

УДК 628.35+546.135+546.766

**Г.Ф. Смирнова**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев МСП, Д03680, Украина*

## **ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА БАКТЕРИЙ, ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ ХЛОРАТЫ И ПЕРХЛОРАТЫ**

*Из разных природных источников выделены бактерии – факультативные анаэробы, способные восстанавливать кислородные соединения хлора – хлораты и перхлораты – как терминальные акцепторы электронов. Конечным продуктом этого процесса является хлорид. Кроме хлоратов и перхлоратов изолированные бактерии восстанавливали и другие кислородсодержащие анионы – хроматы, сульфаты, нитраты, ванадаты, манганаты, используя при этом целый ряд органических соединений как источник углерода.*

*Ключевые слова: (пер)хлоратвосстанавливающие микроорганизмы, хлораты, перхлораты, сульфаты, хроматы, ванадаты, нитраты, манганаты.*

Кислородные соединения хлора (КСХ) – чрезвычайно сильные окислители – производятся и используются в огромных масштабах в различных областях промышленности. Медико-гигиенические исследования доказали их необратимое деструктивное влияние на эндокринную и нервную системы теплокровных животных и человека [14,20]. Это привело к ужесточению требований по содержанию КСХ в окружающей среде и снижению их предельно допустимых концентраций с 32 до 4 мг/л [18,22]. КСХ попадают в окружающую среду во все возрастающих количествах как дезинфицирующие и отбеливающие вещества, гербициды, побочные продукты диспропорционирования и фоторазложения диоксида хлора в процессах водоподготовки питьевой воды и при использовании в бумажной промышленности. Значительное количество перхлоратов попадает в окружающую среду при плановой замене комплектов вооружения, имеющих ограниченный срок использования (например, твердотопливные ракеты, в состав топлива которых входит до 70 % перхлората аммония). Поэтому чрезвычайно остро стоит проблема утилизации этих соединений [12, 13, 22].

© Г.Ф. Смирнова, 2010

КСХ – сильно растворимые и устойчивые в растворах вещества, не поддающиеся химическому и физико-химическому восстановлению. Эту стабильность обеспечивают атомы кислорода, расположенные вокруг атомов хлора, что приводит к образованию термодинамически весьма устойчивых пространственных структур, для разрушения которых требуется очень большая энергия. Поэтому удаление КСХ из растворов с помощью физико-химических методов (сорбции, обратного осмоса) невозможно, наночистотные и ионообменные технологии очень дороги и также не эффективны. Единственным экологически безопасным способом утилизации является биологическое восстановление с помощью бактерий, редуцирующих КСХ до значительно менее опасных хлоридов [18].

Высокий окислительно-восстановительный потенциал хлоратов и перхлоратов ( $\text{ClO}_4^-/\text{Cl}^- E_0 = 1.287 \text{ V}$ ;  $\text{ClO}_3^-/\text{Cl}^- E_0 = 1.03 \text{ V}$ ) делает их идеальными акцепторами для микробного метаболизма [22]. О возможности биологического восстановления КСХ известно уже почти столетие [9]. Считается, (хотя и не доказано) что все бактерии, способные восстанавливать перхлораты, могут использовать и хлораты, но обратное не всегда верно [13, 21, 22]. Кислород ингибирует как хлорат-, так и перхлоратредукцию у всех штаммов, за исключением *Pseudomonas* sp. PDA [23].

Целью этой работы было изучение бактерий, восстанавливающих хлораты и перхлораты, их распространение, а также особенности физиологии и метаболизма этих микроорганизмов.

**Материалы и методы.** Источниками выделения бактерий, восстанавливающих КСХ были: вода поверхностных водоемов, ил озер, рек, лиманов Черного моря (Хаджибейского и Куяльницкого), сточные воды заводов, дренажные воды городской свалки (с. Пирогово), почва, навоз крупного рогатого скота и других домашних животных (ручная крыса), куриный помет, пробы из систем водоподготовки и водопользования (пивоваренный завод и бассейн для хранения отработанных ТВЭЛов), антарктические образцы – пробы почвы в районе станции “Вернадский” и побережья, помет животных и птиц, обитающих в этом регионе.

Накопительную культуру получали путем посева образцов на основную минеральную среду, содержащую (г/л):  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 1,0$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,0$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,1$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl} - 2,0$ ; МПБ – 10% от объема среды; 1,0 мл/л р-ра микроэлементов, следующего состава (мг/л):  $\text{FeSO}_4 - 0,2$ ;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 3,0$ ;  $\text{ZnSO}_4 - 10,0$ ;  $\text{CoCl}_2 - 20,0$ ;  $\text{CuCl}_2 - 1,0$ ;  $\text{NiCl}_2 - 2,0$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 - 3,0$ ;  $\text{H}_2\text{O}$  дист.– 1,0 л; трилон Б – 500,0 мг/л; pH – 3,5. Как акцептор электронов вносили  $\text{KClO}_3 - 2,0$  г/л (или  $\text{NH}_4\text{ClO}_4 - 1,0$  г/л). Культивирование проводили в условиях ограниченного доступа кислорода, в пробирках, полностью заполненных средой и закрытых резиновыми пробками при температуре 34 °С, время культивирования 2–5 суток.

Рост изолированных культур с использованием альтернативных акцепторов электронов изучали на основной минеральной среде, в которую вместо КСХ вносили стерильные растворы акцепторов:  $\text{CrO}_4^{2-}$  (в виде  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) – 20 мг /л; Mn (IV) в виде свежесажженного  $\text{MnO}_2$  в полужидкой агаризованной основной минеральной среде;  $\text{VO}_3^-$  (в виде раствора аммонийной соли) – 1,0 г/л. Восстановление  $\text{SO}_4^{2-}$  изучали на среде Постгейта «В», редукцию нитратов – на среде Гильята. [1]. Культивирование на альтернативных акцепторах электронов продолжалось до 30 суток.

Рост хлорат- и перхлоратвосстанавливающих бактерий определяли по увеличению оптической плотности культуральной жидкости. Наличие процесса хлорат- и перхлоратредукции контролировали по содержанию КСХ в среде. Количество хлоратов определяли методом перманганатометрического титрования [6], перхлоратов – экстрационно-колориметрическим методом [3].

Процесс восстановления альтернативных акцепторов электронов контролировали по росту биомассы и по характерным изменениям среды – изменению окраски, появлению характерных осадков, а также аналитически: восстановление ванадия определяли согласно [5], хроматов – [16], сульфатов – [19]. Восстановление нитратов определяли с помощью ион-селективного электрода [7]. Рост на среде с манганатами контролировали по исчезновению черной окраски среды.

Чистые культуры получали путем посева на МПА, после чего вновь проверяли их на способность восстанавливать хлораты на основной минеральной среде в условиях периодичес-

кого роста в пробирках под резиновыми пробками. Первичную идентификацию проводили согласно [4].

**Результаты и их обсуждение.** Из различных эконисш было выделено около 70 штаммов бактерий, способных расти как в жидкой питательной среде с КСХ (табл. 1), так и на поверхности МПА, т.е. являющимися факультативными анаэробами (рис. 1, 2).

В среднем содержание этих бактерий составляло  $10-10^3$  КОЕ/г (мл) образца.

Таблица 1

**Распространение хлорат-(ХВБ) и перхлоратовосстанавливающих (ПХБ) в различных экологических нишах**

Источник выделения	Количество изолированных штаммов	
	ПХБ	ХВБ
Вода р. Днепр, р-н г. Киев	–	–
Вода лесных озер, р-н г. Киев	–	–
Донные отложения лесных озер	2	2
Почва (г. Киев)	1	1
Стоячий водоем (г. Фастов)	4	–
Почва, р-н ст. «Вернадский»	3	–
Система водоподготовки пищевого предприятия	1	5
Бассейн-охладитель, (ст.Чернобыль)	1	4
Сточная вода з-да «Днепрошина»	–	–
Дренажные воды свалки(с.Пирогово)	3	1
Гальванический сток з-да «Коммаш», г. Киев	3	–
Навоз крупного рогатого скота	–	2
Куриный помет	–	3
Сточные воды спичечных фабрик	18	8
Ил (Хаджибейский лиман)	2	–
Ил (Кюяльницкий лиман)	1	–
Помет животных и птиц, (ст. «Вернадский»)	8	–
Помет крысы	1	–

Как правило, эти бактерии выделялись из образцов, относительно дефицитных по кислороду (донные отложения, помет животных и птиц) или из мест естественного обогащения (сточные воды заводов и свалок), а также из проб, отобранных из систем, периодически подвергавшихся хлорированию (система водоподготовки пищевого предприятия). Из проб, отобранных в районе антарктической станции (преимущественно из помета животных и птиц, населяющих данную местность) выделялись только бактерии, восстанавливающие перхлораты, характерным признаком которых был относительно хороший рост при температуре 3 °С.

Изучение основных морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств позволило разделить выделенные штаммы на три довольно четкие группы. Первая группа штаммов – грам-вариабильные кокковидные мелкие палочки (1,0-1,5 x 1,5-2,0 мкм) с характерным «дергающимся» движением. Эти бактерии были устойчивы к 200 ед/мл пенициллина, на среде с которым на ранних стадиях роста (4–6 часов) клетки под микроскопом имеют вид крупных булавовидных образований. С возрастом такие клетки распадаются на мелкие палочки с закругленными концами, похожие на кокки. По особенностям клеточного строения, а также физиолого-биохимическим свойствам эта группа штаммов близка к описанному нами ранее *Acinetobacter thermotolerantus* C-1 [8].

Вторая группа штаммов – это грамположительные, неподвижные кокки, единичные или располагаются в цепочки по 2–6 клеток, 0,7–1,0 мкм в диаметре. При росте на МПА колонии мелкие, блестящие с ровными краями. С возрастом (4 суток) колонии становятся молочными, слабо опалесцирующими в проходящем свете. По биохимическим признакам это факультативные анаэробы с дыхательным типом метаболизма, не образуют оксидазу и каталазу. Для роста необходимы аммиачные формы азотного питания, оптимальная температура – 34 °С. Предварительная идентификация позволила отнести эту группу бактерий к роду *Aerococcus*, описанных нами ранее.[2]

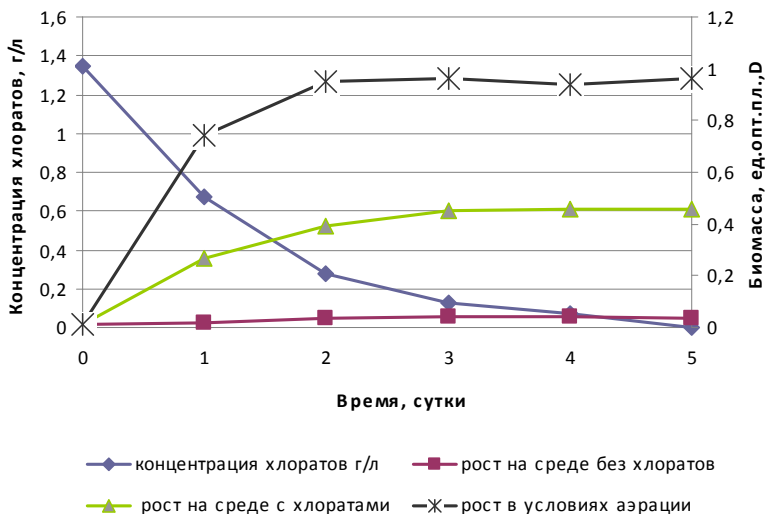


Рис. 1. Рост *Acinetobacter* шт. 62-1 на среде с хлоратами

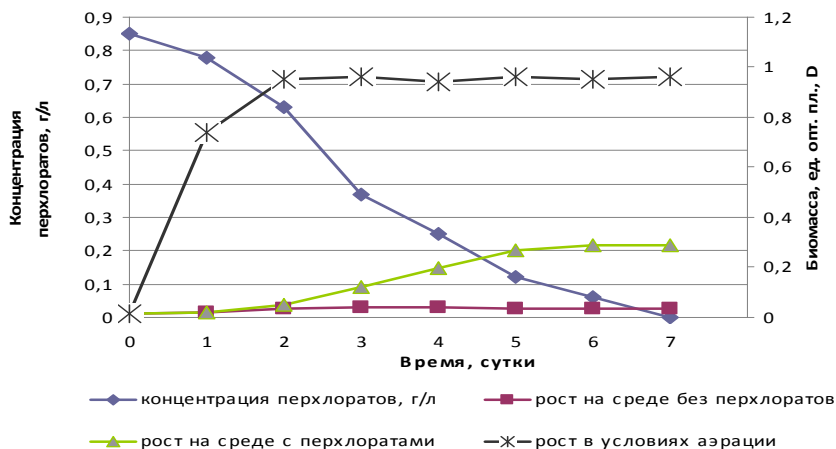


Рис. 2. Рост *Acinetobacter* шт. 62-1 на среде с перхлоратами

Третья группа представлена грам-отрицательными подвижными палочками, часто соединенных по парам, оксидазоотрицательными, каталазоположительными. На поверхности агаризованных питательных сред эти культуры растут только при внесении в среду восстановителей (0,1% тиогликолат натрия или 0,1% раствора цистеина). При росте в жидких питательных средах с КСХ под резиновыми пробками продуцируют красно-фиолетовый внутриклеточный пигмент. Хорошо растут в широком температурном диапазоне (2–34 °С). Предварительно эти штаммы были отнесены к роду *Rhodopseudomonas*.

При росте на КСХ изолированные штаммы могут использовать целый ряд органических соединений (табл. 2).

Изолированные штаммы первых двух групп росли на поверхности агаризованных сред, а также при выращивании на качалках, что свидетельствует о том, что эти микроорганизмы используют кислород как акцептор электронов. Микроорганизмы третьей группы росли на поверхности сред медленно и только при обязательном внесении в среду восстановителей.

Кроме КСХ изолированные штаммы могут использовать и другие акцепторы электронов (табл. 3).

**Органические соединения, используемые бактериями как доноры электронов при восстановлении кислородных соединений хлора**

Группы бактерий, восстанавливающих КСХ	Вещества, используемые при восстановлении КСХ
Группа « <i>Acinetobacter</i> »	Альбумин, МПБ, белковые компоненты сточных вод, цитрат, ксилоза, этанол, n-алканы, нефть, нафталин
Группа « <i>Aerococcus</i> »	Альбумин, МПБ, белковые компоненты сточных вод, целлобиоза, галактоза, рамноза, лактоза, рафиноза, сахароза, фруктоза, этанол, нефть, нафталин
Группа « <i>Rhodopseudomonas</i> »	Ацетат, цитрат, этанол, альбумин, МПБ

Таблица 3

**Использование бактериями, восстанавливающими кислородные соединения хлора, альтернативных акцепторов электронов**

Акцепторы электронов	Группа бактерий « <i>Aerococcus</i> »	Группа бактерий « <i>Acinetobacter</i> »	Группа бактерий « <i>Rhodopseudomonas</i> »
Перхлораты	–	±*)	+
Хлораты	+	+	+
Ванадаты	+	+	+
Хроматы	+	+	±
Сульфаты	–	+	–
Нитраты	–	+	+
Манганаты	+	+	±
Кислород	+	+	±**)

**Примечание:** \*) – растут 43 % штаммов; \*\*) – растут только при внесении в среду восстановителя

Все изолированные штаммы росли на средах с хлоратами, однако не все они использовали перхлораты. Бактерии, объединенные в группу «*Aerococcus*» и часть (57 %) штаммов из группы «*Acinetobacter*» являются истинно хлорат-редуцирующими бактериями. Большинство изолированных штаммов использовали в качестве акцептора электронов хроматы в концентрации, которая значительно превышает ингибирующие концентрации для большинства микроорганизмов (3–5 мг/л), а также ванадаты. Об этом свидетельствует рост биомассы и снижение содержания хроматов и ванадатов с образованием  $\text{Cr}^{3+}$  или четырехвалентного ванадия, соответственно. Следует отметить, что рост бактерий, восстанавливающих КСХ на средах с хроматами и ванадатами, приводил к необратимой утрате способности восстанавливать хлораты и, в некоторых случаях, перхлораты. Возможно, это объясняется конкуренцией между хроматами и сульфатами, как это имеет место у сульфатредуцирующих бактерий за транспортную цепь, по которой в клетки бактерий поступают и сульфаты и хроматы [11], или антагонизмом между ванадатами и фосфатами [17].

Способность хроматов и ванадатов действовать подобным образом на способность восстанавливать КСХ в литературе не отмечалась. В восстановлении других акцепторов разными группами ХВБ и ПВБ существует различия (табл. 3). Так, все бактерии группы «*Aerococcus*» не восстанавливают перхлораты и нитраты и редуцируют хлораты, что свидетельствует о разных ферментных путях трансформации этих акцепторов. У бактерий из группы «*Acinetobacter*» только около половины штаммов восстанавливали перхлораты. Практически все изолированные бактерии восстанавливали манганаты, что проявлялось в постепенном (в течение 20–30 суток) исчезновении черного преципитата четырехвалентного марганца в полужидкой агаризованной среде, просветления среды и обильного роста точечных колоний.

Таким образом, бактерии восстанавливающие КСХ, как правило, выделяются из экониш с относительно анаэробными условиями. В среднем содержание этих бактерий составляет  $10\text{--}10^3$  КОЕ/г или мл образца. Все эти бактерии – факультативные анаэробы с дыхательным типом метаболизма, которые могут усваивать широкий круг источников углерода и целый ряд альтернативных акцепторов электронов. Культивирование на хроматах и ванадатах приводит к необратимой утрате способности восстанавливать КСХ. В результате проведенных исследований удалось выделить бактерии, у которых хлорат- и перхлоратредукция являются

отдельными процессами. На основании того, что не все изоляты восстанавливают нитраты можно утверждать о разных путях восстановления КСХ и нитратов.

**Г.Ф. Смирнова**

*Институт мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного, НАН України, Київ*

## **ОСОБЛИВОСТИ МЕТАБОЛІЗМУ БАКТЕРІЙ, ЩО ВІДНОВЛЮЮТЬ ХЛОРАТИ І ПЕРХЛОРАТИ**

Резюме

З різних природних джерел виділені бактерії – факультативні анаероби, здатні відновлювати кисневі сполуки хлору, – хлорати і перхлорати, використовуючи їх як термінальні акцептори електронів. Кінцевим продуктом цього процесу є хлорид. Крім хлоратів і перхлоратів ізольовані бактерії відновлювали і інші акцептори електронів – хромати, сульфати, нітрати, ванадати, манганати. При відновленні бактерії, що вивчаються, використовують як донори електронів цілий ряд органічних сполук.

*Ключові слова:* (пер)хлоратвідновлювальні мікроорганізми, хлорати, перхлорати, сульфати, хромати, ванадати, нітрати, манганати.

**G.F.Smirnova**

*Zabolotny Institute of Microbiology and*

*Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## **METABOLISM PECULIARITIES OF BACTERIA RESTORING CHLORATES AND PERCHLORATES**

Summary

Bacteria facultative anaerobes capable to restore chlorine oxygen compounds – chlorates and perchlorates, using them as terminal acceptors of electrons, have been isolated from various natural sources. Chloride is the end product of this process. Besides chlorates and perchlorates the isolated bacteria also restored other electron acceptors: chromates, sulfates, nitrates, vanadates, manganates. The studied restored bacteria use a whole number of organic compounds as electron donors.

The paper is presented in Russian.

**Key words:** (per)chlorate-restoring microorganisms, chlorates, perchlorates, sulphates, chromates, vanadates, nitrates, manganates.

**The author's address:** Smirnova G.F., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Антипчук А.Ф., Кірсева В.Ю. Водна мікробіологія. – К.: Вид-во Нац. аграрного ун-ту. – 2003. – 224 с.
2. А.с. 1564122 СССР МКИ С 02 F 3/34, С 12 N 1/20 Штамм бактерий *Aerococcus dechloraticans* ГТС-463, используемый для очистки сточных вод производства спичек / Н.С. Серпокряков, В.И.Семенов, В.П. Костюков и др., Опубли.15.05.90, бюл. №18.
3. Голосницкая В.А., Петрашень В.И. Экстракционно-фотометрические определения перхлоратов в присутствии хлоратов // Журнал аналитической химии. – 1962, – 17, № 7. – С. 878–881.
4. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта. – Т. 1, 3. – М.: Мир. – 1983. – 800 с.
5. Музгин В.Н., Хамзина Л.Б., Золотавин В.Л., Безруков И.Я. / Аналитическая химия ванадия. – М.: Наука. – 1981 – 215 с.
6. Петрашень В.И. Объемный анализ – М.: Гостхимиздат, 1946. – 227 с.
7. Справочное руководство по применению ионоселективных электродов / Под ред. Петрухина О.П. – М.: Изд-во химической литературы. – 1986. – 225 с.
8. Степанюк В.В., Смирнова Г.Ф., Ключникова Т.М. и др. Новый вид рода *Acinetobacter* – *A. thermotoleranticus* sp.nov. // Микробиология. – 1992. – 61, № 3. – С. 490–500.
9. Aslanger A. Experiments on the eradication of Canada thistle (*Cirsium arvense*) with chlorate and other herbicides // J. Agric. Res. – 1928. – 6, № 6. – P. 915–935.
10. Bruce R.A., Achenbach L.A. and Coates J.D. Reduction of (per)chlorate by a novel organism isolated from a paper mill waste // Environ. Microbiol. – 1999. – 1, № 4. – P. 319–331.
11. Cervantes C., Campos-Garcia J., Devars S., Gutierrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzman J.C., Moreno-Sanchez R. Interactions of chromium with microorganisms and plants.// FEMS Microbil. – 2001. – 25, № 3. – P. 335–347.

12. Coates J.D., Cole K.A., Chakraborty R., O'Connor S.M., Achenbach L.A. The diversity and ubiquity of bacteria utilizing humic substances as an electron donor for anaerobic respiration // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – **68**, N 4. – P. 2445–2452.
13. Coates J.D., Michaelidou U., Bruce R.A., O'Connor S.M., Crespi J.N. and Achenbach L.A. The ubiquity and diversity of dissimilation of (per)chlorate-reducing bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – **65**, N 2. – P. 5234–5241.
14. Howdeshell K.L. A model of the development of the brain as a construct of the thyroid system // *Environ. Health Perspect.* – 2002. – **110**, N 3. – P. 337–348.
15. Logan B.E. A review of chlorate and perchlorate respiring microorganisms. // *Bioremed. J.* – 1998. – **2**, N 2. – P. 69–79.
16. Pilkington E.S., Smith P.R. Spectrophotometric determination of chromium in ilmenite // *Anal. chem. acta.* – 1967. – **39**, N 7. – P. 321–328.
17. Rehder D. Bioinorganic Vanadium chemistry / John Wiley & Sons Ltd., 2008. – 225 p.
18. Urbansky E.T. Perchlorate chemistry: implication for analysis and remediation // *Biorem. J.* – 1998. – **2**, N 2. – P. 81–95.
19. White C., Sayer J.A., Gadd G.M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2000. – **33**, N 3–4. – P. 197–208.
20. Wolff J. Perchlorate and the thyroid gland. // *Pharmacol. Rev.* – 1998. – **50**, N1. – P. 89–105.
21. Wu J., Unz R.F., Zhang H. and Logan B.E. Persistence of perchlorate and the relative numbers of perchlorate- and chlorate-respiring microorganisms in natural waters, soil, and wastewater // *Biorem. J.* – 2001. – **5**, N2. – P. 119–130.
22. Xu J., Song Y., Min B. Microbial degradation of Perchlorate: Principles and Application // *Environ. Eng. Sci.* – 2003. – **20**, N 5. – P. 404–422.
23. Xu J., Trimble J., Steinberg L., Logan B.E. Chlorate and nitrate reduction pathways are separately induced in the perchlorate-respiring bacterium *Dechlorosoma* sp. KJ and the chlorate-respiring bacterium *Pseudomonas* sp. PDA // *Water Research* – 2004. – **38**, N 3. – P. 673–680.

Отримано 14.04.2009