



УДК 579.[26+22]+546.3+631.461.71

СУЛЬФІДОГЕННА АКТИВНІСТЬ *DESULFUROMUSA* SP. CB30 ЗА ВПЛИВУ СПОЛУК ХРОМУ, КУПРУМУ І ФЕРУМУ

С. В. Дяків, С. О. Гнатуш, В. В. Бабенко, О. М. Мороз

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

Проведено факторний аналіз даних за 29 змінними, які визначені для порід відвалів вугільних шахт. У разі аналізу червоної породи відвалів шахт виділено чотири латентних фактори, які пояснюють понад 97 % сукупної дисперсії даних. У разі аналізу задернованої та незадернованої породи виділено по шість латентних факторів, які пояснюють близько 87 і 86 %, відповідно, сукупної дисперсії даних. Досліджено здатність сірковідновлювальних бактерій *Desulfuromusa* sp. CB30, виділених із порід відвалів шахт Червоноградського гірничопромислового району, використовувати сполуки Cr (VI), Cu (II) та Fe (III) як акцептори електронів у процесі анаеробного дихання, а також встановлено вплив сполук цих металів на ріст і сульфідогенну активність бактерій. *Desulfuromusa* sp. CB30 з різною інтенсивністю використовують 0,5–2 мМ $K_2Cr_2O_7$ і $CuCl_2$ та 1–10 мМ $C_6H_5O_7Fe$ як акцептори електронів у процесі анаеробного дихання. За впливу 0,5 мМ $K_2Cr_2O_7$, 1–2 мМ $CuCl$ і $CuCl_2$, 1 мМ $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ та 1–30 мМ $C_6H_5O_7Fe$ спостерігається інтенсифікація метаболічної активності бактерій. Перевищення вказаних концентрацій сполук важких металів пригнічує ріст і сульфідогенну активність *Desulfuromusa* sp. CB30. Рівень зв'язування 0,5–1 мМ Cu^{2+} утвореними бактеріями гідроген сульфідом сягає 95,0–100,0 %, 1 мМ Fe^{2+} – 88,0 %. Прогнозовано високу ефективність застосування бактерій *Desulfuromusa* sp. CB30 у технологіях очищення доквілля від токсичних сульфур- і металовмісних сполук.

Ключові слова: факторний аналіз, *Desulfuromusa* sp., сульфідогенна активність, важкі метали, металоредукція, породні відвали

ВСТУП

Здатні до металоредукції бактерії відіграють важливу роль у функціонуванні біоценозів. Особливої уваги заслуговують сірковідновлювальні бактерії, які відновлюють сполуки металів як термінальні акцептори електронів і продукують гідроген сульфід. Так, бактерії *Desulfuromusa ferrireducens*, *Desulfuromusa kysingii*, *Geobacter* sp. використовують нерозчинні сполуки феруму (III) та мангану (IV), а також кобальту (III), гідраргіуму (II), урану (VI) як кінцеві акцептори електронів [8, 18, 30].

Породний відвал вугільної шахти є прикладом впливу багатofакторного стресу (важкі метали, кислотність, температура, вміст органічних речовин, вологість) на організми, тому метаболізм мікроорганізмів за цих умов має свої особливості. Вважають, що найбільш токсичним є вплив на клітину важких металів (ВМ), а інші фактори лише доповнюють ефект їхньої дії [29, 32]. Використання факторного аналізу дає змогу виділити найважливіші змінні, які виявляють вплив на функціонування мікробіоценозів [1]. Нами встановлено, що вміст купруму в різних породах відвалів шахт Червоноградського гірничопромислового району (ЧГПР), залежно від місця відбору, перевищує ГДК у 3–12 разів, хрому – у 2,5–10 разів, феруму – удвічі, що негативно впливає на чисельність і метаболізм мікроорганізмів різних еколого-трофічних груп, сповільнюючи природну рекультивацию території [16]. Особливості відновлення металів бактеріями роду *Desulfuromusa* та їхня роль у рекультивациі територій досліджені мало. Тому **метою** роботи було створити матрицю факторних навантажень на прикладі зразків червоної, задернованої та незадернованої породи й вивчити особливості металоредукції бактерій *Desulfuromusa* sp. СВ30, виділених нами із порід відвалів шахт ЧГПР, за використання Cr (VI), Cu (II) та Fe (III) за концентрацій відповідно до їхнього вмісту у зразках порід, а також дослідити вплив окиснених і відновлених сполук цих металів на сульфідогенну активність бактерій для оцінки ефективності можливого їхнього використання у технологіях очищення довкілля від токсичних сульфур- і металовмісних сполук.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Аналізували 20 проб порід із основного відвалу Центральної збагачувальної фабрики (ЦЗФ), відвалів шахт “Візейська” і “Надія”. Забір матеріалу проводили із вершин, терас і підніж на задернованих мохами ділянках і незадернованих [12]. Аналізували породи на вміст ВМ (Zn, Cd, Ni, Co, Fe, Mn, Pb, Cu, Cr) як описано [23]. Визначали вміст загальної та рухомої сірки, загального нітрогену і його нітратної форми, а також рН, температуру, вологість порід як описано [4, 9–11]. Дослідження ензиматичної активності мікроорганізмів порід (каталазнаї, протеазнаї, уреазнаї та целюлазнаї) проводили за [2]. Методом граничних розведень визначали кількість мікроорганізмів різних еколого-трофічних груп на таких середовищах: сусло-агар – для мікроскопічних грибів; крохмало-аміачний агар – для бактерій, що засвоюють мінеральні форми нітрогену; Ешбі – для олігонітрофільних, у т. ч. азотофіксувальних бактерій; Бейеринка та Сільвермана–Люднгрена 9К – для безбарвних сірко-окиснювальних нейтрофільних і ацидофільних бактерій, відповідно; Кравцова–Сорокіна з S^0 та SO_4^{2-} – для сірко- і сульфатвідновлювальних бактерій, відповідно; Гетченсона – для целюлозоруйнівних аеробних мікроорганізмів [12].

Виділені з породних відвалів вугільних шахт ЧГПР й ідентифіковані нами сірководновлювальні бактерії *Desulfuromusa* sp. СВ30 зберігаються в колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології ЛНУ ім. Івана Франка [8]. Бактерії вирощували впродовж 5–10 діб у модифікованому середовищі Постгейта С [12] із S^0 (32,29 мМ), без SO_4^{2-} і $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ за рН 7,0–7,5, температури +28 °С за анаеробних умов у пробірках об'ємом 25 мл. Перед засівом у середовище вносили 0,1 мл стерильного 1 М розчину $Na_2S \cdot 9H_2O$. Бактерії попередньо вирощували до експоненційної фази росту в середовищі Постгейта С з 2,7 мМ фумаратом. Розчини металів стерилізували окремо та вносили в середовище перед засівом. Досліджували вплив сполук металів за концентрацій відповідно до їхнього вмісту у зразках

порід: сполуки хрому та купруму вносили в середовище до їхніх кінцевих концентрацій 0,5; 1 та 2 мМ, феруму – 1; 5; 10 та 30 мМ. Контроль – середовище з S⁰, без внесення сполук металів.

Для дослідження відновлення Cr₂O₇²⁻, Cu²⁺, Fe³⁺ *Desulfuromusa* sp. СВ30 вирощували зі сполуками металів. На 5, 8 і 10 доби визначали накопичення біомаси та наявність у культуральній рідині біхромат-йонів, йонів купруму (II) та феруму (III). Біомасу визначали турбідиметрично з використанням КФК-3 ($\lambda = 340$ нм, $l = 3$ мм) [12, 15].

Для визначення впливу відновлених і окиснених сполук хрому (CrCl₃×6H₂O і K₂Cr₂O₇), купруму (CuCl і CuCl₂) та феруму (FeCl₂×4H₂O і C₆H₅O₇Fe) на сульфідогенну активність *Desulfuromusa* sp. СВ30 клітини бактерій інкубували зі сполуками металів. Перед інкубацією клітини осаджували з використанням центрифуги ОС-6М (4025 г, 25 хв), ресуспендували у 0,05 М *трис*-HCl буфері (рН 7,5) та інкубували в ньому 1 год за різних концентрацій сполук ВМ. Після цього клітини осаджували (4025 г, 20 хв), двічі відмивали розчином NaCl (0,9 %) і висівали у модифіковане середовище Постгейта С з S⁰. Після 8 діб росту визначали біомасу та вміст HS⁻ у культуральній рідині за утворенням метиленової сині [27].

Для визначення впливу відновлених і окиснених форм металів, за їхньої наявності у середовищі, на ріст і сульфідогенну активність бактерій, а також рівня утворення сульфідів металів бактерії вирощували за наявності S⁰ та сполук металів за наведених вище концентрацій. На 8 добу визначали накопичення біомаси. Суміш клітин і сульфідів металів осаджували центрифугуванням (4025 г, 20 хв). У культуральній рідині визначали наявність Cr³⁺, Cu²⁺ та Fe²⁺ [15] та вміст гідрогенсульфіду, сумарну концентрацію якого розраховували як суму концентрацій вільного HS⁻ і зв'язаного у формі металосульфідів (MeS).

Отримані дані опрацьовували з використанням програм “Microsoft Excel 2010”, “Origin 6.1”, “Statistica 8.0”. Для оцінки достовірності різниці між двома альтернативними сукупностями даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента *t*. Достовірною вважали різницю у разі $p \leq 0,05$ [17]. Факторний аналіз даних проводили засобами пакету прикладних програм Statistica 8.0 [13].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Мікробні угруповання мають потенційну здатність до саморегуляції й адаптації до змін навколишнього середовища, за яких високі концентрації ВМ відіграють роль селективного фактора, формуючи резистентні штами мікроорганізмів. Метали в окисненій формі можуть взаємодіяти з мікробною клітиною [26, 28, 29].

Факторний аналіз даних проводили за 29 змінними (табл. 1–3). У разі аналізу червоної породи відвалів шахт виділено чотири латентні фактори (тобто нові узагальнені умовні показники), які пояснюють понад 97 % сукупної дисперсії даних. Проаналізували окремо задерновану і незадерновану породи. У разі аналізу задернованої породи матриця факторних навантажень, отримана після обернення факторів методом нормалізованого варімаксу, наведена у табл. 1. Тут виділено шість латентних факторів, які пояснюють близько 87 % сукупної дисперсії даних. У разі аналізу незадернованої породи матрицю факторних навантажень ротованих факторів наведено у табл. 2, де виділено також шість латентних факторів, які пояснюють близько 86 % сукупної дисперсії даних, наведених у табл. 3.

Таблиця 1. Матриця факторних навантажень у зразках червоної породи

Table 1. Matrix of factor loadings in red gangue samples

Змінні	Фактори			
	Ф1	Ф2	Ф3	Ф4
Мікроскопічні гриби	0,978	-	-	-
Бактерії, що засвоюють мінеральні форми нітрогену	-	-	0,977	-
Олігонітрофіли	-	0,942	-	-
Безбарвні сіркоокиснювальні нейтрофільні бактерії	-	0,888	-	-
Безбарвні сіркоокиснювальні ацидофільні бактерії	-	-	-0,951	-
Сірководновлювальні бактерії	-	-	-0,405	-0,895
Сульфатвідновлювальні бактерії	0,854	-	-	-
Целюлозоруйнівальні аеробні мікроорганізми	-0,500	0,690	0,495	-
pH породи	-	0,682	-	0,536
Температура на поверхні породи	-	-	-	-0,927
Температура на глибині породи	-0,572	-	-	-0,656
Вологість породи	-0,597	-	0,747	-
Zn	0,974	-	-	-
Cd	-	0,841	-	-
Ni	0,755	0,586	-	-
Co	-0,416	-0,815	-0,401	-
Fe	-	-0,824	-	-0,473
Mn	-	-	-	-0,981
Pb	-	-0,805	-0,451	-
Cu	0,924	-	-	-
Cr	0,820	-	-	0,411
Загальна сірка	0,990	-	-	-
Рухома сірка	0,515	-0,832	-	-
Загальний нітроген	-	0,683	0,650	-
NO ₃ ⁻	-0,951	-	-	-
Каталазна активність мікроорганізмів	-	0,480	0,856	-
Протеазна активність мікроорганізмів	-	-	0,991	-
Уреазна активність мікроорганізмів порід	0,938	-	-	-
Целюлазна активність мікроорганізмів	-	-	0,902	-
Пояснена дисперсія	9,655	7,454	6,843	4,377
% загальної дисперсії	0,333	0,257	0,236	0,151

Примітка: “-” – навантаження фактора незначне (<0,4)

Comment: “-” – insignificant loading on the factor (<0.4)

Таблиця 2. Матриця факторних навантажень у зразках задернованої породи
Table 2. Matrix of factor loadings in the gangue samples, turfed by the mosses

Змінні	Фактори					
	Ф1	Ф2	Ф3	Ф4	Ф5	Ф6
Мікроскопічні гриби	-	0,819	-	-	-	-
Бактерії, що засвоюють мінеральні форми нітрогену	-	-	-	0,830	-	-
Олігонітрофіли	-	-	-	-	-	-0,421
Безбарвні сіркоокиснювальні нейтрофільні бактерії	-	-	-0,556	0,527	-	-
Безбарвні сіркоокиснювальні ацидофільні бактерії	-0,593	-	-	-0,430	-	0,488
Сірковідновлювальні бактерії	-	-	-	-	-0,918	-
Сульфатвідновлювальні бактерії	-	-	-0,878	-	-	-
Целюлозоруйнівальні аеробні мікроорганізми	-	0,444	-	-	0,419	-0,596
pH породи	-	0,823	-	-	-	-
Температура на поверхні породи	-	0,520	0,586	-	-0,450	-
Температура на глибині породи	-	-	-	-	0,784	-
Вологість породи	-	-0,548	-	0,587	-	-
Zn	0,963	-	-	-	-	-
Cd	0,938	-	-	-	-	-
Ni	0,882	-	-	-	-	-
Co	-0,977	-	-	-	-	-
Fe	-	-	-	-	-	0,909
Mn	-	-	-	0,614	0,514	-
Pb	-	-	-	0,458	-	0,737
Cu	0,518	-	-	-	0,494	0,472
Cr	-	-	-	-0,882	-	-
Загальна сірка	-	-	-	-	-	-0,852
Рухома сірка	-	-0,441	0,664	-	-	-
Загальний нітроген	-	-	-0,826	-	-	-
NO ₃ ⁻	-	-	-	0,546	-	0,576
Каталазна активність	-	0,765	-	-	-	-
Протеазна активність	0,901	-	-	-	-	-
Уреазна активність	-	-	0,420	-	-	-0,684
Целюлазна активність	-	0,698	-	0,618	-	-
Пояснена дисперсія	6,093	4,189	3,244	4,179	2,915	4,569
% загальної дисперсії	0,210	0,144	0,112	0,144	0,101	0,158

Примітка: “-” – навантаження фактора незначне (<0,4)

Comment: “-” – insignificant loading on the factor (<0.4)

Таблиця 3. Матриця факторних навантажень у зразках незадернованої породи

Table 3. Matrix of factor loadings in gangue samples without mosses

Змінні	Фактори					
	Ф1	Ф2	Ф3	Ф4	Ф5	Ф6
Мікроскопічні гриби	-0,826	-	-	-	-	-
Бактерії, що засвоюють мінеральні форми нітрогену	-	-	-	0,866	-	-
Олігонітрофіли	-	-0,461	-	0,603	-	0,576
Безбарвні сіркоокиснювальні нейтрофільні бактерії	0,497	-	-	-	-	0,596
Безбарвні сіркоокиснювальні ацидофільні бактерії	-	-	-	0,441	-	-0,414
Сірководновлювальні бактерії	-	0,536	-0,432	-	0,492	-
Сульфатвідновлювальні бактерії	-0,924	-	-	-	-	-
Целюлозоруйнівальні аеробні мікроорганізми	0,882	-	-	-	-	-
pH породи	-	-	-	-	-	0,593
Температура на поверхні породи	-	0,437	-	-	-	0,517
Температура на глибині породи	-	-	-	-	-0,879	-
Вологість породи	-	-0,775	-	-	-	-
Zn	-0,627	-	0,682	-	-	-
Cd	-	-	0,890	-	-	-
Ni	-	-	0,748	-	-	-0,561
Co	-	-	-0,907	-	-	-
Fe	-	-	-0,688	-	-	-0,539
Mn	-	-	-	0,926	-	-
Pb	-	0,622	-0,465	0,422	-	-
Cu	-0,435	-	0,572	0,499	-	-0,441
Cr	-	-	0,468	-	-	-0,809
Загальна сірка	-0,693	-	0,596	-	-	-
Рухома сірка	-	-	-	-	-	-0,848
Загальний нітроген	-	-0,938	-	-	-	-
NO ₃ ⁻	-	-	-	-	-	0,741
Каталазна активність	0,446	-	-	-	0,452	0,422
Протеазна активність	-	-	-	-	-0,657	-
Уреазна активність	-	-	-	-	0,772	-
Целюлазна активність	-	-	-	-	-	0,872
Пояснена дисперсія	4,373	3,119	5,360	3,539	2,776	5,653
% загальної дисперсії	0,151	0,108	0,185	0,122	0,096	0,195

Примітка: “-” – навантаження фактора незначне (<0,4)

Comment: “-” – insignificant loading on the factor (<0.4)

За результатами аналізу, в червоній породі значний вплив на угруповання сірководновлювальних бактерій (входять до четвертого латентного фактора) мають рН, температура, Mn, Fe, Cr. Нами описано вплив рН, температури, а також використання Mn, Fe і Cr сірководновлювальними бактеріями, виділеними з порід відвалів [8].

У задернованій породі вугільних відвалів на чисельність сірководновлювальних бактерій впливають Mn і Cu (табл. 2). У незадернованій породі на угруповання сірководновлювальних бактерій впливає низка сполук ВМ (умовні фактори 2, 3, 5), серед яких Co, Fe, Pb, Zn, Cd, Ni, Cu, Cr, а також загальна сірка (табл. 3). Отже, залежно від тривалості зберігання породи та перебігу процесів окиснення піриту з подальшим формуванням мохового покриву змінюється вплив ВМ на угруповання сірководновлювальних бактерій. Оскільки і в задернованій, і в незадернованій породах простежується вплив Cr, Cu та Fe, ми вивчали здатність виділених з відвалів сірководновлювальних бактерій *Desulfuromusa* sp. СВ30 використовувати сполуки Cr (VI), Cu (II) та Fe (III) як термінальні акцептори електронів.

Хром є металом-окисником [29]. Сульфат- і залізководновлювальні бактерії відновлюють Cr (VI), а також здійснюють непряме відновлення хромату за участі HS^- або Fe (II), відповідно [3, 14, 19]. *Geobacter metallireducens* відновлює Cr (VI) до Cr (III) способом прямого перенесення електронів через трансмембранний комплекс цитохромів, що пов'язане із генерацією енергії та детоксикацією окиснених сполук хрому в навколишньому середовищі [25]. За внесення 0,5 мМ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ у середовище спостерігали зниження біомаси *Desulfuromusa* sp. СВ30, порівняно з контролем, на 8 і 10 доби, а за внесення 1–2 мМ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ – вже на 5 добу (рис. 1, А). Під час сіркоредукції бактерії нагромаджували найвищу біомасу на 8 добу, а за відновлення біхромату – на 5 добу росту. Таким чином, бактерії *Desulfuromusa* sp. СВ30 є чутливими до внесення в середовище $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Купрум є металом комбінованої дії [29]. Він бере участь у біохімічних і фізіологічних процесах, зв'язуючись головно з клітинною поверхнею, зумовлюючи її ушкодження; пригнічує активність кетоглутаратдегідрогенази та нітратредуктази [5, 29]. Техногенні асоціації мікроорганізмів витримують різке підвищення редокс-потенціалу за вмісту 10,0 г/л Cu^{2+} [28]. За резистентність клітин *Geobacter lovleyi* ATCC BAA-1151 до йонів купруму відповідає ген GLOV-1267 [7]. Серед бактерій роду *Desulfuromusa* не описано видів, резистентних до купруму, або таких, що здійснюють його редукцію [18, 30]. На відміну від Cr (VI), використання Cu (II) як термінального акцептора електронів бактеріями *Desulfuromusa* sp. СВ30 сприяло накопиченню високої біомаси. Внесення 0,5 мМ CuCl_2 зумовило збільшення нагромадження біомаси дослідженими бактеріями на 8 та 10 доби у 1,8 та 1,6 рази, відповідно, порівняно з контролем. За наявності у середовищі 1–2 мМ катіонів купруму нагромадження біомаси *Desulfuromusa* sp. СВ 30 не відрізнялося від контролю (рис. 1, Б).

У клітинах живих організмів йони феруму утворюють комплекси з гідроксильними, карбоксильними, фосфатними й аміногрупами, а також ковалентні зв'язки з сульфгідрильними групами, завдяки чому вони з'єднуються з білками, нуклеотидами, коферментами, фосфоліпідами, порфіринами й іншими метаболітами [19]. Йони феруму спричиняють зміни біохімічних властивостей мембран, тому чутливість мембранних ферментних систем до цього елемента є показником резистентності мікроорганізмів [22]. Серед бактерій роду *Geobacter* є штами, які витримують високий вміст сполук феруму [6, 19–21]. *D. ferrireducens* використовує ферум (III) цитрат і ферум (II) оксид, а *D. kysingii* – ферум (III) цитрат як акцептори електронів [18, 30]. *D. kysingii* відновлюють 30 мМ ферум (III) цитрат за наявності 2–3 мМ

ферум (II) хлориду або 1 мМ цистеїну як відновників замість сульфїду [30]. Нами встановлено, що внесення у середовище 5 мМ $C_6H_5O_7Fe$ зумовило підвищення біомаси *Desulfuromusa* sp. СВ30 на 8 та 10 доби. Використання 10 мМ йонів феруму (III) як акцептора електронів зумовило зниження біомаси бактерій у 1,4–1,9 разу, порівняно з контролем, упродовж усього періоду культивування (рис. 1, В).

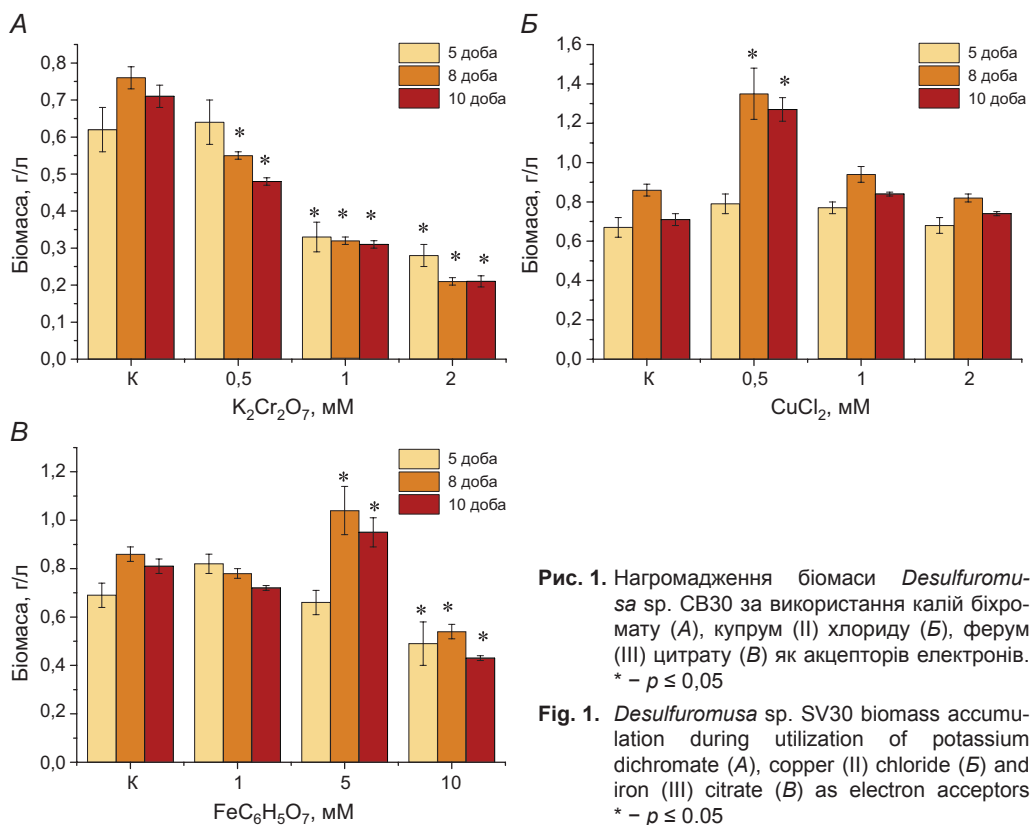


Рис. 1. Нагромадження біомаси *Desulfuromusa* sp. СВ30 за використання калій біхромату (А), купрум (II) хлориду (Б), ферум (III) цитрату (В) як акцепторів електронів. * – $p \leq 0,05$

Fig. 1. *Desulfuromusa* sp. SV30 biomass accumulation during utilization of potassium dichromate (A), copper (II) chloride (B) and iron (III) citrate (B) as electron acceptors * – $p \leq 0.05$

Наявність $Cr_2O_7^{2-}$ у культуральній рідині *Desulfuromusa* sp. СВ30 на 10 добу культивування у всіх варіантах досліджу свідчить про неповне їхнє використання клітинами. Встановлено, що бактерії повністю відновлюють Cu^{2+} та Fe^{3+} за їхнього вмісту до 1 мМ, якщо у культуральній рідині немає окиснених форм металів.

Хоча окисно-відновний потенціал у пари $Cr_2O_7^{2-}/Cr^{3+}$ ($E_0' = +1,33$ В) значно вищий, ніж у пар $Fe(III)/Fe(II)$ ($E_0' = +0,77$ В) та $Cu(II)/Cu(I)$ ($E_0' = +0,15$ В), проте редокс-потенціал хрому є за межами термодинамічної стійкості води (за рН 7 – від $-0,414$ до $+0,814$ В), тому хром більш токсичний для клітини [28].

Відомо, що використання сірковідновлювальними бактеріями металів зі змінною валентністю як акцепторів електронів у процесі анаеробного дихання є одним із механізмів захисту клітин від їхньої токсичної дії [26, 31]. Відновлення металів-окисників мембранозв'язаними металоредуктазами (цитохромами типу с) здійснюється поза клітиною, що супроводжується вивільненням у середовище значної кількості електронів [25, 28]. Зі зростанням концентрації сполук металів у середовищі, можливо, підвищується ступінь проникнення оксоаніонів хрому (VI), катіонів

купруму (II) чи феруму (III) крізь клітинну мембрану бактерій у цитоплазму, де відбувається їхня взаємодія з внутрушньоклітинними метаболітами, утворюються хімічно активні інтермедіати, кисневі радикали, накопичуються відновлені форми металів як кінцеві продукти, що і спричиняє інгібування росту [24, 26].

Для повного поглинання металів бактеріями необхідно від кількох секунд до години після контакту з токсикантом [24, 28, 29]. Після годинної інкубації клітини *Desulfuromusa* sp. СВ30 відмивали, щоб уникнути позаклітинного відновлення Cr (VI), Cu (II) та Fe (III) і утворення у культуральній рідині нерозчинних сульфідів металів. Припускали, що інгібування метаболічних процесів у інкубованих зі сполуками металів бактерій буде обумовлене саме їхнім потраплянням у клітину, де вони можуть окиснювати структурні компоненти, інактивувати ферменти, блокувати циклічний транспорт електронів у окисно-відновних ланцюгах тощо [14, 26, 28, 29].

Інкубація бактерій *Desulfuromusa* sp. СВ30 з 2 мМ $\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ і $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ спричинила зниження біомаси на 0,2–0,4 г/л (рис. 2, А). За інкубації з 2 мМ $\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ вміст утвореного бактеріями HS^- у середовищі знизився втричі, порівняно з контролем. Однак інкубація з 0,5 мМ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ зумовила підвищення концентрації HS^- у середовищі в 1,4 разу, порівняно з контролем.

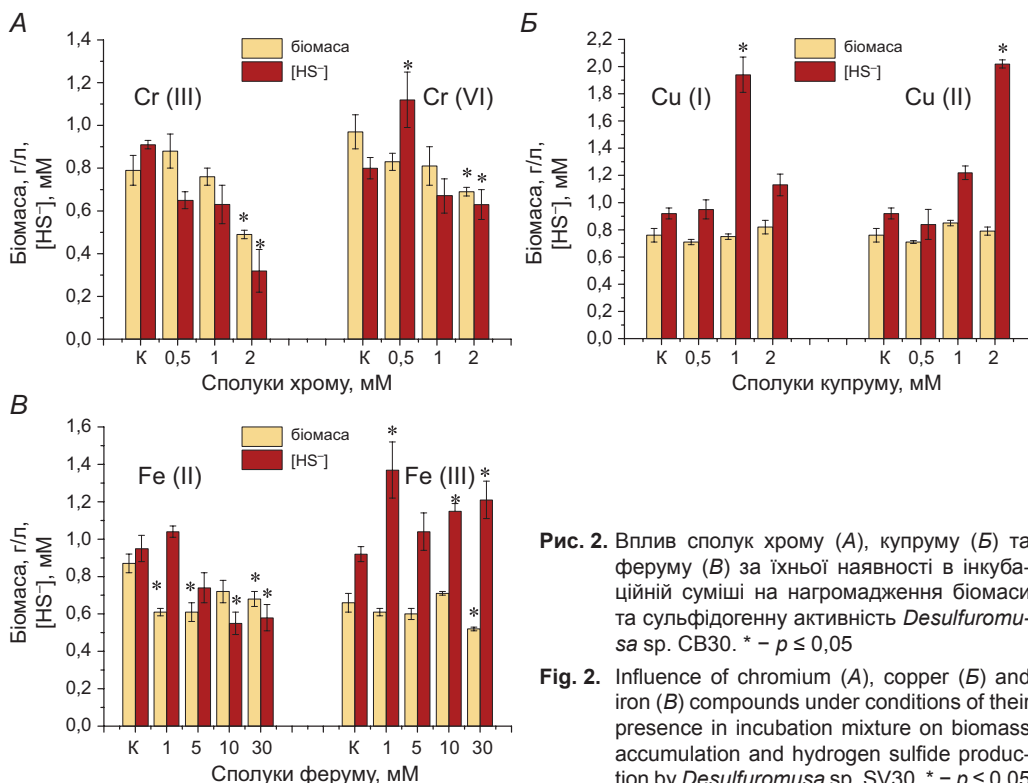


Рис. 2. Вплив сполук хрому (А), купруму (Б) та феруму (В) за їхньої наявності в інкубаційній суміші на нагромадження біомаси та сульфідогенну активність *Desulfuromusa* sp. СВ30. * – $p \leq 0,05$

Fig. 2. Influence of chromium (A), copper (B) and iron (B) compounds under conditions of their presence in incubation mixture on biomass accumulation and hydrogen sulfide production by *Desulfuromusa* sp. SV30. * – $p \leq 0,05$

Інкубація *Desulfuromusa* sp. СВ30 з 1–2 мМ CuCl і CuCl_2 зумовила накопичення бактеріями трохи вищої біомаси, ніж у контролі, а також утворення більшої кількості гідроген сульфїду: у 2,1 разу більше контролю – за внесення в інкубаційну суміш 1 мМ CuCl та в 1,3–2,2 разу – за впливу 1–2 мМ CuCl_2 (рис. 2, Б).

Виявили різний вплив $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ і $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ на нагромадження біомаси *Desulfuromusa* sp. CB30 і здійснювану ними сіркоредакцію (рис. 2, В). Унаслідок інкубації бактерій з 1–30 мМ $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ накопичення біомаси клітинами зменшилося у 1,4–1,2 разу, порівняно з контролем. За впливу 1 мМ $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ бактерії утворювали більшу кількість гідроген сульфід, ніж у контролі, але інкубовані з 10–30 мМ $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ бактерії утворювали вдвічі менше гідроген сульфід, ніж у контрольному варіанті. Інкубація *Desulfuromusa* sp. CB30 з 1–30 мМ $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$, яка майже не вплинула на нагромадження бактеріями біомаси, спричинила нагромадження ними в 1,3–1,5 разу більшої кількості гідроген сульфід, ніж у контролі.

У разі дослідження впливу сполук ВМ на нагромадження біомаси *Desulfuromusa* sp. CB30, утворення ними гідроген сульфід та сульфідів металів припускали, що за внесення у середовище з сіркою окиснених форм металів бактерії використовуватимуть їх як більш енергетично вигідні акцептори електронів (окисно-відновний потенціал пари $\text{S}^0/\text{HS}^- E_0' = -0,27 \text{ В}$) [28].

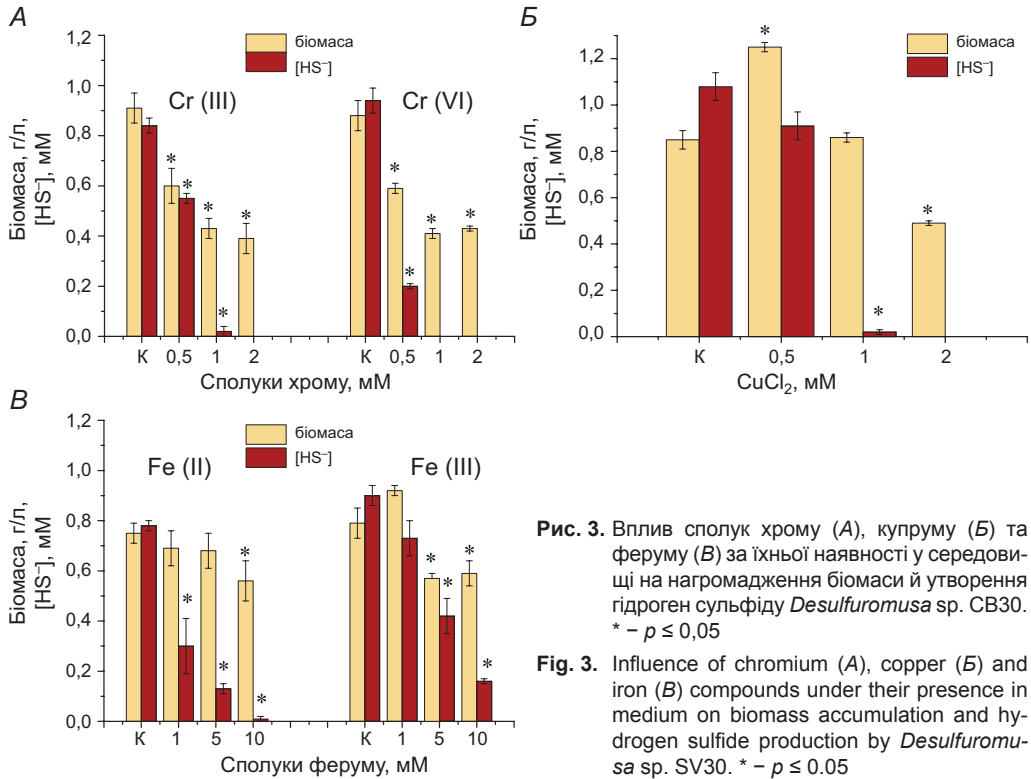
За одночасної наявності у середовищі S^0 та відновлених форм металів відбуватиметься їхня взаємодія з утвореним бактеріями у процесі дисиміляційної сіркоредакції гідроген сульфідом. Cr_2S_3 – розчинний, а FeS та CuS – нерозчинні. Оскільки CuCl – нестійкий і у водному розчині швидко окиснюється [15], до середовища вносили CuCl_2 . За високих концентрацій сполуки металів зі змінною валентністю виявляють на мікроорганізми більш чи менш виражену токсичну дію [24, 26], тому припускали, що нагромадження біомаси бактеріями інгібуватиметься, а гідроген сульфід утворюватиметься у меншій кількості, недостатній для повного зв'язування з йонами металів.

Внесення 0,5–2 мМ $\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ або $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ до середовища культивування *Desulfuromusa* sp. CB30 спричиняло інгібування як нагромадження біомаси, так і відновлення бактеріями сірки (рис. 3, А). Нагромадження біомаси знизилось у 2,2–2,3 разу, порівняно з контролем. За наявності у середовищі 0,5 мМ Cr^{3+} чи $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ досліджені бактерії нагромаджували тільки до 0,6–0,2 мМ HS^- , а за наявності 1–2 мМ сполук хрому спостерігали повне інгібування сіркоредакції.

Внесення до середовища 0,5 мМ CuCl_2 сприяло нагромадженню *Desulfuromusa* sp. CB30 у 1,5 разу вищої біомаси, ніж у контролі (рис. 3, Б). За внесення 1 мМ сполуки металу біомаса бактерій не відрізнялася від контролю, а 2 мМ – зменшилася в 1,7 разу. Наявність у середовищі 0,5 мМ іонів купруму (II) сприяла утворенню бактеріями *Desulfuromusa* sp. CB 30 0,9 мМ гідроген сульфід. За внесення в середовище 1 і 2 мМ CuCl_2 концентрація гідроген сульфід виявилася дуже низькою.

Зі збільшенням концентрації $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ у середовищі до 10 мМ біомаса *Desulfuromusa* sp. CB30 знижувалася до 0,6 г/л (рис. 3, В). За внесення в середовище 1 мМ $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ спостерігали незначне підвищення біомаси. Наявність іонів феруму (II) і (III) в середовищі зумовила зниження концентрації гідроген сульфід: за внесення 1 мМ $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ бактерії нагромаджували 0,3 мМ залишкового HS^- , а $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ – 0,7 мМ. За внесення в середовище 5–10 мМ $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ концентрація HS^- не перевищувала 0,2 мМ, а $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ – 0,4 мМ.

Взаємодія металів з утвореним бактеріями HS^- є важливим механізмом захисту клітин від їхньої негативної дії (внаслідок іммобілізації) [24, 28, 29], тому вивчали рівень зв'язування HS^- з йонами металів (табл. 4). За наявності у середовищі 0,5 мМ $\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ бактерії утворювали 0,7 мМ HS^- , у 1,4 разу менше, ніж у контролі. З підвищенням концентрації сполуки металу до 2 мМ концентрація гідроген сульфід в середовищі знизилася втричі, порівняно з контролем.



Таблиця 4. Утворення сульфїдів металів *Desulfuromusa sp. CB30* у середовищі з S⁰ за внесення Cr³⁺, Cu²⁺, Fe²⁺

Table 4. Metals sulfides production by *Desulfuromusa sp. SV30* in medium with S⁰ and Cr³⁺, Cu²⁺, Fe²⁺

Йони металів	Концентрація, мМ	Біомаса, г/л	[S ²⁻], мМ	[MeS], мМ	Рівень зв'язування металу, %	Якісний аналіз наявності катіонів**
Cr ³⁺	0	0,85±0,04	0,95±0,07	0	0	–
	0,5	0,53±0,07*	0,67±0,01*	0	0	+
	1	0,43±0,04*	0,63±0,05*	0	0	+
	2	0,29±0,06*	0,32±0,01*	0	0	+
Cu ²⁺	0	0,82±0,02	0,92±0,04	0	0	–
	0,5	1,25±0,02*	0,84±0,11	0,51±0,04	100,00±0,01	–
	1	0,86±0,02	1,22±0,05*	0,95±0,04	95,00±0,02	+
Fe ²⁺	0	0,85±0,04	0,95±0,07	0	0	–
	1	0,79±0,07	1,04±0,03	0,88±0,04	88,00±0,03	+
	5	0,68±0,07*	0,74±0,08	0,66±0,04	13,20±0,01	+
	10	0,56±0,08*	0,45±0,06*	0,35±0,04	3,50±0,01	+

Примітки: * – $p \leq 0,05$; ** – “+” – йони металу виявлені; “–” – йони металу не виявлені

Comments: * – $p \leq 0.05$; ** – “+” – metal ions are revealed; “–” – metal ions are not revealed

За наявності в середовищі 1–2 мМ CuCl_2 *Desulfuromusa* sp. CB30 утворювали 1,2–2,0 мМ HS^- , що у 1,3–2,2 рази більше, ніж у контролі. Бактерії утворювали гідроген сульфід у концентрації, достатній для зв'язування 0,5 і 1 мМ Cu^{2+} у формі нерозчинного CuS на 95,0–100,0 %. За внесення у середовище 2 мМ CuCl_2 рівень зв'язування HS^- іонів металу був 73,0 %.

Внесення у середовище 1 мМ $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ стимулювало утворення *Desulfuromusa* sp. CB30 гідроген сульфідів на рівні контролю, тому рівень зв'язування HS^- іонів металу був 88,0 %. Збільшення у середовищі концентрації Fe^{2+} до 5–10 мМ супроводжувалося інгібуванням сіркоредакції в 1,3–2,1 разу, тому за внесення 5 мМ $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ рівень зв'язування іонів металу у формі нерозчинного FeS знизився до 13,2 %, а 10 мМ – до 3,5 %.

ВИСНОВКИ

З використанням факторного аналізу даних за 29 змінними, які визначені для порід відвалів вугільних шахт, у разі аналізу червоної породи виділено чотири латентних фактори, які пояснюють понад 97 % сукупної дисперсії даних. У разі аналізу задернованої і незадернованої породи виділено по шість латентних факторів, які пояснюють близько 87 і 86 %, відповідно, сукупної дисперсії даних. Виявлено вплив на угруповання сірковідновлювальних бактерій низки ВМ.

Встановлено, що бактерії *Desulfuromusa* sp. CB30, виділені з породних відвалів шахт Червоноградського гірничопромислового району, з різною інтенсивністю використовують оксоаніони хрому (VI), катіони купруму (II) та феруму (III) як акцептори електронів у процесі анаеробного дихання. За впливу сполук Cr (III) та Cr (VI), Cu (I) та Cu (II), Fe (II) та Fe (III) за різних концентрацій відбувається або зменшення нагромадження бактеріями біомаси та їхньої сульфідогенної активності, або навіть інтенсифікація метаболізму бактерій, що свідчить про резистентність досліджених мікроорганізмів до відновлених і окиснених форм купруму та феруму. Тому сірковідновлювальні бактерії *Desulfuromusa* sp. CB30 можуть бути ефективно застосовані у біотехнологіях очищення порід відвалів від токсичних сульфур- і металовмісних сполук, зокрема, завдяки високому рівню зв'язування утвореного бактеріями гідроген сульфідів з йонами металів у формі нерозчинних сульфідів. Завдяки здатності до відновної трансформації сполук металів *Desulfuromusa* sp. CB30 можуть суттєво впливати на функціонування біоценозів техногенно змінених територій.

1. *Abdulina D.R., Purish L.M., Asaulenko L.G. et. al.* Sulfidogenic microbial communities from technogenically transformed soils. **Microbiology and Biotechnology**, 2016; 2: 16–29. (In Russian).
2. *Antypchuk A.F., Pilyashenko-Novohatnyy, Yevdokymenko T.M.* **Practical Microbiology: manual for students**. Kyiv: University "Ukraine", 2011. 155 p. (In Ukrainian).
3. *Arias Y.M., Tebo B.M.* Cr(VI) reduction by sulfidogenic and nonsulfidogenic microbial consortia. **Applied and Environmental Microbiology**, 2003; 69(3): 1847–1853.
4. *Arinushkina E.V.* **Guidelines for the chemical analysis of soils**. 2nd ed. Moscow: MSU, 1970. 488 p. (In Russian).
5. *Brown N.L., Lee B.T.O., Silver S.* Bacterial transport and resistance to copper. **Metal Ions in Biological Systems** [ed. by Sigel H., Sigel A.]. New York: Marcel Dekker, 1994; 30: 405–435.
6. *Childers S.E., Ciuffo S., Lovley D.R.* *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. **Nature**, 2002; 416: 767–769.

7. Copper resistance B. *Geobacter lovleyi* (strain ATCC BAA-1151 / DSM 17278 / SZ). **UniProt** [internet-resource]. – Access regime: <http://www.uniprot.org/uniprot/B3E7K7>.
8. Diakiv S.V., Hnatush S.O., Moroz O.M. et al. Sulfur reducing bacteria from coal pits waste heaps of Chervonograd mining region. **Studia Biologica**, 2016; 10(2): 63–76.
9. DSTU 4726:2007. Soil quality. **Determination of total nitrogen in modification of NSC ISSA named after O. N. Sokolovsky**. Kyiv: Derzhspozhyvstandart of Ukraine, 2007. 19 p. (In Ukrainian).
10. DSTU ISO11465-2001. Soil quality. **Determination of dry matter and moisture content by mass. Gravimetric method**. Kyiv: Derzhspozhyvstandart of Ukraine, 2002. 68 p. (In Ukrainian).
11. GOST 26426-85. Soils. **Method of sulfate ions in an aqueous extract determination**. Moscow: Publishing House of Standards, 1985. P. 43–46. (in Russian).
12. Gudz S.P., Hnatush S.O., Javorska G.V. et al. **Practical Microbiology: manual for students**. Lviv: LNU named after I. Franko, 2014. 436 p. (In Ukrainian).
13. Halafiyani A. A. Statistica 6. Statistical data analysis. 3rd ed. Manual. Moscow: LLC “Binom-Press”, 2007. 512 p. (in Russian).
14. Han R., Li F., Liu T. et al. Effects of incubation conditions on Cr(VI) reduction by c-type cytochromes in Intact *Shewanella oneidensis* MR-1 cells. **Frontiers in Microbiology**, 2016; 7: 12 p.
15. Harris D.C. **Quantitative Chemical Analysis**. 6th ed., 2003. 928 p.
16. Karpinets L., Lobachevska O., Baranov V. et al. Total content of nitrogen and heavy metals in the mosses gametophyte and in upper layer of technogenic substrates of the mine dumps. **Studia Biologica**, 2017; 11(1): 101–108. (In Ukrainian).
17. Lakyn G.F. **Biometrics**. Moscow: Vyshha Shkola, 1990. 352 p. (In Russian).
18. Liesack W., Finster K. Phylogenetic analysis of five strains of gram-negative, obligately anaerobic, sulfur-reducing bacteria and description of *Desulfuromusa* gen. nov., including *Desulfuromusa kysingii* sp. nov., *Desulfuromusa bakii* sp. nov., and *Desulfuromusa succinoxidans* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1994; 44(4): 753–758.
19. Lovley D.R. Dissimilatory metal reduction. **Annual Review of Microbiology**, 1993; 47: 263–290.
20. Lovley, D. R., Ueki T., Zhang T. et al. *Geobacter*: The Microbe Electric’s Physiology, Ecology, and Practical Applications. **Advances in Microbial Physiology**, 2011; 59: 1–100.
21. Mahadevan R., Bond D.R., Butler J.E et al. Characterization of metabolism in the Fe(III)-reducing organism *Geobacter sulfurreducens* by constraint-based modeling. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006; 72(2): 1558–1568.
22. Maslovska O., Hnatush S. The influence of ferric (III) citrate on ATP-hydrolases of *Desulfuromonas acetoxidans* IMV B-7384. **Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology**, 2013; 21(1): 3–8. (In Ukrainian).
23. **Methodical recommendations for conducting field and laboratory studies of soils and plants by the control of environmental pollution by metals**. Institute of Experimental Meteorology, Moscow State University named after M.V. Lomonosov [ed. by N.G. Zyrin, S.G. Malahov]. Moscow: Gidrometeoizdat, 1981. P. 9–33. (In Russian).
24. Moroz O. M. Hydrogen sulfide production by sulfur reducing bacteria under influence of hard metals. **Visnyk of Lviv University. Biological series**, 2013; 61:154–165. (In Ukrainian).
25. Pastorella G. Investigation of the electrochemical activity of chromium tolerant mutants of *Geobacter metallireducens*: **PhD thesis**. Dublin City University, 2014 [internet-resource]. Access regime: <http://doras.dcu.ie/19743/>.
26. Richter K., Schicklberger M., Gescher J. Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. **Applied and Environmental Microbiology**, 2012; 78(4): 913–921.
27. Sugiyama M. **Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen sulfide**. United States Patent N 6340596, 2002.
28. Tashyrev O.B., Galinker E.V., Andreyuk K.I. Thermodynamic calculations of redox interaction of microorganisms with oxidative metals (Hg²⁺, CrO₂⁻⁴ and Cu²⁺). **Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine**, 2008; 4: 166–172. (In Ukrainian).

29. Tashyrev O. Integral mechanisms of microbial groups and natural ecosystems interaction with toxic metals in the light of V. I. Vernadsky teaching. **Svitogliad**, 2013; 1: 66–73. (In Ukrainian).
30. Vandieken V., Mussmann M., Niemann H. et al. *Desulfuromonas svalbardensis* sp. nov. and *Desulfuromusa ferrireducens* sp. nov., psychrophilic, Fe(III)-reducing bacteria isolated from Arctic sediments, Svalbard. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2006; 56: 1133–1139.
31. Viti C., Marchi E., Decorosi F. et al. Molecular mechanisms of Cr (VI) resistance in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, 2014; 38(4): 633–659.
32. White C., Sayer J.A., Gadd G.M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. **FEMS Microbiology Reviews**, 2000; 33: 197–208.

SULFIDOGENIC ACTIVITY OF *DESULFUROMUSA* SP. SV30 UNDER THE INFLUENCE OF CHROMIUM, COPPER AND IRON COMPOUNDS

S. V. Diakiv, S. O. Hnatysh, V. V. Babenko, O. M. Moroz

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

Coal pit waste heap is an example of the multifactorial stress influence on organisms. The effect of heavy metals on the cell is the most toxic. Factor analysis of data for 29 variables, defined for gangues from coal pit waste heaps, was conducted. In the case of the analysis of red gangue four latent factors are revealed, it explains over 97 % total dispersion data. In the case of turfed by the mosses gangue as well as gangue without mosses analysis six latent factors were revealed, it explain about 87 and 86 % total dispersion data respectively. The ability of sulfur reducing bacteria *Desulfuromusa* sp. SV30, isolated from coal pits waste heaps of Chervonograd mining region, to utilize Cr (VI), Cu (II) and Fe (III) compounds as electron acceptors was studied. The influence of these compounds on growth and sulfidogenic activity of these bacteria was established. *Desulfuromusa* sp. CB30 reduces 0.5–2 mM of $K_2Cr_2O_7$ and $CuCl_2$, 1–10 mM $C_6H_5O_7Fe$ as electron acceptors with varying intensity. 1 mM of $CuCl_2$ and $C_6H_5O_7Fe$ are completely reduced by bacteria. *Desulfuromusa* sp. SV30 incubation with heavy metals compounds (0.5 mM of $K_2Cr_2O_7$, 1–2 mM of $CuCl$ or $CuCl_2$, 1 mM Fe^{2+} and 1–30 mM Fe^{3+}) causes bacteria metabolism intensification. Oxidized metals forms applying into the medium with sulfur at concentrations of 0.5 mM ($CuCl_2$) and 1 mM leads to the higher biomass growth but sulfur reducing is strictly inhibited. At the presence of 0.5–1 mM $CuCl_2$ in medium 95.0–100.0 % of Cu^{2+} are bounded with HS^- produced by the bacteria. After 1 mM of $FeCl_2 \times 4H_2O$ applying into the medium the level of Fe^{2+} bounding with HS^- equals 88.0 %. Indicated concentrations exceeding inhibited growth and sulfidogenic activity of *Desulfuromusa* sp. SV30. Highly effective application of *Desulfuromusa* sp. SV30 in technologies for purifying the environment from toxic sulfur- and metal-containing compounds is expected.

Keywords: factor analysis, *Desulfuromusa* sp., sulfidogenic activity, heavy metals, reduction of metals, gangue waste heaps

Одержано: 27.07.2017