

УДК: 579[22+23+26] / 8.06

СІРКОВІДНОВЛЮВАЛЬНІ БАКТЕРІЇ ОЗЕРА ЯВОРІВСЬКЕ: ДЕЯКІ МОРФОЛОГІЧНІ, КУЛЬТУРАЛЬНІ І ФІЗІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ

Мороз О.М., Перетятко Т.Б., Клим І.Р., Борсукевич Б.М., Яворська Г.В., Кулачковський О.Р.

Сірковідновлювальні бактерії озера Яворівське: деякі морфологічні, культуральні і фізіологічні особливості. – О.М. Мороз, Т.Б. Перетятко, І.Р. Клим, Б.М. Борсукевич, Г.В. Яворська, О.Р. Кулачковський. – З водойми Яворівського сіркового родовища виділено 10 чистих культур сірковідновлювальних бактерій. Їх ріст спостерігали лише на елективному для досліджуваних бактерій середовищі Постгейта С без сульфатів з сіркою. Жодна з культур не є споротвірною. Встановлено, що всі бактерії грамнегативні. Оптимальним значенням кислотності середовища для росту всіх культур є рН 7, оптимальна температура – 30 °С. Показано, що клітини поодинокі, паличковидні або віброїдні, у діаметрі 0,4–0,8·1,5–3,5 мкм, оточені клітинною стінкою та цитоплазматичною мембраною, у цитоплазмі є нуклеоїд, рибосоми, запасні речовини. За 10 діб росту у середовищі Постгейта С без сульфатів з сіркою культури Yavor-1–Yavor-10 продукували 2,5–4,1 мМ гідроген сульфід. Показано, що отримані культури є стійкими до гідроген сульфід, їх ріст виявився значно пригніченим лише при 6 мМ Na₂S · 9 H₂O у середовищі. Лактат, етанол, бутанол, піруват, L-малат, ацетат, фумарат, сукцинат у присутності сірки засвоювалися культурами як джерела карбону і донори електронів, крім цього, бактерії зброджували фумарат. Клітини виділені культури здатні найбільш активно здійснювати процес дисиміляційної сіркоредакції при використанні ацетату як донора електронів порівняно з утилізацією ними лактату чи пірувату. За дослідженими морфологічними, культуральними та фізіологічними особливостями культури Yavor-1–Yavor-10 сірковідновлювальних бактерій віднесено до виду *Desulfuromonas acetoxidans*.

Ключові слова: сірковідновлювальні бактерії, дисиміляційна сіркоредакція, гідроген сульфід

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

Sulfur reducing bacteria from Yavorivske lake: some morphological, cultural and physiological peculiarities. – O.M. Moroz, T.B. Peretiatchko, I.R. Klym, B.M. Borsukevych, G.V. Yavorska, A.R. Kulachkovsky. – From reservoir of Yavoriv sulfur deposit 10 pure sulfur reducing bacteria cultures were isolated. Their growth observed only on elective to investigated bacteria Postgate C medium without sulfates with sulfur. Cultures don't form spores. All bacteria are Gram-negative it was established. Optimal pH of growth medium to all cultures is pH 7, optimal temperature – 30 °C. Cells are single, with bacillary or vibroid form, 0,4–0,8·1,5–3,5 mkm in diameter, surrounded by cell's wall and cytoplasm membrane, in cytoplasm were seen nucleoid, ribosome's, stock substances. After 10 days of growth in Postgate C medium without sulfates with sulfur cultures Yavor-1–Yavor-10 produced 2,5–4,1 mM hydrogen sulfide. Obtained cultures are resistance to hydrogen sulfide, their growth was considerably decreased only at 6 mM Na₂S · 9 H₂O in medium it was shown. Lactate, ethanol, butanol, pyruvate, L-malate, acetate, fumarate, succinate in presence of sulfur utilized by cultures as carbon sources and electron donors, moreover, bacteria fermented fumarate. Cells of isolated cultures were able most actively carry out dissimilatory sulfur reduction process when they use an acetate as electron donor when compare with their utilization of lactate or pyruvate. For investigated morphological, cultural and physiological peculiarities cultures Yavor-1–Yavor-10 of sulfur reduced bacteria applied to *Desulfuromonas acetoxidans* species.

Keywords: sulfur reducing bacteria, dissimilatory sulfur reduction, hydrogen sulfide

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

Вступ. Згідно визначника Берджі бактерії, що здійснюють дисиміляційне відновлення елементної сірки – це збірна група неспоріднених видів і родів еубактерій та архебактерій [12]. Сірковідновлювальні бактерії умовно поділяються на дві фізіологічні групи [13]. До першої групи належать бактерії, які окиснюють органічні субстрати повністю – до CO₂ і H₂O

(*Desulfuromonas* [15, 21], *Desulfurella* [24], *Desulfuromusa* [16], *Geobacter* [11], *Pelobacter* [17]). До другої групи належать бактерії, які окиснюють органічні субстрати не повністю (*Campylobacter* [23], *Wolinella*, *Sulfospirillum* [23], *Alteromonas*, *Shewanella* [18] та інші). Бактерії *Desulfuromonas acetoxidans* постійно виявляються у затоплених кар'єрах сіркових родовищ та стоках

промислових підприємств, забруднених органічними сполуками, гідроген сульфідом, сульфатами, елементною сіркою тощо. Вони здійснюють дисиміляційне відновлення сірки з утворенням гідроген сульфіду, окиснюючи при цьому широкий ряд органічних субстратів, зокрема, ацетат, піруват, етанол, бутанол, пропанол, лактат, пропіонат, глутамат, вищі жирні кислоти, до CO_2 і H_2O [15, 19, 21, 25].

Вивчення біогенезу гідроген сульфіду у техногенних водоймах на території Прикарпатського сірководобного регіону важливе для розробки ефективних та рентабельних біологічних шляхів регулювання його рівня. Метою роботи було виділити з Яворівського озера сірководновловальні бактерії, які є активними продуцентами H_2S , ідентифікувати їх на основі вивчення культуральних та морфо-фізіологічних особливостей, встановити природу донорів та акцепторів електронів, дослідити фактори, які впливають на нагромадження бактеріями гідроген сульфіду.

Матеріали і методи. У роботі використано штам *Desulfuromonas acetoxidans* ІМВ В-7384 та чисті культури сірководновловальних бактерій *Yavor-I–Yavor-10*, які виділені з води і мулу Яворівського озера, ідентифіковані та зберігаються в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України та колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології ЛНУ імені Івана Франка [10]. Воду відбирали з глибини 30–40 м батометром, мул прибережної смуги з глибини 5–10 см спільно із працівниками ВАТ “Інститут Гірничо-хімічної промисловості” Академії гірничих наук України [7].

Клітини культивували у середовищі Постгейта С без сульфатів з сіркою з чи без $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ у пробірках, об’ємом 25 мл, за анаеробних умов при 30 °С впродовж 10 діб [4, 5, 8]. Проби висівали на рідке середовище з сіллю Fe(II) для отримання нагромаджувальних культур. Після 7–10 діб культивування суспензію клітин (0,05 мл) висівали у ідентичне агаризоване середовище і отримували окремі колонії, кожену з яких переносили у пробірки, доверху заповнені рідким середовищем. Найбільш інтенсивно забарвлені у чорний колір (в результаті утворення FeS) 10 культур сірководновловальних бактерій висівали у рідке середовище без солі Fe(II) для отримання незабарвлених ферум сульфідом клітин. Культури перевіряли на чистоту, вивчали морфологію та основні фізіологічні особливості згідно з Берджі [6].

Культури сірководновловальних бактерій перевіряли на чистоту за ростом впродовж 10 діб на різних середовищах: Постгейта С без сульфатів з сіркою без солі Fe(II) , Постгейта С, Баалсруда, Гільтая, Ван-Ніля, крохмало-аміачному, м’ясопептонному бульйоні (МПБ), суслі [1]. Густина

засіву становила 0,05–0,1 г/л. Наявність чи відсутність росту фіксували візуально.

Здатність бактерій утворювати спори визначали загальноприйнятим методом [1]. Суспензію клітин після її прогрівання на водяній бані при 80 °С впродовж 10 хв висівали на агаризоване середовище Постгейта С без сульфатів з елементною сіркою без солі Fe(II) та культивували впродовж 10–14 діб. Для визначення наявності спор клітини фарбували за методом Пешкова-Грухільйо [1]. Бактерії фарбували за Грамом [1].

Перевіряли ріст культур при рН 4, 5, 6, 7, 9 та 4, 14, 20, 30, 45 °С. Клітини культивували у рідкому середовищі без сульфатів з сіркою без солі Fe(II) , після 10 діб росту визначали біомасу фотоелектроколориметричним методом [1]. Вихідна густина засіву становила 0,05 г/л.

Фіксовані фуксином препарати сірководновловальних бактерій, які виростили у середовищі без сульфатів з сіркою без солі Fe(II) , переглядали під світловим мікроскопом *Ergaval* (x1440) за допомогою програми *Scanner and Camera Wisard (iuVCR 4.10.0.372)*, фотографування здійснювали з використанням *High performance color CCD camera “Vision”*.

Проводили електронномікроскопічні дослідження структури клітин. Ультратонкі зрізи отримували на ультрамікромомі УМТП-6 і контрастували плумбум цитратом [22]. Перегляд і фотографування зразків проводили на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 за прискорювальної напруги 75 кВ. Кінцеве збільшення на мікрофотографіях – 15 тис. разів.

Для вивчення чутливості *D. acetoxidans* ІМВ В-7384 до гідроген сульфіду до середовища без сульфатів з сіркою без солі Fe(II) вносили різну кількість $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ за концентрацій: 0 (контроль); 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 12; 15; 17; 19; 22; 25; 27; 28; 30 мМ. Густина засіву – 0,2 г/л. Після 10 діб росту визначали біомасу.

Для визначення здатності сірководновловальних бактерій утилізувати різні органічні сполуки їх висівали у середовище без сульфатів з елементною сіркою без солі Fe(II) із додаванням органічних сполук: натрій лактату, *L*-малату, натрій пірувату, бутанолу, етанолу, fumarату, натрій ацетату, сукцинату, за концентрації 51 мМ, оскільки саме така концентрація натрій лактату (6,0 г/л) наявна у стандартному середовищі Постгейта С. Для з’ясування можливості використання бактеріями fumarату як акцептора електронів у середовище сірки не додавали. Кількість клітин при засіві становила 0,05 г/л. Після 10 діб росту вимірювали біомасу, у окремих експериментах на 2, 5, 10 доби культивування визначали біомасу та концентрацію гідроген сульфіду спектрофотометричним методом [26].

Проводили статистичну обробку результатів [3].

Результати і їх обговорення. Сірковідновлювальні бактерії отримують енергію для росту за допомогою анаеробного сіркового дихання. Їм належить особлива роль в утворенні гідроген сульфід у техногенних водоймах сірководобних регіонів, збагачених як елементною сіркою, так і органічними сполуками [9, 14, 20]. З проб води і мулу прибережної смуги Яворівського озера на середовищі Постгейта С без сульфатів з сіркою отримано нагромаджувальні культури та виділено 10 чистих культур сірковідновлювальних бактерій, колонії яких при рості на агаризованому середовищі, яке не містило солі Fe(II), були рожевими внаслідок високого вмісту пігментів (цитохромів *c*-типу [21]).

Для перевірки на чистоту вивчали ріст виділених культур за анаеробних умов у середовищах: Постгейта С без сульфатів з сіркою без солі Fe(II), Постгейта С, Баалсруда, Гільтая, Ван-Ніля, крохмало-аміачному, МПБ, суслі (табл. 1). На середовищі Постгейта С без сульфатів з сіркою біомаса культур *Yavor-1–Yavor-10* становила 1,6–2,7 г/л, контроль: *D. acetoxidans* IMB B-7384 – 1,7 г/л. Після 10 діб культивування ріст бактерій на інших середовищах виявився відсутнім. Оскільки ріст культур спостерігався лише у елективному для досліджуваних бактерій середовищі Постгейта С без сульфатів з сіркою,

припустили, що отримані бактерії – сірковідновлювальні.

За відсутністю росту інкубованих при +80 °С впродовж 10 хв культур у агаризованому середовищі Постгейта С без сульфатів з сіркою без солі Fe(II), а також в результаті вивчення морфології клітин після фарбування для виявлення спор за Пешковим-Трухільйо, зробили висновок про те, що жодна з культур здатністю до спороутворення не володіла (табл. 2). Реакція виділених бактерій на фарбування за Грамом виявилася негативною (табл. 3). Тому припустили, що ізолювані культури належать до четвертої підгрупи бактерій Групи 7 згідно з *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [6].

Відомо, що для сірковідновлювальних бактерій рівень рН для росту становить 6,5–8,5 з оптимумом 7,2–7,5, оптимальна температура для росту близько 30 °С. Вивчали ріст культур *Yavor-1, Yavor-5, Yavor-7* у середовищі без сульфатів з сіркою без солі Fe(II) при різних значеннях рН (4, 5, 6, 7 і 9) та при різних температурах (4, 14, 20, 30, 45 °С) впродовж 10 діб. Встановлено, що оптимальним значенням кислотності середовища для росту всіх культур, як і для *D. acetoxidans* IMB B-7384, є рН 7 (біомаса становила до 2,4 г/л) (табл. 4). Виявлено, що оптимальною температурою для росту є 30 °С (спостерігали нагромадження біомаси до 2,3 г/л) (табл. 5).

Таблиця 1. Ріст сірковідновлювальних бактерій на різних середовищах

Культура	Біомаса, г/л							
	Постгейта С без сульфатів з сіркою без солі Fe(II)	Постгейта С	Гільтая	Крохмало-аміачне	Ван-Ніля	Баалсруда	МПБ	Сусло
<i>Yavor-1</i>	1,586±0,008	0,053±0,001	0,073±0,004	0,073±0,005	0,036±0,007	0,030±0,000	0,028±0,003	0,027±0,002
<i>Yavor-2</i>	1,564±0,007	0,069±0,003	0,037±0,004	0,053±0,001	0,079±0,006	0,057±0,008	0,059±0,009	0,015±0,004
<i>Yavor-3</i>	2,268±0,001	0,091±0,008	0,012±0,004	0,030±0,006	0,047±0,005	0,044±0,001	0,057±0,001	0,046±0,004
<i>Yavor-4</i>	2,392±0,002	0,068±0,001	0,046±0,001	0,045±0,004	0,060±0,009	0,096±0,001	0,074±0,003	0,031±0,005
<i>Yavor-5</i>	1,583±0,003	0,081±0,003	0,085±0,001	0,046±0,004	0,031±0,003	0,067±0,009	0,017±0,001	0,046±0,006
<i>Yavor-6</i>	2,416±0,023	0,064±0,023	0,033±0,007	0,080±0,003	0,018±0,003	0,024±0,005	0,075±0,003	0,042±0,005
<i>Yavor-7</i>	2,683±0,002	0,065±0,005	0,078±0,006	0,010±0,002	0,060±0,003	0,081±0,004	0,057±0,001	0,012±0,001
<i>Yavor-8</i>	1,776±0,024	0,089±0,003	0,053±0,003	0,054±0,002	0,064±0,004	0,097±0,003	0,057±0,001	0,032±0,003
<i>Yavor-9</i>	2,663±0,060	0,039±0,007	0,024±0,001	0,035±0,004	0,053±0,002	0,042±0,001	0,047±0,004	0,037±0,002
<i>Yavor-10</i>	2,670±0,001	0,079±0,007	0,093±0,003	0,089±0,002	0,051±0,007	0,084±0,001	0,029±0,001	0,021±0,004
<i>D. acetoxidans</i> IMB B-7384	1,647±0,004	0,052±0,008	0,082±0,002	0,058±0,003	0,048±0,005	0,066±0,007	0,045±0,005	0,039±0,001

Таблиця 2. Здатність сірковідновлювальних бактерій до спороутворення*

Культура	Наявність спор у разі фарбування за Пешковим-Трухільйо	Ріст	
		перед інкубацією при +80° С	після інкубації при +80° С впродовж 10 хв
<i>Yavor-1–Yavor-10</i>	-	+	-
<i>D. acetoxidans</i> IMB B-7384	-	+	-

*Примітки: “+” – наявність спор та росту; “-” – відсутність спор та росту

Таблиця 3. Фарбування сірковідновлювальних бактерій за Грамом*

Культура	Забарвлення за Грамом
<i>Yavor-1–Yavor-10</i>	-
<i>D. acetoxidans</i> IMB B-7384	-

*Примітки: “+” – наявність забарвлення; “-” – відсутність забарвлення

Таблиця 4. Ріст сірковідновлювальних бактерій при різних значеннях pH

Культура	Біомаса, г/л				
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 9
<i>Yavor-1</i>	0,081±0,006	0,391±0,006	0,988±0,031	1,598±0,010	0,780±0,055
<i>Yavor-5</i>	0,071±0,003	0,475±0,001	1,113±0,004	2,378±0,015	0,767±0,027
<i>Yavor-7</i>	0,081±0,005	0,481±0,004	1,032±0,036	1,648±0,005	0,618±0,049
<i>D. acetoxidans</i> IMB B-7384	0,078±0,004	0,381±0,002	1,138±0,029	1,868±0,004	0,814±0,046

Таблиця 5. Ріст сірковідновлювальних бактерій при різних температурах

Культура	Біомаса, г/л				
	4 °C	14 °C	20 °C	30 °C	45 °C
<i>Yavor-1</i>	0,092±0,002	0,429±0,034	1,328±0,034	2,342±0,009	0,294±0,001
<i>Yavor-5</i>	0,063±0,003	0,503±0,028	1,519±0,007	2,122±0,003	0,426±0,007
<i>Yavor-7</i>	0,072±0,004	0,619±0,044	1,388±0,014	1,692±0,025	0,393±0,001
<i>D. acetoxidans</i> IMB B-7384	0,080±0,001	0,616±0,049	1,272±0,004	1,844±0,131	0,387±0,061

За морфологією (світловий мікроскоп, x1440) клітини всіх культур поодинокі, овальні, паличковидні або віброїдні, інколи зігнуті, 0,4–0,8·1,5–3,5 мкм (рис. 1). Як показали електронно-мікроскопічні дослідження (електронний мікроскоп, x15000), клітини мають паличковидну або віброїдну форму, оточені клітинною стінкою та цитоплазматичною мембраною. У цитоплазмі можна спостерігати наявність нуклеоїда, рибосом, запасних речовин (рис. 2).

Перевіряли здатність культур сірковідновлювальних бактерій *Yavor-1–Yavor-10* утворювати гідроген сульфід під час росту у середовищі без сульфатів з сіркою без солі Fe(II). На 10 добу росту біомаса бактерій становила 1,7–2,7 г/л (*D. acetoxidans* IMB B-7384 – 2,4 г/л); клітини продукували 2,5–4,1 мМ (*D. acetoxidans* IMB B-7384 – 3,3 мМ) гідроген сульфід (рис. 3). Таким чином, досліджувані культури сірковідновлювальних бактерій виявилися активними продуцентами гідроген сульфід.

Обмеженням у застосуванні як сульфат-, так і сірковідновлювальних бактерій у біотехнологічних процесах, спрямованих на очистку водного доквілля від гідроген сульфід, сульфатів та важких металів, є їх чутливість до гідроген сульфід [2]. Актуальним є пошук штамів, стійких до підвищених концентрацій H₂S. До

середовища без сульфатів з сіркою без солі Fe(II) вносили 1–30 мМ Na₂S · 9 H₂O (рис. 4). За концентрацій натрій сульфід наногідрату понад 6 мМ ріст *D. acetoxidans* IMB B-7384 виявився значно пригніченим. Якщо у середовищі без додавання Na₂S · 9 H₂O біомаса становила 1,5 г/л, то за його концентрації 6 мМ – 0,6 г/л. За концентрацій Na₂S · 9 H₂O понад 19 мМ ріст бактерій виявився практично відсутнім. Таким чином, встановлено, що сірковідновлювальні бактерії стійкі до високих концентрацій Na₂S · 9 H₂O, тому вони є перспективними для біотехнологічного використання.

Відомо, що сірковідновлювальні бактерії органічні субстрати окиснюють повністю до CO₂. Визначали вплив натрій лактату, етанолу, бутанолу, натрій пірувату, L-малату, натрій ацетату, фумарату, сукцинату з елементною сіркою та фумарату без сірки на ріст сірковідновлювальних бактерій у середовищі без сульфатів і без солі Fe(II) (табл. 6). За 10 діб найкращий ріст бактерій спостерігався при утилізації ними лактату (до 1,5 г/л), пірувату (до 1,3 г/л), ацетату (до 1,6 г/л) та етанолу (до 1,4 г/л). Деяко нижчий вихід біомаси виявився при утилізації клітинами бутанолу (до 0,6 г/л), L-малату (до 0,6 г/л), фумарату (до 0,9 г/л), сукцинату (до 0,5 г/л). Відомо, що L-малат або

фумарат з ацетатом або без ацетату для видів роду *Desulfohalobium* можуть бути акцепторами електронів замість сірки [6, 15]. Бактерії *Yavor-1*–*Yavor-10* використовували фумарат у середовищі без сірки, біомаса сягала 0,7 г/л як і у *D. acetoxidans* IMB B-7384 (0,8 г/л). Таким чином, можна вважати, що лактат, етанол, бутанол,

піруват, *L*-малат, ацетат, фумарат, сукцинат у присутності сірки засвоюються виділеними культурами сірководновловальних бактерій як джерела карбону і донори електронів, крім цього, вони можуть зброджувати фумарат.

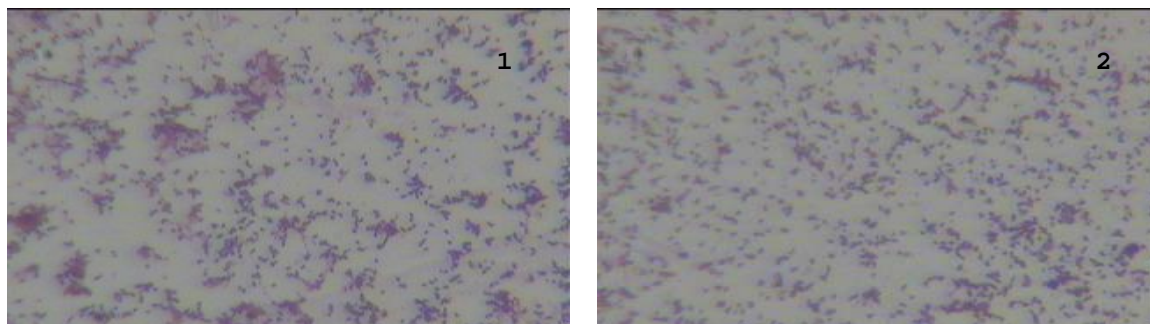


Рис. 1. Морфологія сірководновловальних бактерій: *D. acetoxidans* IMB B-7384 (1), *Yavor-7* (2).

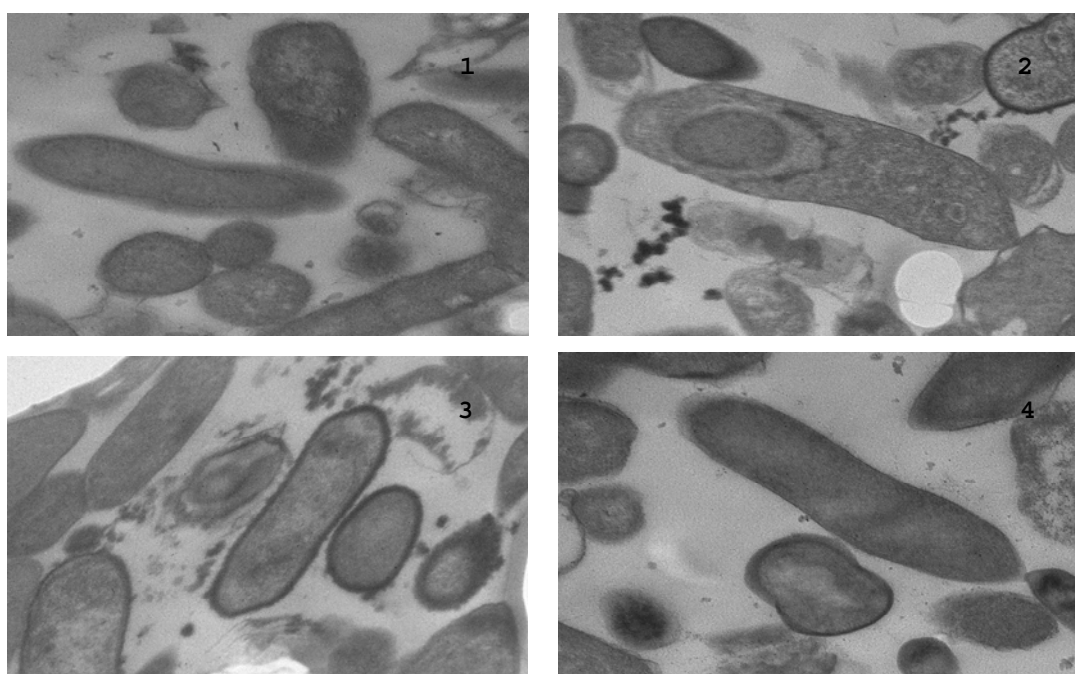


Рис. 2. Ультраструктура клітин сірководновловальних бактерій: *D. acetoxidans* IMB B-7384 (1), *Yavor-5* (2), *Yavor-7* (3), *Yavor-9* (4).

Вивчали вплив пірувату та ацетату на утворення гідроген сульфід культурами *Yavor-5*, *Yavor-7* та *D. acetoxidans* IMB B-7384 під час росту у середовищі без сульфатів з сіркою без солі Fe(II) (рис. 5). Найвищу біомасу та найвищу концентрацію гідроген сульфід виявлено при вирощуванні культури *Yavor-7* у середовищі із всіма перевіреними сполуками. При рості на ацетаті біомаса культури *Yavor-7* виявилася дещо вищою (до 3,1 г/л), ніж на лактаті або піруваті (до 2,6 та 2,5 г/л, відповідно). Клітини утворювали майже 4,3 мМ гідроген сульфід при рості на ацетаті і у 1,2 та 1,7 рази менше – до 3,7 і 2,5 мМ, відповідно, на лактаті і піруваті. Отже, ні біомаса,

ні вміст гідроген сульфід, утвореного клітинами обох культур, як і штаму *D. acetoxidans* IMB B-7384, у середовищі з лактатом та піруватом, не перевищували біомасу та концентрацію гідроген сульфід, продукованого бактеріями під час росту у середовищі з ацетатом. З отриманих результатів можна зробити висновок, що клітини культур сірководновловальних бактерій *Yavor-5* і *Yavor-7*, як і штаму *D. acetoxidans* IMB B-7384, здатні найбільш активно здійснювати процес дисиміляційної сіркоредакції при використанні ацетату як донора електронів, порівняно з утилізацією ними інших органічних сполук, таких як лактат чи піруват.

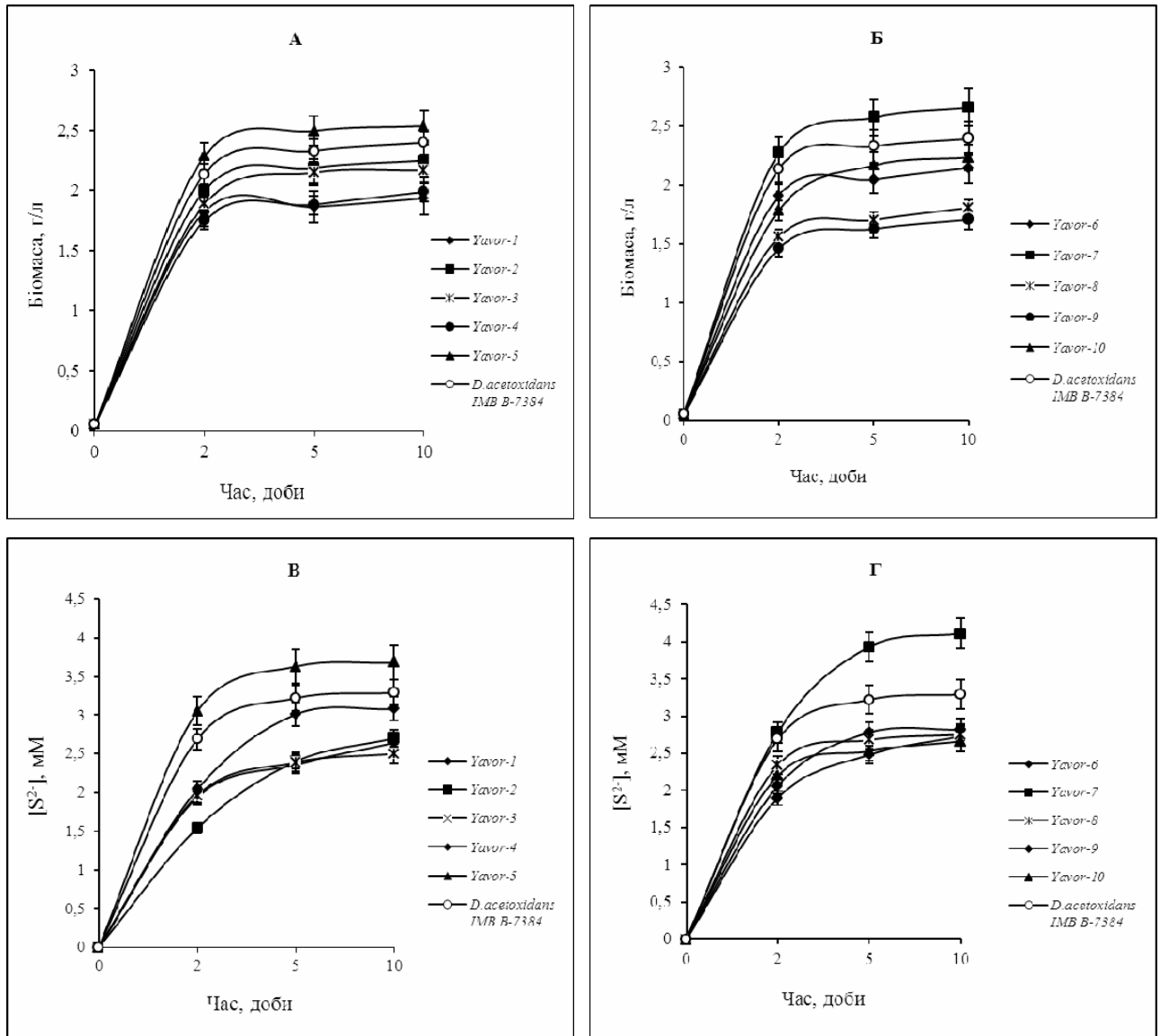


Рис. 3. Біомаса (А, Б) та утворення гідроген сульфіду (В, Г) сірководновловальними бактеріями під час росту у середовищі Постгейта С без сульфатів з сіркою без солі Fe(II).

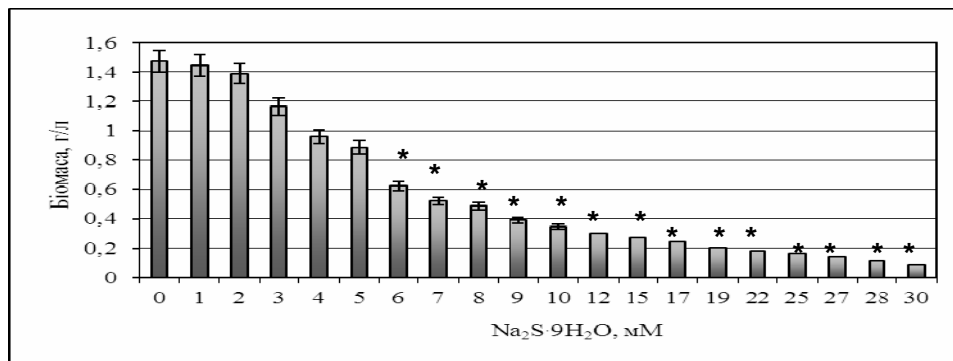


Рис. 4. Біомаса *D. acetoxidans* IMB B-7384 після 10 днів росту у середовищі Постгейта С без сульфатів з сіркою без солі Fe(II) з різним вмістом $Na_2S \cdot 9H_2O$. *Примітка: $p \leq 0,05$.

Таблиця 6. Ріст сірковідновлювальних бактерій у середовищі Постгейта С без сульфатів без солі Fe(II) у присутності органічних сполук (51 мМ)

Культура	Біомаса, г/л								
	Лактат+S ⁰	Етанол+S ⁰	Бутанол+S ⁰	Піруват+S ⁰	L-малат+S ⁰	Ацетат+S ⁰	Фумарат+S ⁰	Фумарат-S ⁰	Сукцинат+S ⁰
<i>Yavor-1</i>	1,161±0,016	1,128±0,028	0,632±0,025	1,276±0,008	0,500±0,022	1,112±0,075	0,648±0,010	0,652±0,000	0,527±0,000
<i>Yavor-2</i>	1,227±0,017	0,922±0,022	0,594±0,033	1,264±0,006	0,523±0,013	1,288±0,005	0,562±0,008	0,673±0,0064	0,527±0,005
<i>Yavor-3</i>	1,404±0,014	1,083±0,017	0,594±0,022	1,276±0,002	0,562±0,013	1,360±0,002	0,700±0,003	0,606±0,031	0,499±0,005
<i>Yavor-4</i>	1,347±0,006	1,431±0,003	0,593±0,008	1,280±0,000	0,526±0,014	1,160±0,039	0,823±0,003	0,614±0,047	0,530±0,000
<i>Yavor-5</i>	1,414±0,040	1,100±0,010	0,608±0,006	1,267±0,000	0,503±0,000	1,508±0,006	0,558±0,006	0,620±0,041	0,501±0,001
<i>Yavor-6</i>	1,471±0,003	1,204±0,008	0,579±0,014	1,232±0,003	0,511±0,006	1,170±0,003	0,492±0,009	0,714±0,047	0,480±0,011
<i>Yavor-7</i>	1,406±0,037	0,942±0,061	0,622±0,009	1,278±0,000	0,533±0,000	1,630±0,006	0,508±0,000	0,556±0,006	0,484±0,003
<i>Yavor-8</i>	1,332±0,008	0,951±0,053	0,605±0,011	1,252±0,003	0,537±0,003	1,352±0,005	0,823±0,025	0,530±0,039	0,514±0,003
<i>Yavor-9</i>	1,280±0,039	1,134±0,003	0,604±0,008	1,278±0,000	0,539±0,000	1,262±0,008	0,520±0,021	0,531±0,009	0,520±0,003
<i>Yavor-10</i>	1,245±0,025	1,072±0,011	0,588±0,009	1,273±0,003	0,498±0,009	1,182±0,011	0,865±0,014	0,518±0,014	0,512±0,002
<i>D. acetoxidans</i> IMB B-7384	1,198±0,059	1,035±0,014	0,790±0,008	1,267±0,000	0,490±0,003	1,341±0,008	0,843±0,036	0,778±0,031	0,487±0,008

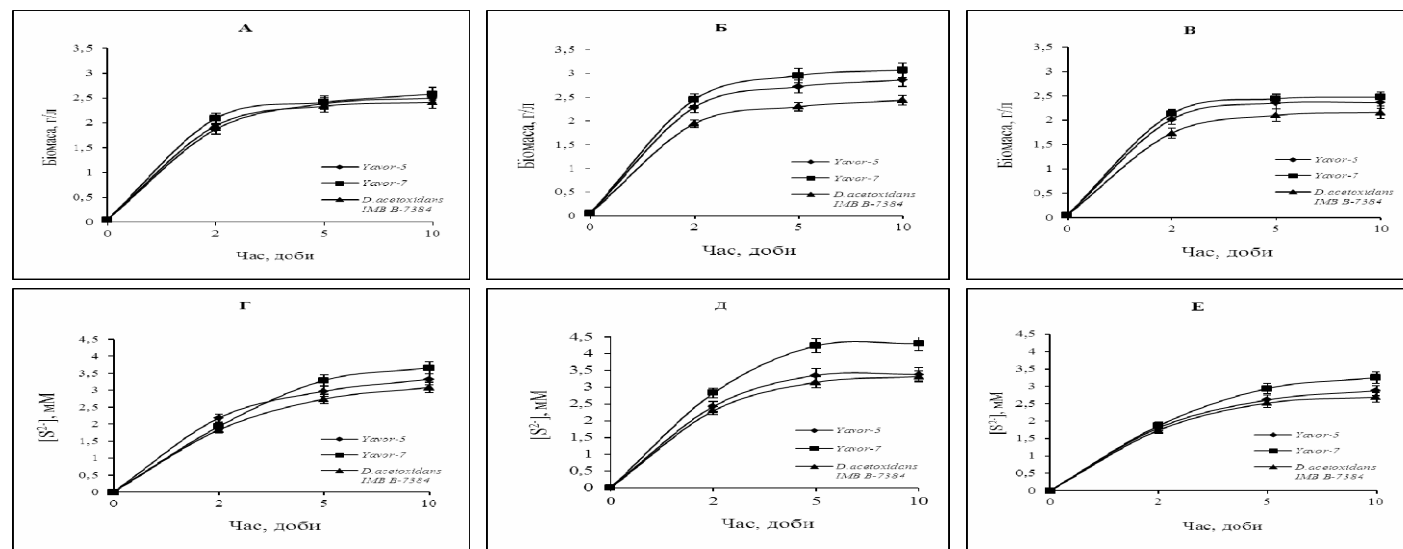


Рис. 5. Утворення гідроген сульфїду сірковідновлювальними бактеріями під час росту у середовищі Постгейта С без сульфатів з сіркою без солі Fe(II) з натрій лактатом (А, Г), натрій ацетатом (Б, Д) і натрій піруватом (В, Е).

Висновки. З Яворівського озера вперше виділено 10 чистих культур сірководнювальних бактерій. За ростом лише на елективному середовищі Постгейта С без сульфатів з сіркою, нездатністю утворювати спори, негативною реакцією на забарвлення за Грамом, оптимумами кислотності середовища для росту (рН 7) і температури (30 °С), морфологією, здатністю відновлювати сірку до гідроген сульфід, засвоювати лактат, етанол, бутанол, піруват, L-

малат, ацетат, фумарат, сукцинат під час росту у середовищі з сіркою та зброджувати фумарат чисті культури віднесено до роду *Desulfuromonas* Підгрупи 4 Групи 7 [6]. Оскільки бактерії найбільш інтенсивно здійснювали процес дисиміляційної сіркоредакції при використанні ацетату як донора електронів, порівняно з іншими органічними сполуками, отримані культури віднесено до виду *Desulfuromonas acetoxidans*.

1. Гудзь С., Гнатуш С., Білінська І. Практикум з мікробіології. Ч. 1. Навчальний посібник. – Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2003. – 80 с.
2. Гудзь С.П., Перетятко Т.Б., Мороз О.М., Гнатуш С.О., Клим І.Р. Регулювання рівня сульфатів, сірководню та важких металів у техногенних водоймах сульфатвідновлювальними бактеріями // Мікробіол. журн. – 2011. – Т. 73, № 2. – С. 33–38.
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. – М.: Наука, 1972. – 215 с.
5. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др.: Пер. с англ. – М.: Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.
6. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т 2: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. – Москва: Мир, 1997. – 368 с.
7. Родина А.Г. Методы водной микробиологии: Практ. руководство. – Москва, Ленинград: Наука, 1965. – 363 с.
8. Розанова Е.П. Методы культивирования и идентификации анаэробных бактерий, восстанавливающих серу и ее окисленные соединения // Теоретические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов. – Пушкино, 1978. – С. 123–136.
9. Розанова Е.П., Назина Т.Н. Сульфатвосстанавливающие бактерии (систематика и метаболизм) // Микробиология. – Т. 51. – С. 191–226.
10. Чайка О., Перетятко Т., Гудзь С. Сірководнювальні бактерії водойм Язівського сіркового родовища // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Серія біологія. – 2010. – Вип. 28. – С. 52–55.
11. Caccavato F., Loregan D. G., Lovley D. R., Davies M., Stolz J. F., McInerney M. J. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov. a hydrogen-acetate oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60, № 10. – P. 3752–3759.
12. Carrity G. M., Winters M., Searles D. B. Taxonomic outline of the procaryotic genera. Bergey's manual of systematic bacteriology, second edition. New York – Berlin – Heidelberg: Springer-Verlag, 2001. – 39 p.
13. Fisher K., Liesack W., Tindal B. J. *Sulfurospirillum arcachonense* sp. nov., a new microaerophilic sulfur-reducing bacterium. // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – Vol. 47, № 6. – P. 1212–1217.
14. Hedderich R., Klimmek O., Kroger A., Dirmeier R., Keller M., Stetter K. O. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with

disulfides // FEMS Microbiol. Reviews. – 1999. – Vol. 22. – P. 353–381.

15. Kuever J., Rainey F. A., Widdel F. Genus I. *Desulfuromonas* / *Desulfuromonas* genus. Pfennig and Biebl eds. – 1977. – 306 p.
16. Liesack W., Finster K. Phylogenetic analysis of five strains of gram-negative obligately anaerobic, sulfur-reducing bacteria and description of *Desulfuromusa* gen. nov., including *Desulfuromusa kysingii* sp. nov., *Desulfuromusa sabakii* sp. nov. and *Desulfuromusa succinioxidans* sp. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1994. – Vol. 44, № 10. – P. 753–758.
17. Lovley D. R., Phillips E. J. P., Lonergan D. J., Widman P. K. Fe (III) and S⁰ reduction by *Pelobacter carbinolicus* // Arch. Microbiol. – 1995. – Vol. 61. – P. 2132–2138.
18. Moser D. P., Neelson K. H. Growth of the facultative anaerobe *Shewanella putrefaciens* by elemental sulfur reduction // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – Vol. 62, № 6. – P. 2100–2105.
19. Paulsen J., Kroger A., Thauer R. K. ATP-driven succinate oxidation in the catabolism of *Desulfuromonas acetoxidans* // Arch. Microbiol. – 1986. – V. 44. – P. 78–83.
20. Postgate J. R. The sulfate-reducing bacteria. 2nd ed. – Cambridge: Cambridge University. – 1984. – 199 p.
21. Rainey F. Pfennig N., Biebl H. *Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate oxidizing bacterium // Arch. Microbiol. – 1976. – Vol. 110, № 1. – P. 3–12.
22. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronpaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. – 1963. – Vol. 17. – P. 208–212.
23. Schumacher W., Kroneck P. M. H., Pfennig N. Comparative systematic study of "*spirillum*" 5175, *Campylobacter* and *Wolinella* species. Description of "*spirillum*" 5175 as *Sulfurospirillum deleyianum* gen. nov., sp. nov. // Arch. Microbiol. – 1992. – Vol. 158. – P. 287–293.
24. Toalster R., Stackebrandt E. *Desulfurella acetivorans* a thermophilic, acetate-oxidizing and sulfur-reducing organism, represents a distinct lineage within the *Proteobacteria* // Syst. Appl. Microbiol. – 1993. – Vol. 16. – P. 373–379.
25. Widdel F., Pfennig N. The genus *Desulfuromonas* and other Gram-negative sulfur-reducing eubacteria // The prokaryotes / Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H., 2nd ed. – New York: Springer-Verlag, 1992. – Vol. 4. – P. 3379–3389.
26. Pat. 6340596 B1 USA, Int. U.G 01 N 33 / 00. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen Sugiyama M; assignee Fujirebio Inc. – № 09 / 248, 316; fil. 02.11.1999, date of pat. 22.01.2002.

Отримано: 18 лютого 2013 р.

Прийнято до друку: 08 жовтня 2013 р.