

УДК: 579.266/68.477.811.2/3:546.81

ВПЛИВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА РІСТ ТА ВІДНОВЛЕННЯ СУЛЬФАТІВ *DESULFOVIBRIO DESULFURICANS*

Мороз О.М., Гудзь С.П., Подопрігора О.І., Клим І.Р.,
Борсукевич Б.М., Деркач М.Б., Парасюк О.В., Гнатуш С.О.

Вплив важких металів на ріст та відновлення сульфатів Desulfovibrio desulfuricans. – О.М. Мороз, С.П. Гудзь, О.І. Подопрігора, І.Р. Клим, Б.М. Борсукевич, М.Б. Деркач, О.В. Парасюк, С.О. Гнатуш. – Визначено вміст іонів важких металів: Sr^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , у воді з різних глибин (0-60 м) кар'єру Яворівського сіркового родовища. Вміст Mn^{2+} значно перевищує ГДК на глибинах понад 30 м; концентрація Cd^{2+} перевищує ГДК на всіх глибинах; вміст Sr^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} та Cu^{2+} на жодній глибині не вищий за ГДК. Виявлено негативний вплив іонів Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} у концентраціях 0,7-3 мМ на ріст сульфатвідновлювальних бактерій. Найбільш токсичний вплив на сульфатвідновлювальні бактерії здійснювали іони Ni^{2+} , Pb^{2+} та Co^{2+} . Встановлено суттєве пригнічення росту штампів *Desulfovibrio desulfuricans* K-45 і Ya-11 іонами свинцю та кадмію у концентраціях, вищих 3 мМ. Встановлено, що свинець і кадмій негативно впливають на утворення сірководню та відновлення сульфатів інкубованими і вирощеними у присутності 3 мМ розчинів солей металів клітинами сульфатвідновлювальних бактерій.*

Ключові слова: сульфатвідновлювальні бактерії, іони важких металів, сірководень, сульфати, сульфатредукція.

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

*Hard methals influence on growth and sulfate reducing by Desulfovibrio desulfuricans. - O.M. Moroz, S.P. Gudz, O.I. Podopryhora, I.R. Klym, B.M. Borsukevych, M.B. Derkach, O.V. Parasiuk, S.O. Hnatysh. – Hard metals ions maintenance: Sr^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , in water from different depths (0-60 m) of Yavoriv sulfur deposit open pit was determined. Maintenance of Mn^{2+} considerably exceed admitted limit on depths more than 30 m; concentration of Cd^{2+} exceed admitted limit on all depths; maintenance of Sr^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} ma Cu^{2+} don't exceed admitted limit on any depth. Negative influence of Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} ions in 0,7-3 mM concentrations on growth of sulfur reducing bacteria was discovered. Most toxic influence on sulfur reducing bacteria make Ni^{2+} , Pb^{2+} and Co^{2+} ions. Considerable decreesing of strains *Desulfovibrio desulfuricans* K-45 і Ya-11 growth by Pb^{2+} and Cd^{2+} ions in more than 3 mM concentrations was established. Pb^{2+} and Cd^{2+} make negative influence on hydrogen sulfide creation and sulfates reduction by incubated and grown in presence of 3 mM salts metals solutions cells of sulfur reducing bacteria.*

Key words: sulfur reducing bacteria, hard metals ions, hydrogen sulfide, sulfates, sulfur reduction

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

*ГДК – гранично допустимі концентрації

Вступ

Однією з основних проблем стану навколишнього середовища є наявність великих кількостей важких металів, радіонуклідів, а також їх сполук в ґрунтах, природних водоймах, стоках промислових підприємств [11, 14]. Навколо промислових об'єктів формуються своєрідні локальні геохімічні аномалії з підвищеним вмістом шкідливих елементів [2]. Розчинність хімічних речовин у воді обумовлює їхні токсичні властивості і здатність впливати на навколишнє середовище, зокрема, ґрунт. Відбувається руйнування ґрунтово-поглинаючого комплексу, дестабілізація кислотно-лужного потенціалу,

посилення хімічної ерозії і зниження екологічної ємності ґрунтів [5, 7, 9]. Згідно матеріалів Європейського економічного співтовариства за токсичністю метали розділено на дві групи: перша – це найбільш токсичні метали і речовини, наприклад, кадмій і його сполуки; друга група – цинк, мідь, кобальт, нікель, хром, свинець, уран і його сполуки. Згідно з переліком Американського агентства захисту навколишнього середовища найбільш небезпечними забруднювачами довкілля є кадмій, хром, мідь, свинець, нікель, цинк [14, 23].

Кадмій міститься у природних водах, атмосферних опадах, стічних водах

металургійних, машинобудівних, приладобудівних, хімічних, лакофарбових, текстильних виробництв, виробництв літаків, автомобілів, акумуляторів, пластмас, отрутохімікатів, фотоматеріалів та ін. і відноситься до числа сильно отруйних речовин. Смертельна доза для людини складає 150 мг/кг маси тіла з летальним ефектом через 1,5 год, метал в основному накопичується у печінці, нирках, підшлунковій і щитовидній залозах [4]. Кадмій надходить у бактеріальні клітини через транспортні системи, призначені для двовалентних катіонів. Він пригнічує дихання шляхом зв'язування сульфгідрильних груп ферментів, викликає денатурацію білків, впливає на метаболізм кальцію і цинку [17].

Свинець є одним з найтоксичніших важких металів, є синергістом і збільшує токсичність інших металів. Він інгібує АТФ-азну активність плазматичної мембрани, взаємодіє з фосфоліпідами мембрани і утворює з ними специфічні комплекси. Його іони порушують структуру поверхневих шарів клітини, цілісність цитоплазматичної мембрани, органел, змінюють величину трансмембранного потенціалу, а також пригнічують окремі процеси метаболізму [15, 25].

Мідь є кофактором ряду ферментів: Cu, Zn-супероксиддисмутази, лізілоксидази, дорамін-β-гідроксилази, аскорбатоксидази, галактозидази, цитохром с-оксидази. У великих концентраціях токсична завдяки взаємодії з нуклеїновими кислотами, а також ферментами. Основним механізмом дії є порушення цілісності цитоплазматичної мембрани [14].

Катіонна сорбція цинку і кадмію може супроводжуватися виходом іонів калію для зрівноваження іонного балансу в клітині, де відбувається стехіометричний обмін іонів кадмію і калію. Вихід іонів калію асоціюється з руйнуванням клітинної стінки і втратою життєздатності клітини [14]. Цинк є кофактором багатьох ферментів: алкогольдегідрогенази, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, альдолази, фосфоліпази А і ін. Він є активатором металоферментних комплексів: аргінази, амінопептидази, гістидиндезамінази, енолази, карбоксилази і ін. Іони цинку утворюють комплекси з білками, нуклеїновими кислотами, амінокислотами, АТФ, цукрами, вітамінами, антибіотиками [19].

Нагромадження кобальту в біомасі залежить від його концентрації в середовищі. Вміст його в біомасі мікроорганізмів різко зростає, якщо ріст культури пригнічений [14]. Як і іони інших важких металів, іони кобальту викликають денатурацію білків і нуклеїнових кислот у клітині, впливають на співвідношення синтезу амінокислот (надсинтез одних і зменшення вмісту інших), позитивно або негативно впливають на

утворення антибіотиків, синтез ферментів, пігментів [11].

Відомо чотири основні категорії металів: токсичні, стратегічні, дорогоцінні метали і радіонукліди. Фізико-хімічні процеси, що використовуються при виведенні важких металів, включають преципітацію, коагуляцію, іонний обмін, мембранні процеси (ультрафільтрація, електродіаліз, зворотній осмос) і адсорбцію [14, 23]. Бактерії, дріжджі, гриби і водорості можуть виводити важкі метали і радіонукліди з водних розчинів і ґрунтів у набагато більших кількостях, ніж інші сорбенти [18, 20, 22]. Зв'язування металів біомасою мікроорганізмів буває активним (активний транспорт і вловлювання частинок), воно відоме як біоаккумуляція і залежить від метаболічної активності клітин, і пасивним, відоме як сорбція (біосорбція) або комплексація, воно відбувається в основному на рівні мембрани клітини [23]. Головну роль в сорбції металів відіграють іонообмінні процеси. Встановлено основні іонообмінні сайти: ацетамідні, полісахаридні групи, аміногрупи і фосфатні групи нуклеїнових кислот, аміно- і амідно- групи, сульфгідрильні і карбоксильні групи білків [24]. Карбоксильна, гідроксильна, сульфатна, фосфатна, амінна функціональні групи визначають заряд (-) клітинної стінки мікроорганізмів, що обумовлює її поведінку як катіоніту. Можливо, сорбція металів здійснюється певними ділянками ліпополісахаридів клітинної стінки або специфічними хелатними сполуками сидерофорам, а можливо, що сорбція металів визначається головним чином наявністю білка в клітинній стінці або поліфосфатами [14]. Характер взаємодії мікроорганізмів з металами визначається концентрацією металу, ступенем його токсичності, а також метаболічним потенціалом мікроорганізмів. Найбільш чутливими до дії важких металів є енергетичні процеси (у більшій мірі бродіння, ніж дихання), процеси клітинного поділу, транспорт цукрів і катіонів металів, синтез рибофлавіну [21].

Серед широкого спектру методів очистки довкілля від токсичних сполук особливе місце займають біологічні, зокрема, з використанням мікроорганізмів. Так, розроблено ефективні методи очищення стічних вод від сульфатів та важких металів при застосуванні сульфатвідновлювальних бактерій. Вони, крім сульфатів, як акцептори електронів можуть використовувати деякі метали зі змінною валентністю: Cr (VI), U (VI), Tc (VI), Pd (II) і ін., перетворюючи їх до менш токсичних малорозчинних сполук. У водній товщі і намульних відкладах поверхневих ніш сульфатвідновлювальні бактерії беруть участь в розщепленні компонентів фіто- і зоопланктону, використовуючи органічні сполуки як донори електронів у дисиміляційній сульфатредукції.

Важкі метали також можуть зв'язуватися сірководнем, що його утворюють сульфатвідновлювальні бактерії, тобто відбувається відновлення цих металів сірководнем: Cu (II), Cd (II), Ni (II), Pb (II), Zn (II). Обмеженням у застосуванні сульфатвідновлювальних бактерій для очищення стічних вод є токсичність для них іонів металів і несприятлива температура навколишнього середовища [3, 16].

Метою даної роботи було визначити вміст деяких іонів важких металів у воді кар'єру Яворівського сіркового родовища, а також вивчити вплив іонів Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} та Fe^{2+} на ріст штамів *Desulfovibrio desulfuricans*. Було цікаво також дослідити вплив свинцю і кадмію на утворення сірководню та відновлення сульфатів клітинами сульфатвідновлювальних бактерій за умов їх інкубації та вирощування в присутності іонів цих металів.

Матеріали і методи

Відбір проб води з різних глибин кар'єру (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 м) проводили за допомогою батометра. Концентрації Sr^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} визначали на програмному комплексі зв'язку атомно-абсорбційного спектрофотометра С 115 М1 та комплексу КАС-120 з ІВМ, що є сумісною з ЕОМ. Фізичний зв'язок СФ та ЕОМ здійснювався за допомогою пристрою спряження (інтерфейса). Сірководень визначали титруванням йодометрично, рН води – потенціометрично [10]. Відбір проб води і визначення у них вмісту іонів важких металів проводили спільно з працівниками відділення гірничо-хімічної сировини Інституту „Гірхімпром” Академії гірничих наук України під керівництвом члена-кореспондента АГН України А.М. Гайдина.

Об'єктом дослідження були штамми сульфатвідновлювальних бактерій: *Desulfovibrio desulfuricans* K-45 із Всеукраїнської колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України і штам *D. desulfuricans* Ya-11, виділений та ідентифікований к.б.н. Т.Б. Перетятком з водойми кар'єру Яворівського сіркового родовища [13].

Бактерії вирощували впродовж 7-19 діб у термостаті при температурі 30°C за анаеробних умов у пробірках, об'ємом 25 мл, чи колбах, об'ємом 500 мл, доверху заповнених середовищем Кравцова-Сорокіна [8]. У окремих експериментах для вивчення росту бактерій і отримання інтактних метаболічно активних клітин використовували модифіковане середовище Кравцова-Сорокіна без солі Мора. У залежності від умов досліду у середовище вносили розчини солей важких металів, які стерилізували окремо.

Біомасу визначали на фотоелектроколориметрі КФК-3 при довжині хвилі 340 нм у кюветі з оптичним шляхом 3 мм. Формула розрахунку: $C, \text{ г/л} = E_{340} \cdot n/0,19$, де E_{340} - екстинкція при 340 нм; n

- фактор розведення, разів; 0,19 - коефіцієнт перерахунку, отриманий ваговим методом.

Для вивчення впливу Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} на ріст сульфатвідновлювальних бактерій у пробірках, заповнені рідким модифікованим середовищем Кравцова-Сорокіна, додавали розчини солей металів: $Pb(NO_3)_2$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $NiCl_2$, $CoCl_2$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, у концентраціях 0,3; 0,5; 0,7; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 мМ, а також суспензію клітин бактерій для отримання однакової густини засіву 0,05 г/л. Контрольними були пробірки з середовищем і клітинами, які солей важких металів не містили. Після 14 діб культивування бактерій при 30° С визначали біомасу.

Для визначення впливу іонів свинцю та кадмію на ріст сульфатвідновлювальних бактерій у пробірках, заповнені рідким модифікованим середовищем Кравцова-Сорокіна, додавали $Pb(NO_3)_2$ і $CdSO_4$ у концентраціях 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1 мМ (контроль – без солей свинцю та кадмію), а також суспензію клітин бактерій для отримання однакової густини засіву 0,05 г/л. Після 14 діб культивування бактерій при 30° С визначали біомасу.

Вивчали кінетику росту штамів K-45 і Ya-11 у модифікованому середовищі Кравцова-Сорокіна у присутності іонів свинцю і кадмію у концентраціях 1; 2; 3; 4; 5; 8; 10 мМ (контроль – без солей металів) впродовж 19 діб (456 год) при 30° С. Густина засіву була однаковою - 0,05 г/л. Після певних проміжків часу визначали біомасу.

Вивчали вплив свинцю і кадмію: короткотерміновий (інкубація) та тривалий (вирощування в присутності іонів металів), на утворення сірководню і відновлення сульфатів клітинами бактерій під час росту у середовищі Кравцова-Сорокіна. Для з'ясування короткотермінового впливу металів на сульфатредукцію клітини штамів K-45 і Ya-11 вирощували колбах, що містили 500 мл модифікованого середовища Кравцова-Сорокіна, впродовж 7 діб за анаеробних умов при 30° С. Клітини від культуральної рідини відокремлювали центрифугуванням впродовж 25 хв при 6000 об/хв, відмивали дистильованою водою, до отриманої суспензії клітин додавали розчини $Pb(NO_3)_2$ і $CdSO_4$ для отримання кінцевої концентрації 3 мМ та інкубували при кімнатній температурі впродовж 1 год. Після цього клітини відмивали дистильованою водою і вимірювали біомасу суспензії для розрахунку об'єму засіву. Для вивчення тривалого впливу металів на сульфатредукцію клітини штамів K-45 і Ya-11 вирощували впродовж 7 діб за анаеробних умов при 30° С у колбах, що містили 500 мл модифікованого середовища Кравцова-Сорокіна, в яке додавали розчини $Pb(NO_3)_2$ і $CdSO_4$ для отримання кінцевої концентрації 3 мМ. Клітини від культуральної рідини відокремлювали

центрифуванням впродовж 25 хв при 6000 об/хв, відмивали дистильованою водою і вимірювали біомасу суспензії для розрахунку об'єму засіву. У пробірки, об'ємом 25 мл, вносили середовище Кравцова-Сорокіна і суспензію інкубованих або вирощених у присутності іонів металів та інтактних (контроль) клітин (густина засіву 0,05 г/л). Після певних проміжків часу визначали біомасу. У культуральній рідині, відокремленій від клітин центрифугуванням впродовж 25 хв при 6000 об/хв, вимірювали вміст сірководню йодометричним методом [10] і сульфатів турбідиметричним [1].

Проводили статистичну обробку результатів [6].

Результати і їх обговорення

За роки дослідження (з 2001 року по 2007 рік) екологічного стану водойми кар'єру Яворівського сіркового родовища, затоплення якого тривало майже 6 років, суттєво змінилася ситуація і у воді

озера "Яворівське", і на прилеглих територіях. Якщо концентрація сульфатів у придонних шарах зросла від 0,8 до 1,7 г/л, то вміст сірководню у поверхневих водах, на відміну від 2001-2005 років, суттєво знизився. У придонних шарах його кількість зменшилася від 12,1 до 4,7 мг/л, тобто втричі [12]. На відміну від постійного контролю за зміною концентрацій сіркових сполук, дослідження вмісту іонів важких металів у воді кар'єру проведено вперше. Як показали наші дослідження (табл. 1), у воді кар'єру вміст іонів стронцію збільшується з глибиною, на глибині 60 м досягає $1,86 \pm 0,03$ мг/л, але не перевершує ГДК. Концентрація марганцю значно перевищує ГДК вже на глибинах понад 30 м і на глибині 60 м досягає $0,568 \pm 0,008$ мг/л. Концентрація іонів кадмію перевищує ГДК на всіх глибинах ($0,012 \pm 0,001$ - $0,033 \pm 0,004$ мг/л). Вміст іонів цинку, свинцю та міді виявився низьким і на жодній глибині не був вищим за ГДК.

Таблиця 1. Вміст іонів важких металів у воді кар'єру Яворівського сіркового родовища

Глибина, м	Концентрація іону металу, мг/л					
	Sr ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Cd ²⁺	Pb ²⁺	Cu ²⁺
0	1,13±0,03	0,012±0,001	0,004±0,001	0,015±0,002*	0,011±0,002	0,0021±0,0001
5	1,55±0,01	0,011±0,001	0,008±0,001	0,012±0,001*	0,012±0,001	0,0032±0,0004
10	0,97±0,01	0,010±0,002	0,008±0,001	0,019±0,002*	0,013±0,003	0,0024±0,0002
20	1,73±0,03	0,218±0,001	0,006±0,001	0,033±0,004*	0,014±0,002	0,0012±0,0003
30	1,75±0,02	0,538±0,004*	0,006±0,001	0,012±0,001*	0,012±0,004	0,0013±0,0005
40	1,72±0,01	0,527±0,007*	0,014±0,002	0,024±0,003*	0,013±0,002	0,0021±0,0003
50	1,83±0,04	0,542±0,006*	0,014±0,002	0,026±0,005*	0,012±0,001	0,0013±0,0001
60	1,86±0,03	0,568±0,008*	0,014±0,003	0,026±0,004*	0,014±0,002	0,0014±0,0004
ГДК [4]	2,0	0,01-0,25	0,01-1,0	0,005	0,02 -0,1	0,02-1,5

Примітка: * - $p \leq 0,05$

Вивчали вплив Pb²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺ на ріст сульфатвідновлювальних бактерій. Клітини штаму *Ya-11* вирощували впродовж 14 діб у модифікованому середовищі Кравцова-Сорокіна, в яке додавали розчини солей металів у концентраціях 0,3; 0,5; 0,7; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 мМ, а також суспензію клітин бактерій (0,05 г/л). Як видно з отриманих результатів (рис. 1, рис. 2), під впливом іонів всіх досліджуваних металів за концентрацій 0,7-3 мМ ріст бактерій суттєво пригнічувався і виявився практично відсутнім при 2,5-3 мМ ($p \leq 0,05$). Найбільш токсичний вплив на сульфатвідновлювальні бактерії здійснювали іони Ni²⁺, Pb²⁺ та Co²⁺, на 14 добу культивування біомаса становила відповідно $0,05 \pm 0,01$, $0,10 \pm 0,02$ та $0,37 \pm 0,02$ г/л за концентрацій іонів металів 3 мМ, контроль: $1,82 \pm 0,03$ г/л.

Відомо, що одними з найбільш токсичних і тому небезпечних забруднювачів довкілля є кадмій та свинець [14, 23]. Уявлялося доцільним вивчити їх вплив на життєздатність та сульфатредукцію сульфатвідновлювальних

бактерій, оскільки при застосуванні цих бактерій можна ефективно здійснювати очистку стічних вод від сульфатів та важких металів. Вивчали ріст штамів K-45 і Ya-11 у модифікованому середовищі Кравцова-Сорокіна впродовж 14 діб при 30°С в присутності іонів свинцю і кадмію у концентраціях: 0,1-1 мМ. Після цього часу спостерігали утворення чорного осаду PbS і насиченого жовтого осаду CdS. Значного впливу на ріст бактерій обидвох штамів іонів свинцю і кадмію у досліджуваних концентраціях не виявлено (рис. 3). У присутності свинцю 0,1-1 мМ біомаса K-45 виявилася в межах $2,69 \pm 0,02$ - $2,88 \pm 0,12$ г/л (контроль: $1,97 \pm 0,18$ г/л) ($p \geq 0,05$), Ya-11: $2,64 \pm 0,02$ - $3,07 \pm 0,05$ г/л (контроль: $1,90 \pm 0,11$ г/л) ($p \geq 0,05$). За концентрацій кадмію 0,1-1 мМ біомаса K-45 виявилася $2,64 \pm 0,08$ - $2,81 \pm 0,04$ г/л (контроль: $1,96 \pm 0,06$ г/л) ($p \geq 0,05$), Ya-11 - $2,05 \pm 0,01$ - $2,64 \pm 0,08$ г/л (контроль: $1,59 \pm 0,2$ г/л) ($p \geq 0,05$).

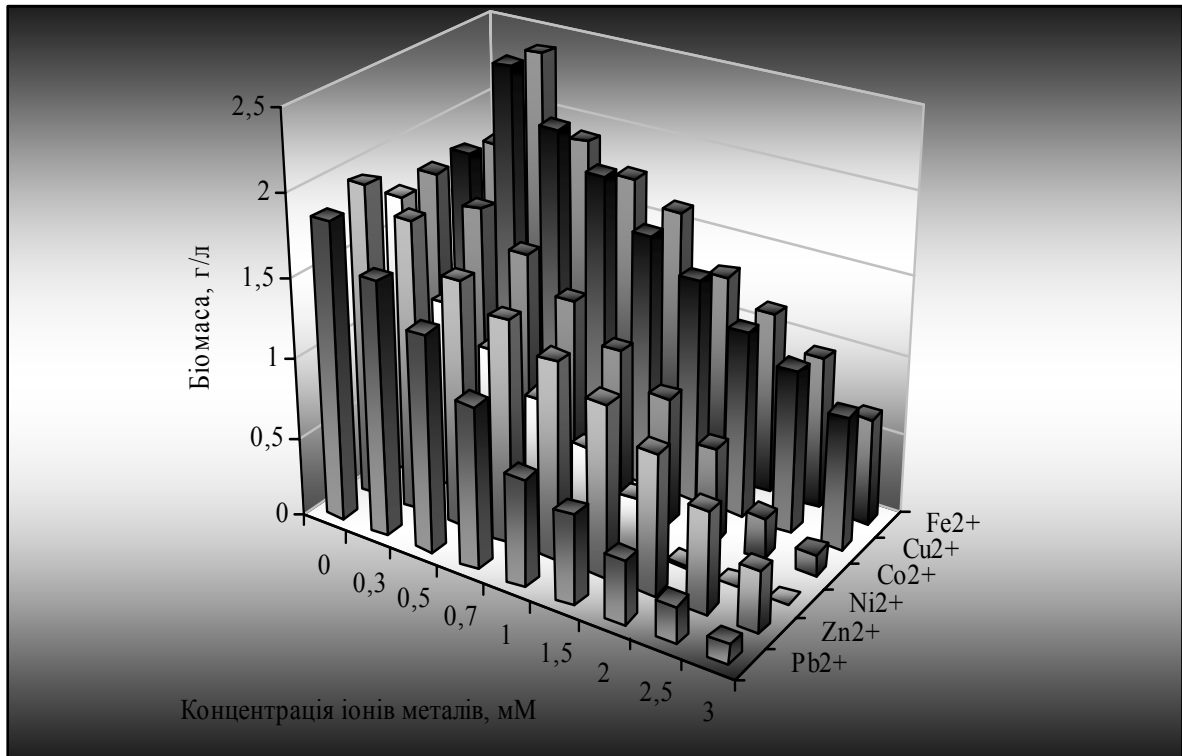


Рис. 1. Ріст *D. desulfuricans* Ya-11 у присутності іонів важких металів (0,3–3 мМ) у модифікованому середовищі Кравцова-Сорокіна впродовж 14 діб.

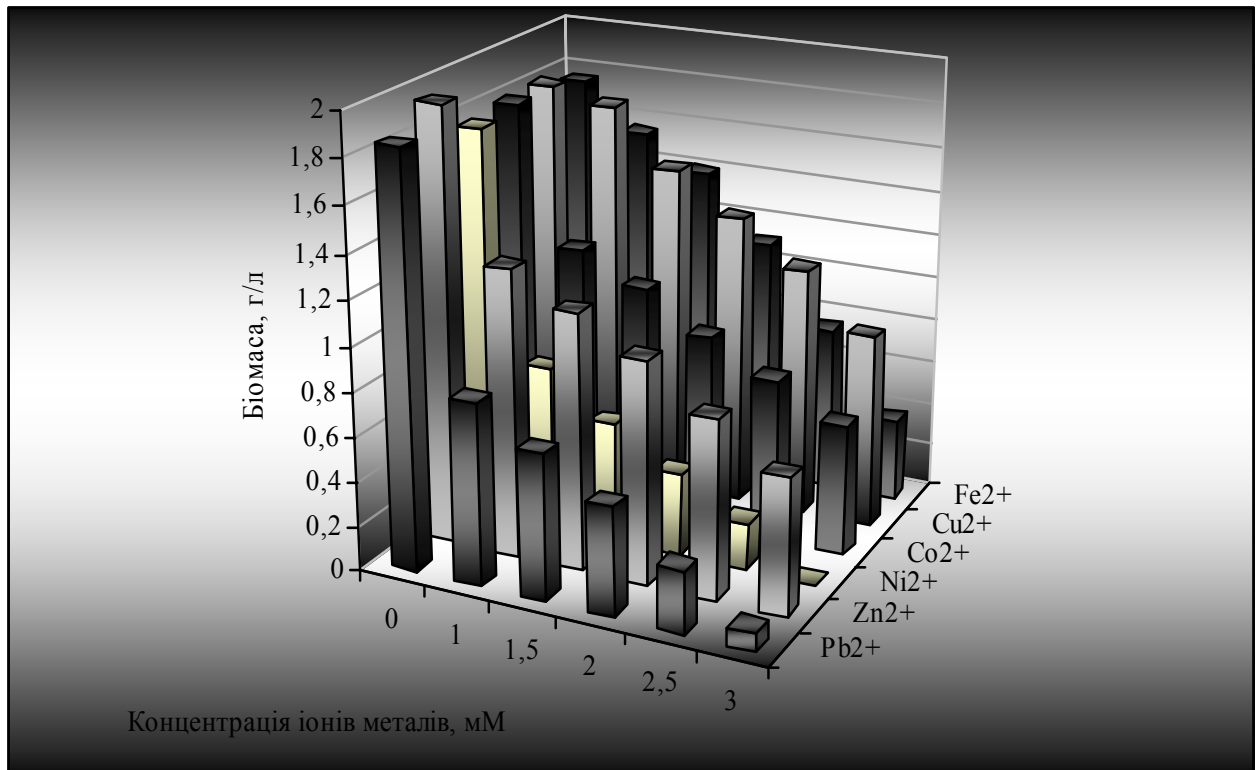


Рис. 2. Ріст *D. desulfuricans* Ya-11 у присутності іонів важких металів (1–3 мМ) у модифікованому середовищі Кравцова-Сорокіна впродовж 14 діб.

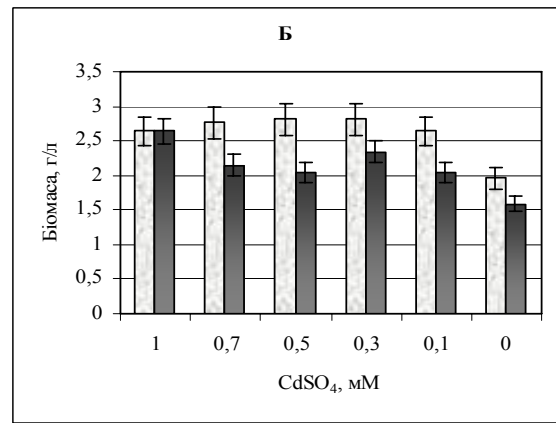
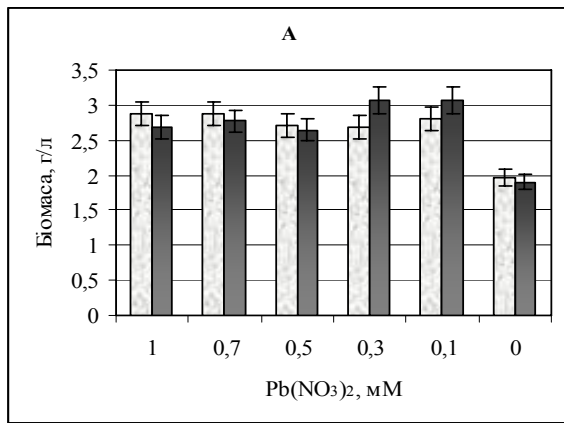


Рис. 3. Ріст *D. desulfuricans* K-45 (□) і *Ya-11* (■) у присутності іонів Pb^{2+} (А) і Cd^{2+} (Б) у модифікованому середовищі Кравцова-Сорокіна впродовж 14 діб.

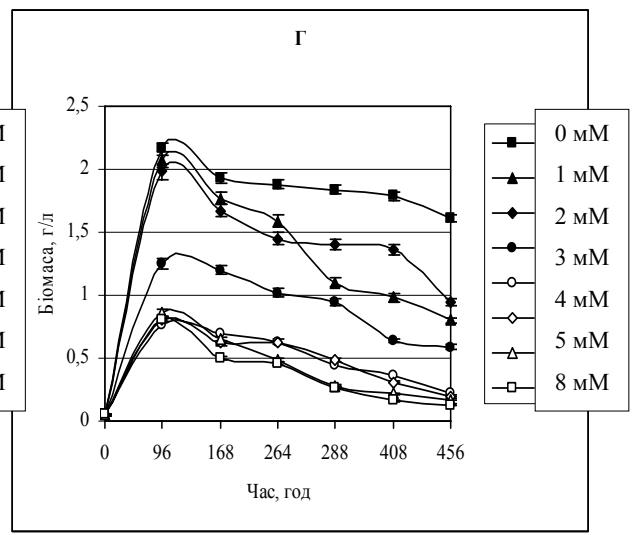
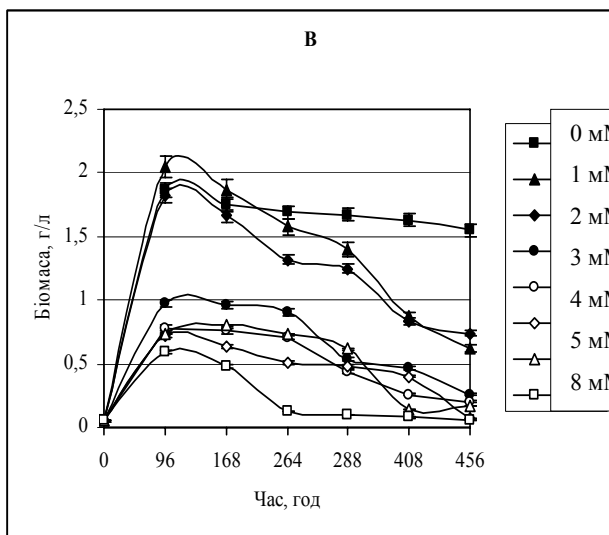
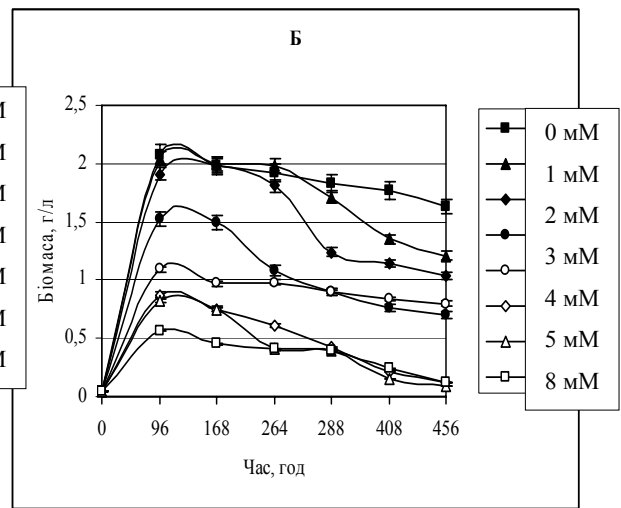
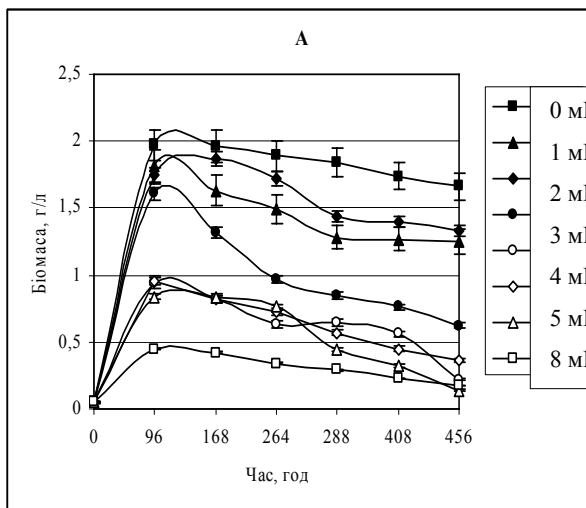


Рис. 4. Кінетика росту *D. desulfuricans* K-45 (А, В) і *Ya-11* (Б, Г) у присутності іонів Pb^{2+} (А, Б) і Cd^{2+} (В, Г) у модифікованому середовищі Кравцова-Сорокіна.

Цікаво відзначити, що біомаса обидвох штамів після 14 діб росту у модифікованому середовищі Кравцова-Сорокіна, яке містило солі свинцю і кадмію у всіх перевірених концентраціях, виявилася незначно вищою, ніж біомаса штамів, вирощених без солей металів. Це можна пояснити, зокрема, утворенням нерозчинних сульфідів металів, що приводить до усунення токсичного для клітин сірководню із середовища.

Оскільки іони свинцю та кадмію за концентрацій 0,1-1 мМ суттєво не впливали на ріст штамів *D. desulfuricans*, уявлялося доцільним перевірити їх ріст у присутності металів у вищих кількостях: 1-10 мМ (рис. 4). Як показали результати, негативний вплив іонів свинцю і кадмію на ріст штамів *K-45* і *Ya-11* у концентраціях понад 3 мМ виявився досить значним, особливо починаючи з 264 години (11 доби) росту. Якщо прослідкувати за кінетикою росту сульфатредуквальних бактерій як у присутності іонів металів, так і без, можна відзначити, що впродовж 4-5 діб бактерії знаходяться у логарифмічній фазі росту, яка в подальшому переходить у стаціонарну. Найвищі значення біомаси спостерігаються на кінець логарифмічної фази і знижуються із зростанням концентрацій як свинцю, так і кадмію. Так, на 4 добу (96 год) росту у середовищі без іонів металів біомаса *K-45* становила 1,87-1,97 г/л, *Ya-11* – 2,08-2,16 г/л. На цю ж добу у присутності іонів свинцю біомаса *K-45* знижувалася пропорційно зростанню концентрації металу від 1,81±0,03 г/л при 1 мМ до 0,45±0,02 г/л при 10 мМ; біомаса *Ya-11* знижувалася від 2,04±0,06 г/л при 1 мМ до 0,57±0,04 г/л при 10 мМ. На 4 добу у присутності іонів кадмію біомаса *K-45* аналогічно знижувалася із зростанням концентрації металу від 2,05±0,05 г/л при 1 мМ до 0,59±0,03 г/л при 10 мМ; біомаса *Ya-11* знижувалася від 2,07±0,02 г/л при 1 мМ до 0,81±0,07 г/л при 10 мМ. На 19 добу (456 год) росту за концентрації свинцю 10 мМ біомаса *K-45* становила 0,17±0,02 г/л (контроль: 1,66±0,04 г/л) ($p \leq 0,05$), а *Ya-11* – 0,12±0,01 г/л (контроль: 1,63±0,05 г/л) ($p \leq 0,05$). На цей час за концентрації кадмію 10 мМ біомаса *K-45* виявилася рівною 0,06±0,01 г/л (контроль: 1,55±0,01 г/л) ($p \leq 0,05$), *Ya-11* – 0,13±0,01 г/л (контроль: 1,61±0,09 г/л) ($p \leq 0,05$). Таким чином, виявлено суттєве пригнічення росту штамів *D. desulfuricans* іонами свинцю та кадмію у концентраціях, вищих 3 мМ.

Вивчали вплив свинцю та кадмію на сульфатредукцію *D. desulfuricans*. Було цікаво порівняти короткотерміновий (інкубація) та тривалий (вирощування в присутності іонів металів) вплив досліджуваних речовин на утворення сірководню та редукцію сульфатів клітинами *K-45* і *Ya-11*.

Досліджували кінетику утворення сірководню та відновлення сульфатів під час росту інтактних

та інкубованих у присутності іонів Pb^{2+} та Cd^{2+} клітин сульфатвідновлювальних бактерій у модифікованому середовищі Кравцова-Сорокіна (рис. 5). Інкубацію клітин проводили у присутності 3 мМ розчинів солей металів, оскільки при цій концентрації ріст бактерій виявився значно пригніченим (див. рис. 4). На 336 годину (14 добу) росту кількість сірководню, утвореного інкубованими із свинцем клітинами *K-45*, становила 1,10±0,08 мМ, *Ya-11* – 1,09±0,04 мМ (контроль: *K-45* – 2,43±0,06 мМ, *Ya-11* – 2,41±0,11 мМ ($p \leq 0,05$)). На цю ж годину росту кількість сірководню, утвореного інкубованими із кадмієм клітинами *K-45*, становила 1,06±0,06 мМ, *Ya-11* – 1,10±0,08 мМ (контроль: *K-45* – 2,40±0,03 мМ, *Ya-11* – 2,43±0,05 мМ ($p \leq 0,05$)). Таким чином, виявлено зниження здатності клітин *D. desulfuricans*, інкубованих у присутності як свинцю, так і кадмію, до продукування сірководню.

Встановлено також негативний вплив свинцю та кадмію на відновлення сульфатів сульфатвідновлювальними бактеріями. Інкубовані у присутності іонів металів бактерії відновлювали значно менше внесених у середовище сульфатів, ніж бактерії, які не піддавалися інкубації. На 336 годину (14 добу) росту концентрація сульфатів у середовищі становила у інкубованих зі свинцем бактерій штаму *K-45* – 2,30±0,02 мМ, *Ya-11* – 2,00±0,02 мМ, в контрольних варіантах бактерій відповідно 0,80±0,02 і 0,60±0,02 мМ ($p \leq 0,05$). На цю ж годину росту вміст сульфатів у середовищі в інкубованих з кадмієм бактерій штаму *K-45* виявився рівним 2,45±0,02 мМ, *Ya-11* – 2,72±0,02 мМ, у контрольних варіантах відповідно 1,34±0,02 і 0,60±0,02 мМ ($p \leq 0,05$).

Вивчено кінетику утворення сірководню та відновлення сульфатів під час росту інтактних та вирощених у присутності іонів свинцю та кадмію клітин сульфатвідновлювальних бактерій у модифікованому середовищі Кравцова-Сорокіна (рис. 6). Клітини вирощували у присутності 3 мМ розчинів солей металів впродовж 7 діб. На 408 годину (17 добу) росту кількість сірководню, утвореного вирощеними у присутності свинцю клітинами *K-45*, становила 0,85±0,02 мМ, *Ya-11* – 0,80±0,03 мМ (контроль: *K-45* – 2,49±0,01 мМ, *Ya-11* – 2,45±0,07 мМ ($p \leq 0,05$)). На цю ж годину росту кількість сірководню, утвореного вирощеними у присутності кадмію клітинами *K-45*, становила 0,81±0,03 мМ, *Ya-11* – 0,83±0,05 мМ (контроль: *K-45* – 2,50±0,06 мМ, *Ya-11* – 2,45±0,02 мМ ($p \leq 0,05$)). Таким чином, виявлено значне зниження здатності клітин *D. desulfuricans*, вирощених у присутності як свинцю, так і кадмію, до продукування сірководню. Слід зазначити, що клітини *D. desulfuricans*, які підлягали більш тривалому впливу іонів металів виявилися менш здатними до продукування сірководню, порівняно

з клітинами, які в присутності іонів металів були інкубовані.

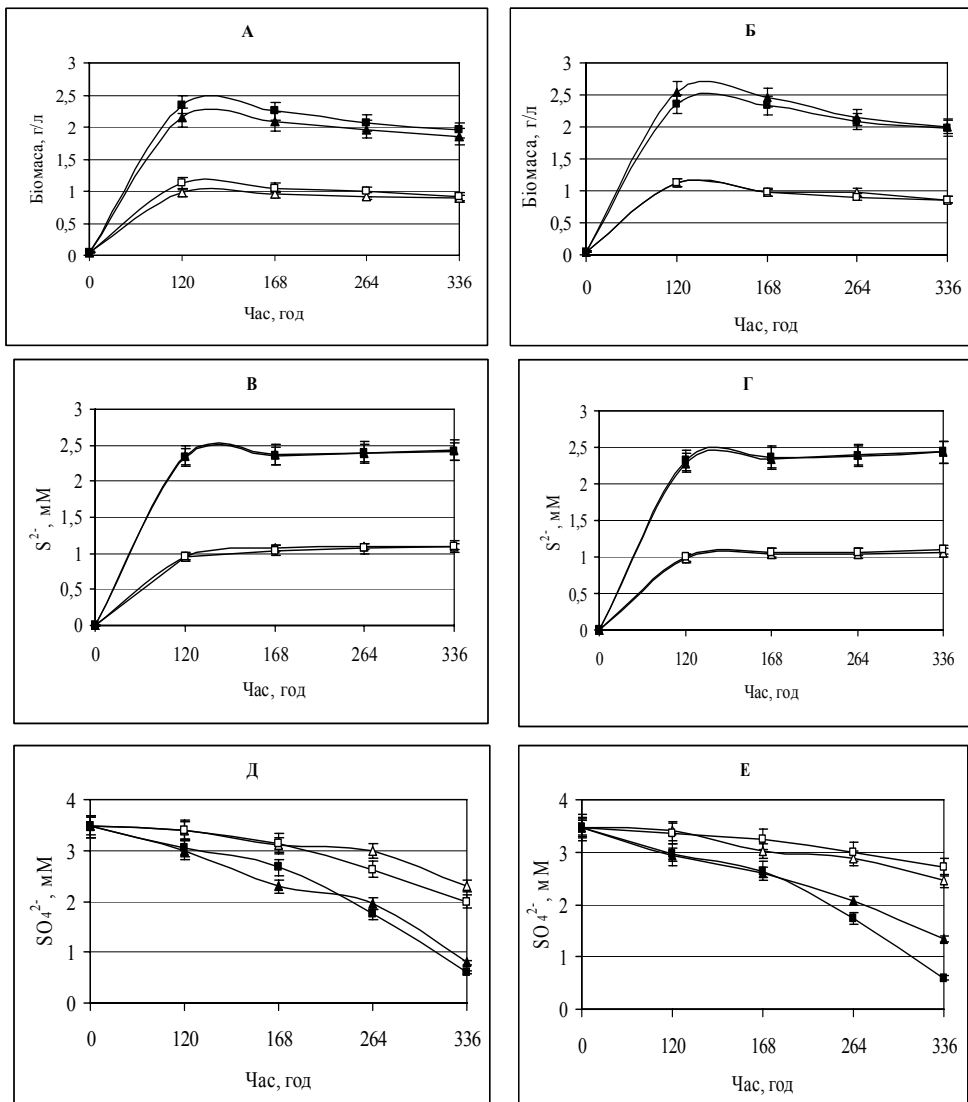


Рис. 5. Ріст у середовищі Кравцова-Сорокіна (А, Б), утворення сірководню (В, Г) та відновлення сульфатів (Д, Е) інтактними (▲, ■) та інкубованими (△, □) впродовж 1 год в присутності 3 мМ розчинів солей свинцю (А, В, Д) і кадмію (Б, Г, Е) клітинами *D. desulfuricans* K-45 (▲, △) і *Ya-11* (■, □).

Вирощені у присутності іонів металів бактерії відновлювали значно менше внесених у середовище сульфатів, ніж бактерії, вирощені без металів. На 408 годину (17 добу) росту концентрація сульфатів у середовищі з вирощеними у присутності свинцю бактерій штаму K-45 становила - $2,85 \pm 0,05$ мМ, *Ya-11* – $2,96 \pm 0,01$ мМ, в контрольних варіантах бактерій відповідно $1,50 \pm 0,02$ і $0,73 \pm 0,02$ мМ ($p \leq 0,05$). На цю ж годину росту вміст сульфатів у середовищі з вирощеними у присутності кадмію бактеріями штаму K-45 виявився рівним $2,98 \pm 0,03$ мМ, *Ya-11*

– $2,90 \pm 0,02$ мМ, у контрольних варіантах відповідно $0,65 \pm 0,04$ і $0,80 \pm 0,03$ мМ ($p \leq 0,05$). Вирощені у присутності іонів металів бактерії відновлювали дещо менші кількості внесених у середовище сульфатів, порівняно бактеріями після інкубації. Отже, можна вважати, що тривалий вплив іонів металів на клітини *D. desulfuricans* має більш негативний вплив на їх життєздатність та метаболічну активність, а зокрема, на здійснюваний ними процес дисиміляційної сульфатредукції.

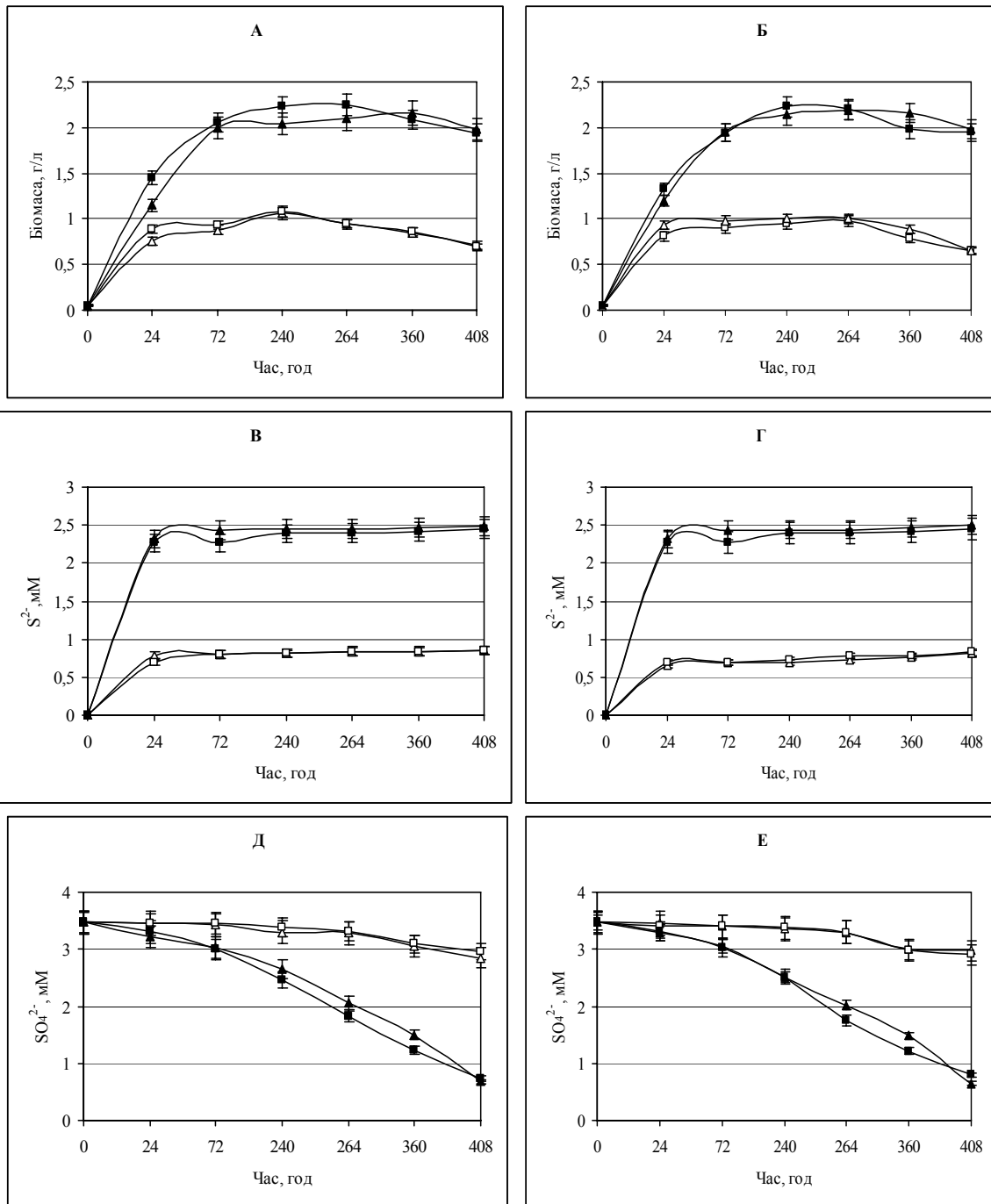


Рис. 6. Ріст у середовищі Кравцова-Сорокіна (А, Б), утворення сірководню (В, Г) та відновлення сульфатів (Д, Е) інтактними (▲, ■) та вирощеними (△, □) впродовж 7 діб в присутності 3 мМ розчинів солей свинцю (А, В, Д) і кадмію (Б, Г, Е) клітинами *D. desulfuricans* K-45 (▲, △) і *Ya-11* (■, □).

Таким чином, результати визначення вмісту Sr^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} та Cu^{2+} у воді з глибин від 0 до 60 м кар'єру Яворівського сіркового родовища показали, що вміст Mn^{2+} значно перевищує ГДК на глибинах понад 30 м; концентрація Cd^{2+} перевищує ГДК на всіх глибинах; вміст Sr^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} та Cu^{2+} на жодній

глибині не вищий за норму. Виявлено негативний вплив іонів Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} у концентраціях 0,7-3 мМ на ріст сульфатвідновлювальних бактерій. Найбільш негативний вплив на ріст *D. desulfuricans* здійснювали іони Ni^{2+} , Pb^{2+} та Co^{2+} . Встановлено суттєве пригнічення росту штамів K-45 і Ya-11

іонами свинцю та кадмію у концентраціях, вищих 3 мМ. Встановлено, що свинець і кадмій негативно впливають на утворення сірководню та

відновлення сульфатів клітинами *D. desulfuricans* як інкубованими, так і вирощеними у присутності 3 мМ розчинів солей металів.

1. *Бабко А.К., П'ятницький І.В.* Кількісний аналіз. - К.: Вища школа, 1974. - 243 с.
2. *Бабьева М.А., Зенова Н.К.* Биология почв. Микробоценозы зональных типов почв СССР. - М.: Изд-во МГУ, 1989. - 201 с.
3. *Галушка А., Перетятко Т., Гудзь С.* Бактерії циклу сірки та їхня роль у природі // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. - 2007. - Вип. 43. - С. 61 - 77.
4. *Грушко Я.М.* Вредные неорганические соединения в промышленных сточных водах: Справочник. - Ленинград: Химия, 1979. - 160 с.
5. *Гузев В.С., Левин С.В., Звягинцев Д.Г.* Реакция микробной системы почв на градиент концентрации тяжёлых металлов // Микробиология. - 1985. - Вып. 3, № 54. - С. 414-420.
6. *Держач М.П., Гумецький Р.Я., Чабан М.Є.* Курс варіаційної статистики - К.: Вища школа, 1977. - 208 с.
7. *Жовинский Э.Я., Кураева И.В.* Геохимия тяжёлых металлов в почвах Украины. - К.: Наукова думка, 2002. - 213 с.
8. *Каравайко Г.И., Кузнецов С.И., Голомзик А.И.* Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. - М.: Наука, 1972. - 215 с.
9. *Колесников С.И., Казеев К.Ш., Вальков В.Ф.* Влияние загрязнения тяжёлыми металлами на микробные сообщества чёрнозема // Почвоведение. - 1999. - № 4. - С. 506-511.
10. *Крешков А.Г.* Основы аналитической химии. - М.: Мир, 1961. - 636 с.
11. *Кушкевич І., Гнатуш С., Гудзь С.* Вплив важких металів на клітини мікроорганізмів // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. - 2007. - Вип. 45. - С. 3-28.
12. *Мороз О.М., Колісник Я.І., Подопрігора О.І., Клим І.Р., Гудзь С.П., Борсукевич Б.М., Гнатуш С.О.* Мікрофлора води озера "Яворівське" // Науковий вісник Ужгородського ун-ту. Серія біологія. - 2008. - Вип. 24. - С. 131-138.
13. *Перетятко Т.Б., Гнатуш С.О., Гудзь С.П.* Сульфатвідновлювальні бактерії водойм Яворівського сіркового родовища // Микробиол. журн. - 2006. - Т. 68, № 5. - С. 87-93.
14. *Подгорский В.С., Касаткина Т.П., Лозовая О.Г.* Дрожжи - биосорбенты тяжёлых металлов // Микробиол. журн. - 2004. - Т. 66, № 1. - С. 91-103.
15. *Сенцова О.Ю., Максимов В.Н.* Действие тяжёлых металлов на микроорганизмы // Успехи микробиологии. - 1985. - Вып. 20. - С. 227-252.
16. *Франк Ю.А., Лушиников С.В.* Биотехнологический потенциал сульфатредуцирующих бактерий // Экология и промышленность. - 2006. - № 1. - С. - 10 -13.
17. *Babich H., Stotzy G.* Effect of cadmium on fungi and on interactions between fungi and bacteria in soil: influence of clay minerals and pH // Appl. Environ. Microbiol. - 1977. - V. 33. - P. 1059-1066.
18. *Belliveau B.H., Starodub M.E., Cotter C., Trevors J.T.* Metal resistance and accumulation in bacteria // Biotechnol. Adv. - 1987. - V. 5, N 1. - P. 101-127.
19. *Duxbury T., Bicknell B.* Metal-tolerant bacterial population from natural and metal-polluted soils // Soil. Biol. Biochem. - 1983. - V. 15. - P. 243-250.
20. *Garnham G.W., Gadd G.A., Gadd G.M.* Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella vulgaris* // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1992. - V. 37. - P. 270-276.
21. *Ji G., Silver S.* Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern // J. Indust. Microbiol. - 1995. - V. 14. - P. 61-75.
22. *Leusch A., Holan Z.R., Volesky B.* Biosorption of heavy metals (Cd, Cu, Ni, Zn) by chemically-reinforced biomass of marine algae // J. Chem. Technol. Biotechnol. - 1995. - V. 62. - P. 279-288.
23. *McEldowney S.* Microbial biosorption of radionuclides in liquid effluent treatment // Appl. Biochem. and Biotechnol. - 1990. - V. 5. - P. 159-179.
24. *Pirog T.P.* Role of *Acinetobacter sp.* exopolysaccharides in protection against heavy metal ions // Microbiology. - 1997. - V. 66, N 3. - P. 284-288.
25. *Summers A.O.* Untwist and shout: a heavy metal-responsive transcriptional regulator // J. Bacteriol. - 1992. - V. 174. - P. 3097-3101.

Отримано: 11 березня 2009 р.

Прийнято до друку: 12 травня 2009 р.