



## Wpływ wybranych wysokoenergetycznych soli azotetrazolu na aktywność mikrobiologiczną w glebie

MATEUSZ SZALA, ANDRZEJ BORKOWSKI<sup>1</sup>

Wojskowa Akademia Techniczna, Wydział Nowych Technologii i Chemii,  
00-908 Warszawa, ul. S. Kaliskiego 2, e-mail: mszala@o2.pl

<sup>1</sup>Uniwersytet Warszawski, Wydział Geologii,  
02-089 Warszawa, ul. Żwirki i Wigury 93, aborkowski@uw.edu.pl

**Streszczenie.** Celem prezentowanych badań było oznaczenie wpływu azotetrazolanu diamonu (AAZ), azotetrazolanu di(guanidyny) (GAZ), azotetrazolanu di(triaminoguanidyny) (TAGAZ) oraz chlorowodoru triaminoguanidyny (TAG·HCl) na wzrost bakterii glebowej *Bacillus halodurans* oraz na aktywność mikrobiologiczną w glebie. W badaniach zastosowano hodowle stacjonarne wyizolowanego z gleby szczepu bakterii *Bacillus halodurans* oraz wykorzystano system respirometryczny do oznaczeń tempa produkcji CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>S w hodowlach glebowych z dodatkiem soli azotetrazolu i TAG. W celu wyznaczenia parametrów biokinetycznych wzrostu mikrobiologicznego *Bacillus halodurans* oraz tempa produkcji gazów w hodowlach glebowych zastosowano analizę matematyczną w oparciu o model logistyczny. Stwierdzono znaczną aktywność azotetrazolanu di(triaminoguanidyny) oraz chlorowodoru triaminoguanidyny hamującą wzrost *Bacillus halodurans*. Podobne wyniki otrzymano przy oznaczeniach respirometrycznych, gdzie dla hodowli z wymienionymi związkami uzyskano tempo produkcji CO<sub>2</sub> na poziomie odpowiednio 937 μg·h<sup>-1</sup> i 1011 μg·h<sup>-1</sup>, natomiast w hodowlach kontrolnych tempo to oznaczono na poziomie 1563 μg·h<sup>-1</sup>. Badania respirometryczne wykazały również, że badane związki mogą charakteryzować się znaczną aktywnością modyfikującą procesy mikrobiologiczne w glebie. Wszystkie zastosowane związki hamowały całkowicie wydzielanie siarkowodoru oraz modyfikowały tempo wydzielania wodoru w hodowlach, znacznie je obniżając w stosunku do układu kontrolnego.

**Słowa kluczowe:** wysokoazotowe sole azotetrazolu, aktywność mikrobiologiczna, badania respirometryczne

### 1. Wprowadzenie

Wzrastające zainteresowanie nowoczesnymi materiałami wybuchowymi i idące w ślad za tym stopniowe wprowadzanie ich do stosowania masowego w technice

cywilnej i wojskowej może być przyczyną znacznego skażenia środowiska wodno-gruntowego. Każde użycie materiału wybuchowego jest potencjalnym źródłem skażenia, podobnie jak transport i składowanie tego typu materiałów. Powodem skażeń są nie tylko konflikty zbrojne trwające na całym świecie, lecz także coraz szersze stosowanie materiałów wybuchowych w technice cywilnej. Jako przykład wystarczy podać masowe stosowanie związków wysokoazotowych w poduszkach powietrznych w samochodach [1], szybkich systemach gaśniczych stosowanych w bibliotekach i serwerowniach czy coraz większe zużycie materiałów wybuchowych w perforatorach stosowanych w górnictwie naftowym [2]. Intensywnie badaną grupą nowoczesnych materiałów wybuchowych są pochodne tetrazolu, wśród których szczególnie dużo uwagi poświęca się solom azototetrazolu ze względu na zawartość azotu w cząsteczce przekraczającą 80% masowych oraz dobrą stabilność termiczną [3].

Większość dotychczasowych badań charakteryzujących możliwości bioremediacji środowisk skażonych materiałami wybuchowymi ukierunkowana była, z racji powszechnego użycia, na nitrowe pochodne benzenu, takie jak 2,4,6-trinitrotoluen [4-6]. Wiele badań dotyczyło również cyklicznych N-nitroamin, takich jak 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazacykloheksan (RDX), 1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetraazacyklooktan (HMX), co zaowocowało opracowaniem potencjalnych szlaków ich biodegradacji [7, 8]. Badania degradacji w obecności mikroorganizmów stosunkowo nowego materiału wybuchowego, jakim jest HNIW, pokazują, że tematyka utylizacji związków energetycznych przez bakterie jest w centrum zainteresowania renomowanych ośrodków badawczych [8]. Obecność tego typu związków chemicznych w środowisku wodno-gruntowym może rodzić poważne konsekwencje związane głównie z modyfikowaniem aktywności mikrobiologicznej, a przez to istotnie wpływać np. na jakość gleby i jej zdolności regeneracyjne. Nie bez znaczenia jest fakt, iż większość soli azototetrazolu jest dobrze rozpuszczalna w wodzie. Wiele związków aromatycznych i heterocyklicznych może charakteryzować się właściwościami toksycznymi; część z nich może modyfikować aktywność mikrobiologiczną w glebie, czego klasycznym przykładem jest dimetylopirazol hamujący wzrost i rozwój mikroorganizmów nitryfikacyjnych [9]. Z drugiej strony, część tego typu związków lub ich produktów rozkładu może podlegać procesom biodegradacji, czego przykładem może być benzen, toluen, anilina, trinitrotoluen czy wspomniany już RDX. Z racji tego, że coraz większe zainteresowanie materiałami wysokoenergetycznymi rodzi poważne problemy natury środowiskowej i toksykologicznej, badania mające na celu określenie wpływu takich substancji na układy żywe są, jak się wydaje, konieczne i uzasadnione, tym bardziej że część związków heterocyklicznych może charakteryzować się selektywnymi właściwościami modyfikującymi aktywność mikrobiologiczną w środowisku.

Najważniejszym celem prezentowanych w pracy badań było scharakteryzowanie soli azototetrazolu pod kątem ich oddziaływania na aktywność mikrobiologiczną w glebie organicznej (torf). Miarą takiej aktywności jest m.in. tempo wydzielania

ditlenku węgla oraz innych gazów podczas inkubacji próbki gleby. W ramach badań określono także wpływ soli azotetrazolu na wzrost bakterii glebowej *Bacillus halodurans*, licznie występującej w zastosowanej w eksperymentach glebie. W celu określenia parametrów biokinetycznych charakteryzujących aktywność mikrobiologiczną gleby oraz wzrost *Bacillus halodurans* w obecności badanych związków chemicznych, zastosowano model logistyczny, bardzo dobrze opisujący wzrost mikrobiologiczny w hodowlach stacjonarnych. Tego typu matematyczne modele z powodzeniem stosowano w wielu badaniach charakteryzujących kinetykę wzrostu mikrobiologicznego [10-13]

## 2. Część eksperymentalna

### 2.1. Synteza soli azotetrazolu

W badaniach zastosowano następujące związki chemiczne (rys. 1): azotetrazolan diamonu (AAZ), azotetrazolan di(guanidyny) (GAZ), azotetrazolan di(triaminoguanidyny) (TAGAZ) oraz chlorowodorek triaminoguanidyny (TAG·HCl). Sole azotetrazolu otrzymywano w reakcjach podwójnej wymiany jonowej pomiędzy solą disodową azotetrazolu (SAZ) a chlorowodorkiem odpowiedniego kationu wg procedur podanych niżej.

#### 2.1.1. Synteza chlorowodorku triaminoguanidyny (TAG·HCl)

Syntezę TAG·HCl prowadzono wg metody podanej przez Coburna, zastępując bezwodną hydrazynę 80% wodzianem hydrazyny i dioksan 2-propanolem [13]. W reaktorze o objętości 250 cm<sup>3</sup> zaopatrzonym w wydajne mieszanadło mechaniczne, termoparę i chłodnicę zwrotną umieszczono 100 cm<sup>3</sup> 2-propanolu, następnie dodano 19,0 g chlorowodorku guanidyny (Gu·HCl) i w temperaturze otoczenia wkroplono 38,0 g 80% wodzianu hydrazyny. Mieszano układ przez 15 min w temperaturze otoczenia, po czym ogrzano do temperatury wrzenia 2-propanolu (82°C) i kondycjonowano układ w tej temperaturze przez 12 h. Następnie ochłodzono mieszaninę reakcyjną do 0°C, mieszano 30 min w tej temperaturze i odsączono wytrącony biały krystaliczny produkt, który następnie suszono 6 h w temperaturze 80°C. Uzyskano 26,5 g produktu, co stanowiło 95% wydajności teoretycznej. Temperatura topnienia otrzymanego TAG·HCl wynosiła 230°C i była zgodna z danymi literaturowymi [13]

#### 2.1.2. Synteza soli disodowej azotetrazolu

Syntezę SAZ prowadzono wg zmodyfikowanej procedury podanej przez Thiego [14]. Do reaktora o objętości 500 cm<sup>3</sup> wyposażonego w wydajne mieszanadło

mechaniczne z końcówką kotwicową, chłodnicę zwrotną, termoparę i umieszczonego na łaźni wodnej wprowadzono 300 g wody destylowanej. Następnie wprowadzono przy ciągłym mieszaniu 24 g NaOH, po rozpuszczeniu się zasady zadozowano do reaktora 10,3 g 5-aminotetrazolu (5AT). Po zakończeniu dodawania 5AT, ogrzano mieszaninę reakcyjną do temperatury 65°C i rozpoczęto dodawanie 12 g utartego  $\text{KMnO}_4$ . Transparentny roztwór przyjął barwę brązową, pochodzącą od powstającego ubocznie tlenku manganu(IV). Szybkość dozowania manganianu(VII) potasu regulowano tak, aby temperatura reakcji nie przekroczyła 70°C. Po zakończeniu dodawania  $\text{KMnO}_4$  nadmiar utleniacza zneutralizowano 9 g siarczanu(IV) sodu. Mieszaninę poreakcyjną przesączono na gorąco w celu usunięcia wytrąconego  $\text{MnO}_2$ . Osad na sączku przemyto 100  $\text{cm}^3$  gorącej (80°C) wody i odciek dodano do przesączu. Roztwór pozostawiono na 48 h w lodówce (2°C). Wytrącone żółte transparentne kryształy odsączono i suszono 12 h w temperaturze 60°C. Uzyskano 10,2 g jasnożółtych nietransparentnych kryształów, co stanowi 80% wydajności teoretycznej. Z roztworów wodnych SAZ krystalizuje w postaci stabilnego pentahydratu ( $\text{SAZ} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) o transparentnych kryształach koloru żółtego. Podczas suszenia w temperaturze wyższej od 30-40°C,  $\text{SAZ} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ulega odwodnieniu z wytworzeniem bezwodnego SAZ koloru bladożółtego. Widmo IR produktu zawierało charakterystyczne pasma absorpcji: 1399  $\text{cm}^{-1}$  (C-N), 1600  $\text{cm}^{-1}$  (C=N), 1430  $\text{cm}^{-1}$  (N=N), 850  $\text{cm}^{-1}$  (N-N, niska intensywność). W widmie  $^1\text{H}$  NMR badanego związku nie obserwowano żadnych sygnałów rezonansowych poza protonami użytego rozpuszczalnika. W widmie  $^{13}\text{C}$  NMR obserwowano jeden sygnał o przesunięciu chemicznym równym 173,2 ppm, który można przypisać równocennym atomom węgla w pierścieniu tetrazolowym.

### 2.1.3. Synteza soli diamonowej azotetrazolu

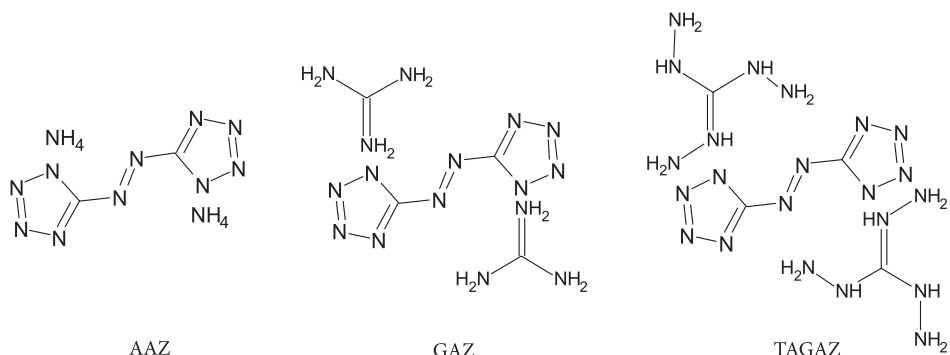
Synteza AAZ prowadzono wg zmodyfikowanej procedury podanej przez Hiskeya [15]. W reaktorze o objętości 600  $\text{cm}^3$  zaopatrzonym w wydajne mieszadło mechaniczne, termoparę i chłodnicę zwrotną umieszczono 300 g wody amoniakalnej i 20 g soli sodowej azotetrazolu. Po ogrzaniu roztworu do 30-35°C dodawano 15 g chlorku amonu w ciągu ok. 10 minut. Mieszaninę poreakcyjną ochłodzono do temperatury otoczenia, a następnie umieszczono w lodówce (2°C) na 48 h. Wytrącone kryształy odsączono i suszono w temperaturze 60°C przez 12 h. Otrzymano 17,9 g żółtych kryształów, co stanowiło 95% wydajności teoretycznej. Temperatura rozkładu (bez topnienia) AAZ wynosiła 190°C. W widmie  $^1\text{H}$  NMR próbki AAZ obserwowano jeden sygnał rezonansowy o przesunięciu chemicznym równym 7,3 ppm, który można przypisać protonom związanym z atomami azotu w kationie amonowym. W widmie  $^{13}\text{C}$  NMR wystąpił również jeden sygnał rezonansowy o przesunięciu chemicznym równym 171,3 ppm, który pochodził od dwóch atomów węgla zlokalizowanych w pierścieniach tetrazolowych.

#### 2.1.4. Synteza soli diguanidynowej azototrazolu

W reaktorze o objętości 250 cm<sup>3</sup> wyposażonym w termoparę, mieszadło mechaniczne oraz chłodnicę zwrotną umieszczono w temperaturze otoczenia 120 g wody destylowanej i 20,0 g SAZ. Następnie ogrzano układ do temperatury 90°C i w jednej porcji wprowadzono 18,2 g chlorowodoru guanidyny i kontynuowano mieszanie w 90°C przez 15 min. Ochłodzono układ do temperatury 5°C, mieszano 15 min w tej temperaturze celem całkowitego wytrącenia produktu. Stały osad odsączono pod obniżonym ciśnieniem, przemyto zimną wodą i suszono w temperaturze 80°C przez 12 h. Otrzymano 23,9 g jasnożółtego produktu, co stanowi 89% wydajności teoretycznej. Produkt rozkłada się bez topnienia w temperaturze 201°C, maksimum piku rozkładu związku występuje (zarejestrowano techniką DTA) w temperaturze 260°C. W widmie <sup>1</sup>H NMR produktu obserwowano jeden sygnał o przesunięciu chemicznym wynoszącym 7,8 ppm, który odpowiada protonom związanym z atomami azotu w cząsteczce guanidyny. W widmie <sup>13</sup>C NMR produktu obserwowano dwa sygnały rezonansowe o przesunięciach chemicznych 158,1 i 173,2 ppm, które można przypisać odpowiednio węglom guanidynowym oraz tym zlokalizowanym w pierścieniach tetrazolowych.

#### 2.1.5. Synteza soli di(triaminoguanidynowej) azototrazolu

W reaktorze o objętości 250 cm<sup>3</sup> wyposażonym w termoparę, mieszadło mechaniczne oraz chłodnicę zwrotną umieszczono w temperaturze otoczenia 120 g wody destylowanej i 10,0 g SAZ. Następnie ogrzano układ do temperatury 90°C i w jednej porcji wprowadzono 13,4 g chlorowodoru triaminoguanidyny i kontynuowano mieszanie w 90°C przez 15 min. Ochłodzono układ do temperatury 5°C, mieszano 15 min w tej temperaturze celem całkowitego wytrącenia produktu. Stały osad odsączono pod obniżonym ciśnieniem, przemyto zimną wodą i suszono w temperaturze 80°C przez 12 h. Otrzymano 14,9 g jasnożółtego produktu,



Rys. 1. Wzory strukturalne badanych wysokoazotowych soli azototrazolu

co stanowiło 83% wydajności teoretycznej. Produkt rozkłada się bez topnienia w temperaturze 194°C, maksimum piku rozkładu związku występuje (zarejestrowano techniką DTA) w temperaturze 212°C. W widmie  $^{13}\text{C}$  NMR produktu rozpuszczonego w deuterowanym DMSO obserwowano dwa sygnały rezonansowe o przesunięciach chemicznych 159,1 i 173,3 ppm (rys. 8), które można przypisać odpowiednio węglom guanidynowym oraz tym zlokalizowanym w pierścieniach tetrazolowych.

## 2.2. Gleba

Próbki gleby do izolacji bakterii oraz badań aktywności mikrobiologicznej w obecności soli azototetrazolu pobrano z torfowiska w okolicy Chełma (wschodnia część Polski) z głębokości 0-20 cm. Zawartość węgla organicznego oznaczono w próbkach gleby na poziomie 20% masowych (wg normy PN ISO 10694, 2002), natomiast fosfor ogólny oznaczono na poziomie 1960  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (wg normy PN-EN ISO 11885, 2009). Liczebność bakterii tlenowych oznaczona metodą płytkową na agarze odżywczym została oszacowana na poziomie  $5\cdot 10^8$   $\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  (jednostek tworzących kolonię na gram).

## 2.3. Mikroorganizmy i podłoża

Do badań wykorzystano szczep *Bacillus halodurans* wyizolowany z pobranej próbki gleby z terenu torfowiska. Izolację przeprowadzono na podłożu o składzie:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4,0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,5 g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,1 g,  $\text{MgSO}_4$  0,1 g,  $\text{CaCl}_2$  0,1 g,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\cdot\text{H}_2\text{O}$  5,0 g, woda destylowana 1000 ml, pH 6,8-7,0 do którego wprowadzano materiał glebowy w ilości 1,0 g/50 ml podłoża. Po 48 h inkubacji materiał z hodowli wysiewano na agar odżywczy, a następnie wykonano identyfikację wyrosłych kolonii metodami molekularnymi w oparciu o analizę sekwencji genu 16S rRNA. Do amplifikacji 1540-bp fragmentu genu 16S rRNA wykorzystano uniwersalne startery dla Eubacteria: 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' i 1492R 5'-GGTTAC-CTTGTTACGACTT-3'. Reakcję PCR prowadzono z użyciem zestawu Gene Amp PCR oraz polimerazy DNA AmpliTaq (Invitrogen).

*Bacillus halodurans* był szczepem licznie reprezentowanym w wyizolowanym z badanej gleby zespole mikrobiologicznym na podłożu silnie buforowanym fosforanami. Nie bez znaczenia jest także fakt, że bakteria ta chętnie rosła na prostym podłożu z jednym źródłem węgla (glukoza) oraz w obecności fosforanów, którymi buforowano podłoże w celu wyeliminowania wahań pH po dodaniu badanych związków chemicznych.



#### 2.4. Wpływ azototrazolanów na wzrost *Bacillus halodurans*

W badaniach nad wpływem azototrazolanów na wzrost *Bacillus halodurans* wykorzystano opisane wyżej podłoże. Eksperymenty przeprowadzono w dwukrotnym powtórzeniu. Do jałowego podłoża dodawano badany związek chemiczny w ilości  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  lub  $2000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Następnie dodawano inokulum — 12-godzinną hodowlę *Bacillus halodurans* w ilości 2 ml/50 ml podłoża. Po dokładnym wymieszaniu, hodowlę przenoszono do jałowej kuwety kwarcowej o długości drogi optycznej 20 mm, a następnie wprowadzano do spektrofotometru UV-Vis DR5000 (Hach-Lange), ustawiając urządzenie, po wcześniejszym skalibrowaniu względem wody, na pomiar gęstości optycznej (OD) w jednostkach absorbancji przy długości  $\lambda = 520 \text{ nm}$ . Pomiar prowadzony był automatycznie, co dwie lub trzy godziny przez okres 40 godzin w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ . Układem kontrolnym była hodowla bez dodatku azototrazolanu i TAG·HCl.

#### 2.5. Oznaczenie oddychania glebowego

Pomiary oddychania glebowego w badaniach nad wpływem związków ksenobiotycznych na aktywność mikrobiologiczną gleby mogą być z powodzeniem stosowane, co wykazano np. w pracy Bartlinga [16]. W prezentowanych badaniach zastosowano respirometr MicroOxymax (*Columbus Instruments*) umożliwiający pomiar zmian stężenia oraz tempa produkcji ditlenku węgla, siarkowodoru i wodoru. Produkcja ditlenku węgla może odzwierciedlać ogólną aktywność metaboliczną w badanej próbce gleby. Wytwarzanie wodoru z kolei jest cechą wielu grup mikroorganizmów, jednak największe jego ilości powstają przy fermentacji i innych procesach beztlenowych, natomiast produkcja siarkowodoru jest związana głównie z aktywnością bakterii redukujących siarczany [17]. Pomiary prowadzono w szczelnych butelkach szklanych o pojemności 250 mL, podłączonych do systemu respirometrycznego. Do naczynia wprowadzano 10,0 g próbki badanej gleby pobranej na torfowisku z głębokości 0-20 cm. Następnie dodawano 50 mL wody z dodatkiem glukozy (0,5%) oraz odpowiedniego azototrazolanu do finalnego stężenia  $2000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Następnie całość inkubowano przez okres 300 h w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ , pomiar stężenia gazów wykonywany był automatycznie co 7 h. Układ eksperymentalny wykonano w czterech powtórzeniach.

#### 2.6. Wyznaczenie parametrów biokinetycznych za pomocą funkcji logistycznej

W celu wyznaczenia parametrów biokinetycznych charakteryzujących wzrost mikrobiologiczny oraz tempo produkcji ditlenku węgla, wodoru i siarkowodoru zastosowano funkcję logistyczną:

$$X(t) = K + \frac{X_0 - K}{1 + e^{\mu(t-T)}}, \quad (1)$$

gdzie:  $X$  — zmienna proporcjonalna do wzrostu bakteryjnego (np. gęstość optyczna, ilość produkowanego gazu);  
 $\mu$  — specyficzne tempo przyrostu zmiennej  $X$ ;  
 $t$  — czas;  
 $K$  — wartość pojemności środowiska względem zmiennej  $X$ ;  
 $X_0$  — parametr charakterystyczny dla danych warunków, wyznacza jedną z asymptot, do których zmierza funkcja logistyczna (drugą asymptotą jest wartość  $K$ ); w idealnych warunkach jest to wartość początkowa zmiennej  $X$ ;  
 $T$  — czas, przy którym następuje punkt przegięcia funkcji, a zatem jest to moment wystąpienia maksymalnej wartości szybkości przyrostu zmiennej  $X$ , w tym momencie wartość

$$\frac{d^2 X}{dt^2} = 0. \quad (2)$$

Zastosowana funkcja jest modyfikacją równania logistycznego Verhulsta [18]:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left( 1 - \frac{X}{K} \right), \quad (3)$$

którego rozwiązaniem jest równanie:

$$X(t) = \frac{KX_0}{(K - X_0)e^{-\mu t} + X_0}. \quad (4)$$

Zastosowana w prezentowanych badaniach zmodyfikowana funkcja logistyczna może posłużyć do wyznaczenia chwilowej szybkości powstawania badanego produktu  $v(t)$ :

$$v(t) = \frac{dX(t)}{dt}, \quad (5)$$

gdzie:  $v(t)$  — szybkość chwilowa zmian wartości  $X$ ;  
 $X$  — zmienna, której zmiany opisane są funkcją zależną od czasu,

umożliwia także wyznaczenie maksymalnej chwilowej szybkości powstawania tego produktu ( $v_{\max}$ ), co jest matematycznie tożsame z wartością pochodnej funkcji logistycznej  $X(t)$  w punkcie  $T$ :

$$v(T) = v_{\max}. \quad (6)$$

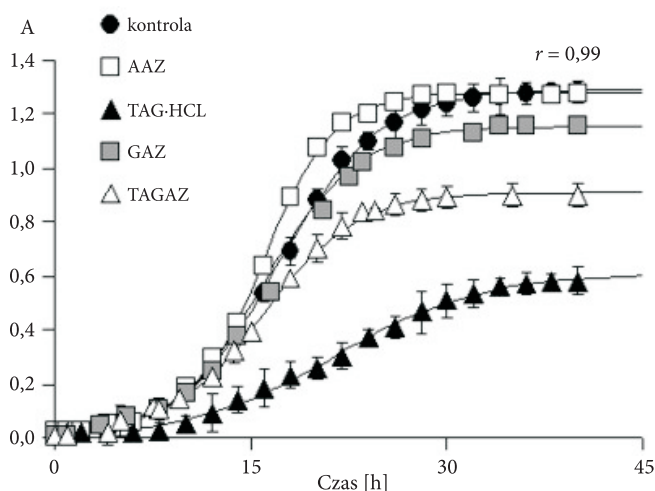


Przedstawiony model ma także tę zaletę, że może być zastosowany zarówno do opisu przyrostu, jak i zaniku wartości badanej zmiennej związanej ze wzrostem mikrobiologicznym.

W celu dostosowania modelu do punktów pomiarowych wykorzystano arkusz statystyczny STATISTICA 6.0 [19] i zastosowano metodę najmniejszych kwadratów dostępną dla modeli nieliniowych (narzędzia zaawansowanych modeli nieliniowych).

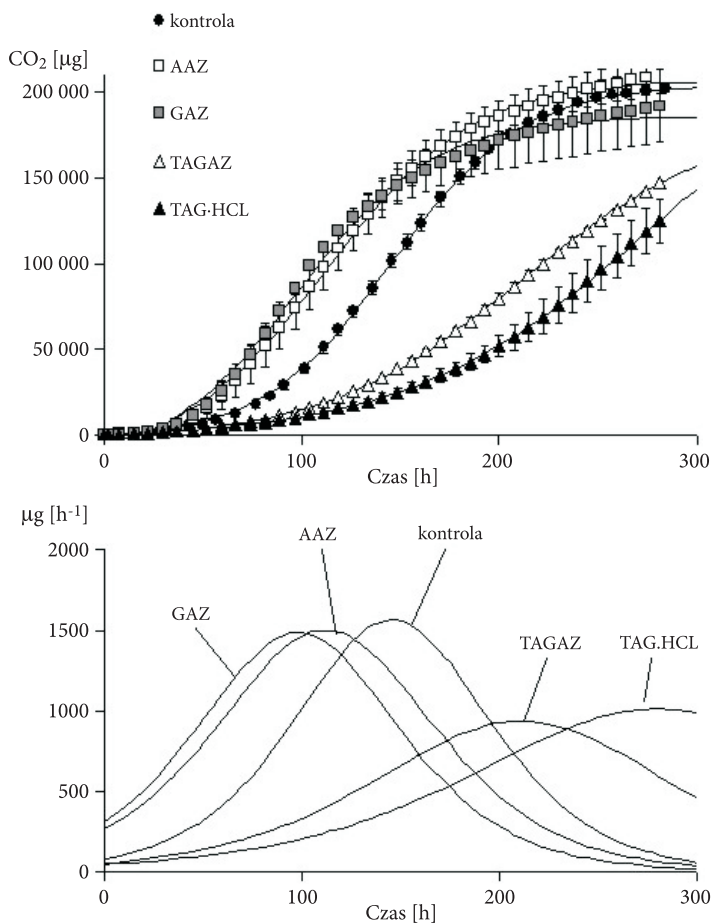
### 3. Wyniki badań

Badane związki chemiczne zostały wykorzystane w eksperymencie określającym ich wpływ na kinetykę wzrostu bakterii *Bacillus halodurans* w hodowlach stacjonarnych przy stężeniu  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (rys. 2) oraz  $2000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ .



Rys. 2. Wzrost *Bacillus halodurans* w hodowlach stacjonarnych w obecności azotetrazolanów i TAG·HCl w stężeniu  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Symbole reprezentują dane eksperymentalne, linią zaznaczono przebieg funkcji logistycznego modelu wzrostu mikrobiologicznego. Zaznaczono odchylenie standardowe oraz współczynnik korelacji dla modelu

Przy stężeniu  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  największy wpływ na wzrost bakteryjny wykazywał azotetrazolan triaminoguanidyny, natomiast pozostałe związki nie wpływały znacząco na zmianę kinetyki wzrostu. Dodatkowo zaznaczał się stymulujący wzrost efekt w hodowli z dodatkiem azotetrazolanu amonu, co dobrze zostało zobrazowane parametrem  $\mu$  określającym specyficzne tempo przyrostu na podstawie modelu logistycznego (tab. 1).



Rys. 3. Produkcja CO<sub>2</sub> w hodowlach glebowych z azotetrazolanami i TAG-HCl (powyżej) oraz tempo produkcji CO<sub>2</sub> w hodowlach obliczone na podstawie dostosowanego modelu wzrostu mikrobiologicznego (poniżej). Symbole reprezentują dane eksperymentalne, linią zaznaczono przebieg funkcji modelu logistycznego. Zaznaczono odchylenie standardowe

TABELA 1

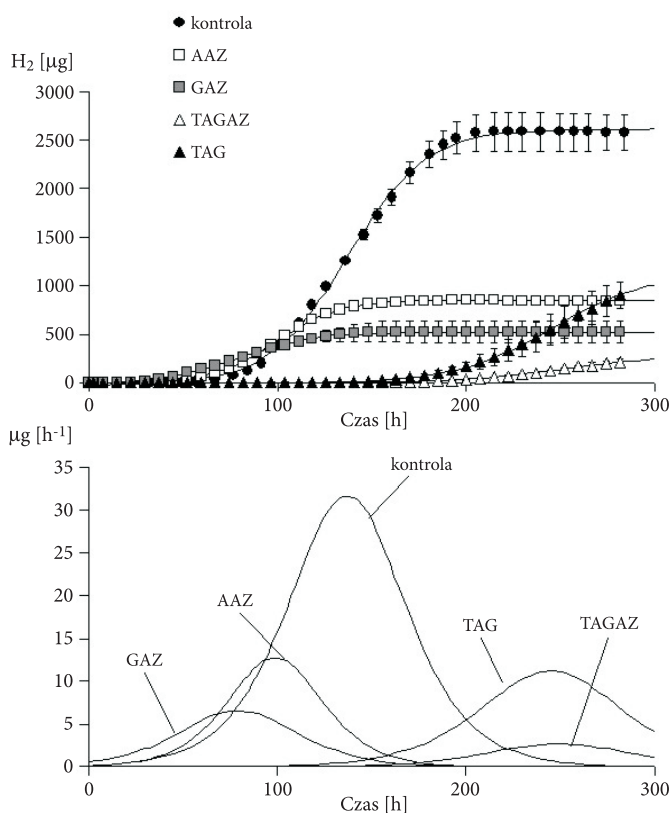
Parametry biokinetyczne wzrostu *Bacillus halodurans* w hodowlach z badanymi związkami, wyznaczone na podstawie zastosowanego modelu wzrostu mikrobiologicznego

Hodowla z badanym związkiem [mg·l <sup>-1</sup> ]	Parametr biokinetyczny		
	$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	$K$ [A]	$T$ [h]
Próbka kontrolna (0)	0,26	1,29	17
AAZ (500)	0,38	1,28	16
AAZ (2000)	0,24	1,10	16

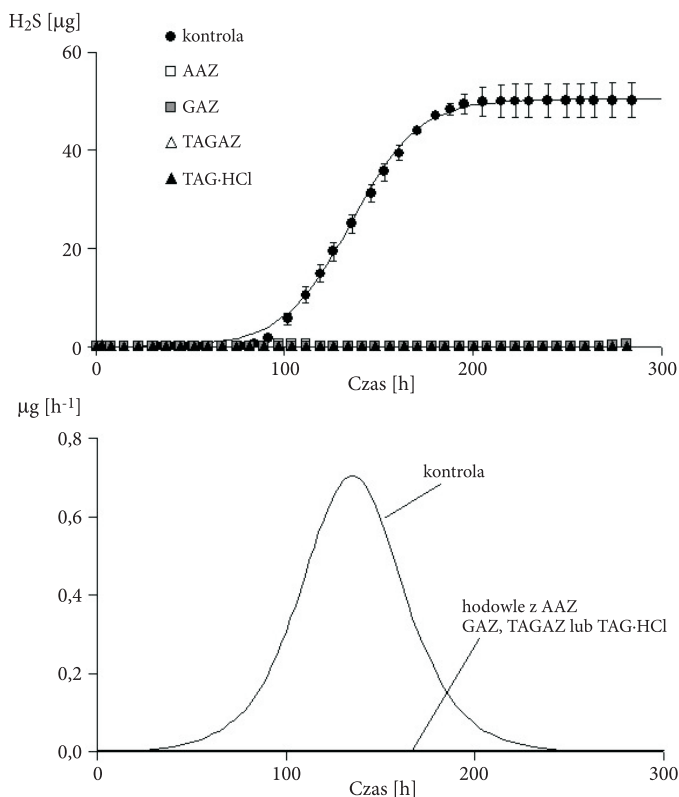
cd. tabeli 1

GAZ (500)	0,28	1,15	16
GAZ (2000)	0,24	0,95	16
TAGAZ (500)	0,28	0,91	16
TAGAZ (2000)	–	–	–
TAG (500)	0,18	0,6	21

W badaniach uzyskano wynik  $0,38 \text{ h}^{-1}$  w hodowli z AAZ, natomiast w hodowli kontrolnej  $0,26 \text{ h}^{-1}$ . Zastosowanie większego stężenia badanych związków w hodowlach ( $2000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) w przypadku AAZ oraz GAZ tylko nieznacznie zmodyfikowało kinetykę wzrostu *Bacillus halodurans*, natomiast w przypadku TAGAZ wzrost tej bakterii został praktycznie zahamowany. Wyniki tego eksperymentu sugerują istotny wpływ



Rys. 4. Produkcja wodoru w hodowlach glebowych z azototrazolanami i TAG·HCl (powyżej) oraz tempo produkcji wodoru w hodowlach obliczone na podstawie dostosowanego modelu wzrostu mikrobiologicznego (poniżej). Symbole reprezentują dane eksperymentalne, linią zaznaczono przebieg funkcji modelu logistycznego. Zaznaczono odchylenie standardowe



Rys. 5. Produkcja  $H_2S$  w hodowlach glebowych z azotetrazolanami i TAG·HCl (powyżej) oraz tempo produkcji  $H_2S$  w hodowlach obliczone na podstawie dostosowanego modelu wzrostu mikrobiologicznego (poniżej). Symbole reprezentują dane eksperymentalne, linia oznacza przebieg funkcji modelu logistycznego. Zaznaczono odchylenie standardowe

charakteru chemicznego kationu, z którym azotetrazolan tworzy sól, dlatego w kolejnym eksperymencie przebadano także wpływ chlorowodoru triaminoguanidyny (TAG·HCl) w stężeniu  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Wyniki wskazują, że związek ten charakteryzuje się właściwościami znacznie hamującymi wzrost badanej bakterii.

W kolejnym etapie badań wykorzystano system respirometryczny, w celu stwierdzenia wpływu badanych związków na procesy mikrobiologiczne w próbkach gleby. W przyjętym układzie eksperymentalnym badano tempo produkcji ditlenku węgla w hodowlach, powstającego w efekcie wzrostu mikroorganizmów glebowych, oraz tempo produkcji wodoru i siarkowodoru, jak efekt m.in. wzrostu mikroorganizmów beztlenowych, w tym bakterii redukujących siarczany. Wyniki tych badań zostały przedstawione na rysunkach 3, 4 i 5. Otrzymane dane posłużyły do wyznaczenia za pomocą modelu logistycznego parametrów biokinetycznych produkcji gazów (tab. 2).

Wyniki oznaczenia ilości oraz tempa produkcji ditlenku węgla mogą być potwierdzeniem otrzymanych wcześniej danych z oznaczeń wpływu badanych

związków na kinetykę wzrostu czystego szczepu *Bacillus halodurans*. Także tutaj daje się zauważyć tylko nieznaczny wpływ AAZ oraz GAZ na tempo produkcji ditlenku węgla. Istotne jest to, że maksymalne tempo produkcji ditlenku węgla osiągnięte jest w tych hodowlach nieco wcześniej (po 112 i 98 h dla AAZ i GAZ) niż w układzie kontrolnym (po 145 h). Ilości ditlenku węgla w przypadku AAZ i kontroli także są porównywalne, dotyczy to również wyznaczonego maksymalnego tempa produkcji CO<sub>2</sub>: 1563 μg·h<sup>-1</sup> i 1504 μg·h<sup>-1</sup> odpowiednio dla kontroli i AAZ. Znaczne różnice w stosunku do układu kontrolnego stwierdzono natomiast w przypadku hodowli z dodatkiem TAGAZ i TAG·HCl. Otrzymane wyniki pokazują znaczny hamujący wpływ tych związków na tempo produkcji ditlenku węgla w próbkach gleby, co objawiało się zarówno zmniejszeniem ilości wyprodukowanego gazu jak i zmniejszeniem maksymalnego tempa produkcji tego gazu (tab. 2). Interesujące są wyniki dotyczące generowania wodoru i siarkowodoru (rys. 5).

TABELA 2

Parametry biokinetyczne (wg modelu logistycznego) produkcji CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>S w próbkach gleby z badanymi związkami

Hodowla z badanym związkiem	Parametr biokinetyczny			v <sub>max</sub> [μg·h <sup>-1</sup> ]
	μ [h <sup>-1</sup> ]	K [ μg]	T [h]	
Produkcja CO <sub>2</sub>				
Próbka kontrolna	0,030	204 711	145	1 563
AAZ	0,027	207 226	112	1 504
GAZ	0,029	185 922	98	1 483
TAGAZ	0,020	183 800	211	937
TAG·HCl	0,016	190 500	280	1 011
Produkcja H <sub>2</sub>				
Próbka kontrolna	0,048	2 618	137	32
AAZ	0,06	850	99	13
GAZ	0,048	527	79	6,6
TAGAZ	0,04	270	249	2,3
TAG·HCl	0,04	1 117	245	11
Produkcja H <sub>2</sub> S				
Próbka kontrolna	0,056	50	135	0,7
AAZ	–	0	0	0
GAZ	–	0	0	0
TAGAZ	–	0	0	0
TAG·HCl	–	0	0	0

Wszystkie zastosowane w badaniach związki chemiczne spowodowały albo znaczne obniżenie ilości i tempa produkcji gazów albo całkowite zahamowanie wydzielania gazu w stosunku do układu kontrolnego. W przypadku hodowli z dodatkiem AAZ i GAZ stwierdzono znaczne zmniejszenie ilości wydzielonego wodoru, podobnie w przypadku hodowli z dodatkiem TAGAZ i TAG·HCl, przy których zanotowano także znaczne wydłużenie czasu osiągnięcia maksymalnego tempa produkcji gazu do odpowiednio 249 h i 245 h. Podobną zależność w przypadku TAGAZ i TAG·HCl zaobserwowano w układzie rejestrującym stężenie ditlenku węgla. Stwierdzone zahamowanie wydzielania siarkowodoru w odniesieniu do układu kontrolnego dotyczyło wszystkich hodowli, do których dodano badane związki.

#### 4. Omówienie wyników

Wykonane badania pokazują, że azotetrazolany z jednej strony mogą modyfikować kinetykę wzrostu bakteryjnego zależnie od kationu, z którym azotetrazolan tworzy sól, z drugiej strony wydaje się, że sama obecność azotetrazolu może znacząco modyfikować aktywność mikrobiologiczną. Badania wzrostu *Bacillus halodurans* w obecności azotetrazolanów oraz oznaczenia intensywności wydzielania ditlenku węgla w hodowlach z próbkami gleby pokazują, że najbardziej toksyczny jest, jak się wydaje, TAGAZ z uwagi na obecność triaminoguanidyny w cząsteczce, bowiem sam chlorowodorek triaminoguanidyny również charakteryzował się właściwościami hamującymi wzrost mikrobiologiczny. Z drugiej strony stwierdzenie szybszego wzrostu *Bacillus halodurans* w obecności AAZ w stężeniu  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  może świadczyć, zgodnie z substratowym modelem Monoda [20, 21], o wykorzystywaniu jonów amonowych pochodzących od AAZ, przy czym wydaje się, że sama obecność azotetrazolu nie wpłynęła istotnie na wzrost badanej bakterii. Analiza wyników respirometrycznych poszerzonych o wodór i siarkowodór sugeruje inną znaczną aktywność samego azotetrazolu niezależnie od tego, z jakim kationem tworzy sól, bowiem w hodowlach stwierdzono różnice w ilości wydzielonego wodoru w stosunku do układu kontrolnego oraz praktycznie całkowite zahamowanie wydzielania siarkowodoru nawet w tych hodowlach, gdzie zastosowano AAZ. Jest prawdopodobne, że badane związki chemiczne mogą istotnie modyfikować proces sulfidogenezy prowadzony przez bakterie redukujące siarczany, należałoby jednak przeprowadzić szerzej zakrojone badania ukierunkowane tylko na ten problem. Badane azotetrazolany należą do grupy związków heterocyklicznych, wśród których istnieje wiele substancji charakteryzujących się oddziaływaniem zarówno na kinetykę wzrostu mikrobiologicznego jak i zdolnościami wybiórczo hamującymi wzrost niektórych mikroorganizmów. Potwierdzenia dostarczają wyniki wielu badań, w których stosowano tego typu związki chemiczne. McCarthy i Bremner

[22] przebadali 12 niepodstawionych i 33 pochodne heterocyklicznych związków azotowych pod kątem ich zdolności do selektywnego hamowania procesu nitryfikacji w glebie. Badania te przeprowadzono na próbkach gleb mineralnych, rejestrując zmiany stężenia azotanów(III) i (V) w hodowlach z dodatkiem badanych związków. Stwierdzono wówczas znaczne, hamujące aktywność nitryfikacyjną działanie 1,2-diazoli (pirazoli), w tym dimetylopirazolu. Badanie te zostały potwierdzone także w pracy Zerulla [23] i Yu [24], z kolei badania Muller [25] wskazały na brak wpływu dimetylopirazolu na enzymy procesu denitryfikacji. Pandey [26] donosi o działaniu antymikrobiałnym pochodnych zawierających pierścieni 1,2,4-triazolowy, 1,2,4-triazynowy, a także 1,2,4,5-tetrazynowy. W pracy Yavuz [27] przedstawione zostały wyniki badań nad antymikrobiałną aktywnością kilku nowych podstawionych fenylohydrazyno-1H-tetrazolo-5-acetonitryli. Badania te przeprowadzono na czystych szczepach *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Staphylococcus aureus*. W konkluzji stwierdzono, że związki te odznaczały się antybiotycznymi właściwościami w stosunku do tych szczepów bakterii.

Badania nad wpływem związków heterocyklicznych na kinetykę wzrostu mikrobiologicznego są tym bardziej istotne, iż obecnie m.in. w tej klasie związków poszukuje się nowych materiałów wybuchowych miotających. Wysokoazotowe sole azototrazolu są idealnymi kandydatami na składniki ekologicznych paliw rakietowych przyszłości o wysokim impulsie właściwym z uwagi na to, że podczas ich spalania wydziela się niemal wyłącznie azot. Z kolei tego typu badania determinują także poszukiwania rozwiązań przeciwdziałających skażeniu środowiska powstałego w efekcie używania i składowania materiałów wybuchowych. Wielu autorów prac badawczych stwierdziło możliwość zastosowania zespołów mikrobiologicznych w procesie biodegradacji takich związków wybuchowych jak RDX, HMX, a także pochodnych nitroaromatycznych i polinitroamin klatkowych [4, 7, 8, 28, 29].

Sole azototrazolu w badanym zakresie stężeń są w pełni rozpuszczalne w wodzie. W celu dokładniejszego zbadania wpływu kationów oraz anionu azototrazolanowego na rozwój mikroorganizmów konieczne jest także określenie stopnia dysocjacji w wodzie poszczególnych związków. Dokładne poznanie toksyczności mikrobiologicznej badanych związków może spowodować, że w przyszłości mikroorganizmy będą wykorzystywane do rekultywacji terenów powojkowych w miejsce wykorzystywanych obecnie klasycznych metod dekontaminacji chemicznej. Badane mikroorganizmy występują powszechnie w glebie, dlatego też ewentualna konieczność wprowadzenia ich większej ilości w celu przyspieszenia rekultywacji skażonego terenu nie będzie zaburzać w sposób istotny równowagi mikrobiologicznej w glebie.



## 5. Wnioski

Wyniki przeprowadzonych badań pozwalają wyciągnąć następujące wnioski:

1. Toksyczność soli azototrazolu oznaczaną dla *Bacillus halodurans* warunkuje część kationowa, sam azototrazol (anion azototrazolanowy) wykazuje umiarkowaną toksyczność wobec badanych mikroorganizmów.
2. Najbardziej toksyczny dla szczepu *Bacillus halodurans* spośród badanych związków okazał się TAGAZ, prawdopodobnie ze względu na obecność triaminoguanidyny w cząsteczce związku. Jej działanie hamujące wzrost *B. halodurans* zostało potwierdzone w odrębnym eksperymencie.
3. Oznaczenia tempa wydzielania ditlenku węgla z hodowli glebowych w obecności azototrazolanów korelują z danymi otrzymanymi w badaniach kinetyki wzrostu mikrobiologicznego *Bacillus halodurans*. Wykazano, że związkiem znacząco obniżającym tempo oddychania glebowego jest TAGAZ oraz TAG·HCl. Z kolei obecność AAZ w hodowli przyspiesza czas wystąpienia maksymalnego tempa produkcji CO<sub>2</sub>, co — zgodnie z modelem substratowym Monoda [20-21] — może wiązać się z obecnością łatwo dostępnego źródła azotu (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) w cząsteczce AAZ.
4. Wszystkie badane sole azototrazolu hamują wydzielanie siarkowodoru z hodowli oraz zmniejszają tempo wydzielania wodoru, za co odpowiedzialny jest, jak się wydaje, anion azototrazolanowy, jednak bez dodatkowych badań trudno jest wnioskować o mechanizmie tego wpływu. W dyskusji zwrócono uwagę, że w grupie azotowych związków heterocyklicznych znajduje się wiele substancji selektywnie modyfikujących aktywność niektórych grup mikroorganizmów.
5. Badane szczepy bakterii glebowych mogą uczestniczyć w biodegradacji soli azototrazolu w zanieczyszczonej nimi glebie na terenach poligonowych lub w miejscach konfliktów. Toksyczność mikrobialna TAGAZ wobec badanych bakterii powoduje, że konieczne są poszukiwania szczepu odpornego na ten związek oraz włączającego go w cykle biochemiczne.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2008-2011 jako projekt badawczy Nr O N204-000834 oraz środków WTC WAT w ramach pracy badawczej 08-984.

Artykuł wpłynął do redakcji 29.12.2011 r. Zweryfikowaną wersję po recenzji otrzymano w marcu 2012 r.

### LITERATURA

- [1] T. KŁAPOTKE, *High Energy Density Materials, Structure and Bonding*, Springer, 125, Berlin Heidelberg, 2007.
- [2] W.P. WALTERS, J.A. ZUKAS, *Fundamentals of shaped charges*, A. Wiley-Interscience Publication, New York, 1989.

- [3] M. HISKEY, N. GOLDMAN, J. STINE, *High-nitrogen energetic materials derived from azotetrazolate*, J. Energ. Mater., 16, 1998, 119.
- [4] J. RODGERS, N. BUNCE, *Treatment methods for the remediation of nitroaromatic explosives*, Wat. Res., 35, 9, 2001, 2101.
- [5] P. CHULHWAN, T. KIM, S. KIM, J. LEE, S. KIM, *Biokinetic parameter estimation for degradation of 2,6,6-trinitrotoluene (TNT) with Pseudomonas putida KP-T201*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 94, 1, 2002, 57.
- [6] Z. SNELLINX, A. NEPOVIM, S. TAGHAVI, J. VANGRONSVELD, T. VANEK, D. VAN DER LELIE, *Biological remediation of explosives and related nitroaromatic compounds*, ESPR-Environ Sci. & Pollut. Res., 9, 1, 2002, 48.
- [7] D. FOURNIER, A. HALASZ, J. SPAIN, P. FIURASEK, J. HAWARI, *Determination of key metabolites during biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine with Rhodococcus sp. strain DN22*, Appl. Environ. Microbiol., 68, 1, 2002, 166.
- [8] F. CROCKER, K. INDEST, H. FREDRICKSON, *Biodegradation of the cyclic nitramine explosives RDX, HMX, and CL-20*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, 73, 274.
- [9] G. MCCARTY, J. BREMNER, *Inhibition of nitrification in soil by heterocyclic nitrogen compounds*, Biol. Fertil. Soils, 8, 1989, 204.
- [10] H. FUJIKAWA, A. KAI, S. MOROZUMI, *A new logistic model for Escherichia coli growth at constant and dynamic temperatures*, Food Microbiology, 21, 2004, 501.
- [11] R. GOSPAVIC, J. KREYENSCHMIDT, S. BRUCKNER, V. POPOV, N. HAQUE, *Mathematical modelling for predicting the growth of Pseudomonas spp. in poultry under variable temperature conditions*, International Journal of Food Microbiology, 127, 2008, 290.
- [12] P. PERIAGO, A. VAN ZUIJLEN, P. FERNANDEZ, P. KLAPOWIJK, P. TER STEEG, M. CORRADINI, M. PELAG, *Estimation of the non-isothermal inactivation patterns of Bacillus sporothermodurans IC4 spores in soups from their isothermal survival data*, International Journal of Food Microbiology, 95, 2004, 205.
- [13] M. COBURN, G. BUNTAIN, B. HARRIS, M. HISKEY, K. LEE, D. OTT, *An improved synthesis of 3,6-diamino-1,2,4,5-tetrazine. II. From triaminoguanidine and 2,4-pentadione*, J. Heterocyclic Chem., 28, 1991, 2049.
- [14] J. THIELE, Liebigs Ann. Chem., 303, 1898, 57.
- [15] M. HISKEY, N. GOLDMAN, J. STINE, *High-nitrogen energetic materials derived from azotetrazolate*, Energ. Mater., 16, 1998, 119.
- [16] J. BARTLING, J. ESPERSCHUTZ, B. WILKE, M. SCHLOTTER, *ETBE (ethyl tert butyl ether) and TAME (tert amyl methyl ether) affect microbial community structure and function in soils*, Journal of Hazardous Materials, 187, 2011, 488.
- [17] R. NANDI, S. SENGUPTA, *Microbial production of hydrogen: an overview*, Crit. Rev. Microbiol., 24, 1, 2008, 61; J. Holt, N. Krieg, P. Sneath, J. Staley, S. Williams, *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. Dissimilatory sulfate — or sulfur-reducing bacteria*, 9<sup>th</sup> Edition, Williams&Wilkins, 1994, 335.
- [18] A. TSOULARIS, *Analysis of logistic growth models*, Res. Lett. Inf. Math. Sci., 2001, 23.
- [19] STATISTICA 6.0, 2001, Statsoft Polska.
- [20] J. LOBRY, J. FLANDROIS, G. CARRET, A. PAVE, *Monod's bacterial growth model revisited*, Bulletin of Mathematical Biology, 54, 1, 1992, 117.
- [21] J. MONOD, *The growth of bacterial cultures*. Ann. Rev. Microbiol., 3, 1949, 371.

- [22] G. McCARTY, J. BREMNER, *Inhibition of nitrification in soil by heterocyclic nitrogen compounds*, Biol Fertil Soils, 8, 1989, 204.
- [23] W. ZERULLA, T. BARTH, J. DRESSEL, K. ERHARDT, K. HORCHLER VON LOCQUWNGHIEN, G. PASDA, M. RADLE, A. WISSEMEIER, *3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) — a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture*, Biol Fertil Soils, 34, 2001, 79.
- [24] Q. YU, Y. CHEN, X. YE, G. TIAN, Z. ZHANG, *Influence of the DMPP (3,4-dimethyl pyrazole phosphate) on nitrogen transformation and leaching in multi-layer soil columns*, Chemosphere, 69, 2007, 825.
- [25] C. MULLER, R. STEVENS, R. LAUGHLIN, F. AZAM, J. OTTOW, *The nitrification inhibitor DMPP had no effect on denitrifying enzyme activity*, Soil Biology & Biochemistry, 34, 2002, 1825.
- [26] S. PANDEY, A. SINGH, A. NIZAMUDDIN, *Antimicrobial studies of some novel quinazolinones fused with [1,2,4]-triazole, [1,2,4]-triazine and [1,2,4,5]-tetrazine rings*, European Journal of Medicinal Chemistry, 44, 2009, 1188.
- [27] S. YAVUZ, O. AYDIN, S. CETE, A. DISLI, Y. YILDIRIR, *Synthesis and antimicrobial activity studies of some novel substituted phenylhydrazono-1H-tetrazol-5-yl-acetonitriles*, Medical Chemistry Research, 19, 2010, 120.
- [28] B. BHUSHAN, A. HALASZ, J. SPAIN, J. HAWARI, *Diaphorase catalyzed biotransformation of RDX via N-denitration mechanism*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 296, 2002, 779.
- [29] B. BHUSHAN, L. PAQUET, J. SPAIN, J. HAWARI, *Biotransformation of 2,4,6,8,10,12-hexanitro-2,4,6,8,10,12-hexaazaisowurtzitane (CL-20) by denitrifying Pseudomonas sp. strain FA1*, Appl. Environ. Microbiol., 69, 2003, 5216.

## M. SZALA, A. BORKOWSKI

### Effect of selected high-energetic azotetrazole salts on microbial activity in soil

**Abstract.** The aim of this study was to determine how the azotetrazole salts affect the growth of soil bacteria *Bacillus halodurans* and microbial activity in soil. Diammonium azotetrazolate (AAZ) guanidinium azotetrazolate (GAZ), triaminoguanidine azotetrazolate (TAGAZ) and triaminoguanidine hydrochloride (TAG-HCl) have been investigated. The stationary cultures of strain *Bacillus halodurans*, which were isolated from a soil, have been applied to estimate biokinetic parameters of the microbial growth in the presence of azotetrazole salts. Additionally, the respirometric system was used to determine the rate of production of CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>S in cultures of soil with these compounds. In order to determine the biokinetic parameters of microbial growth of *Bacillus halodurans* and gas production rates in cultures of soil, mathematical analysis based on the logistic model has been applied. Significant inhibitory activity in relation to growth of *Bacillus halodurans* was found. Analogous results were obtained with respirometric assays, where in the cultures with TAGAZ and TAG-HCl, the production rate of CO<sub>2</sub> was achieved at the level of 937 μg·h<sup>-1</sup> and 1011 μg·h<sup>-1</sup>, respectively, whereas the rate in control cultures was determined at the level of 1563 μg·h<sup>-1</sup>. However, all investigated compounds inhibited completely the production of hydrogen sulphide and modified the rate of hydrogen production in the cultures, significantly reducing them relative to the control system.

**Keywords:** high-nitrogen azotetrazolate salts, microbial activity, respirometric study