

Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна, тел.: +38 (032) 239 40 53
e-mail: t_peretyatko@franko.lviv.ua

ПСИХРОФІЛЬНІ ШТАМИ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ

*З анаеробної зони водойми, що знаходиться в зоні Яворівського сіркового родовища, виділені психрофільні сульфатвідновлювальні бактерії, які ідентифіковані як *Desulfobacter* sp. Виділені бактерії у середовищі з сульфатами і органічними сполуками інтенсивно відновлюють сульфати до сірководню. Із досліджених органічних сполук як джерело вуглецю бактерії використовують ацетат, лактат, глюкозу, рафінозу, галактозу, арабінозу, сорбіт, дульцит. Виділені психрофільні сульфатвідновлювальні бактерії можуть розглядатися як перспективні для очищення середовищ з високим вмістом сульфатів.*

К л ю ч о в і с л о в а: психрофільні сульфатвідновлювальні бактерії, гідроген сульфід, сульфат.

Сульфатвідновлювальні бактерії здійснюють дисиміляційне відновлення сульфатів і зв'язують потоки вуглецю і сірки в анаеробних біотопах, що містять сульфат. Вони використовують сульфат як кінцевий акцептор електронів і отримують енергію для росту внаслідок окиснення органічних речовин або молекулярного водню [13]. Окрім сульфатів сульфатвідновлювальні бактерії можуть використовувати метали із змінною валентністю (Cr(VI), U(VI), Tc(VI), Pd(II) та ін.) як акцептори електронів, перетворюючи їх до відновлених менш токсичних форм [11, 14, 15]. З другого боку сульфатвідновлювальні бактерії, утворюючи в процесі життєдіяльності гідроген сульфід, сприяють утворенню нерозчинних сульфідів [12].

В умовах помірного клімату перспективним є використання психрофільних і психротолерантних штамів сульфатвідновлювальних бактерій для очищення середовища від високих концентрацій сульфатів та металів. Це дасть можливість в значній мірі нівелювати залежність процесів ремедіації середовища від температури в період осінь-весна. Крім того, вважається, що ферменти психрофільних мікроорганізмів мають більш високу каталітичну активність порівняно з ферментами мезофільних бактерій [9, 10].

Метою роботи було виділити психрофільні штами сульфатвідновлювальних бактерій та дослідити їхні властивості.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були культури сульфатвідновлювальних бактерій, виділені з водойми, що знаходиться на території Яворівського сіркового родовища. Проби води розводили і висівали на чашки Петрі з агаризованим середовищем Постгейта В [13] у розрахунку 100–150 колоній на чашку. Культури вирощували протягом 14



діб при 12 °С в анаеростатах. Для поглинання кисню використовували генератори GENbox anaer (Франція). Для виявлення колоній сульфатвідновлювальних бактерій у середовище додавали залізо у формі FeSO₄. Це сприяло утворенню в клітинах бактерій FeS, що забарвлював колонії у чорний колір. Біомасу клітин після їх вирощування у рідкому середовищі в анаеробних умовах визначали ваговим методом або турбідиметрично, використовуючи КФК-3. Для фотоелектроколориметричного визначення біомаси клітин будували калібрувальну криву залежності екстинції від сухої маси клітин.

Ідентифікацію сульфатвідновлювальних бактерій проводили за морфо-фізіологічними ознаками згідно визначника Берджі [4].

Здатність бактерій утворювати спори визначали загальноприйнятим методом [2]. Суспензію клітин після її прогрівання на водяній бані при 80 °С протягом 10 хв висівали на агаризоване середовище та інкубували в анаеробних умовах. Для виявлення спор в клітинах їх додатково фарбували за методом Пешкова [7], морфологію клітин вивчали за допомогою світлового мікроскопа (x 1600).

Нагромадження ацетат-іону в культурах бактерій в процесі їхнього росту проводили, як описано [1].

Сірководень у культуральній рідині визначали фотометрично з використанням фотоелектроколориметра КФК-3 ($\lambda=665$ нм, кювета з оптичним шляхом 30 мм). Реакційна суміш мала такий склад: цитрат цинку (27,3 мМ) — 10 мл; дистильована вода — 1,98 мл; розчин п-амінодиметиланіліну (5,5 мМ) — 4 мл та 20 мкл досліджуваного розчину. Через 5 хв додавали 1 мл хлориду феруму (0,125 М) та спостерігали утворення метиленої сині. Концентрацію сірководню встановлювали за калібрувальною кривою.

Сульфат у середовищі визначали турбідиметрично після його осадження барій хлоридом. Для стабілізації суспензії використовували гліцерин [6].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою Microsoft Excel 2000 та як описано [3].

Результати та їх обговорення

Щоб з'ясувати, які саме представники психрофільних сульфатвідновлювальних бактерій зустрічаються в даному середовищі з мулу відбирали проби, використовуючи метод Столбунова-Рябова [8]. Проби висівали на селективне середовище Постгейта. Після 14 діб культивування при 12 °С відібрали 32 культури, колонії яких були забарвлені у чорний колір, що свідчило про інтенсивну сульфатредукцію. У подальших експериментах використовували одну культуру, що добре росла на селективному середовищі і колонії якої мали найбільш інтенсивне чорне забарвлення.

Згідно визначника бактерій Берджі сульфатвідновлювальні бактерії поділяють на чотири підгрупи [4]. Щоб з'ясувати, до якої групи належать виділені бактерії, їх висівали у середовище з сульфатами та без них, а також із елементною сіркою з додаванням лактату натрію як джерела вуглецю. Одержані результати показують, що досліджувані бактерії добре росли в контрольному середовищі, що містило сульфати та лактат натрію. Крім того, одержані дані показують, що за відсутності сульфату, сірка не забезпечувала їхнього росту у середовищі з лактатом, що свідчить про відсутність серед виділених бактерій представників родів *Desulfurella* та *Desulfuromonas*.



Для з'ясування здатності виділених бактерій використовувати різні джерела вуглецю, їх висівали на середовище, в якому лактат натрію, як основне джерело вуглецю, заміняли на інші органічні сполуки, зокрема використовували ацетат, сорбіт, дульцит, етанол, пальмітат, сукцинат, глюкозу, рафінозу, лактозу та ряд інших олігоцукридів (табл.).

Таблиця
Нагромадження біомаси та використання сульфату *Desulfobacter sp. 1*

Table
Biomass accumulation and sulphate utilization by *Desulfobacter sp. 1*

Джерело вуглецю	Біомаса, г/л		% використання сульфатів
	SO ₄ ²⁻	S ⁰	
Лактат Na (контроль)	4,51 ± 0,31	-	90,2
Ацетат Na	4,75 ± 0,28	-	96,5*
Глюкоза	3,96 ± 0,18	-	77,7*
Арабіноза	3,84 ± 0,24	-	75,8*
Лактоза	3,69 ± 0,31	-	70,6*
Рафіноза	4,02 ± 0,17	-	81,3*
Сорбіт	3,85 ± 0,23	-	80,5*
Дульцит	3,65 ± 0,13	-	72,6*
Етанол	-	-	-
Пальмітат Na	-	-	-
Сукцинат Na	-	-	-
Пропіонат Na	-	-	-

Примітка. * — встановлено статистичну різницю відносно контрольних даних;
“-” — ріст відсутній.

Отримані результати показують, що досліджувані бактерії добре росли у контрольному середовищі, що містило сульфати та лактат натрію. Протягом 14 діб культивування у цьому середовищі бактерії використали до 90% сульфату. Бактерії, що росли у середовищі з ацетатом активніше використовували сульфати (96%). У середовищі з глюкозою кількість використаного сульфату складала 78%. При вирощуванні бактерій у середовищах, у яких джерелом вуглецю були інші органічні сполуки, кількість використаного сульфату сягала рівня 72–81%. Виділені культури не росли у середовищі з етанолом, пальмітатом та сукцинатом (табл.). Усі виділені культури мали подібні до наведених в таблиці властивості.

Жодна з культур не росла у середовищі з сульфатами і пропіонатом, що включає їх можливу належність до роду *Desulfobulbus*. У середовищі з лактатом натрію і сульфатами усі бактерії, не нагромаджували в середовищі ацетат-іон. Перевірка здатності даних бактерій до спороутворення дала негативні результати, що свідчить про відсутність серед досліджуваних культур представників роду *Desulfotomaculum*.



Отже, дослідження ростових потреб, здатності утворювати спори, характерна паличкоподібна форма, ріст на середовищі з лактатом натрію, ацетатом та іншими джерелами вуглецю і відсутність росту на середовищі з етанолом, пальмітатом та сукцинатом дає підстави віднести виділені культури сульфатвідновлювальних бактерій до роду *Desulfobacter*.

Для визначення оптимальної температури росту штами бактерій пересівали у пробірки з рідким селективним середовищем та вирощували за різних температур. Оптимальною температурою для росту виділених бактерій виявилась 12 °C (рис. 1). Максимум нагромадження біомаси при 12 °C спостерігався на 9 добу культивування і складав 3,6 г/л.

На цей час із середовища практично повністю вичерпувалися сульфати, а у середовищі нагромаджувалося до 5 мМ гідроген сульфід. За температури 4 °C спостерігався незначний ріст (рис. 1) і біомаса клітин була у три рази менша, ніж при 12 °C.

Поряд з цим у середовищі виявлялося більше 50% внесених сульфатів. Підвищення температури культивування до 25 °C не супроводжувалося зростанням біомаси бактерій та підвищенням інтенсивності процесу сульфатредукції. За температури 37 °C бактерії не росли. Таким чином, активний ріст виділених бактерій та утворення ними гідроген сульфід при 12–25 °C свідчить про те, що вони є психрофільними мікроорганізмами.

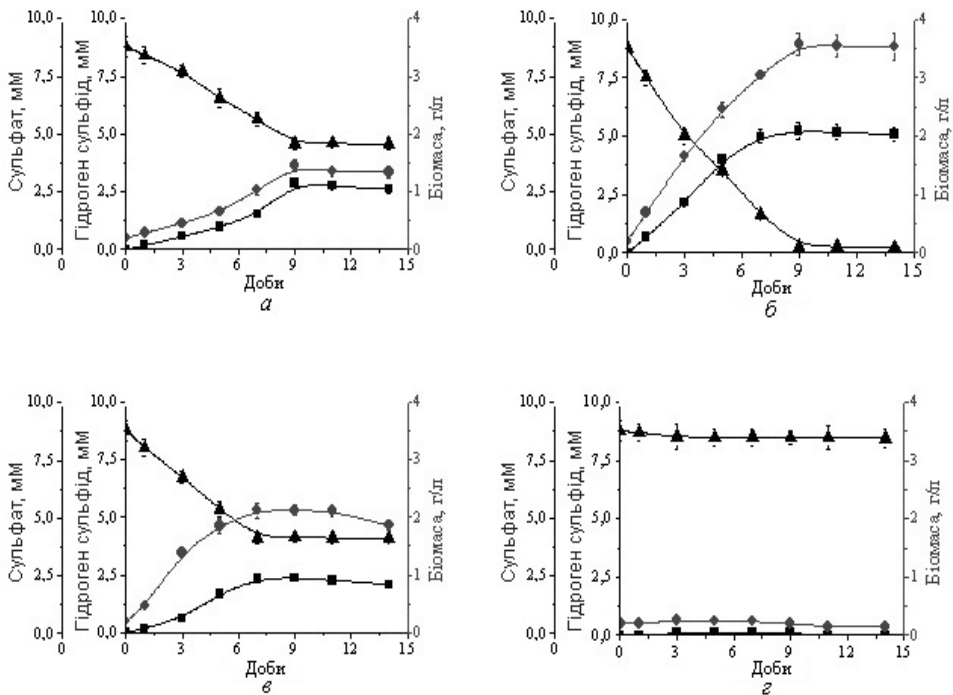


Рис. 1. Використання сульфату (-▲-) та нагромадження біомаси (-●-) і сульфіді (-■-) *Desulfobacter sp. 1* за різних температур: а – 4 °C, б – 12 °C, в – 25 °C і г – 37 °C

Fig. 1. Sulphate utilization (-▲-) and biomass (-●-) and sulphide (-■-) accumulation by *Desulfobacter sp. 1* at different temperatures: а – 4 °C, б – 12 °C, в – 25 °C and г – 37 °C

Концентрація сульфатів у середовищі виявилася важливим чинником, що визначає рівень нагромадження біомаси і переходу культури бактерій у стаціонарну фазу росту. Щоб встановити залежність росту виділених бактерій від концентрації сульфату, їх вирощували у середовищі з різними його концентраціями (рис. 2). За концентрації сульфату 4,4 мМ максимальний ріст бактерій спостерігався на п'яту добу культивування (рис. 2, а). У середовищі, що містило 8,8 мМ сульфату максимум нагромадження біомаси спостерігався на сьому добу культивування.

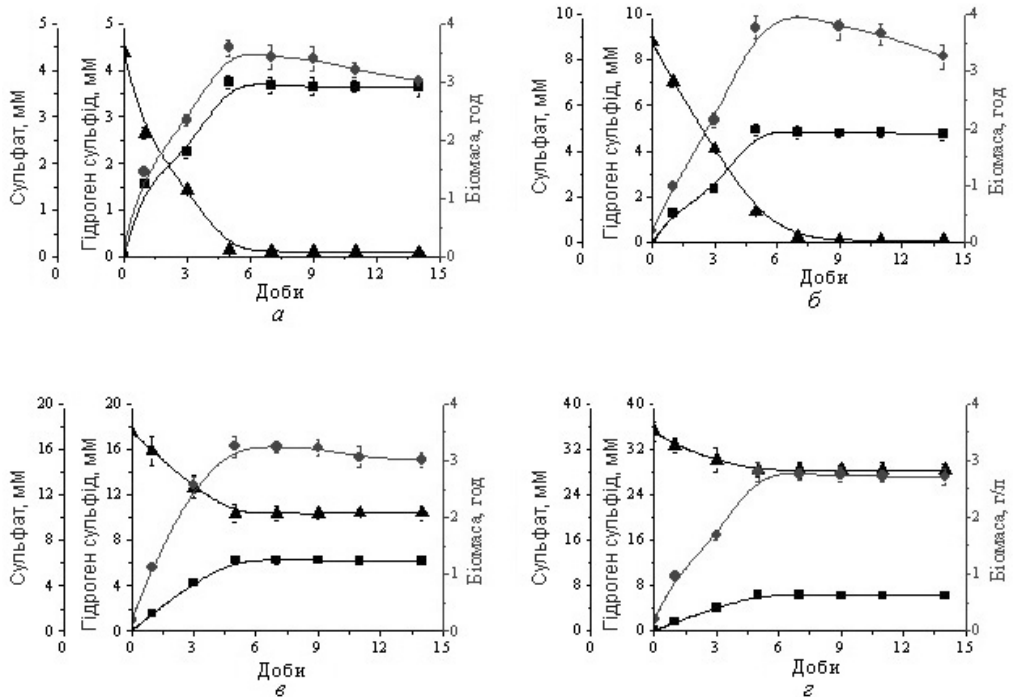


Рис. 2. Використання сульфату (-▲-) та нагромадження біомаси (-●-) і сульфідіду (-■-) *Desulfobacter sp. 1* у середовищі за різної концентрації сульфатів: а – 4,4 мМ; б – 8,8 мМ; в – 17,6 мМ; з – 35,2 мМ

Fig. 2. Sulphate utilization (-▲-) and biomass (-●-) and sulphide (-■-) accumulation by *Desulfobacter sp. 1* in the media with different sulphate concentrations: а – 4.4 mM; б – 8.8 mM; в – 17.6 mM; з – 35.2 mM

Аналіз динаміки використання сульфатів бактеріями показав, що на цей час культура практично повністю (> 97%) використовувала сульфат з середовища, що могло бути причиною припинення росту бактерій після сьомої доби культивування (рис. 2, а, б). Подальше збільшення концентрації сульфату (рис. 2, в, з) не сприяло зростанню біомаси. Причиною цього могло бути або дефіцит органічних речовин (донорів електронів) або токсична дія гідроген сульфідіду.

Раніше авторами було показано, що основним фактором, який лімітує ріст *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 за наявності в середовищі донорів і акцепторів електронів є гідроген сульфід [5]. Очевидно, подібна закономірність спостерігається і у представників роду *Desulfobacter*.



Таким чином, виділені нами штами психрофільних сульфатвідновлювальних бактерій за морфо-фізіологічними ознаками слід віднести до роду *Desulfobacter*. Їхній оптимальний ріст за температури 12 °С дає підстави вважати виділені культури перспективними для біотехнологічного використання при очищенні забруднених сульфатами середовищ в умовах помірного клімату.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бабко А.К., П'ятницький І.В. Кількісний аналіз. — К.: Вища школа, 1974. — 352 с.
2. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Білінська І.С. Практикум з мікробіології. Частина перша. — Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка. — 2003. — 80 с.
3. Лакін Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
4. *Определитель* бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Р. Крига, П.Снита, Дж. Стейли и С.Уильямса. — М.: Мир, 1997. — 432 с.
5. Перетятко Т.Б., Гнатуш С.О., Гудзь С.П. Утворення сульфідів *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 за різних умов культивування // Вісник Львів. ун-ту. Серія біол. — 2007. — 43. — С. 180—184.
6. *Почвы*. Метод определения ионов сульфата в водной вытяжке. ГОСТ 26426-85. — М.: Изд-во стандартов, 1985.
7. *Практикум по микробиологии* / Под ред. Н.С. Егорова. — М.: МГУ, 1976. — 355 с.
8. *Родина А.Г.* Методы водной микробиологии. Практ. руководство. М. — Л.: Наука, 1965. — 363 с.
9. Франк Ю.А., Герасимчук А.Л. Психротолерантные сульфатредуцирующие бактерии, перспективные для биотехнологии // XLIII международной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». (Новосибирск, 2005): тез. докл. — Новосибирск: Издательство НГУ, 2006. — С. 180—181.
10. Франк Ю.А., Лушников С.В. Биотехнологический потенциал сульфатредуцирующих бактерий // *Экология и промышленность*. — 2006. — 1. — С. 10—13.
11. Goulhen F., Gloter A., Guyot F., Bruschi M. Cr(VI) detoxification by *Desulfovibrio vulgaris* strain Hildenborough: microbe-metal interactions studies // *Applied microbial and cell physiology*. — 2006. — 71. — P. 892—897.
12. Lovely D.R. Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction // *J. Ind. Microbiol.* — 1995. — 14. — P. 85—93.
13. Postgate J.R. *The sulfate-reducing bacteria*. 2nd ed. — Cambridge: Cambridge Univ. press, 1984. — 199 p.
14. Poulson S.R., Colberg P.J.S., Drever J.I. Toxicity of heavy metals (Ni, Zn) to *Desulfovibrio desulfuricans* // *Geomicrobiol.* — 1997. — 14. — P. 41—49.
15. Tebo B.M., Obratsova A.Y. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(IV), Mn(IV) and Fe(III) as electron acceptors // *FEMS Microbiology Letters*. — 1998. — 162. — P. 193—198.

Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь

Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина, тел.: +38 (032) 239 40 53
e-mail: t_peretyatko@franko.lviv.ua

ПСИХРОФИЛЬНЫЕ ШТАММЫ СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Реферат

Из анаэробной зоны водоема, находящегося на территории Яворовского серного месторождения, выделены психрофильные сульфатвосстанавливающие бактерии (температурный оптимум 12 °С), идентифицированные как *Desulfovibrio sp.* На средах с сульфатами и органическими веществами бактерии восстанавливают сульфаты до сероводорода. В качестве источника углерода бактерии используют ацетат, лактат, глюкозу, рафинозу, галактозу, арабинозу, сорбит, дульцит. Выделенные бактерии могут быть использованы в странах с умеренным климатом для очистки вод, загрязненных сульфатами.

К л ю ч е в ы е с л о в а: психрофильные сульфатвосстанавливающие бактерии, сероводород, сульфат.

T.B. Peretyatko, S.P. Gudz

Ivan Franko National University of Lviv,
Hrushevsky str. 4, Lviv, 79005, Ukraine, tel.: +380 32 239 40 53
e-mail: t_peretyatko@franko.lviv.ua

PSYCHROPHILIC STRAINS OF SULPHATE-REDUCING BACTERIA

Summary

Psychrophilic sulphate-reducing bacteria that were isolated from anaerobic zone of Yavoriv storage lake are identified as *Desulfobacter sp.* These bacteria intensively reduce sulphate to hydrogen sulphide in the medium with sulphate and organic compounds. Among the investigated organic compounds bacteria use acetate, lactate, glucose, raffinose, galactose, arabinose, sorbitol and dulzite as carbon sources. Isolated psychrophilic sulphate-reducing bacteria can be considered as perspective for media with high sulphate content purification.

К e y w o r d s: psychrophilic sulphate-reducing bacteria, hydrogen sulphide, sulphate.

