

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ АГРОЕКОЛОГІЇ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ**

ВЕРХОЛЯК НАТАЛІЯ СТЕПАНІВНА



УДК 574.635+579.26

**ЕКОЛОГІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ
БАКТЕРІЙ В ОЧИЩЕННІ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА
ВІД ПОЛЮТАНТІВ**

03.00.16 – «Екологія»

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано на кафедрі мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка.

Науковий керівник: кандидат біологічних наук, доцент
Перетятко Тарас Богданович,
Львівський національний університет
імені Івана Франка,
доцент кафедри мікробіології.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Рильський Олександр Федорович,
Запорізький національний університет,
завідувач кафедри загальної та прикладної екології
і зоології;

доктор сільськогосподарських наук, професор
Шерстобоева Олена Володимирівна
Інститут агроекології і
природокористування НААН,
головний науковий співробітник
лабораторії екології мікроорганізмів
відділу агроекології і біобезпеки.

Захист дисертації відбудеться «15» вересня 2021 р. об 11:00 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.371.01 Інституту агроекології і природокористування НААН за адресою: 03143, м. Київ, вул. Метрологічна, 12.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту агроекології і природокористування НААН за адресою: 03143, м. Київ, вул. Метрологічна, 12.

Автореферат розіслано «13» серпня 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат сільськогосподарських наук



С. О. Мазур

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, щороку до 13 млн захворювань виявляються наслідком незадовільного екологічного стану довкілля (Bernstein et al., 2011; Каленська, 2012; Приходько, Падун, 2019). Ксенобіотики ароматичної природи належать до групи найнебезпечніших забруднювачів довкілля (Mufflera et al., 2011). Унаслідок антропогенного впливу ароматичні сполуки постійно надходять і накопичуються у навколишньому середовищі, створюючи загрозу для існування живих організмів (Павленко та ін., 2007). Значною екологічною небезпекою є забруднення поверхневих вод органічними та неорганічними речовинами, що містяться у стоках промислових підприємств. Стічні води, потрапляючи у водойми, інтенсифікують процеси гниття, цвітіння води й негативно впливають на фауну та флору (Мальований, 2008). Ароматичні сполуки, важкі метали, сульфуровмісні сполуки чинять мутагенний, канцерогенний вплив, блокують активність ферментних систем у біологічних об'єктах, генерують вільні радикали, перекисне окиснення ліпідів біологічних мембран і стимулюють передчасне старіння організмів (Turkyilmaz et al., 2018, 2020; Глібовицька, Плаксієв, 2020).

Основну роль у мінералізації органічної речовини у природі відіграють бактерії (Chung, King, 2001; Daane et al., 2001; Watanabe, 2001; Widada et al., 2002; Leys et al., 2004). Здатність швидко адаптуватися до змінних умов навколишнього середовища, широкий набір і лабільність ферментних систем дають змогу бактеріям використовувати різні органічні сполуки як джерело енергії та карбону, зокрема, токсичні, канцерогенні й мутагенні речовини, до яких належать і ароматичні (Павленко, Сорока, Гвоздяк, Кухар, 2007). Для знешкодження токсичних речовин, окрім традиційних фізичних і хімічних методів, дедалі частіше використовують біологічні методи за участю мікроорганізмів, що є економічно вигіднішими й екологічно безпечнішими (Копча, Садляк, Бокшан, 2010).

Перспективними мікроорганізмами для очищення стічних вод від органічних і неорганічних речовин є сульфатвідновлювальні бактерії, які окиснюють молекулярний водень та органічні сполуки, використовуючи сульфат-йон як акцептор електронів (Баран та ін., 2003; Галушка, Перетятко, Гудзь, 2007; Гудзь та ін., 2011). Культури мікроорганізмів, адаптовані до конкретних абіотичних умов, використовують для очищення стічних вод та інтенсифікації процесів ремедіації екосистем у разі хронічного забруднення їх (Каретникова, Жиркова, 2005; Салманов, Велиев, Бабашлы, Бекташи, 2010).

Одним із пріоритетних напрямів екології є ремедіація забруднених екосистем з використанням екологічно безпечних біологічних методів (Рильський, Шерстобоева, Гвоздяк, 2010; Cristaldi et al., 2017; Shevchuk, Romanyuk, 2017; Ashraf et al., 2019; Glibovytska, Karavanovych, Kachala, 2019; Ruf et al., 2019; Глібовицька, Плаксієв, 2020). Дослідження процесів очищення водного середовища за участю сульфатвідновлювальних бактерій – це актуальне завдання сьогодення, оскільки такі дослідження дають змогу розробити способи детоксикації ароматичних сполук, йонів важких

металів і оксоаніонів хлору у водному середовищі, що має важливе теоретичне та практичне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана відповідно до тематичних планів науково-дослідних робіт Львівського національного університету імені Івана Франка: Бм-95П «Роль бактерій циклу сірки у регулюванні рівня сірководню та важких металів у водних середовищах» (ДР № 0112U001260, 2012–2013 рр.), Бм-25Ф «Функціонування мікробіоценозів техногенно змінених територій та їхня участь у трансформації сполук важких металів і сульфуру» (ДР № 0116U001534, 2016–2018 рр.).

Мета і завдання дослідження. *Метою* роботи було встановити екологічне значення сульфатвідновлювальних бактерій у очищенні водного середовища від ароматичних сполук, йонів важких металів, оксоаніонів хлору та довести можливість їхнього використання у розробленні способів біоремедіації.

Для досягнення мети було поставлено такі *завдання*:

- виділити сульфатвідновлювальні бактерії, здатні до очищення водного середовища, зі системи побутових і промислових стічних вод м. Львова;

- визначити вплив абіотичних чинників (кисню, температури, рН середовища, органічних і неорганічних речовин) на ріст виділеного штаму бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1;

- з'ясувати здатність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 використовувати ароматичні сполуки (пірогалол, гідрохінон, ксилен, толуен, *n*-амінобензойну кислоту) як єдине джерело карбону й енергії за різних умов культивування;

- дослідити вплив поллютантів (органічних кислот, ароматичних сполук, амінокислот і йонів важких металів, водень сульфід, сульфат-і перхлорат-йонів) на нагромадження біомаси та сульфідогенну активність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11;

- встановити здатність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 вилучати йони важких металів із водного середовища;

- порівняти ефективність очищення водного середовища суспензійними й іммобілізованими клітинами бактерій *D. desulfuricans* Ya-11 та *Desulfotomaculum* sp. AR1.

Об'єкт дослідження: біологічне очищення водного середовища від ароматичних сполук, оксоаніонів хлору та йонів важких металів.

Предмет дослідження: вплив абіотичних чинників на ріст і сульфідогенну активність штамів сульфатвідновлювальних бактерій та очищення водного середовища від ароматичних сполук, оксоаніонів хлору і йонів важких металів.

Методи досліджень: екологічні (аналіз впливу абіотичних чинників на ріст бактерій, ретроспективний і порівняльний для виявлення причинно-наслідкових зв'язків щодо впливу речовин органічної та неорганічної природи на ріст і сульфідогенну активність бактерій), мікробіологічні (виділення чистих культур та ідентифікація бактерій), фізико-хімічні

(одержання клітинних екстрактів, визначення концентрації білка, сульфат-йонів, гідроген сульфід, йонів металів, ацетат-йонів, перхлорат-йонів), хроматографічні (дослідження вмісту органічних кислот, ароматичних сполук), мікроскопічні (дослідження морфології клітин бактерій), статистичні (обчислення статичних параметрів одержаних даних, проведення одно- та двофакторного аналізу даних, тесту Тьюкі, встановлення рівня достовірності).

Наукова новизна одержаних результатів. Комплексними дослідженнями встановлено екологічне значення сульфатвідновлювальних бактерій у детоксикації ароматичних сполук, йонів важких металів, оксоаніонів хлору у водному середовищі та можливість їхнього використання у розробленні способів біоремедіації.

Вперше:

- виділено спороутворювальні сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfotomaculum* sp. AR1 зі системи очищення стічних вод м. Львова, які здатні очищувати водне середовище від органічних і неорганічних поллютантів, використовуючи ароматичні сполуки як єдине джерело карбону, та сульфуровмісні й хлоровмісні неорганічні сполуки – як акцептор електронів;

- встановлено сульфідогенну активність і здатність нових штамів бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 рости у середовищах з ароматичними сполуками як єдиним джерелом карбону, знижуючи їхній вміст у забрудненому середовищі;

- доведено, що бактерії *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 активніше накопичують біомасу за наявності у середовищі пірогалолу, толуену та ксилену;

- з'ясовано, що ароматичні сполуки, фумарат, перхлорат-йони та йони важких металів негативно впливають на ріст і сульфідогенну активність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1;

- доведено здатність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 за наявності ароматичних сполук у середовищі осаджувати йони важких металів (Cu^{2+} , Cd^{2+}) гідроген сульфідом, продукованим у процесі сульфатредукції, у вигляді нерозчинних сульфідів металів, що дає можливість одночасно нівелювати токсичний вплив йонів важких металів і гідроген сульфід.

Набуло подальшого розвитку питання щодо переваг використання іммобілізованих організмів у біотехнологічних процесах. Унаслідок порівняння ефективності вилучення перхлорат-йонів із розчину іммобілізованими та суспензійними клітинами бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 і *D. desulfuricans* Ya-11 встановлено, що іммобілізовані клітини значно активніше очищують водне середовище, ніж суспензійні.

Поглиблено та поширено уявлення про механізми біологічного очищення водного середовища від поллютантів за участю мікроорганізмів.

Практичне значення одержаних результатів. Результати дисертаційної роботи можна застосувати у розробленні біотехнологій очищення стічних вод від органічних (толуену, ксилену, фумарату,

пірогалолу, *n*-амінобензойної кислоти, валіну, лейцину та ізолейцину) й неорганічних (сульфат- і перхлорат-йонів, елементної сірки) поллютантів за анаеробних умов за участю бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11.

Результати роботи щодо дослідження впливу різних абіотичних чинників на відновлення сульфат-йонів дають змогу регулювати ефективність використання бактеріями оксоаніонів сульфуру, зменшуючи їхній вміст у забрудненому водному середовищі, та показують можливість регулювати кількість токсичного гідроген сульфід.

Здатність сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 рости у середовищі з ароматичними сполуками, знижуючи їхній вміст у середовищі, та йонами важких металів (Cu^{2+} чи Cd^{2+}) доводить їхній високий потенціал у розробленні способів очищення водного середовища від поллютантів.

Результати дисертаційної роботи доводять біотехнологічну перспективність використання іммобілізованих клітин бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 для очищення водного середовища від перхлорат-йонів.

Результати роботи використовують у викладанні лекційних курсів «Мікробіологія», «Екологія мікроорганізмів», «Біогеохімічна діяльність мікроорганізмів» для студентів біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем проаналізовано значний обсяг літератури за темою дисертаційної роботи; проведено експериментальні дослідження; опрацьовано, узагальнено й систематизовано отримані результати експериментів; зі системи очищення стічних вод м. Львова виділено бактерії та ідентифіковано їх до роду; досліджено морфологічні та фізіологічні властивості виділеного штаму бактерій; досліджено вплив абіотичних чинників на ріст і сульфідогенну активність різних штамів бактерій; встановлено здатність бактерій використовувати ароматичні сполуки як єдине джерело карбону; встановлено здатність бактерій осаджувати йони важких металів продуктованим гідроген сульфідом; проведено порівняння ефективності використання перхлорат-йонів суспензійними й іммобілізованими клітинами бактерій, показано перспективність використання іммобілізованих клітин з метою очищення середовища від оксоаніонів хлору.

Разом із науковим керівником доц. Т. Б. Перетятком проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, сформульовано основні положення дисертаційної роботи і підготовано до друку наукові публікації. Електронно-мікроскопічні дослідження здійснено спільно із провідним фахівцем Міжфакультетської лабораторії інструментальних методів дослідження Львівського національного університету імені Івана Франка, к.б.н. О. Р. Кулачковським й асистентом кафедри геології та корисних копалин і геофізики ЛНУ імені Івана Франка Ю. Р. Дацюком. Хроматографічні дослідження здійснено спільно із завідувачем Міжфакультетської лабораторії

інструментальних методів дослідження ЛНУ імені Івана Франка, к.б.н., доц. А. А. Галушкою.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були представлені й апробовані на VIII-XVI Міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2012–2020), XIII з'їзді Товариства мікробіологів України (Ялта, 2013), Міжнародній науковій конференції «Досягнення та перспективи розвитку мікробіології» (Львів, 2016), XV з'їзді Товариства мікробіологів України (Одеса, 2017), VII Міжнародній Вайглівській конференції (Львів, 2017), Міжнародній конференції «Досягнення мікробіології та біотехнології» (Львів, 2018), XIII Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2018), 6-му Міжнародному конгресі «Сталий розвиток: захист навколишнього середовища. Енергоощадність. Збалансоване природокористування» (Львів, 2020), Міжнародній науковій конференції «Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку та інших природоохоронних територій» (Львів, 2020), 6-му Міжнародному молодіжному конгресі «Сталий розвиток: захист навколишнього середовища. Енергоощадність. Збалансоване природокористування» (Львів, 2021), XVII Всеукраїнській науковій онлайн конференції здобувачів вищої освіти і молодих учених з міжнародною участю «Сучасні проблеми екології» (Житомир, 2021), наукових конференціях професорсько-викладацького складу і наукових співробітників Львівського національного університету імені Івана Франка (Львів, 2018, 2019), наукових семінарах кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка.

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 22 наукові праці, зокрема, 7 статей у виданнях, що входять до переліку періодичних фахових видань України, 15 тез доповідей на конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 176 сторінках друкованого тексту і складається із вступу, чотирьох розділів та висновків. Список використаних джерел містить 208 джерел, у т. ч. 117 латиницею. Роботу ілюстровано 16 таблицями та 49 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

РОЛЬ МІКРООРГАНІЗМІВ У ОЧИЩЕННІ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

У розділі опрацьовано літературні дані щодо впливу органічних і неорганічних сполук на мікроорганізми. Зокрема, проаналізовано шляхи деструкції ароматичних сполук за аеробних і анаеробних умов, показано здатність мікроорганізмів використовувати ароматичні й оксигеновмісні сполуки хлору у власному метаболізмі. Всебічно розглянуто питання екологічного значення сульфатвідновлювальних бактерій штучних і природних водойм. Проведений аналіз літературних даних довів актуальність обраної теми дисертаційної роботи.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі застосовано штам сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1, виділений зі системи очищення побутових і промислових стічних вод м. Львова (Верхоляк, Перетятко, 2018) та штам сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11, виділений із оз. Яворівське (Перетятко, Гнатуш, Гудзь, 2006).

Для виділення сульфатвідновлювальних бактерій методом Столбунова-Рябова відбирали проби води та мулу з води первинного, вторинного відстійників і активного мулу аеротенку системи очищення стічних вод м. Львова (Антипчук, Кіреєва, 2005). Ідентифікацію виділеного штаму сульфатвідновлювальних бактерій проводили за морфофізіологічними ознаками згідно з визначником Берджі (Хоулт та ін., 1997).

Для дослідження фізіологічних властивостей і культивування сульфатвідновлювальних бактерій *D. desulfuricans* Ya-11 та *Desulfotomaculum* sp. AR1 використовували середовище Постгейта С (Postgate, 1984). Для дослідження впливу абіотичних чинників на ріст і розвиток виділеного штаму бактерії культивували за рН 2–12 (рН-метр рН-150М), температури 4–65 °С, використовували середовище Постгейта С з додаванням різних джерел карбону – натрій лактату (6 г/л), натрій ацетату (4,4 г/л), гідрохінону (3,4 г/л), пірогалолу (1,3 г/л), натрій бензоату (4,1 г/л), катехолу (3,7 г/л), толуену (2,6 г/л), ксилену (2,6 г/л), *n*-амінобензойної кислоти (3,9 г/л), лейцину (4,4 г/л), ізолейцину (4,4 г/л), валіну (4,7 г/л), фумарату (4,9–6,0 г/л). Для дослідження впливу йонів важких металів на ріст бактерій Cu(II), Cd(II) та Cr(VI) вносили у середовище культивування бактерій у формі CuSO₄·5H₂O, CdSO₄, K₂Cr₂O₇, відповідно, у концентрації 1 мМ після стерилізації. Для виявлення здатності *D. desulfuricans* Ya-11 та *Desulfotomaculum* sp. AR1 використовувати перхлорат-йон як акцептор електронів, бактерії культивували у модифікованому середовищі Постгейта С (без сульфат-йонів), за внесення перхлорат-йонів у формі NaClO₄ у концентрації 1 г/л.

Біомасу бактерій визначали на фотоелектроколориметрі КФК-3 ($\lambda=340$ нм, кювета з оптичним шляхом 3 мм).

Вміст сульфат-йонів визначали турбідиметрично згідно з ГОСТ 26426-85. Кількість гідроген сульфід у культуральній рідині на КФК-3 з використанням *n*-амінодиметиланіліндигідрохлориду ($\lambda=665$ нм, кювета з оптичним шляхом 30 мм) (Sugiyama, 2002). Вміст ацетат-йонів визначали титриметрично з використанням натрій гідроксиду (Бабко, П'ятницький, 1974). Вміст перхлорат-йонів визначали за допомогою методу перманганатометрії (титруванням 0,1 Н розчином KMnO₄ залишку солі Мора) (Петрашень, 1946). Катіони Cu²⁺ та Cd²⁺ якісно визначали у культуральній рідині (Ломницька та ін., 2004). Вміст органічних кислот, пірогалолу та гідрохінону визначали методом високоефективної рідинної хроматографії (Kerem et al., 2004; Siddique et al., 2012; Zhang et al., 2015).

Для отримання клітинних екстрактів клітини відділяли від культуральної рідини центрифугуванням за 3500 g упродовж 20 хв за 4 °С. Осаджені клітини двічі промивали 10 мМ калій-фосфатним буфером (рН 7,5). До осаджених клітин додавали охолоджений екстрагувальний буфер (Мороз

та ін., 2003). Клітини руйнували за допомогою ультразвукового дезінтегратора УЗДН-2Т.

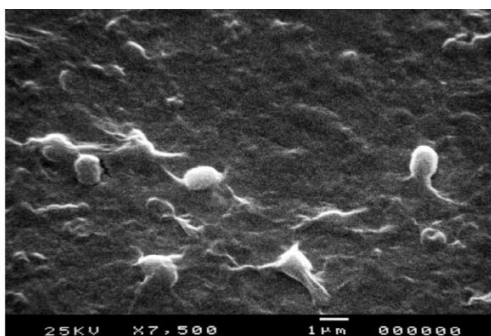
Визначення вмісту загального білка проводили за методом Бредфорда (Bradford, 1976). Для визначення здатності іммобілізованих бактерій вилучати зі середовища перхлорат-йони, клітини бактерій іммобілізували у 3% агарі та на деревній стружці. Перхлорат-йони вносили у модельний розчин у формі NaClO_4 у концентрації 0,07–0,16 мМ. Морфологію бактерій досліджували за допомогою сканувальної електронної мікроскопії з використанням SEM JEOL T220A та електронної трансмісійної мікроскопії.

Для статистичного оброблення результатів використовували коефіцієнт Стюдента, однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA), дані порівнювали за допомогою тесту Тьюкі. Проведено двофакторний дисперсійний аналіз (Anova: Two-Factor Without Replication). Відмінність між контрольними та дослідними показниками вважали достовірною, коли ймовірність різниці становила $P < 0,05$.

ОЧИЩЕННЯ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА ВІД СПЛУК ОРГАНІЧНОЇ ТА НЕОРГАНІЧНОЇ ПРИРОДИ ЗА УЧАСТЮ БАКТЕРІЙ

Аутекологічна характеристика сульфатвідновлювальних бактерій, виділених зі стічних вод м. Львова, та їхня ідентифікація. Кількість сульфатвідновлювальних бактерій на різних етапах системи очищення стоків м. Львова коливається в різних межах. У первинному відстійнику й активному мулі кількість сульфатвідновлювальних бактерій становить 10^2 КУО/мл, а в аеротенку – $4 \cdot 10^2$ КУО/мл, тоді як у вторинному відстійнику їх не виявлено (Шоляк, Перетятко, Гудзь, 2013).

Із різних ланок системи очищення стічних вод м. Львова відібрано 15 ізолятів сульфатвідновлювальних бактерій. Здатність до дисиміляційної сульфатредукції, внаслідок чого у середовищі нагромаджується гідроген сульфід, вказує на те, що ізоляти бактерій, згідно з визначником Берджі, належать до групи 7 – Бактерії, що здійснюють дисиміляційне відновлення сульфату або сірки. Бактерії штаму AR1 мають найвищу сульфідогенну активність. Морфологічно клітини бактерій штаму AR1 мають вигляд коротких паличок розміром 1,0 x 1,5 мкм (рис. 1), грамнегативні.



А – сканувальна електронна мікроскопія, $\times 7\,500$



Б – трансмісійна електронна мікроскопія, $\times 15\,000$

Рис. 1. Клітини сульфатвідновлювальних бактерій штаму AR1

Досліджено вплив абіотичних чинників середовища на ріст виділених бактерій штаму AR1. Бактерії належать до мезофільних мікроорганізмів, оптимальна температура росту 25–37 °С. Оптимальне рН для росту бактерій штаму AR1 становить 6,0–7,5 (табл. 1).

Таблиця 1

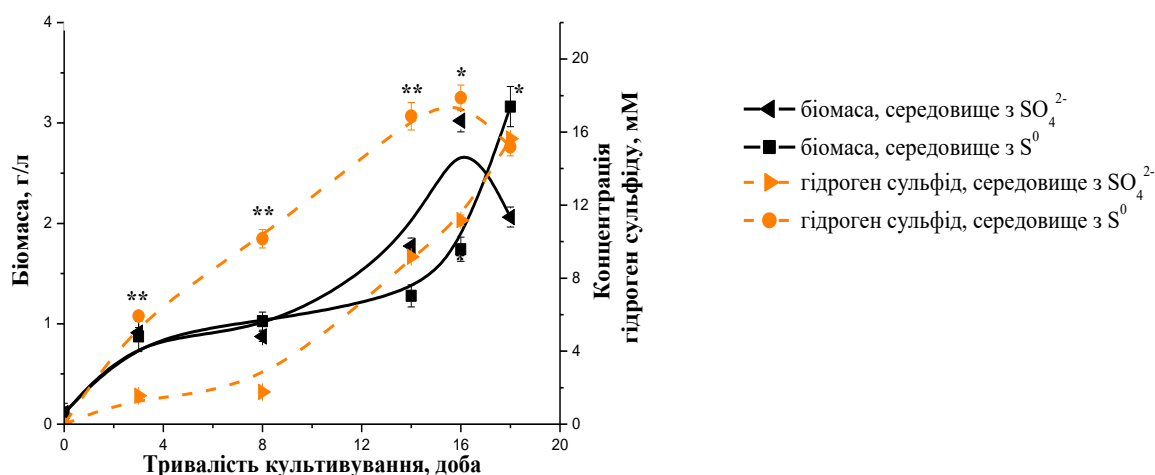
Вплив абіотичних чинників на ріст бактерій штаму AR1

Ознака	Штам AR1	
Ріст за температури	4–20 °С	–
	25–37 °С	+
	45–65 °С	–
Ріст за рН	2,0–5,5	–
	6,0–7,5	+
	8,0–12,0	–
Вплив кисню	з O ₂	–
	без O ₂	+
<i>Вплив органічних і неорганічних сполук</i>		
Акцептори електронів	Сульфат-йон	+
	Елементна сірка	+
Донори електронів	Натрій ацетат	+
	Натрій лактат	+

Примітка: «–» – немає росту; «+» – є ріст

За наявності кисню в середовищі бактерії не ростуть. Це вказує на те, що бактерії штаму AR1 є анаеробами. За наявності в середовищі натрій ацетату бактерії ростуть, використовуючи його як єдине джерело карбону. Бактерії штаму AR1 здійснюють повне окиснення органічних сполук.

За культивування сульфатвідновлювальних бактерій штаму AR1 у середовищі без йонів сульфату за наявності елементної сірки встановлено, що вони можуть використовувати її як єдиний акцептор електронів (рис. 2).



* – P < 0,05; ** – P < 0,01 – вірогідні зміни порівняно з контролем

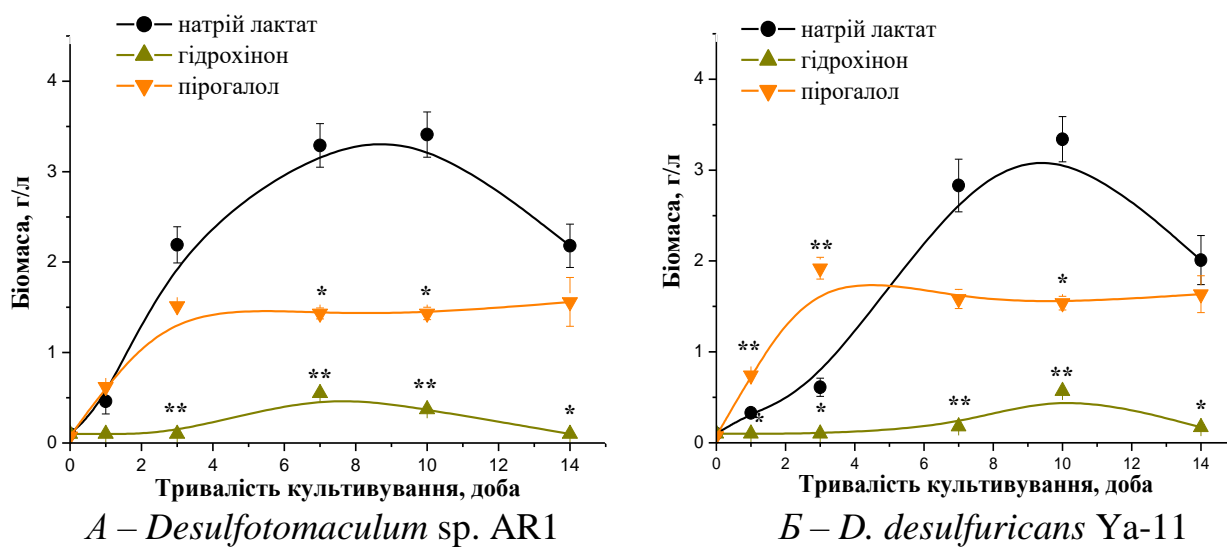
Рис. 2. Нагромадження гідроген сульфіду та біомаси бактеріями штаму AR1 у середовищі з різними акцепторами електронів

Концентрація гідроген сульфїду за росту бактерій штаму AR1 у середовищах за впливу різних акцепторів електронів – сульфат-йонів та елементної сірки – становить 15 мМ та 18 мМ, відповідно.

Визначено, що бактерії штаму AR1 утворюють спори, а згідно з визначником бактерій Берджі, серед сульфатвідновлювальних еубактерій утворювати спори можуть лише представники роду *Desulfotomaculum* (Хоулт та ін., 1997).

Отже, результати дослідження морфологічних властивостей, впливу абіотичних чинників на ріст бактерій, здатності утворювати спори, відновлювати сульфат-йони та елементну сірку, нагромаджувати гідроген сульфід, використовувати і повністю окиснювати органічні сполуки дають змогу ідентифікувати виділений штам сульфатвідновлювальних бактерій як *Desulfotomaculum* sp. AR1.

Вплив фенолів на нагромадження біомаси сульфатвідновлювальними бактеріями. Встановлено здатність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 використовувати двох- і трьохатомні феноли, зокрема, гідрохінон і пірогалол, для росту й одержання енергії. Бактерії *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 ростуть у середовищі з пірогалолом, нагромаджуючи 2 г/л біомаси, тоді як у середовищі з гідрохіноном біомаса значно нижча (0,5 г/л) (рис. 3).



* – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$ – вірогідні зміни порівняно з контролем

Рис. 3. Нагромадження біомаси бактеріями *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 у середовищах із різними джерелами карбону

Після семи діб культивування бактерій вміст пірогалолу знизився на 40 %, гідрохінону – на 10 % (рис. 4). Вихідна концентрація пірогалолу та гідрохінону перевищує ГДК у 10^4 разів.

Бактерії *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 можуть вилучати зі середовища фенольні сполуки, використовуючи їх як джерело карбону й енергії, проте ефективність використання пірогалолу є вищою, порівняно з ефективністю використання гідрохінону.

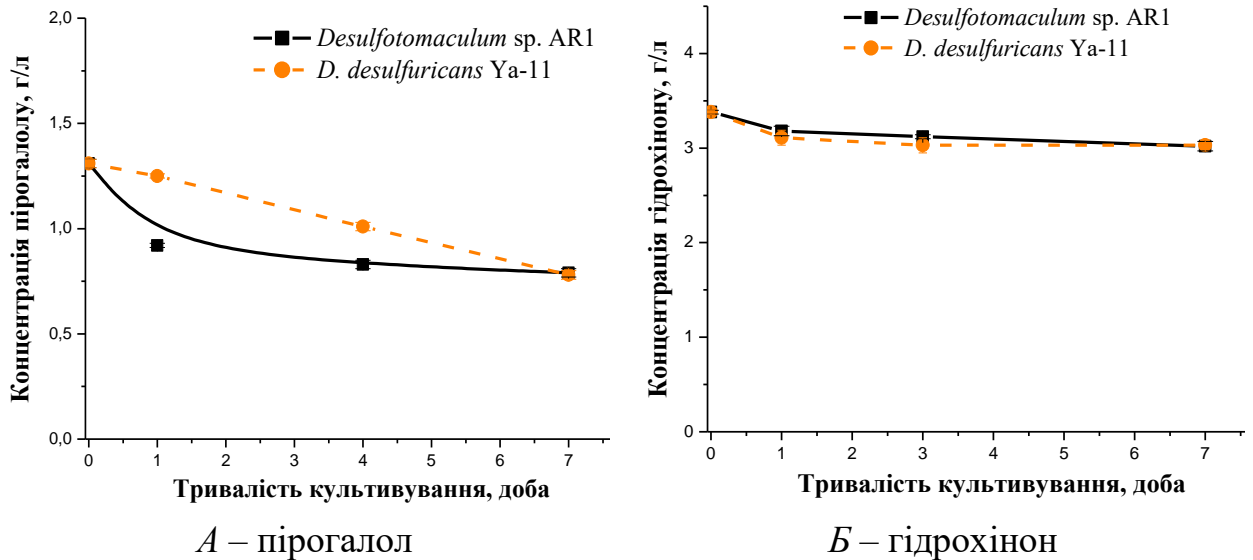
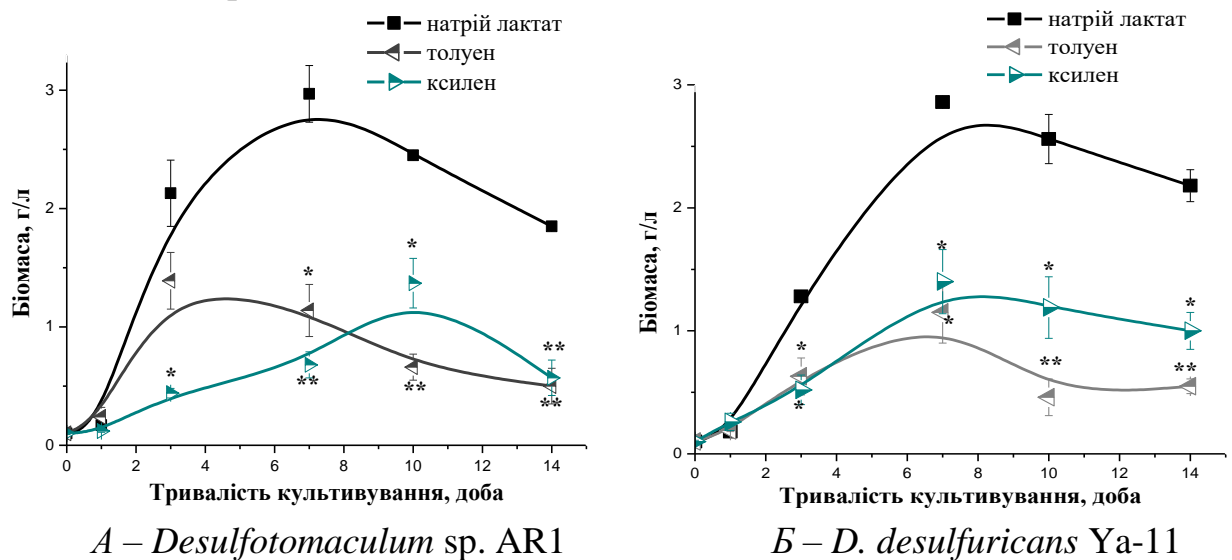


Рис. 4. Зміна концентрації пірогалолу і гідрохінону за культивування бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11

Деструкція толуену та ксилену сульфатвідновлювальними бактеріями. Досліджено здатність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 використовувати толуен і ксилен як джерела карбону й енергії. Бактерії нагромаджують понад 1 г/л біомаси у середовищах з толуеном і ксиленом, що у 2–2,5 рази нижче порівняно з контрольними показниками (рис. 5).

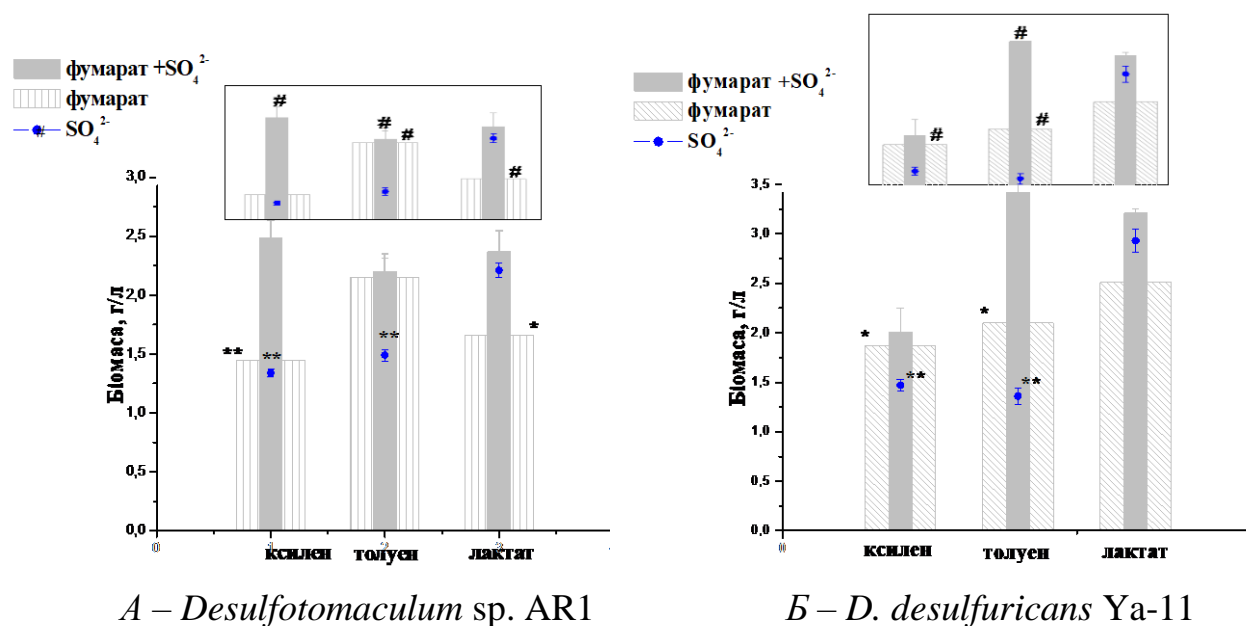


* – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$ – вірогідні зміни порівняно з контролем

Рис. 5. Нагромадження біомаси *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 у середовищі Постгейта С з толуеном і ксиленом як джерелом карбону

Відомо, що реакція конденсації толуену з фумаратом, унаслідок чого утворюється бензилсукцинат, є початковим етапом деструкції толуену в бактерій *Thauera* sp. і *Azoarcus* sp., а також у сульфатвідновлювальних бактерій. Приєднання фумарату є загальною реакцією, яку використовують мікроорганізми для активації вуглеводнів з метою їхньої деструкції також

з іншими метильованими ароматичними речовинами, зокрема, з ксиленом (Gibson, Harwood, 2002). Досліджено ріст сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 (рис. 6, А) та *D. desulfuricans* Ya-11 (рис. 6, Б) у середовищах з ксиленом і толуеном з/без фумарату.



* – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$ – вірогідні зміни порівняно з контролем (натрій лактат із SO₄²⁻); # – $P < 0,05$ – вірогідні зміни порівняно з контролем (ксилен/толуен/натрій лактат із SO₄²⁻)

Рис. 6. Біомаса бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 за росту в середовищі Постгейта С з різними донорами й акцепторами електронів

Найкращий ріст досліджуваних бактерій спостерігали у середовищі з досліджуваною аромосполукою, фумаратом і йонами сульфату. Кількість використаного фумарату в середовищі з толуеном і ксиленом бактеріями *Desulfotomaculum* sp. AR1 після семи діб культивування сягає 90 %.

Сульфатвідновлювальні бактерії здатні до анаеробної деструкції ароматичних вуглеводнів, зокрема, толуену та ксилену, знижуючи їхній вміст у середовищі, за наявності сульфат-йона як кінцевого акцептора електронів. Ймовірно, бактерії *Desulfotomaculum* sp. AR1 і *D. Desulfuricans* Ya-11 використовують фумарат у процесах деструкції толуену та ксилену, як це описано у літературі для бактерій *Thauera* sp., *Azoarcus* sp. і сульфатвідновлювальних бактерій (Beller, Spormann, 1999; Krieger, Beller, Reinhard, Spormann, 1999; Elshahed, Gieg, McInerney, Suffita, 2001).

Вплив нітрогеновмісних сполук на сульфатвідновлювальні бактерії.

Встановлено, що бактерії *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 можуть рости у середовищі з *n*-амінобензойною кислотою, використовуючи її як джерело карбону. Як джерело нітрогену бактерії не здатні використовувати *n*-амінобензойну кислоту, оскільки у середовищі з цією аромосполукою без інших джерел нітрогену бактерії *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 не ростуть.

Відомо, що шляхи розкладання амінокислот сульфатвідновлювальними бактеріями пов'язані зі шляхами деградації нітрогеновмісних ароматичних

сполук (<https://www.genome.jp>). Досліджено здатність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 використовувати лейцин, ізолейцин і валін як джерела карбону й енергії (рис. 7). Бактерії *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 у середовищі з валіном нагромаджують найвищу біомасу (2 г/л), у середовищах з лейцином/ізолейцином значення цього показника вдвічі менше. Ефективність відновлення SO_4^{2-} бактеріями *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 у середовищі з натрій лактатом сягає 80 %, у середовищах із амінокислотами 15,6–19,3 %.

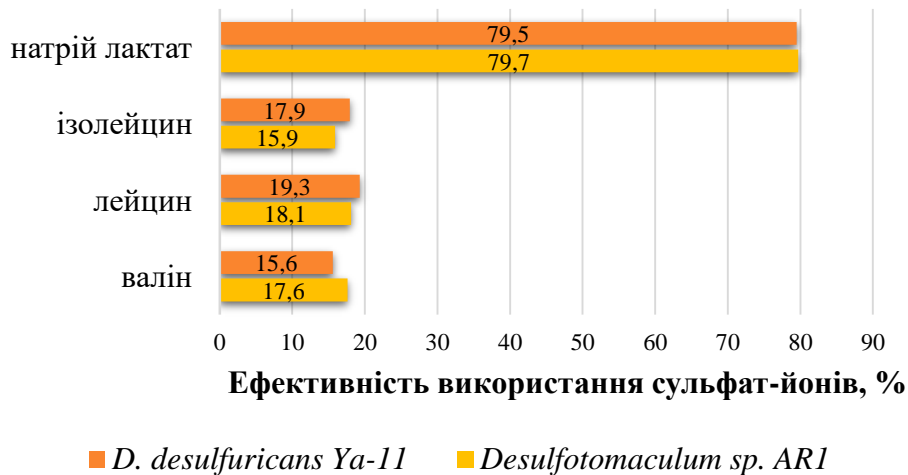


Рис. 7. Ефективність використання сульфат-йонів *Desulfotomaculum* sp. AR1 і *D. desulfuricans* Ya-11 після 10 діб культивування у середовищах з амінокислотами та натрій лактатом

Бактерії *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 можуть бути використані у розробленні технологій з метою очищення стічних вод від нітрогеновмісних органічних речовин, зокрема, *n*-амінобензойної кислоти й амінокислот валіну, лейцину та ізолейцину, які утворюються за анаеробних умов у процесі гниття протеїновмісних субстратів.

Вплив умов культивування на сульфідогенну активність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11. У стічних водах промислових підприємств виявляють у високих концентраціях йони сульфатів (Мороз та ін., 2009). Бактерії *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 ростуть у середовищах з різними джерелами карбону за вихідної концентрації сульфат-йонів 28 мМ, що значно перевищує ГДК. За вмісту SO_4^{2-} 15 мМ у середовищі ефективність відновлення сульфат-йонів *Desulfotomaculum* sp. AR1 становить 86 %, а *D. desulfuricans* Ya-11 – 93 %. За вихідної концентрації 15–28 мМ бактерії *Desulfotomaculum* sp. AR1 нагромаджують 11–14 мМ гідроген сульфід, *D. desulfuricans* Ya-11 – 13–14 мМ, що, можливо, є основною причиною низької ефективності відновлення SO_4^{2-} , за їх високої вихідної концентрації (табл. 2).

Оскільки у стоках різних промислових підприємств, окрім неорганічних сполук, містяться органічні, зокрема, ароматичні сполуки, досліджено сульфідогенну активність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 і *D. desulfuricans* Ya-11 у середовищах з толуеном, ксиленом,

n-амінобензойною кислотою. Підтвердженням росту бактерій є зростання кількості білка у клітинах. За росту *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 у середовищах з толуеном, ксиленом, *n*-амінобензойною кислотою концентрація гідроген сульфідів більш ніж у 7 разів нижча, ніж у контрольному середовищі.

Таблиця 2

Ефективність відновлення сульфат-йонів і нагромадження гідроген сульфідів бактеріями *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 у середовищі з натрій лактатом

Вихідна концентрація сульфат-йонів, мМ	Штам бактерій			
	<i>Desulfotomaculum</i> sp. AR1		<i>D. desulfuricans</i> Ya-11	
	Досліджуваний параметр			
	Ефективність використання SO_4^{2-} , %	Кількість нагромадженого гідроген сульфідів, мМ	Ефективність використання SO_4^{2-} , %	Кількість нагромадженого гідроген сульфідів, мМ
15,09±0,15	86,48±0,46	12,36±0,32	93,24±0,73	13,69±0,32
22,04±0,10	54,45±0,40***	10,98±0,26***	70,29±0,05***	13,00±0,32
28,33±0,10	54,36±3,07**	14,05±1,01**	57,65±3,18**	14,00±1,12

Примітка: ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ – вірогідні зміни порівняно з контролем

Наявність ароматичних сполук у середовищі – один із чинників, який дає змогу регулювати вміст токсичного гідроген сульфідів, продукованого бактеріями *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11.

Детоксикація йонів важких металів у водному середовищі за участю бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11. Джерелом надходження йонів важких металів у навколишнє середовище є відходи практично всіх галузей народного господарства. Найбільш токсичними з них є Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cr (VI), Mn (VII), Hg^{2+} , Fe^{3+} , Sn^{2+} (Стеценко, Долін, 2009). Досліджено можливість використання бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1, виділених зі системи очищення стічних вод, для осадження сполук хрому. Встановлено, що за наявності Cr (VI) знижується біомаса *Desulfotomaculum* sp. AR1 у середовищі з натрій лактатом у 9 разів, у середовищі з толуеном – у 2,5 рази. Досліджено вплив Cu^{2+} і Cd^{2+} на нагромадження біомаси бактеріями *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11. Результати досліджень показали, що найбільш пригнічувальний вплив на нагромадження біомаси бактеріями спостерігали за синергічного впливу Cu^{2+} та Cd^{2+} . За внесення у середовища культивування Cu^{2+} та/або Cd^{2+} спостерігали пригнічення використання сульфат-йонів бактеріями *Desulfotomaculum* sp. AR1 і *D. desulfuricans* Ya-11.

Одним із ефективних методів очищення забрудненого водного середовища від йонів металів є їхнє осадження за участю речовин різної природи біогенного походження. У разі використання сульфат-

відновлювальних бактерій йони металів осаджуються продукованим гідроген сульфідом у вигляді нерозчинних сульфідів металів (рис. 8).

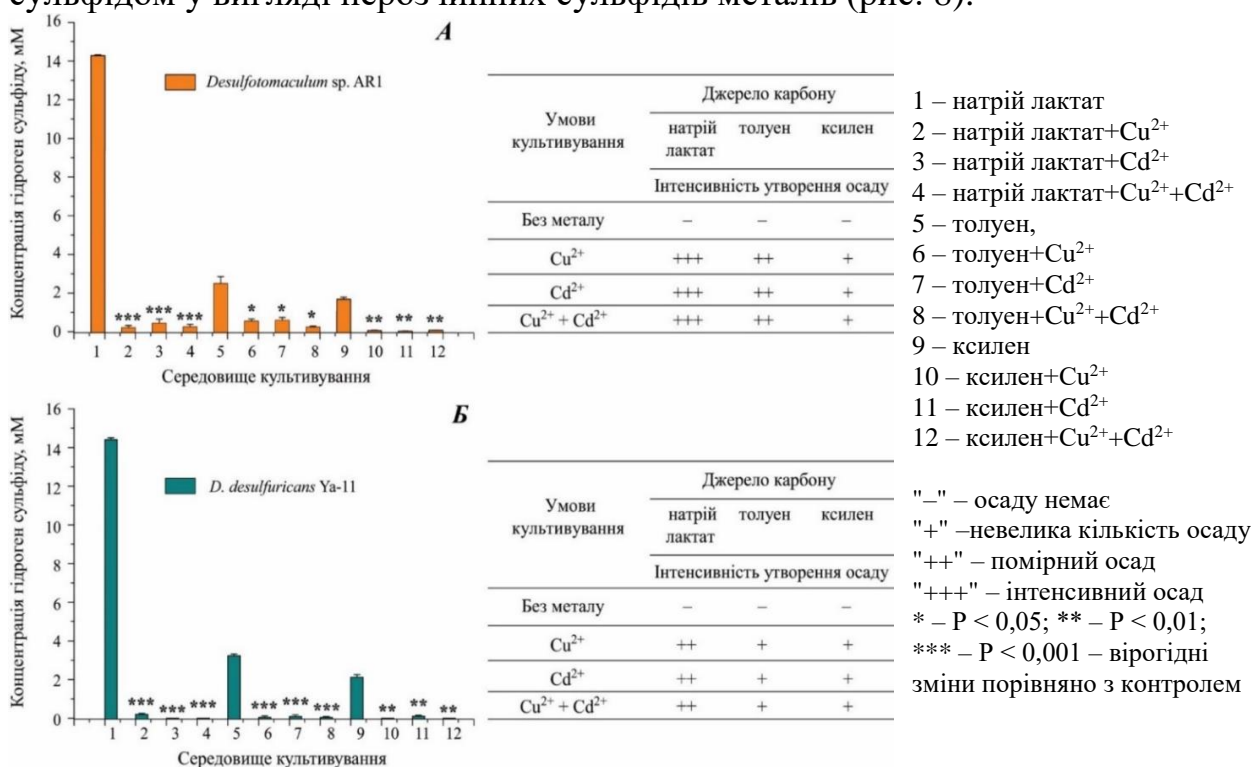


Рис. 8. Нагромадження гідроген сульфіду бактеріями *Desulfotomaculum* sp. AR1 (А) і *D. desulfuricans* Ya-11 (Б) за впливу йонів Cu²⁺ та/або Cd²⁺

Продукований бактеріями внаслідок дисиміляційної сульфатредукції гідроген сульфід здатний осаджувати йони важких металів з утворенням нетоксичних сульфідів металів. Таким способом можна регулювати вміст сірководню у водному середовищі та, у свою чергу, очищати це середовище від йонів важких металів.

Вплив чинників середовища на використання оксоаніонів хлору бактеріями *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11. Використання біологічних методів очищення водного середовища від перхлорат-йонів переважно пов'язано зі здатністю мікроорганізмів відновлювати ClO₄⁻ до Cl⁻ за наявності донорів електронів – різноманітних органічних речовин (Nerenberg, Rittmann, Najm, 2002; Nerenberg, Kawagoshi, Rittmann, 2006; Prata, 2007). Досліджено здатність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 і *D. desulfuricans* Ya-11 рости у середовищі з натрій лактатом чи толуеном, використовуючи перхлорат-йони як акцептори електронів. Встановлено, що перхлорат-йони пригнічують ріст і сульфیدогенну активність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 у середовищі з натрій лактатом.

Ефективність використання перхлорат-йонів бактеріями *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 у середовищі Постгейта С з толуеном висока і становить 80–90 %, у середовищі з натрій лактатом – 60–90 % (рис. 9). Вихідна концентрація перхлорат-йонів становить 0,15 мМ, що перевищує ГДК у понад 10³ разів.

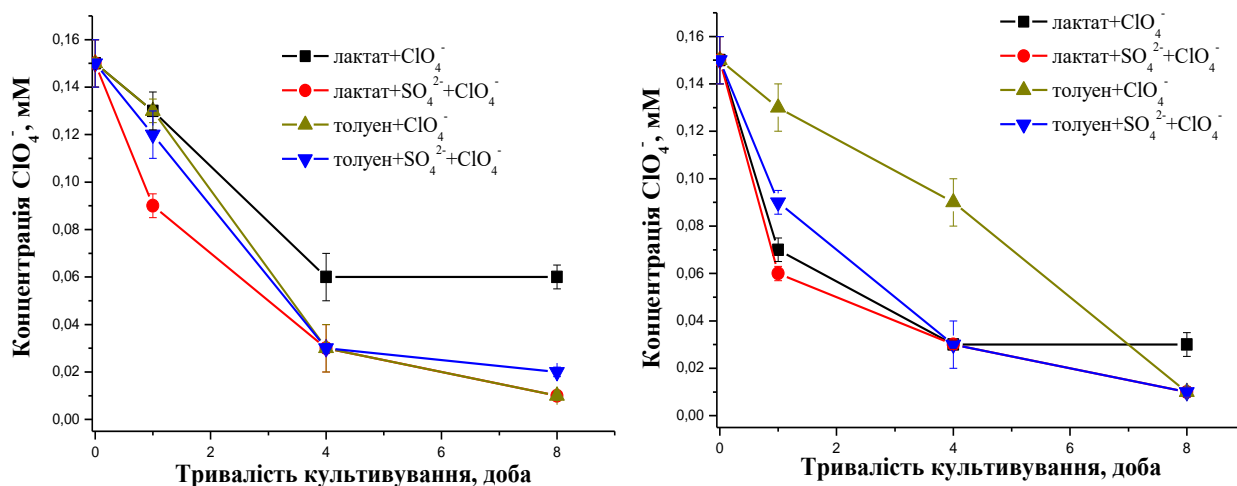
А – *Desulfotomaculum* sp. AR1Б – *D. desulfuricans* Ya-11

Рис. 9. Використання йонів перхлорату як акцепторів електронів бактеріями *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 у середовищі з різними джерелами карбону

Досліджено здатність іммобілізованих у агарі та на деревній стружці клітин бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 очищати водне середовище від перхлорат-йонів. Одержані результати показують, що відновлення перхлорат-йонів трохи швидше здійснюють бактерії *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11, іммобілізовані в агарі, проте цей спосіб економічно менш вигідний, порівняно з використанням деревної стружки (табл. 3).

Таблиця 3

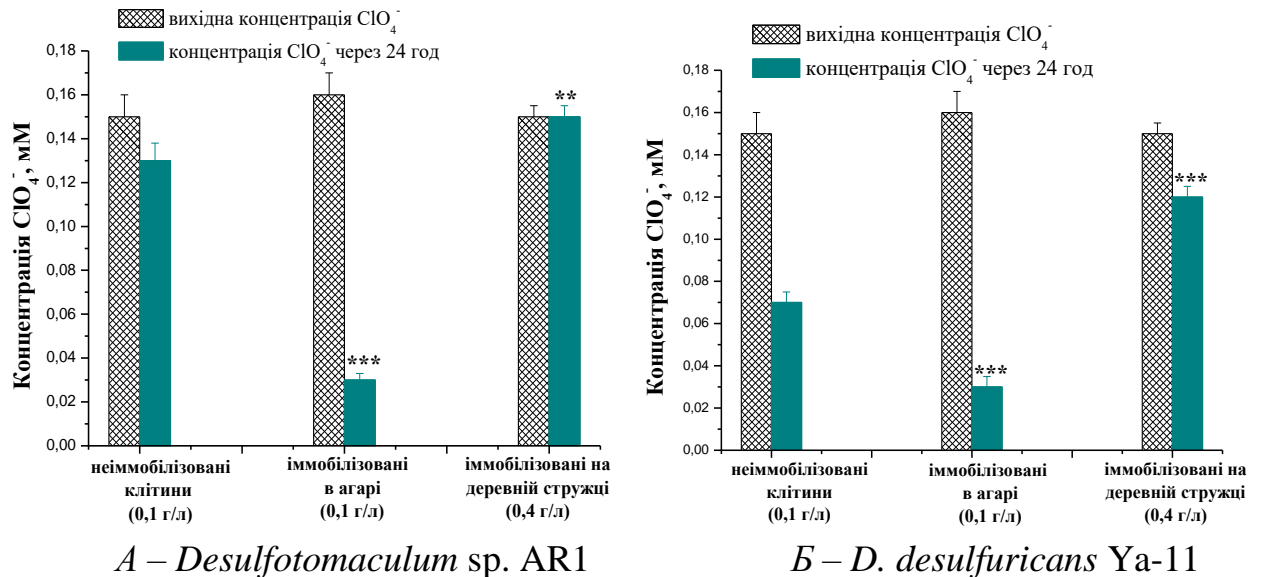
Вилучення перхлорат-йонів із модельного розчину іммобілізованими клітинами бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 у концентрації 1 г/л

Спосіб іммобілізації	Штам бактерій	Кількість вилучених ClO_4^- , %*	Тривалість вилучення, год
Іммобілізовані в агарі	<i>Desulfotomaculum</i> sp. AR1	100	24
	<i>D. desulfuricans</i> Ya-11	100	48
	Контроль (без клітин)	6,25	76
Іммобілізовані на деревній стружці	<i>Desulfotomaculum</i> sp. AR1	80	124
	<i>D. desulfuricans</i> Ya-11	60	74
	Контроль (без клітин)	6,67	166

*Примітка: вихідна концентрація ClO_4^- становить 0,15–0,16 мМ

Встановлено, що іммобілізовані в агарі клітини бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 ефективніше очищують перхлоратовмісне водне середовище від ClO_4^- , ніж неіммобілізовані (рис. 10).

Вилучення ClO_4^- за участю мікроорганізмів є перспективним методом в очищенні перхлоратовмісних вод. Бактерії *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 здатні використовувати перхлорат-йони як акцептори електронів у своєму метаболізмі, знижуючи їхній вміст у забрудненому водному середовищі.



** – $P < 0,01$ – вірогідні зміни порівняно з контролем (неіммобілізовані клітини);
 *** – $P < 0,001$ – вірогідні зміни порівняно з контролем (неіммобілізовані клітини)

Рис. 10. Концентрація ClO_4^- в модельному розчині після 24 год інкубування іммобілізованих і неіммобілізованих клітин бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11

Результати досліджень здатності іммобілізованих клітин бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 вилучати перхлорат-йони вказують на доцільність їхнього використання у ремедіації водного середовища.

УЗАГАЛЬНЕННЯ Й ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

У процесі біологічного очищення промислових і побутових стічних вод вирішальну роль відіграють мікроорганізми. З літератури відомо про важливу роль сульфатвідновлювальних бактерій у цих процесах. За анаеробних умов ці мікроорганізми забезпечують повне вилучення йонів важких металів з одночасним очищенням від органічних речовин (Буракаєва, Русанов, Лантух, 1999). Перевагами застосування сульфатвідновлювальних бактерій є їхня здатність рости у середовищах з невеликою кількістю джерела карбону, використання різних органічних сполук як джерела енергії, зниження витрат електроенергії на аерування середовища, на відміну від аеробних систем (Seghezzo, Zeeman, van Lier, Hamelers, Lettinga, 1998). Обмежує застосування мікроорганізмів для очищення стічних вод токсичність для них йонів металів (Перетятко, Галушка, Гудзь, 2009).

Дослідження здатності сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 використовувати як джерело карбону та донор електронів різні органічні сполуки, зокрема, лактат, фумарат, толуен, ксилен, пірогалол, *n*-амінобензойну кислоту, амінокислоти (лейцин, ізолейцин, валін), а як акцептор електронів – сульфат-і перхлорат-йони дає нам можливість запропонувати схему очищення стічної води за участю мікроорганізмів, із подальшим зниженням вмісту цих речовин (рис. 11).

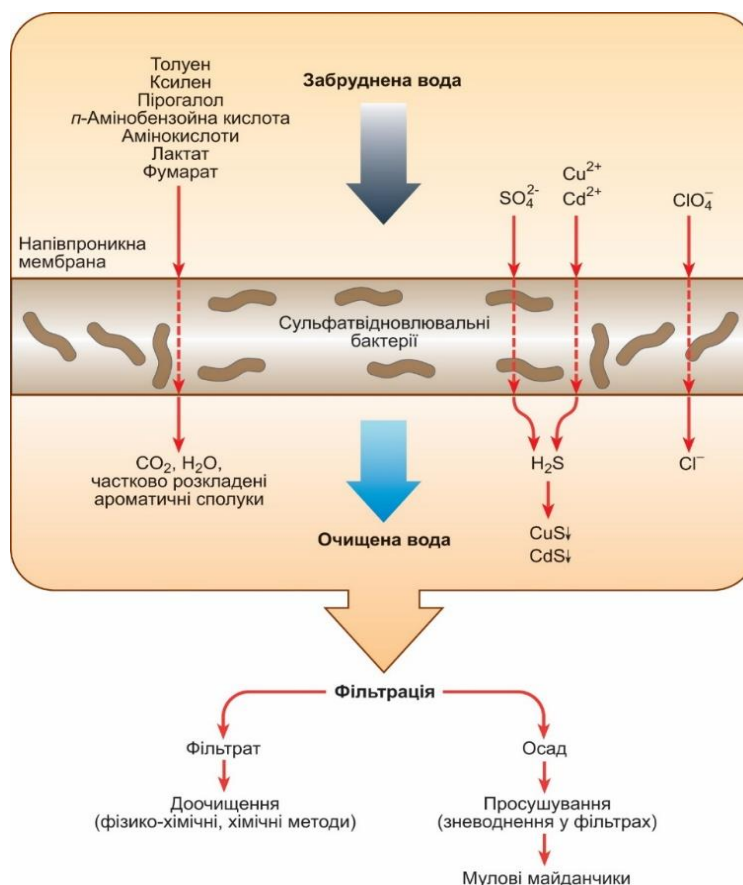


Рис. 11. Схема очищення стічних вод за участю бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 і *D. desulfuricans* Ya-11 від сполук органічної та неорганічної природи

З цією метою бактерії можна помістити у напівпроникну мембрану, яка захищатиме їх від надмірного впливу токсичних речовин, що містяться у стоках. Унаслідок повного розкладання органічних речовин бактеріями у середовище виділятимуться вода і вуглекислий газ, у разі неповної деструкції ароматичних сполук – речовини, що будуть утворюватися, можуть використовувати інші види мікроорганізмів з метою доокиснення.

Йони сульфату внаслідок сульфатредукції відновлюватимуться до гідроген сульфід, який, у свою чергу, може осаджувати йони важких металів, зокрема, Cu^{2+} та Cd^{2+} у вигляді нерозчинних сульфідів. Окрім сульфат-йонів, досліджувані бактерії можуть застосовувати йони перхлорату як акцептори електронів. Здатність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 використовувати елементну сірку дає змогу вважати їх перспективними для очищення стічних вод від S^0 , а їхня здатність до споруутворення забезпечує більшу стійкість і виживання за умов неконтрольованого скиду забруднених стоків. Очищену біологічним способом воду фільтрують, фільтрат подають на доочищення фізико-хімічними методами, воду на знезараження, осад – на мулові майданчики чи на осушення, з подальшим використанням як добрива.

Отже, сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfotomaculum* sp. AR1, виділені зі системи очищення стічних вод м. Львова, та *D. desulfuricans* Ya-11, виділені з озера Яворівське, можна використовувати для біоремедіації водних об'єктів від ароматичних сполук, оксоаніонів хлору та йонів важких металів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі з'ясовано екологічне значення сульфатвідновлювальних бактерій у детоксикації водного середовища та доведено можливість застосування їх у розробленні технологій біоремедіації водних об'єктів, завдяки здатності цих бактерій використовувати ароматичні сполуки та оксоаніони хлору як донори й акцептори електронів і осаджувати йони важких металів у вигляді нетоксичних сульфідів.

1. Виділено штам *Desulfotomaculum* sp. AR1 зі системи очищення побутових і промислових стічних вод м. Львова як потенційний деструктор полютантів, що використовує сульфат-йони та елементну сірку як акцептор електронів, накопичуючи до 18 мМ гідроген сульфід.

2. Встановлено вплив абіотичних чинників середовища на ріст і розвиток нового штаму бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та визначено їхні оптимальні параметри: температура 25–37 °С, рН 6,0–7,5, відсутність вільного кисню в середовищі. За оптимальних умов і використання натрій лактату як джерела карбону бактерії нагромаджують біомасу до 3 г/л.

3. Доведено здатність штамів *Desulfotomaculum* sp. AR1 і *D. desulfuricans* Ya-11 вилучати зі середовища ароматичні сполуки (пірогалол, гідрохінон, толуен, ксилен, *n*-амінобензойну кислоту) й амінокислоти (лейцин, ізолейцин, валін), використовуючи їх як джерело карбону та донор електронів.

4. Ефективність використання пірогалолу штамми *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 зі середовища є вищою у 4 рази, порівняно з ефективністю використання гідрохінону. Ефективність використання толуену та ксилену залежить від наявності фумарату, на що вказує зростання біомаси бактерій у 1,5–2,5 рази в середовищі з фумаратом.

5. Ароматичні сполуки, перхлорат-йони та йони важких металів негативно впливають на ріст і сульфідогенну активність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11, знижуючи до семи разів концентрацію гідроген сульфід, що дає змогу регулювати рівень його накопичення.

6. Доведено, що ефективність відновлення сульфат-йонів бактеріями *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 найвища за концентрації SO_4^{2-} 15 мМ і становить 86 та 93 %, відповідно. Штами бактерій здатні рости у середовищі з вмістом сульфат-йонів 28 мМ, яка у 5,4 разу перевищує гранично допустиму концентрацію.

7. Встановлено здатність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 вилучати йони важких металів, зокрема Cu^{2+} і Cd^{2+} , осаджуючи їх гідроген сульфідом у вигляді нетоксичних сульфідів металів, що дає змогу одночасно нівелювати токсичний вплив цих забруднювачів.

8. З'ясовано здатність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 і *D. desulfuricans* Ya-11 вилучати зі середовища перхлорат-йони та використовувати їх як акцептори електронів.

9. Доведено, що іммобілізовані клітини бактерій *D. desulfuricans* Ya-11 та *Desulfotomaculum* sp. AR1 у 1,6–6,5 рази ефективніше вилучають ClO_4^- порівняно зі суспензійними.

**ОСНОВНІ НАУКОВІ ПРАЦІ,
ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЙНОЇ РОБОТИ**

Статті у фахових наукових виданнях України

1. Шоляк К.В., Перетятко Т.Б., Гудзь С.П., Гнатуш С.О., **Верхоляк Н.С.**, Галушка А.А. Використання фумарату сульфат-відновлювальними бактеріями *Desulfomicrobium* sp. CrR3 і *Desulfotomaculum* sp. *Мікробіологічний журнал*, 2015. 77(5). С. 20–28. (дослідження використання фумарату бактеріями *Desulfotomaculum* sp., участь у написанні статті).

2. **Верхоляк Н.С.**, Перетятко Т.Б. Використання ароматичних сполук бактеріями. I. Аеробна й анаеробна деструкція. *Біологічні Студії*, 2018. 12(2). С. 135–156. <https://doi.org/10.30970/sbi.1202.566> (аналіз та узагальнення літературних даних, підготовано статтю до друку).

3. **Верхоляк Н.С.**, Перетятко Т.Б. Використання ароматичних сполук бактеріями. II. Розкладання ароматичних ксенобіотиків. *Біологічні Студії*, 2018. 12(3–4). С. 117–140. <https://doi.org/10.30970/sbi.1203.574> (аналіз та узагальнення літературних даних, підготовано статтю до друку).

4. **Верхоляк Н.С.**, Перетятко Т.Б. Морфологічні властивості сульфатвідновлювальних бактерій, виділених із системи очищення стічних вод м. Львова. *Мікробіологія і біотехнологія*, 2018. 4. С. 19–29. [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.4\(44\).139440](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.4(44).139440) (виділено бактерії зі системи очищення стічних вод м. Львова та проведено їхню ідентифікацію, підготовано статтю до друку).

5. **Верхоляк Н.С.**, Перетятко Т.Б. Деструкція толуену та ксилену сульфатвідновлювальними бактеріями. *Ecology and Noospherology*, 2019. 30(2). С. 95–100. <https://doi.org/10.15421/031916> (досліджено здатність сульфатвідновлювальних бактерій використовувати ароматичні вуглеводні як джерело карбону й енергії, описано вплив фумарату на ці процеси, опрацьовано результати, підготовано статтю до друку).

6. **Verkholiak N.S.**, Peretyatko T.B., Halushka A.A. Reduction of perchlorate ions by the sulfate-reducing bacteria *Desulfotomaculum* sp. and *Desulfovibrio desulfuricans*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 2020. 11(2). С. 278–282. <https://doi.org/10.15421/022041> (досліджено ріст бактерій за впливу перхлорат-йонів, здатність бактерій очищати перхлоратовмісне водне середовище від ClO_4^- , опрацьовано результати досліджень, підготовано статтю до друку).

7. **Верхоляк Н.С.**, Перетятко Т.Б., Стахера І.М. Вплив Cu^{2+} і Cd^{2+} на ріст і сульфідогенну активність сульфатвідновлювальних бактерій за використання ароматичних вуглеводнів. *Агроекологічний журнал*, 2020. №4. С. 23–32. <https://doi.org/10.33730/2077-4893.4.2020.219442> (досліджено вплив йонів важких металів на ріст і сульфідогенну активність бактерій за росту в середовищі з різними органічними речовинами, описано результати досліджень, підготовано статтю до друку).

Тези і матеріали наукових конференцій

1. **Сембрак Н.С.**, Перетятко Т.Б., Гудзь С.П. Детоксикація водного середовища від йонів сульфату і важких металів сульфатвідновлювальними бактеріями. *Молодь і поступ біології: VIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів* (Львів, 3–6 квітня 2012 р.). Львів, 2012. С. 249–250.
2. **Верхоляк Н.С.**, Перетятко Т.Б., Гудзь С.П. Про здатність сульфатвідновлювальних бактерій використовувати оксоаніони хлору як акцептори електронів. *Молодь і поступ біології: IX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів* (Львів, 16–19 квітня 2013 р.). Львів, 2013. С. 281–282.
3. Перетятко Т.Б., Шоляк К.В., **Верхоляк Н.С.**, Гудзь С.П. Донори і акцептори електронів для сульфатвідновлювальних бактерій. *XIII з'їзд Товариства мікробіологів України* (Ялта, 1–6 жовтня 2013 р.). Ялта, 2013. С. 405.
4. Перетятко Т., Залізняк С., Кордупель Н., **Верхоляк Н.**, Шоляк К. Роль сульфатвідновлювальних бактерій у детоксикації середовища від політвантів органічної і неорганічної природи. *Досягнення та перспективи розвитку мікробіології: Міжнародна наукова конференція* (Львів, 12–14 жовтня 2016 р.). Львів, 2016. С. 58–60.
5. Перетятко Т.Б., **Верхоляк Н.С.**, Залізняк С.Р., Гудзь С.П. Відновлення оксоаніонів хлору бактеріями *Desulfotomaculum* sp. за різних умов культивування. *XV з'їзд Товариства мікробіологів України* (Одеса, 11–15 вересня 2017 р.). Одеса, 2017. С. 83.
6. Peretyatko T., Halushka A., Chaika O., **Verkholiak N.** Role of bacteria of the reducing stage of sulfur cycle, isolated from different biotopes, in the purification of environment from the pollutants. *7th International Weigl Conference* (Lviv, 2017 September 26–29). Lviv, 2017. P. 187.
7. **Верхоляк Н.**, Рогозіна І., Атаманчук М., Перетятко Т. Використання ароматичних сполук сульфатвідновлювальними бактеріями. *Молодь і поступ біології: XIV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів* (Львів, 10–12 квітня 2018 р.). Львів, 2018. С. 231–232.
8. **Verkholiak N.**, Peretyatko T., Halushka A. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by sulfate-reducing bacteria. *Advances in Microbiology and Biotechnology: International Conference* (Lviv, 2018 October 29–31). Lviv, 2018. P. 121.
9. Рогозіна І.В., **Верхоляк Н.С.** Вплив фумарату на використання толуену та *o*-ксилену сульфатвідновлювальними бактеріями. *Біологія: від молекули до біосфери: XIII Міжнародна конференція молодих науковців* (Харків, 28–30 листопада 2018 р.). Харків, 2018. С. 107–108.
10. **Верхоляк Н.С.**, Рогозіна І.В., Перетятко Т.Б. Використання сульфатвідновлювальних бактерій в очищенні водного середовища від йонів важких металів і ароматичних сполук. *Молодь і поступ біології: XV Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів* (Львів, 9–11 квітня 2019 р.). Львів, 2019. С. 195.
11. Рогозіна І.В., **Верхоляк Н.С.**, Перетятко Т.Б. Вплив купрум (II) сульфату і кадмій сульфату на сульфідогенну активність

бактерій *Desulfotomaculum* AR1 та *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 за використання толуену і *o*-ксилену. *Молодь і поступ біології: XVI Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів* (Львів, 27–29 квітня 2020 р.). Львів, 2020. С. 105–106.

12. Перетятко Т.Б., Рогозіна І.В., **Верхоляк Н.С.** Вплив ароматичних сполук і йонів важких металів на сульфідогенну активність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11. *Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку та інших природоохоронних територій: Міжнародна наукова конференція* (Львів, 10–13 вересня 2020 р.). Львів, 2020. С. 88–90.

13. **Верхоляк Н.С.**, Перетятко Т.Б. Детоксикація водного середовища від фенольних сполук за участю сульфатвідновлювальних бактерій. *Сталий розвиток: захист навколишнього середовища. Енергоощадність. Збалансоване природокористування: 6 Міжнародний конгрес* (Львів, 23–25 вересня 2020 р.). Львів, 2020. С. 25.

14. **Верхоляк Н.С.**, Перетятко Т.Б. Детоксикація водного середовища від речовин органічної та неорганічної природи сульфатвідновлювальними бактеріями. *Сталий розвиток: захист навколишнього середовища. Енергоощадність. Збалансоване природокористування: 6 Міжнародний молодіжний конгрес* (Львів, 9–10 лютого 2021 р.). Львів, 2021. С. 273.

15. **Верхоляк Н.С.**, Перетятко Т.Б. Роль сульфатвідновлювальних бактерій у детоксикації навколишнього середовища від ароматичних сполук. *Сучасні проблеми екології: XVII Всеукраїнська наукова on-line конференція здобувачів вищої освіти і молодих учених з міжнародною участю* (Житомир, 15 квітня 2021 р.). Житомир, 2021. С. 53.

АНОТАЦІЯ

Верхоляк Н. С. Екологічне значення сульфатвідновлювальних бактерій в очищенні водного середовища від полютантів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.16 – «Екологія». – Інститут агроекології і природокористування НААН України, Київ, 2021.

У роботі розкрито значення сульфатвідновлювальних бактерій у процесах очищення водного середовища від полютантів. Досліджено вплив різних абіотичних факторів на ріст і розвиток бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11, зокрема, органічних сполук (пірогалолу, гідрохінону, толуену, ксилену, *n*-амінобензойної кислоти), показано здатність використовувати ці речовини як єдине джерело карбону й енергії, відповідно знижуючи їхній вміст у забрудненому середовищі. З'ясовано здатність бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 рости у сульфатовмісних середовищах за підвищених концентрацій сульфат-йонів. Досліджено вплив різних умов культивування на ріст бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 і *D. desulfuricans* Ya-11 та їхню сульфідогенну активність. Виявлено інгібувальний вплив ароматичних сполук, перхлорат-

йонів і йонів важких металів на сульфідогенну активність досліджуваних бактерій. Встановлено здатність бактерій осаджувати йони важких металів, зокрема, Cu^{2+} та Cd^{2+} , у вигляді нетоксичних сульфідів металів продукованим унаслідок дисиміляційної сульфатредукції гідроген сульфідом. Виявлено здатність бактерій вилучати перхлорат-йони зі середовища, використовуючи їх як акцептори електронів. Проведено іммобілізацію клітин бактерій *Desulfotomaculum* sp. AR1 та *D. desulfuricans* Ya-11 з подальшим застосуванням іммобілізованих клітин у процесах очищення модельного розчину від ClO_4^- . Встановлено, що використання перхлорат-йонів ефективніше відбувається іммобілізованими клітинами бактерій, ніж суспензійними. Показано перспективність використання досліджуваних бактерій у процесах біоремедіації водного середовища.

Ключові слова: полютанти, детоксикація, сульфатвідновлювальні бактерії, сульфатредукція, очищення, біоремедіація.

ABSTRACT

Verkholiak N. S. Ecological significance of sulfate-reducing bacteria in the purification of the aquatic environment from pollutants. – Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

The thesis for scientific degree of the Candidate of Biological Sciences in a specialty 03.00.16 – “Ecology”. – Institute of Agroecology and Nature Management of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The paper clarifies the importance of microorganisms in the processes of the aquatic environment purification from pollutants. It is known from the literature about a significant role of sulfate-reducing bacteria in the purification of environment. A strain was isolated from Lviv wastewater as a potential pollutant destructor, which was identified as *Desulfotomaculum* sp. AR1. The effects of various abiotic factors on the growth and development of bacteria *Desulfotomaculum* sp. AR1 and *D. desulfuricans* Ya-11, in particular, organic compounds – pyrogallol, hydroquinone, toluene, xylene, *p*-aminobenzoic acid is studied, the ability to utilize these substances as the sole source of carbon and energy, respectively reducing their content in the contaminated environment, is shown. Positive effect of fumarate on biomass accumulation by bacteria during the growth in medium with aromatic hydrocarbons is shown. The best growth of the studied bacteria is found at the presence of aromatic compound, fumarate and sulfate ion in the medium. Studied bacteria are capable for growth at the presence of amino acids in the medium – leucine, isoleucine and valine, utilizing them as the sole carbon source. Studied bacteria may be used in the development of technologies of wastewater purification from nitrogen-containing organic compounds, particularly, valine, leucine and isoleucine, produced under the anaerobic conditions in the process of protein-containing substrates destruction. The ability of *Desulfotomaculum* sp. AR1 and *D. desulfuricans* Ya-11 bacteria to grow in media with different sulfate ion concentrations is studied, their ability to grow at SO_4^{2-} concentrations that highly exceed highest permissible concentration (HPC) is shown. Effects of abiotic factors on the growth of studied

bacteria and their sulfidogenic activity under different cultivation conditions is studied. Inhibitory effects of toluene, xylene and *p*-aminobenzoic acid on the sulfidogenic activity of *Desulfotomaculum* sp. AR1 and *D. desulfuricans* Ya-11 is found. Not considerable amount of hydrogen sulfide, which is in 7 times lower than in the control medium, is found at these conditions, which enables the regulation of toxic hydrogen sulfide content in the environment. The ability of bacteria to grow in the medium with sodium lactate or aromatic hydrocarbons under the influence of heavy metal ions is shown. Addition of Cr(VI) to the medium with sodium lactate or toluene inhibits *Desulfotomaculum* sp. AR1 growth. The most expressed inhibitory effect on biomass accumulation by *Desulfotomaculum* sp. AR1 and *D. desulfuricans* Ya-11 is found under the synergic influence of Cu^{2+} and Cd^{2+} . The ability of bacteria to precipitate heavy metal ions, in particular Cu^{2+} and Cd^{2+} in the form of non-toxic metal sulfides produced by dissimilatory sulfate reduction with hydrogen sulfide, has been established. Analysis of the influence of the carbon source and the presence of $\text{Cu}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ showed that the growth of bacteria *Desulfotomaculum* sp. AR1 and *D. desulfuricans* Ya-11 is affected by both the nature of the electron donor and the presence of heavy metal ions. The ability of bacteria to remove perchlorate ions from the environment, using them as electron acceptors is found. Inhibitory effect of perchlorate ion on the sulfate reduction is shown. Many factors have influence on the process of perchlorate ion reduction, particularly, the presence of molybdenum ion in the medium. It was found that molybdenum at a concentration of 0.1 and 1 mM promotes the process of perchlorate reduction, while at a concentration of 5 mM – has an inhibitory effect. Immobilization of *Desulfotomaculum* sp. AR1 and *D. desulfuricans* Ya-11 cells in agar and on the wood shavings is performed with further usage of immobilized cells in the processes of model solution purification from ClO_4^- . Utilization of perchlorate ion is performed more effectively by the immobilized in agar cells than on wood shavings. Immobilized cells remove perchlorate ion from the medium more effectively than free. Prospects of the studied bacteria usage in the bioremediation processes are shown.

Keywords: *pollutants, detoxification, sulfate-reducing bacteria, sulfate reduction, purification, bioremediation.*

АННОТАЦИЯ

Верхоляк Н. С. Экологическое значение сульфатредуцирующих бактерий в очистке водной среды от поллютантов. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.16 – «Экология». – Институт агроэкологии и природоиспользования НААН Украины, Киев, 2021.

В работе раскрыто значение сульфатредуцирующих бактерий в процессах очистки водной среды от поллютантов. Исследовано влияние различных абиотических факторов на рост и развитие бактерий *Desulfotomaculum* sp. AR1 и *D. desulfuricans* Ya-11, в частности, органических соединений (пирогаллола, гидрохинона, толуола, ксилола, *n*-аминобензойной

кислоты), показана способность использовать эти вещества в качестве единственного источника углерода и энергии, соответственно снижая их содержание в загрязненной среде. Выяснена способность бактерий *Desulfotomaculum* sp. AR1 и *D. desulfuricans* Ya-11 расти в сульфатсодержащих средах при повышенных концентрациях сульфат-ионов. Исследовано влияние различных условий культивирования на рост бактерий *Desulfotomaculum* sp. AR1 и *D. desulfuricans* Ya-11 и их сульфидогенную активность. Выявлено ингибирующее влияние ароматических соединений, перхлорат-ионов и ионов тяжелых металлов на сульфидогенную активность исследуемых бактерий. Установлена способность бактерий осаждать ионы тяжелых металлов, в частности, Cu^{2+} и Cd^{2+} , в виде нетоксичных сульфидов металлов сероводородом, продуцирующимся в результате диссимиляционной сульфатредукции. Обнаружена способность бактерий изымать перхлорат-ионы из среды, используя их как акцепторы электронов. Проведена иммобилизация клеток бактерий *Desulfotomaculum* sp. AR1 и *D. desulfuricans* Ya-11 с последующим применением иммобилизованных клеток в процессах очистки модельного раствора от ClO_4^- . Установлено, что использование перхлорат-ионов эффективнее происходит иммобилизованными клетками бактерий, чем суспензионными. Показана перспективность использования исследуемых бактерий в процессах биоремедиации водной среды.

Ключевые слова: *поллютанты, детоксикация, сульфатредуцирующие бактерии, сульфатредукция, очистка, биоремедиация.*