

УДК 579.[22:23:243:26:811.21]:546.4

І.В. Кушкевич, С.О. Гнатуш, С.П. Гудзь, О.Р. Кулачковський

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна, тел.: 8 (0322) 96 40 53,
e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net

ВПЛИВ КАДМІЙ СУЛЬФАТУ НА РІСТ, ШВИДКІСТЬ ПОГЛИНАННЯ КИСНЮ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРУ *CHROMATIUM SP.**

*Вивчено ріст бактерій *Chromatium sp.* за впливу різних концентрацій кадмій сульфату. Внесення $CdSO_4$ у середовище культивування пригнічує ріст фототрофних сіркових бактерій. Зростання вмісту $CdSO_4$ в середовищі супроводжується збільшенням швидкості поглинання кисню клітинами. Досліджено зміни ультраструктури клітин *Chromatium sp.* за впливу кадмій сульфату.*

*К л ю ч о в і с л о в а: кадмій, токсичність, *Chromatium*, ультраструктура.*

Важкі метали — одні з найнебезпечніших забруднювачів довкілля [1]. Одним з таких металів є кадмій, який потрапляє у навколишнє середовище при вилуговуванні металевих руд, мігрує у поверхневі води разом з відходами металообробних заводів, рудозбагачувальних фабрик, а також багатьох хімічних підприємств, у технологічному циклі яких його використовують [2].

Сполуки кадмію у мікрокількостях відіграють важливу роль у процесах життєдіяльності тварин і людини [2], а у високих концентраціях — токсичні та спричиняють злякисну трансформацію клітин.

У природних водах кадмій зустрічають переважно у вигляді розчинних мінеральних й органо-мінеральних комплексів. Значна частина цього токсичного металу може поглинатися клітинами мікроорганізмів різних систематичних груп. Зниження концентрації розчинених сполук кадмію відбувається за рахунок процесів сорбції, випадання в осад кадмій гідроксиду та кадмій карбонату і поглинання їх мікроорганізмами [3].

Дослідження характеру дії важких металів на мікроорганізми є важливим етапом під час вирішення багатьох екологічних проблем. До них відносять: оцінку стану довкілля, зокрема ґрунтів, пошук біологічних індикаторів техногенного забруднення для створення універсальних комплексних біотехнологій очистки водойм, ґрунтів та атмосфери від іонів металів [4].

Метою нашої роботи було вивчення впливу різних концентрацій кадмій сульфату на ріст і поглинання кисню та ультраструктуру клітин пурпурових сіркобактерій *Chromatium sp.*

* Робота частково виконана за фінансової підтримки Західноукраїнського біомедичного дослідницького центру (WUBMRC)



Матеріали і методи

У роботі використовували культуру пурпурових сіркобактерій *Chromatium* sp., виділену з водойм Яворівського сіркового родовища та ідентифіковану на кафедрі мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка [5].

Бактерії вирощували у рідкому середовищі Ван Ніля протягом 10 діб за анаеробних умов при температурі 20–23 °С і постійному освітленні. У середовище додатково вносили натрій піруват і натрій ацетат у концентрації 4 ммоль/л.

Біомасу культури визначали фотоелектроколориметричним методом на КФК-3 ($\lambda=660$ нм, оптичний шлях 3 мм). Проби для визначення відбирали через першу, другу, третю, четверту, шосту, восьму та десятю доби росту. Швидкість поглинання кисню клітинами визначали полярографічним методом. Величину дифузного струму реєстрували на полярографічній установці. Зміни напруження кисню під час досліду реєстрували за допомогою самописця КСП-4 на паперовій стрічці, швидкість руху якої була 1800 мм/год. Поглинання кисню клітинами визначали за кутом нахилу кривої. Швидкість поглинання виражали у $\text{нг O}_2/\text{хв} \cdot \text{мг клітин}$. У комірку почергово вносили 1 мл суспензії культури сіркобактерій *Chromatium* sp., які культивували при різних концентраціях CdSO_4 .

Для електронномікроскопічних досліджень клітини двічі відмивали стерильною водопровідною водою та осаджували центрифугуванням при 10 000 об/хв протягом 15 хв. Інтактні клітини фіксували в 1,5 %-му водному розчині KMnO_4 упродовж 20 хв. при кімнатній температурі. Ультратонкі зрізи отримували на ультрамікроскопі УМТП-6 і контрастували цитратом плюмбуму за Рейнольдсом [6]. Перегляд і фотографування зразків проводили на електронних трансмісійних мікроскопах УЕМВ-100 Б і ПЕМ-100 за прискорюючої напруги 75 кВ. Кінцеве збільшення на мікрофотографіях – близько 6000 разів.

Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням програми Origin.

Результати та їх обговорення

Виділені з водойм Яворівського сіркового родовища та ідентифіковані як *Chromatium* sp. пурпурові бактерії – поодинокі одноклітинні мікроорганізми, овальної та видовженої форм. Розміри досліджуваних бактерій становлять 4,5–6,0×8,0–15,0 мкм. Бактерії відкладають у клітинах глобули сірки (S). Розмножуються бінарним поділом (рис. 3.1). Не утворюють ендоспор. Рухаються за допомогою джгутіка.

Вплив CdSO_4 на ріст *Chromatium* sp. досліджували у концентраціях 0,5; 1; 1,5; 2,0; 2,5 мМ у середовищі Ван Ніля (рис. 1).

Найкращий ріст досліджуваної культури, як видно з рис. 1, спостерігали у контрольному середовищі (без внесення солі кадмію). У присутності 0,5 мМ CdSO_4 інтенсивність росту бактерій знизилася на 12 %, порівняно з контролем. При внесенні у середовище 1,0 та 1,5 мМ кадмій сульфату біомаса культури *Chromatium* sp. зменшилася відповідно у 1,3 та 1,6 рази, порівняно з контролем. Подальше зростання концентрації досліджуваного металу до 2,0 мМ призвело до значного уповільнення ростових процесів. За цих умов максимальною була біомаса на восьму добу і становила $2,17 \pm 0,01$ г/л. За найвищої концентрації CdSO_4 – 2,5 мМ біомаса мікроорганізмів майже не змінювалась, що свідчить про токсичний вплив кадмію у цій концентрації на ростові процеси культури.



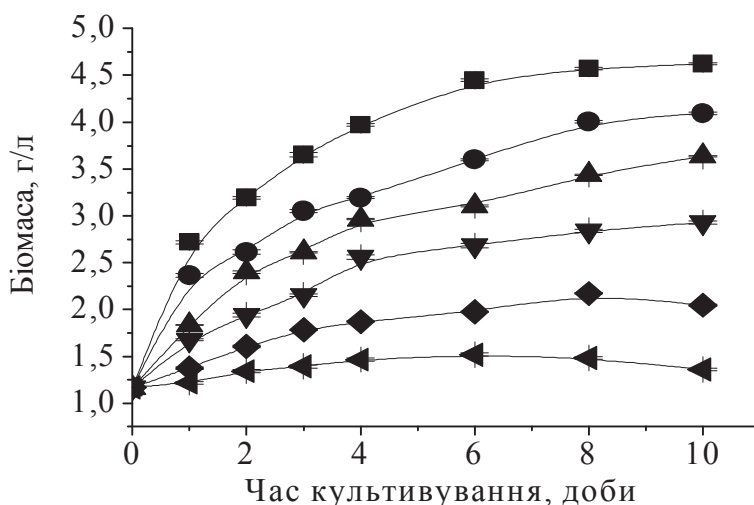


Рис. 1. Ріст культури *Chromatium* sp. у середовищі Ван Ніля за різних концентрацій CdSO_4
 -■- — контроль; -●- — 0,5 мМ; -▲- — 1 мМ; -▼- — 1,5 мМ; -◆- — 2 мМ; -◄- — 2,5 мМ

Fig. 1. Growth of *Chromatium* sp. culture in Van Niel medium at different CdSO_4 concentrations
 -■- — контроль; -●- — 0,5 мМ; -▲- — 1 мМ; -▼- — 1,5 мМ; -◆- — 2 мМ; -◄- — 2,5 мМ

На думку О. Б. Таширева [1] спочатку бактерії поглинають двозарядні катіони металу, які, можливо, після проникнення в клітину зв'язуються з білками цитоплазми і внутрішніми мембранними структурами або утворюють нерозчинні продукти. Через певний проміжок часу мікроорганізми адаптуються, долають інгібуючу дію сполук кадмію, та здатні акумулювати CdSO_4 у клітині в значних кількостях [7]. Виникнення стійкості до важких металів спричинене, можливо, не зниженням проникності клітинної стінки, а змінами у метаболізмі, які дозволяють клітині виживати при більш високих концентраціях металу [1]. При цьому спостерігаємо збільшення біомаси бактерій, стійких до дії цього токсичного металу. При високих концентраціях кадмію адаптація клітин проходить повільно.

Більшість пурпурових сіркобактерій анаероби [8, 9]. Але вони здатні поглинати молекулярний кисень у невеликих кількостях у темряві за наявності органічних сполук [10]. Дослідження швидкості поглинання кисню бактеріями *Chromatium* sp. за умов росту у середовищі Ван Ніля, яке містило органічні сполуки, з вищевказаними концентраціями кадмій сульфату показало, що при культивуванні бактерій без внесення CdSO_4 (контроль) швидкість поглинання кисню клітинами була найменшою (рис. 2).

Присутність у середовищі 0,5 мМ іонів кадмію призводила до підвищення швидкості поглинання кисню клітинами на першу, другу та третю добу відповідно на 6, 16 та 62 %, порівняно з контролем. Збільшення концентрації досліджуваного металу до 1,0 та 1,5 мМ пришвидшувало поглинання кисню сіркобактеріями упродовж трьох діб. Кадмій сульфат у концентрації 2,0 мМ активував здатність бактерій *Chromatium* sp. поглинати кисень. За цієї концентрації швидкість по-



глинання кисню клітинами досліджуваних мікроорганізмів збільшилася у 5,3 та 4 рази, порівняно з контролем, відповідно на першу, другу та третю доби росту. При внесенні 2,5 мМ металу відмітили найбільшу швидкість поглинання кисню бактеріями *Chromatium* sp. – $16,23 \pm 0,01$, $14,04 \pm 0,01$ та $20,93 \pm 0,01$ нг O_2 /хв · мг клітин на першу, другу та третю доби росту. Отже, збільшення концентрації металу призводить до зростання швидкості поглинання кисню клітинами сіркобактерій.

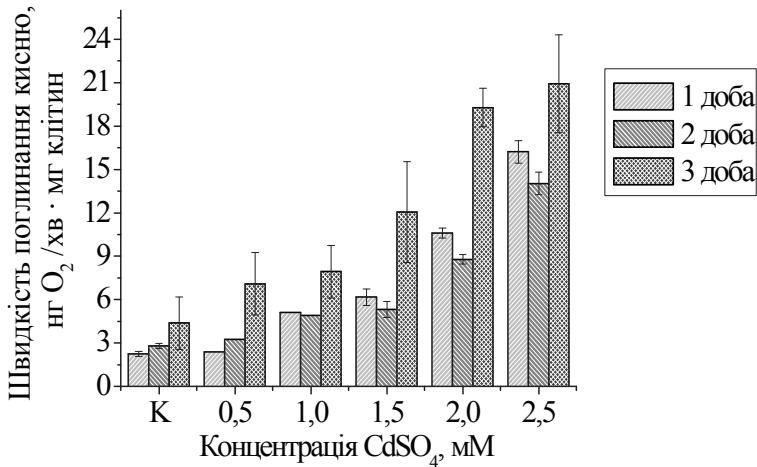


Рис. 2. Вплив $CdSO_4$ на швидкість поглинання кисню клітинами бактерій *Chromatium* sp.

Fig. 2. Influence of $CdSO_4$ on the velocity of oxygen uptake by bacteria cells *Chromatium* sp.

У пурпурових бактерій наявна типова клітинна стінка характерна для грамнегативних бактерій. Вони відкладають в клітинах глобули сірки (S) (рис. 3). Дослідження ультраструктури клітин *Chromatium* sp. під електронним мікроскопом на десяту добу культивування показало, що при внесенні солі кадмію в середовище спостерігаються суттєві зміни.

Внесення кадмію у концентрації 0,5 та 1,0 мМ призводить до порушень при поділі клітин, змінює їх форму. Збільшення концентрації іонів важкого металу до 1,5 мМ спричиняє збільшення розмірів клітини, зміну структури цитоплазми. За наявності в середовищі 2,0 мМ $CdSO_4$ клітини набувають не характерних для них форм, а при 2,5 мМ – відбувається відшарування цитоплазми від клітинної стінки.

Таким чином, досліджено вплив різних концентрацій іонів кадмію на ріст культури *Chromatium* sp. Показано, що внесення даного металу в середовище пригнічує ріст бактерій. Визначено швидкість поглинання кисню культурою сіркобактерій *Chromatium* sp. при рості у середовищі з різними концентраціями $CdSO_4$. Збільшення концентрації кадмію активує поглинання кисню клітинами досліджуваної культури. Внесення кадмію в середовище культивування викликає зміни ультраструктури клітин *Chromatium* sp.

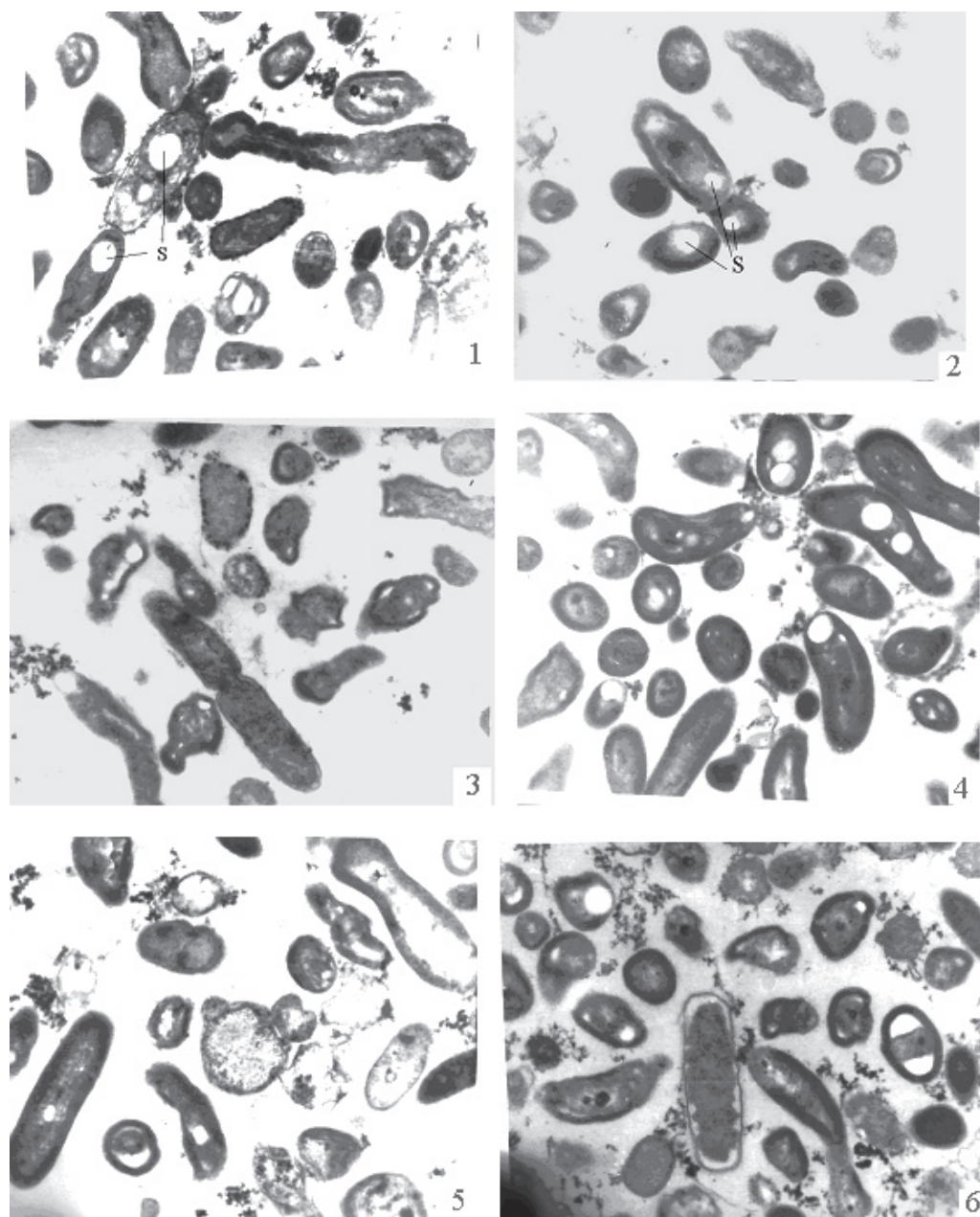


Рис. 3. Клітини *Chromatium* sp. при рості у середовищі з різними концентраціями CdSO_4 :
 1 – контроль; 2 – 0,5 мМ; 3 – 1,0 мМ; 4 – 1,5 мМ; 5 – 2,0 мМ; 6 – 2,5 мМ;
 S – глобули сірки (електронна мікроскопія, $\times 6\ 000$)

Fig. 3. *Chromatium* sp. cells during the growth in the medium with different CdSO_4 concentrations:
 1 – control; 2 – 0,5 mM; 3 – 1,0 mM; 4 – 1,5 mM;
 5 – 2,0 mM; 6 – 2,5 mM; S – sulfur globules (electronic microscope, $\times 6\ 000$)

ЛІТЕРАТУРА

1. Таширев А. Б. Взаимодействие микроорганизмов с металлами // Микробиологический журнал. — 1995. — № 2. — С. 95-101.
2. Таширев О. Б. Біотехнології очищення промислових стічних вод на основі термодинамічного прогнозування взаємодії мікроорганізмів з металами та радіонуклідами: Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня доктора технічних наук. — К. 2005. — 42 с.
3. Іутинська Г. О., Антипчук А. Ф., Валагурова Е. В., Козырицкая В. Е., Петруша З. В. Відновлення біологічних функцій ґрунтів, забруднених важкими металами // Агротехніка і ґрунтознавство: Спец. випуск до V з'їзду УТГА (Рівне, 6-10 липня 1998 р.). — Харків: УААН. — 1998. — С.93-95.
4. Иутинская Г. А., Антипчук А. Ф., Валагурова Е. В., Козырицкая В. Е., Петруша З. В. Использование микроорганизмов как биотестов на загрязнение почв тяжелыми металлами // Материалы Междунар. конф. «Проблемы микробиологии и биотехнологии». — Минск: Микробио. — 1998. — С.170-172.
5. Гудзь С. П., Коструба М. Ф., Гнатуш С. О. та ін. Сіркові бактерії Яворівського сіркового родовища та проблеми рекультиватії земель // Вісник Одеського університету. Серія Біологія. — 2002. — Вип. 10. — № 4. — С. 72-75.
6. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscope // J. Cell Biol. — 1963. — Vol. 17. — P. 208-212.
7. Іутинська Г. О., Петруша З. В. Резистентність ґрунтових мікроорганізмів до забруднення ґрунтів важкими металами // Микробиол. журн. — 1999. — Т. 61. — № 5. — С. 72-77.
8. Кондратьева Е. Н. Фотосинтезирующие бактерии. М.: Изд-во. Москов. ун-та. — 1989. — С. 82-103.
9. Кушкевич І. В. Вплив атмосферного кисню на аноксигенні фототрофні пурпурові сіркобактерії // Матеріали наукової конференції студентів біологічно факультету Львівського національного університету імені Івана Франка (21 квітня 2004 року). — Львів. 2004. — С.47 — 51.
10. Петушкова Ю. П., Ивановский Р. Н. Дыхание клеток *Thiocapsa roseopersicina* // Микробиология. — 1976. — Вып. 1. — С. 389 — 395.

И.В. Кушкевич, С.А. Гнатуш, С.П. Гудзь, О.Р. Кулачковський

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина, тел.: 8 (0322) 96 40 53,
e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net

ВЛИЯНИЕ КАДМИЙ СУЛЬФАТА НА РОСТ, СКОРОСТЬ ПОГЛОЩЕНИЯ КИСЛОРОДА И УЛЬТРАСТРУКТУРУ *CHROMATIUM* SP.

Реферат

Исследовано рост бактерий *Chromatium* sp. под влиянием различных концентраций кадмий сульфата. Внесение $CdSO_4$ в среду культивирования угнетает рост фототрофных серобактерий. Увеличение содержания $CdSO_4$ в среде сопровождается увеличением скорости поглощения кислорода клетками.

Исследовано изменения ультраструктуры клеток *Chromatium* sp. под влиянием кадмий сульфата.

К л ю ч е в ы е с л о в а: кадмий, токсичность, *Chromatium*, ультраструктура.



I.V. Kushkevych, S.O. Hnatush, S.P. Gudz, O.R. Kulachkovsky

Ivan Franko National University of Lviv,
4, Hrushevskiy Str., Lviv, 79005, Ukraine, tel.: 8 (0322) 96 40 53,
e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net

**INFLUENCE OF CADMIUM SULFATE ON THE GROWTH,
VELOCITY OF OXYGEN UPTAKE AND ULTRASTRUCTURE
OF *CHROMATIUM* SP.**

Summary

The growth of bacteria *Chromatium* sp. under the influence of different cadmium sulfate concentrations is investigated. The addition of CdSO_4 to the medium inhibits the growth of phototrophic sulfur bacteria. The increase of CdSO_4 content in the medium leads to the increase of oxygen uptake velocity.

The changes in the ultrastructure of *Chromatium* sp. cells under the influence of cadmium sulfate are investigated.

K e y w o r d s: cadmium, toxicity, *Chromatium*, ultrastructure.

