

МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК: 579.68+579.266+579.222

**ВІДНОВЛЕННЯ СУЛЬФАТ-, НІТРАТ- І НІТРИТ-ЙОНІВ  
БАКТЕРІЯМИ РОДУ *DESULFOVIBRIO* ЗА ВПЛИВУ СПОЛУК  
ФЕРУМУ (III), ХРОМУ (VI) ТА МАНГАНУ (IV)**

**О. Мороз, С. Гнатуш, Х. Богославець, Г. Яворська, Б. Борсукевич**

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

Встановлено, що сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 і *Desulfovibrio* sp. Yav-8, виділені з озера Яворівське, з різною інтенсивністю відновлюють у процесі анаеробного дихання  $Fe^{3+}$ ,  $Cr^{6+}$  та  $Mn^{4+}$  за концентрації 3,47 мМ їх сполук у середовищі Кравцова-Сорокіна. Внесення  $C_6H_5O_7Fe$ ,  $K_2Cr_2O_7$ ,  $MnO_2$  за концентрацій 0,5; 2,5; 3,5 мМ до інкубаційної суміші спричиняє пригнічення нагромадження біомаси та здійснювані бактеріями дисиміляційні сульфат-, нітрат- і нітритредукцію. За токсичним впливом на метаболічну активність бактерій досліджені сполуки металів можна розмістити у такій послідовності:  $MnO_2$ ,  $K_2Cr_2O_7$  та  $C_6H_5O_7Fe$ .  $Mn$  (IV) оксид, калій біхромат і  $Fe$  (III) цитрат за концентрації 3,5 мМ у інкубаційній суміші пригнічували рівень відновлення бактеріями сульфат-йонів у середовищі з  $SO_4^{2-}$  у 1,9; 1,8 і 1,7 разу, рівень відновлення нітрат-йонів у середовищі з  $NO_3^-$  у 5,1; 5,0 і 3,9 разу, рівень відновлення нітрит-йонів у середовищі з  $NO_2^-$  у 5,7; 5,0 і 4,7 разу відповідно. Дисиміляційні нітрат- і нітритредукція, здійснювані бактеріями роду *Desulfovibrio*, виявилися більш чутливими до негативної дії  $C_6H_5O_7Fe$ ,  $K_2Cr_2O_7$  та  $MnO_2$ , порівняно з процесом дисиміляційної сульфатредукції.

*Ключові слова:* сульфатвідновлювальні бактерії, важкі метали, гідроген сульфід, йони амонію, сульфат-йони, нітрат-йони, нітрит-йони.

Дисиміляційна  $Fe$  (III) редукція – це процес, здійснюючи який мікроорганізми переносять електрони на зовнішні йони феруму (III), відновлюючи їх до йонів феруму (II), без асиміляції феруму. Широкий ряд філогенетично відмінних мікроорганізмів, від архей до бактерій, здатні до дисиміляційної  $Fe$  (III) редукції. Більшість мікроорганізмів, які відновлюють ферум (III), також можуть переносити електрони на йони хрому (VI) та мангану (IV), відновлюючи їх до  $Cr^{3+}$  і  $Mn^{2+}$  відповідно [14, 21]. Цікаво, що металовідновлювальні мікроорганізми здатні переносити електрони на нерозчинні акцептори електронів, такі як  $Fe$  (III) та  $Mn$  (IV) оксиди, з утворенням найчастіше магнетиту ( $Fe_3O_4$ ), сидериту ( $FeCO_3$ ) або родохрозиту ( $MnCO_3$ ), розчинність яких у воді теж дуже низька [14]. Йони металів зі змінною валентністю можуть бути використані бактеріями як акцептори електронів для видалення надлишку відновників, що утворюються у процесі окиснення органічних субстратів [7]. Структура ланцюга транспортування електронів і ферменти, які беруть участь у процесі їхнього дисиміляційного відновлення, маловивчені. Висувають припущення, що активні центри мембранозв'язаних редуктаз металів, зокрема, у грамнегативних бактерій, локалізуються з зовнішнього боку цитоплазматичної мембрани для полегшення взаємодії з нерозчинними сполуками металів [14]. Тим не менш, за високих концентрацій йони важких металів зі змінною валентністю виявляють на мікроорганізми більш чи менш вираже-

ну токсичну дію [6]. Токсичність йонів металів для мікроорганізмів є однією із головних перешкод для їх застосування у ремедіаційних технологіях.

Відомо, що сульфатвідновлювальні бактерії, які беруть участь в анаеробній де-струкції органічних речовин, у нішах із низьким окисно-відновним потенціалом здійснюють відновну трансформацію широкого спектра сполук не лише сульфур, але і нітрогену [9, 15, 20]. Відновлення нітрат- чи нітрит-йонів у бактерій виконує кілька фізіологічних функцій: використання  $\text{NO}_3^-$  чи  $\text{NO}_2^-$  як джерел нітрогену (асиміляція нітрат- або нітрит-йонів); утворення АТФ під час утилізації  $\text{NO}_3^-$  або  $\text{NO}_2^-$  як кінцевих акцепторів електронів (нітратне або нітритне дихання); розсіювання надлишку енергії відновлення для підтримання окисно-відновного балансу клітин (дисиміляція нітрат- чи нітрит-йонів) [7, 18]. У процесі використання нітрогену нітрату чи нітриту сульфатвідновлювальними бактеріями як акцептора електронів дисиміляційної нітрат- або нітритредукції у середовищі нагромаджуються йони амонію (тобто відбувається амоніфікація нітрату чи нітриту), які можуть використовуватися клітинами для конструктивних потреб [5, 7, 12, 20].

Метою нашої роботи було дослідити здатність різних штамів сульфатвідновлювальних бактерій роду *Desulfovibrio*, виділених з озера Яворівське, відновлювати у процесі анаеробного дихання  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$  та  $\text{Mn}^{4+}$ , а також вивчити вплив сполук феруму (III), хрому (VI) та мангану (IV) на здійснювану ними сульфат-, нітрат- і нітритредукцію для розкриття біотехнологічного потенціалу цих мікроорганізмів.

#### Матеріали та методи

Досліджували вплив сполук металів на фізіологічні особливості штамів сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-8, виділених з озера Яворівське, які ідентифіковані та зберігаються в колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка [4].

Бактерії вирощували в середовищі Кравцова-Сорокіна [1] без сульфат-йонів і без ферум (II) хлориду гексагідрату такого складу (г/л):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  – 0,84;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,5;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 0,16;  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,1; натрій лактат ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$ ) – 2,0 (17,86 мМ) упродовж 10 діб при 30°C за анаеробних умов у пробірках, об'ємом 25 мл, доверху заповнених середовищем. Перед засівом 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  $\text{NaOH}$ . Бактерії висівали у середовище до початкової концентрації клітин 0,05 г/л або близько  $10^8$  КУО/мл. Розчини  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фумарату ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ ),  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_2$  стерилізували окремо та вносили в середовище за концентрації 3,47 мМ (концентрація сульфат-йонів у стандартному середовищі Кравцова-Сорокіна). До середовищ без  $\text{SO}_4^{2-}$  з нітрат- чи нітрит-йонами не додавали  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . У середовища без сульфат-йонів з фумаратом або нітрат- чи нітрит-йонами вносили сульфурвмісну амінокислоту цистеїн (0,2 г/л) для задоволення асиміляційних потреб бактерій у сульфурі.

Біомасу бактерій після вирощування у рідкому середовищі визначали за мутністю суспензії клітин шляхом її вимірювання на фотоелектроколориметрі КФК-3 при довжині хвилі 340 нм у кюветі з оптичним шляхом 3 мм і розраховували за формулою:  $C, \text{ г/л} = (E_{340} \cdot n) / 0,19$ , де  $E_{340}$  – екстинкція при  $\lambda=340$  нм;  $n$  – фактор розведення; 0,19 – коефіцієнт перерахунку, отриманий за калібрувальною кривою залежності екстинкції від сухої маси клітин [3].

Концентрацію гідроген сульфід у культуральній рідині, відокремлений від клітин центрифугуванням при 6 тис. об./хв упродовж 15 хв, визначали спектрофотометрично за утворенням метиленової сині [23]. У культуральній рідині визначали також концентрації сульфат-йонів турбідиметричним методом за утворенням бар'єр сульфату після осадження

сульфат-йонів барій хлоридом [1], нітрат-, нітрит-йонів спектрофотометричним [1] і йонів амонію колориметричним методом за утворенням індофенолу [1].

Для дослідження впливу сполук важких металів на нагромадження біомаси бактеріями клітини вирощували в середовищі без сульфат-йонів, з цистеїном як джерелом сульфур та натрій лактатом чи натрій цитратом як донором електронів (17,86 мМ), у яке додавали в еквімолярній кількості до вмісту  $\text{SO}_4^{2-}$  у стандартному середовищі стерильні 1 М розчини  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , фумарату (контроль), а також стерильні наважки нерозчинного у воді  $\text{MnO}_2$  до їхньої кінцевої концентрації 3,47 мМ. Попередньо клітини вирощували в середовищі без  $\text{SO}_4^{2-}$ , з цистеїном, фумаратом (3,47 мМ) та натрій лактатом (17,86 мМ) до середини експоненційної фази росту. На 2, 4, 6, 8, 10 доби росту біомасу бактерій визначали турбідиметрично. У культуральній рідині якісно визначали наявність  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$  та  $\text{Mn}^{4+}$  [11], кількісно – вміст  $\text{Fe}^{2+}$  за реакцією з *o*-фенатроліном [11].

Для визначення впливу сполук металів на утворення гідроген сульфідів і відновлення сульфат-йонів клітини, попередньо вирощені у середовищі без  $\text{SO}_4^{2-}$  з цистеїном (0,15 г/л) і фумаратом, осаджували центрифугуванням (центрифуга ОС-6М) упродовж 20 хв при 6 тис. об./хв, ресуспендували у стерильному 0,9 % розчині  $\text{NaCl}$  та за стерильних умов інкубували впродовж 1 год із різними об'ємами стерильних 1 М водних розчинів  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$  та  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , а також стерильними наважками  $\text{MnO}_2$  за концентрацій у інкубаційній суміші 0,5; 2,5; 3,5 мМ, осаджували центрифугуванням упродовж 20 хв при 6 тис. об./хв, двічі відмивали фізіологічним розчином і висівали у середовище з  $\text{SO}_4^{2-}$  (3,47 мМ). Контроль – клітини, не інкубовані зі сполуками перехідних металів. Після 10 діб росту визначали біомасу, вміст гідроген сульфідів і сульфат-йонів.

Для визначення впливу сполук перехідних важких металів на відновлення бактеріями нітрат- чи нітрит-йонів клітини, попередньо вирощені у середовищі без  $\text{SO}_4^{2-}$  з цистеїном (0,15 г/л) і фумаратом, осаджували центрифугуванням упродовж 20 хв при 6 тис. об./хв, ресуспендували у стерильному 0,9% розчині  $\text{NaCl}$  та за стерильних умов інкубували впродовж 1 год із різними об'ємами стерильних 1 М водних розчинів  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$  та  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , а також стерильними наважками  $\text{MnO}_2$  за концентрацій в інкубаційній суміші 0,5; 2,5; 3,5 мМ, осаджували центрифугуванням упродовж 20 хв при 6 тис. об./хв, двічі відмивали фізіологічним розчином і висівали у середовище без  $\text{SO}_4^{2-}$  та  $\text{NH}_4\text{Cl}$  з цистеїном (0,15 г/л) і  $\text{NO}_3^-$  або  $\text{NO}_2^-$  (3,47 мМ) відповідно. Контроль – клітини, не інкубовані зі сполуками перехідних металів. Після 10 діб росту визначали біомасу, концентрації йонів амонію, нітрат- чи нітрит-йонів.

Досліди повторювали тричі з трьома паралельними постановками для кожного варіанта експериментальних і контрольних умов. Основні статистичні показники обчислювали 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 обчислювали коефіцієнт Ст'юдента  $t$ . Достовірною вважалася різниця при рівні значимості  $p \leq 0,05$ , обчисленому після знаходження  $t$  по таблиці  $t$ -розподілу Ст'юдента при ступенях свободи  $\nu = n_x + n_y$  [2]. Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програму "Microsoft Excel 2010".

#### Результати і їхнє обговорення

Сульфатвідновлювальні бактерії родів *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobacterium*, *Desulfocapsa*, *Desulfofrigus*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfobacter* і ін. здійснюють перетворення сполук карбону, сульфур, нітрогену і металів у водному та ґрунтовому середовищах [10, 13, 14, 16, 17, 20]. Сульфати, арилсульфати, детергенти, тіофени, сульфок-

сиди, сульфіти, полісульфіди, елементна сірка, сульфонаміди, гідроген сульфід, аміноксиди, нітрати, нітрити й ін. забруднюють кар'єри родовищ сірки і сульфідних руд, стоки нафтопереробних, целюлозно-паперових, харчових підприємств. На територіях діючих і недіючих шахт, полігонів побутових та промислових відходів утворюються кислі дренажні води, що містять, окрім токсичних сульфур- і нітрогеновмісних сполук, хімічно активні йони металів. Біологічні методи очищення доквілля – ефективніші, безпечніші та дешевші, ніж фізичні й хімічні, майже без вторинних відходів. Оскільки за впливу сполук металів спостерігається сповільнення метаболізму бактерій, відбір виділених із антропогенно змінених екотопів резистентних до забруднень штамів, здатних метаболізувати широкий спектр полютантів, є особливо актуальним завданням для створення новітніх очисних біотехнологій [9].

Відомо, що сульфатвідновлювальні бактерії родів *Desulfovibrio* та *Desulfotomaculum*, як і представники інших філогенетично неспоріднених родів – *Geobacter*, *Desulfuromusa*, *Pelobacter*, *Geothrix*, *Geovibrio*, *Deferribacter*, *Ferribacter*, *Shewanella*, *Ferrimonas*, *Aeromonas*, *Sulfurospirillum*, *Wolinella*, *Pseudomonas*, *Thermoterrabacterium*, *Pyrobaculum*, *Thermotoga* та ін., здійснюють дисиміляційне відновлення іонів феруму (III), мангану (IV) й інших перехідних металів [14]. Досліджували здатність виділених нами з озера Яворівське штамів сульфатвідновлювальних бактерій [4] використовувати  $Fe^{3+}$ ,  $Cr^{6+}$  та  $Mn^{4+}$  як кінцеві акцептори електронів у процесі окиснення органічних субстратів. Контрольним було середовище з фумаратом, який сульфатвідновлювальні бактерії відновлюють до сукцинату (фумаратне дихання) за участю ланцюга транспортування електронів, до складу якого входять відповідні дегідрогенази і фумаратредуктаза, зв'язані між собою пулом менахіонів [7]. У середовищі з фумаратом не утворюється токсичний для клітин гідроген сульфід, а вихід біомаси приблизно такий, як і у середовищі зі сульфат-йонами. Клітини *D. desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 та *Desulfovibrio* sp. Yav-8 культивували у середовищі без  $SO_4^{2-}$  з цистеїном (0,2 г/л) і натрій лактатом або цитратом (17,86 мМ), у яке додавали  $C_6H_5O_7Fe$ ,  $K_2Cr_2O_7$ ,  $MnO_2$  та фумарат (контроль) у концентрації 3,47 мМ (рис. 1). За наявності у середовищі  $Fe^{3+}$  нагромадження біомаси дослідженими штамми бактерій було вищим, ніж у середовищі з фумаратом. Якщо за 10 діб росту в середовищі з  $Fe$  (III) цитратом досліджені штами бактерій нагромаджували біомасу до 2,74 г/л, то у середовищі з фумаратом – до 2,26 г/л. Донором електронів у обох середовищах був натрій цитрат. Незважаючи на те, що окисно-відновний потенціал у окисно-відновної пари  $Fe$  (III)/ $Fe$  (II) ( $E_0' = +0,77$  В) значно вищий, ніж у пари фумарат/сукцинат ( $E_0' = +0,03$  В), виявлено незначну різницю в нагромадженні біомаси бактеріями при використанні тривалентного феруму і фумарату, що можна пояснити негативним впливом на клітини йона металу за концентрації 3,47 мМ. Майже удвічі нижчий вихід біомаси, ніж у середовищі з фумаратом, виявлений після культивування бактерій упродовж цього ж часу в середовищах з  $K_2Cr_2O_7$  та  $MnO_2$ . Донором електронів у всіх трьох середовищах був натрій лактат. Якщо за 10 діб росту в середовищах з  $K_2Cr_2O_7$  та  $MnO_2$  бактерії нагромаджували біомасу, яка не перевищувала 1,55 і 1,32 г/л відповідно, то у середовищі з фумаратом – 2,23 г/л. Хоча окисно-відновні потенціали у окисно-відновних пар  $Cr$  (VI)/ $Cr$  (III) ( $E_0' = +1,33$  В) та  $Mn$  (IV)/ $Mn$  (II) ( $E_0' = +1,23$  В) значно вищі, ніж у окисно-відновних пар  $Fe$  (III)/ $Fe$  (II) ( $E_0' = +0,77$  В) і фумарат/сукцинат ( $E_0' = +0,03$  В) [7], використання сполук  $Cr$  (VI) та  $Mn$  (IV) мікроорганізмами сповільнене через їхню токсичність і майже абсолютної нерозчинності  $MnO_2$  при нейтральному рН. Тим не менш у донних відкладах відновлення сполук перехідних важких металів бактеріями відіграє важливу роль у процесі окиснення органічних субстратів [7, 13, 14].

Упродовж перших 6 діб культивування в середовищі можна було якісно виявити  $Fe^{3+}$ , який майже повністю використовувався бактеріями на 8–10 добу і в середовищі не

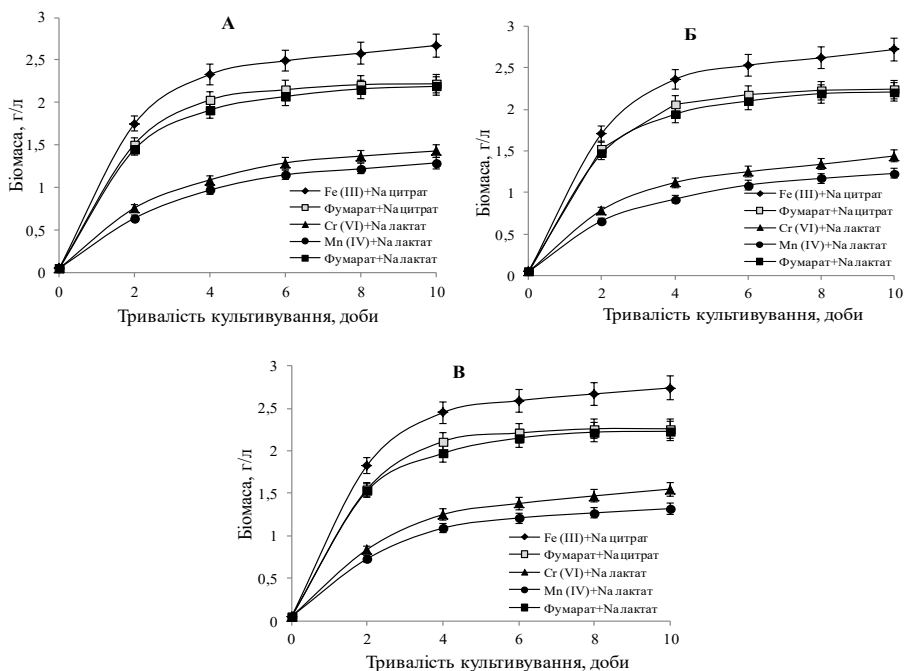


Рис. 1. Нагромадження біомаси *D. desulfuricans* IMB K-6 (А), *Desulfovibrio* sp. Yav-6 (Б), *Desulfovibrio* sp. Yav-8 (В) під час росту в середовищі з  $C_6H_5O_7Fe$ ,  $K_2Cr_2O_7$ ,  $MnO_2$  (3,47 мМ), цистеїном (0,2 г/л) і натрій лактатом або цитратом (17,86 мМ) як донорами електронів. Контроль – середовище з фумаратом (3,47 мМ) як акцептором і натрій лактатом або цитратом (17,86 мМ) як донором електронів.

виявлявся, що, можливо, обумовлено переходом культур у стаціонарну фазу росту, в якій сповільнені окисно-відновні реакції та знижені потреби бактерій в акцепторі електронів (табл. 1). Після 10 діб росту в культуральній рідині кількісно визначали вміст  $Fe^{2+}$  (табл. 2). Встановлено, що в середовищі з  $Fe^{3+}$  як єдиним акцептором електронів тривалентний ферум відновлюється бактеріями практично повністю. Шестивалентний хром і чотиривалентний манган якісно виявлялися в середовищі упродовж усього часу культивування бактерій, що свідчить про неповне їх використання клітинами (див. табл. 1). Отже, виявлено, що всі досліджені штами сульфатвідновлювальних бактерій з різною інтенсивністю використовують  $Fe^{3+}$ ,  $Cr^{6+}$  та  $Mn^{4+}$  за концентрації 3,47 мМ як акцептори електронів, що демонструє важливу роль цих мікроорганізмів у відновній детоксикації природних і техногенних середовищ від окиснених форм перехідних важких металів.

Вивчали вплив сполук перехідних металів на сульфідогенну активність різних штамів сульфатвідновлювальних бактерій. Для цього клітини *D. desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 і *Desulfovibrio* sp. Yav-8 інкубували упродовж години з  $C_6H_5O_7Fe$ ,  $K_2Cr_2O_7$  та  $MnO_2$  [8], відмивали і культивували у середовищі зі сульфат-йонами без сполук металів, щоб уникнути використання бактеріями важких металів зі змінною валентністю як акцепторів електронів і утворення їхніх сульфідів у культуральній рідині. Встановлено, що зі зростанням концентрацій йонів металів під час інкубації клітин рівень нагромадження ними біомаси й утворення гідроген сульфїду знижувався.

Якщо клітини, не інкубовані з  $C_6H_5O_7Fe$ , за 10 діб нагромаджували біомасу, яка не перевищувала 2,95 г/л, то рівень нагромадження біомаси клітинами, інкубованими з 0,5,

Таблиця 1

Наявність Fe<sup>3+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Mn<sup>4+</sup> у культуральній рідині за умов росту сульфатвідновлювальних бактерій у середовищах з C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, MnO<sub>2</sub> (3,47 мМ), цистеїном (0,2 г/л) і натрій лактатом чи натрій цитратом (17,86 мМ)

| Тривалість культивування, доби | Акцептори електронів у середовищі |                  |                  |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|
|                                | Fe <sup>3+</sup>                  | Cr <sup>6+</sup> | Mn <sup>4+</sup> |
|                                | <i>Desulfovibrio</i> sp. Yav-6    |                  |                  |
| 0                              | +                                 | +                | +                |
| 2                              | +                                 | +                | +                |
| 4                              | +                                 | +                | +                |
| 6                              | +                                 | +                | +                |
| 8                              | -                                 | +                | +                |
| 10                             | -                                 | +                | +                |
|                                | <i>Desulfovibrio</i> sp. Yav-8    |                  |                  |
| 0                              | +                                 | +                | +                |
| 2                              | +                                 | +                | +                |
| 4                              | +                                 | +                | +                |
| 6                              | +                                 | +                | +                |
| 8                              | -                                 | +                | +                |
| 10                             | -                                 | +                | +                |
|                                | <i>D. desulfuricans</i> IMB K-6   |                  |                  |
| 0                              | +                                 | +                | +                |
| 2                              | +                                 | +                | +                |
| 4                              | +                                 | +                | +                |
| 6                              | +                                 | +                | +                |
| 8                              | -                                 | +                | +                |
| 10                             | -                                 | +                | +                |

**Примітка.** “+” – наявність Fe<sup>3+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Mn<sup>4+</sup> у середовищі; “-” – відсутність Fe<sup>3+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Mn<sup>4+</sup> у середовищі.

Таблиця 2

Концентрація Fe<sup>2+</sup> у культуральній рідині після 10 діб росту сульфатвідновлювальних бактерій у середовищі з C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe (3,47 мМ), цистеїном (0,2 г/л) і натрій цитратом

| Штами бактерій                  | Fe <sup>2+</sup> , мМ |
|---------------------------------|-----------------------|
| <i>Desulfovibrio</i> sp. Yav-6  | 3,45±0,03             |
| <i>Desulfovibrio</i> sp. Yav-8  | 3,47±0,02             |
| <i>D. desulfuricans</i> IMB K-6 | 3,38±0,04             |

2,5 і 3,5 мМ Fe (III) цитрату, знижувався до 2,67; 2,38; 1,95 г/л, відповідно (рис. 2, А). Клітини, не інкубовані з C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe, за 10 діб утворювали до 2,43 мМ гідроген сульфід, інкубовані з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe клітини утворювали гідроген сульфід лише до 2,34; 1,62; 1,22 мМ, відповідно (рис. 2, Б). Інтенсивність відновлення бактеріями сульфат-йонів знижувалася зі зростанням концентрації C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe під час інкубації клітин. Якщо клітини, не інкубовані з Fe (III) цитратом, за 10 діб відновили до 94,23% наявних у середовищі сульфат-йонів, то інкубовані з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe клітини відновили наявних у середовищі сульфат-йонів лише до 89,05; 76,37; 63,11%, відповідно (рис. 2, В). Найбільше пригнічення нагромадження біомаси та сульфидогенної активності бактерій спостерігали за впливу 3,5 мМ Fe (III) цитрату. За цієї концентрації йони феруму (III) інгібували ріст бактерій усіх штамів у 1,6 разу, рівень утворення гідроген сульфід у 2,3 разу, рівень відновлення сульфат-йонів у 1,7 разу.

Клітини, не інкубовані з K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, за 10 діб нагромаджували біомасу до 3,08 г/л. Рівень нагромадження біомаси клітинами, інкубованими з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, знижу-

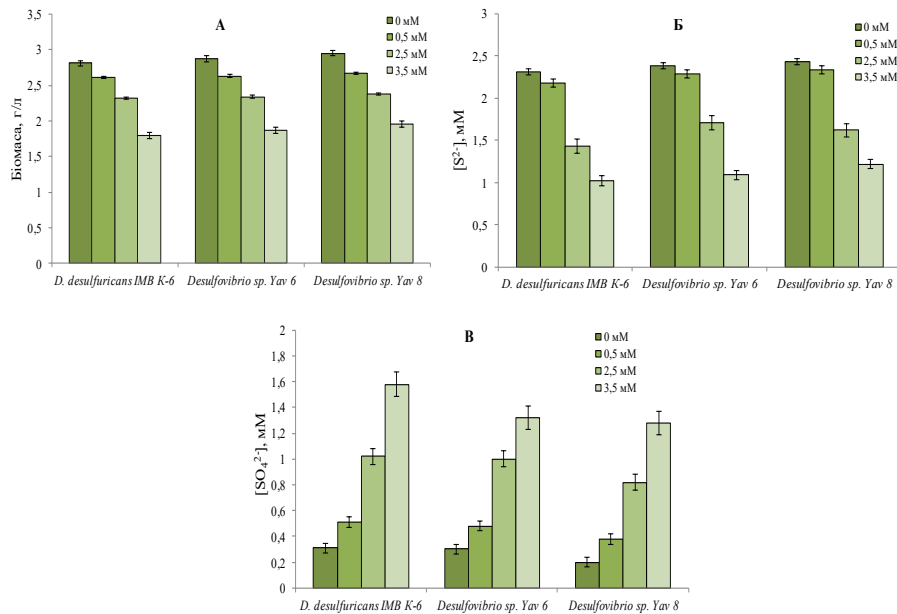


Рис. 2. Вплив  $C_6H_5O_7Fe$  на нагромадження біомаси (А), утворення гідроген сульфіду (Б) та відновлення сульфат-іонів (В) *D. desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 та *Desulfovibrio* sp. Yav-8 після 10 діб росту в середовищі з  $SO_4^{2-}$ .

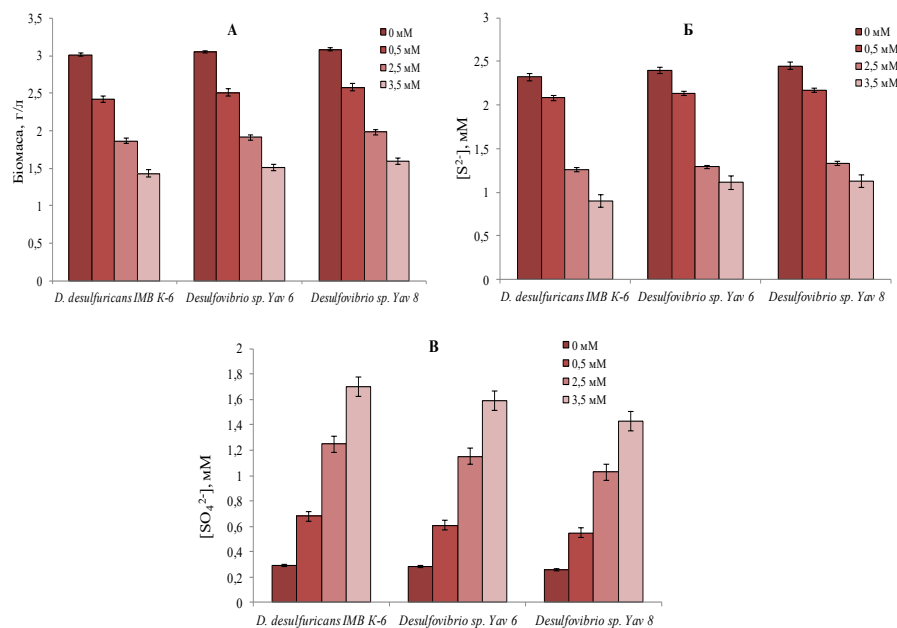


Рис. 3. Вплив  $K_2Cr_2O_7$  на нагромадження біомаси (А), утворення гідроген сульфіду (Б) та відновлення сульфат-іонів (В) *D. desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 та *Desulfovibrio* sp. Yav-8 після 10 діб росту у середовищі з  $SO_4^{2-}$ .

вався до 2,58; 1,98; 1,59 г/л, відповідно (рис. 3, А). Якщо клітини, не інкубовані з  $Cr^{6+}$ , за 10 діб утворювали до 2,45 мМ гідроген сульфіду, то інкубовані з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ  $Cr^{6+}$  утворю-

вали не більш як 2,17; 1,33; 1,13 мМ гідроген сульфід, відповідно (рис. 3, Б). Із зростанням концентрації  $K_2Cr_2O_7$  під час інкубації клітин інтенсивність відновлення бактеріями сульфат-йонів знижувалася. Клітини, не інкубовані з  $Cr^{6+}$ , за 10 діб відновили до 92,51% наявних у середовищі сульфат-йонів. Клітини, інкубовані з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ  $Cr^{6+}$ , відновили тільки до 84,14; 70,32; 58,79% наявних у середовищі сульфат-йонів, відповідно (рис. 3, В). Найбільше пригнічення росту та сульфідогенної активності бактерій виявлено за впливу  $K_2Cr_2O_7$  за концентрації 3,5 мМ у інкубаційній суміші. Йони хрому (VI) інгібували ріст бактерій у 2,1 разу, рівень утворення гідроген сульфід у 2,6 разу та рівень відновлення сульфат-йонів у 1,8 разу.

Біомаса клітин бактерій, не інкубованих з  $MnO_2$ , на 10 добу не перевищувала 3,08 г/л. Клітини, інкубовані з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ  $MnO_2$ , нагромаджували біомасу до 2,23; 1,53; 1,25 г/л, відповідно (рис. 4, А). Клітини, не інкубовані з  $MnO_2$ , за 10 діб утворювали до 2,45 мМ гідроген сульфід, інкубовані з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ  $MnO_2$ , утворювали тільки до 2,06; 1,29; 1,11 мМ гідроген сульфід, відповідно (рис. 4, Б). Якщо клітини, не інкубовані з  $Mn$  (IV) оксидом, за 10 діб відновили до 92,51% наявних у середовищі сульфат-йонів, то інкубовані з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ  $MnO_2$  відновили тільки 80,12; 64,27; 56,20% наявних у середовищі сульфат-йонів, відповідно (рис. 4, В). Значне зниження росту і сульфідогенної активності бактерій спостерігали вже за впливу 2,5 мМ  $MnO_2$  у інкубаційній суміші. Найбільше пригнічення рівня нагромадження біомаси і відновлення бактеріями сульфат-йонів спостерігали за впливу 3,5 мМ  $MnO_2$ . За цієї концентрації  $Mn$  (IV) оксид інгібував ріст бактерій у 2,6 разу, рівень утворення гідроген сульфід у 3,1 разу, рівень відновлення сульфат-йонів у 1,9 разу.

Порівнюючи вплив сполук перехідних металів на сульфідогенну активність бактерій, можна констатувати, що найбільш негативну дію на нагромадження біомаси й утворення гідроген сульфід бактеріями виявляє манган (IV) оксид. За впливу 2,5 мМ  $MnO_2$

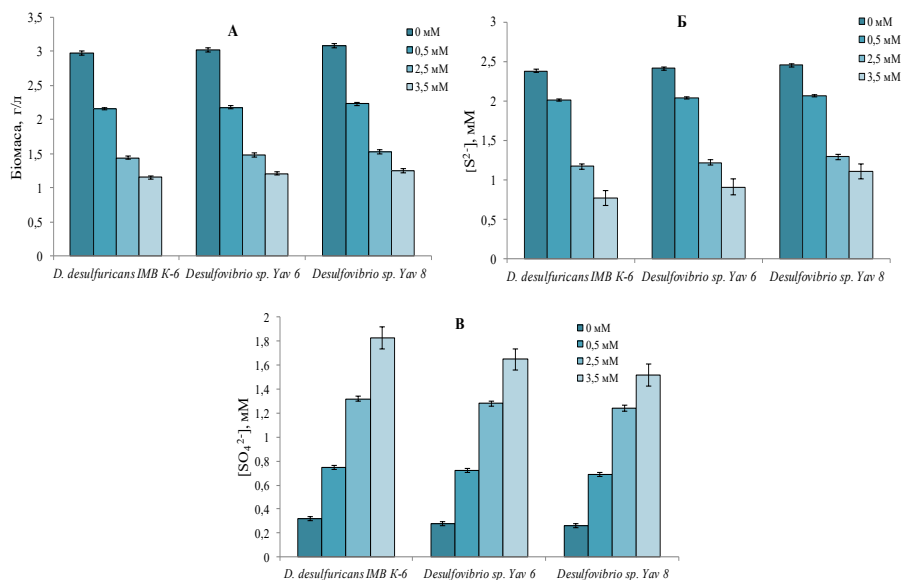


Рис. 4. Вплив  $MnO_2$  на нагромадження біомаси (А), утворення гідроген сульфід (Б) та відновлення сульфат-йонів (В) *D. desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 та *Desulfovibrio* sp. Yav-8 після 10 діб росту в середовищі з  $SO_4^{2-}$ .



значно знижуються ріст та інтенсивність відновлення бактеріями сульфат-йонів. Сполуки феруму (III) і хрому (VI) значно інгібують ріст і утворення гідроген сульфідів бактеріями за концентрації 3,5 мМ. Отже, за токсичним впливом на процеси росту і дисиміляційного відновлення сульфатів бактеріями досліджені сполуки металів можна розмістити у такій послідовності:  $\text{MnO}_2$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  та  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ .

Факультативно анаеробні бактерії здійснюють дисиміляційне відновлення нітратів з утворенням  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  та  $\text{N}_2$  (денітрифікація) або нітриту за участю НАД(Ф)Н чи відновленого менахінону може безпосередньо відновлюватися до  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  (амоніфікація нітрату) [7]. Описано нітратредукцію з утворенням нітриту і подальшим відновленням його до  $\text{NH}_4^+$  у сульфатвідновлювальних бактерій родів *Desulfovibrio* (зокрема, у *D. desulfuricans*) та *Desulfotomaculum* [12, 15, 17, 18, 20]. Сполуки перехідних важких металів:  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  та  $\text{MnO}_2$ , з якими впродовж години інкубували клітини *D. desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 і *Desulfovibrio* sp. Yav-8, за концентрацій 0,5; 2,5; 3,5 мМ значно пригнічували рівень нагромадження бактеріями біомаси, знижували інтенсивність відновлення нітрат-йонів і утворення йонів амонію під час росту в середовищі без  $\text{SO}_4^{2-}$  та амоній хлориду з цистеїном і  $\text{NO}_3^-$ . Подібно до попереднього дослідження (ріст у середовищі зі сульфат-йонами), зі зростанням концентрацій  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  та  $\text{MnO}_2$  під час інкубації клітин у середовищі з  $\text{NO}_3^-$  рівень нагромадження бактеріями біомаси та йонів амонію знижувався.

Клітини, не інкубовані з  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ , за 10 діб нагромаджували біомасу до 1,74 г/л. Клітини, інкубовані з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ Fe (III) цитрату нагромаджували біомасу лише до 1,32; 1,01; 0,74 г/л, відповідно (рис. 5, А). За відсутності  $\text{Fe}^{3+}$  в інкубаційній суміші у середовищі культивування упродовж 10 діб клітинами утворювалося не більш ніж 2,56 мМ  $\text{NH}_4^+$ , за інкубування з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ  $\text{Fe}^{3+}$  утворювалось до 2,45; 1,78; 0,85 мМ  $\text{NH}_4^+$ , відповідно (рис. 5, Б). Інтенсивність відновлення бактеріями нітрат-йонів знижувалася зі зростанням концентрації  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$  під час інкубації клітин. Якщо клітини, не інкубовані з

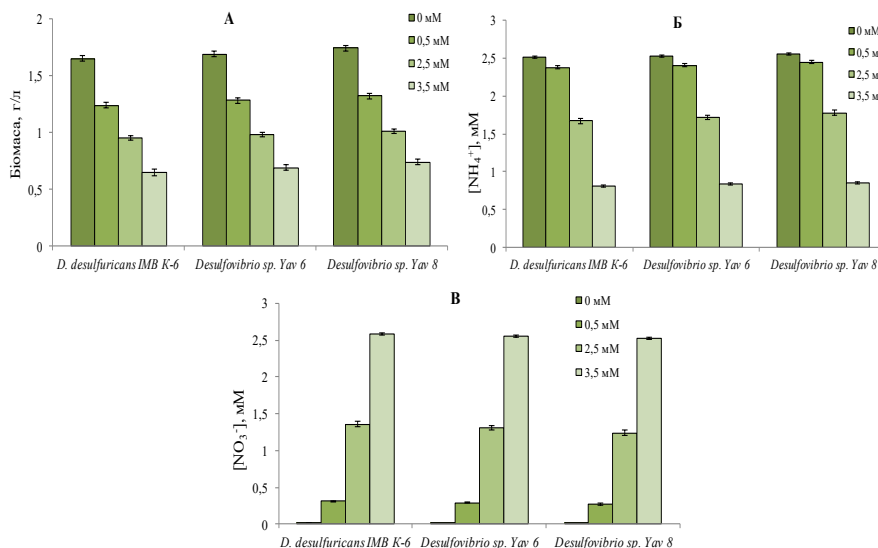


Рис. 5. Вплив  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$  на нагромадження біомаси (А), утворення  $\text{NH}_4^+$  (Б) та відновлення нітрат-йонів (В) *D. desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 і *Desulfovibrio* sp. Yav-8 після 10 діб росту в середовищі без  $\text{SO}_4^{2-}$  та  $\text{NH}_4\text{Cl}$  з цистеїном і  $\text{NO}_3^-$ .

$\text{Fe}^{3+}$ , за 10 діб відновили до 99,71% наявних у середовищі нітрат-йонів, то інкубовані з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ  $\text{Fe}^{3+}$  відновили тільки 92,22; 64,27; 27,09% наявних у середовищі нітрат-йонів, відповідно (рис. 5, В). Найбільше пригнічення нагромадження біомаси та нітратвідновлювальної активності бактерій спостерігали за впливу 3,5 мМ  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ . Йони феруму (III) інгібували нагромадження біомаси всіх штамів у 2,5 разу, утворення йонів амонію у 3,1 разу, відновлення нітрат-йонів у 3,9 разу.

Клітини, не інкубовані з  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , за 10 діб нагромаджували біомасу, яка не перевищувала 1,75 г/л. Рівень нагромадження біомаси клітинами, інкубованими з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , знижувався до 1,21; 0,91; 0,58 г/л, відповідно (рис. 6, А). Якщо клітини, не інкубовані з  $\text{Cr}^{6+}$ , за 10 діб утворювали до 2,54 мМ  $\text{NH}_4^+$ , то інкубовані з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ  $\text{Cr}^{6+}$  утворювали тільки до 2,31; 1,44; 0,71 мМ  $\text{NH}_4^+$ , відповідно (рис. 6, Б). Зі зростанням концентрації  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  під час інкубації клітин інтенсивність відновлення бактеріями нітрат-йонів знижувалася. Клітини, не інкубовані з калій біхроматом, за 10 діб відновили до 99,71% наявних у середовищі нітрат-йонів. Клітини, інкубовані з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ калій біхромату, відновили тільки до 85,88; 55,04; 23,05% наявних у середовищі нітрат-йонів, відповідно (рис. 6, В). Найбільше пригнічення нагромадження біомаси та нітратвідновлювальної активності бактерій виявлено за впливу  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  за концентрації 3,5 мМ у інкубаційній суміші. Йони хрому (VI) інгібували ріст бактерій у 3,2 разу, рівень утворення йонів амонію у 3,7 разу та рівень відновлення нітратів у 5,0 разу.

Якщо клітини, не інкубовані з  $\text{MnO}_2$ , за 10 діб нагромаджували біомасу до 1,84 г/л, то інкубовані з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ  $\text{MnO}_2$  нагромаджували біомасу до 1,12; 0,81; 0,45 г/л, відповідно (рис. 7, А). Клітини, не інкубовані з  $\text{Mn}$  (IV) оксидом, за 10 діб утворювали до 2,55 мМ  $\text{NH}_4^+$ , інкубовані з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ  $\text{Mn}$  (IV) оксиду утворювали тільки до 2,25; 1,39; 0,63 мМ  $\text{NH}_4^+$ , відповідно (рис. 7, Б). Інтенсивність відновлення бактеріями нітрат-йонів знижувалася зі зростанням концентрації  $\text{MnO}_2$  під час інкубації клітин. Якщо клітини, не інкубовані з  $\text{Mn}$  (IV) оксидом, за 10 діб відновили до 99,71% наявних у середовищі нітрат-

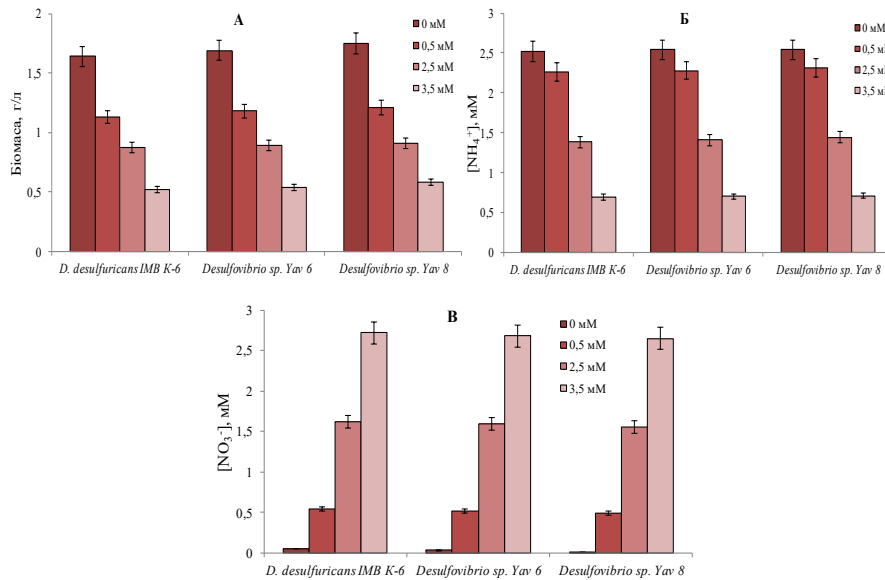


Рис. 6. Вплив  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  на нагромадження біомаси (А), утворення  $\text{NH}_4^+$  (Б) та відновлення нітрат-йонів (В) бактеріями *D. desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 і *Desulfovibrio* sp. Yav-8 після 10 діб росту в середовищі без  $\text{SO}_4^{2-}$  та  $\text{NH}_4\text{Cl}$  з цистеїном і  $\text{NO}_3^-$ .

йонів, то інкубовані з 0,5, 2,5 і 3,5 мМ Mn (IV) оксиду відновили тільки до 82,71; 51,59; 23,05 % наявних у середовищі нітрат-йонів, відповідно (рис. 7, В). Статистично достовірне пригнічення нагромадження біомаси та нітратвідновлювальної активності бактерій спостерігали за впливу 2,5 мМ MnO<sub>2</sub>, але найбільше – за впливу 3,5 мМ MnO<sub>2</sub>, у культуральній рідині виявлено до 2,79 мМ нітрат-йонів. Mn (IV) оксид за концентрації 3,5 мМ у інкубаційній суміші пригнічував нагромадження біомаси бактерій у 4,5 разу, рівень утворення NH<sub>4</sub><sup>+</sup> у 4,4 разу, рівень відновлення нітрат-йонів у 5,1 разу.

Таким чином, встановлено, що C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> та MnO<sub>2</sub> виявляють інгібувальну дію на нітратредукцію, яку здійснюють досліджені штами бактерії роду *Desulfovibrio*. Найбільш негативний вплив на нагромадження біомаси й утворення NH<sub>4</sub><sup>+</sup> бактеріями виявляє Mn (IV) оксид. За впливу 2,5 мМ MnO<sub>2</sub> значно знижується нагромадження біомаси й інтенсивність відновлення бактеріями нітрат-йонів. Сполуки феруму (III) і хрому (VI) значно інгібують ріст і утворення йонів амонію бактеріями за концентрації 3,5 мМ. Отже, за токсичним впливом на процеси нагромадження біомаси та дисиміляційного відновлення нітрат-йонів бактеріями досліджені сполуки металів можна розмістити у такій послідовності: MnO<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> та C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe. Оскільки найбільше пригнічення нагромадження біомаси та нітратвідновлювальної активності бактерій виявлено за впливу 3,5 мМ сполук металів, цю концентрацію було обрано для вивчення їх впливу на відновлення бактеріями нітрит-йонів.

Встановлено, що за впливу 3,5 мМ C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> та MnO<sub>2</sub> значно пригнічувалося нагромадження біомаси *D. desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 і *Desulfovibrio* sp. Yav-8, знижувалася інтенсивність відновлення нітрит-йонів і утворення NH<sub>4</sub><sup>+</sup> після 10 діб росту бактерій у середовищі без SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> й амоній хлориду з цистеїном і NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (рис. 8). Найбільше інгібував ріст бактерій MnO<sub>2</sub> – у 6,4 разу, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> і C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe – у 3,4 та 2,7 разу відповідно. Не інкубовані зі сполуками металів клітини бактерій за 10 діб практично повністю використали наявні у середовищі нітрит-йони (3,47 мМ) з нагромадженням до

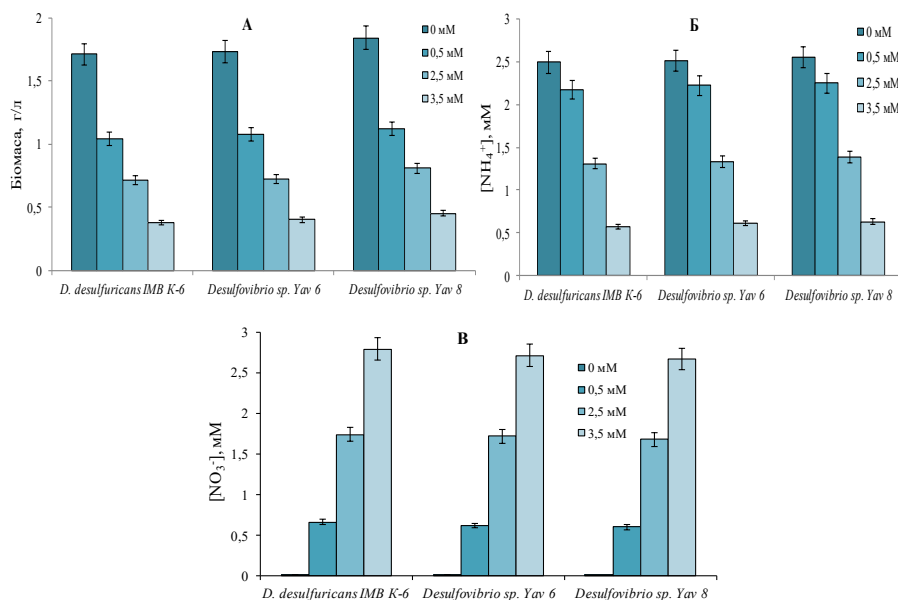


Рис. 7. Вплив MnO<sub>2</sub> на нагромадження біомаси (А), утворення NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Б) та відновлення нітрат-йонів (В) бактеріями *D. desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 і *Desulfovibrio* sp. Yav-8 після 10 діб росту в середовищі без SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> та NH<sub>4</sub>Cl з цистеїном і NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

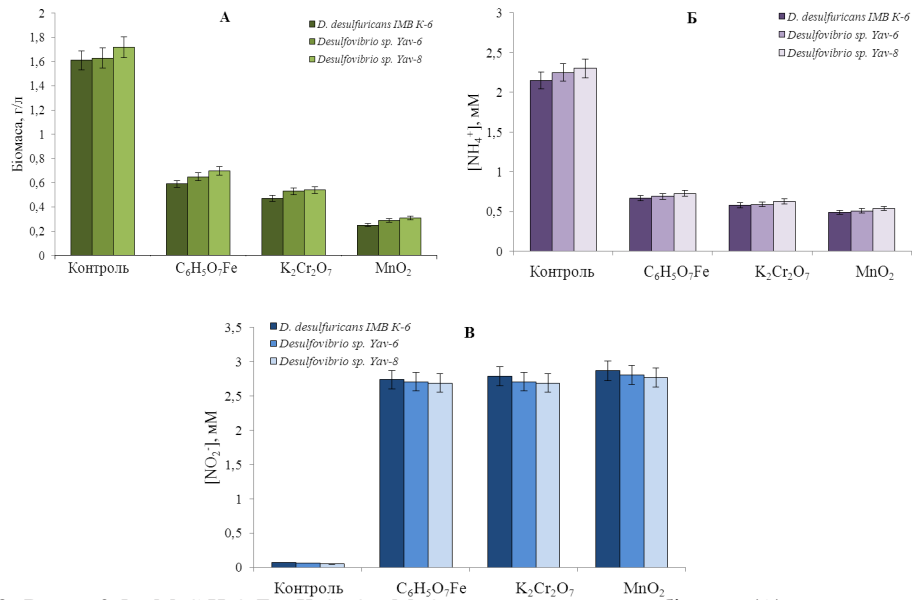


Рис. 8. Вплив 3,5 мМ C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, MnO<sub>2</sub> на нагромадження біомаси (А), утворення йонів амонію (Б) та відновлення нітрит-йонів (В) бактеріями *D. desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 і *Desulfovibrio* sp. Yav-8 після 10 діб росту в середовищі без SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> та NH<sub>4</sub>Cl з цистеїном і NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

2,30 мМ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Клітини, інкубовані з Mn (IV) оксидом утворювали найменше NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: лише до 0,54 мМ; з калій біхроматом і Fe (III) цитратом – 0,63 і 0,73 мМ відповідно. Рівень утворення NH<sub>4</sub><sup>+</sup> бактеріями, вирощеними у середовищі з нітрит-йонами (за впливу сполук металів чи без), виявився нижчим, ніж у середовищі з нітрат-йонами, можливо, у зв'язку з більшою токсичністю нітрит-йонів для клітин. За впливу сполук металів інтенсивність відновлення бактеріями нітрит-йонів знижувалася, тому в культуральній рідині виявлено до 2,87 мМ нітрит-йонів. Якщо клітини, не інкубовані зі сполуками металів, за 10 діб відновили до 98,55% наявних у середовищі нітрит-йонів, то інкубовані з MnO<sub>2</sub> відновили тільки до 20,17%; з K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> і C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe – 22,48 і 22,48% відповідно наявних у середовищі нітрит-йонів. Отже, за токсичним впливом на процеси нагромадження біомаси та дисиміляційного відновлення нітрит-йонів сульфатвідновлювальними бактеріями досліджені сполуки металів можна розмістити у такій послідовності: MnO<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> та C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe. Сполуки Mn (IV), Cr (VI) і Fe (III) за концентрації 3,5 мМ у інкубаційній суміші інгібували ріст бактерій у 6,4; 3,4 та 2,7 разу, рівень утворення NH<sub>4</sub><sup>+</sup> у 4,4; 3,7 і 3,2 разу, інтенсивність відновлення нітрит-йонів у 5,7; 5,0 і 4,7 разу відповідно.

Штам *Desulfovibrio* sp. Yav-8, який виявився здатним утворювати найбільші кількості гідроген сульфідів та NH<sub>4</sub><sup>+</sup> порівняно зі штатами *D. desulfuricans* IMB K-6 і *Desulfovibrio* sp. Yav-6 у процесі сульфат- і нітрат- чи нітритредукції відповідно, був найбільш стійким до пригнічувального впливу сполук перехідних важких металів.

Процеси нітрат- і нітритредукції, здійснювані бактеріями роду *Desulfovibrio*, виявилися більш чутливими до негативного впливу C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> та MnO<sub>2</sub>, порівняно з процесом відновлення сульфат-йонів. Якщо інтенсивність відновлення сульфат-йонів за впливу 3,5 мМ сполук металів знижувалася максимально в 1,9 разу, то рівень відновлення нітрат-йонів – у 5,1 разу, нітрит-йонів – у 5,7 разу. Можливо, нітратредуктаза і нітритредук-

таза у бактерій роду *Desulfovibrio* є більш чутливими до негативного впливу сполук металів, ніж цитоплазматичні ферменти, задіяні у сульфатному диханні цих бактерій: АТФ-сульфурилаза, пірофосфатаза, АФС-редуктаза, сульфїтредуктаза [7]. Оскільки токсична дія металів на бактерійну клітину полягає у їх зв'язуванні (і тому руйнуванні) з поверхневими структурами клітинної стінки, зміні електрофізіологічних властивостей плазматичної мембрани, блокуванні систем транспорту, заміщенні необхідних йонів з активних центрів ферментів, зв'язуванні з функціональними групами клітинних метаболітів [6], то негативний вплив йонів металів на активність молібденвмісної мембранозв'язаної респіраторної і/або дисиміляційної нітратредуктази [18], а також периплазматичної нітрїтредуктази, що містить як простетичну групу сирогем [7, 17, 19], у бактерій роду *Desulfovibrio* може бути зумовлений пошкодженням структури цитоплазматичної мембрани чи модифікацією активної конформації та денатурацією молекули білка в результаті заміщення необхідного йона металу активного центру ферменту ферумом, хромом чи манганом.

Таким чином, встановлено, що досліджені штами сульфатвідновлювальних бактерій роду *Desulfovibrio*, виділені з озера Яворівське, з різною інтенсивністю відновлюють у процесі анаеробного дихання  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$  та  $\text{Mn}^{4+}$  за концентрації 3,5 мМ їх сполук у середовищі. За концентрацій у інкубаційній суміші 2,5–3,5 мМ  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  та  $\text{MnO}_2$  сповільнюють метаболізм бактерій, тому спостерігається пригнічення нагромадження біомаси та здійснюваних цими бактеріями дисиміляційних сульфат-, нітрат- і нітрїтредукції. Отримані нами результати дають підстави стверджувати, що досліджені штами бактерій роду *Desulfovibrio* є стійкими до високих концентрацій йонів металів (до 2,5 мМ), можливо, завдяки природному добору за здатністю виживати за стресових чинників. Тому за резистентністю до сполук металів і здатністю метаболізувати широкий спектр поліютантів вони перспективні для використання у ремедіаційних технологіях, спрямованих на очищення довкілля від сполук сульфуру, нітрогену та важких металів. Унаслідок відновлення  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$  та  $\text{Mn}^{4+}$  у процесі анаеробного дихання бактерії переводять їх у менш токсичні для живих організмів форми [6, 14, 16, 21]. Окрім цього, взаємодія утвореного бактеріями (у процесі дисиміляційної сульфатредукції) гїдроген сульфїду з йонами двовалентних металів призводить до утворення їх нерозчинних сульфїдів і таким чином вилучення з природного кругообігу елементів [3, 10, 22]. Ефективність біологічних методів очищення середовищ від забруднювачів залежить не лише від стійкості до йонів металів відібраних штамів бактерій, але і від їх метаболічної активності. Тому вивчення фізіолого-біохімічних властивостей штаму *Desulfovibrio* sp. Yav-8, який утворює найбільші кількості гїдроген сульфїду та йонів амонїю у процесі сульфат- чи нітрат- і нітрїтредукції, порівняно з іншими штамми, уявляється найбільш доцільним для майбутніх досліджень.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гудзь С. П., Гнатуш С. О., Яворська Г. В. та ін. Практикум з мікробіології: підручник. Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2014. 436 с.
2. Деркач М. П., Гумецький Р. Я., Чабан М. С. Курс варіаційної статистики. К.: Вища школа, 1977. 208 с.
3. Мороз О. М., Грицишин Г. Р., Звір Г. І., Кулачковський О. Р. Дисиміляційна сульфатредукція у бактерій роду *Desulfovibrio* озера "Яворівське" за різних умов культивування // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. біол. 2011. Вип. 30. С. 152–157.
4. Мороз О. М. Закономірності утворення сірководню сульфатвідновлювальними бактеріями водойми кар'єру Яворівського сіркового родовища // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. біол. 2010. Вип. 27. С. 56–63.

5. Мороз О. М., Русин І. Б. Використання сполук нітрогену бактеріями циклу сульфору озера Яворівське // Мікробіологія і біотехнологія. 2012. № 2 (18). С. 96–108.
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 / ред. Й. Ленгелер, Г. Древис, Г. Шлегель; пер. с англ. 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. № 1. С. 10–13.
10. Hao O. J. Metal effects on sulfur cycle bacteria and metal removal by sulfate-reducing bacteria / Eds. P. N. L. Lens and L. Hulshoff. Environmental technologies to treat sulfur pollution. Principles and engineering. London: IWA Publishing, 2000. P. 393–414.
11. Harris D. C. Quantitative Chemical Analysis. 6-th ed. 2003. 928 p.
12. Keith S. M., Herbert R. A. Dissimilatory nitrate reduction by a strain of *Desulfovibrio desulfuricans*. FEMS Microbiol. Lett. 1983. Vol. 18. N 1–2. P. 55–59.
13. Lloyd J. R. Microbial reduction of metals and radionuclides // FEMS Microbiol. Rev. 2003. Vol. 27. N 2–3. P. 411–425.
14. Lovley D. Dissimilatory Fe (III)- and Mn (IV)-reducing prokaryotes / M. Dworkin ed. The Prokaryotes. New York: Springer-Verlag, LLC, 2006. Vol. 2. P. 635–658.
15. McCready R. G. L., Gould W. D., Cook F. D. Respiratory nitrate reduction by *Desulfovibrio* sp. // Arch. Microbiol. 1983. Vol. 135. N 3. P. 182–185.
16. Michel C., Brugna M., Aubert C. et al. Enzymatic reduction of chromate: comparative studies using sulfate-reducing bacteria // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. Vol. 55. P. 95–100.
17. Mitchell G. J., Jones J. G., Cole J. A. Distribution and regulation of nitrate and nitrite reduction by *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* species. Arch. Microbiol. 1986. Vol. 144. N 1. P. 35–40.
18. Morozkina E. V., Zvyagil'skaya R. A. Nitrate reductases: structure, functions, and effect of stress factors // Biochemistry (Moscow). 2007. Vol. 72. N 10. P. 1151–1161.
19. Postgate J. R. The sulfate-reducing bacteria. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: Cambridge Univ. press, 1984. 199 p.
20. Seitz H. J., Cypionka H. Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans* with hydrogen coupled to ammonification of nitrate or nitrite // Arch. Microbiol. 1986. Vol. 146. N 1. P. 63–67.
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. White C., Sayer J. A., Gadd G. M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination // FEMS Microbiol. Ecol. 2000. Vol. 33. P. 197–208.
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 30.09.15

доопрацьована 02.12.15

прийнята до друку 04.12.15

**SULFATE, NITRATE AND NITRITE IONS REDUCTION BY BACTERIA OF *DESULFOVIBRIO* GENUS UPON THE INFLUENCE OF FERRUM (III), CHROME (VI) AND MANGAN (IV) COMPOUNDS****O. Moroz, S. Hnatush, Ch. Bohoslavets, G. Yavorska, B. Borsukevych**

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

It was established that sulfur reducing bacteria *Desulfovibrio desulfuricans* IMV K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 and *Desulfovibrio* sp. Yav-8, isolated from the Yavorivske lake, with different intensity reduced during the process of anaerobic respiration the  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$  and  $\text{Mn}^{4+}$  at concentration of 3.47 mM their compounds in Kravtsov-Sorokin medium. Addition of  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{MnO}_2$  at concentrations of 0.5; 2.5; 3.5 mM to incubation mixture causing inhibition of biomass accumulation and carried out by bacteria dissimilation sulfate, nitrate and nitrite reduction. For toxic influence on metabolic activity of bacteria investigated compounds of metals can be placed in a next sequence:  $\text{MnO}_2$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  and  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ . Mn (IV) oxide, potassium dichromate and Fe (III) citrate at concentration of 3.5 mM in incubation mixture inhibited level of sulfate ions reduction in medium with  $\text{SO}_4^{2-}$  in 1.9; 1.8 and 1.7 folds, level of nitrate ions reduction in medium with  $\text{NO}_3^-$  in 5.1; 5.0 and 3.9 folds, level of nitrite ions reduction in medium with  $\text{NO}_2^-$  in 5.7; 5.0 and 4.7 folds accordingly. Carried out by bacteria of *Desulfovibrio* genus dissimilation nitrate and nitrite reduction appeared more sensible to the negative action of  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  and  $\text{MnO}_2$  comparatively with the process of dissimilation sulfate reduction.

*Keywords:* sulfur reducing bacteria, heavy metals, hydrogen sulfide, ammonium ions, sulfate, nitrate and nitrite ions.

**ВОССТАНОВЛЕНИЕ СУЛЬФАТ-, НИТРАТ- И НИТРИТ-ИОНОВ БАКТЕРИЯМИ РОДА *DESULFOVIBRIO* ПОД ВЛИЯНИЕМ СОЕДИНЕНИЙ ФЕРРУМА (III), ХРОМА (VI) И МАНГАНА (IV)****О. Мороз, С. Гнатуш, Х. Богославец, Г. Яворская, Б. Борсукевич**

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

Установлено, что сульфатвосстанавливающие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* ИМВ К-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 и *Desulfovibrio* sp. Yav-8, выделенные из озера Яворовское, с разной интенсивностью восстанавливают в процессе анаэробного дыхания  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$  и  $\text{Mn}^{4+}$  при концентрации 3,47 мМ их соединений в среде Кравцова-Сорокина. Внесение  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{MnO}_2$  при концентрациях 0,5; 2,5; 3,5 мМ к инкубационной смеси приводит к угнетению накопления биомассы и осуществляемых бактериями диссимиляционных сульфат-, нитрат- и нитритредукции. По токсическому влиянию на метаболическую активность бактерий исследованные соединения металлов можно разместить в следующем порядке:  $\text{MnO}_2$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  и  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ . Mn (IV) оксид, калий бихромат и Fe (III) цитрат при концентрации 3,5 мМ в инкубационной смеси угнетали уровень восстановления сульфат-ионов в среде с

$\text{SO}_4^{2-}$  в 1,9; 1,8 и 1,7 раза, уровень восстановления нитрат-ионов в среде с  $\text{NO}_3^-$  в 5,1; 5,0 и 3,9 раза, уровень восстановления нитрит-ионов в среде с  $\text{NO}_2^-$  в 5,7; 5,0 и 4,7 раза соответственно. Диссимиляционные нитрат- и нитритредукция, осуществляемые бактериями рода *Desulfovibrio*, оказались более чувствительными к отрицательному влиянию  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  и  $\text{MnO}_2$  по сравнению с процессом диссимиляционной сульфатредукции.

*Ключевые слова:* сульфатвосстанавливающие бактерии, тяжёлые металлы, гидроден сульфид, ионы аммония, сульфат-ионы, нитрат-ионы, нитрит-ионы.