

## СУЛЬФІДОГЕННА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ *DESULFOMICROBIUM* SP. CRR3 ЗА ВПЛИВУ НІТРИТУ ТА МОЛІБДАТУ НАТРІЮ

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

Львівський національний університет імені Івана Франка

*Встановлено, що сульфатвідновлювальні бактерії Desulfomicrobium sp. CrR3, виділені із стічних вод м. Львова, не нагромаджують біомасу за впливу іонів нітриту та молібдату. Ці речовини пригнічують сульфідогенну активність бактерій Desulfomicrobium sp. CrR3. Обґрунтовано, що внесення іонів нітриту в концентрації 1 мМ майже не впливає на нагромадження біомаси і гідроген сульфід бактеріями Desulfomicrobium sp. CrR3. Збільшення концентрації нітриту до 5 мМ спричиняло пригнічення росту бактерій Desulfomicrobium sp. CrR3 приблизно вдвічі, за якого спостерігалось зниження ефективності використання сульфату порівняно з контролем. Молібдат у концентрації 0,5–1 мМ повністю пригнічує ріст і сульфідогенну активність Desulfomicrobium sp. CrR3. Одночасна дія нітриту та молібдату спричиняє фактично повне пригнічення росту бактерій Desulfomicrobium sp. CrR3. За цих умов бактерії не відновлюють сульфатів і, як наслідок, не нагромаджують гідроген сульфід.*

**Ключові слова:** нітрит, молібдат, гідроген сульфід, сульфатвідновлювальні бактерії, стічні води.

Відновлення сульфатів мікроорганізмами за анаеробних умов відіграє важливу роль щодо мінералізації органічних речовин у природі. Проте внаслідок життєдіяльності сульфатвідновлювальних бактерій утворюється гідроген сульфід, що спричиняє пригнічувальну, мутагенну та канцерогенну дію на живі організми, має неприємний запах, а також знижує вміст оксигеновмісних сполук у водоймах [1]. У нафтовидобувній промисловості через взаємодію гідроген сульфід з іонами важких металів утворюються нерозчинні сполуки, сульфідні, які закупорюють нафтові ходи, знижуючи тим самим нафтовіддачу пластів [2]. Пригнічення сульфідогенної активності сульфатвідновлювальних бактерій може бути одним із способів зниження рівня гідроген сульфід у водоймах, повітрі та нафтових ходах.

Для пригнічення сульфідогенної активності найчастіше застосовують інгібітори сульфатредукції та біомодифікатори.

Інгібітори сульфатредукції специфічно конкурують з іонами сульфатів за активний центр АТФ-сульфурилази, внаслідок

чого утворюється нестабільний комплекс АМФ-сульфат, що швидко гідролізується до АМФ та сульфату. Повторні реакції з інгібітором зумовлюють виснаження запасу АТФ для активації сульфатів, що в кінцевому результаті призводить до пригнічення росту сульфатвідновлювальних бактерій. Крім того, інгібітори сульфатредукції пригнічують транспорт сульфату до клітин сульфатвідновлювальних бактерій. До інгібіторів належать антрахінони, хромати, селенати, молібдат [1, 3] тощо. Відомо, що нітрит спричиняє дисбаланс запасів АТФ у клітині *Desulfovibrio* sp. [4].

До біомодифікаторів належать нітри-ти, які можуть використовуватись деякими бактеріями як альтернативні акцептори електронів. Дія нітратів та нітритів є синергічною [5, 6]. Одним з недоліків застосування нітратів та нітритів як біомодифікаторів є забезпечення їх високої концентрації (500–1000 мг/л), необхідності для пригнічення сульфідогенної активності сульфатвідновлювальних бактерій. Концентрація біомодифікаторів для пригнічення утворення гідроген сульфід залежить від вмісту джерела карбону в середовищі, оптимального співвідношення оксигено-

вмісних сполук і  $\text{SO}_4^{2-}$ , солоності, густини мікробної популяції, рН, температури, електрохімічного потенціалу.

Мета роботи — продемонструвати вплив нітриту та молібдату як біомодифікаторів та інгібіторів сульфатредукції на сульфідогенну активність бактерій *Desulfomicrobium* sp. CrR3.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використовували хромрезистентні сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfomicrobium* sp. CrR3 [7], виділені з очисних споруд м. Львова. Мікроорганізми культивували у середовищі Постгейта С при температурі 28°C у пробірках, за анаеробних умов. Пробірки повністю заповнювали середовищем і закривали гумовими корками [8].

Вплив нітриту та молібдату на сульфідогенну активність бактерій визначали за зміною біомаси та концентрації сульфатів і нітритів у культуральному середовищі, а також за зміною кількості утвореного гідроген сульфіду. Нітрит та молібдат вносили у формі водних розчинів —  $\text{NaNO}_2$  та  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  відповідно.

Біомасу бактерій визначали турбідиметрично на фотоелектроколориметрі КФК-3; вміст сульфатів — турбідиметрично після їх осадження барій хлоридом. Для стабілізації суспензії використовували гліцерин [9]. Кількість гідроген сульфіду, продукованого бактеріями, визначали у культуральній рідині фотометрично, з використанням *n*-амінодиметиланіліндігідрохлориду [10]; вміст нітриту — спектрофотометрично, після його взаємодії з *n*-нафтилетилендіаміндихлориду [11]; концентрацію амонію — спектрофотометрично [12].

Статистичне оброблення отриманих результатів проводили з використанням програми Origin 6.1 за рівня достовірності  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що сульфатвідновлювальні бактерії здатні рости у середовищах

з нітратами та сульфатами, відновлюючи їх до нітриту і гідроген сульфіду, які токсично діють на живі організми [1, 5, 6]. За результатами досліджень іноземних науковців [4], нітрит пригнічує відновлення сульфату, впливаючи на ключовий фермент сульфатредукції — сульфідредуктазу, а також на низку інших важливих процесів у клітинах, унаслідок чого пригнічується сульфідогенна активність мікроорганізмів.

У модифікованому середовищі Постгейта С, у якому єдиним акцептором електронів був сульфат (10 мМ), максимальна біомаса бактерій *Desulfomicrobium* sp. CrR3 становила 2,6 г/л після трьох діб культивування. За цих умов бактерії використали 90% сульфатів і продукували близько 6 мМ гідроген сульфіду (рис. 1).

Внесення іонів нітриту в концентрації 1 мМ майже не впливає на сульфідогенну активність досліджуваних бактерій (рис. 2, а). Зокрема, біомаса бактерій становила 2,6 г/л, а вміст сульфатів знижувався на 80%. Додавання 5 мМ нітриту пригнічувало утворення гідроген сульфіду, біомаса бактерій знизилася на 50% порівняно з контролем (рис. 2, б).

За цих умов бактерії відновлювали близько 50% від усього обсягу внесених у середовище сульфатів. Тому в подальших експериментах у середовище вносили 5 мМ іонів нітриту.

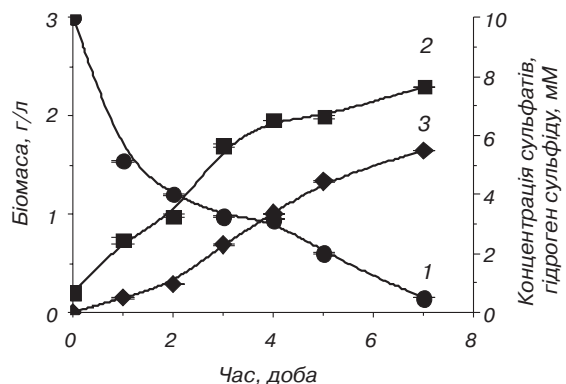
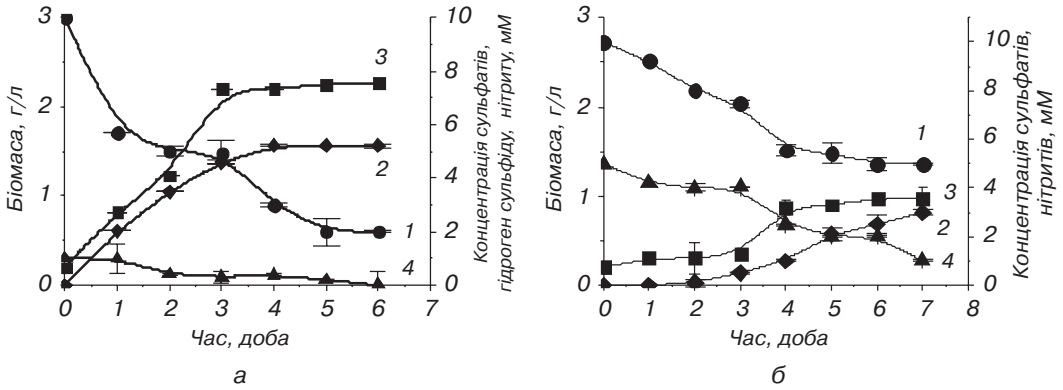


Рис. 1. Культивування бактерій *Desulfomicrobium* sp. CrR3 у середовищі з сульфатами: 1 — використання сульфатів; 2 — нагромадження біомаси; 3 — гідроген сульфіду



**Рис. 2.** Використання бактеріями *Desulfomicrobium sp.* CrR3: сульфатів (1), гідроген сульфіду (2);нагромадження біомаси (3) за внесення нітриту (4) у концентрації (мМ): а) 1 та б) 5

Одержані результати свідчать, що у невисоких концентраціях (1 мМ) нітрит слабо інгібує сульфатредукцію та ріст бактерій. Збільшення нітриту до 5 мМ спричиняло пригнічення сульфідогенної активності бактерій і зменшення біомаси на 50%. Додавання нітриту може знизити корозійний вплив гідроген сульфіду у водопостачальних трубах, зменшуючи його концентрацію у навколишньому природному середовищі.

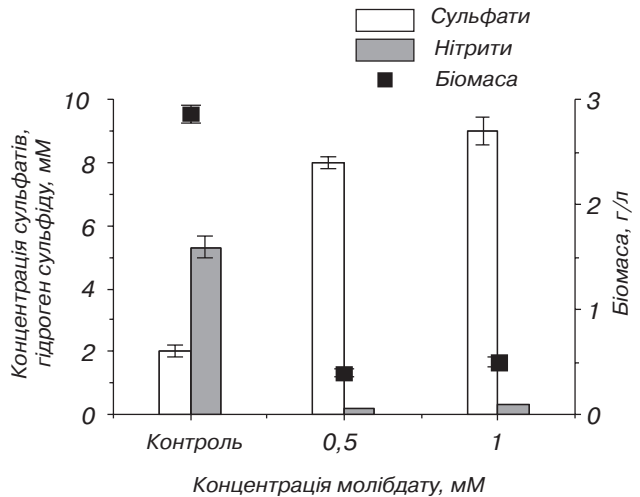
Відомо, що деякі аналоги сульфату (наприклад молібдат) можуть пригнічувати сульфатредукцію сульфатвідновлювальних бактерій. Ми перевірили вплив молібдату на нагромадження гідроген сульфіду бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3* і встановили, що молібдат виявився ефективним інгібітором утворення гідроген сульфіду. Зокрема, молібдат у концентрації 0,5–1 мМ повністю пригнічує ріст і сульфідогенну активність бактерій *Desulfomicrobium sp. CrR3* (рис. 3).

Отже, молібдат може бути використаний для очищення природних джерел, забруднених сульфідами.

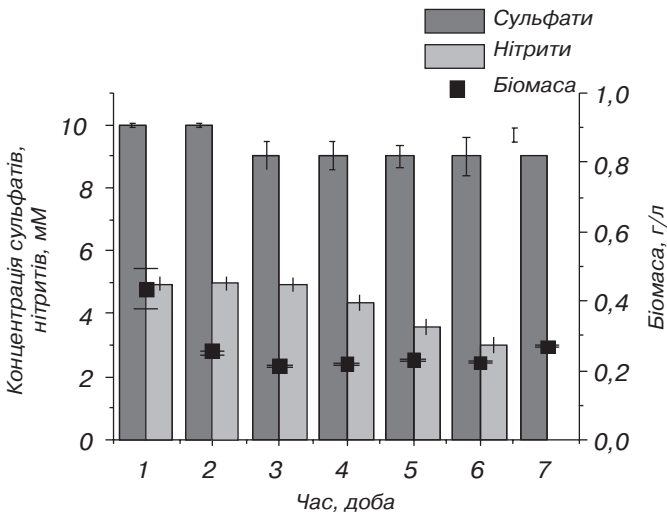
За одночасного внесення у середовище нітритів та молібда-

ту процес сульфатредукції пригнічувався повністю (рис. 4).

Оскільки нітрит та молібдат є біомодифікатором та інгібітором сульфатвідновлювальної активності бактерій, відповідно, ми припускаємо, що механізм дії цих сполук полягає у використанні бактеріями однієї транспортної системи для сульфату та молібдату. Ймовірно, нітрит пригнічує активність ферментів, що беруть участь у сульфатредукції.



**Рис. 3.** Використання бактеріями *Desulfomicrobium sp.* CrR3 сульфатів, гідроген сульфіду та нагромадження біомаси (3) за внесення різних концентрацій молібдату



**Рис. 4.** Вплив нітриту та молібдату на процес сульфатредукції бактерій за одночасного їх внесення у середовище з бактеріями *Desulfomicrobium* sp. CrR3

## ВИСНОВКИ

Одержані результати свідчать, що внесення нітриту та молібдату пригнічує процес сульфатредукції бактерій *Desulfomicrobium* sp. CrR3, тим самим сприяє зменшенню концентрації гідроген сульфід

у навколишньому природньому середовищі.

За наявності нітриту у концентрації 5 мМ нагромадження біомаси бактеріями *Desulfomicrobium* sp. CrR3 пригнічувалося приблизно на 50%. За внесення нітриту у концентрації 5 мМ спостерігалося зниження ефективності використання сульфату на 44% порівняно з контролем. Рівень нітриту за цих умов знижувався на 80%.

Молібдат у концентрації 0,5–1 мМ повністю пригнічує ріст і сульфидогенну активність *Desulfomicrobium* sp. CrR3.

Використання речовин, що пригнічують ріст та метаболізм сульфатвідновлювальних бактерій, є перспективним в очистці стічних та промислових вод від гідроген сульфід, а також у роботі зі збільшення нафтовіддачі з продуктивних пластів під час видобування нафти.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Bratcova S. The effect of some essential environmental factors on the microbial dissimilatory sulphate reduction / S. Bratcova, S. Groudev, P. Georgiev // Mining Miner Process. — 2002. — Vol. 44, No. 2. — P. 123–127.
2. Application of denaturing high-performance liquid chromatography for monitoring sulfate-reducing bacteria in oil fields / O. Priha, M. Nyssönen, M. Bomberg et al. // Appl. Environ. Microbiol. — 2013. — Vol. 79, No. 17. — P. 5186–5196.
3. Isa M. Molybdate inhibition of sulfate reduction in two-phase anaerobic digestion / M. Isa, G.K. Anderson // Process Biochem. — 2005. — Vol. 40. — P. 2079–2089.
4. Haveman S.A. Physiological and gene expression analysis of inhibition of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough by nitrite / S.A. Haveman, C.P. Greene, Stilwell J.K., Voordouw G. // J. Bacteriol. — 2004. — Vol. 186. — P. 7944–7950.
5. Mohanakrishnan J. Dynamic microbial response of sulfidogenic wastewater biofilm to nitrate / J. Mohanakrishnan, M.V. Kofoed, J. Barr et al. // Appl Microbiol Biotechnol. — 2011. — Vol. 91, No. 6. — P. 164–175.
6. Nemati M. Control of biogenic H<sub>2</sub>S production with nitrite and molybdate / M. Nemati, T.J. Mazutina, G.E. Jenneman, G.Voordouw // J. Ind. Microbiol. Biot. — 2001. — Vol. 26. — P. 350–355.
7. Шоляк К.В. Хромрезистентні сульфатвідновлювальні бактерії, виділені із стічних вод промислових підприємств / К.В. Шоляк, Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь // Мікробіологія і біотехнологія. — 2013. — № 2. — С. 66–76.
8. Postgate J.R. The sulfate-reducing bacteria / J.R. Postgate // 2nd ed. Cambridge: Cambridge Univ. press. — 1984. — P. 366.
9. Почвы. Метод определения ионов сульфата в водной вытяжке: ГОСТ 26426-85. — М.: Изд-во стандартов, 1985. — 7 с.
10. United States Patent. № 6340596. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen sulfide / M. Sugiyama. — 2002.
11. Granger D.L. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction / D.L. Granger, R.R. Taintor, K.S. Boockvar // Methods in Enzymology. — 1996. — No. 268. — P. 142–151.

12. Ivančić I. An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by the indophenol blue method / I. Ivančić, D. Degobbis // Wat. Res. — 1984. — No. 18. — P. 1143–1147.

## REFERENCES

1. Bratcova S., Groudev S., Georgiev P. (2002). The effect of some essential environmental factors on the microbial dissimilatory sulphate reduction. Mining Miner Process, Vol. 44, No. 2, pp. 123–127 (*in English*).
2. Priha O., Nyyssönen M., Bomberg M., Laitila A., Simell J., Kapanen A., Juvonen R. (2013). Application of denaturing high-performance liquid chromatography for monitoring sulfate-reducing bacteria in oil fields. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 79, No. 17, pp. 5186 – 5196 (*in English*).
3. Isa M., Anderson G. (2005). Molybdate inhibition of sulfate reduction in two-phase anaerobic digestion. Process Biochem, Vol 40, pp. 2079–2089 (*in English*).
4. Haveman S.A., Greene C.P., Stilwell J.K., Vourdouw G. (2004). Physiological and gene expression analysis of inhibition of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough by nitrite. J. Bacteriol, Vol. 186, pp. 7944–7950 (*in English*).
5. Mohanakrishnan J., Kofoed M.V., Barr J., Yuan Z., Schramm A., Meyer R.L. (2011). Dynamic microbial response of sulfidogenic wastewater biofilm to nitrate. Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 91, No. 6, pp. 164–1757 (*in English*).
6. Nemati M., Mazutinac T.J., Jenneman G.E., Vourdouw G. (2001). Control of biogenic H<sub>2</sub>S production with nitrite and molybdate. J. Ind. Microbiol. Biot, Vol. 26, pp. 350–355 (*in English*).
7. Sholiak K.V., Peretiak T.B., Hudz S.P. (2013). *Khromrezystentni sulfatvidnocliuvalni bakterii, vydilenni iz stichnykh vod promyslovykh pidpriemstv* [Propresistent sulfatase bacteria, the allocation of sewage of industrial enterprises]. *Mikrobiolohiia i biotekhnolohiia* [Microbiology and Biotechnology]. No. 2, pp. 66–76 (*in Ukrainian*).
8. Postgate J.R. (1984). The sulfate-reducing bacteria. 2nd ed. Cambridge: Cambridge Univ. press., pp. 366 (*in English*).
9. Pochvyii. *Metod opredelenie ionov sulfata v vodnoji vyituzhke* (1985). [Soil. Method for determination of sulfate ions in water extract]. GOST 26426-85, Moskva: Izdatelstvo standartov Publ., 7 p. (*in Russian*).
10. Sugiyama M. (2002). Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen sulfide. United States Patent. No. 6340596 (*in English*).
11. Granger D.L., Taintor R.R., Boockvar K.S. (1996). Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. Methods in Enzymology, No. 268, pp. 142–151 (*in English*).
12. Ivančić I., Degobbis D. (1984). An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by the indophenol blue method. Wat. Res, No. 18, pp. 1143–1147 (*in English*).