor was studied. The level of biomass accumulation in the medium with nitrate changed depending on the initial NO₃⁻ concentration. At nitrate concentration 5 mM the bacterial biomass was the same as in the medium with sulfate. The intermediate product of nitrates reduction in *D. desulfuricans* Ya-11 is nitrite, and the final one – ammonium. High nitrates concentrations in the medium inhibit the process of dissimilatory sulfate reduction. Washed cells of *D. desulfuricans* Ya-11 fully reduced nitrite of the medium to ammonium. The ability of psychrophilic sulfate-reducing bacteria *Desulfohalobium* sp. to reduce nitrates at low temperatures is demonstrated.

Key words: sulfate-reducing bacteria, nitrate, electron acceptor.

СПОСОБНОСТЬ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ *DESULFOVIBRIO DESULFURICANS* YA-11 И *DESULFOBACTER* SP. ИСПОЛЬЗОВАТЬ НИТРАТ В КАЧЕСТВЕ АКЦЕПТОРА ЭЛЕКТРОНОВ

Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь

Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: t_peretyatko@franko.lviv.ua

Исследована способность бактерий *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 использовать нитрат в качестве конечного акцептора электронов. В среде с нитратом уровень биомассы изменялся в зависимости от исходной концентрации NO_3^- . При концентрации нитрата 5 мМ биомасса бактерий существенно не отличалась от таковой в среде с сульфатом. Промежуточным продуктом восстановления нитрата у *D. desulfuricans* Ya-11 является нитрит, а конечным – аммоний. Высокие концентрации нитрата ингибируют процесс диссимиляционного восстановления сульфатов. Отмытые клетки *D. desulfuricans* Ya-11 полностью восстанавливали нитрит в аммоний. Показана способность психрофильной сульфат-редуцирующей бактерии *Desulfobacter* sp. восстанавливать нитрат при низких температурах.

Ключевые слова: сульфатвосстанавливающие бактерии, нитрат, акцептор электронов.

Одержано: 06.07.2011