

... МІКРОБІОЛОГІЯ ...

УДК: 579. [222.3 : 23 : 24 : 811.21/ .22]

Бактерії родини Chromatiaceae, виділені з озера «Яворівське» Язівського сіркового родовища

Ю.О.Павлова, С.П.Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка (Львів, Україна)

З водойми Яворівського сіркового родовища виділені чисті культури пурпурових сіркових бактерій, які здійснюють аноксигенний фотосинтез. В клітинах бактерій виявлені внутрішні мембрани везикулярного типу. Основні пігменти представлені бактеріохлорофілом *a* та каротиноїдами спірилоксантинової або родопіналевої груп. Як донори електронів в процесі фотосинтезу бактерії використовують сульфід, тіосульфат та сірку. При рості на сульфіді в клітинах нагромаджується сірка. Культури росли при високих концентраціях сірководню (в межах 1–10 мМ), суттєво відрізнялися за оптимумами освітлення, температури, значенням рН, відношенням до кисню, потребою у вітаміні В₁₂ і здатністю утилізувати органічні джерела вуглецю в присутності Н₂S і СО₂. За морфофізіологічними ознаками бактерії віднесені до родів *Thiocystis* та *Chromatium*.

Ключові слова: *пурпурові сіркові бактерії, фотосинтез, сірка, морфофізіологічні дослідження.*

Вступ

Пурпурові сіркові бактерії (родина Chromatiaceae) – облигатні анаероби, що здійснюють аноксигенний фотосинтез з використанням сірководню як донора електронів (Phennig, Trüper, 1992). Більшість описаних видів – облигатні фотолітоавтотрофи. Окремі представники здатні до хемоавтотрофного або хемогетеротрофного росту (Imhoff et al., 1998). Пурпурові сіркобактерії – типові водні організми, що зустрічаються у прісних і сірководневих озерах, морях, океанах. Їх розповсюдження в значній мірі залежить від наявності світла і концентрації сульфідів.

Пурпурові сіркові бактерії представлені багатьма родами (Кондратьєва, 1989; Хоулт и др., 1997; Imhoff et al., 1998; Phennig, Trüper, 1992). В останні роки описані нові види, що віднесені до родів *Halochromatium*, *Thiohalocapsa*, *Thiococcus*, *Rhabdochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Allochromatium*, *Thiorhodovibrio*, *Thermochromatium* (Imhoff et al., 1998; Phennig, Trüper, 1992). Всі вони здатні утилізувати Н₂S і як проміжний продукт його окиснення нагромаджувати всередині клітин сірку. Суспензії культур пурпурових сіркових бактерій забарвлені в червоний колір з різними відтінками, що зумовлено наявністю бактеріохлорофілу *a* або *b* та каротиноїдів спірилоксантинової, окенонової або родопіналевої груп (Кондратьєва, 1989; Хоулт и др., 1997; Phennig, Trüper, 1992).

Метою цієї роботи було дослідити розповсюдження пурпурових сіркових бактерій у водоймі, що утворена на місці Яворівського сірковидобувного кар'єру.

Об'єкти і методи досліджень

Проби води відбирали з різних глибин (5–10 м) центрального зумфу кар'єру озера «Яворівське» Язівського сіркового родовища (Львівська область, Україна), води якого характеризуються високим вмістом сульфатів і сірководню (Баран та ін., 2003). Нагромаджувальні культури пурпурових сіркобактерій отримували за методом Виноградського (Кондратьєва, 1989). Чисті культури – за методом Ван Ніля (Кузнецов, Дубинина, 1959). Чистоту культур перевіряли мікроскопуванням та посівом на МПА, сусло і середовище Кравцова-Сорокіна для сульфатвідновлювальних бактерій (Каравайко и др., 1972).

Ідентифікацію виділених культур проводили на основі морфофізіологічних ознак згідно нових стандартів для опису фототрофних бактерій (International Code of Nomenclature of Bacteria), відповідно до яких для ідентифікації зелених і пурпурових сіркових бактерій послідовності 16S рДНК подавати необов'язково (Imhoff, Caumette, 2004).

Культури вирощували в рідкому або на агаризованому середовищі Ван Ніля (Кузнецов, Дубинина, 1959) в анаеростатах (GENbox jars, bioMerieux, Франція) із застосуванням кисеньпоглинаючих генераторів (GENbox generators, bioMerieux, Франція). Бактерії вирощували протягом 10 діб при температурі 28°C за умов постійного освітлення. Для вивчення здатності бактерій засвоювати органічні речовини до середовища вносили одну із досліджуваних сполук у концентрації 0,5 мМ (Imhoff, Caumette, 2004). Для дослідження здатності бактерій використовувати сполуки сірки як

донори електронів у середовище вносили розчини сульфиду натрію (0,5–40 мМ), елементну сірку (0,1%), тіосульфат (5 мМ) (Imhoff, Caumette, 2004). Оптимальні для росту температуру, значення рН та потребу бактерій у вітаміні В₁₂ визначали у рідкому середовищі Ван Ніля.

Для освітлення культур використовували лампи розжарювання різної потужності. Інтенсивність освітлення вимірювали люксметром Ю116.

Морфологію досліджуваних культур вивчали за допомогою світлової та електронної мікроскопії. Фіксацію і контрастування клітин проводили, як описано (Кіт, Гудзь, 2007; Reynolds, 1963). Зразки розглядали і фотографували у електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 за прискорювальної напруги 75 кВ.

Якісний та кількісний склад пігментів визначали, як описано (Мусієнко та ін., 2001).

Спектри поглинання інтактних клітин і екстрагованих з них пігментів реєстрували на спектрофотометрі Specord M-40. Ідентифікацію пігментів проводили за їх забарвленням, величинами R_f та максимумами поглинання при відповідних довжинах хвиль (Britton, 1985; Bryantseva et al., 2000; Oelze, 1985; Phennig, Trüper, 1992).

Результати та обговорення

Внаслідок припинення на початку 90-их рр. розробки Прикарпатських родовищ сірки утворилися величезні кар'єри (Яворівський кар'єр – найбільший у світі). В них були повернуті води річок, які тепер збагачені органічними речовинами і сульфатами, що постійно утворюються в результаті окиснення сірки. Це створило сприятливі умови для розвитку сульфатвідновлювальних бактерій, продуктом життєдіяльності яких є сірководень – токсична сполука, нагромадження якої створює серйозну небезпеку для навколишнього середовища і в першу чергу для водних екосистем. Лише невелика група прокаріот здатна нейтралізувати сірководень, оскільки використовує його як донор електронів в процесі фотосинтезу. Серед них чільне місце займають пурпурові фотосинтезуючі бактерії, які разом із зеленими сіркобактеріями і сульфатвідновлювальними утворюють у природних умовах мікроекосистеми (Guegheg et al., 2002), що регулюють вміст сірководню у водоймах. Таким чином, розвиток пурпурових сіркових бактерій може служити показником активності бактерій циклу сірки та інших живих організмів у водоймі (Кондратьєва, 1989).

Мікробіологічний аналіз проб води, відібраних із водойми Яворівського сіркового родовища, проведений за методом Виноградського, дозволив виявити активний ріст пурпурових сіркових бактерій у нагромаджувальних культурах за наявності світла. У нижній частині пробірки на гіпсовому шарі через 7 днів культивування з'являється зона росту бактерій, забарвлена в червоний колір. Бактерії утворювали також рожеві зони в товщі або на стінках пробірок, іноді зафарбовували все середовище у червоний колір. Під пурпуровою зоною виростали зелені сіркові бактерії, а під ними чорний шар сульфатвідновлювальних бактерій – продуцентів сірководню (рис. 1). Із пурпурово-червоної зони відбирали зразки і висівали на агаризоване середовище Ван Ніля. Після багаторазових пересівів відділяли окремі колонії, що були забарвлені в червоний колір. Колонії, які виростили в анаеростатах при постійному освітленні, розсівали на чашки 5 разів і окремі з них перевіряли на однорідність шляхом мікроскопування і повторним пересівом на селективне середовище.

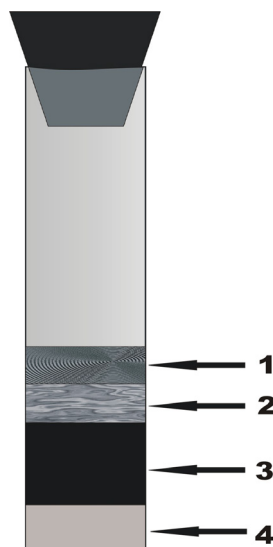


Рис. 1. Схематичне зображення колонки Виноградського з пурпуровими (1), зеленими (2) і сульфатвідновлювальними бактеріями (3). 4 – гіпс

Всі виділені культури не росли за відсутності світла, що свідчить про їх здатність до фотосинтезу. В клітинах трьох культур за допомогою електронного мікроскопа виявлені фотосинтетичні мембрани везикулярного типу (рис. 2, А, Б, В).

У двох культур виявлені мембрани ламелярного типу, що не характерні для пурпурових сіркових бактерій (Phennig, Trüper, 1992), у третьої тип внутрішніх цитоплазматичних мембран було важко встановити (рис. 2, Г, Д, Е). У подальших дослідженнях основну увагу ми зосередили на бактеріях, які характеризуються везикулярним типом цитоплазматичних мембран і здатністю нагромаджувати в клітинах сірку. Культури суттєво відрізнялися за формою і розміром клітин та типом їх розміщення, забарвленням колоній і суспензій, тощо. Клітини культури №1 (рис. 2, А) мають сферичну або овальну форму, діаметром 2–2,5 мкм, поодинокі або розташовані попарно, можуть утворювати агрегати неправильної форми, рухомі (табл. 1). У клітин культури виявлений специфічний «однобічний» поділ, що нагадує поділ у стафілококів (Touhami et al., 2004) (рис. 2, А, рис. 3). В клітинах розміщені великі гранули сірки, інколи вони займають весь об'єм клітини (рис. 3). Забарвлення колоній – коричнево-червоне.

Колонії культури №2 мають пурпурово-червоний відтінок. Клітини паличкоподібні, з гранулами сірки всередині (рис. 2, Б), поодинокі, без газових вакуоль, рухомі. Діаметр клітин 0,6–0,1 мкм, довжина – 2,0–2,5 мкм.

Культура №3 (рис. 2, В) представлена характерними для представників роду *Chromatium* паличкоподібними поодинокими клітинами, діаметром 0,7–0,9 мкм і довжиною 1,6–1,8 мкм. Суспензія клітин забарвлена у червоний колір (табл. 1).

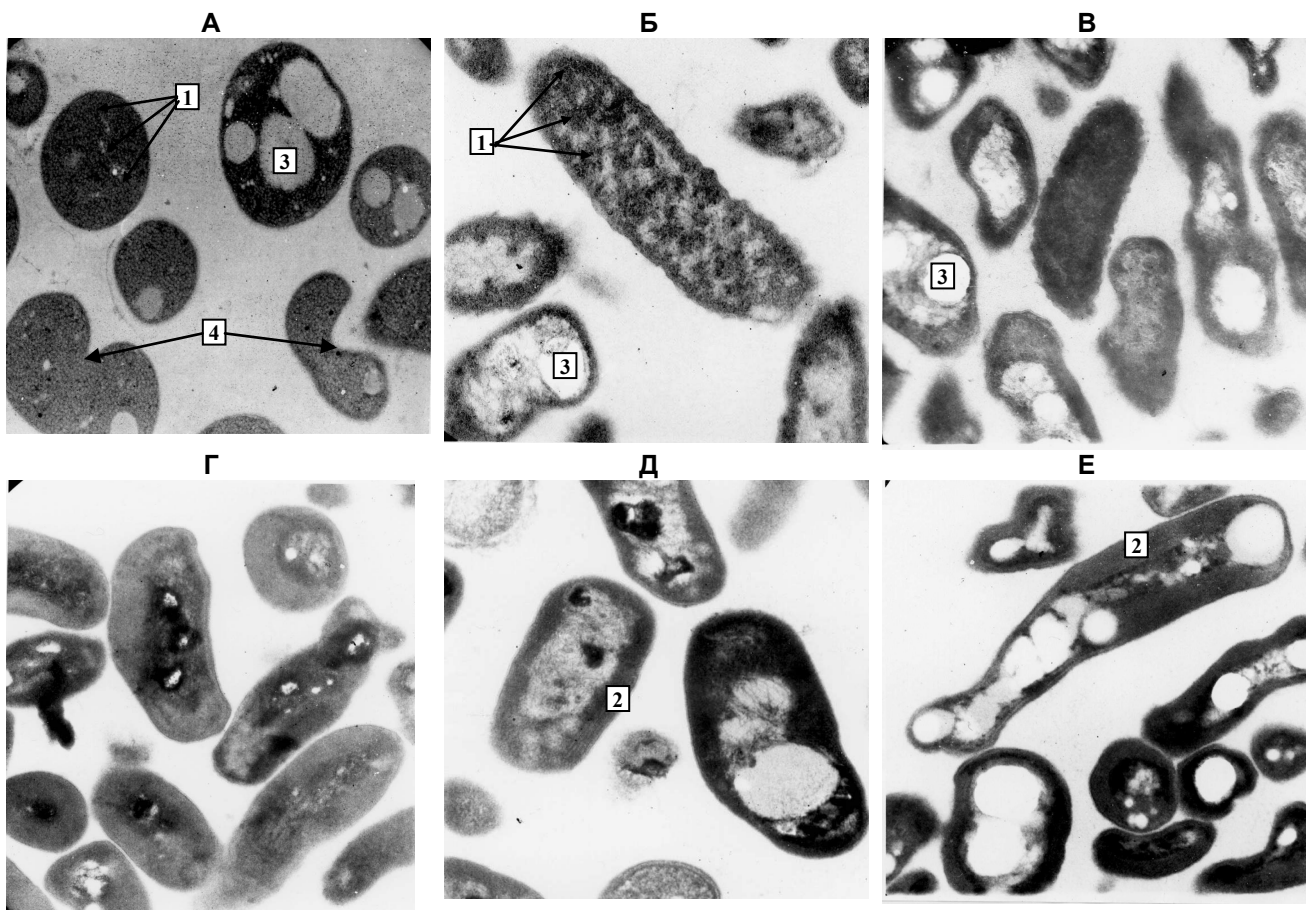


Рис. 2. Електронно-мікроскопічні фотографії клітин пурпурових сіркових і несіркових бактерій

1 – внутрішньоцитоплазматичні мембрани везикулярного типу, 2 – ламелярного типу, 3 – гранули сірки, 4 – «однобічний» специфічний поділ. ($\times 7500$ (А) – $16\,500$ (Б, В, Г, Д))

Інтактні клітини фототрофно вирощених культур мало відрізнялися за спектральними характеристиками. Основні абсорбційні максимуми поглинання клітин припадали на 488–518 нм, 800–810 нм, що свідчило про наявність в клітинах досліджуваних культур бактеріохлорофілу а та каротиноїдів спірилоксантинової групи (рис. 4) (Oelze, 1985; Phennig, Trüper, 1992). Хроматографічна і

спектрофотометрична характеристика пігментів виділених культур підтвердила присутність в клітинах бактеріохлорофілу *a* та каротиноїдів – лікопену, спірілоксантину, родопіну, родовібрину і родопіналю. Останній є різновидом спірілоксантинних пігментів (Хоулт и др., 1997). За кількістю каротиноїдів і бактеріохлорофілу *a* досліджувані культури суттєво відрізнялися між собою (табл. 1).

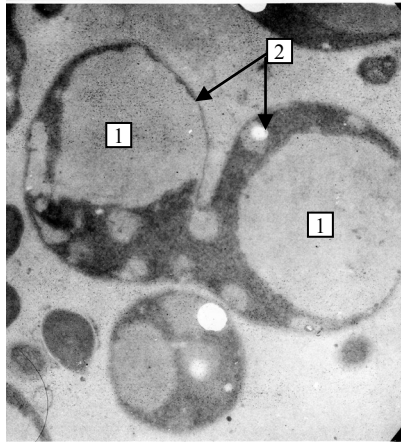


Рис. 3. Клітини культури №1 з гранулами сірки (1). 2 – дві дочірні клітини, що утворилися внаслідок «однобічного» специфічного поділу. ($\times 9000$)

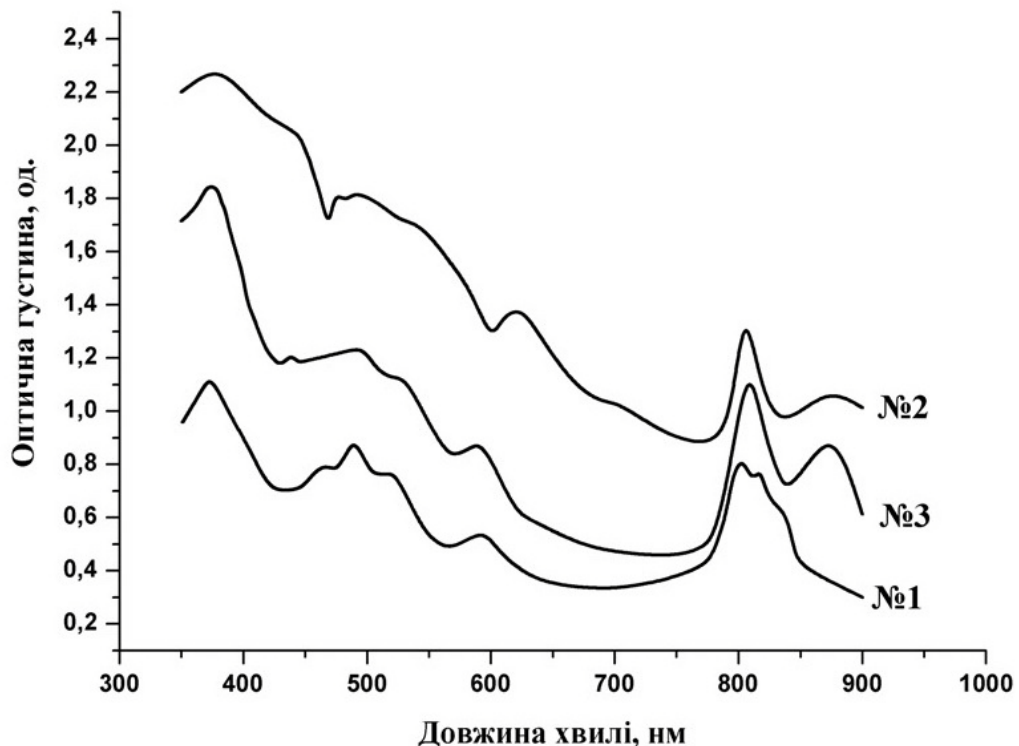


Рис. 4. Абсорбційні спектри інтактних клітин культур пурпурових сіркобактерій

Важливе значення при культивуванні пурпурових сіркових бактерій має концентрація донора електронів в середовищі (сульфіду, тіосульфату, сірки), а також світловий режим і температура. Ріст багатьох представників родини Chromatiaceae пригнічується високими концентраціями сірководню, а підвищена температура (30–35°C) сприяє росту видів, що представлені клітинами невеликих розмірів (Phennig, Trüper, 1992). За цими ознаками виділені культури суттєво відрізнялися між собою. Так, культура №1 росте при високих концентраціях сульфідів (5–10 мМ), тоді як оптимальний ріст культури №2 спостерігали при концентрації сірководню 1–2 мМ (табл. 1). Культура №3 добре росла при підвищеній концентрації сульфідів, але, на відміну від перших двох, нагромадження біомаси спостерігали в широкому діапазоні температур і освітленості. Для виділених бактерій оптимальними є рН 7–8, концентрація хлориду натрію 0,5–1 %. Потребу у вітаміні В₁₂ проявляла лише культура №3.

Таким чином, культури виділених фотосинтезувальних пурпурових сіркових бактерій суттєво відрізнялися за рядом морфологічних ознак, а саме: формою та розміром клітин, забарвленням суспензії, оптимумами температури, сульфїду, освітлення (табл. 1).

Родина Chromatiaceae об'єднує аноксигенні фототрофні бактерії, які можуть рости фотолітоавтотрофно та використовувати сульфід чи сірку як донори електронів (Phennig, Trüper, 1992). Деякі види є облігатними анаеробами і фототрофами, можуть асимілювати за наявності сульфїду і вуглекислоти невелику кількість органічних сполук (Кондратьєва, 1989; Imhoff et al., 1998; Phennig, Trüper, 1992), а також рости хемоавтотрофно чи хемогетеротрофно (Imhoff et al., 1998). Виділені нами культури використовують як донори електронів сульфід, тіосульфат та сірку і проявляють різну чутливість до кисню (табл. 1). Ріст в присутності органічних сполук перевіряли згідно стандарту (Imhoff, Saumette, 2004). Виявилось, що за здатністю асимілювати органічні речовини культури суттєво відрізнялися між собою (табл. 2). Зростання біомаси порівняно з контролем у культури №1 спостерігали у присутності багатьох органічних сполук, в той час як ріст культури №2 стимулювали лише ацетат і піруват. За здатністю використовувати органічні сполуки культура №3 займала проміжне становище.

Таблиця 1.

Морфологічні властивості культур пурпурових сіркобактерій, виділених з водойми Яворівського сіркового родовища

Ознака	Культура		
	№1	№2	№3
Морфологія клітин	сферичні, овальні, інколи розташовані попарно, утворюють агрегати неправильної форми	паличкоподібні, поодинокі	паличкоподібні, поодинокі
Розмір клітин, мкм	2–2,5	2,0–2,5 × 0,8–1,0	1,6–1,8 × 0,7–0,9
Рухливість	+ / -	+	+
Наявність капсул газових вакуоль	+ -	- -	- -
Внутрішні цитоплазматичні структури	везикулярні	везикулярні	везикулярні
Утворення сірки всередині клітини	+	+	+
Забарвлення суспензії клітин	коричнево-червоне	пурпурове	червоне
Основні пігменти	бактеріохлорофіл а, лікопен, родопін, спірилоксантин, родопіналь	бактеріохлорофіл а, лікопен, родовібрин, спірилоксантин, сфероіденон	бактеріохлорофіл а, лікопен, родовібрин, спірилоксантин
Загальна кількість пігментів, мг/г сухої ваги			
бактеріохлорофіли	0,3±0,04	1,2±0,02	1,0±0,04
каротиноїди	0,6±0,05	1,5±0,02	2,2±0,02
Оптимальне значення температури, °С	30–35	33–38	18–35
pH	7–8	6,5–8	6,5–8
освітленості, лк	200–900	100–1500	450–1000
концентрації сульфїду, мМ	5–10	1–2	5–7
NaCl, %	0,5–1	0,5–1	0–1
Потреба у В ₁₂	-	-	+
Донор електронів			
сульфід	+	+	+
тіосульфат	+	+	+
сірка	+	+	+
Відношення до кисню	облігатний анаероб	мікроаерофіл	мікроаерофіл

Таблиця 2.
Фотоасиміляція органічних сполук виділеними пурпуровими сірковими бактеріями за наявності NaHCO_3 і Na_2S в середовищі

Органічна сполука	№ культури		
	1	2	3
Контроль	+	+	+
Фруктоза	+	-	+
Глюкоза	+	-	-
Ксилоза	+	-	+
Рафіноза	+	-	+/-
Галактоза	+	-	+
Мальтоза	+	-	+
Сахароза	+	-	+/-
Ацетат	+	+	+
Піруват	+	+	+
Лактат	+	-	+
Фумарат	-	-	-
Сукцинат	+	-	-
Цитрат	-	-	-
Тартрат	-	-	-
Аскорбат	+	-	-
Пальмітат	-	-	-
Метанол	-	-	-
Етанол	+/-	-	-
Маніт	+	+/-	+/-
Гліцерин	+	-	+/-
Сорбіт	+	-	+
Дульцит	+	-	+
Інозит	+	-	+

Отже, виділені культури здатні рости тільки за наявності світла, що вказує на їх фототрофний тип живлення. Використання сульфиду і сірки як єдиних донорів електронів для асиміляції CO_2 , паличкоподібна форма, рухливість, відсутність газових вакуоль та нездатність утворювати агрегати з клітин у формі пластинок дають підстави віднести культури №2 і №3 до роду *Chromatium*. Сферична форма клітин, здатність залишатися у формі диплококів після ділення і утворювати агрегати неправильної форми дозволяють виокремити культуру №1 в рід *Thiocystis*.

На основі морфологічних характеристик та їх порівняння з літературними даними (Хоулт і др., 1997; Phennig, Tüper, 1992) виділені і описані нами фототрофні бактерії слід віднести до: культуру №1 – *Thiocystis* sp. Ya2006¹, №2 – *Chromatium* sp. Ya2006-1, №3 – *Chromatium* sp. Ya2006-2.

Список літератури

- Баран І., Подопрігора О., Гришук Г. та ін. Екологічний моніторинг водойм Яворівського сіркового родовища; мікробіологічний контроль // Довкілля та здоров'я. – 2003. – №4. – С. 55–58.
- Каравайко Г.И., Кузнецов С.И. Голомзик А.И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. – М.: Наука, 1972. – 248с.
- Кіт Л.Я., Гудзь С.П. Пурпурові сіркобактерії з водойм Яворівського родовища сірки // Мікробіологічний журнал. – 2007. – Т.69, №1. – С. 12–19.
- Кондратьева Е.Н. Фотосинтезирующие микроорганизмы. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1989. – 374с.
- Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. – М.: Наука, 1959. – 123с.
- Мусієнко М.М. Паршикова Т.В., Славний П.С. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 200с.
- Хоулт Дж., Криг Н., Снит П. и др. Определитель бактерий Берджи / Пер. с англ. – М.: Мир, 1997. – Т.2. – С. 353–368.
- Britton G. General carotenoid methods // Meth. Enzymol. – Acad. press, 1985. – Vol.3, pt B. – P. 113–145.

¹ Ya - Yavoriv.

- Bryantseva I.A., Gorlenko V.M., Kompantseva E.I., Imhoff J.F. *Thioalkalicoccus limnaeus* gen. nov., sp. nov., a new alkaliphilic purple sulfur bacterium with bacteriochlorophyll *b* // Int. J. Syst. Bacteriol. – 2000. – Vol.50. – P. 2157–2163.
- Guerrero R., Piqueras M., Berlanga M. Microbial mats and the search for minimal ecosystems // Int. Microbiol. – 2002. – Vol.5. – P. 177–188.
- Imhoff J., Caumette P. Recommended standards for description of new species of anoxygenic phototrophic bacteria // Int. J. Syst. Bacteriol. – 2004. – Vol.54. – P. 1415–1421.
- Imhoff J., Süling J., Petri R. Phylogenetic relationship among the *Chromatiaceae*, their taxonomic reclassification and description of the new genera *Allochomatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thiococcus*, *Thiohalocapsa* and *Themochromatium* // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1998. – Vol.48. – P. 1129–1143.
- Oelze J.M. Analysis of bacteriochlorophylls // Meth. microbiol. – 1985. – Vol.18. – P. 257–284.
- Phennig N., Trüper H. The family *Chromatiaceae* // The Prokaryotes. A handbook of the biology of bacteria. Ecophysiology, isolation, identification, applications. – 2nd edn. – New York: Springer, 1992. – P. 3200–3221.
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. – 1963. – Vol.17. – P. 208–212.
- Touhami A., Jericho M., Beveridge T. Atomic force microscopy of cell growth and division in *Staphylococcus aureus* // J. Bacteriol. – 2004. – Vol.186, №11. – P. 3286–3295.

**Бактерии семейства Chromatiaceae, выделенные из озера «Яворовское» Язовского
серного рудника
Ю.А.Павлова, С.П.Гудзь**

Из водоема Яворовского серного месторождения выделены чистые культуры пурпурных серобактерий, которые осуществляют анаэробный фотосинтез. В клетках бактерий выявлены внутренние мембраны везикулярного типа. Основные пигменты представлены бактериохлорофиллом *a* и каротиноидами спириллоксантиновой или родопиналевой групп. Как доноры электронов в процессе фотосинтеза бактерии используют сульфид, тиосульфат и серу. При росте на сульфиде в клетках накапливается сера. Культуры росли при высоких концентрациях сероводорода (1–10 мМ) и существенно отличались по оптимумам освещения, температуры, значению pH, отношению к кислороду, потребности в витамине B₁₂ и способности утилизировать органические источники углерода в присутствии H₂S и CO₂. По морфофизиологическим признакам бактерии отнесены к родам *Thiocystis* и *Chromatium*.

Ключевые слова: пурпурные серобактерии, фотосинтез, сера, морфофизиологические исследования.

**Bacteria of family Chromatiaceae from the Lake Yavorivske of Yazivske sulfur mine
Yu.A.Pavlova, S.P.Gudz**

From the waters of Yavoriv sulfur mine pure cultures of purple sulfur bacteria, which were able to anoxygenic photosynthesis, were isolated. In bacteria cells internal membranes of vesicular type were discovered. The main pigments were bacteriochlorophyll *a* and carotenoids of the spirilloxanthin or rhodospinal series. As electron donors in photosynthetic process bacteria used sulfide, thiosulphate and sulfur. During the growth on sulfide bacteria formed internal sulfur globules. Cultures grew under high sulfide concentration (1–10 mM) and differed in optimum of light intensity, temperature, pH, relation to oxygen and vitamin B₁₂, abilities to utilize organic carbon sources in the presence of H₂S and CO₂. After the study of morpho-physiological properties bacteria were ascribed to genera *Thiocystis* and *Chromatium*.

Key words: purple sulfur bacteria, photosynthesis, sulfur, morpho-physiological researches.

Представлено: Д.В.Федоровичем
Рекомендовано до друку: Т.В.Догадіною