

ВИКОРИСТАННЯ РІЗНИХ АКЦЕПТОРІВ ЕЛЕКТРОНІВ БАКТЕРІЯМИ *DESULFUROMONAS* SP., ВИДІЛЕНИМИ З ОЗЕРА ЯВОРІВСЬКЕ

О. Мороз, Н. Гуль, А. Галушка, Г. Звір, Б. Борсукевич

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

Встановлено, що сірководновловальні бактерії роду *Desulfuromonas*, виділені з озера Яворівське, використовують сульфур *L*-цистеїну та полісульфідну сірку як акцептори електронів анаеробного енергетичного метаболізму з відновленням їх до сульфідів. Сульфур тіосульфату, сульфіту і сульфату бактерії не відновлюють. Бактерії не використовують нітроген нітрату й нітриту як акцептор електронів. Бактерії *Desulfuromonas* sp. використовують фумарат і малат одночасно як акцептори, донори електронів і як джерела карбону для росту. Встановлено, що Fe (III), Cr (VI) і Mn (IV) за концентрації 3,5 мМ більш ніж удвічі інгібують ріст і рівень утворення гідроген сульфідів клітинами бактерій, інкубованих зі сполуками цих металів. Незважаючи на це, сірководновловальні бактерії використовують Fe (III), Cr (VI) і Mn (IV) за цієї ж концентрації як кінцеві акцептори електронів, відновлюючи їх до менш токсичних для довкілля форм.

Ключові слова: сірководновловальні бактерії, акцептори електронів, перехідні важкі метали.

За анаеробних умов бактерії окиснюють органічні сполуки з використанням замість молекулярного кисню інших неорганічних або органічних акцепторів електронів, здійснюючи так зване анаеробне дихання. У процесі відновлення акцептора електронів синтез АТФ спряжений з транспортом електронів по дихальному ланцюгу і перенесенням H^+ , у результаті чого енергія запасасться у вигляді електрохімічного протонного потенціалу. На відміну від анаеробного дихання, при якому анаеробні окисно-відновні процеси пов'язані з електронтранспортним фосфорилуванням, процеси бродіння забезпечують отримання енергії лише за рахунок субстратного фосфорилування [7].

Сірка є кінцевим акцептором електронів і відновлюється сірководновловальними бактеріями роду *Desulfuromonas* до гідроген сульфідів. Для відновлення S^0 до H_2S бактеріям необхідний донор електронів. Сірка (S_8) практично нерозчинна у воді, тонкодисперсна сірка з водою утворює колоїдний розчин. У водному середовищі сірка може перебувати у гідрофільній формі, наприклад, у формі політіонатів ($O_3S-S_n-SO_3$) або у вигляді полісульфідів. Полісульфідів (S_n^{2-} ; $n=4-5$), які утворюються при розчиненні сірки у водному розчині сульфідів, можуть бути субстратом для молібдоптериндинуклеотиддвмісної полісульфідредуктази [13, 18]. Цистин або окиснений глутатіон теж можуть бути акцепторами електронів. Нітрат, сульфат, сульфід, тіосульфат не можуть бути акцепторами електронів для *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov. [19]. Окиснення бактеріями роду *Desulfuromonas* лактату, етанолу, ацетату, пірувату, бутанолу, малату, фумарату, сукцинату, пропанолу, пропіонату, вищих жирних кислот і глутамату як джерел карбону і донорів електронів до CO_2 у циклі трикарбонових кислот за анаеробних умов чи в ацетил-CoA/CO-дегідрогеназному шляху стехіометрично пов'язане з відновленням акцептора електронів. Штами *Desulfuromonas acetoxidans* можуть зброджувати *L*-малат або фумарат, використовуючи їх як ак-

цептори електронів, з утворенням сукцинату як основного продукту за наявності або за відсутності ацетату [15].

Гідроген сульфід, сульфати, нітрати, нітрити й інші окиснені сполуки нітрогену, важкі метали є найбільш небезпечними забруднювачами довкілля. Значна їх частина не включається у природний кругообіг, накопичується в біосфері й зумовлює негативний вплив на екологічну структуру довкілля та людину. Хімічні методи очищення техногенно забруднених вод малоефективні й енерговитратні. Розробка нових мікробних біотехнологій зниження вмісту гідроген сульфід, сульфатів, нітратів, нітритів і важких металів у водних екосистемах є особливо актуальним завданням.

Сірковідновлювальні бактерії роду *Desulfuromonas* привертають увагу дослідників як потенційні агенти очищення стічних вод, забруднених гідроген сульфідом і важкими металами. Відомо, що сірковідновлювальні бактерії в результаті дисиміляційної сіркоредукції утворюють гідроген сульфід, який взаємодіє з йонами двовалентних металів з утворенням нерозчинних сульфідів, котрі вилучаються таким чином із природного кругообігу [4, 8, 9, 20]. Ці бактерії окиснюють органічні субстрати з використанням металів зі змінною валентністю як акцепторів електронів і переводять їх у нетоксичні або менш токсичні для живих організмів форми [5]. У сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio vulgaris* цитохром c_3 функціонує як Fe (III)- та U (VI)-редуктаза. У *Desulfuromonas acetoxidans* виявлено тригемовий цитохром c_3 , близький за структурою до тетрагемового цитохрому c_3 *D. vulgaris*, який є, можливо, металоредуктазою в цих бактерій [17].

Здатність до використання різних акцепторів електронів відрізняється у штамів бактерій одного роду [15]. Фізіологічні аспекти отримання енергії для росту під час відновлення акцепторів електронів бактеріями роду *Desulfuromonas*, виділеними з озера Яворівське, досліджені недостатньо [10, 11], тому метою роботи було вивчення здатності цих бактерій використовувати сполуки сульфуру, нітрогену, органічні сполуки та важкі метали зі змінною валентністю як акцептори електронів анаеробного енергетичного метаболізму, відновлювати їх, перетворюючи у нетоксичні або менш токсичні для довкілля форми.

Матеріали та методи

Об'єктом досліджень були сірковідновлювальні бактерії *Desulfuromonas acetoxidans* IMB B-7384, *Desulfuromonas* sp. *Yavor-5* та *Desulfuromonas* sp. *Yavor-7*, виділені з озера Яворівське. Штами ідентифіковані на основі вивчення морфологічних, культуральних та фізіологічних особливостей і зберігаються в колекції кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка [11].

Бактерії вирощували в середовищі Кравцова-Сорокіна [2] без солі феруму (II) та без сульфатів такого складу (г/л): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,84; K_2HPO_4 – 0,5; NH_4Cl – 0,16; $\text{Mg-Cl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; натрій лактат ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$) – 2,0 або натрій піруват ($\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$) – 1,9 упродовж 10 діб при 30°C за анаеробних умов у пробірках об'ємом 25 мл, доверху заповнених середовищем. Перед висівом у середовище вносили 0,05 мл стерильного розчину $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ (1%), для доведення рН середовища до 7,2 використовували стерильний 10 н розчин NaOH. Сірку стерилізували окремо та вносили в середовище за концентрації не меншої, ніж 0,1 г/л (3,47 мМ – концентрація сульфатів у стандартному середовищі Кравцова-Сорокіна). Стерильні розчини $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, Na_2SO_3 , Na_2SO_4 , цистеїну ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$), NaNO_3 , NaNO_2 , фумарату ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$), малату ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$), $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ вносили в середовище за концентрації 3,47 мМ. Нерозчинний у воді MnO_2 вносили у пробірки, які стерилізували і використовували для експериментів, у кількості, необхідній для отримання його концентрації в середовищі 3,47 мМ. Для дослідження впливу використання NaNO_3 , NaNO_2 , $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$, $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$, MnO_2 як акцепторів електронів на нагромадження бактеріями біомаси

клітини висівали в середовище, до якого для задоволення асиміляційних потреб бактерій у сульфурі додавали цистеїн (0,2 г/л) [7]. До середовища без натрій лактату, яке містило фумарат або малат і як донор, і як акцептор електронів та джерело карбону, їх додавали в концентрації 21,33 мМ, яку розраховували як суму вмісту в середовищі донора (17,86 мМ) й акцептора електронів (3,47 мМ). Клітини вносили в середовище у кількості 10 об. % до початкової концентрації 10^8 КУО/мл (0,05 г/л). Бактерії культивували впродовж 10 діб.

Біомасу визначали турбідиметрично за мутністю суспензії клітин шляхом її фотометрування на фотоелектроколориметрі КФК-3 при 340 нм у кюветі з оптичним шляхом 3 мм.

Концентрацію гідроген сульфід у культуральній рідині, відокремленій від клітин центрифугуванням при 6 тис. об./хв впродовж 15 хв, визначали спектрофотометрично [23].

Фумарат і сукцинат, що є проміжним продуктом відновлення клітинами *Desulfuromonas* sp. *Yavor-5* і *Desulfuromonas* sp. *Yavor-7* фумарату, виявляли з використанням високоефективного рідинного хроматографа (Varian ProStar) після 1 та 2 діб росту в середовищі з фумаратом як акцептором, донором електронів і джерелом карбону (21,33 мМ) та з цистеїном як джерелом сульфуру (0,2 г/л) у культуральній рідині й клітинних екстрактах. Культуральну рідину відокремлювали від клітин центрифугуванням при 6 тис. об./хв впродовж 15 хв і перед використанням зберігали в льоді. Клітини ресуспендували в 3 мл екстрагуювального буферу (50 мМ калій-фосфатний буфер, рН 7,5; 10^{-5} М ЕДТА (етилендіамінтетраацетат); 10^{-5} М ФМСФ (фенілметилсульфонілфторид)) і руйнували за допомогою ультразвукового дезінтегратора УЗДН-2Т частотою 22 кГц впродовж 5 хв (0,5 хв руйнування і 0,5 хв паузи 5 разів). Уламки клітин від супернатанту відділяли центрифугуванням при 15 тис. об./хв впродовж 45 хв при 4°C. Отримані клітинні екстракти поміщали в лід і відразу використовували для досліджень. Хроматографічна система складалася з двох помп Varian ProStar 210, хроматографічної колонки Polaris 5 C18-A, 250×4,6 мм у модулі колонок Varian ProStar 500, спектрофотометричного детектора з фотодіодною матрицею Varian ProStar 335. Як рухоми фазу використовували 1 розчинник: 0,2% розчин трифтороцтової кислоти (AppliChem) у воді (отриманій за допомогою системи очищення води Adrona Crystal CreBio з ультрафільтром Milipore). Хроматографічне розділення здійснювали у 0,2% розчині трифтороцтової кислоти протягом 8 хв. Потік розчинника становив 1,5 мл/хв [14]. Хроматограми записували при довжині хвилі 210 нм. Температура колонки становила 35°C.

Для визначення впливу сполук перехідних важких металів на ріст і рівень утворення гідроген сульфід сірководновлювальними бактеріями клітини осаджували центрифугуванням впродовж 20 хв при 6 тис. об./хв, ресуспендували у стерильному розчині NaCl (0,9%), за стерильних умов інкубували впродовж 1 год зі стерильними розчинами $K_2Cr_2O_7$ і $C_6H_5O_7Fe$ та MnO_2 (наважками) за концентрацій 0 (контроль); 0,5; 2,5; 3,5 мМ, осаджували центрифугуванням впродовж 20 хв при 6 тис. об./хв, двічі відмивали стерильним розчином NaCl (0,9%) і висівали в середовище зі сіркою (густина засіву – 0,05 г/л), після 10 діб росту визначали біомасу та вміст гідроген сульфід у культуральній рідині.

Для дослідження впливу сполук важких металів на нагромадження біомаси бактеріями *D. acetoxidans* ІМВ В-7384, *Desulfuromonas* sp. *Yavor-5* та *Desulfuromonas* sp. *Yavor-7* клітини вирощували в середовищі без сульфатів, сірки, з цистеїном як джерелом сульфуру (0,2 г/л) та натрій піруватом як донором електронів (17,86 г/л), у яке додавали в еквімолярній кількості до вмісту сульфатів у стандартному середовищі стерильні 1 М розчини $C_6H_5O_7Fe$, $K_2Cr_2O_7$, фумарату (контроль), а також MnO_2 до їхньої кінцевої концентрації 3,47 мМ. Попередньо клітини вирощували в середовищі без сульфатів, без сірки, з цистеїном (0,2 г/л), фумаратом (3,47 мМ) і натрій піруватом (17,86 мМ) до середини

експоненційної фази росту. На 2, 4, 6, 8, 10 добу росту біомасу бактерій визначали фотометрично. У культуральній рідині якісно визначали наявність йонів Fe (III), Cr (VI) та Mn (IV) [3], кількісно – вміст Fe (II) за реакцією з *o*-фенатроліном [12].

Досліди повторювали тричі з трьома паралельними постановками для кожного варіанта експериментальних і контрольних умов. Основні статистичні показники вираховували за безпосередніми даними (середнє арифметичне – M , стандартна похибка середнього арифметичного – m , $M \pm m$). Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обраховували коефіцієнт Стьюдента t , достовірною вважалася різниця при рівні значимості $p \leq 0,05$, знайденому після знаходження t по таблиці t -розподілу Стьюдента при ступенях свободи $\nu = n_x + n_y - 1$ [1]. Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програму “Microsoft Excel 2010”.

Результати і їхнє обговорення

Сірковідновлювальні бактерії отримують енергію для росту за допомогою анаеробного сіркового дихання. Їм належить особливе значення в утворенні гідроген сульфід у техногенних водоймах сірковидобувних регіонів, збагачених як сіркою, так і органічними сполуками [10, 11]. Із проб води з глибини 30–40 м озера Яворівське отримано нагромаджувальні культури та виділено 10 чистих культур сірковідновлювальних бактерій. Для досліджень обрано культури сірковідновлювальних бактерій *Desulfuromonas* sp. *Yavor-5* та *Desulfuromonas* sp. *Yavor-7*, оскільки вони, як і штамп *D. acetoxidans* IMB B-7384, упродовж мінімального часу культивування в середовищі зі сіркою утворювали найбільше гідроген сульфід [11].

Для вивчення можливості використання бактеріями, окрім сірки, неорганічних сполук сульфуру з різним ступенем окиснення чи сульфуру органічних субстратів, клітини культивували в середовищі з додаванням 3,47 мМ натрій тіосульфату, сульфіту, сульфату, сульфурвмісної амінокислоти цистеїну та сірки (контроль). Також бактерії вирощували в середовищі без сполук сульфуру, в яке для задоволення асиміляційних потреб клітин у сульфурі вносили цистеїн (0,2 г/л). На 10 добу визначали біомасу та концентрацію гідроген сульфід (табл. 1). Встановлено, що *Desulfuromonas* sp. *Yavor-5*, *Desulfuromonas* sp. *Yavor-7* та *D. acetoxidans* IMB B-7384 не використовують сульфур $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, Na_2SO_3 , Na_2SO_4 як акцептор електронів анаеробного енергетичного метаболізму. У середовищах із цими сполуками, як і в середовищі без акцептора електронів, бактерії не росли й не утворювали гідроген сульфід. Очевидно, що на відміну від сульфатвідновлювальних бактерій, ферменти, необхідні для здійснення дисиміляційної редукції цих сполук, у бактерій роду *Desulfuromonas* відсутні, а їх забезпечення енергією відбувається за іншими механізмами. За 10 діб росту в середовищі з *L*-цистеїном і сіркою бактерії нагромаджували біомасу до 3,02 і 2,91 г/л, з утворенням до 1,23 і 1,95 мМ гідроген сульфід, відповідно. Найвищу біомасу та найвищу концентрацію гідроген сульфід, порівняно з іншими штамми, виявлено при вирощуванні в середовищі з *L*-цистеїном чи сіркою культури *Desulfuromonas* sp. *Yavor-7*. Отже, з отриманих результатів можна зробити висновок, що сульфур цистеїну бактерії всіх культур використовують як акцептор електронів. Більш інтенсивне утворення клітинами гідроген сульфід у результаті відновлення полісульфідної сірки дією полісульфідредуктази, порівняно з його утворенням у результаті відщеплення відновленого атома сульфуру від цистеїну дією піридоксальфосфатвмісної цистеїндесульфгідрази, можна пояснити відмінністю в енергетичному забезпеченні клітин при сірковому диханні та зброджуванні цистеїну, при якому він є одночасно і акцептором, і донором електронів (з утворенням пірватату як продукту β -елімінації цистеїну) [7].

Таблиця 1

Нагромадження біомаси та утворення гідроген сульфідів сірководновловальними бактеріями після 10 діб росту в середовищі з різними сполуками сульфуру як акцепторами електронів

Штам	Сполуки сульфуру в середовищі	Біомаса, г/л	[S ²⁻], мМ
<i>Desulfuromonas</i> sp. <i>Yavor-5</i>	Na ₂ S ₂ O ₃	0,04±0,01*	0
	Na ₂ SO ₃	0,05±0,04*	0
	Na ₂ SO ₄	0,04±0,07*	0
	C ₃ H ₇ NO ₂ S	2,97±0,05	1,16±0,03
	S ⁰ (контроль)	2,84±0,05	1,82±0,09
<i>Desulfuromonas</i> sp. <i>Yavor-7</i>	Без сполук сульфуру**	0,03±0,05*	0
	Na ₂ S ₂ O ₃	0,05±0,04*	0
	Na ₂ SO ₃	0,03±0,01*	0
	Na ₂ SO ₄	0,04±0,07*	0
	C ₃ H ₇ NO ₂ S	3,02±0,05	1,23±0,07
<i>D. acetoxidans</i> IMB B-7384	S ⁰ (контроль)	2,91±0,05	1,95±0,06
	Без сполук сульфуру**	0,03±0,01*	0
	Na ₂ S ₂ O ₃	0,05±0,04*	0
	Na ₂ SO ₃	0,04±0,05*	0
	Na ₂ SO ₄	0,03±0,07*	0
<i>D. acetoxidans</i> IMB B-7384	C ₃ H ₇ NO ₂ S	2,76±0,05	1,08±0,06
	S ⁰ (контроль)	2,65±0,05	1,59±0,04
	Без сполук сульфуру**	0,02±0,04*	0

Примітки. * – p≤0,05; ** – до середовища додавали цистеїн (0,2 г/л).

Щоб перевірити здатність сірководновловальних бактерій здійснювати нітрат- чи нітритредукцію, їх вирощували в середовищі без сірки з цистеїном (0,2 г/л), натрій нітратом чи нітритом (табл. 2). Бактерії не використовували нітроген нітрату і нітриту як акцептор електронів, оскільки у середовищі з NaNO₃ та NaNO₂ їхнього росту не спостерігали. Відомо, що окиснені атоми нітрогену можуть відновлювати не всі азотфіксувальні мікроорганізми, а лише ті, які синтезують нітрат- і нітритредуктазу [7]. Досліджувані нами сірководновловальні бактерії для росту потребують забезпечення амонієм, який утворюється денітрифікувальними мікроорганізмами внаслідок азотфіксації або відновлення нітратів, оскільки активностями вищеперелічених ферментів вони, очевидно, не володіють.

Таблиця 2

Нагромадження біомаси сірководновловальними бактеріями після 10 діб росту в середовищі зі сполуками нітрогену як акцепторами електронів**

Штам	Акцептори електронів у середовищі	Біомаса, г/л
<i>Desulfuromonas</i> sp. <i>Yavor-5</i>	NaNO ₃	0,07±0,03*
	NaNO ₂	0,06±0,08*
	S ⁰ (контроль)	2,72±0,07
<i>Desulfuromonas</i> sp. <i>Yavor-7</i>	NaNO ₃	0,08±0,02*
	NaNO ₂	0,09±0,04*
	S ⁰ (контроль)	2,75±0,04
<i>D. acetoxidans</i> IMB B-7384	NaNO ₃	0,07±0,01*
	NaNO ₂	0,05±0,03*
	S ⁰ (контроль)	2,59±0,08

Примітки. * – p≤0,05; ** – до середовищ зі сполуками нітрогену додавали цистеїн (0,2 г/л).

Енергетичне забезпечення клітин при анаеробному диханні та бродінні відрізняється. При анаеробному диханні під час окиснення донора електронів (органічних сполук) енергія запасється у формі АТФ шляхом субстратного фосфорилування, тоді як при відновленні акцептора електронів синтез АТФ поєднаний із перенесенням електронів по електронтранспортному ланцюгу (електронтранспортне фосфорилування). Під час бро-

діння АТФ утворюється у процесі субстратного фосфорилування, спряженого з окисненням донора електронів, тоді як перенесення електронів на молекулу акцептора не спряжене з запасанням енергії [7]. Відомо, що деякі штами сірковідновлювальних бактерій можуть зброджувати малат і фумарат як за наявності, так і без додаткового джерела карбону [22]. Мікроорганізми можуть синтезувати фумарат із малату за участю фумарази [7]. Перевіряли здатність досліджуваних нами бактерій використовувати фумарат і малат як акцептори електронів під час росту в середовищі з чи без натрій лактату як донора електронів і джерела карбону. Для задоволення асиміляційних потреб бактерій у сульфурі до середовищ з органічними акцепторами електронів додавали цистеїн (0,2 г/л) (табл. 3). Встановлено, що культури *Desulfuromonas* sp. *Yavor-5* та *Desulfuromonas* sp. *Yavor-7*, як і штамп *D. acetoxidans* IMB B-7384, використовують малат і фумарат як акцептори електронів, оскільки біомаса бактерій після 10 діб росту в середовищі з цими сполуками з натрій лактатом і без нього незначно відрізнялася від біомаси, нагромадженної після цього ж часу росту в середовищі зі сіркою та натрій лактатом. Фумарат і малат як органічні акцептори електронів добре відновлювалися всіма штамами, однак найвищу біомасу нагромаджували клітини *Desulfuromonas* sp. *Yavor-7*. Усі штами зброджували фумарат чи малат у середовищі без додаткового джерела карбону, проте за таких умов біомаса була незначно нижчою, ніж за наявності в середовищі лактату як донора електронів. Незважаючи на те, що окисно-відновний потенціал окисно-відновної пари фумарат/сукцинат ($E_0' = +0,03$ В) вищий, ніж пари S^0/HS^- ($E_0' = -0,27$ В), вихід біомаси, нагромадженної клітинами після росту в середовищі зі сіркою, виявився вищим, ніж у середовищі з фумаратом чи малатом, що, можливо, зумовлене відмінностями у ферментативних механізмах анаеробного дихання та бродиння. Отже, фумарат і малат можуть бути як акцепторами електронів, так і їхніми донорами та джерелами карбону для росту бактерій роду *Desulfuromonas*.

Таблиця 3

Нагромадження біомаси сірковідновлювальними бактеріями після 10 діб росту в середовищі з органічними акцепторами електронів**

Штам	Акцептори електронів у середовищі	Донори електронів і джерела карбону в середовищі	Біомаса, г/л
<i>Desulfuromonas</i> sp. <i>Yavor-5</i>	Фумарат	Натрій лактат	2,03±0,01
	Фумарат	Фумарат	1,55±0,04
	Малат	Натрій лактат	1,83±0,03
	Малат	Малат	1,31±0,05*
	S ⁰ (контроль)	Натрій лактат	2,79±0,06
<i>Desulfuromonas</i> sp. <i>Yavor-7</i>	Фумарат	Натрій лактат	2,08±0,03
	Фумарат	Фумарат	1,62±0,02
	Малат	Натрій лактат	1,93±0,04
	Малат	Малат	1,42±0,01*
	S ⁰ (контроль)	Натрій лактат	2,93±0,03
<i>D. acetoxidans</i> IMB B-7384	Фумарат	Натрій лактат	1,97±0,07
	Фумарат	Фумарат	1,48±0,05
	Малат	Натрій лактат	1,79±0,04
	Малат	Малат	1,26±0,02*
	S ⁰ (контроль)	Натрій лактат	2,68±0,04

Примітки. * – $p \leq 0,05$; ** – до середовищ з органічними акцепторами електронів додавали цистеїн (0,2 г/л).

При використанні бактеріями фумарату одночасно як акцептора та донора електронів очікували виявлення проміжного продукту його відновлення – сукцинату в культуральній рідині та всередині клітин. Клітини бактерій *Desulfuromonas* sp. *Yavor-5* і *Desulfuromonas* sp. *Yavor-7* вирощували у середовищі без сірки, з цистеїном (0,2 г/л) і фумаратом, концентрацію якого в середовищі збільшували з урахуванням вмісту акцептора (3,47 мМ), донора електронів і джерела карбону (17,86 мМ) до 21,33 мМ. Густина засіву

збільшували до 0,5 г/л. Фумарат і сукцинат виявляли з використанням високочутливого рідинного хроматографа в клітинному екстракті й культуральній рідині після 1-ї та 2-ї доби росту (рис. 1). Як видно з отриманих результатів, у культуральній рідині *Desulfuromonas* sp. *Yavor-5* і *Desulfuromonas* sp. *Yavor-7* виявлено фумарат у кількості 0,54–0,71 г/л, що значно менше його початкової концентрації в середовищі (2,47 г/л), і незначні кількості сукцинату (до 0,06 г/л). У клітинному екстракті *Desulfuromonas* sp. *Yavor-7* виявлено 0,5 мг/г клітин фумарату. Відомо, що відновлення фумарату з використанням різних донорів електронів відбувається за участю мембранного електронтранспортного ланцюга, до складу якого входять відповідні дегідрогенази й фумаратредуктаза, зв'язані між собою пулом менахінонів [7, 16]. Утворення сукцинату в результаті відновлення фумарату дією ФАД-вмісної фумаратредуктази є свідченням використання клітинами фумарату як акцептора електронів [7]. При використанні бактеріями фумарату як донора електронів відбувається його окиснення дією фумарази з утворенням малату [16]. Відновні еквіваленти, які утворюються з малату в циклі трикарбонових кислот, переносяться на наявний у середовищі акцептор електронів – фумарат. Отримані результати дають змогу підтвердити попередній висновок, що фумарат бактерії використовують і як акцептор, і як донор електронів анаеробного енергетичного метаболізму та джерело карбону для конструктивних потреб.

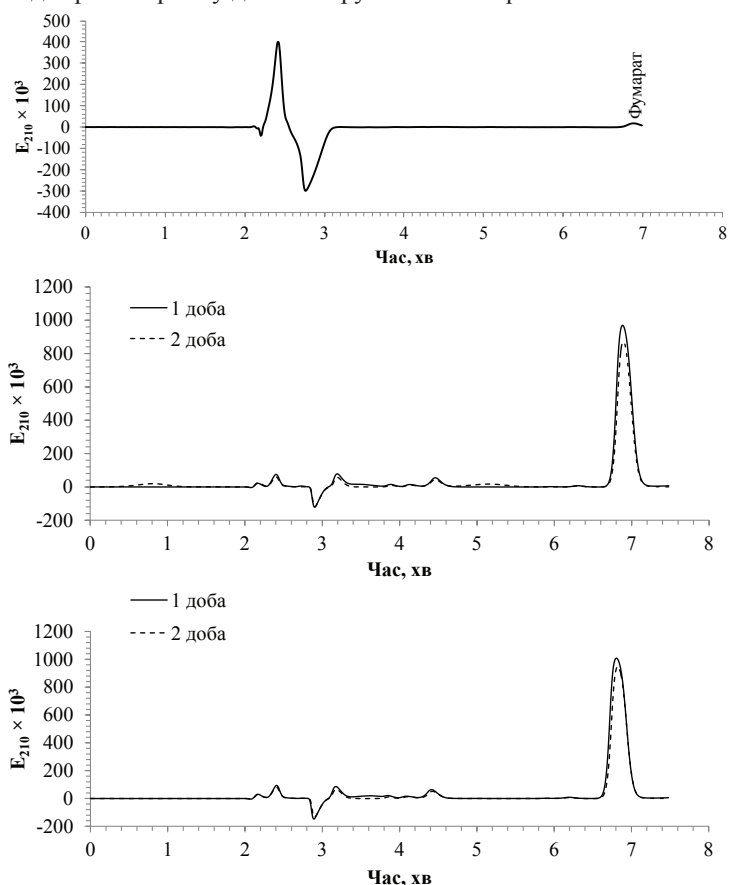


Рис. 1. Хроматограми клітинного екстракту після другої доби росту *Desulfuromonas* sp. *Yavor-7* (1) і культуральній рідині після першої та другої доби росту *Desulfuromonas* sp. *Yavor-5* (2) та *Desulfuromonas* sp. *Yavor-7* (3) у середовищі з фумаратом як акцептором, донором електронів і джерелом карбону (21,33 мМ) та цистеїном (0,2 г/л).

Йони металів зі змінною валентністю можуть бути використані багатьма мікроорганізмами як акцептори електронів у процесі анаеробного дихання [21]. У природних середовищах окиснені йони цих металів часто перебувають у малорозчинних формах, тому, незважаючи на дуже високий окисно-відновний потенціал, їхнє використання мікроорганізмами сповільнене через майже абсолютну нерозчинність при нейтральному рН. Так, розчинність у воді феруму в складі гематиту ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), феригідриту ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$), магеміту ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), гетиту ($\alpha\text{-FeOOH}$), лепідокрокиту ($\gamma\text{-FeOOH}$), магнетиту (Fe_3O_4), сидериту (FeCO_3) чи мангану у складі піролюзиту (MnO_2) або родохрозиту (MnCO_3) дуже низька. У бактерій, здатних до бродіння, окиснені йони металів зі змінною валентністю можуть бути використані лише як акцептори електронів для видалення надлишку відновників, що утворюються у процесі окиснення органічних субстратів. Структура електронтранспортного ланцюга й ферментів, які беруть участь у процесі їхнього дисиміляційного відновлення, маловивчені, можливо, активні центри мембранозв'язаних редуктаз металів (імовірно, цитохромів у бактерій роду *Desulfuromonas*), зокрема, у грамнегативних бактерій, локалізуються з зовнішнього боку цитоплазматичної мембрани для полегшення взаємодії з нерозчинними сполуками металів. Таким чином, йони відновлених металів мають утворюватися поза клітиною [7, 17]. З іншого боку, за високих концентрацій йони важких металів зі змінною валентністю виявляють на мікроорганізми більш чи менш виражену токсичну дію [4, 6].

Для визначення впливу сполук перехідних важких металів – Fe (III), Cr (VI) та Mn (IV), на ріст і рівень утворення гідроген сульфідів сірководновлювальними бактеріями клітини інкубували впродовж години з розчинами $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ (добре розчинна у воді сіль феруму (III)) та MnO_2 за концентрацій 0,5, 2,5 і 3,5 мМ, відмивали і вирощували впродовж 10 діб у середовищі зі сіркою (рис. 2). Встановлено, що Fe (III), Cr (VI) та Mn (IV) за концентрації 3,5 мМ більш ніж удвічі інгібують ріст і рівень утворення гідроген сульфідів бактеріями, інкубованими зі сполуками цих металів. Якщо Fe (III) за концентрацій до 2,5 мМ виявляв меншу інгібуючу дію на дисиміляційну сіркоредакцію, здійснювану клітинами всіх досліджуваних штамів бактерій, порівняно з Cr (VI) та Mn (IV), то за концентрації 3,5 мМ його негативний вплив на цей процес виявився подібним до впливу Cr (VI). Манган у складі MnO_2 виявився найбільш токсичним для бактерій, оскільки за всіх досліджуваних його концентрацій виявлено найбільше пригнічення росту й утворення гідроген сульфідів клітинами всіх штамів.

Досліджували здатність сірководновлювальних бактерій рости в середовищі з Fe (III), Cr (VI) та Mn (IV) за відсутності сірки для з'ясування, чи можуть ці бактерії використовувати їх як кінцеві акцептори електронів при окисненні органічних субстратів. Клітини *Desulfuromonas* sp. *Yavor-5*, *Desulfuromonas* sp. *Yavor-7* та *D. acetoxidans* IMB B-7384 вирощували у середовищі без сірки з цистеїном (0,2 г/л) та натрій піруватом (17,86 мМ), у яке додавали $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, MnO_2 і фумарат (контроль) за концентрації 3,47 мМ (рис. 3). За наявності в середовищі Fe (III) ріст бактерій виявився дещо інтенсивнішим, ніж у середовищі з фумаратом. Якщо за 10 діб росту в середовищі з Fe (III) бактерії нагромаджували біомасу 2,7–2,8 г/л, то у середовищі з фумаратом – 2,3–2,5 г/л. Оскільки у складі середовища концентрація акцептора електронів становить 3,47 мМ (вміст інших компонентів однаковий), то можна було би вважати, що вихід біомаси повинен напряму залежати від окисно-відновного потенціалу акцептора електронів, який вищий у окисно-відновній парі Fe (III)/Fe (II) ($E_0' = +0,77$ В) і нижчий у парі фумарат/сукцинат ($E_0' = +0,03$ В). Можливо, незначна різниця в нагромадженні біомаси бактеріями при використанні фумарату і тривалентного феруму зумовлена негативним впливом на клітини йона металу в концентрації 3,47 мМ. Майже вдвічі нижчий вихід біомаси, виявлений після культивування бактерій упродовж цього ж часу в середовищі з Cr (VI) і Mn (IV), також можна пояснити високою токсичністю для клітин $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ і MnO_2 за концентрації 3,47 мМ.

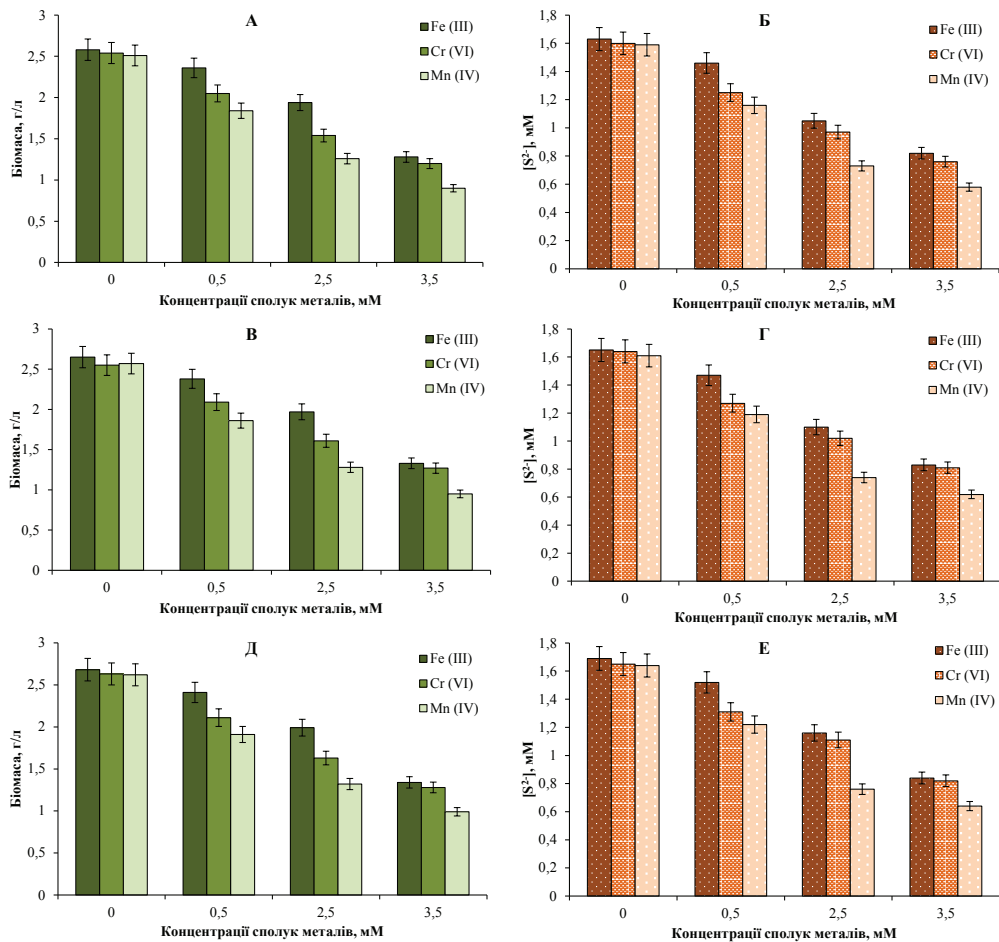


Рис. 2. Вплив $C_6H_5O_7Fe$, $K_2Cr_2O_7$, MnO_2 на нагромадження біомаси (А, В, Д) та утворення гідроген сульфід (Б, Г, Е) *D. acetoxidans* IMB В-7384 (А, Б), *Desulfuromonas* sp. *Yavor-5* (В, Г) і *Desulfuromonas* sp. *Yavor-7* (Д, Е) після 10 діб росту в середовищі зі сіркою.

Упродовж перших восьми діб культивування в середовищі можна було якісно виявити тривалентний ферум, який майже повністю використовувався бактеріями на 10-ту добу і в середовищі не виявлявся, що, можливо, пов'язано з переходом культур у стаціонарну фазу росту з різким сповільненням окисно-відновних реакцій і зниженням потреби бактерій в акцепторі електронів (табл. 4). Після 10 діб росту в культуральній рідині кількісно визначали вміст йонів Fe (II) (табл. 5). Встановлено, що в середовищі з Fe (III) як єдиним акцептором електронів тривалентний ферум відновлюється бактеріями практично повністю, відносна кількість утвореного Fe (II) становить 96,0–100,0%. Шестивалентний хром і чотиривалентний манган якісно виявлялися в середовищі упродовж усього часу культивування бактерій, що свідчить про неповне їх використання клітинами (див. табл. 4). Отже, виявлено, що всі культури сірководновловальних бактерій використовують (із різною інтенсивністю) сполуки Fe (III), Cr (VI) та Mn (IV) за концентрації 3,47 мМ як акцептори електронів, що демонструє важливу роль цих бактерій у відновній детоксикації довкілля від окиснених форм перехідних важких металів.

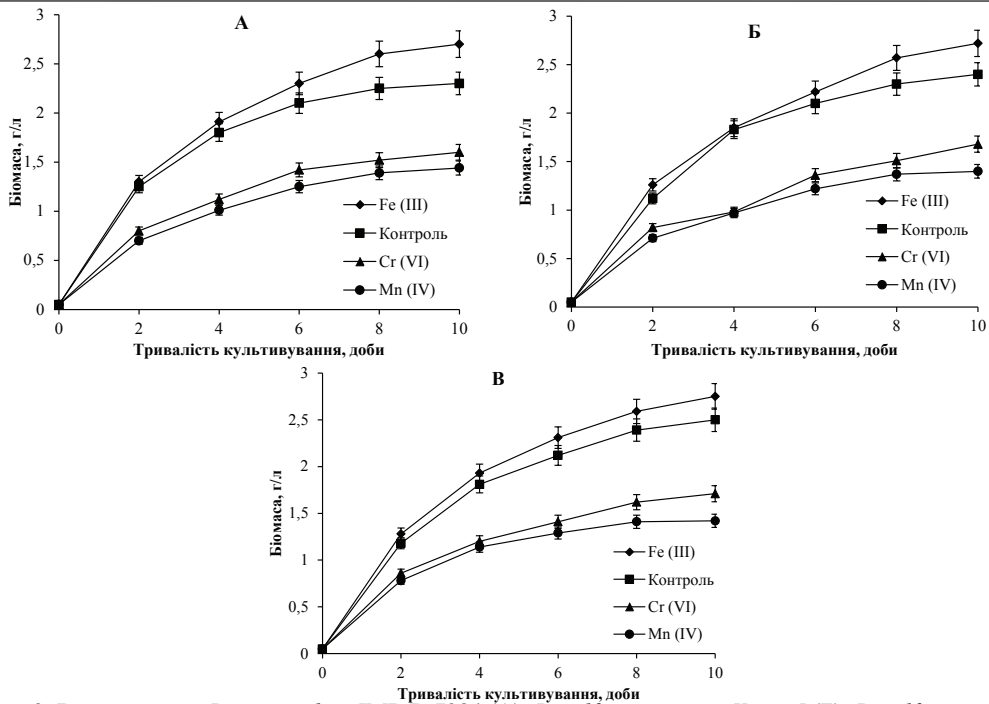


Рис. 3. Використання *D. acetoxidans* IMB B-7384 (А), *Desulfuromonas* sp. *Yavor-5* (Б), *Desulfuromonas* sp. *Yavor-7* (В) іонів важких металів зі змінною валентністю як акцепторів електронів (3,47 мМ) під час росту в середовищі з цистеїном (0,2 г/л) і натрій піруватом (17,86 мМ). Контроль – середовище з fumarатом (3,47 мМ) як акцептором і натрій піруватом (17,86 мМ) як донором електронів.

Таблиця 4

Відновлення Fe (III), Cr (VI), Mn (IV) сірководнювальними бактеріями під час росту в середовищі з цистеїном (0,2 г/л) і натрій піруватом*

Час культивування, доби	Fe (III)	Cr (VI)	Mn (IV)
<i>Desulfuromonas</i> sp. <i>Yavor-5</i>			
0	+	+	+
2	+	+	+
4	+	+	+
6	+	+	+
8	+	+	+
10	-	+	+
<i>Desulfuromonas</i> sp. <i>Yavor-7</i>			
0	+	+	+
2	+	+	+
4	+	+	+
6	+	+	+
8	+	+	+
10	-	+	+
<i>D. acetoxidans</i> IMB B-7384			
0	+	+	+
2	+	+	+
4	+	+	+
6	+	+	+
8	+	+	+
10	-	+	+

Примітка. * – Результати якісної реакції: “+” – наявність іонів Fe (III), Cr (VI), Mn (IV), “-” – відсутність іонів Fe (III), Cr (VI), Mn (IV).

Таблиця 5

Відновлення Fe (III) бактеріями після 10 діб росту в середовищі з цистеїном (0,2 г/л) і натрій піруватом

Fe (III), мМ	Fe (II), мМ	Відносна кількість утвореного Fe (II), %
3,47	3,46±0,04	<i>Desulfuromonas</i> sp. <i>Yavor-5</i> 99,7±0,3
3,47	3,47±0,03	<i>Desulfuromonas</i> sp. <i>Yavor-7</i> 100,0±0,1
3,47	3,33±0,05	<i>D. acetoxidans</i> IMB B-7384 96,0±0,2

Таким чином, встановлено, що сірковідновлювальні бактерії, які широко розповсюджені у водній товщі й намульних відкладах поверхневих ніш, впливають на геохімічні цикли карбону, сульфуру та металів у водному і ґрунтовому середовищах. Бактерії роду *Desulfuromonas*, виділені з озера Яворівське, що активно беруть участь у анаеробній деструкції органічних речовин, можуть використовувати полісульфідну сірку, сульфур L-цистеїну, тривалентний ферум, шестивалентний хром або чотиривалентний манган як акцептори електронів анаеробного енергетичного метаболізму. Вони використовують фумарат і малат одночасно як акцептори, донори електронів і як джерела карбону для росту. Отримані результати дають змогу вважати сірковідновлювальні бактерії перспективними для використання в технологіях очищення стічних вод від небезпечних забруднювачів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Деркач М. П., Гумецький Р. Я., Чабан М. Є. Курс варіаційної статистики. К.: Вища школа, 1977. 208 с.
2. Каравайко Г. И., Кузнецов С. И., Голомзик А. И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. М.: Наука, 1972. С. 190–221.
3. Крешков А. П. Основы аналитической химии. М.: Госхимиздат, 1961. Кн. 1. 636 с.
4. Мороз О. М. Утворення гідроген сульфідів сірковідновлювальними бактеріями за впливу солей важких металів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2013. Вип. 61. С. 154–165.
5. Мороз О. М., Яворська Г. В., Муравель Н. О., Клим І. Р. Відновлення Феруму (III) сульфатвідновлювальними і сірковідновлювальними бактеріями // Біологічні студії / *Studia biologica*. 2012. Т. 6. № 2. С. 161–172.
6. Перетятко Т., Гудзь С., Галушка А. Використання металів як кінцевих акцепторів електронів сульфатвідновлювальними бактеріями // Біологічні студії / *Studia biologica*. 2009. Т. 3. № 3. С. 141–158.
7. Современная микробиология // Прокариоты / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. Т. 1. 654 с.
8. Таширев А. Б. Взаимодействие микроорганизмов с металлами // Микробиол. журнал. 1995. Т. 57. № 2. С. 95–104.
9. Франк Ю. А., Лушников С. В. Биотехнологический потенциал сульфатредуцирующих бактерий // Экология и промышленность. 2006. Т. 1. С. 10–13.
10. Чайка О., Перетятко Т., Гудзь С. Сірковідновлювальні бактерії водойм Язівського сіркового родовища // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. біол. 2010. Вип. 28. С. 52–55.
11. Юринець Х. Є., Мороз О. М., Кулачковський О. Р., Звір Г. І. Морфологія і фізіологія сірковідновлювальних бактерій озера Яворівське // Молодь і поступ біології: VIII Міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів. Львів, 2012. С. 267–268.
12. Harris D. S. Quantitative chemical analysis. 2003. P. 258–261, 407–422.

13. Hedderich R., Klimmek O., Kroger A. et al. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides // FEMS Microbiol. Reviews. 1999. Vol. 22. P. 353–381.
14. Kerem Z., Bravdo B., Shoseyov O., Tugendhaft Y. Rapid liquid chromatography – ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must // J. Chromatogr. A. 2004. Vol. 1052. P. 211–215.
15. Kuever J., Rainey F. A., Widdel F. Genus I. *Desulfuromonas* / *Desulfuromonas* genus. Pfennig and Biebl eds. 1977. 306 p.
16. Paulsen J., Kroger A., Thauer R. K. ATP-driven succinate oxidation in the catabolism of *Desulfuromonas acetoxidans* // Arch. Microbiol. 1986. Vol. 44. P. 78–83.
17. Roden E. E., Lovley D. R. Dissimilatory Fe (III) reduction by the marine microorganism *Desulfuromonas acetoxidans* // Appl. Environ. Microbiol. 1993. Vol. 59. N 3. P. 734–742.
18. Schauder R., Müller E. Polysulfide as a possible substrate for sulfur-reducing bacteria // Arch. Microbiol. 1993. Vol. 160. P. 377–382.
19. Sung Y., Ritalahti K. M., Sanford R. A. et al. Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. Vol. 69. N 5. P. 2964–2974.
20. Tebo B. M. Metal precipitation by marine bacteria: potential for biotechnological applications // Genetic engineering – principles and methods / Ed. J.K. Setlow. New York: Plenum Press, 1995. P. 231–263.
21. Tebo B. M., Obratsova A. Y. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr (VI), U (VI), Mn (IV), and Fe (III) as electron acceptors // FEMS Microbiol. Lett. 1998. Vol. 162. P. 193–198.
22. Widdel F., Pfennig N. The genus *Desulfuromonas* and other gram-negative sulfur-reducing eubacteria // The prokaryotes / A. Balows, H. Truper, M. Dworkin et al. eds. N.Y.: Springer-Verlag, 1992. Vol. 4. P. 3379–3389.
23. Pat. 6340596 B1 USA, Int. U.G 01 N 33 / 00. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen / M. Sugiyama. Assignee Fujirebio Inc. № 09/248,316. Fil. 02.11.1999. Date of pat. 22.01.2002.

Стаття: надійшла до редакції 26.12.13

доопрацьована 15.05.14

прийнята до друку 19.05.14

DIFFERENT ELECTRON ACCEPTORS USAGE BY BACTERIA OF *DESULFUROMONAS* SP. ISOLATED FROM YAVORIV LAKE

O. Moroz, N. Gul', A. Galushka, G. Zvir, B. Borsukevych

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

Sulfur-reducing bacteria of *Desulfuromonas* genus, isolated from Yavoriv Lake, use L-cysteine sulfur and polysulfide sulfur as electron acceptors of anaerobic energy metabolism with its reducing to sulfide. Bacteria didn't reduce thiosulfate, sulfite and sulfate sulfur. Bacteria didn't use nitrogen of nitrate and nitrite as electron acceptor. *Desulfuromonas* sp. bacteria use fumarate and malate simultaneously as electron acceptors, donors and carbone sources for growth. It was established that Fe (III), Cr (VI) and Mn (IV) at concentration of 3.5 mM more than twice inhibit growth and level of hydrogen sulfide formation by bacteria

cells, incubated with this metals compounds. In spite of this sulfur reducing bacteria used Fe (III), Cr (VI) and Mn (IV) at that concentration as terminal electron acceptors with reducing them to less toxic to environment forms.

Keywords: sulfur-reducing bacteria, electron acceptors, transition heavy metals.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ АКЦЕПТОРОВ ЭЛЕКТРОНОВ БАКТЕРИЯМИ *DESULFUROMONAS* SP., ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ ОЗЕРА ЯВОРОВСКОЕ

О. Мороз, Н. Гуль, А. Галушка, Г. Звир, Б. Борсукевич

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

Показано, что серовосстанавливающие бактерии рода *Desulfuromonas*, выделенные из озера Яворовское, используют сульфур *L*-цистеина и полисульфидную серу как акцепторы электронов анаэробного энергетического метаболизма с восстановлением их до сульфида. Серу тиосульфата, сульфита и сульфата бактерии не восстанавливают. Бактерии не используют азот нитрата и нитрита как акцептор электронов. Бактерии *Desulfuromonas* sp. используют фумарат и малат одновременно как акцепторы, доноры электронов и как источники углеводорода для роста. Установлено, что Fe (III), Cr (VI) и Mn (IV) при концентрации 3,5 мМ более чем вдвое ингибируют рост и уровень образования сероводорода клетками бактерий, инкубированных с соединениями этих металлов. Несмотря на это, серовосстанавливающие бактерии используют Fe (III), Cr (VI) и Mn (IV) при той же концентрации как конечные акцепторы электронов, восстанавливая их к менее токсическим для окружающей среды формам.

Ключевые слова: серовосстанавливающие бактерии, акцепторы электронов, переходные тяжёлые металлы.