

УДК 631.461.7+579.695

**Л.С. Дорош, Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь**

Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна, тел.: +38(097) 990 07 98,  
e-mail: Dorosh\_lilya@ukr.net

## **ВПЛИВ НІТРАТУ НА СУЛЬФІДОГЕННУ АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ *DESULFOMICROBIUM SP. CRR3***

*Метою цієї роботи було дослідити вплив нітрату на ефективність відновлення сульфату і нагромадження гідроген сульфїду бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3*. Методи. Об'єктом дослідження були хромрезистентні сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3*. Вплив нітрату на сульфїдогенну активність бактерій визначали за зміною біомаси та концентрації сульфату, нітрату, нітриту, амонію та гідроген сульфїду в культуральному середовищі. Результати. За внесення у середовище 5 мМ нітрату спостерігали пригнічення сульфатредукції на 40 % у бактерій *Desulfomicrobium sp. CrR3*. Із збільшенням концентрації нітрату до 10 мМ відбувається повне пригнічення сульфатредукції. Висновки. Одержані результати свідчать про те, що нітрат у високих концентраціях пригнічує сульфатредукцію у бактерій *Desulfomicrobium sp. CrR3*.*

*Ключові слова: нітрат, сульфїдогенна активність, сульфатвідновлювальні бактерії.*

Окиснення органічних речовин та відновлення сульфату мікроорганізмами в процесах анаеробного дихання відіграє важливу роль у мінералізації цих сполук в природі. Однак, при цьому утворюється гідроген сульфїд, що має неприємний запах та виявляє токсичну, мутагенну та канцерогенну дії. Він також знижує вміст оксигеновмісних сполук у водоймах [4]. При нафтовидобуванні в результаті взаємодії гідроген сульфїду з йонами важких металів утворюються сульфїди – нерозчинні сполуки, які знижують нафтовіддачу пластів [9]. Пригнічення сульфїдогенної активності сульфатвідновлювальних бактерій може бути одним із способів зниження рівня гідроген сульфїду у навколишньому середовищі.

Для пригнічення сульфїдогенної активності найчастіше застосовують інгібітори сульфатредукції та біомодифікатори [6].

Інгібітори сульфатредукції специфічно конкурують з йонами сульфату за активний центр АТФ-сульфурилази, в результаті чого утворюється нестабільний комплекс АМФ-сульфат, що швидко гідролізується до АМФ та сульфату. Повторні реакції з інгібітором приводять до виснаження запасу АТФ для активації сульфатів, що в кінцевому результаті призводить до пригнічення росту сульфатвідновлювальних бактерій. Крім того, інгібітори сульфатредукції пригнічують

© Л.С. Дорош, Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь, 2015



транспорт сульфату в клітини бактерій. До інгібіторів належать антрахінони, хромати, селенати, молібдат [6] та інші. Відомо, що останній спричиняє дисбаланс запасів АТФ у клітині *Desulfovibrio sp.* [10].

До біомодифікаторів належать нітрат [6] та нітрит [15], які можуть використовуватися деякими бактеріями як альтернативні акцептори електронів [14]. Дія нітрату та нітриту синергічна [6, 15]. За високої концентрації нітрату сульфатвідновлювальні бактерії можуть використовувати їх як акцептори електронів [2]. Концентрація біомодифікаторів для пригнічення утворення гідроген сульфідів залежить від вмісту джерела карбону в середовищі та інших чинників [6, 15].

Метою цієї роботи було дослідити вплив нітрату на ефективність відновлення сульфату і нагромадження гідроген сульфідів бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3*.

### Матеріали та методи

У роботі використовували хромрезистентні сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3* [3].

Бактерії культивували у середовищі Постгейта С за температури 30 °С у пробірках об'ємом 25 мл за анаеробних умов. Анаеробні умови забезпечували кип'ятінням та швидким охолодженням середовища культивування, що призводить до зменшення в ньому розчинного кисню, а також додаванням аскорбінової кислоти чи  $\text{Na}_2\text{S}$ . Пробірки повністю заповнювали середовищем і закривали гумовими корками [13].

Біомасу визначали фотометрично на фотоелектроколориметрі КФК-3 за мутністю клітинної суспензії.

Вміст сульфату визначали турбідиметрично після його осадження барій хлоридом з утворенням барій сульфату. Для стабілізації суспензії використовували гліцерин [14].

Кількість гідроген сульфідів у культуральній рідині визначали фотометрично з використанням з *n*-амінодиметиланіліндигідрохлориду. У результаті взаємодії гідроген сульфідів з *n*-амінодиметиланілін-дигідрохлоридом утворюється комплексна сполука синього кольору [16].

Вміст нітриту визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 540 нм з використанням *n*-нафтилетилендіаміндихлориду. Метод ґрунтується на діазотуванні сульфанілової кислоти нітритами і взаємодії утвореної солі з *n*-нафтилетилендіаміндихлоридом. Нітрат визначали після визначення концентрації нітриту методом діазотування. Як відновник використовували цинковий порошок [7].

Концентрацію амонію визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 640 нм. Метод ґрунтується на утворенні індофенолу голубого кольору в результаті взаємодії амонію, фенолу та гіпохлориту за високого значення рН [8].

Вплив нітрату на сульфідогенну активність бактерій визначали за зміною біомаси та концентрації сульфатів, нітрату і нітриту у культуральному середовищі, а також за зміною кількості гідроген сульфідів.



Результати наводили як середнє значення з поправкою на стандартну похибку ( $M \pm m$ ). Статистичне оброблення отриманих результатів проводили з використанням програми «Origin 6.1».

### Результати і обговорення

Сульфатвідновлювальні бактерії можуть використовувати різні оксоаніони як акцептори електронів за анаеробного окиснення органічних сполук [2]. Виходячи з цього спочатку дослідили використання нітрату як єдиного акцептора електронів при окисненні лактату (рис. 1, Б), контролем при цьому було середовище, у якому акцептором електронів був сульфат (рис. 1, А).

Дані рис. 1 показують, що ріст і використання сульфату та нітрату бактеріями *Desulfomicrobium* sp. CrR3 відрізнялися незначно. Біомаса бактерій, вирощених у середовищі з сульфатом, становила 2,4 г/л, тоді як з нітратом – 3 г/л. У середовищі з сульфатами нагромаджується гідроген сульфід у концентрації 4 мМ, а нітратами – амоній (6 мМ). У процесі нітратредукції утворюється нітрит у концентрації 2 мМ, який практично повністю вичерпується після 4 діб культивування.

Результати досліджень свідчать про здатність бактерій *Desulfomicrobium* sp. CrR3 використовувати нітрат і сульфат як акцептори електронів.

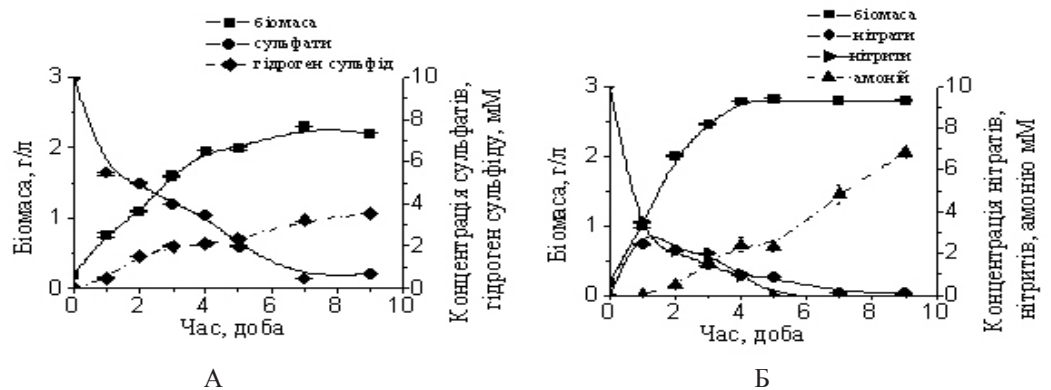


Рис. 1. Ріст *Desulfomicrobium* sp. CrR3 у середовищі з лактатом (як донором електронів) за внесення сульфату (А) та нітрату (Б) як кінцевих акцепторів електронів

Fig. 1. The growth of *Desulfomicrobium* sp. CrR3 in the medium with lactate (as electron donors), with the addition sulfate (A) and nitrate (B) as terminal electron acceptors

У природних умовах забруднення середовища відбувається, як правило, багатьма токсичними сполуками одночасно, забруднювачами найчастіше бувають нітрат, нітрит, хромати, молібдати, солі важких металів тощо. Цікаво було дослідити як відбувається використання різних можливих акцепторів електронів за їхньої одночасної присутності в середовищі. Результати досліджень, представлені у табл. 1, свідчать про те, що за одночасної наявності у



середовищі сульфату і нітрату інтенсивніше використовується нітрат (100 % використання нітрату на 8 добу культивування). За наявності у середовищі 10 мМ нітрату та сульфату одночасно ефективність використання сульфату бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3* знижується на 50 %. За цих умов у середовищі нагромаджується близько 2 мМ гідроген сульфід, що удвічі менш порівняно з контрольними показниками (рис. 1, А, табл. 1).

Таблиця 1

**Ріст та використання сульфату і нітрату бактеріями  
*Desulfomicrobium sp. CrR3* за їхньої одночасної наявності у середовищі**

Table 1

**The growth and utilization of sulfate and nitrate by bacteria  
*Desulfomicrobium sp. CrR3* at their simultaneous presence in the medium**

Час, доба	Біомаса, г/л	Сульфат, мМ	Гідроген сульфід, мМ	ЕВ* SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , %	Нітрат, мМ	Нітрит, мМ	Амоній, мМ	ЕВ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , %
0	0,2	10	0	0	10	0	0	0
1	0,69±0,08	8,44±0,35	0	15,6	5,36±0,25	0	0,80±0,14	46,4
2	1,05±0,07	8,31±0,42	0,97±0,04	16,3	4,81±0,31	2,51±0,22	1,54±0,12	51,9
3	1,95±0,12	7,35±0,43	1,32±0,08	16,9	3,84±0,22	1,96±0,14	2,35±0,18	61,6
4	2,12±0,10	6,04±0,27	1,42±0,12	39,6	2,58±0,18	1,31±0,15	3,25±0,25	74,2
5	2,17±0,13	5,32±0,43	1,45±0,14	46,8	2,36±0,25	0,32±0,12	4,48±0,35	76,4
7	2,25±0,02	5,21±0,34	1,51±0,18	47,9	0,17±0,05	0	5,84±0,25	98,3
8	2,41±0,12	5,45±0,25	1,82±0,10	45,5	0	0	6,01±0,33	100
9	2,12±0,14	4,84±0,31	1,92±0,14	51,6	0	0	0	100

Примітка: ЕВ\* – ефективність використання.

Одержані результати свідчать, про те, що бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3* здатні використовувати сульфат- та нітрат одночасно, як бактерії *Desulfovibrio desulfuricans* DT101 [2], на відміну від бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* CS4, у яких спостерігали повне інгібування нітратредукції за наявності гідроген сульфід, як кінцевого продукту дисиміляційної сульфатредукції [10].

За високих концентрацій нітрату бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3* протягом 9 діб культивування не використовували сульфат як акцептор електронів. Про це свідчить характер кривої росту бактерій і вміст сульфату в середовищі. Навіть при вичерпуванні нітрату біомаса бактерій не зростає, не дивлячись на високий вміст сульфату (рис. 2).



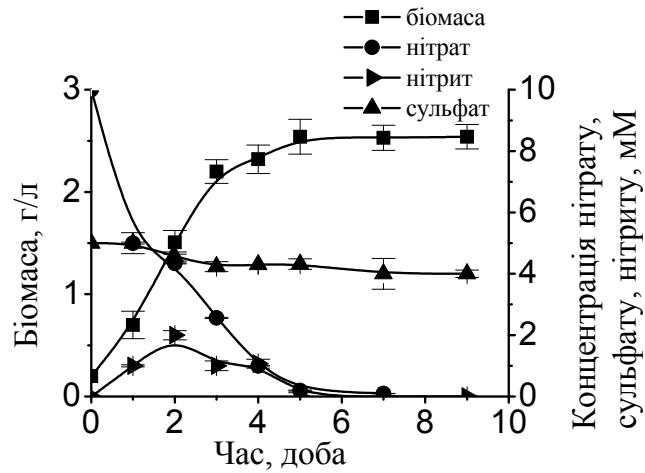


Рис. 2. Ріст та використання сульфату бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3* за наявності нітрату у середовищі

Fig. 2. The growth and utilization of sulfate by bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3* at the presence of nitrate in the medium

Анаеробні сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3* здатні використовувати нітрат як акцептори електронів в процесі безкисневого окиснення органічних сполук, що, очевидно, може знайти практичне застосування цих бактерій при очистці середовища від нітрату. Важливим фактором при цьому слід враховувати співвідношення компонентів середовища і в першу чергу акцепторів електронів.

Бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3* здатні до дисиміляційної сульфат-та нітратредукції. Оскільки за культивування їх з сульфатом та нітратом як єдиними акцепторами електронів у середовищі спостерігали нагромадження гідроген сульфід (4 мМ) та амонію (6 мМ), відповідно. При цьому біомаса бактерій зростала до 3 г/л.

За одночасного внесення у середовище 5 мМ нітрату та 10 мМ сульфату спостерігали пригнічення сульфатредукції на 40%. Із збільшенням концентрації нітрату до 10 мМ відбувається повне пригнічення сульфатредукції у бактерій *Desulfomicrobium sp. CrR3*.

УДК 631.461.7+579.695

**Л. С. Дорош, Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь**

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,  
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина, тел.: +38(097)990 07 98,  
e-mail: Dorosh\_lilya@ukr.net

## **ВЛИЯНИЕ НИТРАТА НА СУЛЬФИДОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ *DESULFOMICROBIUM SP. CRR3***

### **Реферат**

**Целью** этой работы было исследовать влияние нитрата на эффективность восстановления сульфата и накопление сульфида бактериями *Desulfomicrobium sp. CrR3*. **Методы.** Объектом исследования были хромрезистентные сульфатредуцирующие бактерии *Desulfomicrobium sp. CrR3*. Влияние нитрата на сульфидогенную активность бактерий определяли по изменению биомассы и концентрации сульфата, нитрата, нитрита, аммония и сероводорода в культуральной среде. **Результаты.** При внесении в культуральную среду 5 мМ нитратов наблюдали ингибирование сульфатредукции на 40 %. С увеличением концентрации нитратов до 10 мМ происходит полное подавление сульфатредукции бактериями *Desulfomicrobium sp. CrR3* и роста примерно на 50 % и полное подавление образования сероводорода. **Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что внесение нитрата подавляет процесс сульфатредукции у бактерий *Desulfomicrobium sp. CrR3*.

*Ключевые слова:* нитрат, сульфидогенная активность, сульфатредуцирующие бактерии.

UDC 631.461.7+579.695

**L. S. Dorosh, T. B. Peretyatko, S. P. Gudz**

Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine  
4, Hrushevsky Str., Lviv, 79005, Ukraine, tel.: +38(097)990 07 98,  
e-mail: Dorosh\_lilya@ukr.net

## **INFLUENCE OF NITRATE ON SULFIDOGENIC ACTIVITY OF BACTERIA *DESULFOMICROBIUM SP. CRR3***

### **Summary**

**The aim** of this work was to study influence of nitrate on the effectivity of sulphate reduction and accumulation of hydrogen sulfide by bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3*. **Methods.** The object of the study was chromiumresistant sulphate-reducing bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3*. Effect of nitrate on sulfidogenic activity of bacteria was determined by the change of biomass and concentration of sulfates, nitrate and hydrogen sulfide in culture medium. **Results.** It was established the influence of nitrate ions on sulfidogenic activity of bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3*. 5 mM nitrate in adding culture medium caused the inhibition of sulphate reduction by 40 %. With the increase of nitrate concentrations up to 10 mM the inhibition of sulfate reduction was completely. **Conclusions.** The results indicate that the addition of nitrate caused the inhibition of the dissimilatory sulfate reduction by bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3*.

*Key words:* nitrate, sulfidogenic activity, sulphate-reducing bacteria.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Лакін Г. Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
2. Тарасова Н. Б., Горшков О. В., Петрова О. Е. Нитратредуктазная активность *Desulfovibrio desulfuricans* ВКМ 1388 // Микробиология. – 2009. – 78, № 2. – С. 192–196.
3. Шоляк К.В., Перетятко Т.Б., Гудзь С. П. Хромрезистентні сульфат-відновлювальні бактерії, виділенні із стічних вод промислових підприємств // Микробиологія і біотехнологія. – 2013. – № 2. – С. 66–76.
4. Bordado J. C.M., Gomes J.F. P. Emission and odour control in Kraft pulp mills // J. Cleaner Production. – 2003. – № 11. – P. 797–801.
5. Birkeland N. K. Sulfate-reducing bacteria and Archaea // **Petroleum microbiology**. ASM Press, Washington. – 2005. – P. 35–54.
6. Bratcova S., Groudev S., Georgiev P. The effect of some essential environmental factors on the microbial dissimilatory sulphate reduction // Mining Miner Process. – 2002. – 44, № 2. – P. 123–127.
7. Granger D. L., Taintor R. R., Boockvar K. S. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction // Methods in Enzymology. – 1996. – № 268. – P. 142–151.
8. Ivančić I., Degobbis D. An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by the indophenol blue method // Wat. Res. – 1984. – № 18. – P. 1143–1147.
9. Magot M., Ollivier B., Patel B. Microbiology of petroleum reservoirs // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2000. – № 77. – P. 103–116.
10. Marietou A., Griffiths L. Preferential reduction of the thermodynamically less favorable electron acceptor, sulfate, by nitrate-reducing strain of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* 27774 // J. Biol. – 2008. – 191, № 3. – P. 882–889.
11. Okabe S., Ito T., Satoh H. Sulphate-reducing bacterial community structure and their contribution to carbon mineralization in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – 63. – P. 322–334.
12. Polanco F.F., Polanco M. F., Uruena M. A., Garcia P.A., Villaverde S. Combining the biological nitrogen and sulphur cycles in anerobic conditions // Wat. Sci. Tech. – 2001. – 44, № 8. – P. 77–84.
13. Postgate J. R. *The sulphate reducing bacteria*. –2nd Edition. Cambridge University Press. Cambridge, 1984. – 1–123 p.
14. ГОСТ 26426-85. Почвы. Метод определения ионов сульфата в водной вытяжке. – М.:Изд-во стандартов, 1985.
15. United States Patent № 6309597. Method for reducing hydrogen sulphide level in water containing sulphate reducing bacteria and hydrogen sulphide metabolizing bacteria / Ballinger, K.E., Burger, E.D., Knauer, R.F., 2001.
16. United States Patent № 6.340.596. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen / Sugiyama M., 2002.

Стаття надійшла до редакції 21.05.2015 р.

