

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

С.О. Гнатуш¹, С.В. Лаврик²

¹Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна, тел: +38 (032) 239 40 53;

²Педагогічний коледж ЛНУ імені Івана Франка, вул. Туган-Барановського, 7, Львів 79005, Україна, e-mail: sofi_lavryk@email.ua

ХАРАКТЕРИСТИКА ПУРПУРОВИХ НЕСІРКОВИХ БАКТЕРІЙ *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS* З ОЗЕРА ЯВОРІВСЬКЕ (УКРАЇНА)

Мета роботи. Виділення з води озера Яворівське, ідентифікація та дослідження пурпурових несіркових бактерій, які можуть утилізувати сірководень і добре рости завдяки використанню органічних сполук.

Методи. Бактерії культивували анаеробно чи у мікроаерофільних умовах на світлі та у темряві на середовищах Ван Ніля і PNSB за внесення різних донорів електронів, джерел карбону і нітрогену. Біомасу визначали за мутністю розведеної суспензії клітин фотометруванням на КФК-3. Концентрацію S²⁻ визначали турбідиметрично за утворенням метиленової сині. Сірку екстрагували з культурального середовища фільтруванням через нітроцелюлозні фільтри, надалі її концентрацію визначали за методом Ван Гемердена. Аналіз пігментного складу здійснювали спектрофотометрично на Specord M-40. Ультраструктуру клітин бактерій досліджували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЕМ-100. Зразки генів 16S ДНК ампліфікували методом ПЛР. Первинну структуру фрагментів визначали на GATC Biotech AG (Konstanz, Germany). **Результати.** Отримали чисті культури пурпурових несіркових бактерій. Клітини дослідженого штаму паличкоподібні, рухливі. Фотосинтетичні мембрани ламелярного типу, основні пігменти – бактеріохлорофіл *a* та каротиноїди спірилоксантинової серії. Бактерії ростуть як хемотрофно, так і фототрофно, при використанні сірководню як донора електронів утворюють сірку, що виводиться у культуральне середовище. Використовують різні донори електронів, джерела карбону та нітрогену. Є факультативними анаеробами. Генетично близькі до видів *Rhodopseudomonas faecalis* (99%) і *Rhodopseudomonas palustris* (98%), *Rhodopseudomonas rhenobacensis* (98%). **Висновок.** Виділені з води озера Яворівське пурпурові несіркові бактерії ідентифіковані нами за морфо-фізіологічними ознаками і за результатами аналізу нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК як *Rhodopseudomonas palustris*. Вони можуть утилізувати сірководень і добре рости завдяки використанню органічних сполук.

Ключові слова: пурпурові несіркові бактерії, *Rhodopseudomonas palustris*.



Унаслідок зміни деяких промислових технологій виникла потреба у рекультиватії водойм, утворених при розробці родовищ корисних копалин. Зокрема, рекультиватії потребує озеро Яворівське, утворене на місці котловану Язівського сіркового родовища (Львівська область). Однією з проблем цієї водойми є постійне утворення сірководню у придонній зоні внаслідок життєдіяльності бактерій циклу сульфуру [1]. Сірководень є токсичним для більшості організмів навіть у невеликих дозах, а тому стримує заселення глибинної частини озера еукаріотами.

Оскільки припинити утворення сірководню шляхом ізоляції сіркового пласту технічно неможливо, слід зосередитись на пошуку способів утримання низької концентрації цієї сполуки у водній товщі. З цією метою можна використати бактерії, які утилізують сірководень у процесі своєї життєдіяльності. Зважаючи на перспективність біоочищення цієї водойми, ми зосередили свою увагу на виділенні, ідентифікації та дослідженні фізіологічних властивостей пурпурових несіркових бактерій, які можуть утилізувати сірководень і добре рости завдяки використанню органічних сполук, присутніх в озері у достатніх кількостях.

Матеріали і методи

Проби води відбирали за методом Столбунова-Рябова у прибережній зоні Яворівського озера з глибини 27 м [3]. Нагромаджувальні культури пурпурових бактерій отримували, використовуючи середовище Ван Ніля. Чисті культури пурпурових несіркових бактерій отримували та культивували у рідкому і агаризованому середовищах PNSB у пробірках та на чашках Петрі (г/л): KH_2PO_4 — 1,0; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NH_4Cl — 1,0; NaHCO_3 — 3,0; Na_2SO_4 — 0,7; NaCl — 1.

Анаеробні умови створювали з використанням кисеньопоглинаючих пакетів GENbox anaer (Франція) [6]. Як джерело світла використовували лампи розжарювання. Інтенсивність освітлення вимірювали люксометром Ю-116.

Оптимальні для росту температуру та освітленість визначали, вирощуючи бактерії у пробірках з рідким середовищем PNSB. Здатність досліджених бактерій асимілювати органічні речовини та сполуки нітрогену і сульфуру досліджували згідно рекомендованих стандартів опису нових видів аноксигенних фототрофних бактерій [10]. Біомасу визначали за мутністю розведеної суспензії клітин з використанням КФК-3.

Концентрацію S^2 визначали турбідиметрично з використанням КФК-3. Метод ґрунтується на взаємодії S^2 з п-аміно-диетиланіліном з утворенням метиленової сині [15]. Вміст сірки у культуральному середовищі визначали, осаджуючи її на нітроцелюлозних мембранних фільтрах з порами 0,45 мм як описано для *Thiobacillus*. Сірку екстрагували етанолом, а її концентрацію у екстракті визначали спектрофотометрично [8, 12]. Склад пігментів визначали у бактерій, вирощених на середовищі з сульфід-іоном та ацетатом [2, 4, 7,



9]. Спектри поглинання інтактних клітин та екстрагованих з них пігментів реєстрували на спектрофотометрі Specord M-40. Ультраструктуру бактерій вивчали за допомогою електронного трансмісійного мікроскопа ПЕМ-100. Фіксацію і контрастування клітин проводили за методом Рейнольдса [11].

Очищення та ампліфікацію рибосомальної 16S ДНК здійснювали як описано [5]. Визначення первинної структури ампліфікованих фрагментів ДНК проводили на GATC Biotech AG (Konstanz, Germany), використовуючи праймери: 337F: GACTCCTACGGGAGGCWGCAG; 518R: GTATTACCGCGGCTGCTGG; 928F: TAAAАCTYAAAKGAATTGACGGG. Для пошуку гомологів досліджених бактерій використовували програму BLASTN.

Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програму OriginPro 7.0.

Результати та їх обговорення

Із проб води озера Яворівське отримано нагромаджувальну культуру, в якій виявлено значну кількість невеликих паличкоподібних клітин без внутрішньоклітинної сірки. Відсутність глобул сірки всередині клітини є однією із основних ознак родини *Rhodospirillaceae* [6]. У результаті досліджень виділено штами пурпурових несіркових бактерій: Ya-2010/A, Ya-2010/B, Ya-2010 /C і Ya-2010 /D, які використовували сірководень у процесі автотрофного росту і, подібно до *Rhodopseudomonas palustris*, виділяли сірку у культуральне середовище.

У подальших дослідженнях використовували штам Ya-2010/A, який найактивніше утилізував сульфід-іон і утворював найбільше сірки.

Для ідентифікації штаму Ya-2010/A проведено аналіз нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК та її порівняння з гомологічними послідовностями, депонованими у GenBank (табл. 1).

Високий рівень спорідненості виявлено до кількох видів роду *Rhodopseudomonas*. Однак, генетично близькі види часто відрізняються морфо-фізіологічними властивостями. Тому, щоб визначити, до якого саме з наданих видів належить штам Ya-2010 /A було визначено його морфо-фізіологічні характеристики.

У клітинах штаму Ya-2010 /A виявлено внутрішні фотосинтетичні мембрани ламелярного типу, розташовані паралельно цитоплазматичній мембрані. В той же час, сіркових глобул ні всередині, ні на поверхні клітин не виявлено. Ці морфологічні ознаки підтверджують приналежність досліджуваного штаму до родини *Rhodospirillaceae* [6].

Фотосинтетичними пігментами клітин штаму Ya-2010 /A є бактеріохлорофіл *a* (абсорбційні максимуми 376, 593, 805, 872 нм) та каротиноїди спірилоксантинової серії (467, 490 і 525 нм). Порівняння абсорбційних максимумів окремих пігментів, розділених методом тонкошарової хроматографії, з даними літератури, підтвердило присутність бактеріохлорофілу *a* та дозволило ідентифікувати лікопін, родопін і сфероіденон [4, 7, 13].



Результати пошуку бактерій-гомологів штаму Ya-2010/A за результатами BLASTN-аналізу

The results of search for homologues to strain Ya-2010/A based on BLASTN-analysis data

Штам	Довжина фрагменту, пн	Ідентичність, %	Гомологічний вид	Код GenBank
Ya-2010 /A	1517	99	Rhodopseudomonas faecalis	NR_024971.1
Ya-2010 /A	1517	98	Bradyrhizobium japonicum	NR_074322.1
Ya-2010 /A	1517	98	Bradyrhizobium betae	NR_029104.1
Ya-2010 /A	1517	98	Rhodopseudomonas palustris	NR_103926.1
Ya-2010 /A	1517	98	Bradyrhizobium liaoningense	NR_041785.1
Ya-2010 /A	1517	98	Rhizobium lupini	NR_044869.1
Ya-2010 /A	1517	98	Rhodopseudomonas rhenobacensis	NR_028641.1
Ya-2010 /A	1517	98	Nitrobacter vulgaris	NR_042449.1

Бактерії роду *Rhodopseudomonas* здатні рости фототрофно або хемотрофно, причому найкращим типом метаболізму для них є фотогетеротрофія [6]. Встановлено, що бактерії штаму Ya-2010 /A як основне джерело карбону можуть використовувати різні органічні сполуки. Очевидно, ця властивість сприяє їхньому виживанню за зміни хімічного складу природного середовища (табл. 2).

Пурпурові несіркові бактерії, в тому числі *R. rhenobacensis*, *R. palustris*, можуть використовувати органічні сполуки не лише як джерело карбону, а й як донори електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу [6]. Бактерії штаму Ya-2010 /A здатні рости фототрофно за відсутності S²- на середовищі з ацетатом, малатом, піруватом.

Джерелами нітрогену для штаму Ya-2010 /A були амоній, нітрат, аспартат, аргінін, глутамат, дріжджовий екстракт. Нітрат, можливо, перетворювався до нітриту завдяки нітратредукції, яка характерна для бактерій роду *Rhodopseudomonas* [6, 13].

Результати дослідження морфо-фізіологічних характеристик штаму Ya-2010 /A наведені у табл. 3.



Таблиця 2

Ріст бактерій штаму Ya-2010 /A за внесення органічних сполук як джерела карбону

Table 2

The growth of strain Ya-2010 /A under addition of some organic compounds as carbon sources

Органічна речовина	Наявність /відсутність росту	Органічна речовина	Наявність /відсутність росту
Ацетат	+	Малат	+
Аспарат	–	Метанол	–
Валерат	+	Піруват	+
Гліцерол	–	Пропанол	–
Глутамат	+	Пропіонат	+
Глюкоза	–	Сорбітол	+
Дріждж. екстракт	+	Тартрат	–
D–фруктоза	–	Форміат	–
Етанол	+	Фумарат	+
Лактат	+	Контроль	+

Примітка: «+» – забезпечували ріст бактерій; «–» – відсутність росту бактерій; контроль – ріст бактерій на середовищі PNSB

Note: «+» – support growth of bacteria; «–» – absence of growth of bacteria control – growth of bacteria on medium PNSB

Необхідно зазначити, що ріст бактерій штаму Ya-2010 /A не пригнічувався за внесення NaCl (1 г /л), на відміну від генетично близького *R. rhenobacensis* [6]. Одночасно не можна підтвердити приналежність штаму Ya-2010 /A до *R. faecalis*, бо досліджені бактерії як донори електронів здатні використовувати S² та тіосульфат, що не характерно для *R. faecalis* [14].

Отже, за результатами генетичних та морфо-фізіологічних досліджень пурпурові несіркові бактерії штаму Ya-2010 /A, виділені з води Яворівського озера (Україна, Львівська обл.), належать до роду *Rhodopseudomonas* і з високою імовірністю є *Rhodopseudomonas palustris*. Вони можуть утилізувати сірководень і добре рости завдяки використанню органічних сполук.



Морфо-фізіологічна характеристика бактерій штаму Ya-2010 /A

The morphophysiological characteristic of strain Ya-2010 /A

Ознака	Характеристика ознаки	
	Штам Ya-2010 /A	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> [6]
Морфологія клітин	паличкоподібні, поодинокі; у старих культурах утворюють розеткоподібні угруповання, грамнегативні	від паличкоподібних до овальних, поодинокі; у старих культурах можуть утворювати угруповання за типом кластерів чи розеток, грамнегативні
Розмір клітин, мкм	0,5-0,9x1,8-2,0	0,6-0,9x1,2-2,0
Рухливість	рухливі	рухливі
Внутрішні цитоплазматичні мембрани	ламелярного типу, паралельні мембрані клітини	ламелярного типу, паралельні мембрані клітини
Забарвлення суспензії клітин	темно-червоне	від червоного до червоно-коричневого
Основні пігменти	бактеріохлорофіл <i>a</i> , каротиноїди спірилоксантинової серії	бактеріохлорофіл <i>a</i> , каротиноїди спірилоксантинової серії
Оптимальне значення: температури, °C освітленості, люкс сульфіду, мМ	28–30 1400–1500 2–3	30–37 не вказано не вказано
Максимальна концентрація S ²⁻	5	не вказано
Донор електронів: сульфід тіосульфат сірка	+ + –	+ +/ –
Ріст у темряві: аеробні умови мікроаерофільні умови анаеробні умови	– + +	+ /– + +
Відношення до кисню	факультативний анаероб	факультативний анаероб

Автори публікації висловлюють подяку за визначення первинної структури фрагментів ДНК директору з досліджень Середземноморського Інституту Нейробиології (INMED /INSERM) І. Медіні та завідувачу міжфакультетської лабораторії електронної мікроскопії ЛНУ імені Івана Франка, к.б.н. О. Кулачковському за допомогу у дослідженні ультраструктури клітин.



С. А. Гнатуш¹, С. В. Лаврик²

¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко, ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина, тел: +38 (032) 239 40 53;

²Педагогический колледж ЛНУ имени Ивана Франко, ул. Туган-Барановского, 7, Львов 79005, Украина, тел: +38 (063) 278 73 43, e-mail: sofii_lavryk@email.ua

ХАРАКТЕРИСТИКА ПУРПУРНЫХ НЕСЕРНЫХ БАКТЕРИЙ *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS* ИЗ ОЗЕРА ЯВОРИВСКОЕ (УКРАИНА)

Реферат

Целью работы было выделение из воды озера Яворивское, идентификация и исследование свойств пурпурных несерных бактерий, способных утилизировать сероводород и расти с использованием органических соединений. **Методы.** Бактерии культивировали анаэробно и в микроаэрофильных условиях, на свету и в темноте, на средах Ван Ниля и PNSB с разными донорами электронов, источниками углерода и азота. Биомассу определяли по мутности разбавленной суспензии клеток с использованием КФК-3. Концентрацию S²⁻ определяли турбидометрически по образованию метиленовой сини. Серу из культуральной среды экстрагировали методом осаждения на нитроцеллюлозных фильтрах, а ее концентрацию определяли методом Ван Гемердена. Для анализа пигментного состава бактерий использовали спектрофотометр Specord M-40. Ультраструктуру бактерий изучали с помощью электронного трансмиссионного микроскопа ПЕМ-100. Первичную структуру фрагментов ДНК определяли на GATC Biotech AG (Konstanz, Germany). Для поиска гомологов исследованных бактерий использовали программу BLASTN. **Результаты.** Клетки бактерий палочкообразные, подвижные. Фотосинтетические мембраны ламеллярного типа, пигменты — бактериохлорофилл *a* и каротиноиды спириллоксантиновой серии. Бактерии растут хемотрофно и фототрофно, при использовании сероводорода в качестве донора электронов образуют серу, которая выводится в среду. Используют разные источники углерода и азота. Факультативные анаэробы. Генетически близки видам *Rhodopseudomonas faecalis* (99%), *Rhodopseudomonas palustris* (98%), *Rhodopseudomonas rheinobacensis* (98%). **Вывод.** Выделенные из воды озера Яворивское пурпурные несерные бактерии идентифицированы нами как *Rhodopseudomonas palustris*. Они могут утилизировать сероводород и хорошо расти благодаря использованию органических соединений.

Ключевые слова: пурпурные несерные бактерии, *Rhodopseudomonas palustris*.



S.O. Hnatysh¹, S.V. Lavryk²

¹Ivan Franko National University of Lviv, 4, Grushevsky Str., Lviv 79005, Ukraine,
tel. +38 (032) 239 40 53;

²Pedagogical college of Ivan Franko National University of Lviv, 7, Tuhan-Baranovsky Str., Lviv
79005, Ukraine; tel. +38 (063) 278 73 43, e-mail: sofi_lavryk@email.ua

CHARACTERISTIC OF NON-SULFUR PURPLE BACTERIA *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS* FROM LAKE JAVORIVSKE (UKRAINE)

Summary

The **aim** of work was isolation from water of lake Javorivske, identification and investigation of purple non-sulfur bacteria with ability to use sulfide and grow on the organic compounds. **Methods.** Bacteria were cultivated under anaerobic and microaerophilic conditions, on the light or in the dark in the Van Niel or PNSB media with addition of different electron donors, carbon and nitrogen sources. Biomass was determined using turbidity diluted cell suspension photometry on CPK-3. The concentration of S²⁻ was determined colorimetrically for methylen blue formation. The elemental sulfur extracted from medium used filtration through nitrocellulose filters. The sulfur concentration was measured by the method of Van Gernerden. For analyses of pigment content it has been used spectrophotometer Specord M-40. Bacterial cell structure was investigated with an electron transmission microscope PEM-100. The fragments primary structure was determined on GATC Biotech AG (Konstanz, Germany). The search for homologues to our bacteria used the BLASTN-program. **Results.** The bacteria cells are rod-shaped and motile. Photosynthetic membranes are of lamellar type. The main photosynthetic pigments are bacteriachlorophyll *a* and carotenoids of spirilloxanthin series. Bacteria grow chemotrophically or phototrophically, use sulfide as an electron donor and produce elemental sulfur, which extracted in cultural medium. Bacteria use different electron donors, carbon and nitrogen sources. They are facultative anaerobes. Bacteria were genetically similar to *Rhodopseudomonas faecalis* (99%), *Rhodopseudomonas palustris* (98%) and *Rhodopseudomonas rhenobacensis* (98%). **Conclusions.** Purple bacteria isolated from water of lake Javorivske were identified as *Rhodopseudomonas palustris*. They use sulfide and grow well due to utilization of organic compounds.

Key words: purple non-sulfur bacteria, *Rhodopseudomonas palustris*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Мороз О.М., Колісник Я.І., Подопрігора О.І., Клим І.Р., Гудзь С.П., Борсукевич Б.М., Гнатуш С.О. Мікрофлора води озера Яворів-



ське // Науковий вісник Ужгородського ун-ту. Серія біологія. — 2008. — 24. — С. 131–138.

2. Мусієнко М.М., Паршикова Т.В., Славний П.С. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин. Київ: Фітосоціоцентр, 2001. — 200 с.

3. Родина А. Г. Методы водной микробиологии. Практ. руководство. — М.—Л.: Наука, 1965. — 363 с.

4. Akiba T., Usami R., Horikoshi K. *Rhodopseudomonas rutila*, a new species of non-sulfur purple photosynthetic bacteria // International Journal of Systematic Bacteriology. — 1983. — 33, № 3. — P. 551–556.

5. Barns S.M., Pelletier D.A, Lane D.J., Weisburg W.G. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. — 1991. — 173, № 2. — P. 697–703.

6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. — 10th ed. — New York, 2005. — Vol. 2. — 1416 p.

7. Britton G. General carotenoid methods // Meth. Enzymol. — 1985. — 3. — P. 113–145.

8. Gemerden H. Growth measurements of *Chromatium* cultures // Arhiv. Mikrobiol. — 1968. — 64. — P. 103–110.

9. Hirashi A., Santos T., Siguyama J., Komagata K. *Rhodopseudomonas rutila* is a later subjective synonym of *Rhodopseudomonas palustris* // International Journal of Systematic Bacteriology. — 1992. — 42, № 1. — 186–188.

10. Imhoff J. Caumette P. Recommended standards for description of new species of anoxygenic phototrophic bacteria // J. Syst. Bacteriol. — 2004. — 54. — P. 1415–1421.

11. 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.

12. Visser J., Robertson L., Verseveld H., Kouenen G. Sulfur production by obligately chemolithoautotrophic *Thiobacillus* species // Applied and Environmental Microbiology. — 1997. — 63, № 6. — P. 2300–2305.

13. Yongqin J., Kappler A., Croal L., Newman D. Isolation and characterization of a genetically tractable photoautotrophic Fe(II)-oxidizing bacterium, *Rhodopseudomonas palustris* strain TIE-1 // Applied and Environmental Microbiology. — 2005. — 71, № 8. — P. 4487–4496.

14. Zhang D., Yang H., Huang Z., Zhang W., Liu S. J. *Rhodopseudomonas faecalis* sp. nov., a phototrophic bacterium isolated from an anaerobic reactor that digests chicken faeces // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. — 2002. — 52. — P. 2055–2060.

15. Пат.6340596 США, МКИ G 01 N33 /00. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen / Masami Sugiyama (Японія); Fujirebio Inc. № 248316; Заявл. 02.01. 1999. — Опубл. 22.01.2002; НКИ 436.121.

Стаття надійшла до редакції 9.10.2013.

