



УДК 579.26:579.811.26:546.3

ВПЛИВ ДЕЯКИХ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ФОТОСИНТЕЗУВАЛЬНІ СІРКОБАКТЕРІЇ *LAMPROCYSTIS SP.*

I. В. Кушкевич, С. О. Гнатуш, С. П. Гудзь

*Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, 79005 Львів, Україна
e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net*

Вивчено ріст фототрофних сіркобактерій *Lamprocystis sp.* за впливу CdSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ та CuSO_4 у концентраціях 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 та 2,5 мМ (у перерахунку на концентрацію металу). У контрольне середовище не вносили солі металу. Показано, що найсильніше пригнічувало ріст внесення у середовище CuSO_4 , дещо менший вплив виявляв $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Ці солі в концентрації 0,5 мМ і вище зменшували нагромадження біомаси на 85 і 59%, відповідно. Внесення CdSO_4 чи ZnSO_4 призводило до зниження біомаси лише при високих концентраціях солей у середовищі.

Визначено якісний і кількісний склад основних фотосинтезувальних пігментів у клітинах за цих умов. Внесення солей важких металів у середовище культивування бактерій *Lamprocystis sp.* зменшує вміст пігментів у клітинах, що викликає пригнічення ростових процесів культури.

Ключові слова: Кадмій, Цинк, Плюмбум, Купрум, сіркобактерії, бактеріохлорофіли, каротиноїди.

Важкі метали є небезпечними забруднювачами довкілля. Потрапляючи у ґрунт із газопиловими викидами промислових підприємств, автотранспорту, з домішками добрив, пестицидів, вони нагромаджуються в ньому до небезпечних концентрацій і негативно впливають на ґрунтову біоту, рослини, тварини. По трофічних ланцюгах іони важких металів можуть потрапляти в організм людини і завдати шкоди її здоров'ю [2].

Тривале застосування для зрошення забрудненої стічної води або мінеральних, органічних добрив і пестицидів, що мають у своєму складі домішки важких металів, призводить до нагромадження останніх на сільськогосподарських угіддях. Високий їх вміст негативно впливає на ґрунтову мікрофлору [3]. У забруднених іонами металів ґрунтах відзначають зниження інтенсивності основних мікробіологічних процесів, зокрема процесів трансформації органічних і неорганічних сполук.

Для реабілітації забруднених ґрунтів застосовують різні меліоранти, які здатні зменшувати рухливість і токсичність сполук важких металів. Як меліоранти часто використовують різні сорбенти й органічні добрива, котрі закріплюють солі важких металів в орґано-мінеральних комплексах [11].

Джерелом забруднення водойм є стічні води заводів, які містять розчини сполук важких металів. Це призводить до погіршення якості води та робить неможливим перебування в ній водних гідробіонтів [2].

Солі важких металів у природних водах перебувають у розчиненому й адсорбованому стані, що визначається хімічним складом води, температурою та значеннями рН. Потрапляючи у воду в іонній формі, вони нагромаджуються в осаді у вигляді гідрооксидів, карбонатів, сульфідів або фосфатів. Вміст сполук різних металів у водоймах коливається у широкому діапазоні значень [12].

Відомо, що мікроорганізми чутливо реагують на зміни факторів навколишнього середовища. У ґрунтах і водоймах, забруднених важкими металами, пригнічується розвиток окремих груп мікроорганізмів, їхня біохімічна активність, змінюється склад мікробних угруповань [3]. Мікроорганізми по-різному реагують на вміст важких металів у середовищі. Одні з них здатні активно транспортувати метали в клітину, інші осаджують їх на поверхні клітини у вигляді нерозчинних сполук [6]. За токсичністю важкі метали розміщуються у такій послідовності: ртуть, срібло, мідь, кадмій, цинк, свинець, хром, нікель, кобальт [1]. Але цей порядок змінюється залежно від виду мікроорганізму і від форми, у якій цей метал присутній у середовищі [11]. Недисоційовані солі й іони, які утворюють комплекси, зазвичай менш токсичні, ніж іони металів. Є дані про вплив важких металів на ціанобактерії, які здійснюють оксигенний фотосинтез [9]. Однак у літературі відсутні дані про вплив важких металів на велику групу мікроорганізмів, здатних здійснювати аноксигенний фотосинтез, – пурпурові сіркобактерії. Пурпурові сіркобактерії виділяють із водойм, збагачених сірководнем [5]. У ґрунтах їх мало, але кількість різко збільшується при затопленнях. Зроблено перші кроки до практичного використання фототрофних бактерій для очищення стічних вод.

Метою роботи було вивчення росту, якісного та кількісного складу пігментів фототрофних сіркових бактерій *Lamprocystis* sp. за впливу солей важких металів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використовували фотосинтезувальні сіркобактерії *Lamprocystis* sp., виділені з водойм Яворівського сіркового родовища.

Бактерії вирощували у рідкому середовищі Ван Ніля такого складу (г/л): амоній хлорид – 1; магній хлорид – 0,5; калій дигідрофосфат – 1; натрій хлорид – 1; натрій гідрокарбонат – 5; натрій сульфід наногідрат – 1; вода дистильована – 1 л, мікроелементи. Середовище стерилізували в автоклаві при 1 атм.

10%-ні розчини натрій гідрокарбонату та натрій сульфід наногідрату стерилізували окремо і вносили у середовище перед засівом культур бактерій. рН середовища доводили 10%-м розчином фосфатної кислоти до 7,5. Після цього стерильно вносили розчин вітаміну В₁₂ (5 мкг/л).

Для нагромадження біомаси бактерії *Lamprocystis* sp. культивували протягом 10 діб за анаеробних умов при температурі +25°C і постійному освітленні лампою розжарювання з використанням червоного світлофільтра. Анаеробних умов досягали, заповнюючи пробірки місткістю 20 мл середовищем так, щоб під гумовим корком не залишалося повітря.

У середовище вносили солі металів: CdSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ та CuSO_4 у концентраціях 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 та 2,5 мМ (у перерахунку на концентрацію металу). У контрольне середовище не вносили солі металу.

Біомасу культури визначали турбідометрично, використовуючи КФК-3 ($\lambda=660$ нм, оптичний шлях 3 мм), на першу, другу, третю, четверту, шосту, восьму та десятю доби росту.

Для визначення якісного та кількісного складу фотосинтезувальних пігментів висушені клітини бактерій руйнували розтиранням із кварцовим піском [8]. Для цього суспензію *Lamprocystis sp.* центрифугували протягом 45 хв при 8000 об/хв. Надосадову рідину зливали, а одержану біомасу наносили на поверхню скла і висушували при температурі $+40^\circ\text{C}$ [10].

Пігменти екстрагували сумішшю етанолу й ацетону (1:1) з висушеної біомаси до повного знебарвлення осаду. Одержані екстракти використовували для реєстрації спектрів поглинання [8, 14, 15].

Хроматографічне розділення пігментів проводили на силуфолових пластинках („Sorbfil”, Росія) у висхідному потоці розчинника бензин:ацетон:петролейний ефір:гексан (10:10:3:10). Стандартними зразками (свідками) були астаксантин із панцира креветок та β -каротин із клітин гриба *Blakeslea trispora*.

Ідентифікацію пігментів проводили за забарвленням на хроматограмах, величинами *Rf* та максимумами поглинання при різних довжинах хвиль [16].

Спектри поглинання екстрагованих пігментів реєстрували на двопроменевому спектрофотометрі „Spercord M-40”. Вміст пігментів розраховували на 1 г сухої маси за формулою:

$$A = \frac{C \cdot V \cdot K}{H},$$

де *A* – кількість пігменту, мг/г, *C* – концентрація пігменту, г/л; *V* – об’єм екстракту, мл; *H* – наважка клітин, г; *K* – відношення об’єму елюату до об’єму розчину, нанесеного на хроматограму.

Концентрацію пігментів розраховували за формулою:

$$A = \frac{D}{E \cdot l},$$

де *D* – оптична густина розчину, *E* – питомий коефіцієнт екстинкції пігменту, $\text{л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; *l* – товщина поглинаючого шару, см.

Статистичні показники вираховували із експериментальних даних. Для оцінки достовірності різниці між статистичними параметрами альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента [7]. Достовірною вважалася різниця при $P > 0,95$. Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програму Origin.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Виділена з водойм Яворівського сіркового родовища культура при мікроскопуванні мала розміри клітин від 3 до 3,5 мкм. Клітини бактерій були сферичними, кокподібними, овальними, містили газові вакуолі. Рухомі. Колір колоній при рості на агаризованому середовищі Ван Ніля від рожевого до фіолетового, клітини утворюють несиметричні скупчення. Найінтенсивніший ріст спостерігали при температурі 26°C . Перед поділом клітини набували диплококоподібної форми. Розмножувались бактерії бінарним поділом. За Грамом фарбувалися негативно. Культура ідентифікована як *Lamprocystis sp.* [4, 13].

Бактерії вирощували протягом 10 діб у середовищі Ван Ніля, в яке вносили кадмій сульфат, цинк сульфат, п्लумбум нітрат або купрум сульфат у різних концентраціях.

Як видно з рис. 1, при вирощуванні культури *Lamprocystis* sp. у середовищі Ван Ніля без солей важких металів біомаса була максимальною. Вона зростала до шостої – восьмої доби.

Криві, що відображають ріст бактерій за досліджуваних концентрацій кадмій сульфату (рис. 1, а), схожі в часі з контрольним варіантом, проте біомаса була меншою в кожній точці, коли проводилося вимірювання. Так, за концентрації 1,5 мМ біомаса зменшилася на 24% на восьму добу порівняно з контролем. Кадмій сульфат концентрацією 2,5 мМ спричинив суттєве інгібування росту. Біомаса *Lamprocystis* sp. зменшилася на 64% на восьму добу порівняно з контролем.

Цинк сульфат у концентрації 0,5 мМ спричинив незначне зменшення біомаси на шосту добу росту, хоча спостерігали уповільнення ростових процесів до четвер-

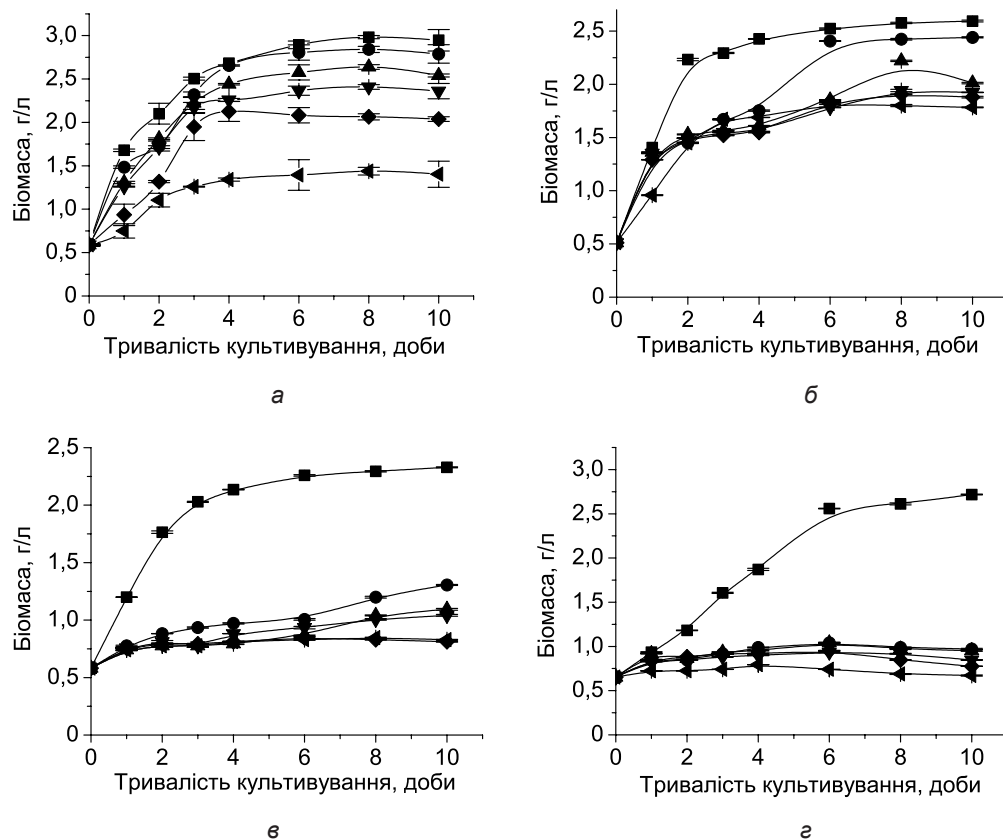


Рис. 1. Ріст культури *Lamprocystis* sp. у середовищі Ван Ніля за різних концентрацій солей важких металів: а – CdSO_4 ; б – ZnSO_4 ; в – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; г – CuSO_4
 -■- – Контроль; -●- – 0,5 мМ; -▲- – 1,0 мМ; -▼- – 1,5 мМ; -◆- – 2,0 мМ; -◄- – 2,5 мМ

Fig. 1. Grows of *Lamprocystis* sp. culture in Van Niel medium at different heavy metals salts concentrations: а – CdSO_4 ; б – ZnSO_4 ; в – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; г – CuSO_4
 -■- – Control; -●- – 0,5 mM; -▲- – 1,0 mM; -▼- – 1,5 mM; -◆- – 2,0 mM; -◄- – 2,5 mM

тої доби. Збільшення солі металу в середовищі до 1 мМ спричинило призупинення росту від третьої до шостої доби, після чого ріст відновився до восьмої доби. За наявності 1,5 і 2,0 мМ $ZnSO_4$ в середовищі ріст культури спостерігали лише до третьої доби, після чого він уповільнювався (рис. 1, б).

Плюмбум нітрат у концентрації 0,5 мМ пригнічував нагромадження біомаси на 59% на десятю добу, порівняно з контролем. При збільшенні концентрації металу до 2,0 і 2,5 мМ росту не спостерігали (рис. 1, в).

Купрум сульфат у концентрації 0,5 мМ спричиняв пригнічення процесу нагромадження біомаси на 85% порівняно з контролем на десятю добу. За вищих концентрацій ріст культури не спостерігали (рис. 1, г).

Порівнявши графіки кривих росту бактерій *Lamprocystis sp.*, можна зробити висновок, що солі важких металів негативно впливають на ріст культури. Купрум сульфат і плюмбум нітрат значно пригнічують ріст бактерій у досліджуваних концентраціях упродовж культивування. Кадмій сульфат меншою мірою призводить до інгібування росту сіркобактерій. Цинк сульфат чинить менший інгібуючий вплив на ріст досліджуваних бактерій. Однак, за впливу 0,5–1,5 мМ цієї солі спостерігали уповільнення ростових процесів протягом 2–3 доби, після чого ріст відновлювався.

Таким чином, для бактерій *Lamprocystis sp.* найсильніше пригнічувало ріст внесення у середовище $CuSO_4$, дещо менший вплив виявляв $Pb(NO_3)_2$. Ці солі в концентрації 0,5 мМ і вище знижували нагромадження біомаси на 85 і 59%, відповідно. Внесення $CdSO_4$ чи $ZnSO_4$ призводило до зниження нагромадження біомаси лише при високих концентраціях солей у середовищі.

Основними пігментами пурпурових бактерій *Lamprocystis sp.* є бактеріохлорофіли та каротиноїди, склад і співвідношення яких визначають забарвлення бактерій [3].

Досліджували якісний і кількісний склад фотосинтезувальних пігментів бактерій *Lamprocystis sp.* за впливу різних концентрацій солей важких металів, зокрема, кадмію, цинку, плюмбуму та купруму.

На основі результатів хроматографічного розділення та спектрального аналізу екстрактів клітин проведено ідентифікацію пігментів бактерій *Lamprocystis sp.* (див. табл.).

Таблиця

Хроматографічна характеристика пігментного складу бактерій *Lamprocystis sp.*

Chromatographic characteristics of *Lamprocystis sp.* pigments composition

Назва пігменту	Колір пігменту	Спектри поглинання, λ, нм	Значення Rf
Бактеріохлорофіл а	Яскраво-зелений	391, 530, 697, 773	0,19
Спірилоксантин	Рожевий	471–483	0,42
Лікопін	Жовтий	434–504	0,55
Родопін	Яскраво-пурпуровий	587	0,83

У розчині екстрагованих пігментів основні максимуми поглинання спостерігали при 391, 471–483, 434–504, 530, 587, 697, 773 нм (рис. 2–4). Досліджувані бактерії містять каротиноїди спірилоксантинового ряду, зокрема спірилоксантин, лікопін і родопін, а також бактеріохлорофіл а.

Внесення CdSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 не спричиняло змін якісного складу пігментів. Внесення $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ в концентрації 2,5 мМ призводило до зсуву піку з 530 нм у довгохвильову ділянку спектра та до його відсутності в ділянці 697 нм.

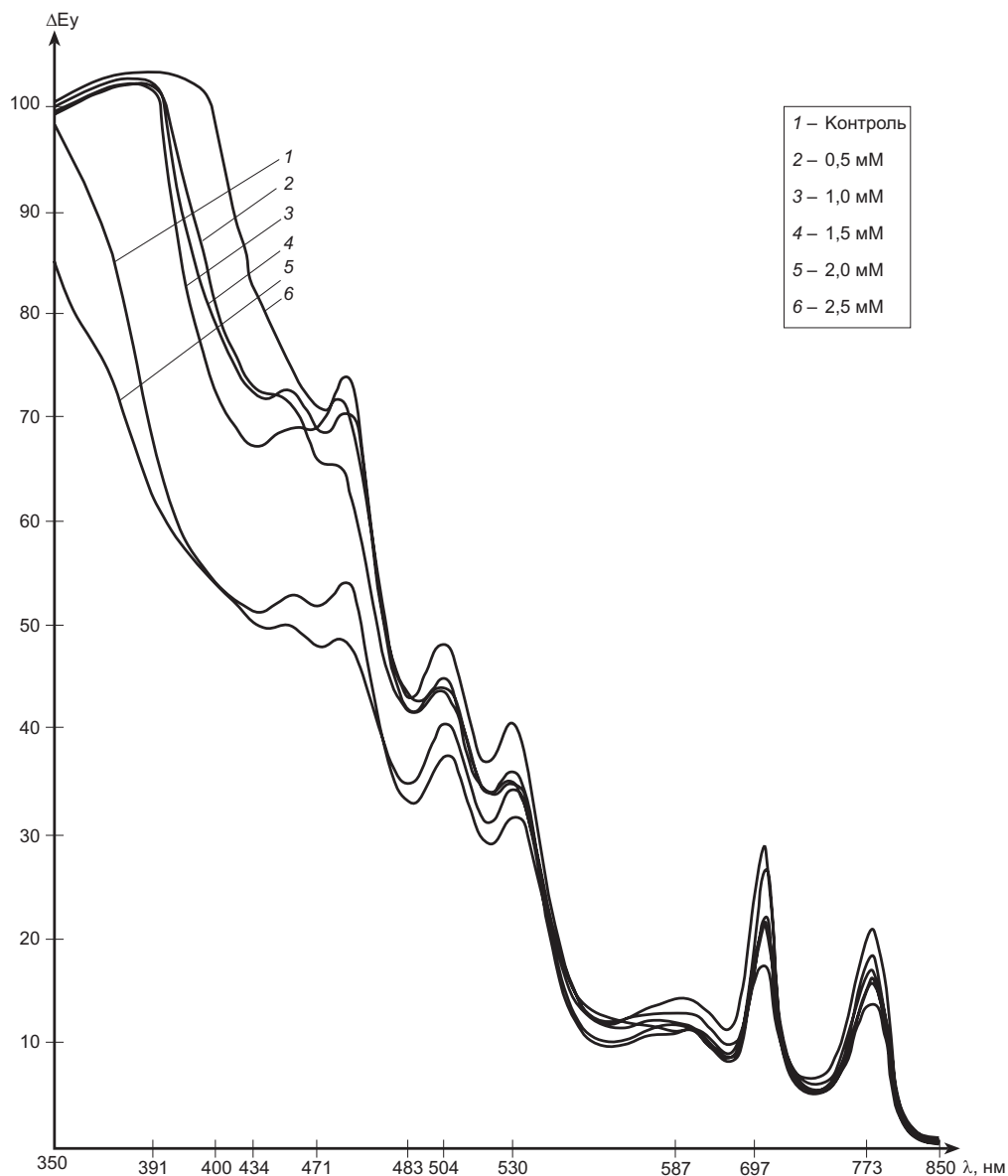


Рис. 2. Спектри поглинання пігментів *Lamprocystis* sp., вирощених за різних концентрацій CdSO_4

Fig. 2. Absorption spectra of pigments of *Lamprocystis* sp. grown at different CdSO_4 concentrations

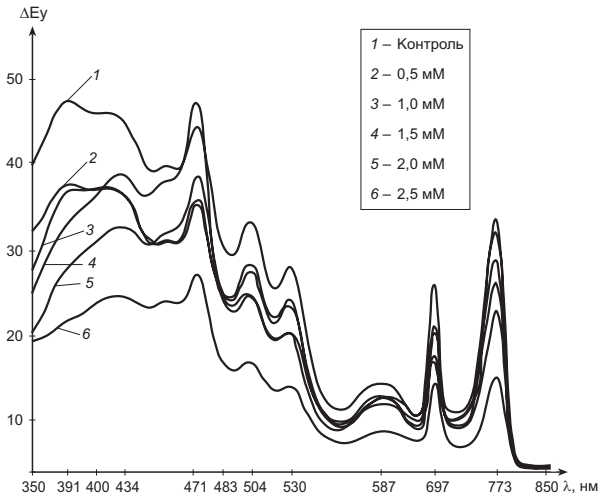


Рис. 3. Спектри поглинання пігментів *Lamprocystis sp.*, вирощених за різних концентрацій $ZnSO_4$

Fig. 3. Absorption spectra of pigments of *Lamprocystis sp.* grown at different $ZnSO_4$ concentrations

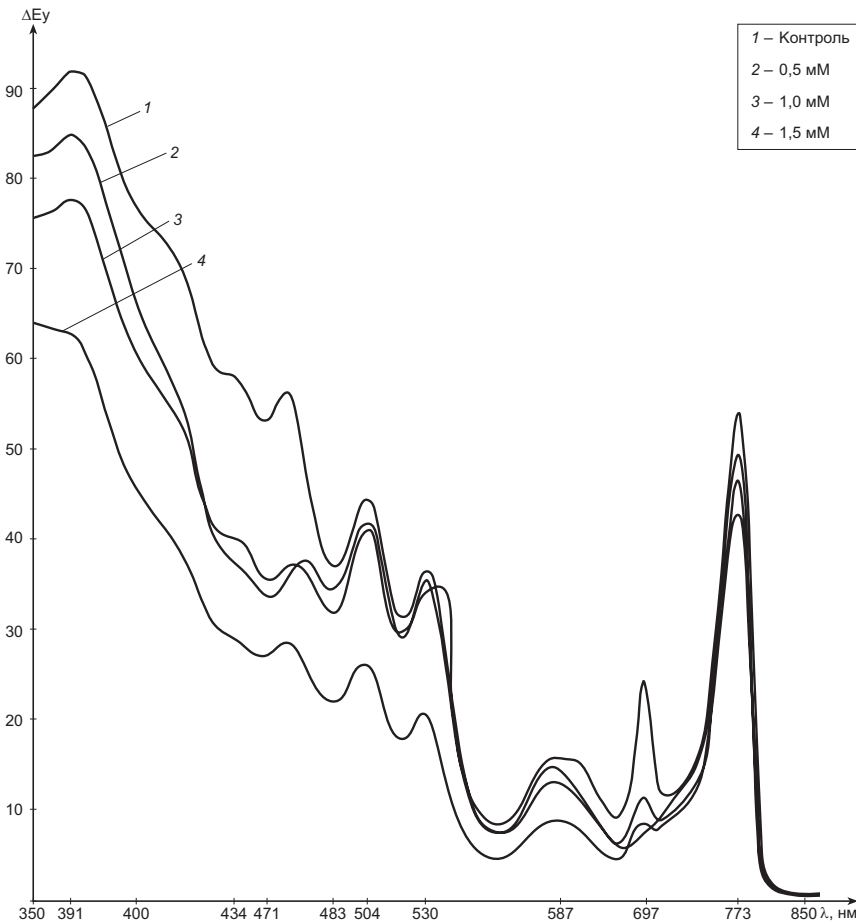


Рис. 4. Спектри поглинання пігментів *Lamprocystis sp.*, вирощених за різних концентрацій $Pb(NO_3)_2$

Fig. 4. Absorption spectra of pigments of *Lamprocystis sp.* grown at different $Pb(NO_3)_2$ concentrations

У клітин досліджуваних бактерій найбільше було каротиноїдів, значно менше – бактеріохлорофілу *a*. При рості культури *Lamprocystis* sp. у контрольному середовищі (без солі металу) вміст усіх пігментів був найвищим (рис. 5).

Внесення солі кадмію у середовище культивування спричинило суттєве зменшення кількості фотосинтезувальних пігментів у клітинах бактерій *Lamprocystis* sp. За найвищої досліджуваної концентрації CdSO_4 кількість каротиноїдів спірилоксантину, лікопіну та родопіну зменшилася відповідно на 33, 67 та 67%. Вміст бактеріохлорофілу *a* за цих умов зменшився на 18%.

Досліджуючи вплив ZnSO_4 на кількість пігментів пурпурових сіркобактерій, також відмітили їх зменшення. При збільшенні концентрації до 2,5 мМ цинк сульфату вміст спірилоксантину лікопіну зменшився на 10%, родопіну – на 5%. Вміст бактеріохлорофілу *a* змінювався аналогічно до каротиноїдів. Загалом відзначили зменшення вмісту пігменту на 12%, порівняно з контролем.

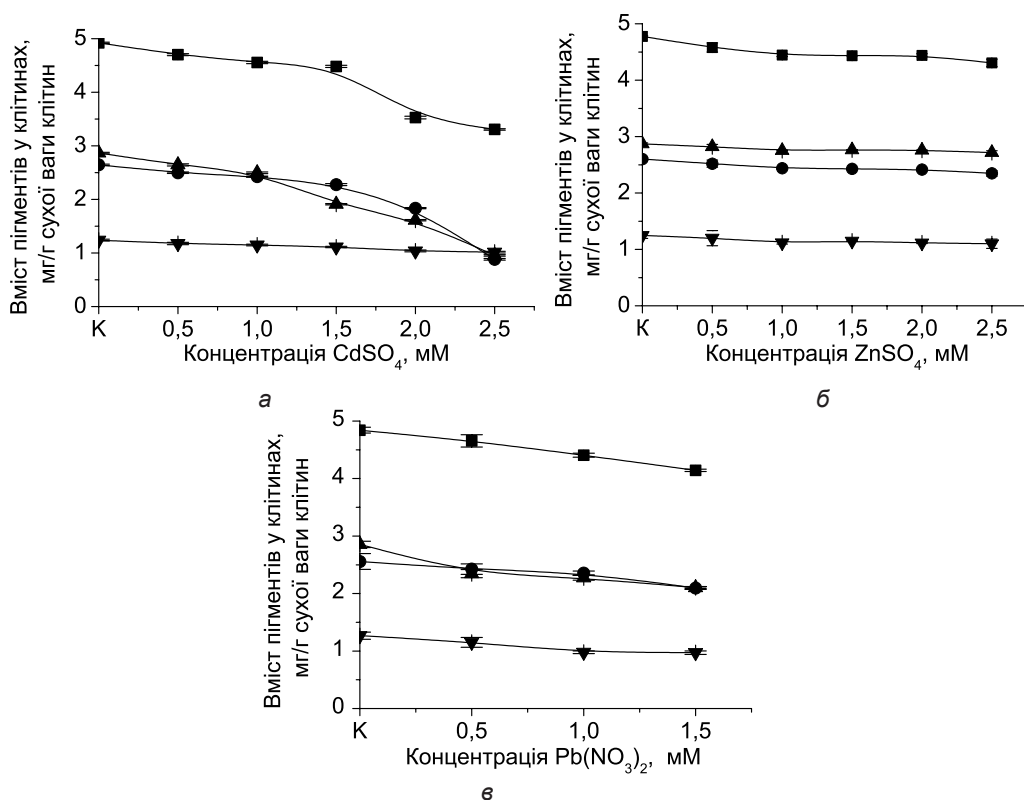


Рис. 5. Вміст фотосинтезувальних пігментів у клітинах бактерій *Lamprocystis* sp. за впливу різних концентрацій солей металів: а – CdSO_4 ; б – ZnSO_4 ; е – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$
 ■ – спірилоксантин; ● – лікопін; ▲ – родопін; ▼ – бактеріохлорофіл а

Fig. 5. Photosynthetic pigments content in *Lamprocystis* sp. cells under the influence of different heavy metal salts concentrations: а – CdSO_4 ; б – ZnSO_4 ; е – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$;
 ■ – spirilloxanthine; ● – lycopene; ▲ – rodopene; ▼ – bacteriochlorophyll a

За впливу 1,5 мМ пльмбум нітрату кількість спірилоксантину зменшилася на 14%, лікопіну та бактеріохлорофілу *a* – на 18%, родопіну – на 26%.

Таким чином, внесення солей важких металів у середовище культивування бактерій *Lamprocystis sp.* знижує вміст пігментів у клітинах, що викликає пригнічення ростових процесів культури.

1. Буракаева А.Д., Русанов А.М., Лантух В.П. Роль микроорганизмов в очистке сточных вод. **Методическое пособие**. Оренбург: ОГУ, 1999. 54 с.
2. Иутинская Г.А., Антипчук А.Ф., Валагурова Е.В. и др. Структура микробиологического мониторинга почв как составной части биологического мониторинга. **Технические и системные средства экологического мониторинга почв**. 1998: 63–68.
3. Іутинська Г.О., Петруша З.В., Васильєва Т.В., Сопліна О.М. Токсичність і мутагенність важких металів – забруднювачів ґрунту. **Современные проблемы токсикологии**. 2000; 2: 53–56.
4. Кім Л.Я., Баран І.М., Федорович А.М. та ін. Пігменти фототрофних зелених та пурпурових сіркобактерій водойм Яворівського сіркового родовища. III з'їзд Укр. біофіз. т-ва. Львів, 2002. 128 с.
5. Кондратьева Е.Н., Максимова И.В., Самуилов В.Д. **Фототрофные микроорганизмы**. М.: Изд-во МГУ, 1989. С. 97–112.
6. Кушкевич І. В., Гнатуш С. О., Гудзь С. П. Вплив важких металів на клітини мікроорганізмів. **Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.**, 2007; 45: 3–28.
7. Лакин Г.Ф. **Биометрия**. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
8. Мусієнко М.М., Паршикова Т.В., Славний П.С. **Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин**. К.: Фітоцентр, 2001. 200 с.
9. Мушак П.О. Абсорбція іонів важких металів синьозеленою водорістю *Spirulina platensis* (Nordts.) Geitl. **Укр. ботан. журн**, 2006; 63 (4): 551–557.
10. Паперно Т.Я., Позняков В.П., Смирнова А.А., Элагин Л.М. **Физико-химические методы исследования в органической и биологической химии**. М.: Просвещение, 1977. 176 с.
11. Таширєв А.Б. Теоретические аспекты взаимодействия микроорганизмов с металлами. Микробная аккумуляция металлов, обусловленная их стереохимической аналогией с макроэлементами. **Мікробіол. журн**, 1994; (6): 89–97.
12. Таширєв А.Б., Смирнова Г.Ф. Аккумуляция металлов синтрофными ассоциациями микроорганизмов. **Мікробіол. журн**, 1999; 61 (6): 58–65.
13. Хоулт Дж., Криг Р., Снит П. и др. **Определитель бактерий Берджи**. М.: Мир, 1997. Т.1. 426 с.
14. Britton G. **General carotenoid methods. Methods in enzymology**. London: Academic press, 1985; (3B): 113–145.
15. Frigard et al. Spectrochromatography of photosynthetic pigments as fingerprinting technique for microbial phototrophs. **FEMS Microbiol. Ecol**, 1996; (20): 69–77.
16. Oelze J. Analysis of Bacteriochlorophylls. **Method microbial**, 1985; (18): 257–284.

INFLUENCE OF SOME SALTS OF HEAVY METALS ON SULFUR BACTERIA *LAMPROCYSTIS SP.*

I. V. Kushkevych, S. O. Hnatush, S. P. Gudz

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

The growth of phototrophic sulfur bacteria *Lamprocystis sp.* under the influence of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 mM of CdSO₄, ZnSO₄, Pb(NO₃)₂ and CuSO₄ was investigated.

The control medium did not contain metal salt. The highest inhibition of growth was caused by CuSO_4 , and $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ had weaker effect. These salts at the concentration 0.5 mM and higher have decreased the biomass accumulation for 85 and 58% respectively. Addition of CdSO_4 or ZnSO_4 caused the decrease of biomass accumulation only at high salts concentrations in the medium.

The qualitative and quantitative composition of the main photosynthetic pigments in the cells at these conditions was determined. Addition of salts of heavy metals to the growth medium of *Lamprocystis* sp. decreased the pigments content in the cells, and inhibited culture growth.

Key words: Cadmium, Zinc, Lead, Copper, sulfur bacteria, bacteriochlorophylls, carotenoides.

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ НЕКОТОРЫХ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА СЕРОБАКТЕРИИ *LAMPROCYSTIS* SP.

И. В. Кушкевич, С. А. Гнатуш, С. П. Гудзь

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net*

Изучен рост фототрофных серобактерий *Lamprocystis* sp. при влиянии CdSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ и CuSO_4 в концентрациях 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 и 2,5 мМ (в пересчете на концентрацию металла). В контрольную среду не вносили соли металла. Показано, что сильнее всего подавляло рост внесение в среду CuSO_4 , несколько меньше – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Эти соли в концентрации 0,5 мМ и выше снижали накопление биомассы на 85 и 58%, соответственно. Внесение CdSO_4 или ZnSO_4 приводило к снижению накопление биомассы при высоких концентрациях солей в среде.

Определены качественный и количественный состав основных фотосинтезирующих пигментов в клетках в этих условиях. Внесение солей тяжелых металлов в среду культивирования бактерий *Lamprocystis* sp. снижает содержание пигментов в клетках, что вызывает подавление ростовых процессов культуры.

Ключевые слова: Кадмий, Цинк, Свинец, Медь, серобактерии, бактериохлорофиллы, каротиноиды.

Одержано: 14.04.2009