

УДК 579.266/8.06

СІРКОВІДНОВЛЮВАЛЬНІ БАКТЕРІЇ ВОДОЙМ ЯЗІВСЬКОГО СІРКОВОГО РОДОВИЩА

Чайка О. М., Перетятко Т. Б., Гудзь С. П.

Сірковідновлювальні бактерії водойм Язівського сіркового родовища. — О. М. Чайка, Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь. — Из водойм Язівського сіркового родовища виділені бактерії, що здійснюють дисиміляційне відновлення сірки. Донорами електронів для них слугують ацетат, пропіонат, сукцинат, етанол, які при цьому окиснюються до CO_2 . Як акцептор електронів бактерії використовують елементну сірку. Вони не здатні відновлювати сульфат і тіосульфат. За відсутності сірки ростуть у середовищі з фумаратом. Для росту потребують біотин. На основі одержаних морфо-фізіологічних характеристик виділені бактерії ідентифіковані як *Desulfuromonas* sp.

Ключові слова: Сірковідновлювальні бактерії, дисиміляційне відновлення сірки, сірка, фумарат, ацетат.

Адреса: Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, м. Львів 79005, Україна;
e-mail: t-peretyatko@franko.lviv.ua

Sulfur reducing bacteria from Yaziv storage lake. — O. Chajka, T. Peretyatko, S. Gudz. — Sulfur reducing bacteria that are able to gain energy for growth by dissimilatory reduction of elemental sulfur were isolated from Yaziv storage lake. Acetate, propionate, succinate, ethanol are used as electron donors and they are oxidized to CO_2 . These bacteria use elemental sulfur as electron acceptor. Sulfate or thiosulfate is never reduced. In the absence of elemental sulfur they also grew with fumarate as the sole substrate. Biotin is required as a growth factor. On the basis of morphological and physiological characteristics the sulfur reducing bacteria are identified as *Desulfuromonas* sp.

Key words: Sulfur reducing bacteria, dissimilatory reduction of elemental sulfur, elemental sulfur, fumarate, acetate.

Address: Ivan Franko National University of Lviv, Hrushevsky Str., 4, Lviv 79005, Ukraine; e-mail: t-peretyatko@franko.lviv.ua

Вступ

Бактерії, які здатні відновлювати елементну сірку до гідроген сульфід, відіграють важливу роль у кругообігу сірки в природі, а в місцях, збагачених сіркою (особливо в сірководобувних регіонах, де процеси кругообігу сірки порушуються) в результаті активізації процесів дисиміляційної сірко- і сульфатредукції, нагромаджуються підвищені кількості сірководню [4]. Це – високотоксична сполука, яка створює серйозну загрозу для існування живих організмів [16].

Згідно Берджі, бактерії, що здійснюють дисиміляційне відновлення сірки – це збірна група неспоріднених видів і родів еубактерій та архебактерій [12]. Умовно, сірковідновлювальні бактерії поділяються на дві фізіологічні групи, які включають види, що мають різне філогенетичне походження [13]. До першої групи належать облигатні анаероби родів *Desulfuromonas* [22], *Desulfurella* [26], *Desulfuromusa* [17], *Geobacter* [11], *Pelobacter* [18], які окиснюють органічні субстрати до CO_2 і H_2O . До другої групи належать представники родів *Campylobacter* [24], *Wolinella*, *Sulfospirillum* [24], *Alteromonas*, *Shewanella* та інші. Ці бактерії ростуть за низької концентрації кисню і окиснюють органічні субстрати не повністю [19].

Сірковідновлювальні бактерії здатні до хемолітогетеротрофного (*Wolinella succinogenes*, *Sulfospirillum arcachonense*), хемолітоавтотрофного (*Aqui-*

fex aelicus, *Acidianus amivalens*, *Pyrodicticum* sp.) і хемоорганогетеротрофного (*Desulfuromonas*, *Desulfurella*, *Desulfuromusa*, *Wolinella*, *Shewanella*) росту [21, 27]. Під час хемоорганогетеротрофного типу живлення сірковідновлювальні бактерії використовують як донори вуглецю та енергії такі сполуки: лактат, ацетат, пропіонат, бутират, сукцинат, глутамат, формат, оксалоацетат, стеарат, пальмітат та інші жирні кислоти, етанол, пептиди, амінокислоти тощо.

Ріст у хемолітоавтотрофних і хемолітогетеротрофних умовах відбувається завдяки окисненню молекулярного водню [13, 21]. За умов автотрофії фіксація CO_2 відбувається у відновному циклі трикарбонових кислот (ЦТК) і 3-гідроксипропіонатному циклі [15].

Сірковідновлювальні бактерії, крім того, відіграють важливу роль в очищенні стічних вод від сполук сірки, а утворений ними гідроген сульфід здатний осаджувати важкі метали (кобальт, нікель, кадмій, залізо, свинець, цинк, ртуть та інші метали) і цим сприяти очищенню водою від цих ксенобіотиків [2]. Однак біологія сірковідновлювальних бактерій досліджена недостатньо.

Метою нашої роботи було виділити сірковідновлювальні бактерії з водойм Язівського сіркового родовища та дослідити морфо-фізіологічні властивості виділених культур для встановлення їхньої таксономічної приналежності.

Матеріали і методи

Проби води і мулу відбирали з водойм на території Язівського сіркового родовища (Прикарпаття, Україна) методом Столбунова – Рябова [8]. Їх висівали з розрахунку 100–150 колоній на чашки Петрі. Культури вирощували протягом 10–14 днів при 28°C в анаеростатах. Для поглинання кисню використовували генератори GENbox anaer (Франція). Бактерії вирощували у агаризованому середовищі Постгейта В без сульфатів [20].

Для виявлення колоній сірковідновлювальних бактерій, у середовище додавали залізо у формі FeCl₂. Це сприяло утворенню FeS і надавало колоніям чорного забарвлення [9]. Бактерії вирощували у рідкому середовищі Постгейта С у пробірках об'ємом 20 мл, щільно закритих гумовими корками при температурі 28 °С, рН 7,0–7,5.

Біомасу клітин визначали ваговим методом або фотоелектроколориметрично, використовуючи КФК–3. Для фотоелектрометричного методу визначення біомаси клітин будували калібрувальну криву залежності екстинції від сухої маси клітин.

Для дослідження використання бактеріями різних сполук сірки, як акцептори електронів у середовище вносили натрій тіосульфат або амоній сульфат. Для вивчення здатності бактерій засвоювати органічні сполуки, до середовища додавали глюкозу, фруктозу, сахарозу, етанол, пальмітат, фумарат і натрієві солі пропіонової, лимонної, оцтової кислот у концентрації 0,3%. Наявність ацетат-іону у середовищі визначали за [1].

Морфологію досліджуваних культур вивчали за допомогою електронної мікроскопії. Для цього, двічі відмиті дистильованою водою клітини осаджували центрифугуванням при 10 тис. об./хв протягом 15 хв. Клітини фіксували в 1,5%-му розчині OsO₄ у какодилатному буфері (рН 7,2) протягом 90 хв при 0°C. Фіксовані клітини промивали, обезводнювали в розчинах із зростаючими концентраціями етанолу і окису пропілену. Зразки переносили в епоксидну смолу Епон 812. Зрізи клітин отримували на ультрамікротомі УМТП-6 і контрастували цитратом свинцю за Рейнольдсом [23]. Перегляд і фотографування зразків проводили на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 при прискорюючій напрузі 75кВ. Кінцеве збільшення на мікрофотографіях – 10–15 тис. разів.

Концентрацію гідроген сульфід у визначали фотометрично за утворенням метиленової сині [25].

Ідентифікацію сірковідновлювальних бактерій проводили за морфо-фізіологічними ознаками згідно визначника бактерій Берджі [7].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою Microsoft Excel 2000 та як описано [25].

Результати та їх обговорення

Протягом останніх років на території Язівського сіркового родовища велика увага приділялася вивченню поширення та моніторингу сульфатвідновлюваних бактерій [3]. У той же час, поширення і

розвиток сірковідновлювальних бактерій тут залишалися практично не дослідженими. Тому, із води та мулу кар'єрного озера Яворівське, що знаходиться на території Язівського сіркового родовища, були відібрані проби для проведення мікробіологічного аналізу на загальну кількість бактерій, та на наявність серед них сірковідновлювальних бактерій.

Виявилося, що у воді, відібраної з глибини 3 м, міститься 9,37·10⁶ КФО/мл, із яких 1,5·10⁶ здатні рости на середовищі з елементною сіркою як акцептором електронів, що складало 16% від загальної кількості бактерій. У верхніх шарах мулу кількість сірковідновлювальних бактерій складала 20% від загальної кількості бактерій. Таким чином, у воді і мулі водойм, що утворилися на місці сірковидобувних кар'єрів, міститься доволі велика кількість сірковідновлювальних бактерій. Їхня життєдіяльність забезпечує процес відновлення сірки, що супроводжується нагромадженням гідроген сульфід.

Сірковідновлювальні бактерії, згідно визначника бактерій Берджі, належать до 7-ої групи – "Бактерії, які здійснюють дисиміляційне відновлення сульфату або сірки". Їх поділяють на чотири підгрупи. Відновлювати елементну сірку можуть окремі представники родів *Desulfomicrobium* і *Desulfovibrio*, що належать до другої підгрупи і усі представники четвертої підгрупи, що представлені родами *Desulfurella* і *Desulfuromonas*.

Наявність сірковідновлювальних бактерій у воді і мулі озера виявляли шляхом висіву проб на агаризоване середовище Постгейта В. Донором електронів у ньому був лактат, а акцептором S⁰. Після 14 діб культивування відібрали більше 100 колоній, що мали чорне забарвлення, яке обумовлене наявністю в клітинах FeS, що утворився в результаті взаємодії заліза і гідроген сульфід, виділюваного бактеріями внаслідок дисиміляційного відновлення S⁰. Виділені культури мають паличкоподібну форму (рис. 1), рухомі, оптимальний ріст спостерігається за температури 25–35 °С, рН 6,5–7,5.

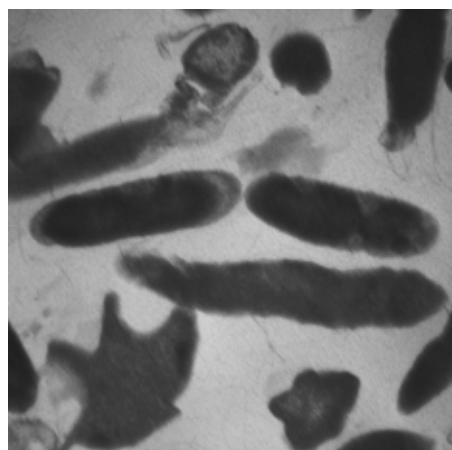


Рис. 1. Електронно-мікроскопічна фотографія клітин виділених сірковідновлювальних бактерій (x 15 000)

Fig. 1. Electron microscopic image of cells of sulfur reducing bacteria

В подальших експериментах використовували одну типову культуру, що добре росла на селективному середовищі і колонії якої мали інтенсивне чорне забарвлення.

Відомо, що представники родів *Desulfomicrobium* і *Desulfovibrio*, окрім елементарної сірки, відновлюють також сульфат і тіосульфат, а органічні речовини окиснюють не повністю, а лише до ацетату. Два роди сірководновлюваних бактерій *Desulfurella* та *Desulfuromonas*, у визначнику бактерій Берджі, віднесені до четвертої підгрупи, які не здатні відновлювати сульфат і тіосульфат як акцептори електронів. Представники цих родів відновлюють лише елементарну сірку. Щоб з'ясувати, до якої підгрупи належать виділені бактерії, їх висівали у середовище з лактатом натрію, до якого додавали сульфат, тіосульфат або елементарну сірку (табл. 1).

Виявилось, що виділені бактерії як джерело вуглецю використовують етанол, ацетат, пропіонат, сукцинат, фумарат, бутанол і не ростуть у середовищі з глюкозою, фруктозою, сахарозою та пальмітатом (табл. 1). Для росту вони потребують вітамін біотин.

Таблиця 1. Властивості бактерій роду *Desulfuromonas* та виділених сірководновлювальних бактерій

Table 1. Propertis of bacteria of *Desulfuromonas* species and of osilated sulfur reducing bacteria

Ознаки	Сірководновлювальні бактерії	
	<i>Desulfuromonas</i>	Штам УХ-1
Розмір клітин, мкм	0,4–0,8 x 1–4	0,5–0,7 x 1,8–2,0
Рухливість	+	+
Оптимальне значення		
температури °C	30	25–35
pH	6,8–7,5	6,5–7,5
Акцептор електронів		
SO ₄ ²⁻	–	–
S ₂ O ₃ ²⁻	–	–
S ⁰	+	+
Джерело вуглецю		
глюкоза	–	–
фруктоза	–	–
сахароза	–	–
пальмітат	–	–
етанол	+	+
ацетат	+	+
пропіонат	+	+
сукцинат	+	+
фумарат	+	+
бутанол	+	+
Повне окиснення органічних сполук	+	+
Потреба в біотині	+	+

Примітка: "+" – наявність росту, "–" – відсутність росту

У середовищі з сульфатом та тіосульфатом виділена культура бактерій не росте, а у середовищі з лактатом і елементарною сіркою не нагромаджує ацетат,

що вказує на те, що вона окиснює органічні субстрати повністю до CO₂.

Одержані результати показують, що досліджувана культура належить до четвертої підгрупи "Бактерії, що відновлюють сірку" [7].

У наступних експериментах ми дослідили інтенсивність росту і утворення гідроген сульфід у середовищі із різними органічними сполуками (рис. 2). Було показано, що у середовищі з ацетатом, біомаса бактерій складала 3,5–3,75 г/л, і вони нагромаджували до 4,5 мМ гідроген сульфід, що свідчить про їх високу сульфурредуктазну активність. У середовищах з іншими органічними речовинами бактерії нагромаджували меншу біомасу і, відповідно, меншу кількість гідроген сульфід. Використання ацетату, етанолу, пропіонату, сукцинату, фумарату є також характерною ознакою четвертої підгрупи.

Відомо, що деякі сірководновлювані бактерії можуть використовувати фумарат як акцептор електронів і, одночасно, як джерело вуглецю [7]. Встановлено, що виділені бактерії ростуть у середовищі з фумаратом за відсутності елементарної сірки.

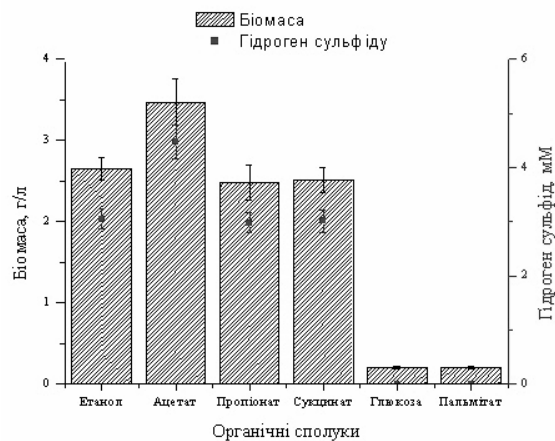


Рис. 2. Ріст і утворення гідроген сульфід виділеною культурою у середовищах із різними органічними сполуками

Fig. 2. Growth and formation of hydrogen sulfide by isolated species in medium with different organic compounds

Висновки

Таким чином, на основі одержаних результатів (морфо-фізіологічні властивості, здатність використовувати органічні субстрати і повністю їх окиснювати, використовувати елементарну сірку, як акцептор електронів і відсутність росту у середовищі із сульфатом та тіосульфатом) можна зробити висновок, що виділена культура належить до сірководновлювальних бактерій та ідентифікована як *Desulfuromonas sp.*

1. Бабко А. К., П'ятицький І. В. Кількісний аналіз. – К.: Вища школа, 1974. – 352 с.

2. Буракаева А. Д., Русанов А. М., Лантух В. П. Роль микроорганизмов в очистке сточных вод от тяжелых металлов: Метод. пособие. – Оренбург: ОГУ, 1999. – 51 с.

3. Колісник Я., Гудзь С., Подопрігора О., Клим І. Сульфатвідновлювальні та сіркоокиснюючі бактерії різних біотопів Яворівського сіркового родовища // Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. – 2008, Вип. – 46. – С. 147–152.
4. Галушка А., Перетятко Т. П., Гудзь С. П. Бактерії циклу сірки та їхня роль у природі // Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. – 2007, Вип. – 43. – С. 61–77.
5. Грабович М. Ю. Участие прокариот в круговороте серы // Сорос. Обозрев. Журн. – 1999. – №12. – С. 16–20.
6. Козлова І. П., Радченко О. С., Степура Л. Г., Кондратюк Т. О., Піляшенко-Новохатний А. І. Геохімічна діяльність мікроорганізмів та її прикладні аспекти. – К.: Наукова Думка, 2008. – 526 с.
7. *Определитель бактерий Берджи* / Под. ред. Дж. Хоулта, Р. Крига, П. Снита, Дж. Стейли и С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – 432 с.
8. Родина А. Г. Методы водной микробиологии. Практ. руководство. М.–Л.: Наука, 1965. – 363 с.
9. Розанова Е. П. Методы культивирования и идентификации анаэробных бактерий, восстанавливающих серу и ее окисленные соединения // Теоретические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов. – Пущино, 1978. – С. 123–136.
10. *Современная микробиология. Прокары* / Под ред. Й. Ленгелер, Г. Шлегеля: В 2 т. – М.: Мир, 2005. – Т. 1. – 656 с.
11. Caccavaco F., Lorengan 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. Fishter 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. Hugler M., Huber H., Stetter K. O., Fuchs G. Autotrophic CO₂ fixation pathways in archaea (Crenarchaeota) // Arch Microbiol. – 2003. – 179. – P. 160–173.
16. *Hydrogen sulfide: human health aspects* [Electronic resource] / World health organization: Cicads 53. – Geneva, 2003. Access mode: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad53.htm>
17. 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 succinoxidans* sp.nov. // Int.J.Syst.Bacteriol.– 1994. – Vol. 44, № 10. – P. 753–758.
18. 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.
19. Moser D. P., Nealson K. H. Growth of the facultative anaerobe *Shewanella putrefaciens* by elemental sulfur reduction // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – Vol. 62, № 6. – P. 2100–2105.
20. Postgate J. R. The sulfate-reducing bacteria. 2nd ed.– Cambridge: Cambridge University. – 1984. – P. 199.
21. Rabus R., Hansen T., Widdel F. Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community/ Dworkin M. – 3rd ed. – New York: Springer-Verlag. – 2000.
22. 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.
23. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. – 1963. – 17. – P. 208–212.
24. 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.
25. Sugiyama M. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen sulfide/ United States Patent №6340596, 2002.
26. 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.
27. Widdel F., Pfennig N. The genus *Dsulforomonas* and other Gram – negative sulfur-reducing eubacteria // The prokaryotes / Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, – 2nd ed. – New York: Springer, 1992 – Vol.4. – P. 3379–3389.

Отримано: 4 травня 2010 р.

Прийнято до друку: 24 червня 2010 р.