

УДК 579.222

© 2015

## ДИНАМІКА ВЗАЄМОДІЇ АСОЦІАЦІЇ СПОРОУТВОРЮВАЛЬНИХ ҐРУНТОВИХ МІКРООРГАНІЗМІВ З Fe(III)

*V.M. Говоруха*

*О.Б. Таширеєв,*  
доктор технічних наук

*Інститут  
мікробіології  
і вірусології  
ім. Д.К. Заболотного  
НАН України*

**Мета.** Дослідити динаміку взаємодії асоціації спороутворювальних ґрунтових мікроорганізмів зі сполуками Fe(III). **Методи.** Застосовано мікробіологічний, потенціометричний, колориметричний методи та газову хроматографію. **Результати.** Досліджено динаміку взаємодії асоціації спороутворювальних ґрунтових мікроорганізмів зі сполуками Fe(III). Установлено, що природне мікробне угруповання зберігає стабільність функціонування за внесення сполук Fe(III). Виявлено, що ефективність відновлення Fe(III) за 74 год становила 65%, а ефективність осадження — 35%. **Висновки.** Здатність асоціації взаємодіяти зі сполуками Fe свідчить про її істотну роль у біогеохімічних циклах трансформації Fe у природі. Оцінка ефективності взаємодії природної ґрунтової асоціації зі сполуками Fe створює підґрунтя для розробки ефективних біотехнологій очищення води від Fe, а також вилучення його сполук зі збіднених родовищ.

**Ключові слова:** термодинамічне прогнозування, біогеохімічні цикли трансформації Fe, асоціація спороутворювальних ґрунтових мікроорганізмів.

У земній корі сполуки Fe є найпоширенішими серед важких металів. Сполуки Fe(II) і Fe(III) входять до складу нерозчинних мінералів: гематиту ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), магнетиту ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), гетиту ( $\alpha\text{-FeO(OH)}$ ), лепідокриту ( $\gamma\text{-FeO(OH)}$ ), піриту ( $\text{FeS}_2$ ), сидериту ( $\text{FeCO}_3$ ) та ін. [2, 3]. У процесі їх деструкції Fe мобілізується та залучається до біологічного кругообігу [1]. Сполуки Fe є в усіх ґрунтах, морських і прісноводних екосистемах [7, 10, 11].

Термодинамічні розрахунки способів взаємодії мікроорганізмів зі сполуками Fe [8] свідчать, що мікробна трансформація сполук Fe(III) і Fe(II) має істотно впливати на перерозподіл векторних потоків вуглецю і Fe у природі.

**Мета роботи** — дослідити динаміку взаємодії асоціації спороутворювальних ґрунтових мікроорганізмів зі сполуками Fe(III).

Спорові мікроорганізми є дуже поширеними у ґрунті. Їхня життєдіяльність може істотно впливати на перерозподіл векторних потоків C (вуглецю) і Fe в екосистемах. Дослідження взаємодії асоціації спороутворювальних

ґрунтових мікроорганізмів зі сполуками Fe дає змогу оцінити їх вплив на біогеохімічні цикли трансформації Fe в природі.

Крім того, використання спороутворювальних мікроорганізмів під час дослідження взаємодії зі сполуками Fe є перспективним з погляду біотехнології. Переваги ґрунтової спороутворювальної асоціації мікроорганізмів: поширені в природі; простота і легкість отримання такої асоціації; можливість довготривалого зберігання; широкий спектр субстратів; висока швидкість їх зброджування та ін.

Саме тому асоціацію спороутворювальних ґрунтових мікроорганізмів було обрано як модельну для вивчення закономірностей взаємодії зі сполуками Fe [5].

Модельним субстратом була картопля, оскільки крохмаль є одним із найпоширеніших полімерів у природі [5, 12]. Його деструкція ґрунтовими мікроорганізмами створює умови для ефективного відновлення сполук Fe(III) до Fe(II).

**Матеріали і методи.** Об'єктами досліджень були спорові ґрунтові мікроорганізми,

сполуки Fe(III) і Fe(II), а також картопля як модельний субстрат (природний полімер).

Для отримання асоціації спороутворювальних ґрунтових мікроорганізмів 50 г нарізаної кубиками картоплі (довжина ребра 0,5–1 см) з ґрунтом вносили у флакон об'ємом 250 мл та заливали 120 мл водопровідної води. Для селекції спорових бактерій флакон кип'ятили на водяній бані протягом 10 хв під ватно-марлевою пробкою. Після охолодження флакон герметично закривали гумовою пробкою та металевим затискачем. Культивування проводили протягом 7 діб за температури 28°C. Про розвиток мікроорганізмів свідчили помутніння середовища, руйнування картоплі, активне піноутворення, зниження концентрації кисню, синтез водню та вуглекислого газу, зміна показників рН та Eh.

Для дослідження динаміки взаємодії бактерій зі сполуками Fe(III) використовували отриману асоціацію спороутворювальних ґрунтових мікроорганізмів. Культивування проводили у пластиковому культиваторі розміром 9×15×10 см, що герметично закривається. Культиватор обладнаний двома штуцерами: для відбору зразків газової фази та культуральної рідини. Стерилізували культиватор промиванням 35%-м розчином перекису водню. Нарізану картоплю (50 г) заливали 500 мл водопровідної води та кип'ятили у скляному флаконі під ватно-марлевою пробкою на водяній бані протягом 10 хв. Термічно оброблену картоплю та воду переносили у культиватор та додавали 2 мл культуральної рідини, що містила спороутворювальну ґрунтову асоціацію. Культивування проводили за 28°C. Через добу від його початку, після зниження редокс-потенціалу до негативних значень і початку синтезу водню до флакона додавали цитрат Fe(III) у концентрації 0,25 г/л за катіоном заліза.

Контролювали такі метаболічні показники: рН та Eh, концентрацію водню, Fe(III) та Fe(II). Показники рН та Eh вимірювали потенціометричним методом. Для визначення рН використовували рН-метр-мілівольтметр «рН-150 МА» з вимірювальним електродом ЕСК-10603/4. Редокс-потенціал вимірювали за допомогою рН-метра-мілівольтметра «рН-150 МА» та вимірювального електрода ЕПВ-1. Електрод порівняння — хлорсрібний електрод ЭВЛ-1МЗ.

Концентрацію водню визначали за стандартною методикою на газовому хроматографі ЛХМ-8-МД [4], обладнаному двома

сталевими колонками — одна (I) для аналізу  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $N_2$  і  $CH_4$ , друга (II) — для аналізу  $CO_2$ .

Параметри колонок: I —  $l=3$  м,  $d=3$  мм, з молекулярним ситом 13X (NaX); II —  $l=2$  м,  $d=3$  мм, з носієм Рогарак-Q; температура колонок — +60°C, випарювача — +75°C, детектора — +60°C, струм детектора — 50 мА. Газ-носієй — аргон, швидкість потоку газу — 30 см<sup>3</sup>/хв. Об'єм проб газу: на колонці I — 2,5 см<sup>3</sup>, II — 1 см<sup>3</sup>.

Уміст  $H_2$  у газовій суміші (%) розраховували за стандартною методикою за площею піків компонентів газової фази.

Концентрацію Fe(III) та Fe(II) визначали колориметричним методом [6]. Перед визначенням вмісту Fe 6 мл культуральної рідини центрифугували за 2655 г протягом 15 хв. Надосадову рідину зливали і використовували для визначення концентрації сполук Fe.

Визначення концентрації Fe(II) ґрунтується на утворенні забарвлених у червоний колір сполук Fe(II) з о-фенантроліном. Для вимірювання відбирали 1,5 мл надосадової рідини і додавали 0,75 мл 0,25%-го розчину о-фенантроліну. Про наявність Fe(II) свідчило з'явлення червоно-оранжевого забарвлення. Кількість Fe(II) визначали за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2МП за  $\lambda=490$  нм та довжини оптичного шляху 0,5 см.

Концентрацію Fe(III) виявляли за методом, заснованим на утворенні забарвлених у червоний колір сполук Fe(III) з роданідом калію у кислому середовищі. Для цього відбирали 1,5 мл надосадової рідини, додавали 0,25 мл 1,5 М розчину KSCN та 0,75 мл концентрованої HCl. Про наявність Fe(III) свідчило з'явлення червоного забарвлення. Кількість Fe(III) визначали за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2МП за  $\lambda=490$  нм та довжини оптичного шляху 1 см.

**Результати досліджень.** Динаміку взаємодії асоціації спороутворювальних ґрунтових мікроорганізмів зі сполуками Fe вивчали за концентрації катіону заліза 0,25 г/л.

Важливою характеристикою мікробної асоціації є здатність до збереження стабільного функціонування за внесення Fe(III) у високій концентрації.

На момент внесення Fe асоціація активно зброджувала картоплю (рис. 1). Про це свідчило зниження величин рН поживного середовища з 7 до 5, а Eh — з +380 до –120 мВ.

Через 10 хв після внесення Fe(III) редокс-потенціал культуральної рідини підвищувався з –120 до +20 мВ та протягом 2 год коливався

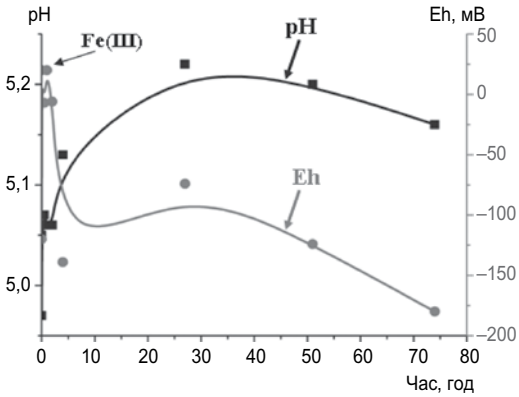


Рис. 1. Динаміка зміни показників pH та Eh у відповідь на внесення Fe(III)

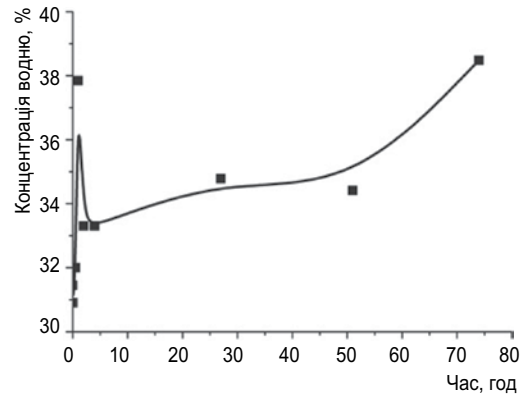


Рис. 2. Динаміка синтезу водню після внесення Fe(III)

в межах від  $-7$  до  $+20$  мВ. За наступні 2 год показник Eh різко знизився до  $-140$  мВ. У подальшому за 70 год редокс-потенціал знизився до  $-180$  мВ. Тобто за 4 год асоціація адаптувалася до внесеного Fe та відновила вихідні показники редокс-потенціалу.

Показник pH після внесення Fe(III) зріс з 5 до 5,1 та в подальшому залишався в межах 5,1–5,2.

Унесення Fe(III) не пригнічувало синтез водню асоціацією (рис. 2). Концентрація синтезованого водню на момент внесення заліза становила 31,5%. Через 1 год концентрація  $H_2$  зросла на 5%, а в подальшому залишалася у межах 33–35%. Через 74 год культивування кінцева концентрація водню становила 38,5%.

Отримані результати свідчать про здатність асоціації зберігати стабільність функціонування за внесення Fe(III) у концентрації 0,25 г/л. Швидкість відновлення вихідних показників метаболізму, зокрема Eh, дає підстави стверджувати, що досліджувана концентрація Fe(III) не є летальною для мікроорганізмів та може використовуватися для моделювання їх взаємодії зі сполуками Fe.

Низький редокс-потенціал, відсутність кисню та наявність водню в газовій фазі за термодинамічними розрахунками [8] мають сприяти швидкому та ефективному відновленню Fe(III) до Fe(II).

Відновлення Fe(III) до Fe(II) починалось одразу після внесення Fe (рис. 3). Вже через 10 хв відновилося 0,5% внесеного Fe(III). За 74 год ефективність відновлення Fe(III) мікроорганізмами становила 65 %.

Зниження концентрації Fe(III) та накопичення Fe(II) в культуральній рідині не

виникало у стехіометричному співвідношенні. Тому припустимо, що відновлення Fe(III) мікроорганізмами відбувалося неспецифічно завдяки накопиченню екзометаболітів-відновників, зниженню редокс-потенціалу, а також функціонуванню низькопотенційних редокс-ферментів, про що може свідчити активний синтез водню.

Кінцева сумарна концентрація розчинених сполук Fe(III) та Fe(II) становила 0,19 г/л. Решта сполук Fe могла бути іммобілізована мікроорганізмами у вигляді нерозчинних гідроксидів Fe або сорбована біомасою. Ефективність осадження сполук Fe(III) та Fe(II) становила 35%.

Висока ефективність неспецифічного відновлення Fe(III) до Fe(II) неадаптованою до Fe асоціацією споруутворювальних ґрунтових мікроорганізмів, ефективність осадження Fe, значне поширення таких мікробних

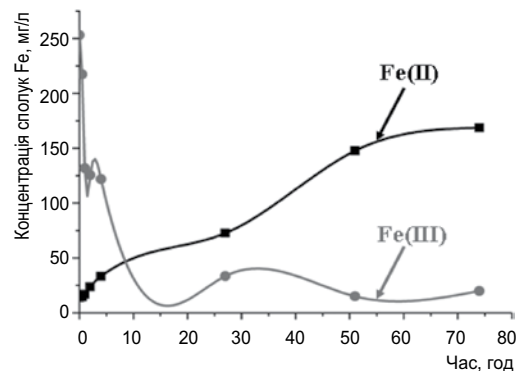


Рис. 3. Динаміка відновлення Fe(III) до Fe(II) споруутворювальною ґрунтовою асоціацією мікроорганізмів

угруповань у природі, а також поширення сполук Fe в екосистемах у концентраціях до кількох грамів на 1 кг ґрунту [9] свідчать, що такі мікроорганізми мають істотно впливати на перерозподіл векторних потоків вуглецю і заліза у природі.

Здатність асоціації спороутворювальних

ґрунтових мікроорганізмів швидко адаптуватись до підвищення концентрації Fe(III) та взаємодіяти з ним, відновлюючи або осаджуючи, створює підґрунтя для розробки ефективних біотехнологій очищення води від сполук Fe та підвищення ефективності вилучення його зі збіднених родовищ.

## **Висновки**

*Досліджено динаміку взаємодії асоціації спороутворювальних ґрунтових мікроорганізмів зі сполуками Fe. Встановлено здатність мікробного угруповання зберігати стабільність функціонування за внесення Fe(III) концентрацією 0,25 г/л і взаємодіяти зі сполуками Fe. Припускається, що така взаємодія асоціації зі сполуками Fe(III) та*

*Fe(II) може істотно впливати на біогеохімічні цикли трансформації Fe в природі. Отримані закономірності взаємодії спороутворювальної ґрунтової асоціації зі сполуками Fe можуть стати основою для розробки ефективних біотехнологій очистки води від Fe(III) і Fe(II) та підвищення ефективності вилучення Fe зі збіднених родовищ.*

## **Бібліографія**

1. Аристовская Т.В. Микробиология процессов почвообразования/Т.В. Аристовская. — Л.: Наука, 1980. — 187 с.
2. Водяницкий Ю.Н. Оксиды железа и их роль в плодородии почв/Ю.Н. Водяницкий. — М.: Наука, 1989. — 160 с.
3. Глинка Н.Л. Общая химия/Н.Л. Глинка. — К.: Вища шк., 1976. — 624 с.
4. Другов Ю.С. Газохроматографический анализ загрязненного воздуха/Ю.С. Другов, В.Г. Березкин. — М.: Химия, 1981. — 256 с.
5. Образование молекулярного водорода ассоциацией спорообразующих микроорганизмов/Н.А. Матвеева, А.С. Левишко, И.Р. Притула и др./Мікробіологічний журн. — 2011. — Т. 73, № 1. — С. 36–43.
6. Сендел Е. Колориметрические методы определения следов металлов/Е. Сендел. — М.: Мир, 1964. — 899 с.
7. Слободкин А.И. Термофильные железовосстанавливающие прокариоты: автореф. дис. на соиск. науч. степени д-ра биол. наук/А.И. Слободкин. — М.,

2008. — 35 с.

8. Справочник химика; под ред. Б.П. Никольского. — Т. 3. — М., Л.: Химия, 1965. — 1008 с.

9. Becker M. Iron toxicity in rice-conditions and management concepts/M. Becker, F. Asch//J. Plant Nutr. Soil Sci. — 2005. — 168. — P. 558–573.

10. Lovley D.R. Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron: a review/D.R. Lovley// Geomicrobiology J. — 1987. — V. 5, № 3–4. — P. 375–399.

11. Nealsen K.H. Microbial reduction of manganese and iron: new approaches to carbon cycling/K.H. Nealsen, Ch.R. Myers//Applied and Environmental Microbiology. — 1992. — V. 58, № 2. — P. 439–443.

12. Tashyreva A. The Novel Comprehensive Approach for Agricultural and Landfill Biomass Microbial Fermentation and Biogas Production/A. Tashyreva, O. Tashyrev, I. Prytulal//Biotechnology and Plant Breeding Perspectives, Eds., R.K. Behl and Ed. Arseniuk, Agrobios (International) Publishers, 2014. — P. 347–356.

*Надійшла 18.12.2014.*