

УДК 579.266.4+579.26:631.461

Дисиміляційна сульфатредукція у бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6 за впливу гербіцидів Ураган і Раундап

Г.І. Звір, О.М. Мороз, С.О. Гнатущ

Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, Україна

З'ясовано здатність сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6 рости та відновлювати сульфат-іони до гідроген сульфід у впливі гербіцидів Ураган і Раундап. Нагромадження біомаси бактеріями у контролі та за впливу гербіцидів було найвищим на четверту – шосту добу культивування, після чого бактерії переходили у стаціонарну фазу росту. За впливу гербіцидів біомаса *D. desulfuricans* IMB K-6 була вищою порівняно з контролем. Нагромадження біомаси змінювалося відповідно до зростання концентрації гербіцидів у середовищі. Сульфатвідновлювальні бактерії *D. desulfuricans* IMB K-6 за наявності сульфатів та органічних сполук у середовищі здійснюють відновлення сульфат-іонів до гідроген сульфід (дисиміляційна сульфатредукція). У контрольному середовищі процес відновлення сульфат-іонів бактеріями *D. desulfuricans* IMB K-6 був найінтенсивнішим упродовж перших чотирьох діб. За цих умов у середовищі виявлено максимальну концентрацію гідроген сульфід. Внесення гербіцидів у середовище культивування стимулювало процес відновлення сульфат-іонів і утворення гідроген сульфід сульфатвідновлювальними бактеріями *D. desulfuricans* IMB K-6. Здатність *D. desulfuricans* IMB K-6 нагромаджувати вищі рівні біомаси та здійснювати дисиміляційну сульфатредукцію за впливу Урагану та Раундапу може бути зумовлена наявністю у цих гербіцидах невисоких концентрацій інертних компонентів (сульфатів), що можуть бути використані бактеріями як акцептори електронів у сульфатному диханні.

Ключові слова: сульфатвідновлювальні бактерії; дисиміляційна сульфатредукція; сульфат-іони; гідроген сульфід

Dissimilatory sulfate reduction in bacteria *Desulfovibrio desulfuricans* IMV K-6 upon influence of Uragan and Raundup herbicides

G.I. Zvir, O.M. Moroz, S.O. Hnatush

Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine

Objects of the study were sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio desulfuricans* IMV K-6, isolated from Yavorivske lake. This strain is kept in the collection of microorganisms at the Department of Microbiology of Ivan Franko National University. Bacteria were grown in the Kravtsov-Sorokin's liquid medium with the following composition (g/l): $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O} - 0.5$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - 0.3$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.5$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 0.2$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.1$, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na} - 2.0$. The bacteria were grown for 10 days at 30 °C under anaerobic conditions. In order to study the sensitivity of the sulfate reducing bacteria to action of Uragan and Raundup herbicides, the cells of *D. desulfuricans* IMV K-6 were grown at the concentrations of herbicides as follows: 0,28 mM, 2,8 mM (concentration recommended for use) and 5,6 mM. Biomass was determined by photometric method. Concentration of hydrogen sulfide in the culture medium was determined by photo-colorimetric method. Concentration of sulfate-ions in the medium was determined by turbidimetric method. Capacity of sulfate reducing bacteria *D. desulfuricans* IMV K-6 to grow, reducing sulfates to hydrogen sulfide upon influence of Uragan and Raundup herbicides was studied. Accumulation of bacterial biomass in the control and upon influence of herbicides was the highest on the fourth-sixth day of cultivation, and after that the stationary growth phase began. It was shown that sulfate reducing bacteria upon influence of herbicides grew more intensively compared with the control. It was discovered that the level of biomass changed depending on the increasing concentration of Uragan or Raundup herbicides in the medium. Sulfate reducing bacteria *D. desulfuricans* IMV K-6 could reduce sulfates to hydrogen sulfide in the presence of sulfates and organic compounds in the medium (dissimilatory sulfate reduction). Stimulatory influence of Uragan and Raundup on the dissimilatory sulfate reduction process of *D. desulfuricans* IMB K-6 has been discovered. The formation of hydrogen sulfide correlates with the usage of sulfate ions. The capacity of sulfate reducing bacteria *D. desulfuricans* IMV K-6 to grow, reducing sulfate ions to hydrogen

sulfide upon influence of Uragan and Raundup may be caused by presence of inert components (sulfates) in these herbicides that can be used by microorganisms as electron acceptors during sulfate respiration.

Key words: sulfate reducing bacteria; dissimilatory sulfate reduction; sulfate ions; hydrogen sulfide

Вступ

Упродовж останніх років серед гербіцидів за обсягами використання на землях сільськогосподарського та несільськогосподарського призначення домінують препарати на основі гліфосату. Гліфосат – один із найпоширеніших неселективних системних гербіцидів, який застосовують для боротьби з бур'янами, особливо багаторічними. Препарати на основі гліфосату пригнічують синтез білка у клітинах рослин, унаслідок чого відбувається інгібування синтезу хлорофілу з наступним відмиранням рослин (Kuznetsova and Chmil, 2001; Shushkova et al., 2012).

Гліфосат малотоксичний для теплокровних тварин і людини (Evans and Batty, 1986; Lund-Hoie and Friestad, 1986; Kuznetsova and Chmil, 2001; Nikolaichik et al., 2011), проте завдає шкоди комахам, риbam і птахам, знижує життєздатність азотфіксуювальних бактерій, інгібуючи активність ферментів, що беруть участь у синтезі амінокислот, пригнічує ріст мікоризи, підвищує чутливість рослин до збудників хвороб, спричиняє канцерогенний вплив (Kuznetsova and Chmil, 2001; Saratovskich et al., 2007; Nedopytanska, 2011; Poznyak, 2011; Belokon and Sklyar, 2012). Впливаючи на ґрунтову мікробіоту, гліфосат може змінювати перебіг природних процесів в екосистемах і навіть у біосфері в цілому.

В Україні зареєстровано понад 50 різних препаративних форм на основі гліфосату, наприклад Ураган, Гліфосат, Антибур'ян, Гліфовіт, Торнадо тощо, які відрізняються складом. Крім діючої речовини вони містять так звані «інертні компоненти». Наприклад, Раундап містить ізопропіламіну та сорбінову кислоти, натрій сульфат, калій гідроксид, метилпіролідіон, ізобутан, 3-йодо-2-пропінілбутилкарбамат, амоній сульфат і поліетоксилат талоамін (Poznyak, 2011). Незалежні дослідження, проведені у деяких європейських країнах, Японії та США, показали, що гербіцид Раундап токсичніший, ніж його діюча речовина – гліфосат. Через високу біологічну активність, широке застосування збільшується вірогідність негативного впливу гербіцидів на урожай і стан навколишнього середовища (Kuznetsova and Chmil, 2001; Poznyak, 2011).

Незважаючи на те, що біодеградація пестицидів вивчається досить інтенсивно, залишаються малодослідженими закономірності формування стійкості мікроорганізмів ґрунту, зокрема, бактерій циклу сульфору, до токсичної дії засобів захисту рослин. Тому мета нашого дослідження – з'ясувати вплив гербіцидів Ураган і Раундап, діючою речовиною яких є гліфосат, на ріст і процес дисиміляційної сульфатредукції сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6.

Матеріал і методи досліджень

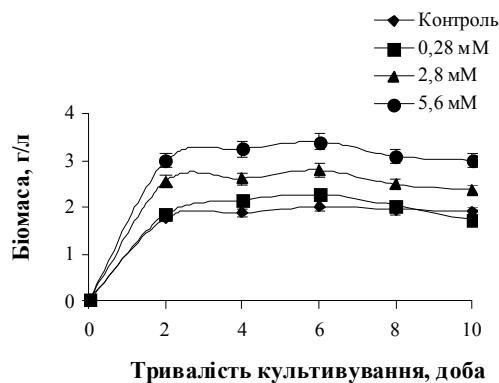
Об'єкт дослідження – сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6. Бактерії вирощували у середовищі Кравцова – Сорокіна такого складу (г/л):

$\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O} - 0,5$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - 0,3$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,5$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 0,2$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,1$, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na} - 2,0$. Перед посівом у середовище вносили 0,05 мл стерильного розчину $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ (1%). рН середовища дорівнювала 7,2. Бактерії вирощували упродовж 10 діб у термостаті за температури 30 °С й анаеробних умов у пробірках об'ємом 25 мл, доверху заповнених середовищем. Густина засіву була 0,05 г/л. Із метою дослідження чутливості сульфатвідновлювальних бактерій до дії гербіцидів Ураган і Раундап вносили у пробірки у концентраціях 0,28, 2,8 мМ (рекомендована до використання концентрація) та 5,6 мМ. Контролем було середовище без гербіцидів. Біомасу вимірювали через 2, 4, 6, 8, 10 діб культивування фотометруванням на фотоелектроколориметрі КФК-3 за $\lambda = 340$ нм у кюветі з оптичним шляхом 3 мм і розраховували за формулою: C (г/л) = $E_{340} \times n \div K$, де E_{340} – екстинкція за довжини хвилі 340 нм, n – розведення, K – коефіцієнт перерахунку, отриманий за калібрувальною кривою залежності екстинкції від сухої маси клітин. Для *D. desulfuricans* IMB K-6 коефіцієнт перерахунку становить 0,19. Концентрацію гідроген сульфід у культуральній рідині визначали фотоколориметричним, сульфат-іонів – турбідиметричним методом (Gudz et al., 2014). Статистичне опрацювання результатів здійснювали за допомогою програми Origin Pro 7.0.

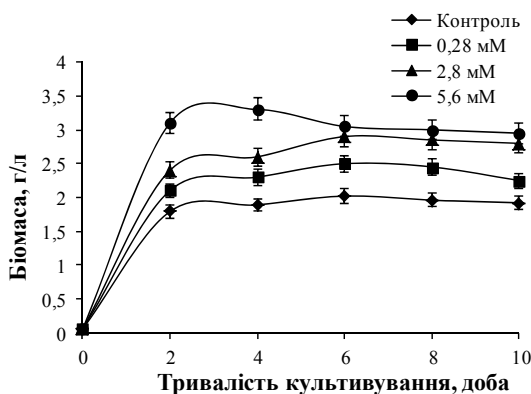
Результати та їх обговорення

Сульфатвідновлювальні бактерії роду *Desulfovibrio*, які відновлюють сульфати до гідроген сульфід, – важлива ланка у колообігу сполук сульфору у природі. Вони не лише ростуть у середовищах, забруднених важкими металами та іншими ксенобіотиками, а й можуть бути використані для ремедіації довкілля, оскільки розкладають токсичні сполуки складної структури до малотоксичних речовин (Petrova et al., 2003; Butorova et al., 2010). Досліджено чутливість бактерій *D. desulfuricans* IMB K-6 до дії гербіцидів Ураган і Раундап у різних концентраціях (рис. 1 А, Б).

Упродовж перших двох діб культивування *D. desulfuricans* IMB K-6 у середовищі, яке не містило гербіцидів, біомаса зростає з $0,05 \pm 0,004$ до $1,79 \pm 0,20$ г/л. Найбільшою біомаса була на шосту добу росту ($2,02 \pm 0,03$ г/л). Внесення гербіцидів у середовище культивування стимулювало ріст *D. desulfuricans* IMB K-6. Криві, що відображають ріст бактерій *D. desulfuricans* IMB K-6 за впливу гербіцидів, схожі з контрольним варіантом, проте біомаса була вищою в кожній точці, в якій проводили вимірювання. За впливу Урагану у концентрації 0,28 мМ нагромадження біомаси зросло на 13% порівняно з контролем. Збільшення концентрації Урагану до 2,8 мМ стимулювало нагромадження біомаси в 1,6 раза порівняно з контролем. У випадку збільшення концентрації гербіциду до 5,6 мМ біомаса майже удвічі перевищила контрольні величини. Отже, внесення у середовище культивування *D. desulfuricans* IMB K-6 гербіциду Ураган стимулювало нагромадження біомаси відповідно до концентрації гербіциду.



А



Б

Рис. 1. Нагромадження біомаси *D. desulfuricans* IMB К-6 у середовищі Кравцова – Сорокіна за впливу Урагану (А) та Раундапу (Б)

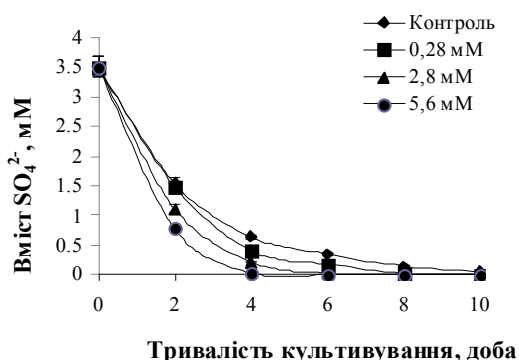
Раундап, як і Ураган, стимулював ріст *D. desulfuricans* IMB К-6 відповідно до концентрації. Внесення у середовище культивування Раундапу за концентрації 0,28 мМ стимулювало зростання біомаси на 24%. За збільшення концентрації гербіциду до 2,8 мМ біомаса зростає в 1,4 раза порівняно з контролем. Найбільшу біомасу бактерії нагромаджували за внесення 5,6 мМ Раундапу на четверту добу культивування ($3,30 \pm 0,28$ г/л).

Стимулювання росту сульфатвідновлювальних бактерій за впливу гербіцидів на основі гліфосату може бути зумовленим здатністю цих бактерій розкладати молекули гліфосату до простих органічних речовин із подальшим використанням їх як донорів електронів і джерел карбону, нітрогену чи фосфору, або спричинятися тим, що гербіциди містять незначну кількість сульфат-іонів, як це показано для бактерій *Desulfotomobium* sp. CRR3 (Sholiak, 2014). Адже до складу Раундапу входять натрій сульфат, амоній сульфат, які можуть бути використані дослідженими бактеріями як акцептори електронів у процесі сульфатного дихання.

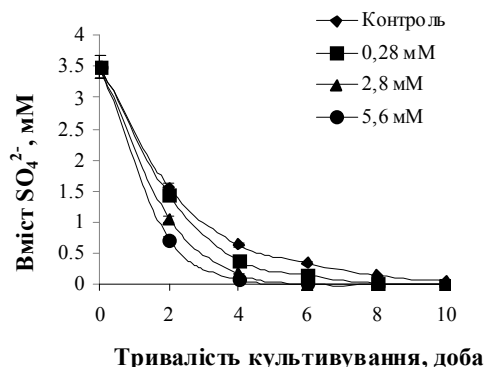
Сульфатвідновлювальні бактерії *D. desulfuricans* IMB К-6 за наявності сульфатів і органічних сполук у середовищі здійснюють дисиміляційну сульфатредукцію. Вони використовують сульфат як кінцевий акцептор електронів, відновлюючи його до гідроген сульфіду (Peretyatko et al., 2006; Kushkevych, 2012).

Під час вирощування бактерій у середовищі, яке не містило гербіцидів, найінтенсивніший процес відновлення сульфат-іонів спостерігали упродовж перших чотирьох діб, унаслідок чого вміст сульфат-іонів у середовищі знизився на другу добу у 2,4 раза, на четверту – у 3,4 раза (рис. 2 А, Б). За цих умов у середовищі виявлено максимальну концентрацію гідроген сульфіду (приблизно 2,1 мМ на четверту добу) (рис. 3).

Аналогічну закономірність виявлено і за умови додавання до середовища культивування гербіцидів. Внесення гербіцидів у середовище культивування стимулювало процес відновлення сульфат-іонів і утворення гідроген сульфіду сульфатвідновлювальними бактеріями *D. desulfuricans* IMB К-6 (рис. 2, 3).



А



Б

Рис. 2. Вміст сульфат-іонів у середовищі Кравцова – Сорокіна у процесі вирощування *D. desulfuricans* IMB К-6 за впливу Урагану (А) та Раундапу (Б)

За впливу Урагану вміст сульфат-іонів у середовищі культивування бактерій *D. desulfuricans* IMB К-6 уже на другу добу знизився у 2,3, 3,1 та 4,5 раза, за впливу Раундапу – у 2,4, 3,3 та 4,9 раза відповідно до кон-

центрації гербіциду. Вміст гідроген сульфіду у середовищі з Ураганом зріс, порівняно з контролем, у 1,2–1,4 раза, із Раундапом – у 1,2–1,3 раза відповідно до концентрації гербіциду.

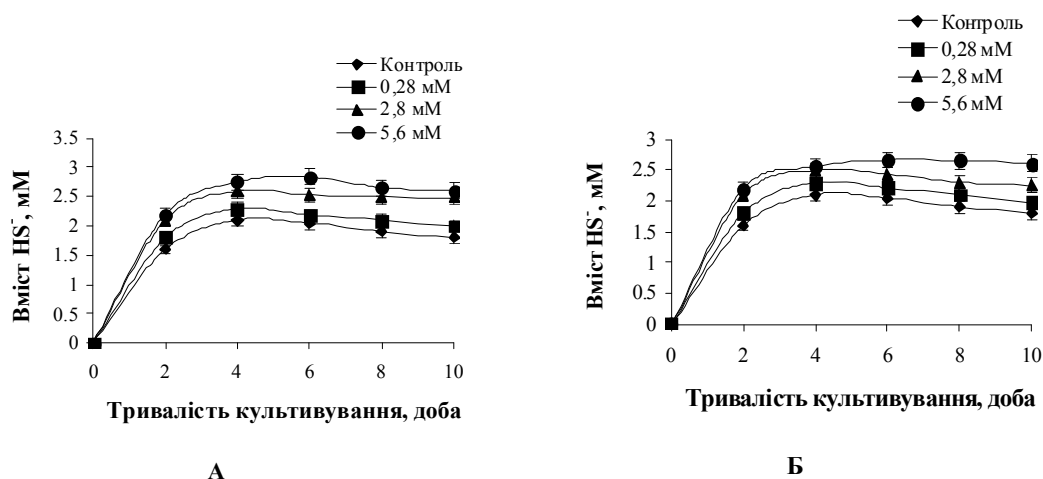


Рис. 3. Вміст гідроген сульфід у середовищі Кравцова – Сорокіна у процесі вирощування *D. desulfuricans* IMB K-6 за впливу Урагану (А) та Раундапу (Б)

Подібні зміни кривих росту та процесу дисиміляційної сульфатредукції за впливу гербіцидів на основі гліфосату можуть свідчити про наявність у їх складі сульфат-іонів, які стимулюють ріст *D. desulfuricans* IMB K-6 та відновлення клітинами сульфат-іонів до гідроген сульфід. Утворений сульфатвідновлювальними бактеріями гідроген сульфід високотоксичний для живих організмів (Beauchamp et al., 1984; Peretyatko et al., 2006; Kushkevych, 2012). Механізм дії гідроген сульфід полягає у пошкодженні метало- та дисульфідумісних протеїнів, деполаризації мітохондріальних мембран еукаріот тощо. Гідроген сульфід пригнічує люмінесценцію у *Vibrio fischeri*, інгібує ріст архебактерій та ціанобактерій (Beauchamp et al., 1984). Тому неконтрольоване внесення у ґрунт гербіцидів може мати непередбачуваний негативний вплив на ґрунтову мікробіоту більшою мірою через стимулювальний вплив їх складових на сульфідогенну активність бактерій, ніж через токсичність діючої речовини препаратів (гліфосату). Зростання чисельності сульфатвідновлювальних бактерій може бути індикатором погіршення екологічного стану біогеоценозів унаслідок антропогенного навантаження.

Висновки

За умови інтенсивного застосування гербіцидів виникає небезпека накопичення у ґрунті їх діючої речовини гліфосату чи його метаболітів, які можуть впливати на життєдіяльність деяких груп мікроорганізмів. Внесення у середовище препаратів на основі гліфосату стимулювало нагромадження біомаси сульфатвідновлювальними бактеріями *D. desulfuricans* IMB K-6. Досліджені мікроорганізми відновлювали сульфат-іони до гідроген сульфід не лише за впливу рекомендованих до використання концентрацій гербіцидів, а й удвічі вищих. Стимулювання процесу дисиміляційної сульфатредукції *D. desulfuricans* IMB K-6 за впливу Урагану та Раундапу пов'язане, на нашу думку, з наявністю сульфатів у складі цих препаратів. Утворений сульфатвідновлювальними бактеріями гідроген сульфід може мати більший негативний вплив на ґрунтову мікробіоту, ніж гліфосат та продукти його розщеплення.

Бібліографічні посилання

- Beauchamp, R.O.Jr., Bus, J.S., Popp, J.A., 1984. A critical review on the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 13, 25–97.
- Belokon, S.V., Sklyar, V.S., 2012. Genotoksychnyj efekt gerbicydiv i ploduchist' *Drosophila melanogaster* [Genotoxic effect of herbicides and fecundity of *Drosophila melanogaster*]. *Visn. Odes. Nac. Univ. Ser. Biol.* 17(4), 57–61 (in Ukrainian).
- Butorova, O.P., Kozlova, A.V., Gerasimchuk, A.L., 2010. Obrazovanie sul'fidov medi *Desulfovibrio sp. R2* v optimal'nyh temperaturnyh uslovijah [For motion of copper sulfides by *Desulfovibrio sp. R2* under optimal temperature conditions]. *Vest. Tom. Gos. Univ.* 2, 19–28 (in Russian).
- Gudz, S.P., Hnatysh, S.O., Yavorska, G.V., Bilinska, I.S., Borsukevych, B.M., 2014. *Praktykum z mikrobiologii'* [Workshop on microbiology]. Lviv. Nac. Univ. imeni Ivana Franka. Ser. Biol. Stud., Lviv (in Ukrainian).
- Evans, D.D., Batty, M.J., 1986. Effects of high dietary concentrations of glyphosate on a species of bird, marsupial and rodent indigenous to Australia. *Env. Toxicol. Chem.* 5, 399–401.
- Kushkevich, I.V., 2012. Sul'fatvidnovljuval'ni bakterii' kyshechnyky lyudyny. I. Dysymiljacijne vidnovlennja sul'fatu [Sulfate-reducing bacteria of human intesting. I. Dissimilatory sulfate reduction]. *Boil. Stud.* 6(1), 149–180 (in Ukrainian).
- Kuznetsova, E.M., Chmil, V.D., 2001. Glifosat: Povedenie v okruzhajushhej srede i urovni ostatkov [Glyphosate: Environmental fate and levels of residues]. *Sovremennye Problemy Toksikologii* 1, 87–95 (in Russian).
- Lund-Hoie, K., Friestad, N.O., 1986. Photodegradation of the herbicide glyphosate in water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 723–729.
- Nedopytanska, N.M., 2011. Problema kancerogennoi' nebezpeky glifosatu: Novi dani [The problem of cancerogenous danger of glyphosate: New data]. *Suchasni Problemy Toksykologii'* 1–2, 5–15 (in Ukrainian).
- Nikolaichik, Y.A., Guschinskaya, N.N., Evtushenkov, A.N., 2011. Konstruirovanie variantov bakterial'nogo gena APO A so snizhennoj chuvstvitel'nost'ju k gerbicide glifosatu [Construction of bacterial gene ARO A variants with lower sensitivity to herbicide glyphosate]. *Tr. Bel. Gos. Univ.* 6(1), 174–180 (in Russian).
- Peretyatko, T.B., Hnatysh, S.O., Gudz, S.P., 2006. Sul'fatvidnovljuval'ni bakterii' vodojm Javoriv'skogo Sirkovogo Ro-

- dovyshha [Sulfate-reducing bacteria from Yavoriv Sulfur Deposit Reservoir]. Mikrob. Zh. 68(5), 87–93 (in Ukrainian).
- Petrova, O.E., Davydova, M.N., Tarasova, N.B., Muhytova, F.K., 2003. Sul'fatreducirujushhie bakterii v biologicheskoy pererabotke promyshlennyh othodov, sodержashhiih nitrocelljulozu [Sulfate-reducing bacteria in biological processing of industrial wastes containing nitrocellulose]. Vest. Mosk. Univ. Ser. Him. 44(1), 43–45 (in Russian).
- Poznyak, V., 2011. Total'nyj vynyshhuvach [Total destroyer]. Agrobiznes S'ogodni 9, 42–43 (in Ukrainian).
- Saratovskich, E.A., Glazer, V.M., Kostromina, N.Y., Kotelevtsev, S.V., 2007. Genotoksichnost' pesticidov v teste Jejmsa i ih sposobnost' k obrazovaniju kompleksov s DNK [Genotoxicity of pesticides in Ames test and its ability to formation of complex with DNA]. Ekol. Genet. 5(3), 46–54 (in Russian).
- Sholiak, K., Hnatush, S., Peretyatko, T., Gudz, S., 2014. Vidnovlennja hromat- i sul'fat-ioniv sul'fatvidnovljuval'nyh bakterijamy *Desulfomicrobium sp. CRR3* za vplyvu organichnyh rehovyn – zabrudnjuvachiv navkolyshn'ogo seredovyshha [Chromate- and sulfate-iones reducing bacteria *Desulfomicrobium sp. CRR3* under the influence of various organic compounds – environmental pollutants]. Visn. Lviv. Univ. Ser. Biol. 65, 266–272 (in Ukrainian).
- Shushkova, T.V., Ermakova, I.T., Sviridov, A.V., Leontevsky, A.A., 2012. Biodestrukcija glifosata pochvnyimi bakterijami: Optimizacija processa kul'tivirovanija i sposob hranenija aktivnoj biomassy [Biodestruction of glyphosate by soil bacteria: Optimization of cultivation process and method of active biomass storage]. Mikrobiol. 81(1), 48–55 (in Russian).

Надійшла до редколегії 26.02.2015