

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПУРПУРОВИХ НЕСІРКОВИХ БАКТЕРІЙ *RHODOPSEUDOMONAS SP. Ya-2016*

О. Тарабас*, С. Гнатуш, Б. Осташ, Г. Мутенко, О. Кошла

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: otarabas@gmail.com*

Виділено чисту культуру пурпурових несіркових бактерій із води озера Яворівське (Львівська область, Україна), яке утворилося в результаті затоплення території сіркового кар'єру. Суспензія виділеного штаму Ya-2016 має рожево-червоне забарвлення. Віброїдні клітини є рухомими, грамнегативними, не утворюють спор. Розміри клітин 1,5–1,8 x 0,4–0,46 мкм. У клітинах бактерій виявлені внутрішні мембрани везикулярного типу. Ріст штаму пригнічується за внесення NaCl (1 г/л). Як субстрати для фототрофного росту бактерії використовують сульфід, тиосульфат і низку органічних сполук. Для росту потребують вітамін B₁₂. Нуклеотидна послідовність консервативної ділянки гена 16S рРНК виявляє високу подібність (99 % ідентичних залишків у попарному вирівнюванні методом BLASTN) до 16S рРНК бактерій роду *Rhodospseudomonas*. На основі дослідження морфологічних характеристик і аналізу нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК пурпурові фотосинтезувальні несіркові бактерії штаму Ya-2016, виділені з води озера Яворівське, ідентифіковані як *Rhodospseudomonas sp. Ya-2016*.

Ключові слова: фототрофні бактерії, пурпурові несіркові бактерії, *Rhodospseudomonas sp.*

Озеро Яворівське (Львівська обл., Україна) розташоване на сполученні Східноєвропейської платформи з Передкарпатським крайовим прогином. В основі геологічного перерізу тут залягають відкладення крейди, а на них лягає карбонатно-сульфатна товща. Частина її заміщена сірковою рудою, що утворює поклади товщиною до 30 м, шириною до 4–5 км і довжиною до 20 км. За розрахунками в озеро надійшло 20 % підземної води, 20 % опадів із площі водозабору, 60 % річкової води. Показано, що за вмісту кисню у поверхневих водах 50 мг/л в суміші залишиться до 5 мг/л сірководню [1]. Унаслідок хімічного та біологічного окиснення сполук сульфуру зростає концентрація сульфат-іонів у водоймі. Біологічне відновлення сульфатів супроводжується нагромадженням гідроген сульфіду у водоймі. Його концентрація є доволі високою у верхніх шарах водойми та зростає з глибиною. Утворений сульфатвідновлювальними бактеріями сірководень є донором електронів у процесі фотосинтезу для пурпурових і зелених сірковобактерій. Його концентрація у воді, очевидно, може бути показником інтенсивності перебігу аноксигенного фотосинтезу, а отже, свідчить про очищення води за участю фотосинтезувальних бактерій [2, 4].

Фототрофні пурпурові бактерії поділяють на сіркові пурпурові бактерії класу *Gammaproteobacteria* та пурпурові несіркові бактерії класів *Alphaproteobacteria* і *Betaproteobacteria* [10, 11]. Ці мікроорганізми використовують відновлені сполуки сульфуру в процесі аноксигенного фотосинтезу [14]. Пурпурові несіркові бактерії широко розповсюджені у природі, про що свідчить їхнє виділення із найрізноманітніших джерел, у тому числі з прісних водойм, морських прибережних відкладень, стічних вод і навіть продуктів метаболізму дощових черв'яків [11].

Вони здатні використовувати сполуки сірки, такі як сульфід. Деякі пурпурові несіркові бактерії є фотолітоавтотрофами і використовують відновлені сполуки сульфуру [16]. Також вони можуть рости або за анаеробних умов при освітленні, або за аеробних у темноті, використовуючи різні органічні сполуки як джерела карбону та донори електронів [9].

Метою роботи було виділити з озера Яворівське й ідентифікувати фототрофні пурпурові несіркові бактерії, які можуть бути використані для створення біотехнологічної схеми очищення води, забрудненої гідроген сульфідом.

Матеріали та методи

Проби води відбирали за методом Столбунова-Рябова у прибережній зоні Яворівського озера з глибини 1 м [7]. Їх висівали на чашки Петрі з модифікованим середовищем АТСС№1449 без додавання NaHCO_3 і вирощували упродовж 16 діб при 28 °С [4]. Анаеробні умови створювали з використанням генбоксів і кисеньпоглинаючих генераторів GENbox anaer (Франція). Відібрані штами бактерій культивували у рідкому модифікованому середовищі АТСС№1449 у пробірках об'ємом 20 мл, щільно закритих гумовими корками за температури 28 °С і рН 6,8–7,3 [4]. Як джерело світла використовували лампи розжарювання різної потужності. Інтенсивність освітлення вимірювали люксометром Ю-116. Біомасу клітин визначали турбідиметрично, використовуючи КФК–3, за довжини хвилі 660 нм.

Для дослідження використання бактеріями різних сполук сульфуру як донори електронів у середовище вносили натрій тіосульфат, натрій сульфід або елементну сірку. Для вивчення здатності бактерій засвоювати органічні сполуки як основне джерело карбону до середовища додавали у концентрації 12 мМ глюкозу, малат, гліцерол, пептон, дріжджовий екстракт, піруват натрію і ацетат натрію.

Морфологію клітин досліджуваних бактерій вивчали з використанням трансмісійного електронного мікроскопа ПЕМ–100–01 при напрузі 75 кВ і збільшеннях від 3 000 до 19 000 [3, 8]. Концентрацію гідроген сульфідну визначали фотометрично за утворенням метиленої сині [17].

Ідентифікацію фототрофних пурпурових бактерій проводили на основі морфологічних властивостей [5] і за результатами біоінформатичного аналізу *in silico* нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК. Пошук гомологів виконували з використанням програми BLASTN на сервері NCBI [12].

Для секвенування 16S-кодувальних послідовностей ДНК виділяли з 1 мл культури. Лізис клітин проводили протягом 5 хв за температури 65 °С розчином такого складу: 6 М гуанідин тіоціанат, 50 мМ натрій ацетат, 5 мМ ЕДТА, 5 % тритон X-100. Після цього в кожну пробірку додавали 25 мкл 0,1 % сіліки. Сорбент двічі відмивали розчином 70 % етанолу, висушували при 65 °С протягом 10 хв. Надалі ДНК зі сорбенту ресуспендували в 50 мкл трис-ЕДТА буферу (рН6,0) [6]. Виділену ДНК візуально виявляли методом електрофоретичного розділення та зберігали за температури -20 °С [13]. 16S рДНК ампліфікували зі сумарної ДНК штаму за допомогою дегенерованих праймерів 117F (5'GAGTTTGATCCTGGCTCAG3') та 1502R (5'GGCTACCTTGTTACGA3'). Амплікон очікуваного розміру (прибл. 1,5 т.п.н.) очищували за допомогою набору "QiaQuick" ("Qiagen", США) і далі секвенували методом Сенгера з використанням вищеописаних праймерів.

Результати і їхнє обговорення

Із проб води озера Яворівське було отримано нагромаджувальну культуру, в якій виявлено значну кількість невеликих вібродних клітин без внутрішньоклітинної сірки. Відсутність глобул сірки всередині клітини є однією з основних ознак пурпурових несіркових бактерій [5]. Було виділено чотири штами пурпурових несіркових бактерій. Для подаль-

ших досліджень було відібрано штамп Ya-2016, який найшвидше використовував гідроген сульфід зі середовища.

Як перший крок до ідентифікації культури несіркових фототрофних бактерій, виділеної з води Яворівського сіркового родовища, нами виконано секвенування консервативної ділянки гена 16S рРНК. Виявлено, що нуклеотидна послідовність останньої виявляє високу подібність (99 % ідентичних залишків у попарному вирівнюванні методом BLASTN) до 16S рРНК бактерій роду *Rhodopseudomonas*. Досліджуваний нами штамп позначено як *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016. Філогенетичний аналіз засвідчив, що найближчими до *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 виявилися бактерії *Rhodopseudomonas* sp. A7, *Rhodopseudomonas* sp. J5-3, *Rhodopseudomonas palustris* DX-1 (рис. 1). Водночас жоден зі секвенованих нині видів цього роду не є достатньо близьким до *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 на філогенетичному дереві (не лежать на одній кладі), аби стверджувати, що *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 належить до описаного виду.

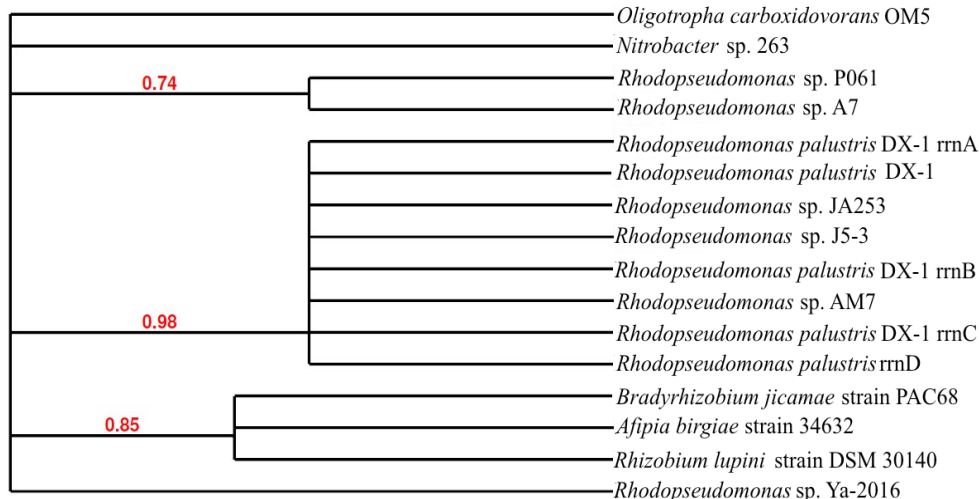


Рис. 1. Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК бактерій порядку *Rhizobiales*

Дерево обчислено на основі алгоритму максимальної вірогідності на сервері phylogeny.fr. Досліджувану послідовність позначено як *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016. Топологію дерева оцінено методом обчислення індексу aLRT (значення індексу наведено на кладах дерева, у частках від 1); знівельовано всі ноди зі значенням aLRT менше 0,5.

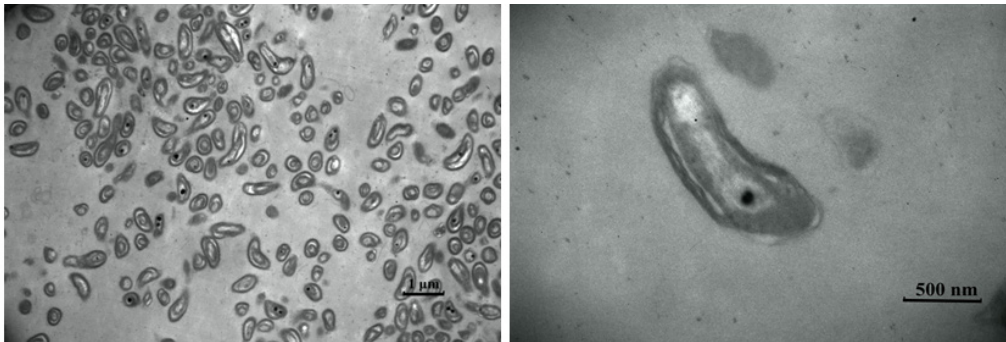
Бактерії *Rhodopseudomonas palustris* Ya-2010/A виділили із озера Яворівське раніше [2], тому цікаво було порівняти властивості обох штамів (див. таблицю). Бактерії роду *Rhodopseudomonas* здатні рости фототрофно або хемотрофно, причому найкращим типом метаболізму для них є фотогетеротрофія [5]. Встановлено, що бактерії *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 як основне джерело карбону можуть використовувати різні органічні сполуки: піруват натрію, ацетат натрію, гліцерол, малат, пептон, дріжджовий екстракт. Спостерігали незначний ріст у середовищі з глюкозою, пропіонатом і елементною сіркою (див. таблицю). Для росту досліджені бактерії потребують вітаміну B₁₂.

Необхідно зазначити, що ріст бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 пригнічувався за внесення NaCl (1 г/л), на відміну від *R. palustris* Ya-2010 [2]. У середовищі з натрій сульфідом і натрій гіосульфатом спостерігається значний приріст біомаси (1,2 і 1,4 г/л відповідно), на відміну від середовища з елементною сіркою.

Серед описаних у літературі пурпурових несіркових бактерій *Rhodopseudomonas blastica* і *Rhodocyclus purpureus* [15] є єдиними видами цієї групи мікроорганізмів, у яких не спостерігали руху. Клітини нового ізоляту, виділені з озера Яворівське, є рухомими, грамнегативними, не утворюють спор. При вирощуванні в рідкому середовищі культура має рожево-червоне забарвлення. Клітини вібриоїдної форми, поодинокі (рис. 2, А, Б), на відміну від паличкоподібних клітин *R. palustris* (Ya-2010). Після 10 діб культивування довжина клітин була від 1,5 до 1,8 мкм, а ширина від 0,4 до 0,46 мкм. Оптимальний ріст клітин спостерігали за температури +27...+30 °С і рН 6,8–7,3.

Порівняльна характеристика використання субстратів для фототрофного росту ізолятами *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 і *Rhodopseudomonas palustris* Ya-2010 («+» – наявність росту, «-» – відсутність росту, (+) – незначний ріст)

Субстрати	<i>Rhodopseudomonas</i> sp. Ya-2016	<i>R. palustris</i> Ya-2010 [2]
Гліцерол	+	-
Глюкоза	(+)	-
Малат	+	+
Піруват натрію	+	+
Ацетат натрію	+	+
Пропіонат	(+)	+
Натрій сульфід	+	+
Натрій тіосульфат	+	+
Елементна сірка	(+)	-
Дріжджовий екстракт	+	Не досліджували
Пептон	+	Не досліджували



А

Б

Рис. 2. Клітини виділених пурпурових несіркових бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 (електронна мікроскопія, x 3 000, А) та (електронна мікроскопія, x 19 000, Б)

Таким чином, на основі морфологічних властивостей, а також на основі аналізу *in silico* нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК можна стверджувати, що виділена культура належить до фототрофних несіркових бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016.

Автори публікації висловлюють подяку співробітникові міжкафедральної лабораторії фізичних методів дослідження у геології ЛНУ імені Івана Франка Ю. Р. Дацюку за допомогу в дослідженні ультраструктури клітин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гайдін А. М., Зозуля І. І. Нові озера Львівщини / Гірхімпром. Львів, 2009. 105 с.
2. Гнатуш С. О., Лаврик С. В. Характеристика пурпурових несіркових бактерій *Rhodopseudomonas palustris* з озера Яворівське (Україна) // Мікробіологія і біотехнологія. 2013. № 4. С. 24–25.

3. *Голдстейн Дж., Ньюбери Д., Эчлин П.* Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ: в 2-х кн. / пер. с англ. М.: Мир, 1984. 303 с.
4. *Гудзь С. П., Горішний М. Б., Гнатуш С. О.* Бактеріальний фотосинтез: навч. посіб.: [для студ. вищ. навч. закл.]. Львів: ЛНУ ім. І. Франка, 2011. 179 с.
5. *Определитель бактерий Берджи* / под ред. Дж. Хоулта, Р. Крига, П. Снита, Дж. Стейли и С. Уильямса. М.: Мир, 1997. 432 с.
6. *Полімеразна ланцюгова реакція в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб: навч.-метод. посіб. для лікарів / за ред. І. В. Дзюблик, Н. Г. Горовенко.* К.: НМАПО ім. П. Л. Шупика, 2012. 219 с.
7. *Родина А. Г.* Методы водной микробиологии: практ. руководство. М.; Л.: Наука, 1965. 363 с.
8. *Уикли Б. С.* Электронная микроскопия для начинающих / пер. с англ. М.: Мир, 1975. 338 с.
9. *Akiba T., Usmani R., Horikoshi K.* Rhodopseudomonas rutila, a new species of non-sulfur purple photosynthetic bacteria // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1983. Vol. 33. N 3. P. 551–556.
10. *Drews G., Imhoff J.-F.* Phototrophic purple bacteria // *Variations in Autotrophic Life.* Academic Press, London. 1991. P. 51–97.
11. *Frigaard N.-U., Dahl C.* Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria // *Adv. Microb. Physiol.* 2008. Vol. 54. P. 103–200.
12. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
13. <http://www.interlabservice.ru/about/amplisens>
14. *Nitschke W., Rutherford A.* Photosynthetic reaction centres: variations on a common structural theme? // *Trends Biochem.* 1991. Vol. 16. P. 241–245.
15. *Pfenning N., Truper G.* The Rhodospirillales (phototrophic or photosynthetic bacteria) // *In Handbook of Microbiology.* CRC Press. 1973. Vol. 1. P. 17–27.
16. *Sander J., Dahl C.* Metabolism of inorganic sulfur compounds in purple bacteria // *Advances in photosynthesis and respiration.* Springer, Dordrecht. 2008. Vol. 28. P. 595–622.
17. *Sugiyama M.* Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen sulfide // *United States Patent.* 2002. № 6340596.

Стаття: надійшла до редакції 21.10.16

доопрацьована 13.02.17

прийнята до друку 15.02.17

IDENTIFICATION OF PURPLE NON- SULFUR BACTERIA OF *RHODOPSEUDOMONAS* SP. Ya-2016

O. Tarabas, S. Hnatush, B. Ostash, G. Mutenko, O. Koshla

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: otarabas@gmail.com*

Pure culture of purple non-sulfur photosynthetic bacteria was isolated from waters of lake Yavorivske (Lviv region, Ukraine), which was formed as a result of flooding of the sulfur career. The suspension of the selected isolate Ya-2016 is of pinkish-red colour. Vibrioid cells are gramnegative, motile and incapable to form spores. The cells size is 1,5–1,8 x 0,4–0,46 μm . The photosynthetic membrane systems of this strain is of the vesicular type.

Growth of bacteria was inhibited by introducing NaCl (1 g/l). These bacteria use sodium sulfide, sodium thiosulfate and a number of organic compounds as substrates for phototrophic growth. Vitamin B₁₂ is required as the growth factor. The nucleotide sequence of conservative area of 16S rRNA gene shows high similarity (99 % identical residues in pairwise alignment method BLASTN) to the 16S rRNA bacteria of the genus of *Rhodopseudomonas*. Based on the research of morphophysiological characteristics and the analysis of nucleotide sequences of 16S rRNA gene the purple photosynthetic bacterial strain Ya-2016, isolated from lake Yavorivske, has been identified as *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016.

Keywords: phototrophic bacteria, purple nonsulfur bacteria, *Rhodopseudomonas* sp.