
BIOREMEDIATION OF ENVIRONMENT



O. M. Moroz ✉
S. O. Hnatysh
Ch. I. Bohoslavets
T. M. Hrytsun'
B. M. Borsukevych

Cand. Sci. (Biol.), Sen. Res. Sci.
Cand. Sci. (Biol.), Professor

UDK 579.[22+26+68+81]+
546.3

Ivan Franko National University of Lviv,
Hrushevskiyi Str., 4, Lviv, Ukraine, 79005

THE INFLUENCE OF POTASSIUM DICHROMATE ON DISSIMILATORY REDUCTION OF SULFATE AND NITRATE IONS BY BACTERIA *DESULFOVIBRIO* SP.

Abstract. Sulfate reducing bacteria, capable to reductive transformation of different nature pollutants, used in biotechnologies of purification of sewage, contaminated by carbon, sulfur, nitrogen and metal compounds. H_2S formed by them sediment metals to form of insoluble sulfides. Number of metals can be used by these microorganisms as electron acceptors during anaerobic respiration. Because under the influence of metal compounds observed slowing of bacteria metabolism, selection isolated from technologically modified ecotops resistant to pollutions strains is important task to create a new biotechnologies of purification. That's why the purpose of this work was to study the influence of potassium dichromate, present in medium, on reduction of sulfate and nitrate ions by sulfate reducing bacteria *Desulfovibrio desulfuricans* IMV K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 and *Desulfovibrio* sp. Yav-8, isolated from Yavorivske Lake, to estimate the efficiency of possible usage of these bacteria in technologies of complex purification of environment from dangerous pollutants.

Bacteria were cultivated in modified Kravtsov-Sorokin medium without SO_4^{2-} and $FeCl_2 \times 4H_2O$ for 10 days. To study the influence of $K_2Cr_2O_7$ on usage by bacteria SO_4^{2-} or NO_3^- cells were seeded to media with $Na_2SO_4 \times 10H_2O$ or $NaNO_3$ and $K_2Cr_2O_7$ at concentrations of 1.74 mM for total content of electron acceptors in medium 3.47 mM (concentration of SO_4^{2-} in medium of standard composition). Cells were also seeded to media with 3.47 mM $Na_2SO_4 \times 10H_2O$, $NaNO_3$ or $K_2Cr_2O_7$ to investigate their growth in media with SO_4^{2-} , NO_3^- or $Cr_2O_7^{2-}$ as sole electron acceptor (control). Biomass was determined by turbidymetric method, content of sulfate, nitrate, dichromate, chromium (III) ions, hydrogen sulfide or ammonia ions in cultural liquid – by spectrophotometric method.

It was found that $K_2Cr_2O_7$ inhibits growth (2.2 and 1.3 times) and level of reduction by bacteria sulfate or nitrate ions (4.2 and 3.0 times, respectively) at simultaneous addition into cultivation medium of 1.74 mM SO_4^{2-} or NO_3^- and 1.74 mM $Cr_2O_7^{2-}$, compared with growth and level of reduction of sulfate or nitrate ions in medium only with SO_4^{2-} or NO_3^- as sole electron acceptor. Revealed that during cultivation of bacteria in presence of equimolar amount of SO_4^{2-} or NO_3^- and $Cr_2O_7^{2-}$, last used by bacteria faster, content of Cr^{3+} during whole period of bacteria cultivation exceeded content H_2S or NH_4^+ . $K_2Cr_2O_7$ in medium has most negative influence on dissimilatory reduction by bacteria SO_4^{2-} than NO_3^- , since level of nitrate ions reduction by cells in medium with

✉ Tel.: +38067-811-86-44. E-mail: moroz_oksana@yahoo.com

DOI: 10.15421/031708

NO_3^- and $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ was a half times higher than level of sulfate ions reduction by it in medium with SO_4^{2-} and $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$. The ability of bacteria *Desulfovibrio* sp. to priority reduction of $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ and after their exhaustion – NO_3^- and SO_4^{2-} in the processes of anaerobic respiration can be used in technologies of complex purification of environment from toxic compounds.

Key words: sulfate reducing bacteria, dichromate, nitrate, sulfate ions.

УДК 579.[22+26+68+81]+
546.3

О. М. Мороз
С. А. Гнатуш
Х. И. Богославец
Т. М. Грицунь
Б. М. Борсукевич

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.
канд. биол. наук, проф.

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, г. Львов, Украина, 79005,
тел.: +38067-811-86-44, e-mail: moroz_oksana@yahoo.com*

ВЛИЯНИЕ КАЛИЙ БИХРОМАТА НА ДИССИМИЛЯЦИОННОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ИОНОВ СУЛЬФАТА И НИТРАТА БАКТЕРИЯМИ *DESULFOVIBRIO* SP.

Аннотация. Исследовано влияние калий бихромата при наличии его в среде культивирования на восстановление сульфат- и нитрат-ионов сульфатвосстанавливающими бактериями *Desulfovibrio desulfuricans* ИМБ К-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 и *Desulfovibrio* sp. Yav-8, выделенными из озера Яворовское. Установлено, что калий бихромат подавляет рост (в 2,2 и 1,3 раза) и уровень восстановления бактериями ионов сульфата или нитрата (в 4,2 и 3,0 раза соответственно) при одновременном внесении в среду культивирования 1,74 мМ SO_4^{2-} или NO_3^- и 1,74 мМ $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, по сравнению с ростом и уровнем восстановления ионов сульфата или нитрата в среде только с SO_4^{2-} или NO_3^- как единственным акцептором электронов. Выявлено, что в условиях культивирования бактерий в присутствии эквимольного количества сульфат- или нитрат и бихромат-ионов последние используются бактериями быстрее, содержание ионов хрома (III) в течение всего времени культивирования бактерий превышало содержание H_2S или NH_4^+ . Калий бихромат в среде более негативно влиял на диссимилиационное восстановление бактериями ионов сульфата, чем нитрата, поскольку уровень восстановления ионов нитрата клетками в среде с NO_3^- и $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ в полтора раза превышал уровень использования ими ионов сульфата в среде с SO_4^{2-} и $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$. Способность бактерий *Desulfovibrio* sp. до первоочередного использования ионов бихромата, а после их исчерпания – ионов нитрата и сульфата в процессах анаэробного дыхания может быть использована в технологиях комплексной очистки окружающей среды от опасных загрязнителей.

Ключевые слова: сульфатвосстанавливающие бактерии, ионы бихромата, нитрата, сульфата.

УДК 579.[22+26+68+81]+
546.3

О. М. Мороз
С. О. Гнатуш
Х. І. Богославец
Т. М. Грицунь
Б. М. Борсукевич

канд. біол. наук, ст. наук. співр.
канд. біол. наук, проф.

*Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, м. Львів, Україна, 79005,
тел.: +38067-811-86-44, e-mail: moroz_oksana@yahoo.com*

ВПЛИВ КАЛІЙ БІХРОМАТУ НА ДИССИМІЛЯЦІЙНЕ ВІДНОВЛЕННЯ ІОНІВ СУЛЬФАТУ І НІТРАТУ БАКТЕРІЯМИ *DESULFOVIBRIO* SP.

Анотація. Досліджено вплив калій бихромату за наявності його в середовищі культивування на відновлення сульфат- та нитрат-іонів сульфатвідновлювальними бактеріями

Desulfovibrio desulfuricans IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 і *Desulfovibrio* sp. Yav-8, виділеними з озера Яворівське. Встановлено, що калій біхромат пригнічує ріст (у 2,2 і 1,3 разу) та рівень відновлення бактеріями йонів сульфату або нітрату (у 4,2 і 3,0 разу відповідно) за одночасного внесення в середовище культивування 1,74 мМ SO_4^{2-} або NO_3^- та 1,74 мМ $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, порівняно з ростом і рівнем відновлення йонів сульфату або нітрату в середовищі лише з SO_4^{2-} чи NO_3^- як єдиним акцептором електронів. Виявлено, що за умов культивування бактерій у присутності еквімолярної кількості сульфат- чи нітрат- і біхромат-йонів останні використовуються бактеріями швидше, вміст йонів хрому (III) впродовж усього часу культивування бактерій перевищував вміст H_2S чи NH_4^+ . Калій біхромат у середовищі більш негативно впливав на дисиміляційне відновлення бактеріями йонів сульфату, ніж нітрату, оскільки рівень відновлення йонів нітрату клітинами в середовищі з NO_3^- та $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ у півтора разу перевищував рівень використання ними йонів сульфату в середовищі з SO_4^{2-} та $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$. Здатність бактерій *Desulfovibrio* sp. до першочергового використання йонів біхромату, а за їх вичерпання – йонів нітрату і сульфату в процесах анаеробного дихання може бути використана в технологіях комплексного очищення доквілля від небезпечних забруднювачів.

Ключові слова: сульфатвідновлювальні бактерії, йони біхромату, нітрату, сульфату.

ВСТУП

Факультативно анаеробні бактерії окиснюють органічні субстрати або молекулярний водень з використанням різних акцепторів електронів. Дисиміляційне відновлення йонів сульфату до сульфідів у сульфатвідновлювальних бактерій відбувається в цитоплазмі з утворенням аденозин-5'-фосфосульфату (АФС) як проміжного продукту. Етапи сульфатредукції каталізуються АТФ-сульфурилазою, АФС-редуктазою, низкою сульфитредуктаз (Lengeler et al., 2005). Нітрати, нітрити та інші окиснені сполуки нітрогену можуть відновлювати мікроорганізми, які синтезують нітрат- і нітритредуктазу (Lengeler et al., 2005). Нітратредуктаза Nar GH1 є ферментним комплексом, до складу якого входять мультигемовий цитохром типу *b*, білки з Fe-S-кластерами і Мо-вмісний кофактор (Morozkina and Zvyagilskaya, 2007; Kozlova et al., 2008). Описано нітратредукцію з утворенням нітриту і подальшим відновленням його комплексом периплазматичних дисиміляційних нітритредуктаз до NH_4^+ у *Desulfovibrio desulfuricans* та *Wolinella succinogenes* (Bokranz et al., 1983; Peretyatko and Gudz, 2011; Moroz, 2013). Мембранозв'язані металоредуктази (тетра- і декагемові цитохроми типу *c*) у *Shevanella frigidimarina* локалізовані між внутрішньою і зовнішньою мембранами та в периплазмі, через які електрони з цитоплазми від реакцій метаболізму сполук карбону передаються назовні клітини, де, власне, і відновлюються катіони чи кисневмісні аніони металів або радіонукліди (Lengeler et al., 2005; Lovley, 2006; Richter et al., 2012; Fitzgerald et al., 2013).

Промислові стоки, кислі дренажні води сміттєзвалищ і шахт, затоплені кар'єри родовищ сірки (озеро Яворівське) містять, окрім токсичних сульфур- і нітрогеновмісних сполук, йони металів, зокрема хрому. Хоча хром є одним із найпоширеніших елементів земної кори ($100\text{--}300 \text{ мг}\times\text{г}^{-1}$) (Viti et al., 2014), його нагромадження в біосфері в основному є результатом антропогенної діяльності. Cr (VI) (у складі хроматів і біхроматів) – розчинний, дуже токсичний для живих організмів, мутагенний і канцерогенний для людини (Gibb et al., 2000). Для виживання в забрудненому Cr (VI) доквіллі мікроорганізми мають різні механізми стійкості, такі як видалення йонів хромату з цитоплазми або позаклітинне відновлення Cr (VI) до Cr (III) (Morais et al., 2011; Belchik et al., 2011; Caballero-Flores et al., 2012; Viti et al., 2014). Незважаючи на те, що ріст мікроорганізмів стимулюють низькі концентрації хроматів в середовищі, їх наявність сильно модифікує експресію генів, продукти яких задіяні в метаболізмі бактерій (транспорті і перетворенні вуглеводів, амінокислот, утворенні і використанні енергії у формі АТФ тощо), спричиняючи інгібування нагромадження біомаси (Henne et al., 2009; Monsieurs et al., 2011).

Сульфатвідновлювальні бактерії (*Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobacterium*, *Desulfocapsa*, *Desulfofrigus*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfobacter* і ін.), які здатні до відновної трансформації полютантів різної природи, використовують у технологіях очищення вод, забруднених сполуками карбону, сульфуру, нітрогену та металів, біологічними методами (Lovley, 2006; Frank and Lushnikov, 2006; Kozlova et al., 2008; Viti et al., 2014). Гідроген сульфід, утворений ними, осаджує важкі метали у формі нерозчинних сульфідів (Gudz et al., 2011). Метали із змінною валентністю (Cr (VI), Fe (III), Mn (IV), U (VI) Tc (VII), Pd (II), V (V), Mo (VI), Cu (II) тощо) можуть бути використані цими мікроорганізмами як акцептори електронів у процесі анаеробного дихання, незважаючи на їх токсичність за високих концентрацій (Tebo and Obratzsova, 1998; Moroz et al., 2016). Оскільки за впливу сполук металів спостерігається сповільнення метаболізму бактерій, відбір виділених із техногенно змінених екоотопів резистентних до забруднень штамів, здатних перетворювати сполуки різної природи, є особливо актуальним завданням для створення біотехнологій очищення (Frank and Lushnikov, 2006). Тому метою роботи було вивчити вплив калій бихромату за наявності його в середовищі культивування на відновлення сульфат- та нітрат-йонів сульфатвідновлювальними бактеріями *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 і *Desulfovibrio* sp. Yav-8, виділеними з водойми кар'єру Яворівського сіркового родовища, для оцінки ефективності можливого використання цих бактерій у технологіях комплексного очищення доквілля від небезпечних забруднювачів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-8 виділені з озера Яворівське, ідентифіковані і зберігаються в колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології ЛНУ імені Івана Франка (Peretyatko et al., 2009; Moroz, 2010).

Бактерії вирощували упродовж 10 діб у модифікованому середовищі Кравцова-Сорокіна (Gudz et al., 2014) без SO_4^{2-} і без $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ такого складу (г/л): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,84; K_2HPO_4 – 0,5; NH_4Cl – 0,16; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; натрій лактат ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$) – 2,0 за анаеробних умов, температури 30°C 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 NaOH . Бактерії висівали в середовище до початкової концентрації клітин 0,1 г/л або близько 10^8 КУО/мл.

Розчини $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$, Na_2SO_4 , NaNO_3 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ стерилізували окремо й вносили в середовище перед засівом клітин. Для вивчення впливу калій бихромату на використання бактеріями йонів сульфату або нітрату клітини, попередньо вирощені в середовищі з фумаратом (3,47 мМ) до середини експотенційної фази росту, висівали в середовище з $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$ або NaNO_3 та $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ за їх концентрацій 1,74 мМ для отримання сумарного вмісту акцепторів електронів у середовищі 3,47 мМ (концентрація SO_4^{2-} у середовищі стандартного складу). Клітини також висівали в середовища з 3,47 мМ $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 або $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ для перевірки їх росту в середовищах з SO_4^{2-} , NO_3^- або $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ як єдиним акцептором електронів (контроль). До середовищ з NaNO_3 та $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ або без не додавали NH_4Cl . У середовища з $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ та/або NaNO_3 вносили сульфурвмісну амінокислоту цистеїн (0,2 г/л) для задоволення асиміляційних потреб бактерій у сульфурі (Lengeler et al., 2005). На 2-, 4-, 6-, 8- та 10-ту добу росту визначали біомасу, вміст йонів сульфату або нітрату, бихромату, хрому (III), гідроген сульфідів або йонів амонію в культуральній рідині.

Біомасу визначали турбідиметричним методом за мутністю суспензії клітин шляхом її вимірювання на фотоелектроколометрі КФК-3 при довжині хвилі 340 нм у кюветі з оптичним шляхом 3 мм і розраховували за формулою: $S, \text{ г/л} = (E_{340} \cdot n) / 0,19$, де E_{340} – екстинкція ($\lambda=340$ нм); n – фактор розведення; 0,19 – коефіцієнт перерахунку, отриманий за калібрувальною кривою залежності екстинкції

від сухої маси клітин (Gudz et al., 2014). Концентрацію гідроген сульфід у культуральній рідині, відокремленій від клітин центрифугуванням (6 тис. об./хв, 15 хв), визначали спектрофотометрично за утворенням метиленової сині (Gudz et al., 2014). У культуральній рідині визначали також концентрації сульфат-йонів турбідиметричним методом за утворенням бар'їв сульфату після їх осадження бар'їв хлоридом, йонів нітрату за реакцією з реактивом Грісса (N-(1-нафтил)етилендіамін, сульфанілова і оцтова кислоти), біхромату за взаємодією з дифенілкарбазидом, хрому (III) за реакцією з хромазуолом S та йонів амонію колориметричним методом за утворенням індофенолу (Gudz et al., 2014).

Досліди повторювали тричі з трьома паралельними постановками для кожного варіанту експериментальних та контрольних умов. Отримані дані опрацьовували з використанням програми Microsoft Excel 2010. Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обраховували коефіцієнт Стьюдента t . Достовірною вважалася різниця при рівні значимості $p \leq 0,05$ (Lakyn, 1990).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У природних умовах, де переважно є кілька можливих акцепторів електронів анаеробного дихання, бактерії в першу чергу відновлюють ті, стандартний окисно-відновний потенціал яких вищий. Послідовність відновлення акцепторів електронів мікроорганізмами за їх одночасної наявності в середовищі з'ясована недостатньо. У різних мікроорганізмів вона детермінована генетично і контролюється складними регуляторними механізмами (Lengeler et al., 2005). Раніше нами було показано, що сульфатвідновлювальні бактерії роду *Desulfovibrio* окрім йонів сульфату чи нітрату можуть використовувати окиснені форми важких металів зі змінною валентністю, зокрема, йони біхромату як кінцеві акцептори електронів (Moroz, 2013; Moroz et al., 2016). Відновлення йонів металів мембранозв'язаними металоредуктазами є одним із механізмів захисту цих бактерій від їх токсичної дії і здійснюється поза клітиною, що супроводжується вивільненням у середовище значної кількості електронів (Richter et al., 2012). Для оцінки ефективності можливого застосування виділених нами з озера Яворівське бактерій *Desulfovibrio* sp. у технологіях очищення доквілля від сполук металів, сульфур та нітрогену доцільно було дослідити закономірності відновлення ними сульфат- або нітрат-йонів за одночасної наявності в середовищі іншого акцептора електронів – йонів біхромату.

За внесення в середовище культивування 1,74 мМ $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$ та 1,74 мМ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ спостерігалось пригнічення росту бактерій, порівняно з ростом у середовищах, у яких були наявні лише натрій сульфат або калій біхромат (рис. 1, табл. 1). Біомаса бактерій *D. desulfuricans* ІМБ К-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 і *Desulfovibrio* sp. Yav-8 після 10 діб росту в середовищі з SO_4^{2-} (2,72–2,85 г/л) виявилася майже вдвічі вищою, ніж у середовищі з $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (1,39–1,49 г/л). Біомаса бактерій, вирощених упродовж цього ж часу в середовищі з йонами сульфату та біхромату, не перевищувала 1,26–1,33 г/л і була у 2,1–2,2 разу нижчою, ніж при використанні бактеріями лише йонів сульфату, і в 1,1 разу нижчою, ніж при використанні бактеріями лише йонів біхромату.

Відомо, що транспорт йонів біхромату в клітину відбувається за участю транспортної системи йонів сульфату (Ramirez-Diaz et al., 2008; Viti et al., 2014). Можна припустити, що саме конкуренція за транспортну систему є причиною зниження рівня використання йонів сульфату клітинами в середовищі з йонами сульфату та біхромату (який не перевищував 22,4–25,3 %), порівняно з рівнем їх відновлення в середовищі лише з йонами сульфату як єдиним акцептором електронів (який становив 93,7–96,0 %) (табл. 1). У середовищі з йонами сульфату та біхромату клітини утворювали лише 0,38–0,46 мМ гідроген сульфід. Рівень використання йонів біхромату клітинами в середовищі з йонами сульфату та біхромату (який становив 47,1–48,3 %) виявився нижчим, ніж рівень їх відновлення в середовищі

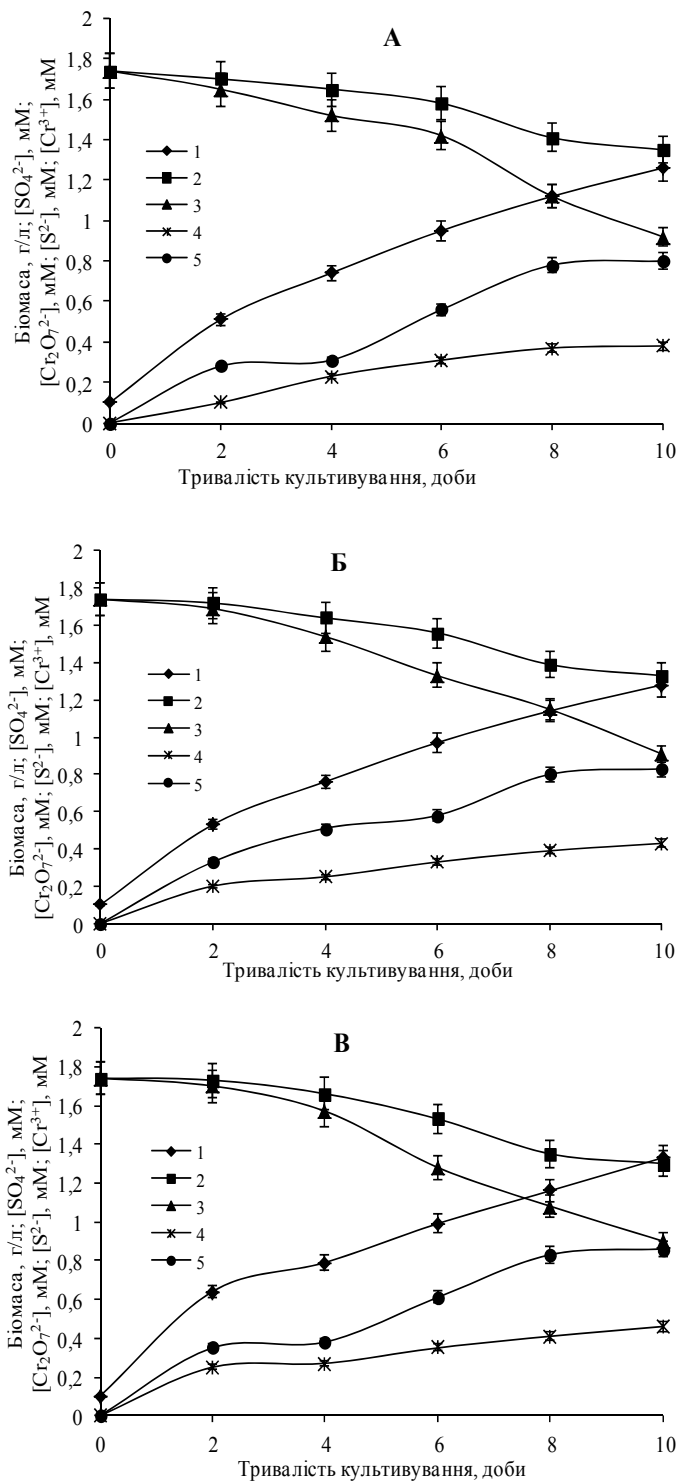


Рис. 1. Нагромадження біомаси, вміст іонів сульфату, біхромату, хрому (III) та гідроген сульфід у культуральній рідині під час росту *D. desulfuricans* IMB K-6 (A), *Desulfovibrio* sp. Yav-6 (Б) та *Desulfovibrio* sp. Yav-8 (В) у середовищі з 1,74 мМ SO_4^{2-} та 1,74 мМ $Cr_2O_7^{2-}$: 1 – біомаса; 2 – сульфат-іони; 3 – біхромат-іони; 4 – гідроген сульфід; 5 – іони хрому (III)

лише з йонами біхромату як єдиним акцептором електронів (який становив усього 53,3–56,5 % у зв'язку з токсичністю $K_2Cr_2O_7$ для клітин за концентрації 3,47 мМ), але перевищував рівень використання бактеріями йонів сульфату у 1,9–2,1 разу. У середовищі з йонами сульфату та біхромату клітини утворювали 0,80–0,86 мМ йонів хрому (III). Незважаючи на те, що в середовищі з SO_4^{2-} та $Cr_2O_7^{2-}$ гідроген сульфід, утворений бактеріями в процесі сульфатредукції, підсилює хроматредукцію внаслідок його взаємодії з йонами біхромату з утворенням хром-сульфур вмісного комплексу $\{H_2O_4Cr^{VI}S\}^{2-}$ та подальшим утворенням $Cr(OH)_3$ (Vainshtein et al., 2003), послідовність відновлення йонів сульфату та біхромату в основному визначається електрохімічними закономірностями: у першу чергу відновлюється акцептор електронів з вищим стандартним окисно-відновним потенціалом, тобто $Cr_2O_7^{2-}$ (окисно-відновний потенціал у пари $Cr_2O_7^{2-}/Cr^{3+}$ ($E_0' = +1,33$ В) значно вищий, ніж у пари HSO_3^- (утворюється внаслідок відновлення SO_4^{2-})/ HS^- ($E_0' = -0,12$ В)) (Lengeler et al., 2005). За наявності в середовищі одночасно йонів і сульфату, і біхромату, можливо, зростає рівень проникнення в клітину йонів біхромату, де відбувається їх взаємодія з внутрішньоклітинними відновниками (амінокислотами, нуклеотидами, цукрами, органічними кислотами, глутатионом, флавоензимами, вітамінами), утворення хімічно активних інтермедіатів Cr (V) і/або Cr (IV), активних радикалів кисню і йонів хрому (III), що призводить до інгібування біосинтетичних та енергетичних процесів у клітині (Viti et al., 2014). За наявності в середовищі лише йонів біхромату як єдиного акцептора електронів їх відновлення, очевидно, здійснюється переважно або в більшій мірі поза клітиною дією металоредуктаз, зв'язаних з мембранами (що є важливим механізмом захисту бактерій від токсичної дії Cr (VI)), про що свідчить вища біомаса, нагромаджена бактеріями всіх штамів у середовищі з $Cr_2O_7^{2-}$, порівняно з середовищем, яке містило йони сульфату та біхромату.

Таблиця 1

Використання SO_4^{2-} і $Cr_2O_7^{2-}$ сульфатвідновлювальними бактеріями після 10 діб росту в середовищах з натрій сульфатом та/або калій біхроматом*

Штам	Акцептор електронів анаеробного дихання	Залишковий вміст у культуральній рідині		Рівень відновлення		Біомаса, г/л
		$[SO_4^{2-}]$, мМ	$[Cr_2O_7^{2-}]$, мМ	$[SO_4^{2-}]$, %	$[Cr_2O_7^{2-}]$, %	
<i>D. desulfuricans</i> IMB K-6	SO_4^{2-}	0,22±0,04	0	93,7	0	2,72±0,04
	SO_4^{2-} і $Cr_2O_7^{2-}$	1,35±0,07	0,92±0,03	22,4	47,1	1,26±0,03
	$Cr_2O_7^{2-}$ **	0	1,62±0,04	0	53,3	1,39±0,03
<i>Desulfovibrio</i> sp. Yav-6	SO_4^{2-}	0,19±0,03	0	94,5	0	2,79±0,02
	SO_4^{2-} і $Cr_2O_7^{2-}$	1,33±0,04	0,91±0,03	23,6	47,7	1,28±0,06
	$Cr_2O_7^{2-}$ **	0	1,58±0,06	0	54,5	1,45±0,03
<i>Desulfovibrio</i> sp. Yav-8	SO_4^{2-}	0,14±0,02	0	96,0	0	2,85±0,07
	SO_4^{2-} і $Cr_2O_7^{2-}$	1,30±0,05	0,90±0,05	25,3	48,3	1,33±0,06
	$Cr_2O_7^{2-}$ **	0	1,51±0,04	0	56,5	1,49±0,04

* Вихідна концентрація SO_4^{2-} або $Cr_2O_7^{2-}$ у середовищі – 3,47 мМ, за наявності у середовищі SO_4^{2-} і $Cr_2O_7^{2-}$ – 1,74 мМ.

** До середовища з йонами біхромату вносили цистеїн (0,2 г/л).

Отже, встановлено, що калій біхромат пригнічує ріст (у 2,1–2,2 разу) і рівень відновлення йонів сульфату (у 3,8–4,2 разу) бактеріями роду *Desulfovibrio* за одночасного внесення в середовище культивування 1,74 мМ SO_4^{2-} та $Cr_2O_7^{2-}$, порівняно з ростом і рівнем відновлення йонів сульфату в середовищі лише з SO_4^{2-} як єдиним акцептором електронів. За умов культивування бактерій у присутності еквімолярної кількості сульфат- і біхромат-йонів останні використовуються бактеріями практично вдвічі швидше.

За одночасного внесення в середовище культивування 1,74 мМ NaNO₃ та 1,74 мМ K₂Cr₂O₇ спостерігалось пригнічення росту бактерій, порівняно з ростом у середовищі лише з натрій нітратом. У середовищі з йонами нітрату і біхромату біомаса була вищою, ніж лише з калій біхроматом (рис. 2, табл. 2). Біомаса бактерій *D. desulfuricans* IMB K-6, *Desulfovibrio* sp. Yav-6 і *Desulfovibrio* sp. Yav-8 після 10 діб росту в середовищі з NO₃⁻ (1,81–2,04 г/л) виявилася майже в півтора разу вищою, ніж у середовищі з Cr₂O₇²⁻ (1,39–1,49 г/л). Біомаса бактерій, вирощених упродовж 10 діб у середовищі з йонами нітрату та біхромату, не перевищувала 1,51–1,58 г/л і була в 1,2–1,3 разу нижчою, ніж при використанні бактеріями лише йонів нітрату, але в 1,1 разу вищою, ніж при використанні бактеріями лише йонів біхромату.

Таблиця 2

Використання NO₃⁻ і Cr₂O₇²⁻ сульфатвідновлювальними бактеріями після 10 діб росту в середовищі з цистеїном, натрій нітратом та/або калій біхроматом*

Штам	Акцептор електронів анаеробного дихання	Залишковий вміст у культуральній рідині		Рівень відновлення		Біомаса, г/л
		[NO ₃ ⁻], мМ	[Cr ₂ O ₇ ²⁻], мМ	[NO ₃ ⁻], %	[Cr ₂ O ₇ ²⁻], %	
<i>D. desulfuricans</i> IMB K-6	NO ₃ ⁻ **	0,09±0,01	0	97,4	0	1,81±0,02
	NO ₃ ⁻ і Cr ₂ O ₇ ²⁻ **	1,18±0,02	0,89±0,05	32,2	48,9	1,51±0,04
	Cr ₂ O ₇ ²⁻	0	1,62±0,04	0	53,3	1,39±0,03
<i>Desulfovibrio</i> sp. Yav-6	NO ₃ ⁻ **	0,06±0,01	0	98,2	0	1,92±0,02
	NO ₃ ⁻ і Cr ₂ O ₇ ²⁻ **	1,16±0,02	0,84±0,02	33,3	51,7	1,56±0,05
	Cr ₂ O ₇ ²⁻	0	1,58±0,06	0	54,5	1,45±0,03
<i>Desulfovibrio</i> sp. Yav-8	NO ₃ ⁻ **	0,03±0,01	0	99,1	0	2,04±0,05
	NO ₃ ⁻ і Cr ₂ O ₇ ²⁻ **	1,10±0,01	0,82±0,04	36,8	52,9	1,58±0,04
	Cr ₂ O ₇ ²⁻	0	1,51±0,04	0	56,5	1,49±0,04

* Вихідна концентрація NO₃⁻ або Cr₂O₇²⁻ у середовищі – 3,47 мМ, за наявності у середовищі NO₃⁻ і Cr₂O₇²⁻ – 1,74 мМ.

** До середовищ з NO₃⁻ і Cr₂O₇²⁻ або без не додавали NH₄Cl.

Можливо, що йони біхромату негативно впливають на активність молібденовмісної мембранозв'язаної дисиміляційної нітратредуктази та комплексу периплазматичних дисиміляційних нітритредуктаз у бактерій роду *Desulfovibrio* (Morozkina and Zvyagil'skaya, 2007; Kozlova et al., 2008) внаслідок модифікації активної конформації чи денатурації білкових молекул або в результаті можливого пошкодження структури цитоплазматичної мембрани (що може бути причиною блокування транспорту йонів нітрату всередину і швидкого винесення токсичного нітриту за межі клітини), оскільки спостерігали зниження рівня використання йонів нітрату клітинами в середовищі з йонами нітрату та біхромату (який не перевищував 32,2–36,8 %), порівняно з рівнем їх відновлення в середовищі лише з йонами нітрату як єдиним акцептором електронів (який становив 97,4–99,1 %) (табл. 2). У середовищі з йонами нітрату та біхромату клітини утворювали лише 0,51–0,61 мМ йонів амонію. Рівень використання йонів біхромату клітинами в середовищі з йонами нітрату та біхромату (який становив 48,9–52,9 %) виявився нижчим, ніж рівень їх відновлення в середовищі лише з йонами біхромату як єдиним акцептором електронів (який становив 53,3–56,5 %), але перевищував рівень використання бактеріями йонів нітрату у 1,4–1,5 разу. У середовищі з йонами нітрату та біхромату клітини утворювали 0,84–0,91 мМ йонів хрому (III). Оскільки окисно-відновний потенціал у пари Cr₂O₇²⁻/Cr³⁺ (E₀' = +1,33 В) значно вищий, ніж у пари NO₂⁻ (утворюється внаслідок відновлення NO₃⁻)/NH₄⁺ (E₀' = +0,34 В) (Lengeler et al., 2005), у середовищі з йонами нітрату та біхромату бактерії спочатку відновлювали йони біхромату, потім – нітрату, тому рівень використання йонів біхромату клітинами всіх штамів перевищував рівень використання йонів нітрату майже в півтора разу.

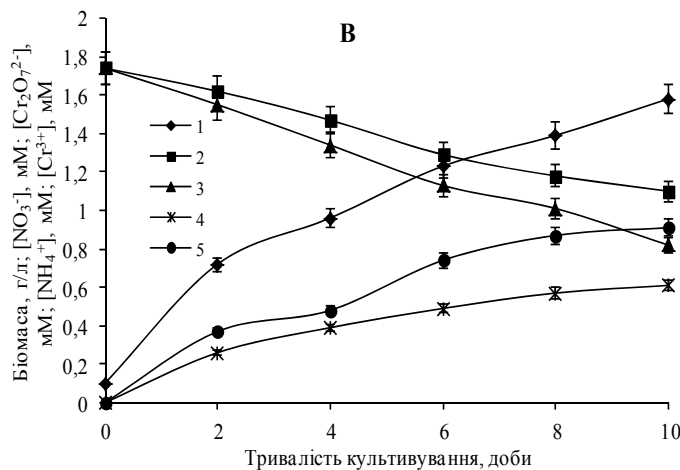
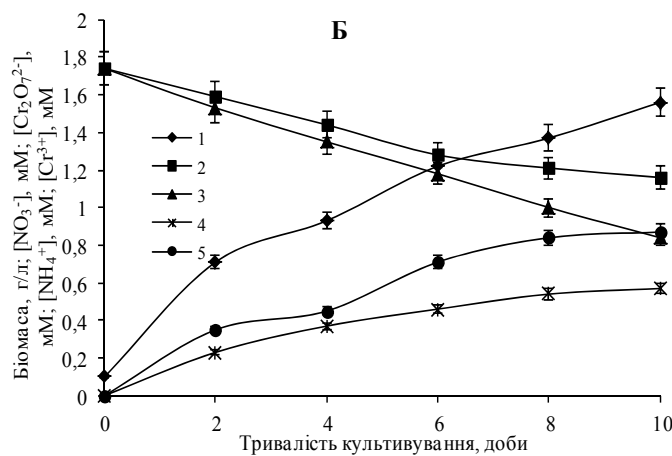
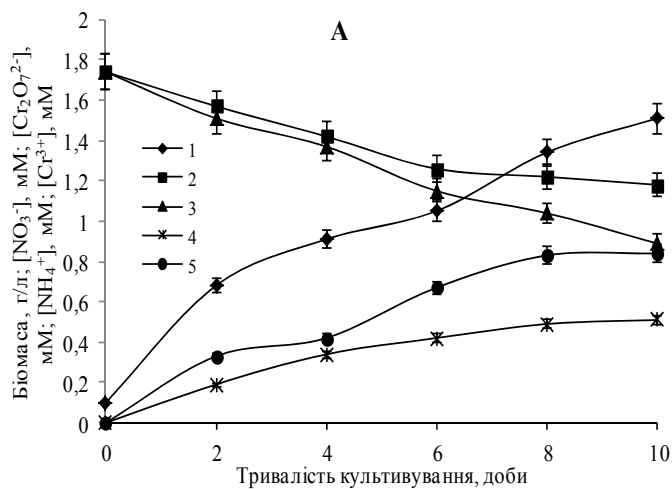


Рис. 2. Нагромадження біомаси, вміст іонів нітрату, біхромату, амонію та хрому (III) у культуральній рідині під час росту *D. desulfuricans* IMB K-6 (А), *Desulfovibrio* sp. Yav-6 (Б) та *Desulfovibrio* sp. Yav-8 (В) у середовищі з 1,74 mM NO₃⁻ та 1,74 mM Cr₂O₇²⁻: 1 – біомаса; 2 – нітрат-іони; 3 – біхромат-іони; 4 – іони амонію; 5 – іони хрому (III)

Можливо, що за наявності в середовищі одночасно йонів нітрату і біхромату, йони біхромату в більшій мірі відновлюються в цитоплазмі клітин бактерій, інгібуючи їх метаболізм, ніж за наявності в середовищі лише йонів біхромату як єдиного акцептора електронів, де вони відновлюються переважно поза клітиною, про що свідчить кращий ріст бактерій усіх штамів у середовищі з $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, порівняно з середовищем, яке містило йони нітрату та біхромату.

Отже, встановлено, що калій біхромат пригнічує ріст (у 1,2–1,3 разу) і відновлення йонів нітрату (у 2,7–3,0 разу) бактеріями роду *Desulfovibrio* за одночасного внесення в середовище культивування 1,74 мМ NO_3^- та $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, порівняно з ростом і рівнем відновлення йонів нітрату в середовищі лише з NO_3^- як єдиним акцептором електронів. За умов культивування бактерій у присутності еквімолярної кількості нітрат- і біхромат-йонів останні використовуються бактеріями майже в півтора разу швидше.

Штам *Desulfovibrio* sp. Yav-8, який виявився здатним утворювати найбільші кількості H_2S та NH_4^+ , порівняно зі штамми *D. desulfuricans* IMB K-6 та *Desulfovibrio* sp. Yav-6 у процесі сульфат- і нітратредукції відповідно, був найбільш стійким до негативного впливу йонів біхромату. За умов культивування бактерій у присутності еквімолярної кількості SO_4^{2-} або NO_3^- та $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ першими використовувалися йони біхромату, вміст йонів хрому (III) впродовж усього часу культивування бактерій перевищував вміст H_2S чи NH_4^+ . Подібно до бактерій роду *Desulfovibrio*, за наявності у середовищі культивування 0,5 мМ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ відновлення 5 мМ йонів сульфату або нітрату хроматорезистентними сульфатвідновлювальними бактеріями *Desulfomicrobium* sp. CrR3 теж пригнічується (Sholiak et al., 2013). Калій біхромат здійснював більш негативний вплив на дисиміляційне відновлення йонів сульфату, ніж на відновлення (або амоніфікацію) йонів нітрату *Desulfovibrio* sp., оскільки рівень відновлення йонів нітрату клітинами в середовищі з йонами нітрату та біхромату перевищував рівень використання ними йонів сульфату в середовищі з йонами сульфату та біхромату в півтора разу, можливо, у зв'язку зі значно вищим окисно-відновним потенціалом NO_3^- як акцептора електронів анаеробного дихання, ніж SO_4^{2-} .

Виділені нами з водойми кар'єру Яворівського сіркового родовища сульфатвідновлювальні бактерії роду *Desulfovibrio* перспективні для використання в технологіях комплексного очищення довкілля від йонів біхромату, сульфату і нітрату. Досліджувані мікроорганізми спочатку використовують йони біхромату, а за їх вичерпання – йони нітрату і сульфату в процесах анаеробного дихання, тим самим очищуючи середовище від цих забруднювачів як за наявності кожного з них окремо, так і за присутності кількох одночасно. Здатність бактерій до детоксикації поллютантів різної природи може бути використана в процесах очищення стічних вод, забруднених йонами біхромату, від агресивних для довкілля сполук сульфурію та нітрогену.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що калій біхромат пригнічує ріст і відновлення йонів сульфату або нітрату бактеріями *Desulfovibrio* sp. за одночасної наявності в середовищі 1,74 мМ SO_4^{2-} або NO_3^- та $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$.

2. Інгібуюча дія калій біхромату виявилася більшою на сульфат-, ніж на нітратредукцію.

3. За умов одночасного внесення SO_4^{2-} або NO_3^- та $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ у середовище культивування бактерій першими використовувалися йони біхромату.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ / REFERENCES

- Belchik, S. M., Kennedy, D. W., Dohnalkova, A. C., Wang, Y. M., Sevinc, P. C., Wu, H., Lin, Y. H., Lu, H. P., Fredrickson, J. K., Shi, L., 2011. Extracellular reduction of hexavalent chromium by cytochromes MtrC and OmcA of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4035–4041.

- Bokranz, M. J., Katz, J., Schröder, I., Robertson, A. M., Kröger, A., 1983. Energy metabolism and biosynthesis of *Vibrio succinogenes* growing with nitrate or nitrite as terminal electron acceptor. Arch. Microbiol. 135, 36–41.
- Caballero-Flores, G. G., Costa-Navarrete, Y. M., Ramirez-Diaz, M. I., Silva-Sanchez, J., Cervantes, C., 2012. Chromate-resistance genes in plasmids from antibiotic-resistant nosocomial enterobacterial isolates. FEMS Microbiol. Lett. 327, 148–154.
- Fitzgerald, L. A., Petersen, E. R., Leary, D. H., Nadeaud, L. J., Sotoe, C. M., Rayf, R. I., Littlef, B. J., Ringeisen, B. R., Johnson, G. R., Vorae, G. J., Biffingera, J. C., 2013. *Shewanella frigidimarina* microbial fuel cells and the influence of divalent cations on current output. Biosens. & Bioel. 40 (1), 102–109.
- Frank Yu. A., Lushnikov S. V., 2006. Biotehnologicheskij potencial sul'fatoreducirujushchih bakterij [Biotechnological potential of sulfate reducing bacteria]. Ekol. i promyshl. 1, 10–13 (in Russian).
- Gibb, H. J., Lees, P. S. J., Pinsky, P. F., Rooney, B. C., 2000. Lung cancer among workers in chromium chemical production. Am. J. Ind. Med. 38, 115–126.
- Gudz, S. P., Hnatysh, S. O., Yavorska, G. V., Bilinska, I. S., Borsukevych, B. M., 2014. Praktikum z mikrobiologii: pidruchnyk [Workshop on microbiology: textbook]. Lviv. Nac. Univ. imeni Ivana Franka. Ser. Biol. Stud., Lviv (in Ukrainian).
- Gudz, S. P., Peretyatko, T. B., Moroz, O. M., Hnatysh, S. O., Klym, I. R., 2011. Rehulyuvannya rivnya sul'fativ, sirkovodnyu ta vazhkykh metaliv u tekhnohennykh vodoymakh sulfatvidnovljuval'nymy bakterijamy [Regulation of sulfates, hydrogen sulfide and hard metals level in technogenic reservoirs by sulfate reducing bacteria]. Mikrobiol. zhurn. 73 (2), 33–38 (in Ukrainian).
- Henne, K. L., Turse, J. E., Nicora, C. D., Lipton, M. S., Tollaksen, S. L., Lindberg, C., Babnigg, G., Giometti, C. S., Nakatsu, C. H., Thompson, D. K., Konopka, A. E., 2009. Global proteomic analysis of the chromate response in *Arthrobacter* sp. strain FB24. J. Prot. Res. 8, 1704–1716.
- Kozlova, I. P., Radchenko, O. S., Stepura, L. G., Kondratiuk, T. O., Pilyashenko-Novochatnyi, A. I., 2008. Geohimichna dijal'nist' mikroorganizmiv ta ii prikladni aspekti: Navchal'nij posibnik [Geochemical activity of microorganisms and its practical aspects: textbook]. Naukova dumka, Kyjiv (in Ukrainian).
- Lakyn, G. F., 1990. Biometrija [Biometrics]. Vyssha shkola, Moscow (in Russian).
- Lengeler, J., Dreves, G., Schlegel, G., 2005. Sovremennaja mikrobiologija: Prokaryoty [Modern Microbiology: Prokaryotes]. Mir, Moscow (in Russian).
- Lovley, D., 2006. Dissimilatory Fe (III)- and Mn (IV)-reducing prokaryotes. The Prokaryotes. Springer-Verlag, LLC, New York.
- Monsieurs, P., Moors, H., Van Houdt, R., Janssen, P. J., Janssen, A., Coninx, I., Mergeay, M., Leys, N., 2011. Heavy metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34 is governed by an intricate transcriptional network. Biometals. 24, 1133–1151.
- Morais, P. V., Branco, R., Francisco, R., 2011. Chromium resistance strategies and toxicity: what makes *Ochrobactrum tritici* 5bv11 a strain highly resistant. Biometals. 24, 401–410.
- Morozkina, E. V., Zvyagil'skaya, R. A. 2007. Nitrate reductases: structure, functions, and effect of stress factors. Biochemistry (Moscow). 72 (10), 1151–1161.
- Moroz, O. M., 2013. Vpliv solej metaliv na vidnovlennja nitrativ sul'fatvidnovljuval'nimi bakterijami [Metal salts influence on nitrates reduction by sulfate reducing bacteria]. Studia biologica. 7 (2), 47–56 (in Ukrainian).
- Moroz, O. M., 2010. Zakonomirnosti utvorennja sirkovodnju sul'fatvidnovljuval'nimi bakterijami vodojmi kar'eru Javorivs'kogo sirkovogo rodovishha [Regularities of hydrogen sulfide production by sulfate reducing bacteria from water of Yavoriv sulfur deposit open pit]. Nauk. Visn. Uzhgorod. Univ. Ser. Biol. 27, 56–63 (in Ukrainian).
- Moroz, O., Hnatysh, S., Bohoslavets, Ch., Yavorska, G., Borsukevych, B., 2016. Vidnovlennja sul'fat-, nitrat- i nitrit-joniv bakterijami rodu *Desulfovibrio* za vplivu spoluk ferumu (III), hromu (VI) ta manganu (IV) [Sulfate, nitrate and nitrite ions reduction by bacteria of *Desulfovibrio* genus upon the influence of ferrum (III), chrome (VI) and manganese (IV) compounds]. Visn.Lviv. Univ. Ser. Biol. 71, 190–205 (in Ukrainian).
- Peretyatko, T. B., Gudz, S. P., 2011. Zdatnist' sul'fatvidnovljuval'nih bakterij *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 i *Desulfobacter* sp. vikoristovuvati nitrat jak akceptor elektroniv [The ability of sulfate

- reducing bacteria *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 and *Desulfobacter* sp. to use nitrate as electron acceptor]. *Studia biologica*. 5 (2), 51–60 (in Ukrainian).
- Peretyatko, T. B., Halushka, A. A., Gudz, S. P., Hnatush, S. O., 2009. Svidotstvo pro deponuvannya shtamu bakteriy Ya-11 (*Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 i *Pseudomonas* sp.) u Depozytariyi Instytutu mikrobiolohiyi i virusolohiyi im. D. K. Zabolotnoho NAN Ukrayiny z nadannam reyestratsiynoho nomeru IMV K-6 [Certificate of deposition of bacteria Ya-11 (*Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 and *Pseudomonas* sp.) in the Depository of D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine with appropriation of registration number IMV K-6] (in Ukrainian).
- Ramirez-Diaz, M. I., Diaz-Perez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-Garcia, J., Cervantes, C., 2008. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals*. 21, 321–332.
- Richter, K., Schicklberger, M. and Gescher, J., 2012. Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (4), 913–921.
- Sholiak, K. V., Peretyatko, T. B., Verkholyak, N. S., Gudz, S. P., 2013. Viktoristannja sul'fatu i nitratu sul'fatvidnovljuval'nimi bakterijami *Desulfomicrobium* sp. CrR3 za najavnosti bihromatu v seredovishhi [Utilization of sulfate and nitrate by sulfate reducing bacteria *Desulfomicrobium* sp. CrR3 in the presence of bichromate in the medium]. *Studia biologica*. 7 (3), 153–160 (in Ukrainian).
- Tebo, B. M., Obratsova, A. Y., 1998. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr (VI), U (VI), Mn (IV), and Fe (III) as electron acceptors. *FEMS Microbiol. Lett.* 162, 193–198.
- Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., Giovannetti, L., 2014. Molecular mechanisms of Cr (VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 38 (4), 633–659.
- Vainshtein, M., Kusch, P., Mattusch, J. Vatsourina, A, Wiessner, A., 2003. Model experiments on the microbial removal of chromium from contaminated groundwater. *Water Res.* 37, 1401–1405.

Стаття надійшла в редакцію 20.02.2017