

## ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ РОДУ *CHROMATIUM*, ВИДІЛЕНИХ З ВОДОЙМ, ЗБАГАЧЕНИХ СІРКОВОДНЕМ

З водойм Яворівського сіркового родовища виділені чисті культури пурпурових сіркових бактерій, які віднесені до роду *Chromatium*. Обидві культури здійснюють аноксигенний фотосинтез, містять бактеріохлорофіл *a* та каротиноїди спірілоксантинової групи. Виділені бактерії ростуть фотолітоавтотрофно, фотолітогетеротрофно та фотоорганогетеротрофно. Утилізують широкий спектр органічних сполук. Неорганічними донорами електронів використовують сірководень, сірку і тиосульфат. Бактерії стійкі до високих концентрацій сірководню та ефективно його засвоюють у процесі аноксигенного фотосинтезу. Виділені бактерії розглядаються як перспективні для створення біотехнологічних екосистем для очищення забруднених сполуками сірки середовищ.

*Ключові слова:* пурпурові сіркові бактерії, сірководень, бактеріохлорофіл *a*, каротиноїди, фотолітоавтотрофія.

За останнє десятиліття зроблено чимало у дослідженні пурпурових сіркових бактерій [10, 12, 17, 21, 22, 24]. Активний пошук нових видів суттєво змінив уявлення не тільки про систематичне положення цих бактерій, але й про фізіологічні особливості родини *Chromatiaceae* [17, 20]. Більшість робіт присвячена вивченню пурпурових сіркобактерій, які виділені з водойм чи ґрунту, незабруднених сірководнем [10, 12, 21, 22, 24].

Пурпурові сіркові бактерії використовують  $H_2S$  як донор електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу. Ця властивість бактерій може бути використана для створення біотехнологічних екосистем і їх використання для біоремедіації забруднених сполуками сірки середовищ, що виникають внаслідок промислової розробки сіркових родовищ. Особливо актуальна ця проблема на Прикарпатті, де внаслідок відкритого видобування сірки у водоймах різко підвищилась концентрація сульфатів [2]. Це активувало життєдіяльність сульфатвідновлювальних бактерій, продуктом метаболізму яких є сірководень. Підвищена концентрація останнього робить середовище малопридатним для існування живих організмів. Виходячи з цього, пошуки нових видів пурпурових сіркобактерій, здатних ефективно детоксикувати  $H_2S$ , представляються перспективними.

**Матеріали і методи.** Проби води відбирали з різних глибин центрального зумфу кар'єру Яворівського сіркового родовища. Нагромаджувальні культури пурпурових сіркобактерій отримували за методом Виноградського [4]. Для створення селективних умов для розвитку невеликих або великих за розміром форм *Chromatiaceae* культури вирощували за умов різної освітленості (50–300 лк або 500–1000 лк) та температури (20–25°C або 30–35°C). Чисті культури пурпурових сіркобактерій отримували за методом Ван Ніля [5]. Чистоту культур перевіряли мікроскопуванням та посівом на МПА, сусло і середовище для сульфатвідновлювальних бактерій.

Бактерії фарбували за стандартною методикою [1].

Культури вирощували на рідкому або на агаризованому середовищі Ван Ніля такого складу (г/л):  $NH_4Cl$  – 1;  $KH_2PO_4$  – 1;  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  – 0,5;  $NaCl$  – 5;  $NaHCO_3$  – 5;  $Na_2S \cdot 9H_2O$  – 1, агар (для твердого середовища) – 15.  $NaHCO_3$  і  $Na_2S \cdot 9H_2O$  – готували окремо у вигляді 10 %-их розчинів, які вносили у середовище після стерилізації. На твердому середовищі бактерії культивували в анаеростатах (GENbox jars, bioMerieux, Франція) із застосуванням генераторів (GENbox generators, bioMerieux, Франція). Тривалість культивування 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 ммоль або 0,05 % (для дріжджового екстракту і пептону) [16]. Вивчали здатність бактерій використовувати фруктозу, глюкозу, ксилозу, рафінозу, галактозу, мальтозу, сахарозу, ацетат, піруват, лактат, фумарат, сукцинат, ци-

трат, винну кислоту, аскорбат, пальмітат, метанол, етанол, маніт, гліцерол, сорбіт, дульцит, інозит [16]. Для дослідження здатності бактерій використовувати сполуки сірки як донори електронів у середовище вносили розчини сульфідів натрію (0,5–40 ммоль), елементарну сірку (0,1 %), тіосульфат (5 ммоль), сульфід натрію (5 ммоль) [16]. Різні сполуки азоту додавали до основного середовища замість хлориду амонію у еквівалентних по азоту кількостях. Оптимальну для росту температуру, значення рН та потребу бактерій у вітаміні В<sub>12</sub> визначали у рідкому середовищі Ван Ніля.

Біомасу клітин після їх вирощування у рідкому середовищі визначали турбідиметрично з використанням КФК-3. Для фотоелектроколориметричного визначення біомаси клітин будували калібрувальну криву залежності екстинції від сухої маси.

Як джерела освітлення використовували лампи розжарювання різної потужності. Різну інтенсивність світла створювали зміною відстані між джерелом світла і об'єктом. Інтенсивність освітлення вимірювали люксметром Ю116.

Морфологію досліджуваних культур і здатність нагромаджувати в клітинах сірку вивчали за допомогою електронної мікроскопії. Для цього бактерії, вирощені до середини логарифмічної фази росту, двічі відмивали дистильованою водою і осаджували центрифугуванням при 8 000 об./хв протягом 20 хв. Клітини фіксували в 1,5 %-му розчині OsO<sub>4</sub> у какодилатному буфері протягом 90 хв при температурі 0°C. Після цього клітини промивали, зневоднювали в розчинах із зростаючими концентраціями етанолу і оксиду пропілену. Зразки переносили в епоксидну смолу Епон 812. Ультратонкі зрізи отримували на мікромомі УМТП-6 і контрастували цитратом свинцю за E. Reynolds [23]. Зразки переглядали і фотографували на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 за прискорювальної напруги 75 кВ.

Для дослідження якісного складу пігментів клітини бактерій відділяли від культуральної рідини центрифугуванням протягом 20 хв при 8 000 об./хв. Супернатант зливали, клітини двічі відмивали 0,9 % NaCl. Відмиті клітини висушували на склі і руйнували розтиранням із кварцевим піском [8]. Пігменти екстрагували сумішшю етанолу та ацетону в об'ємному співвідношенні 1 : 1 до повного знебарвлення органічного розчинника [6].

Хроматографічне розділення пігментів здійснювали на силуфольних пластинках («Sorbfil», Росія) у висхідному потоці системи розчинників бензин: ацетон: петролейний ефір: гексан (10 : 10 : 3 : 10) [6].

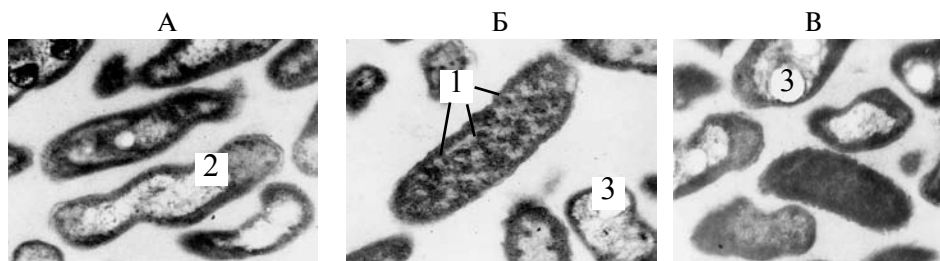
Каротиноїди елюювали із силікагелю ацетоном або петролейним ефіром, бактеріохлорофіли – етанолом. Ідентифікацію пігментів проводили за забарвленням, величинами R<sub>f</sub> та основними максимумами поглинання при певних довжинах хвиль [11, 12, 19].

Спектри інтактних клітин і основні максимума поглинання екстрагованих пігментів реєстрували на спектрофотометрі Specord M-40.

Кінетику окиснення сірководню досліджували спектрофотометрично [3].

Статистичне опрацювання результатів виконували за допомогою програм Excel та Origin.

**Результати та їх обговорення.** Розвиток пурпурових сіркових бактерій у нагромаджувальних культурах спостерігали у вигляді червоного осаду на поверхні чи в товщі мулу або на стінках пробірок. Паралельно з пурпуровими сірковими бактеріями у нагромаджувальних культурах розвивалися зелені сіркобактерії. З пурпурового шару нагромаджувальних культур за допомогою методу Ван Ніля [5] отримували чисті культури пурпурових сіркобактерій, які були різні за кольором (червоний, рожевий, пурпуровий, коричневий тощо) та формою колоній. Одержані культури відрізнялися за формою (пабочкоподібні, овальні, віброїдні), розміром (рис. 1) і рухливістю клітин. Середовище культивування, що містило CO<sub>2</sub> як джерело вуглецю та сульфід натрію як донор електронів, повинно забезпечувати селективні умови для розвитку власне фотосинтезуючих сіркобактерій [20]. Проте відомо, що деякі види пурпурових несіркових бактерій (*Rhodobacter sulfidophilus*) можуть рости у середовищі з сульфідом [20]. Результати електронної мікроскопії виявили добре виражені внутрішньоцитоплазматичні мембранні системи везикулярного типу, які характерні для пурпурових сіркових бактерій, лише у двох з одержаних культур (рис. 1, Б, В). На ультратонких зрізах клітин інших культур виявлено ламелярні мембранні системи (рис. 1, А). У решти виділених бактерій було важко визначити тип фотосинтетичних мембран, що, очевидно, пов'язано з їхньою деградацією під час повільної процедури фіксації препаратів [15].

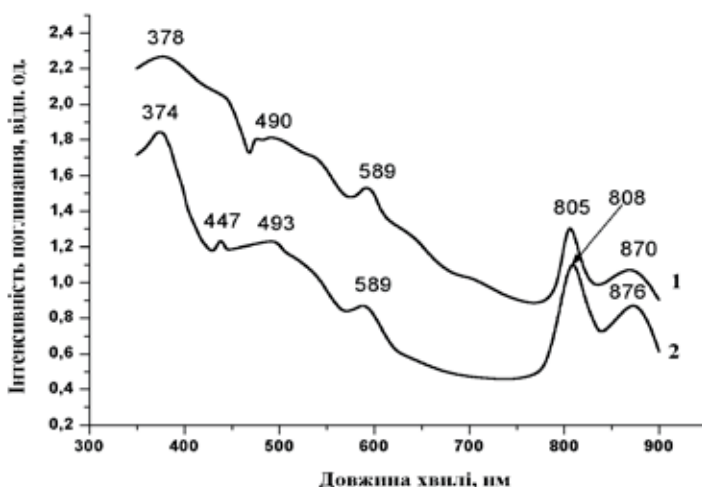


**Рис. 1.** Електронно-мікроскопічні фотографії клітин пурпурових сіркових і несіркових бактерій: 1 – внутрішньоцитоплазматичні мембрани везикулярного типу; 2 – ламелярного типу; 3 – гранули сірки; А – ?; Б – *Chromatium* sp. 1; В – *Chromatium* sp. 2.

Надалі у дослідженнях використовували культури, в клітинах яких було виявлено мембранні системи везикулярного типу (рис. 1, Б, Д). За морфо-фізіологічними ознаками виділені культури було ідентифіковано як представники роду *Chromatium* (*Chromatium* sp. 1, *Chromatium* sp. 2) [4, 9, 20], їх характеристики описано нижче.

Клітини культур грамнегативні, паличкоподібні, поодинокі, рухомі, без газових вакуоль. За присутності сульфідів та світла в процесі культивування у клітинах з'являються глобули сірки, розміщені рівномірно по всій клітині.

Вирощені фотолітотрофно культури мали червоне (*Chromatium* sp. 1) та пурпурове забарвлення (*Chromatium* sp. 2). Виділені культури містили бактеріохлорофіл *a*, про що свідчили абсорбційні максимуми інтактних клітин, які припадали на 374–378, 589, 805–808, 870–876 нм [21, 22, 25]. Абсорбційні спектри клітин бактерій виміряні в зоні 350–600 нм свідчили про наявність у них каротиноїдів спірилоксантинової групи: спірилоксантину (493, 514 нм), похідних лікопену (447 нм) (рис. 2) [12, 20, 21, 25].



**Рис. 2.** Абсорбційні спектри клітин бактерій *Chromatium* sp. 1 (1) та *Chromatium* sp. 2 (2)

При хроматографічному розділенні пігментів виявлено 6 зон, які відрізнялися за забарвленням і величиною Rf (рис. 3). Екстраговані ацетоном і петролейним ефіром зразки з хроматограм мали різні максимуми поглинання. Властивості пігментів культури *Chromatium* sp. 1 та *Chromatium* sp. 2 наведено в таблиці 1. Серед пігментів обох культур переважав бактеріохлорофіл *a*, що характеризувався темно-зеленим забарвленням, величиною Rf 0,17 та характерним максимумом поглинання при 770 нм (табл. 1). Інші пігменти на хроматограмі мали рожеве, пурпурове або жовте забарвлення і максимуми поглинання в області 400–520 нм. Переважали смуги, що мали рожеве, пурпурове та жовте забарвлення. Клітини досліджуваних культур містили два каротиноїди жовтого кольору, які за спектральними характеристиками суттєво відрізнялися від описаних у літературі [4, 7, 11].

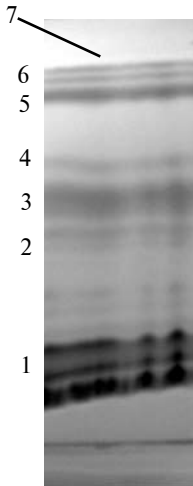


Рис. 3. Хроматограма пігментів екстрагованих з культур *Chromatium* sp. 1: 1 – бактеріохлорофіл а; 2, 3, 4, 5, 6, 7 – каротиноїди.

Порівняння результатів аналізу тонкошарової хроматографії та спектрів поглинання клітин із даними літератури дозволило ідентифікувати основні пігменти *Chromatium* sp. 1 і *Chromatium* sp. 2 як бактеріохлорофіл а, спірілоксантин, пролікопен, родовібрин, сфероіденон [11, 14, 19].

Пурпурові сіркові бактерії поділяють на дві основні фізіологічні групи [13, 17]. До першої належать так звані вузькоспеціалізовані види бактерій. Вони строги анаероби і облігатні фототрофи, як донор електронів у процесі фотосинтезу використовують тільки сірководень. Ці бактерії не засвоюють сульфат, нездатні до хемотрофії. За наявності  $\text{CO}_2$  і сульфіді фотоасимілюються лише ацетат, піруват, пропіонат. Серед таких видів *Chromatium okenii*, *C. weissii*, *C. warmingii*, *C. buderi*, *Thiospirillum jenense*, *Thiocapsa pfennigii* [17, 20]. На відміну від вузькоспеціалізованих видів першої групи, *Thiocystis violaceae*, *Thiocapsa roseopersicina* та види роду *Chromatium* використовують різноманітні органічні субстрати під час фототрофного або хемотрофного росту, асимілюють сульфати, використовують як донор електронів не лише сірководень, але й тиосульфат, сульфід, елементарну сірку [17, 20].

У наступних експериментах досліджено здатність виділених культур засвоювати різні органічні сполуки в процесі росту. За наявності у середовищі сульфіді (як донора електронів) і бікарбонату бактерії нагромаджують біомасу до 0,8 г/л (*Chromatium* sp. 1) та 1,0 г/л (*Chromatium* sp. 2). Додавання за цих умов фруктози, галактози, ксилози, рафінози, мальтози, сахарози, ацетату, пірувату, лактату, маніту, гліцеролу, сорбіту, дульциту, інозиту супроводжувалося збільшенням біомаси для *Chromatium* sp. 2 в 1,3–2,7 рази (табл. 2). Ацетат, піруват, фруктоза, глюкоза, сахароза, мальтоза, етанол, маніт стимулювали ріст *Chromatium* sp. 1. Ріст культур на ацетаті, піруваті, інозиті спостерігали лише за наявності сульфіді і бікарбонату.

Серед представників родини *Chromatiaceae* існують види, які можуть використовувати органічні сполуки як джерела вуглецю і як донори електронів (*C. vinosum*, *C. violascens*, *C. gracillis*, *C. purpuratum*, *Tc. violaceae*) [4]. До таких бактерій, очевидно, належать і досліджувані мікроорганізми. Обидві культури виявляють здатність до фотолітогетеротрофії та фотоорганотрофії під час росту на різноманітних органічних сполуках (табл. 2). Одні органічні речовини виступають донорами електронів (фруктоза – *Chromatium* sp. 1, *Chromatium* sp. 2) або джерелами вуглецю (сорбіт – *Chromatium* sp. 1, сахароза – *Chromatium* sp. 2), інші використовуються і як донори електронів, і як джерела вуглецевого живлення (глюкоза, лактат – *Chromatium* sp. 1, *Chromatium* sp. 2). Отже, здатність використовувати органічні речовини (в тому числі фруктозу і гліцерол) як донори електронів за відсутності сульфіді дозволяє зачислити виділені культури до неспеціалізованих видів пурпурових сіркових бактерій [13, 17, 20].

Властивості основних пігментів пурпурових сіркових бактерій

№ фракції	Забарвлення на хроматограмі		Rf		Основні максимуми поглинання, нм		Ідентифікований пігмент	Максимуми поглинання пігментів у органічних розчинниках, нм
	<i>Chromatium</i> sp. 1	<i>Chromatium</i> sp. 2	<i>Chromatium</i> sp. 1	<i>Chromatium</i> sp. 2	<i>Chromatium</i> sp. 1	<i>Chromatium</i> sp. 2		
1	темно-зелене	темно-зелене	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,01	400,5, 776	400,5, 776	бактеріохлорофіл <i>a</i>	770 [4, 12]
2	рожеве	рожеве	0,47 ± 0,02	0,47 ± 0,01	519	357, 519	спірилоксантин	445,5, 486, 518 [7]
3	яскраво-жовте	яскраво-жовте	0,56 ± 0,02	0,57 ± 0,01	413	413	пролікопен	414, 436, 463 [11]
4	фіолетове	-	0,67 ± 0,02	-	460, 514	-	сфероіденон	460, 483, 515 [11]
5	яскраво-червоне	оранжеве	0,87 ± 0,01	0,87 ± 0,02	483, 514	480, 514	родовібрин	455, 483, 516 [11]
6	жовте	жовте	0,92 ± 0,01	0,93 ± 0,01	413, 514	413, 514	невідомий каротиноїд	-
7	жовте	жовте	0,96 ± 0,01	0,96 ± 0,01	350, 432, 514	514	невідомий каротиноїд	-

Виділені бактерії добре ростуть у фототрофних умовах. Ріст бактерій у темноті відсутній. За умов низької освітленості (40–300 лк) на середовищі з ацетатом *Chromatium* sp. 1 спостерігається незначне нагромадження біомаси (рис. 4). Показано, що ацетат засвоюється лише за присутності сульфідів і бікарбонату в середовищі (табл. 2), очевидно він асимілюється як додаткове джерело вуглецю під час фотолітоавтотрофного росту. Освітленість 500–1000 лк сприяє збільшенню біомаси в два рази, порівняно із нагромадженням біомаси при інтенсивності освітлення 40 лк (рис. 4). Освітленість більше 1000 лк пригнічує ріст культури. *Chromatium* sp. 2 краще пристосовані як до умов недостатнього, так і надмірного освітлення. Хороший ріст культури спостерігали в межах 100–1500 лк.

Таблиця 2

Ріст *Chromatium* sp. 1 та *Chromatium* sp. 2 на середовищі Ван Ніля з додаванням органічних сполук за наявності  $\text{NaHCO}_3$  і  $\text{Na}_2\text{S}$

Органічна сполука	Біомаса, г/л					
	<i>Chromatium</i> sp. 1			<i>Chromatium</i> sp. 2		
	ріст у присутності сульфідів і бікарбонату	Ріст без $\text{Na}_2\text{S}$	Ріст без $\text{NaHCO}_3$	ріст у присутності сульфідів і бікарбонату	Ріст без $\text{Na}_2\text{S}$	Ріст без $\text{NaHCO}_3$
1	2	3	4	5	6	7
контроль	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
фруктоза	1,1 ± 0,1	5,3 ± 0,3	0,4 ± 0,1	1,8 ± 0,2	2,6 ± 0,2	0,3 ± 0,1
глюкоза	1,1 ± 0,1	6,1 ± 0,2	2,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1	3,4 ± 0,2	3,4 ± 0,2
ксилоза	0,6 ± 0,2	3,0 ± 0,3	3,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,7 ± 0,3	3,7 ± 0,3
рафіноза	0,8 ± 0,1	4,8 ± 0,1	3,9 ± 0,1	1,6 ± 0,2	2,8 ± 0,2	0,3 ± 0,2
галактоза	1,0 ± 0,1	6,5 ± 0,2	2,9 ± 0,3	1,9 ± 0,1	2,2 ± 0,2	2,9 ± 0,3
мальтоза	0,9 ± 0,1	6,8 ± 0,4	3,8 ± 0,2	2,4 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,3
сахароза	1,1 ± 0,1	5,0 ± 0,2	0,4 ± 0,2	1,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1	2,0 ± 0,1
ацетат	1,3 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,3
піруват	1,2 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2	1,3 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1
лактат	1,0 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,7 ± 0,1	2,4 ± 0,2	3,8 ± 0,3	1,6 ± 0,1
фумарат	0,5 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0,4 ± 0,1
сукцинат	0,6 ± 0,2	3,6 ± 0,3	1,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,3 ± 0,2	2,7 ± 0,2
цитрат	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,7 ± 0,2	0,6 ± 0,1	3,0 ± 0,3	2,6 ± 0,2
винна кислота	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1
аскорбат	0,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,0 ± 0,3	0,9 ± 0,1	3,0 ± 0,2	3,7 ± 0,2
пальмітат	0,7 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1
метанол	0,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1
етанол	0,9 ± 0,1	4,3 ± 0,3	1,7 ± 0,2	1,1 ± 0,2	3,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1
маніт	1,1 ± 0,1	3,9 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,2	3,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1
гліцерол	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,6 ± 0,3	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,8 ± 0,2
сорбіт	0,7 ± 0,1	0,3 ± 0,1	2,0 ± 0,2	1,8 ± 0,3	3,8 ± 0,2	2,7 ± 0,3
дульцит	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,1 ± 0,1
інозит	0,6 ± 0,2	2,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1	2,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,1
пептон	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,1
дріжджовий екстракт	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1

Відомо, що багато представників пурпурових сіркових бактерій здатні до діазотрофії [4, 10, 22]. Можливо досліджувані культури фіксують азот, оскільки вони зберігають здатність нагромаджувати біомасу після багаторазового пересіву культур на безазотисті середовища. Виділені нами бактерії, подібно до інших видів родини *Chromatiaceae*, як джерела азоту використовують солі амонію, нітрати і пептон [4]. Для деяких пурпурових

сіркових бактерій джерелами азоту можуть бути окремі амінокислоти, хоча деякі виявляють інгібуючий вплив на ріст бактерій. У нашому випадку таку дію викликала глютамінова кислота і гідроксиламін (рис. 5).

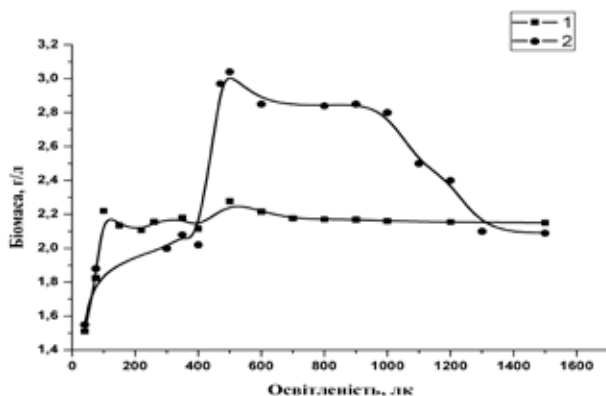


Рис. 4. Ріст культур *Chromatium* sp. 1 (1) та *Chromatium* sp. 2 (2) за умов різного освітлення

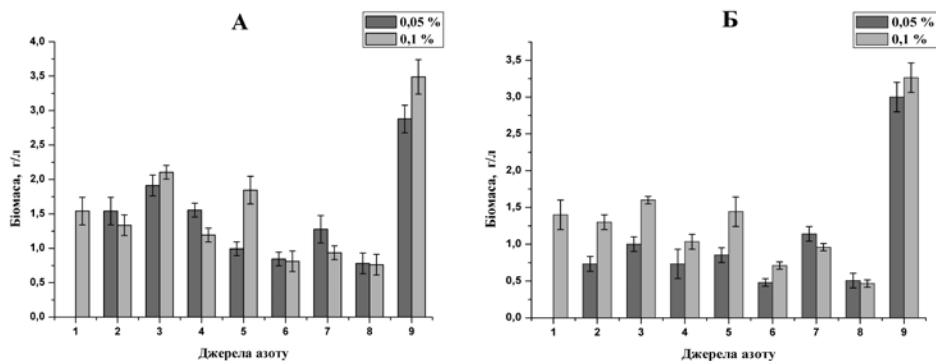


Рис. 5. Використання *Chromatium* sp. 1 (А) та *Chromatium* sp. 2 (Б) сполук азоту (1 – середовище без азоту; 2 –  $\text{KNO}_3$ ; 3 –  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 4 – гідролізат казеїну; 5 – аланін; 6 – гідроксиламін; 7 –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 8 – глютамінова кислота; 9 – пептон) у концентраціях 0,05 % та 0,1 %

Із неорганічних донорів електронів ріст культур забезпечували сульфід, тіосульфат, елементарна сірка (рис. 6).

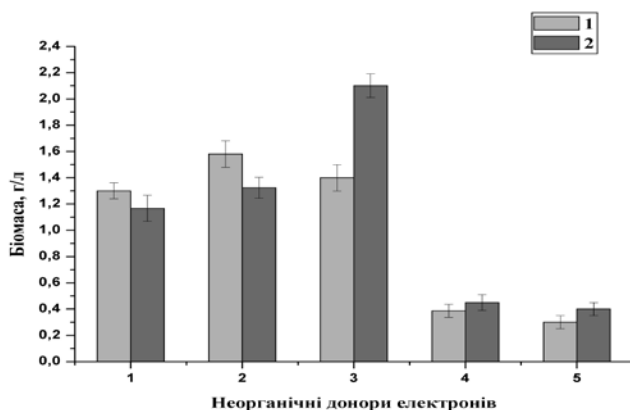


Рис. 6. Використання *Chromatium* sp. 1 (1) та *Chromatium* sp. 2 (2) різних неорганічних донорів електронів (1 – середовище з елементарною сіркою; 2 – тіосульфатом; 3 – сульфідом; 4 – сульфітом; 5 – контроль)

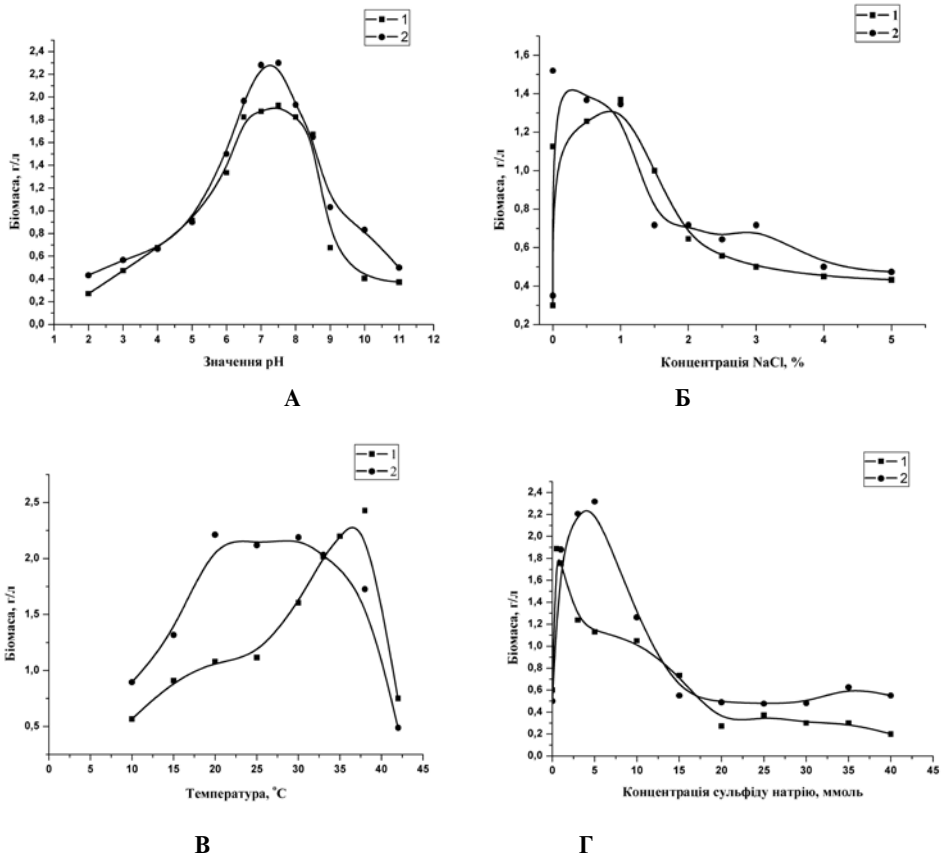


Рис. 7. Ріст *Chromatium* sp. 1 (1) та *Chromatium* sp. 2 (2) за умов різного pH (А), температури (В), за різної концентрації хлориду (Б) та сульфіді натрію (Г) у середовищі

Культури росли в діапазоні pH 5–10. Оптимальним для росту культур є pH – 6,5–8,0 (рис. 7, А).

Обидві культури ростуть за наявності хлориду натрію (0–2,5%) (рис. 7, Б). Найкращий ріст спостерігали за концентрації NaCl – 0–1 %. На середовищі без хлориду натрію культура *Chromatium* sp. 2 росла краще (рис. 7, Б).

Бактерії *Chromatium* sp. 1 ростуть в діапазоні температур 15–41°C. Найбільший урожай бактерій одержували при температурі 33–38°C. Сприятливим для росту *Chromatium* sp. 2 є дещо нижчі температури (20–33°C), проте ріст бактерій спостерігали і при 10–15°C (рис. 7, В).

*Chromatium* sp. 2 потребує для росту вітамін B<sub>12</sub>.

Варто наголосити, що серед численних видів фотосинтезуючих бактерій лише види родини *Chromatiaceae* здатні знешкоджувати сірководень в анаеробних умовах у процесі фотосинтезу та накопичувати утворену сірку всередині клітини. Відомо, що сірководень виявляє токсичну дію на живі організми. Так 0,06–0,2 ммоль сульфіді у середовищі є згубними для *Scenedesmus vacuolatus*, *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* [18]. На відміну від інших організмів, види родини *Chromatiaceae* добре ростуть за наявності 0,5–8 ммоль сульфіді у середовищі [4]. Описана пурпурова сіркова бактерія *Thiorodococcus drewsii*, яка росте за наявності 11 ммоль сульфіді в середовищі [24]. Виходячи з цього, ми дослідили вплив сульфіді на ріст виділених культур. Виявилось, що описані бактерії, на відміну від названих вище організмів, менш чутливі до H<sub>2</sub>S і ростуть за наявності в середовищі 12 ммоль сульфіді (рис. 7, Г), що свідчить про перспективність їхнього використання для очистки середовищ, забруднених сірководнем. Опираючись на дані про вплив різних факторів на ріст і життєдіяльність бактерій, було проведено експеримент із вивчення утилізації сірководню *Chromatium* sp. 1 та *Chromatium* sp. 2. Дослідження кінетики



окиснення сірководню відмитими клітинами показало, що протягом 1 год бактерії утилізують до 14 % наявного у середовищі сульфиду (рис. 8), що складає 8,25–7,85 мкмоль  $H_2S$  на 1 мг клітин за годину.

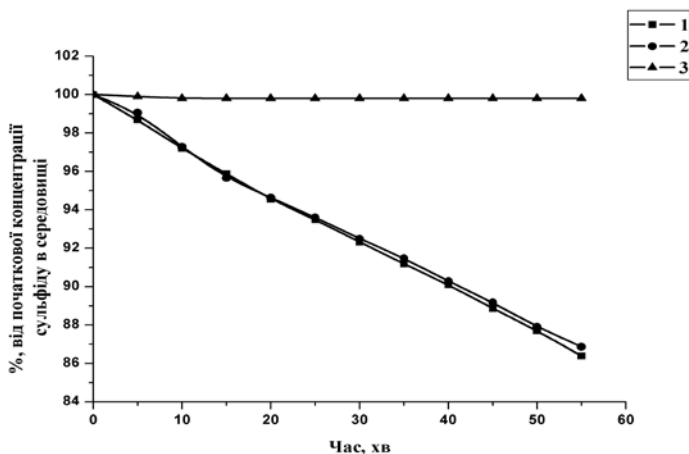


Рис. 8. Кінетика окиснення сірководню. 1 – *Chromatium* sp. 1; 2 – *Chromatium* sp. 2; 3 – контроль (без бактерій)

До недавнього часу пурпурові сіркобактерії відносили до строгих фотолітоавтотрофів. Хоча в останні роки з'явилися повідомлення [10, 14, 17, 20], що у цієї групи фототрофів типи енергетичного і вуглецевого живлення більш різноманітні. Отримані нами результати підтверджують дані про те, що представники родини *Chromatiaceae* можуть утилізувати широкий спектр органічних сполук [17, 20]. Подібно до інших описаних видів у досліджуваних представників родини *Chromatiaceae* функціонують фотолітоорганотрофний та фотоорганогетеротрофний типи живлення. Це значно розширює наші уявлення про метаболізм цих бактерій і відкриває перспективу їх практичного використання.

Висловлюємо щирю подяку завідувачу міжфакультетської лабораторії електронної мікроскопії Львівського національного університету імені Івана Франка, канд. біолог. наук О.Р. Кулачковському за приготування зразків та електронно-мікроскопічні дослідження і завідувачу лабораторії спектрофотометричних методів у біології, канд. біолог. наук А.М. Федоровичу за допомогу у здійсненні спектрального аналізу.

Ю.А. Павлова, С.А. Гнатуш, С.П. Гудзь

Львовский национальный университет имени Ивана Франко

## ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ РОДА *CHROMATIUM*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДОЕМОВ, ОБОГАЩЕННЫХ СЕРОВОДОРОДОМ

### Резюме

Из водоемов Яворовского серного месторождения выделены чистые культуры пурпурных серобактерий, которые отнесены к роду *Chromatium*. Обе культуры осуществляют аноксигенный фотосинтез, содержат бактериохлорофилл а и каротиноиды спириллоксантиновой серии. Выделенные бактерии растут фотолитоавтотрофно, фотолитогетеротрофно и фотоорганогетеротрофно. Утилизируют широкий спектр органических соединений. Неорганическими донорами электронов используют сероводород, серу и тиосульфат. Бактерии стойкие к высоким концентрациям сероводорода и эффективно его обезвреживают в процессе аноксигенного фотосинтеза. Выделенные бактерии рассматриваются как перспективные для создания биотехнологических экосистем для очистки загрязненных соединениями серы сред.

Ключевые слова: пурпурные серобактерии, сероводород, бактериохлорофилл а, каротиноиды, фотолитоавтотрофия.

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF BACTERIA  
OF *CHROMATIUM* GENUS, ISOLATED FROM WATER  
BODIES ENRICHED WITH HYDROGEN SULPHIDE**

S u m m a r y

Pure cultures of purple sulfur bacteria, which were attributed to genus *Chromatium*, were isolated from water bodies of the Yavoriv sulfur deposit. Both cultures perform anoxygenic photosynthesis and contain bacteriochlorophyll *a* and carotenoids of spirilloxanthin group. Isolated bacteria grow photolithoautotrophically, photolithoheterotrophically and photoorganoheterotrophically. Hydrogen sulphide, sulfur and thiosulfate were used as inorganic electron donors. Bacteria were resistant to high hydrogen sulphide concentrations and assimilated it effectively in the process of anoxygenic photosynthesis. Isolated bacteria are considered as promising models for creation of biotechnologic ecosystems, which will be used for treatment of media polluted with sulfur compounds.

The paper is presented in Ukrainian.

**K e y w o r d s:** purple sulfur bacteria, hydrogen sulphide, bacteriochlorophyll *a*, carotenoids, photolithoautotrophy.

**T h e a u t h o r ' s a d d r e s s:** Yu.O.Pavlova, Microbiology Department, Ivan Franko Lviv National University; 4 Hrushevsky St., Lviv, 79005, Ukraine.

1. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Білінська І.С. Практикум з мікробіології: Навчальний посібник. – ч.1. – Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2003. – 80 с.
2. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Перетятко Т.Б., Паляниця Б.М., Коструба М.Ф., Подопрігора О.І., Клим І.Р. Динаміка змін титру сульфатвідновлюваних бактерій та вмісту сульфатів і сірководню у водах кар'єру Яворівського сіркового родовища в процесі його затоплення // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. Біол. – 2004. – Вип. 37 – С. 185–189.
3. Кім Л.Я., Мороз О.М., Федорович А.М., Гнатуш С.О., Гудзь С.П. Метаболізм сульфідів та вуглецевих сполук у фототрофних пурпурових сіркобактерій // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. Біол. – 2004. – Вип. 35 – С. 199–204.
4. Кондратьева Е. Н. Фотосинтезирующие микроорганизмы. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1989. – 374 с.
5. Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. Москва: Наука, 1959. – 123 с.
6. Мусієнко М.М. Паршикова Т.В., Славний П.С. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин. – Київ: Фітосоціоцентр, 2001. – 200 с.
7. Осницкая Л.К. Пигментная система пурпурных бактерий // Микробиология. – 1950. – 19, № 2. – С. 152–170.
8. Подопрігора О.І., Полулях О.В., Дацюк М.М. та ін. Одержання високопродуктивних штамів дріжджів *Phaffia rhodozuta* – продуцентів каротиноїдів // Микробиол. журн. – 1996. – 58, № 4. – С. 19–24.
9. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П., Стейли Дж., Уильямс С. Определитель бактерий Берджи : Пер. с англ. – Москва: Мир, 1997. – Т. 2. – С. 353–368.
10. Arunasri K., Sasikala C., Ramana C.V., Suling J., Imhoff J.F. *Marichromatium indicum* sp. nov., a novel purple sulfur gamma-proteobacterium from mangrove soil of Goa, India // Int. J. Syst. Bacteriol. – 2005. – 55. – P. 673–679.
11. Britton G. General carotenoid methods // Meth. Enzymol. – Acad. press, 1985. – 3, pt B. – P. 113–145.
12. Bryantseva I.A., Gorlenko V.M., Kompanseva 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. – 50. – P. 2157–2163.
13. Eraso J., Kaplan S. Photoautotrophy // Encyclopedia of life sciences. – Nature publishing group, 2001.
14. Frigaard et al. Spectrochromatography of photosynthetic pigments as fingerprinting technique for microbial phototrophs // FEMS Microbiol. Ecol. – 1996. – N 20. – P. 69–77.
15. Hiraishi A., Urata K., Satoh T. A new genus of marine budding phototrophic bacteria, *Rhodobium* gen. nov., which includes *Rhodobium orientis* sp. nov. and *Rhodobium marinum* comb. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1995. – 45, N 2 – P. 226–234.
16. Imhoff J. F., Caumette P. Recommended standards for description of new species of anoxygenic phototrophic bacteria // Int. J. Syst. Bacteriol. – 2004. – 54. – P. 1415–1421.
17. Imhoff J. Saling J. Petri R. Phylogenetic relationship among the *Chromatiaceae*, their taxonomic reclassification and description of the new genera *Allochromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thiococcus*, *Thiohalocapsa* and *Themochromatium* // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1998. – 48. – P. 1129–1143.

18. Kaster E., Dorusch F., Altenburger R. Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, and *Daphnia magna* // Environ. Toxicol. Chem. – 2005. – **24**. – P. 2621–2629.
19. Oelze J.M. Analysis of bacteriochlorophylls // Method Microbiol. – 1985. – **18**. – P. 257–284.
20. Phennig N., Traper H. The family *Chromatiaceae* // The Procaryotes. A handbook on the biology of bacteria. Ecophysiology, isolation, identification, applications. – 2nd edn. – New York: Spinger, 1992. – P. 3200–3221.
21. Pychkova N., Imhoff J., Gorlenko V. *Thiocapsa litoralis* sp. nov., a new purple sulfur bacterium from microbial mats from the White Sea // Int. J. Syst. Bacteriol. – 2000. – **50**. – P. 1441–1447.
22. Rees G.N., Harfoot C.G., Janssen P.H., Schoenborn L., Kuever J., Lunsdorof H. *Tiobaca truperi* gen. nov., sp. nov., a phototrophic purple sulfur bacterium isolated from freshwater lake sediment // Int. J. Syst. Bacteriol. – 2002. – **52**. – P. 671–678.
23. Reynolds E.S. The use of lead citrate at pH as an electronopaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. – 1963. – **17**. – P. 208–212.
24. Zaar A., Fuchs G., Golecki J., Overmann J. A new purple sulfur bacterium isolated from littoral microbial mat, *Thiorhodococcus drewsii* sp. nov. // Arch. Microbiol. – 2003. – **179**, N 3. – P. 174–183.
25. Zhang D., Yung H., Zhang W., Huang Z., Liu Sh.-J. *Rhodocista pekingensis* sp. nov., a cyst-forming phototrophic bacterium from a municipal wastewater treatment plant // Int. J. Syst. Bacteriol. – 2003. – **53**. – P. 1111–1114.

Отримано 01.06.2008