

Дмитренко Г. М., Коновалова В. В., Шум О. А.

## ЗМІНА ОКИСНО-ВІДНОВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ АЕРОБНИХ БАКТЕРІЙ

Вивчено здатність аеробних бактерій змінювати окисно-відновний потенціал (ОВП) культурального середовища в процесі росту в присутності неорганічних сполук із змінновалентними елементами. Показано, що облигатно-аеробні бактерії роду *Pseudomonas* використовують при диханні шестивалентний хром як термінальний акцептор електронів. Денітрифікуючі штами здатні знижувати ОВП до рівня облигатного анаеробіозу і відновлювати сульфат.

Забруднення води відкритих водойм зумовлене постійним скиданням у них недостатньо очищених стічних вод комунального господарства і промислових підприємств. У той же час більшість стічних вод можуть бути очищені до високого ступеня чистоти завдяки сучасним біотехнологіям обробки з мінімальною реконструкцією існуючих очисних споруд і локальної очистки промислових стоків у місці їх утворення.

Альтернативою традиційному аеробному процесу очищення води може бути застосування в біотехнології штамів бактерій, що використовують як термінальні акцептори електронів змінновалентні елементи. Це значно розширює можливості біологічних методів очищення стічних вод [1].

Використання змінновалентних елементів як окисників можливе за наявності в середовищі доступного донора електронів і присутності в організмі відповідних окисно-відновних ферментів.

У тих випадках, коли популяція має можливість вибору кінцевого акцептора електронів, виникає редокс-послідовність і використовуються спочатку кисень, як енергетично найбільш вигідний окисник, потім хромати, нітрати, окиснені форми металів, сульфати і, нарешті, карбонати.

Індикатором наявності в культуральному середовищі доступних клітинам мікроорганізмів термінальних акцепторів електронів може бути величина окисно-відновного потенціалу (ОВП).

Зміна ОВП середовища у процесі росту бактерій є результатом зміни співвідношення окиснених і відновлених еквівалентів у бік збільшення кількості відновлених сполук, і, відповідно, чинником підвищення ефективності роботи біологічних очисних споруд є відсутність або недоступність окисників.

Мета цих досліджень - вивчення динаміки ОВП при культивуванні аеробних бактерій у рідкому поживному середовищі в присутності неорганічних сполук із змінновалентними елементами, а також визначення здатності культур використовувати ці потенційні акцептори електронів при диханні.

### Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були бактерії роду *Pseudomonas*: облигатно-аеробні - *Pseudomonas fluorescens* P9, *P. putida* P15, *P. «rathonis»* P17 і денітрифікуючі *P. aeruginosa* P1, *P. «denitrificans»* P5, *P. fluorescens var. pseudo-iodinum* P11, *P. mendocina* P13, *P. stutzeri* P19, а також здатні до відновлення нітратів спорові *Bacillus polymyxa* B3, *B. subtilis* B9 і артробактерії *Arthrobacter picolinophilus* A1, *A. siderocapsulatus* A3.

Культури отримано з музею мікроорганізмів відділу мікробіології очищення води ІКХХВ НАН України.

Динаміку ОВП і здатність штамів бактерій використовувати різні змінновалентні елементи як термінальні акцептори електронів вивчали в середовищі М9 із мікроелементами такого складу (г/л):  $\text{KH}_2\text{P}_2\text{O}_4$  - 3;  $\text{Na}_2\text{HP}_2\text{O}_4$  - 6;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 1;  $\text{NaCl}$  - 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,1;  $\text{CaCl}_2$  - 0,1; 1 мл розчину мікроелементів містить (мг/л):  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - 25;  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 5;  $\text{CoSO}_4$  - 1;  $\text{ZnSO}_4$  - 1;  $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 0,1;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 0,1;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  - 25;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 0,1. Глюкозу, як донор електронів та джерело вуглецю й енергії, вносили в концентрації 5 г/дм<sup>3</sup>. Як потенційні акцептори електронів використовували хромати, нітрати і сульфати в різних концентраціях.

Концентрацію шестивалентного хрому визначали фотометрично з дифенілкарбазидом [2]. сульфату - турбодиметрично [3].

Біомасу вирощували на повноцінному агаризованому середовищі при температурі

28 °С. Оптична густина суспензії становила 0,02-0,04 од.

Культивування здійснювали в плоскодонних колбах об'ємом 100 см<sup>3</sup>, під двосантиметровим шаром стерильного вазелінового масла при тій же температурі.

Величину ОВП визначали на універсальному йономері ЕВ-74 за допомогою електродної пари - платинового електрода ЕПВ-1 і хлорсрібного допоміжного електрода ЕВЛ-1МЗ. Калібрували електроди перед кожним дослідженням.

Результати та їх обговорення

Методика культивування анаеробних бактерій передбачає використання спеціального устаткування. Це і пробірки Хангейта різних модифікацій, і анаеробні бокси, і видалення кисню з культури рідини за допомогою інертного газу, і використання різного роду хімічних відновників для зниження окисно-відновного потенціалу середовища [4-6]. У своїх дослідженнях ми припустили таке: якщо культура здатна, крім кисню, використовувати інші неорганічні акцептори електронів при диханні, то в замкненій системі вона повинна самостійно, використавши розчинений кисень, переходити на доступні їй альтернативні акцептори електронів і штучного створення анаеробних умов не потребує.

Як видно з рис. 1, величина ОВП мінерального середовища, в яке внесені відповідні акцептори електронів і відсутній доступний донор електронів, становить: у присутності хроматів близько +430 мВ, нітратів - +220 мВ, сульфатів - +30 мВ. Криві отримані при культивуванні *P. fluorescens var. pseudo-iodinum* P11 у мінеральному середовищі М9 під шаром вазелінового масла. У процесі росту клітини поглинають розчинений у середовищі кисень на окиснення

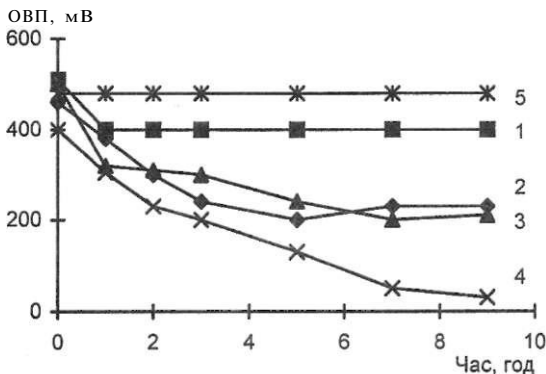


Рис. 1. Величина ОВП середовища із змінновалентними елементами: 1 - K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2 - KN<sub>3</sub>, 3 - без акцептора, 4 - K<sub>2</sub>S<sub>4</sub>, 5 - без мікроорганізмів

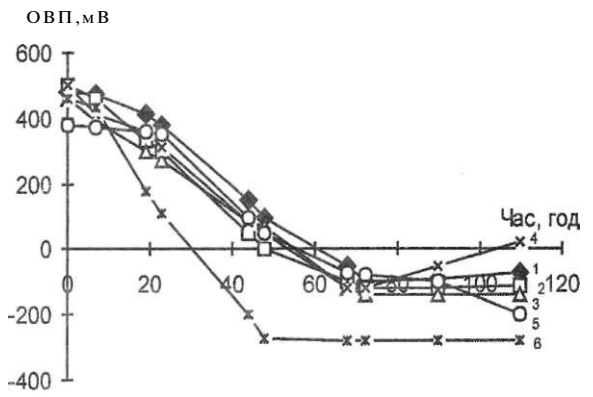


Рис. 2. Динаміка ОВП при культивуванні бактерій родів *Bacillus*, *Arthrobacter* і *Pseudomonas* на глюкозі з нітратом: 1 - *B. subtilis*; 2 - *B. poiyuxa*; 3 - *A. siderocapsulatus*; 4 - *A. picolinophilus*; 5 - *P. stutzeri*; 6 - *P. aeruginosa*

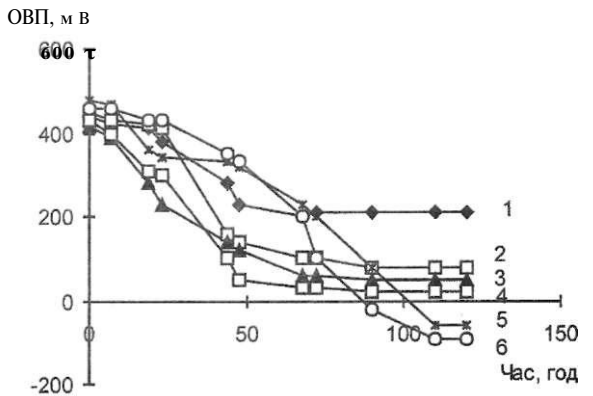


Рис. 3. Динаміка ОВП при культивуванні бактерій родів *Bacillus*, *Arthrobacter* і *Pseudomonas* на глюкозі з нітритом: 1 - *B. subtilis*; 2 - *B. poiyuxa*; 3 - *A. siderocapsulatus*; 4 - *A. picolinophilus*; 5 - *P. stutzeri*; 6 - *P. aeruginosa*

насичених вуглеводнів вазелінового масла, дифузії ж кисню з повітря не відбувається. Через те що культура не здатна використовувати для окиснення вуглеводнів змінновалентні елементи, що є в середовищі, ОВП визначається наявністю саме цих речовин. Без акцепторів електронів величина ОВП у процесі поглинання розчиненого кисню знижується до 220 мВ.

Як видно з рис. 1, аеробна зона ОВП і нітратна перекриваються. Відомо, що при низькій концентрації кисню процеси аеробного окиснення органічних речовин і денітрифікації протікають паралельно.

Нами досліджена здатність різних штамів бактерій, що дихають, змінювати ОВП при культивуванні в поживному середовищі з глюкозою і нітратом (рис. 2) або нітритом (рис. 3) як термінальними акцепторами електронів, а також визначено діапазон ОВП, при якому відбувається редукція останніх у елементний азот.

При культивуванні бактерій роду *Pseudomonas*, *Bacillus* і *Arthrobacter* на глюкозі з нітратом ( $1 \text{ г/дм}^3$ ) нижня межа ОВП для всіх культур знаходиться практично на однаковому рівні. Інтенсивне газоутворення, що відбувається в результаті відновлення нітратного азоту до елементного стану, характерне лише для денітрифікуючих штамів роду *Pseudomonas* і коливається в діапазоні від 160 до -100 мВ.

На рис. 3 показано динаміку ОВП при культивуванні цих же бактерій у присутності  $1 \text{ г/дм}^3$  нітриту. Газоутворення на нітриті в культурі денітрифікуючих псевдомонад відбувається в діапазоні +130 ч- -60 мВ.

Таким чином, окиснення органічних забруднень стічних вод із використанням окиснених форм азоту як термінальних акцепторів електронів для дихання мікроорганізмів необхідно проводити при ОВП близькому до 0 мВ, і використовувати денітрифікуючі бактерії роду *Pseudomonas*. При концентрації органічних забруднень, що перевищують стехіометричне значення, необхідне для повної редукції окисненого азоту, відновлення останнього відбувається до елементного стану.

Окисно-відновний потенціал мінерального середовища, зумовлений присутністю хроматів, знаходиться в діапазоні протікання obligatno-aerobних процесів - близько +430 мВ (див. рис. 1). З літератури відомо, що денітрифікуючі і ферментуючі бактерії в штучно створених анаеробних умовах здатні відновлювати хромати [7]. Цей процес проводять також obligatno-anaerobні сульфатредуючі бактерії [8].

Нами досліджена динаміка ОВП при рості аеробних бактерій, у тому числі й obligatno-aerobних, у середовищі з глюкозою і хроматом, а також визначена здатність культур редукувати шестивалентний хром. Як видно з рис. 4 і 5, досліджувані культури знижують ОВП середовища із шестивалентним хромом і використо-

вують його як термінальний акцептор електронів. Хоча відомо, що obligatno-aerobi при диханні використовують лише кисень як термінальний акцептор електронів, вивчені нами штами відновлюють шестивалентний хром так само ефективно, як і ті, що дихають анаеробно.

Таким чином, нами показано, що obligatno-aerobні бактерії здатні до анаеробного дихання, використовуючи шестивалентний хром як термінальний акцептор електронів.

Ще донедавна вважалося, що дисиміліятивно використовувати сульфат здатні лише obligatno-anaerobні бактерії. Але в науковій літературі є повідомлення, що цей процес можуть проводити і денітрифікуючі бактерії роду *Pseudomonas* [9-10]. із анаеробних еконіш було виділено і визначено як *P. stutzeri* і *P. mendocina* штами, що в штучно створених obligatno-anaerobних умовах відновлюють сульфат у сульфід [9]. Декілька пасажів ізольованих штамів через середовище Кларка призводить до втрати цієї здатності.

Зниження ОВП в культурах денітрифікуючих бактерій при рості в МПБ або на глюкозі з нітратом і нітритом до рівня obligatno-anaerobіозу дозволило нам припустити, що ці культури можуть знижувати ОВП у середовищі із сульфатом до рівня obligatno-anaerobіозу і використовувати ці сполуки як термінальні акцептори електронів при диханні.

На рис. 6 а показана динаміка ОВП при культивуванні денітрифікуючих псевдомонад у середовищі з глюкозою та сульфатом як термінальним акцептором електронів. ОВП у культурі бактерій знижується відносно швидко приблизно до 30 мВ. Знизивши ОВП до межі сульфатредукції, культури підвищують потенціал

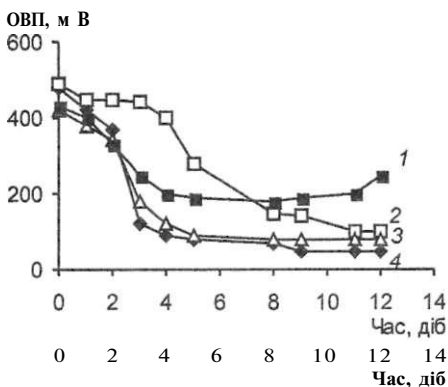


Рис. 4. Динаміка ОВП при культивуванні бактерій в середовищі з шестивалентним хромом (початкова концентрація  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  - 30 мг/л): 1 - *P. «rathonis»*; 2 - *P. aeruginosa*; 3 - *P. mendocina*; 4 - *P. fluorescens var. pseudo-iodinum*

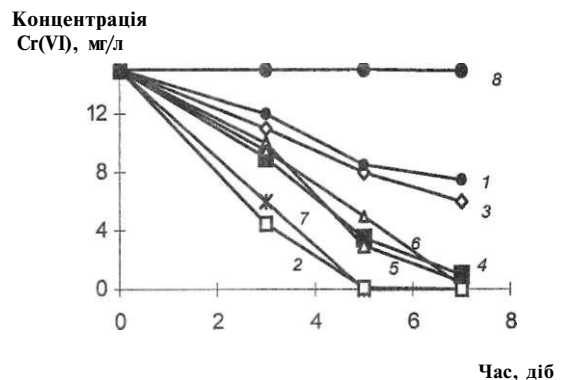


Рис. 5. Зміна концентрації хрому (VI) бактеріями роду *Pseudomonas*: 1 - *P. stutzeri*; 2 - *P. fluorescens var. pseudo-iodinum*; 3 - *P. aeruginosa*; 4 - *P. «rathonis»*; 5-*P. putida*; 6 - *P. mendocina*; 7 - *P. fluorescens*; 8 - контроль без мікроорганізмів

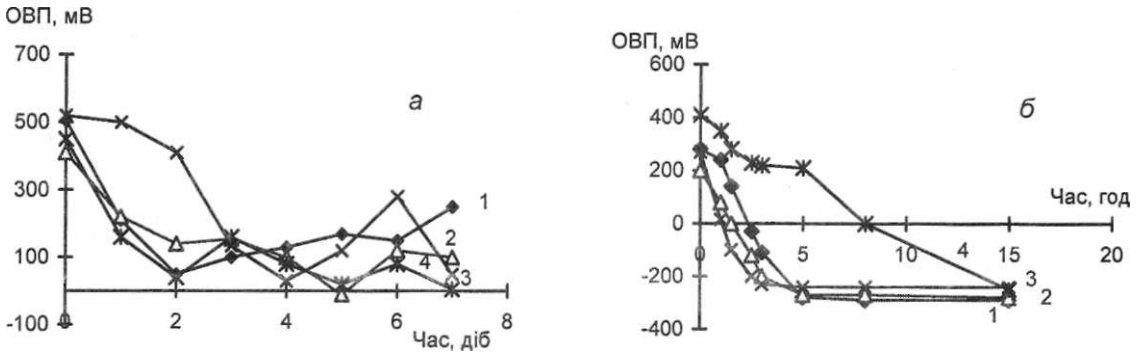


Рис. 6. Зміна ОВП в культурах денітрифікуючих бактерій роду *Pseudomonas* у присутності сульфатів (початкова концентрація  $S^{+6}$ -65 мг/л): а - без металу; б - з металом; 1—*P. mendocina*, 2-*P. stutzeri*, 3-*P. aeruginosa*, 4 - *P. fluorescens var. pseudo-iodinum*

до більш високих позитивних значень, але через якийсь час знову спостерігається зниження цього показника з наступним підвищенням. На нашу думку, такі зигзагоподібні зміни ОВП відбуваються в результаті відновлення клітинами сульфату та утворення сірководню, що навіть у незначних концентраціях є дуже токсичним. Для захисту від цього впливу культура виділяє в середовище окиснені речовини, що призводить до підвищення ОВП. У наступній серії дослідів у середовище культивування ми внесли металічне залізо для зв'язування сірководню. Як видно з рис. 6 б, за п'ять годин денітрифікуючі бактерії роду *Pseudomonas* у присутності металевого заліза знижують ОВП до рівня глибокого облигатного анаеробіозу -300 мВ. Приріст біомаси за цей час (за оптичною густиною) збільшується в п'ять (*P. mendocina* Р13) і десять (*P. stutzeri* Р19) разів, але чорний осад сульфідів заліза не утворюється. У культурах спостерігається інтенсивне газотворення. Концентрація сульфату знижується повільно. За сім діб культивування його концентрація в середовищі кожної з культур зменшується по-різному і утворюється чорний осад. Початкова концентрація сульфатів знижується від 50 до 70 %.

Таким чином, нами показано, що денітрифікуючі псевдомонади здатні самостійно знижувати окисно-відновний потенціал культураль-

ного середовища до рівня облигатного анаеробіозу і використовувати сульфат як термінальний акцептор електронів при окисненні органічних сполук.

### Висновки

Отже, проведені нами дослідження показали, що:

- при вивченні здатності бактерій до анаеробного дихання немає необхідності застосовувати спеціальне устаткування та штучно створювати анаеробні умови для їхнього росту шляхом видалення кисню інертним газом або внесенням хімічних відновників. Культури можуть це робити самі;
- облигатно-аеробні бактерії здатні до анаеробного дихання, а саме: відновлювати шестивалентний хром;
- денітрифікуючі псевдомонади здатні самостійно знижувати окисно-відновний потенціал середовища культивування до рівня облигатного анаеробіозу і використовувати сульфат як термінальний акцептор електронів при диханні;
- окисно-відновний потенціал може бути показником фізіологічного стану бактерій;
- використання альтернативних кисню акцепторів електронів як окисників забруднень значно розширює можливості біологічних методів очищення води.

1. Дмитренко Г. Я, Гвоздяк П. И. Факультативний и облигатний анаеробіоз в біологічній очистці води // Хімія і технологія води.- 1997 - Т. 19 - № 3 - С. 325-330.
2. Аналітична хімія промислових сточних вод / Під ред. Ю. Ю. Лур'є.- М: Хімія, 1984.-448 с.
3. Довідник властивостей, методів аналізу й очищення води / Під ред. Л. А. Кульського та ін. У 2 част. Ч. 2 - Київ: Наук, думка, 1980.

4. Чернышенко Д. В. Модифицирование пробирок Хангейта для культивирования облигатных и факультативных азобных бактерий // Микробиол. журн.- 2000,- Т. 62 - № 6. - С. 57-59.
5. Langenhoff A. A. M, Bromvers- Ceiler D. L, Engelberting at al. Microbial reduction of manganese coupled to toluene oxidation // FEMS Microbiology Ecology- 1997 - V. 22 - P. 119-127.

6. *Weiner J. M., Lovley D. R.* Anaerobic benzene degradation in petroleum-contaminated aquifer sediments after inoculation with a benzene-oxidizing enrichment // *Appl. Envir. Microbiol.* - 1998. - V. 64, - N 2 - P. 775-779.
7. *Гвоздяк П. І., Могілевич Н. Ф., Рильський А. Ф., Грищенко Н. І.* Неспецифічна бактеріальна трансформація // *Доп. АН УРСР. Сер. Б.* - 1985. - № 3. - С. 64-65.
8. *Карначук О. В.* Влияние шестивалентного хрома на образование сероводорода сульфатредуцирующими бактериями // *Микробиология*, -1995. - Т. 64. - № 3. - С. 315-319.
9. *Иляетдинов А. Я., Абраштова С. А., Айткельдиева С. А.* Микроаэрофильное бактериальное восстановление нитратов и сульфатов // *Там само.* - 1984. - Т. 53 - № 1 - С. 33-37.
10. *Клюшников Т. М., Чернышенко Д. В., Касаткина Т. П.* Сульфатредуцирующая способность бактерий рода *Pseudomonas* // *Мікробіол. журн* - 1992. - Т. 54. - № 2. - С. 49-54.

*G. M. Dmytrenko, V. V. Konovalova, O. A. Shum*

## THE OXIDATION-REDUCTION POTENTIAL IN AEROBE BACTERIA CULTURE CULTIVATION

*The possibility of aerobe bacteria which could change the oxidation-reduction potential (ORP) of the culture medium during cultivation in presence of inorganic compounds with varied valence has been studied. It has been shown that obligate aerobe bacteria use chromate as terminal electron acceptor in breathing process. Denitrifying bacteria g. Pseudomonas could decrease ORP to obligate anaerobiosis and reduce sulfate.*