

УДК: 579.811.2/3+577.12.+577.151

О.М. Мороз¹, І.Б. Русин²

¹Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна, e-mail: moroz_oksana@yahoo.com

²Національний університет „Львівська політехніка”,
вул. С. Бандери, 12, Львів, 79013, Україна

ВИКОРИСТАННЯ СПОЛУК НІТРОГЕНУ БАКТЕРІЯМИ ЦИКЛУ СУЛЬФУРУ ОЗЕРА ЯВОРІВСЬКЕ

Встановлено, що нітрат і нітрит негативно впливають на ріст, утворення та окиснення гідроген сульфід у бактеріями циклу сульфору. Сірковідновлювальні бактерії *Desulfuromonas acetoxidans* Yavor-12 і сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6 здійснюють дисиміляційну сірко- та сульфатредукцію з утворенням гідроген сульфід при використанні амонійної та амінної форм нітрогену. Сірковідновлювальні бактерії не використовують нітроген амонію та лізину у середовищі без сульфору, вони не здатні до здійснення нітрат- чи нітритредукції. Сульфатвідновлювальні бактерії не засвоюють нітроген амонію і лізину у середовищі без сульфатів та здійснюють дисиміляційну нітрат- та нітритредукцію з утворенням амонію. Зелені фототрофні сіркобактерії *Chlorobium limicola* IMB K-8 використовують амонійний та амінний нітроген і не засвоюють нітроген нітрату та нітриту. За впливу Co^{2+} , Ni^{2+} та Cd^{2+} відбувається інгібування росту бактерій та утилізації ними гідроген сульфід у середовищі з амонієм та/або лізином. За наявності металів на метаболізм бактерій менший, ніж за нітрогену нітрату чи нітриту.

Ключові слова: нітрат, нітрит, амоній, лізин, *Desulfuromonas acetoxidans*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Chlorobium limicola*, гідроген сульфід, нікель, кобальт, кадмій.

Техногенне забруднення водних ресурсів іонами важких металів та агресивними сполуками сульфору і нітрогену з кожним роком набуває все більш загрозливих масштабів [2, 7, 8]. Це особливо стосується водойм, які виникли на місці недіючих сірковидобувних підприємств. У верхніх водних шарах найбільш інтенсивно протікають процеси окиснення сульфору, здійснювані сіркоокиснювальними бактеріями, продуктом яких є сульфати. Сульфати і сульфур використовуються сульфат- і сірковідновлювальними бактеріями як акцептори електронів при окисненні органічних сполук, у результаті чого утворюється отруйний для живих організмів гідроген сульфід. У глибинній зоні водойм, куди ще проникає світло, детоксика-

© О.М. Мороз, І.Б. Русин, 2012



цію H_2S здійснюють фототрофні сіркобактерії, які використовують його як донор електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу [8]. Найбільш доступним джерелом нітрогену для мікроорганізмів є амоній, який утворюється внаслідок азотфіксації та відновлення нітратів. Окиснені атоми нітрогену можуть відновлювати не всі азотфіксувальні мікроорганізми, а лише ті, які синтезують нітрат- і нітритредуктазу [9].

Факультативно анаеробні бактерії здійснюють окиснення органічних субстратів або H_2 з використанням замість кисню таких акцепторів електронів як сульфат, сульфур, нітрат, нітрит, фумарат, Fe (III), диметилсульфоксид, N-оксид триметиламіну, CO_2 або органічні сполуки (анаеробне дихання). Дисиміляційне відновлення нітратів відбувається з утворенням NO_2^- , NO, N_2O та N_2 (денітрифікація) або нітриту за участю НАД(Ф)Н чи відновленого менахінону може безпосередньо відновлюватися до NH_3/NH_4^+ (амоніфікація нітрату) [9]. Описано нітратредукцію з утворенням нітриту і подальшим відновленням його до NH_4^+ у сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* та сірковідновлювальних бактерій *Wolinella succinogenes* [10, 12]. Нітрати не використовуються фототрофними зеленими сіркобактеріями *Chlorobium limicola* як джерело нітрогену, їх наявність у середовищі пригнічує транспорт амонію в клітину і засвоєння молекулярного та амінного нітрогену [6]. За умов дефіциту нітрогену цими бактеріями синтезуються підвищені кількості запасного продукту у вигляді глікогену [2, 6].

Метою роботи було дослідити вплив різних сполук нітрогену та іонів одних з найбільш токсичних для мікроорганізмів важких металів (кобальту, нікелю та кадмію [7]) на нагромадження біомаси, біогенез та утилізацію гідроген сульфідну бактеріями циклу сульфур, виділеними з водойми Яворівського сіркового родовища.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були сірковідновлювальні бактерії *Desulfuromonas acetoxidans* Yavor-12, сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfovibrio desulfuricans* ІМВ К-6, фотосинтезувальні зелені сіркові бактерії *Chlorobium limicola* ІМВ К-8. Штами виділені з води Яворівського озера, ідентифіковані і зберігаються в колекції кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка [2, 10, 11].

Біомасу визначали за мутністю суспензії клітин шляхом її фотометрування на фотоелектроколориметрі КФК-3 у кюветі з оптичним шляхом 3 мм і розраховували за формулою: $C, \text{ г/л} = (E \cdot n) / K$, де n – фактор розведення; E – екстинкція при 340; 340 і 450 нм; K – коефіцієнт перерахунку, отриманий за калібрувальною кривою залежності екстинкції від маси сухих клітин, визначеної ваговим методом, рівний 0,72; 0,19 і 0,131 для сірко- та сульфатвідновлювальних і зелених сіркобактерій, відповідно.

Сірко- та сульфатвідновлювальні бактерії вирощували у середовищі Кравцова-Сорокіна [4] без сульфатів з елементним сульфуром та з



сульфатами, відповідно, упродовж 10 діб у пробірках, об'ємом 25 мл, доверху заповнених середовищем і щільно закритих гумовими корками, в анаеростатах в атмосфері аргону при 30 °С.

Для вивчення впливу сполук нітрогену на ріст та утворення гідроген сульфід у сірко- та сульфатвідновлювальними бактеріями їх вирощували до середини експоненційної фази росту, осаджували центрифугуванням при 4025 g впродовж 30 хв і вносили в середовище з NH_4Cl чи без, до концентрації 10^8 КУО/мл, культивували впродовж 10 діб. Сполуки нітрогену: NH_4Cl ; NaNO_3 ; NaNO_2 ; лізин ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$), вносили у середовище у вигляді окремо приготованих стерильних розчинів за масою нітрогену в сполуці, рівною вмісту нітрогену у NH_4Cl стандартного середовища (0,042 г/л або 3 мМ). Для перевірки здатності клітин здійснювати дисиміляційне відновлення нітратів чи нітритів бактерії вирощували у середовищі без сульфурі або без сульфатів і без NH_4Cl . У цьому випадку до середовища додавали сірковмісну амінокислоту цистеїн (0,15 г/л) для задоволення асиміляційних потреб бактерій у сульфурі, а також сполуки нітрогену. Для дослідження здатності сульфатвідновлювальних бактерій використовувати сульфати і нітрати їх вирощували у середовищі з однаковим вмістом цих іонів — 3,5 мМ (стандартний вміст іонів сульфату у середовищі Кравцова-Сорокіна) з NH_4Cl . Для виявлення молекулярного нітрогену в пробірці поміщали поплавки запаяним кінцем догори (середовище з нітратом чи нітритом), у культуральній рідині визначали концентрації гідроген сульфід у йодометричним [5], сульфатів турбидиметричним [1], нітратів, нітритів спектрофотометричним [13] та амонію колориметричним методом за утворенням індофенолу [14].

Клітини зелених фототрофних сіркобактерій культивували у середовищі GSB [15]. Для вивчення впливу іонів важких металів та різних сполук нітрогену на ріст і окиснення гідроген сульфід у *C. limicola* IMB K-8 клітини вирощували до середини експоненційної фази росту, осаджували центрифугуванням при 4025 g впродовж 30 хв, ресуспендували у стерильному розчині NaCl (0,9%) та інкубували за стерильних умов упродовж 1 год з стерильними розчинами NiCl_2 , CoCl_2 та CdSO_4 за концентрації 1,5 мМ (попередньо встановлена нами мінімальна концентрація важких металів, за якої виявлено значне пригнічення фотоасиміляції клітинами гідроген сульфід у процесі аноксигенного фотосинтезу [7]) і без металів (контроль). Клітини двічі відмивали дистильованою водою, осаджували центрифугуванням і вносили в пробірки (концентрація в середовищі — $5 \cdot 10^8$ КУО/мл). До середовища додавали розчини NaNO_3 , NaNO_2 , $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ за масою нітрогену в NH_4Cl (контроль), (0,09 г/л). До середовища з NH_4Cl додавали стерильні розчини NaNO_3 , NaNO_2 , $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ і не додавали додаткового джерела нітрогену (контроль) для вивчення впливу нітрату, нітриту та лізину на засвоєння клітинами амонійної форми нітрогену. Бактерії культивували впродовж 10 діб на світлі (40 лк, $\lambda=700-800$ нм) у пробірках, об'ємом 25 мл, доверху запо-



внених середовищем і щільно закритих гумовими корками, розміщених в анаеростатах в атмосфері аргону при 30 °С.

Всі експерименти проводили щонайменше тричі, результати опрацьовували статистично [3].

Результати та їх обговорення

Для вивчення впливу різних сполук нітрогену на утворення гідроген сульфіді сірковідновлювальні бактерії *D. acetoxidans* Yavor-12 культивували у середовищі Кравцова-Сорокіна без сульфатів з сульфуром з чи без NH₄Cl (табл. 1). За наявності амоній хлориду, а також нітрату чи нітриту у середовищі пригнічується засвоєння бактеріями амонійної форми нітрогену, про що свідчить низький ріст та у понад 5 разів нижчий, ніж у контрольному варіанті, рівень утвореного клітинами гідроген сульфіді. При додаванні у середовище з амоній хлоридом лізину бактерії росли та нагромаджували H₂S на рівні контролю.

Таблиця 1

Біомаса та утворення гідроген сульфіді *Desulfovibrio acetoxidans* Yavor-12 після 10 діб росту у середовищі Кравцова-Сорокіна без сульфатів з різними сполуками нітрогену**

Table 1

Biomass and hydrogen sulfide formation by *Desulfovibrio acetoxidans* Yavor-12 after 10 days growth in Kravtsov-Sorokin medium without sulfates with different nitrogen compounds**

Елементний сульфур у середовищі	Сполуки нітрогену в середовищі	Біомаса, г/л	[S ²⁻], мМ
Наявний	NH ₄ Cl (контроль)	3,60±0,05	1,09±0,05
	NH ₄ Cl, NaNO ₃	0,05±0,01*	0,16±0,01*
	NH ₄ Cl, NaNO ₂	0,04±0,01*	0,20±0,02*
	NH ₄ Cl, C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	3,91±0,09	1,05±0,02
	NaNO ₃	0,06±0,02*	0
	NaNO ₂	0,04±0,01*	0
	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	3,26±0,10	1,07±0,04
Відсутній	NH ₄ Cl	0,05±0,01*	0
	NH ₄ Cl, NaNO ₃	0,04±0,01*	0
	NH ₄ Cl, NaNO ₂	0,04±0,01*	0
	NH ₄ Cl, C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	0,04±0,02*	0
	NaNO ₃	0,05±0,04*	0
	NaNO ₂	0,04±0,05*	0
	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	0,04±0,01*	0

Примітки: * – p ≤ 0,05;

** – вихідна концентрація [S⁰] у середовищі – не менш ніж 3,5 мМ

** – initial [S⁰] concentration in medium – no less than 3.5 mM



Таким чином, встановлено, що нітрат і нітрит пригнічують засвоєння сірководновлювальними бактеріями амонійної форми нітрогену. Наявність у середовищі амонійної форми нітрогену стимулює використання його амонійної форми бактеріями. Якщо у середовищі наявні нітрат або нітрит як єдина форма нітрогену, то повністю пригнічується як ріст сірководновлювальних бактерій, так і утворення ними гідроген сульфід. При додаванні до середовища лізину без додаткового джерела нітрогену біомаса *D. acetoxidans* Yavog-12 виявилася незначно нижчою, ніж у контролі. За цих умов клітини активно утворювали H_2S . Можливо, амонійна форма нітрогену є найбільш засвоюваною для сірководновлювальних бактерій. Отже, виявлено, що нітрат і нітрит не засвоюються *D. acetoxidans* Yavog-12, оскільки спостерігали повне пригнічення як росту, так і утворення бактеріями гідроген сульфід. Вони активно здійснювали дисиміляційну сіркоредакцію при використанні як амонійної, так і амонійної форм нітрогену.

Для перевірки здатності використовувати нітроген різних сполук і здійснювати нітрат- чи нітритредукцію сірководновлювальні бактерії вирощували у середовищі без сульфур з чи без NH_4Cl та різними джерелами нітрогену (див. табл. 1). Бактерії не засвоювали нітроген амонію, лізину, нітрату та нітриту у середовищі без сульфур, оскільки у всіх варіантах досліду росту не спостерігали. Бактерії виявилися нездатними засвоювати нітроген амоній хлориду не лише у присутності нітрату або нітриту, але і лізину, якщо у середовищі був відсутній сульфур. Бактерії виявилися не здатними до здійснення нітрат- чи нітритредукції, оскільки в експериментах з NO_3^- та NO_2^- не спостерігали виділення молекулярного нітрогену, а також якісні реакції на нітрита та амоній дали негативні результати.

З метою дослідження впливу різних сполук нітрогену на утворення гідроген сульфід сульфатвідновлювальні бактерії *D. desulfuricans* IMB K-6 культивували у середовищі Кравцова-Сорокіна з сульфатами з чи без NH_4Cl (табл. 2). За наявності амоній хлориду, а також нітрату чи нітриту у середовищі з сульфатами незначно пригнічується засвоєння бактеріями амонійної форми нітрогену. Про це свідчить дещо нижчий, ніж у контролі, ріст та у 1,5 рази нижчий, ніж у контрольному варіанті, рівень утвореного клітинами гідроген сульфід. Клітини росли та нагромаджували H_2S на рівні контролю, якщо у середовище додавали лізин разом з NH_4Cl . Таким чином, встановлено, що нітрат і нітрит незначно пригнічують засвоєння сульфатвідновлювальними бактеріями амонійної форми нітрогену. Наявність у середовищі амонійної форми нітрогену стимулює використання його амонійної форми бактеріями. Якщо у середовищі з сульфатами наявні нітрат або нітрит як єдина форма нітрогену, то майже вдвічі пригнічується як ріст сульфатвідновлювальних бактерій, так і утворення ними гідроген сульфід. При додаванні до середовища лізину без додаткового джерела нітрогену спостерігали добрий ріст *D. desulfuricans* IMB K-6. Біомаса виявилася лише незначно нижчою,



ніж у контролі. За цих умов клітини активно утворювали H_2S . Можливо, амонійна та амінна форми нітрогену є найбільш засвоєваними для *D. desulfuricans* ІМВ К-6. Отже, виявлено, що нітрат і нітрит у середовищі з сульфатами (з чи без NH_4Cl) засвоюються *D. desulfuricans* ІМВ К-6, хоча спостерігається нижча біомаса і нижчий рівень утворення гідроген сульфіді, ніж у контролі. Клітини активно здійснювали дисиміляційну сульфатредукцію з утворенням гідроген сульфіді при використанні як амонійної, так і амінної форм нітрогену.

Таблиця 2

Біомаса та утворення гідроген сульфіді *Desulfovibrio desulfuricans* ІМВ К-6 після 10 діб росту у середовищі Кравцова-Сорокіна з різними сполуками нітрогену**

Table 2

Biomass and hydrogen sulfide formation by *Desulfovibrio desulfuricans* IMV K-6 after 10 days growth in Kravtsov-Sorokin medium with different nitrogen compounds**

Сульфати в середовищі	Сполуки нітрогену в середовищі	Біомаса, г/л	$[S^{2-}]$, мМ
Наявні	NH_4Cl (контроль)	3,52±0,03	2,45±0,04
	NH_4Cl , $NaNO_3$	2,53±0,08	1,67±0,05
	NH_4Cl , $NaNO_2$	2,64±0,01	1,65±0,03
	NH_4Cl , $C_6H_{14}N_2O_2$	3,76±0,03	2,46±0,08
	$NaNO_3$	1,95±0,02	1,35±0,05
	$NaNO_2$	1,95±0,01	1,32±0,02
	$C_6H_{14}N_2O_2$	3,25±0,10	2,42±0,06
Відсутні	NH_4Cl	0,05±0,01*	0
	NH_4Cl , $NaNO_3$	1,82±0,04	0
	NH_4Cl , $NaNO_2$	1,84±0,04	0
	NH_4Cl , $C_6H_{14}N_2O_2$	0,05±0,01*	0
	$NaNO_3$	1,64±0,09*	0
	$NaNO_2$	1,74±0,04*	0
	$C_6H_{14}N_2O_2$	0,05±0,01*	0

Примітки: * – $p \leq 0,05$;

** – вихідна концентрація $[SO_4^{2-}]$ у середовищі – 3,5 мМ

** – initial $[SO_4^{2-}]$ concentration in medium – 3.5 mM

Для з'ясування здатності використовувати нітроген різних сполук і здійснювати дисиміляційну нітрат- чи нітритредукцію сульфатвідновлювальні бактерії вирощували у середовищі без сульфатів з чи без NH_4Cl та різними сполуками нітрогену (див. табл. 2). Бактерії виявилися не-



здатними засвоювати нітроген не тільки амоній хлориду, але і лізину, якщо у середовищі були відсутні сульфати як акцептор електронів. За наявності у середовищі нітрату та нітриту, у присутності чи без NH_4Cl , спостерігали добрий ріст бактерій, хоча біомаса виявилася майже вдвічі нижчою, ніж у середовищі з NH_4Cl та сульфатами. Під час росту бактерій у середовищі з нітратом або нітритом виділення молекулярного нітрогену не спостерігали, очевидно, у зв'язку з їх безпосереднім відновленням до амонію.

Дослідження здатності засвоювати сульфати і нітрати за їх однакової вихідної концентрації (3,5 мМ) у середовищі з амоній хлоридом (табл. 3) показало, що сульфатвідновлювальні бактерії нагромаджували найвищу біомасу під час росту у середовищі з сульфатами і впродовж 10 діб культивування використали 94,9% іонів сульфату. За росту в середовищі з нітратами клітини використали 98,9% внесених у середовище іонів нітрату. За росту в середовищі з сульфатами та нітратами бактерії використали 40,9 і 64,1% наявних у середовищі іонів сульфату і нітрату, відповідно. Отже, внесення у середовище нітрату негативно впливає на рівень редукції бактеріями іонів сульфату, крім цього, за умов культивування бактерій у присутності еквімолярної кількості сульфатів і нітратів, останні використовуються бактеріями швидше.

Таблиця 3

Використання SO_4^{2-} і NO_3^- *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6 за 10 діб росту у середовищі Кравцова-Сорокіна*

Table 3

SO_4^{2-} and NO_3^- utilization by *Desulfovibrio desulfuricans* IMV K-6 after 10 days growth in Kravtsov-Sorokin medium*

Сполуки нітрогену та сульфати в середовищі	Біомаса, г/л	Залишковий вміст у культуральній рідині	
		$[\text{SO}_4^{2-}]$, мМ	$[\text{NO}_3^-]$, мМ
NH_4Cl , SO_4^{2-}	3,43±0,04	0,18±0,01	0
NH_4Cl , NaNO_3 , SO_4^{2-}	2,54±0,02	2,07±0,05	1,26±0,06
NH_4Cl , NaNO_3	1,92±0,02	0	0,04±0,01

Примітка: * – вихідна концентрація $[\text{SO}_4^{2-}]$ та $[\text{NO}_3^-]$ у середовищі – 3,5 мМ
* – initial $[\text{SO}_4^{2-}]$ and $[\text{NO}_3^-]$ concentrations in medium – 3.5 mM

Вивчення природи проміжних продуктів дисиміляційного відновлення або амоніфікації нітратів *D. desulfuricans* IMB K-6 (рис. 1) показало, що за 10 діб росту у середовищі з нітратами бактерії практично повністю використали наявні у середовищі іони нітрату (3 мМ) з нагромадженням до 2,24 мМ NH_4^+ . Впродовж перших діб росту бактерій спостерігали



нагромадження у середовищі NO_2^- , який до кінця культивування майже повністю відновлювався клітинами до амонію.

Отже, встановлено, що нітроген нітрату та нітриту використовується сульфатвідновлювальними бактеріями як акцептор електронів дисимільційної нітрат- чи нітритредукції, відновленим продуктом яких є амоній, що нагромаджується у середовищі і може використовуватися клітинами для конструктивних потреб. Сульфатвідновлювальні бактерії виявилися перспективними для їх використання з метою анаеробної детоксикації середовищ, забруднених нітратами і нітритами [10].

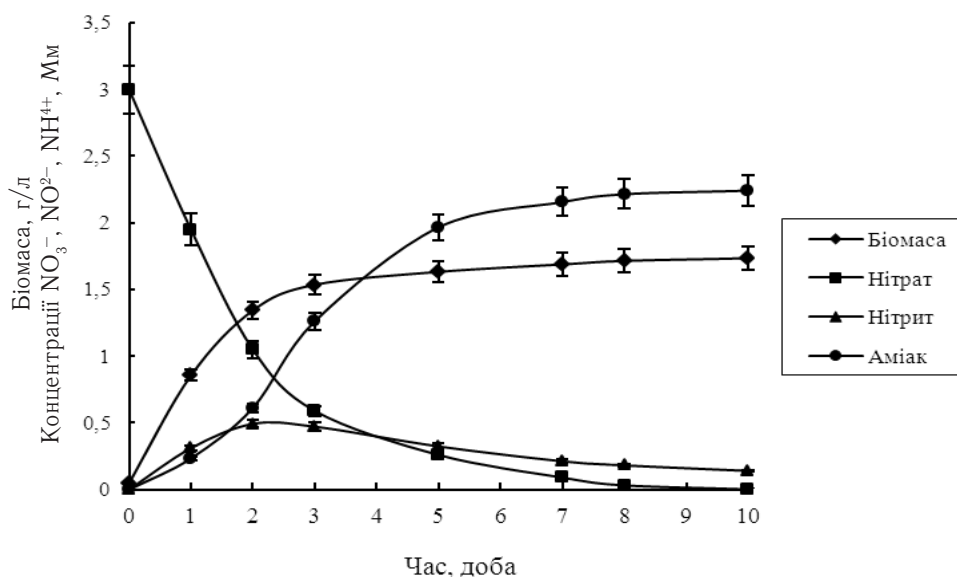


Рис. 1. Використання NO_3^- , утворення NO_2^- та NH_4^+ під час росту *D. desulfuricans* IMB K-6 у середовищі Кравцова-Сорокіна без SO_4^{2-} та NH_4Cl з NO_3^-

Fig. 1. NO_3^- utilization, NO_2^- and NH_4^+ formation during *D. desulfuricans* IMV K-6 growth in Kravtsov-Sorokin medium without SO_4^{2-} and NH_4Cl with NO_3^-

Техногенні водойми часто забруднені не лише агресивними сполуками сульфуру та нітрогену, але і іонами важких металів, вміст яких значно перевищує гранично допустимі концентрації [7, 8]. Дослідження можливості використання зеленими фотосинтезувальними сіркобактеріями *S. limicola* IMB K-8 різних сполук нітрогену, у тому числі за впливу іонів важких металів (табл. 4) показало, що ці бактерії найкраще використовують амонійний та амінний нітроген, оскільки після 10 діб росту у середовищах з NH_4Cl (контроль) або $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ виявлено високу біомасу та незначний вміст гідроген сульфід у середовищі. Наявність у середовищі одночасно лізину та амоній хлориду сприяє росту та окисненню

Таблиця 4

Вплив різних сполук нітрогену та іонів важких металів (1,5 мМ)
на ріст та утилізацію гідроген сульфідів *C. limicola* IMV K-8**

Table 4

Different nitrogen compounds and hard metal ions (1.5 mM) influence
on the growth and hydrogen sulfide utilization by *C. limicola* IMV K-8**

Солі, використані для інкубації клітин	Сполуки нітрогену в середовищі	Біомаса, г/л	[S ²⁻], мМ
Без солей металів	NH ₄ Cl (контроль)	3,31±0,06	0,17±0,05
	NH ₄ Cl, NaNO ₃	1,21±0,03*	0,81±0,05*
	NH ₄ Cl, NaNO ₂	1,30±0,04*	0,66±0,03*
	NH ₄ Cl, C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	3,45±0,05	0,12±0,03
	NaNO ₃	0,12±0,03*	2,40±0,02*
	NaNO ₂	0,13±0,04*	2,41±0,03*
	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	2,47±0,05	0,29±0,03
CoCl ₂	NH ₄ Cl (контроль)	2,31±0,01	0,70±0,01
	NH ₄ Cl, NaNO ₃	0,96±0,07*	1,62±0,04*
	NH ₄ Cl, NaNO ₂	0,89±0,04*	1,55±0,04*
	NH ₄ Cl, C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	2,85±0,04	0,45±0,08
	NaNO ₃	0,14± 0,01*	2,41±0,02*
	NaNO ₂	0,11± 0,01*	2,45±0,02*
	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	2,30± 0,01	0,90±0,01
NiCl ₂	NH ₄ Cl (контроль)	2,28±0,04	0,45±0,03
	NH ₄ Cl, NaNO ₃	0,81±0,05*	1,40±0,04*
	NH ₄ Cl, NaNO ₂	0,93±0,07*	1,38±0,04*
	NH ₄ Cl, C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	2,75±0,04	0,30±0,06
	NaNO ₃	0,10±0,01*	2,40±0,01*
	NaNO ₂	0,10±0,01*	2,43±0,04*
	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	2,19±0,04	0,60±0,06
CdSO ₄	NH ₄ Cl (контроль)	1,96±0,08	0,86±0,11
	NH ₄ Cl, NaNO ₃	0,65±0,03*	1,96±0,35*
	NH ₄ Cl, NaNO ₂	0,69±0,07*	1,93±0,09*
	NH ₄ Cl, C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	2,35±0,02	0,54±0,03
	NaNO ₃	0,15±0,01*	2,42±0,15*
	NaNO ₂	0,14±0,02*	2,41±0,26*
	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	2,09±0,08	0,96±0,05

Примітки: * – $p \leq 0,05$;

** – вихідна концентрація [S²⁻] у середовищі GSB – 2,5 мМ

** – initial [S²⁻] concentration in medium GSB – 2.5 mM



клітинами гідроген сульфіді. Нітрат та нітрит натрію пригнічують засвоєння клітинами амонійної форми нітрогену: спостерігається значно гірший ріст і пригнічення фотоасиміляції гідроген сульфіді, порівняно з контролем. Нітрат та нітрит як єдині джерела нітрогену в середовищі не засвоюються *C. limicola* ІМВ К-8. За даними літератури [2] ці сполуки виступають як стресовий фактор. В таких умовах *C. limicola* ІМВ К-8 активно нагромаджує глікоген, проте пригнічується ріст та утилізація гідроген сульфіді [6].

Іони кобальту, нікелю та кадмію негативно впливають на нагромадження біомаси та утилізацію гідроген сульфіді *C. limicola* ІМВ К-8 під час росту у середовищах з різними сполуками нітрогену (табл. 4). Якщо після культивування у середовищі з амоній хлоридом та лізином не інкубовані з солями важких металів бактерії утилізували 95,2% гідроген сульфіді, то інкубовані з CoCl_2 , NiCl_2 та CdSO_4 — 82,0; 88,0 та 78,4%, відповідно. За наявності у середовищі амонійного нітрогену негативний вплив іонів кобальту, нікелю та кадмію на метаболізм бактерій менший, ніж заміна амонію на нітрат і нітрит. Після культивування у середовищі з амонієм та нітратом не інкубовані з солями важких металів клітини утилізували 67,6% гідроген сульфіді, а клітини, інкубовані з CoCl_2 , NiCl_2 та CdSO_4 — 35,2; 44,0 та 21,6%, відповідно. Як видно з отриманих результатів, найбільш негативний вплив на метаболічну активність зелених фототрофних сіркобактерій виявили іони кадмію.

Таким чином, встановлено, що *C. limicola* ІМВ К-8 використовують амонійний та амінний нітроген і не засвоюють нітроген нітрату та нітриту. Доведено, що нітрат та нітрит пригнічують засвоєння клітинами амонійної форми нітрогену. Показано, що за впливу Co^{2+} , Ni^{2+} та Cd^{2+} відбувається інгібування росту та утилізації гідроген сульфіді бактеріями у середовищі з амоній хлоридом та/або лізином. За наявності у середовищі амонійного нітрогену негативний вплив іонів важких металів на метаболізм бактерій менший, ніж заміна амонійної форми нітрогену на нітроген нітрату чи нітриту.

Отже, нітрат і нітрит негативно впливають на ріст, біогенез гідроген сульфіді сірко- та сульфатвідновлювальними бактеріями та його фотоасиміляцію фотосинтезувальними сіркобактеріями. При асиміляції клітинами нітрогену у формі аміаку або в складі клітинних компонентів (наприклад, амінокислот) його ступінь окиснення (-3) не змінюється, тоді як при використанні бактеріями нітрогену нітратів або нітритів (ступінь окиснення +5 та +3, відповідно) він відновлюється відповідними редуказами, які синтезуються не у всіх мікроорганізмів. Єдиними серед досліджених нами бактерій, які засвоювали нітрати та нітрити, використовуючи їх як кінцевий акцептор електронів дисиміляційної нітрат- чи нітритредукції (з утворенням амонію), виявилися сульфатвідновлювальні бактерії, причому як за наявності, так і за відсутності сульфатів. Нітрат і нітрит пригнічували сульфатредукцію у цих бактерій, можливо, у зв'язку з їх

вищим, ніж у сульфату, окисно-відновним потенціалом, що дозволяло їм відновлюватися у клітинах швидше [9, 10]. З іншого боку, викликане нітратом і нітритом голодування за нітрогеном у бактерій роду *Chlorobium* сприяє нагромадженню бактеріями ендogenous глікогену, продукту, який має важливе для народного господарства значення [2, 6].

ЛІТЕРАТУРА

1. Бабко А.К., П'ятницький І.В. Кількісний аналіз. — К.: Вища школа, 1974. — 352 с.
2. Горішний М.Б. Екологічне значення зелених сіркових бактерій в утилізації сірководню: Дис. ... канд. біол. наук: 07.10.08. — К., 2008. — 202 с.
3. Деркач М.П., Гумецький Р.Я., Чабан М.Є. Курс варіаційної статистики. — К.: Вища школа, 1977. — 208 с.
4. Каравайко Г.И., Кузнецов С.И., Голомзик А.И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. — Москва: Наука, 1972. — С. 190–221.
5. Крешков А.И. Основы аналитической химии. Теоретические основы. Качественный анализ: Книга первая, изд. 4-е, перераб. — М.: Химия, 1976. — 472 с.
6. Левицька О., Горішний М., Гудзь С. Взаємозв'язок азотного живлення та утворення глікогену в клітинах *Chlorobium limicola* // Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — № 1. — С. 53–61.
7. Мороз О.М., Клим І.Р., Подопрігора О.І. і ін. Вплив важких металів на ріст і окиснення сірководню фотосинтезувальними сіркобактеріями водойми кар'єру Яворівського сіркового родовища // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Серія біологія. — 2010. — Вип. 28. — С. 30–34.
8. Мороз О.М., Колісник Я.І., Подопрігора О.І. і ін. Мікрофлора води озера “Яворівське” // Науковий вісник Ужгородського ун-ту. Серія біологія. — 2008. — Вип. 24. — С. 131–138.
9. Дрекс, Г. Шлегель ; пер. с англ. — Москва : Мир, 2005. — Т. 1. — 654 с.
10. Перетятко Т.Б., Гудзь С.П. Здатність сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 і *Desulfobacter* sp. використовувати нітрат як акцептор електронів // Біол. студії. — 2011. — Т. 5, № 2. — С. 51–60.
11. Чайка О., Перетятко Т., Гудзь С. Сірковідновлювальні бактерії водойм Язівського сіркового родовища // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Серія біологія. — 2010. — Вип. 28. — С. 52–55.
12. Bokranz M.J., Katz J., Schroder I. et al. Energy metabolism and biosynthesis of *Vibrio succinogenes* growing with nitrate or nitrite as terminal electron acceptor // Arch. Microbiol. 1983. — Vol. 135. — P. 36–41.



13. Granger D.L., Taintor R.R., Boockvar K.S. et al. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction // *Methods Enzymol.* — 1996. — Vol. 268. — P. 142–151.

14. Manabe T. New modification of Lubochinsky's indophenols method for direct microanalysis of ammonia-N in sea water // *Jap. Soc. Sci. Fish. Bull.* — 1969. — Vol. 35. — P. 897–906.

15. Overmann J. Mahoney Lake: A case study of the ecological significance of phototrophic sulfur bacteria // *Adv. Microbiol. Ecol.* — 1999. — Vol. 15. — P. 251–288.

Стаття надійшла до редакції 20.05.2012 р.

О.М. Moroz¹, І.В. Rusyn²

¹ Ivan Franko National University of Lviv,
4, Hrushevsky Str., Lviv, 79005, Ukraine, e-mail: moroz_oksana@yahoo.com

² National University „Lviv Polytechnika”,
12, Bandera Str., Lviv, 79013, Ukraine

USE OF NITROGEN COMPOUNDS BY SULFUR CYCLE BACTERIA OF YAVORIVSKE LAKE

Summary

It was revealed that nitrate and nitrite negatively influences on the growth, hydrogen sulfide formation and oxidation by sulfur cycle bacteria. Found that sulfur reducing bacteria *Desulfuromonas acetoxidans* Yavor-12 and sulfate reducing bacteria *Desulfovibrio desulfuricans* IMV K-6 carry out dyssimilatory sulfur and sulfate reduction with hydrogen sulfide formation using ammonium and amine forms of nitrogen. Sulfur reducing bacteria do not use ammonium and lysine nitrogen in the medium without sulfur; they are not capable to carry out nitrate or nitrite reduction. Sulfate reducing bacteria do not utilize ammonium and lysine nitrogen in the medium without sulfates; they carry out dissimilatory nitrate or nitrite reduction with ammonium formation. Green phototrophic sulfur bacteria *Chlorobium limicola* IMV K-8 use ammonium and amine nitrogen and they are not capable to utilize nitrate and nitrite nitrogen. It is inhibited bacterial growth and hydrogen sulfide utilization by bacteria in medium with ammonium and/or lysine upon the influence of Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} . The negative influence of heavy metal ions on the bacteria metabolism is less in the presence of ammonium nitrogen in medium than in the presence of nitrate or nitrite.

Key words: nitrogen compounds, cycle sulfur bacteria, hydrogen sulfide.



О.М. Мороз¹, И.Б. Русин²

¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина, e-mail: moroz_oksana@yahoo.com

²Национальный университет „Львовская политехника”,
ул. С. Бандеры, 12, Львов, 79013, Украина

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОЕДИНЕНИЙ НИТРОГЕНА БАКТЕРИЯМИ ЦИКЛА СЕРЫ ОЗЕРА ЯВОРОВСКОЕ

Реферат

Показано, что нитрат и нитрит негативно влияют на рост, образование и окисление гидроген сульфида бактериями цикла серы. Серовосстанавливающие бактерии *Desulphuromonas acetoxidans* Yavor-12 и сульфатвосстанавливающие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* ИМВ К-6 осуществляют диссимиляционную серо- и сульфатредукцию с образованием сероводорода при использовании аммонийной и аминной форм азота. Серовосстанавливающие бактерии не используют азот аммония и лизина в среде без серы, они не способны к осуществлению нитрат- или нитритредукции. Сульфатвосстанавливающие бактерии не усваивают азот аммония и лизина в среде без сульфатов, они осуществляют диссимиляционную нитрат- и нитритредукцию с образованием аммония. Зеленые фототрофные серобактерии *Chlorobium limicola* ИМВ К-8 используют аммонийный и аминный азот и не усваивают азот нитрата и нитрита. Под воздействием Co^{2+} , Ni^{2+} и Cd^{2+} происходит ингибирование роста бактерий и утилизации ими сероводорода в среде с аммонием и/или лизином. При наличии в среде аммонийного азота негативное влияние ионов тяжёлых металлов на метаболизм бактерий меньше, чем при наличии нитрата или нитрита.

Ключевые слова: нитрат, нитрит, аммоний, лизин, *Desulphuromonas acetoxidans*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Chlorobium limicola*, сероводород, никель, кобальт, кадмий.

