



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

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ВЛАСТИВОСТІ ФОТОСИНТЕЗУВАЛЬНИХ ПУРПУРОВИХ СІРКОВИХ БАКТЕРІЙ РОДУ *THIORHODOCOCCUS* SP., ВИДІЛЕНИХ ІЗ ОЗЕРА САКСЬКЕ (АР КРИМ)

С. Гнатуш¹, С. Лаврик², І. Медина³

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

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

³Середземноморський Інститут Нейробиології (INMED/INSERM), Марсель, Франція

Із мулу та води Сакського озера (АР Крим) виділено фотосинтезувальні бактерії, суспензії яких мають червоно-коричневе забарвлення. Бактерії використовують гідроген сульфід у процесі аноксигенного фотосинтезу і нагромаджують у клітинах елементну сірку. За фізіолого-біохімічними і фізіологічними властивостями вони належать до родини *Chromatiaceae*. За результатами аналізу нуклеотидних послідовностей фрагментів гена, який кодує 16S рНК з використанням програми BLASTN, показано, що проаналізована послідовність нуклеотидів штаму *Sa-2010/A* є ідентичною на 94% до *Thiohalocapsa halophila*, *Thiorhodococcus bheemlicus*, *Marinimicrobium koreense*, *Marichromatium bheemlicum*, на 93% до *Thiorhodococcus minor*, *Thiorhodovibrio winogradskyi*, які належать до домену Gammaproteobacteria. На основі дослідження морфофізіологічних характеристик і аналізу нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК пурпурові фотосинтезувальні бактерії штаму *Sa-2010/A*, виділені з води Сакського озера (АР Крим), належать до роду *Thiorhodococcus*.

Ключові слова: пурпурові фотосинтезувальні бактерії, внутрішньоклітинна сірка, *Chromatiaceae*, *Thiorhodococcus*.

ВСТУП

Сакське озеро є цікавим природним біотопом. Воно утворилось із затоки Чорного моря, постійно підживлюється морською водою, тому, очевидно, його мікрофлора близька до мікрофлори морських акваторій. Мул і вода містять значну кількість сірководню, незважаючи на невелику середню глибину водойми (0,8 м). Крім того, вода є сильно мінералізованою (250–280 г/л), з високим вмістом натрію хлориду [2]. Пурпурові фотосинтезувальні сіркобактерії мають унікальну здатність утилізувати токсичний сірководень, нагромаджуючи у клітинах елементну сірку.

Тому ці бактерії є природним біофільтром у водоймах із високим вмістом сірководню, а отже, мають важливе екологічне значення.

Метою нашої роботи було виділити й ідентифікувати пурпурові сіркові бактерії Сакського озера (АР Крим), які характеризуються швидкою утилізацією сірководню та нагромадженням значних кількостей елементної сірки.

Ідентифікація, встановлення філогенетичних зв'язків, вивчення фізіологічних особливостей пурпурових фотосинтезувальних сіркобактерій, виділених у різних куточках світу (Індія, Швейцарія, Росія, Японія, Ізраїль), є темами численних наукових досліджень [7, 10, 14–16, 19].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проби води і мулу відбирали за методом Столбунова–Рябова у прибережній зоні східного басейну Сакського озера глибиною 0,5 м (АР Крим, Україна), використовуючи горизонтальний пластиковий батометр ємністю 1 л [6].

Нагромаджувальні та чисті культури виділених штамів отримували і культивували у рідкому й агаризованому середовищах Ван Ніля у пробірках і на чашках Петрі. Анаеробні умови створювали з використанням генбоксів і киснепоглинальних генераторів GENbox anaer (Франція) [5]. Як джерело світла використовували лампи розжарювання різної потужності. Інтенсивність освітлення вимірювали люксометром Ю-116. Оптимальні для росту температуру, значення рН та потребу бактерій у вітаміні B₁₂ визначали у рідкому середовищі Ван Ніля. Вивчення здатності досліджуваних бактерій асимілювати органічні речовини та сполуки сульфуру здійснювали згідно з рекомендованими стандартами опису нових видів аноксигенних фототрофних бактерій [14].

Біомасу клітин визначали турбідиметрично на фотоколориметрі КФК-3 [5]. Концентрацію HS⁻ у середовищі визначали фотоколориметрично за утворенням метиленової сині [24]. Вміст внутрішньоклітинної елементної загальної сірки вимірювали спектрофотометрично за методом Ван Гемердена [12]. Кількісне визначення вмісту сульфатів проводили турбідиметрично [23]. Якісний і кількісний склад пігментів визначали як описано [4]. Спектри поглинання інтактних клітин і екстрагованих із 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 [20].

Очищення й ампліфікацію 16S ДНК проводили як описано [9]. Очищену 16S ампліфікували, використовуючи ПЛР. При цьому праймерами були: B27F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG; U1492R: GGT TAC CTT GTT ACG ACT T. Визначення первинної структури ампліфікованих фрагментів ДНК проводили на GATC Biotech AG (Konstanz, Germany), використовуючи такі праймери: 337F: GAC TCC TAC GGG AGG CWG CAG; 518R: GTA TTA CCG CGG CTG CTG G; 928F: TAA AAC TYA AAK GAA TTG ACG GG.

Для встановлення приналежності досліджуваних бактерій до певного роду чи виду отриману нуклеотидну послідовність гена 16S ДНК порівнювали з уже відомими нуклеотидними послідовностями різних видів мікроорганізмів [7, 14].

Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням програми OriginPro 7.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

У нагромаджувальних культурах пурпурових фотосинтезувальних бактерій, отриманих із відібраних проб о. Сакське, у процесі світлової мікроскопії було виявлено бактерії, різні за розмірами, формою, рухливістю. Серед них переважали округлі з добре видимими глобулами сірки у цитоплазмі.

Згідно з літературними даними, сірку у клітинах за росту на середовищі із гідроген сульфід-іоном нагромаджують представники родини *Chromatiaceae*. Бактерії, що характеризуються кулястою чи округлою формою клітин і найчастіше виділяються із морських маршів, озер, ставків морського походження, є представниками родів *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thiohalocapsa*, *Thiococcus*, *Thiorhodococcus*, *Thioflavicoccus*, *Thioalkalicoccus* тощо [15].

Надалі отримували поодинокі колонії пурпурових фотосинтезувальних бактерій. Для цього осад із нагромаджувальних культур висівали на агаризоване середовище Ван Ніля. Щоб уникнути розвитку пурпурових несіркових бактерій, у середовище органічних сполук не вносили, а як єдине джерело карбону додавали натрій гідрокарбонат. Крім того, для приготування культурального середовища використовували агар, відмитий дистильованою водою. Для подальшої роботи використовували штами, клітини яких були круглої форми з добре видимими глобулами сірки. Відібрані зразки перевіряли на чистоту під світловим мікроскопом і повторно розсівали. Після багаторазових пересівів було отримано чотири штами, клітини яких були круглої форми, рухомі, добре росли за анаеробних умов і використовували гідроген сульфід як донор електронів у процесі фотосинтезу. Суспензії цих бактерій характеризувалися червоно-коричневим забарвленням. Штамам дали робочі назви: *Sa 2010/A*, *Sa 2010/B*, *Sa 2010/C*, *Sa 2010/D*.

Для подальших досліджень відбирали штам, який найшвидше утилізував гідроген сульфід-іон і нагромаджував сірку у клітинах. Як видно з рис. 1, гідроген сульфід-іон у середовищі на другу добу росту бактерій був відсутній лише у штаму *Sa-2010/A*. Використовуючи гідроген сульфід-іон, ці бактерії нагромадили 0,21 г сірки на 1 г сухої маси клітин, причому приріст вмісту сірки у їхніх клітинах також

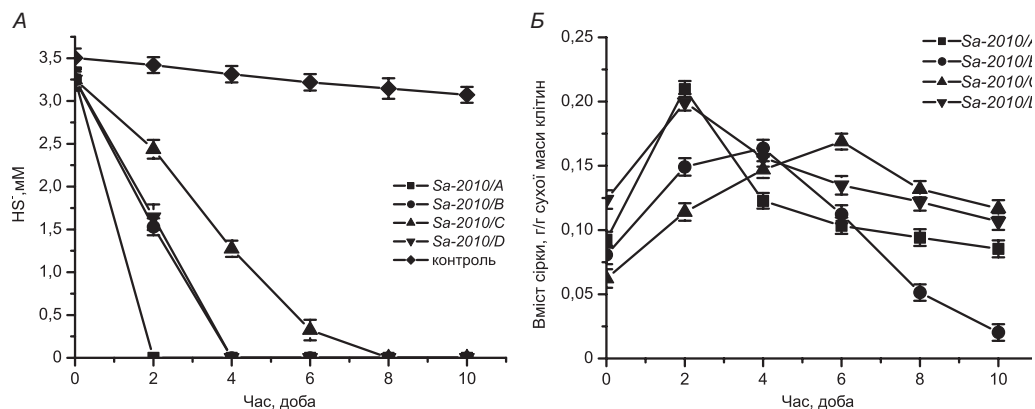


Рис. 1. Утилізація гідроген-сульфід іона (А) та нагромадження елементної сірки (Б) різними штамами пурпурових сіркових бактерій, вирощених за фотолітоавтотрофних умов

Fig. 1. The hydrogen sulfide-ion utilization (A) and elemental sulfur accumulation (B) by different strains of purple sulfur bacteria cultivated under photolithoautotrophic conditions

був найвищим серед усіх досліджуваних штамів. Тому в подальшій роботі використовували пурпурові сіркобактерії штаму *Sa-2010/A*.

Як відомо, найбільш достовірним методом ідентифікації бактерій вважають аналіз нуклеотидної послідовності генів, що кодують синтез 16S рНК і порівняння із відомими послідовностями типових представників певних видів [14]. Для встановлення приналежності виділених пурпурових сіркових бактерій штаму *Sa-2010/A* було проведено аналіз одержаних нуклеотидних послідовностей за допомогою програми BLASTN, порівнюючи їх із гомологічними депонованими у GenBank нуклеотидними послідовностями гена 16S рНК (табл. 1).

Таблиця 1. Ідентифікація штаму *Sa-2010/A* пурпурових фотосинтезувальних бактерій за результатами BLASTN-аналізу

Table 1. The identification of *Sa-2010/A* strain of purple sulfur bacteria by BLASTN-analysis

Штам	Довжина фрагмента, пн	Ідентичність, %	Вид, із яким порівнювали	Код GenBank
<i>Sa-2010/A</i>	178	94	<i>Thiohalocapsa halophila</i>	NR 028863.1
<i>Sa-2010/A</i>	178	94	<i>Thiorhodococcus bheemlicus</i>	NR 042524.1
<i>Sa-2010/A</i>	178	94	<i>Marinimicrobium koreense</i>	NR 043222.1
<i>Sa-2010/A</i>	178	94	<i>Marichromatium bheemlicum</i>	NR 042477.1
<i>Sa-2010/A</i>	178	93	<i>Thiorhodococcus minor</i>	NR 026398.1
<i>Sa-2010/A</i>	178	93	<i>Thiorhodovibrio winogradskyi</i>	NR 037050.1

Згідно з отриманими даними, проаналізована послідовність нуклеотидів штаму *Sa-2010/A* є ідентичною на 94% до *Thiohalocapsa halophila*, *Thiorhodococcus bheemlicus*, *Marinimicrobium koreense*, *Marichromatium bheemlicum*, на 93% до *Thiorhodococcus minor*, *Thiorhodovibrio winogradskyi*, які належать до домену Gammaproteobacteria.

Високий рівень спорідненості нуклеотидних послідовностей ще не свідчить про приналежність виділеного штаму до певного роду чи виду. Наприклад, при ідентифікації пурпурових сіркобактерій штаму JA132^T ступінь спорідненості з видом *Thiorhodococcus drewsi* становив 96%, проте досліджувані бактерії мали суттєві відмінності за морфологічними характеристиками і були описані як новий вид *T. bheemlicus* [8].

Тому для ідентифікації досліджуваних бактерій, поряд із молекулярно-генетичними дослідженнями, ми провели вивчення морфологічних характеристик штаму *Sa-2010/A* [14, 15].

Суттєвою діагностичною ознакою є стійкість до NaCl, бо вона може бути різною у близьких видів сіркобактерій, наприклад, *Thiorhodococcus minor* розвивається при 0,5–9% натрій хлориду, в той час як *T. kakinadensis* – лише при 1–2% цієї сполуки у середовищі [8, 19].

Згідно з результатами досліджень, поданими на рис. 2, пурпурові сіркобактерії *Sa-2010/A* росли за підвищених концентрацій натрій хлориду, подібно до *T. minor*, *T. drewsi* [8, 22], й утилізували водень сульфід-іон. Проте за вмісту натрій хлориду вище 4% спостерігали певне зниження приросту біомаси, причому за 6% натрій хлориду помітно знижувався не лише приріст біомаси, а й швидкість утилізації

гідроген сульфід-іону, що може свідчити про негативний вплив такої концентрації на життєдіяльність бактерій штаму *Sa-2010/A*.

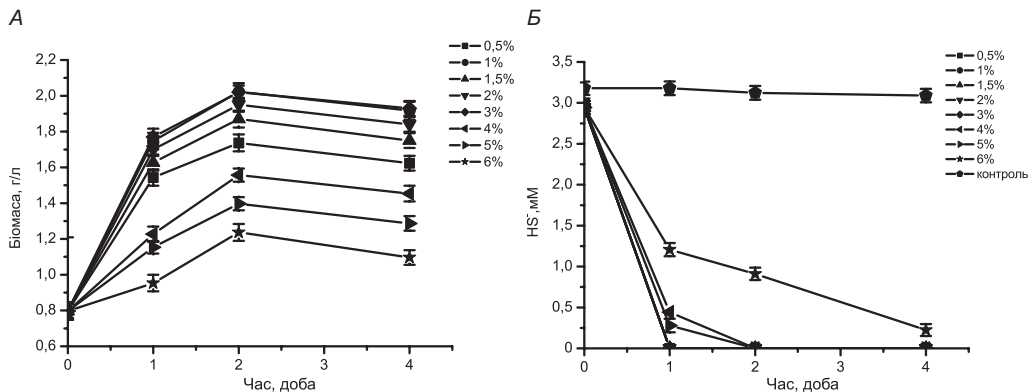


Рис. 2. Нагромадження біомаси (А) та утилізація гідроген сульфід-іона (Б) пурпуровими сіркобактеріями *Sa-2010/A* за різної концентрації NaCl (%); контроль – вміст гідроген сульфід-іона у стерильному середовищі

Fig. 2. The biomass accumulation (A) and hydrogen sulfide-ion utilization (Б) by purple sulfur bacteria *Sa-2010/A* under different concentration of NaCl (%); control – changes of hydrogen sulfide-ion concentration in the sterile medium

Дослідження впливу MgCl₂ показало, що зростання концентрації магній хлориду до 0,5%, тобто фактично у десять разів, не впливало на нагромадження біомаси і утилізацію гідроген сульфід-іона бактеріями *Sa-2010/A* (рис. 3). Лише при 0,6% MgCl₂×6H₂O у середовищі росту досліджувані бактерії нагромаджували меншу біомасу і трохи повільніше утилізували гідроген сульфід-іон.

Таким чином, штам *Sa-2010/A* характеризується підвищеною стійкістю до хлоридів натрію та магнію.

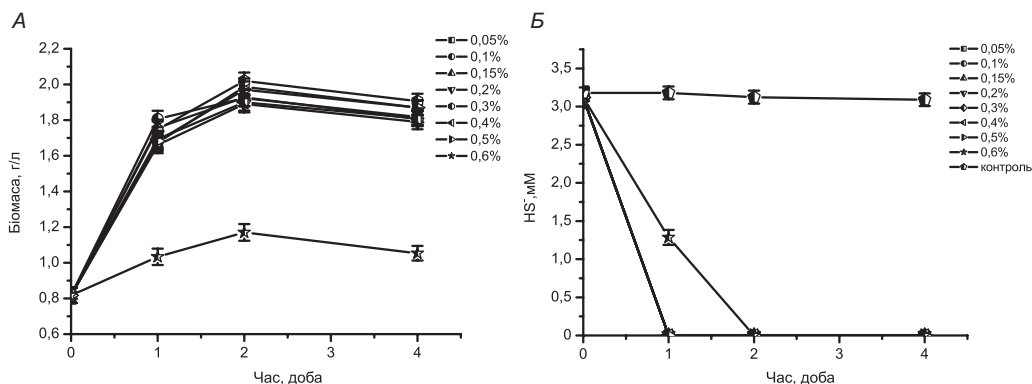


Рис. 3. Нагромадження біомаси (А) й утилізація гідроген сульфід-іона (Б) пурпуровими сіркобактеріями *Sa-2010/A* за різної концентрації MgCl₂×6H₂O (%); контроль – вміст гідроген сульфід-іона у стерильному середовищі

Fig. 3. The biomass accumulation (A) and hydrogen sulfide-ion utilization (Б) by purple sulfur bacteria *Sa-2010/A* under different concentration of MgCl₂×6H₂O (%); control – changes of hydrogen sulfide-ion concentration in the sterile medium

Бактерії з експоненціальної фази росту, вирощені у фотолітотрофних умовах за внесення натрій сульфідіду як донора електронів, досліджували за допомогою електронного мікроскопа. У клітинах бактерій *Sa-2010/A* (рис. 4) виявили внутрішньоклітинні мембрани везикулярного типу та гранули сірки, оточені білковою оболонкою.

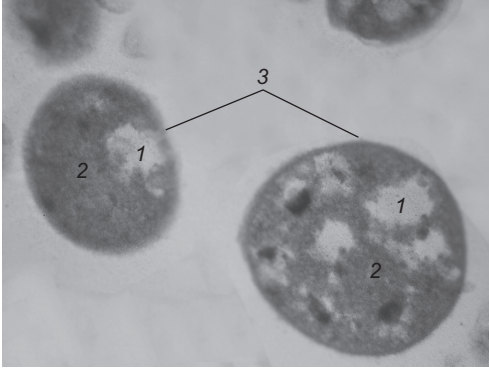


Рис. 4. Ультратонкий зріз клітин пурпурових сіркобактерій штаму *Sa-2010/A*, вирощених у середовищі з гідроген сульфід-іоном, до середини експоненційної фази росту (електронна мікроскопія, $\times 10\ 000$, масштаб 1:10 000). 1 – сіркова глобула; 2 – фотосинтезувальні везикули; 3 – цитоплазматична мембрана

Fig. 4. The ultrathin section of purple sulfur bacteria cells of strain *Sa-2010/A* cultivated in the medium with hydrogen sulfide-ion (increase $\times 10\ 000$, scale 10.000). 1 – protein membrane; 2 – photosynthetic vesicles; 3 – sulfur globe

Як відомо, пігментний склад відрізняється у різних видів фотосинтезувальних бактерій, а тому є обов'язковою характеристикою при ідентифікації до роду і виду [1, 14].

Основні абсорбційні максимуми поглинання інтактних клітин штаму *Sa-2010/A* з логарифмічної фази росту становили 360, 505, 520, 590, 810 і 860 нм (рис. 5), що могло свідчити про наявність у досліджуваних бактерій бактеріохлорофілу *a*, родопіну та каротиноїдів спірилоксантинової групи [3, 7].

Порівняння результатів аналізу тонкошарової хроматографії (табл. 2) та спектрального аналізу інтактних клітин штаму *Sa-2010/A* пурпурових сіркобактерій (рис. 5) з даними літератури дало змогу ідентифікувати бактеріохлорофіл *a*, родопін, лікопін і спірилоксантин.

Таблиця 2. Хроматографічна характеристика пігментного складу пурпурових сіркобактерій штаму *Sa-2010/A*

Table 2. The chromatographical characteristics of purple sulfur bacteria pigment in *Sa-2010/A* strain

Назва пігменту	Забарвлення	Абсорбційний максимум, нм	Значення <i>R_f</i>	Максимуми поглинання пігментів у органічних розчинниках, нм (згідно з літературними даними [1, 6])
Бактеріохлорофіл <i>a</i>	яскраво-зелене	772	0,28	770
Лікопін	оранжеве	451, 507	0,53	448, 474, 505
Спірилоксантин	рожеве	463, 494	0,82	465, 491, 526
Родопін	яскраво-червоне	447, 520	0,85	445, 483, 516

Хоча фотолітоавтотрофія є основним типом метаболізму у пурпурових сіркобактерій, ріст багатьох видів цих мікроорганізмів стимулює внесення органічних сполук. За культивування на світлі у анаеробних умовах вони використовуються бактеріями як додаткові джерела карбону [1, 13, 19].

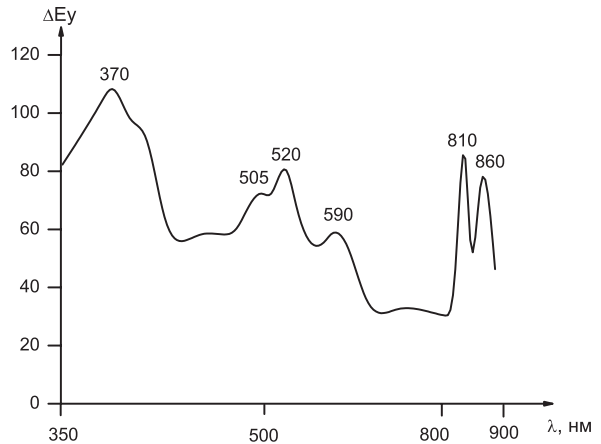


Рис. 5. Спектр поглинання інтактних клітин штаму *Sa-2010/A* пурпурових сіркобактерій

Fig. 5. Absorption spectrum of living purple sulfur bacteria cells of *Sa-2010/A* strain

Виділені нами пурпурові сіркові бактерії можуть використовувати різні органічні субстрати під час фототрофного росту у присутності гідрокарбонату і гідроген сульфїду (табл. 3).

Таблиця 3. Ріст пурпурових сіркобактерій штаму *Sa-2009/A* за внесення деяких органічних сполук як додаткових джерел карбону

Table 3. Growth of purple sulfur bacteria of *Sa-2010/A* strain after the addition of some organic compounds as supplementary carbon sources

Органічна сполука	Наявність/відсутність стимулювання росту
Контроль*	+
Глюкоза	+
Фруктоза	+
Лактоза	+
Мальтоза	+
Рамноза	+
Ацетат	+
Піруват	+
Фумарат	+
Пропіонат	+
Лактат	+
Стеарат	-
Маніт	+
Сорбіт	-
Інозит	+
Етанол	+
Пропанол	+
Гліцерол	+
Дріжджовий екстракт	+

Примітка: контроль* – ріст бактерій на середовищі Ван Ніля з гідроген сульфїдом і гідрокарбонатом; «+» – стимулювала ріст; «-» – не впливала.

На відміну від несіркових, пурпурові сіркові бактерії, асимілюючи відновлені сполуки сульфуру у процесі фотосинтезу, відкладають у клітинах глобули сірки. Вона є резервною речовиною і за потреби використовується як ендогенний донор у фотосинтезувальних реакціях [1].

За росту у фотолітоавтотрофних умовах клітини штаму *Sa-2010/A* найбільше сірки містили на другу добу культивування (рис. 6). Зокрема, її кількість зросла з 0,092 г (на початку культивування) до 0,19 г на 1 г сухої маси клітин. За перші 48 год росту бактерії використали весь гідроген сульфід-іон і надалі використовували як донор електронів внутрішньоклітинну сірку, внаслідок чого її кількість зменшувалася. Натомість, у середовищі з'являлися сульфати – кінцеві метаболіти фотосинтезувальної асиміляції відновлених сполук сульфуру. На 10 добу культивування їхня кількість досягла 2,2 ммоль.

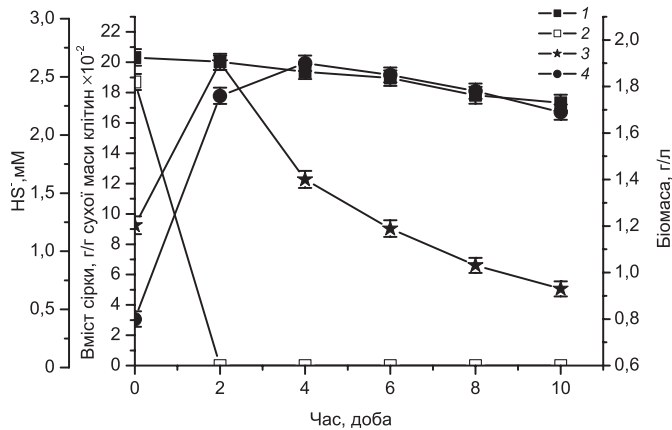


Рис. 6. Утилізація гідроген сульфід-іону (2) та нагромадження внутрішньоклітинної елементарної сірки (3) бактеріями штаму *Sa-2010/A* у процесі росту (4) за фотолітоавтотрофних умов; концентрація гідроген сульфід-іону у середовищі без клітин (1)

Fig. 6. The hydrogen sulfide-ion utilization (2) and intracellular sulfur accumulation (3) by purple sulfur bacteria *Sa-2010/A* strain during photolithoautotrophic growth (4) changes of hydrogen sulfide-ion concentration in the sterile culture medium (1)

Оптимальна інтенсивність освітлення для штаму *Sa-2010/A* становить 1400–1500 люкс. Бактерії росли і в темряві за анаеробних умов у присутності глюкози. Оптимальне значення температури для виділених штамів +25–30°C, рН 7–8 (табл. 4). Пурпурові сіркові бактерії штаму *Sa-2010/A* не потребують внесення вітаміну B₁₂ у середовище, хоча його присутність дещо покращує їхній ріст.

Як відомо, донорами електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу у пурпурових сіркобактерій можуть бути різноманітні відновлені сполуки сірки. Пурпурові сіркові бактерії штаму *Sa-2009/A* у процесі аноксигенного фотосинтезу асимілюють тіосульфат, елементарну сірку та сірководень. Причому вони є досить стійкими до впливу останнього: ростуть за концентрації 2–9 мМ гідроген сульфід-іону у середовищі.

Результати дослідження морфологічних характеристик штаму *Sa-2010/A* наведені у табл. 4. Клітини виділених пурпурових фотосинтезувальних бактерій – круглі, рухомі, без газових вакуолей, їхні фотосинтезувальні мембрани везикулярного типу. Забарвлення суспензії – коричнево-червоне, основні пігменти бактеріо-

хлорофіл *a* та каротиноїди спірилоксантинової групи. Оптимальний вміст NaCl у середовищі 1–3%, рН 7–8, найкраще ростуть за температури +25...+30°C. У процесі фотосинтезу використовують гідроген сульфід, тіосульфат, сірку. Здатні фотосинтезувати низку органічних сполук, ростуть анаеробно у темряві, за аеробних умов не розвиваються. За цими характеристиками властивості досліджуваного штаму відповідають властивостям бактерій роду *Thiorhodococcus* [22].

Таблиця 4. Морфологічна характеристика пурпурових сіркобактерій штаму Sa-2010/A

Table 4. The morphophysiological characteristics of purple sulfur bacteria of Sa-2010/A strain

Тип ознаки	Характеристика ознаки	
	штам Sa-2010/A	бактерії роду <i>Thiorhodococcus</i>
Морфологія клітин	круглі, диплококи, рідше у ланцюжках по кілька клітин, грамнегативні	круглі, переважно диплококи, іноді ланцюжки чи тетради, грамнегативні
Розмір клітин, мкм	3–6	від 1,0–2,0 до 4-6
Рухливість	рухомі	рухомі
Наявність: капсул газових вакуоль	+ –	+ –
Тип внутрішніх цитоплазматичних мембран	везикулярний	везикулярний
Утворення сірки всередині клітини	+	+
Забарвлення суспензії клітин	червоно-коричневе	коричнево-оранжеве, червоно-коричневе, пурпурово-фіолетове
Основні пігменти	бактеріохлорофіл <i>a</i> , каротиноїди спірилоксантинової серії	бактеріохлорофіл <i>a</i> , каротиноїди спірилоксантинової серії
Оптимальне значення: температури, °C освітленості, люкс рН сульфіду, мМ NaCl, % MgCl, %	25–30 1400–1500 7–8 3–5 1,0–3,0 0,15–0,2	25–35 не вказано 6,5–7,5 не вказано 0,5–3 не вказано
Донор електронів: сульфід тіосульфат сірка	+ + +	+ +/- +/-
Ріст у темряві: аеробні умови анаеробні умови	- +	- +
Відношення до кисню	строгий анаероб	строгий анаероб

Таким чином, за результатами молекулярно-генетичних досліджень і на основі вивчення морфофізіологічних характеристик, пурпурові фотосинтезувальні бактерії штаму Sa-2010/A, виділені з води та мулу Сакського озера (АР Крим), які характеризуються швидкою утилізацією сірководню і нагромадженням значних кількостей елементарної сірки, належать до роду *Thiorhodococcus*.

ПОДЯКИ

Автори роботи вдячні за практичну допомогу під час проведення експериментальних досліджень завідувачеві міжфакультетської лабораторії електронної мікроскопії к.б.н. О. Р. Кулачковському і завідувачеві міжкафедральної лабораторії спектрофотометричних методів у біології к.б.н. А. М. Федоровичу.

1. Кондратьева Е.Н. **Фотосинтезирующие бактерии**. Москва: Изд-во Москов. ун-та, 1989. 346 с.
2. Ксензенко В.И. **Технология брома и иода**. Москва: Наука, 1960. 304 с.
3. Кушкевич І.В., Гнатуш С.О., Гудзь С.П. Зміна деяких фізіолого-біохімічних властивостей *Thiocapsa roseopersicina* за впливу різних концентрацій кадмій сульфату. **Вісник Одеськ. нац. ун-ту**, 2008; 13(4): 177–189.
4. Мусієнко М.М., Паршикова Т.В., Славний П.С. **Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин**. Київ: Фітосоціоцентр, 2001. 200 с.
5. Павлова Ю.О., Гудзь С.П. Бактерії родини *Chromatiaceae*, виділені з озера «Яворівське» Язівського сіркового родовища. **Вісник Харк. нац. ун-ту. Сер. біол.**, 2008; 7(14): 148–154.
6. Родина А. Г. **Методы водной микробиологии**. Практ. руководство. М.:Л.: Наука, 1965. 363 с.
7. Хоулт Д., Криг Н., Снит П. и др. **Определитель бактерий Берджи**. Москва: Мир, 1997. 540 с.
8. Anil Kumar P. Sasi Jyothsna, Srinivas T. et al. Two novel species of marine phototrophic Gammaproteobacteria: *Thiorhodococcus bheemlicus* sp. nov. and *Thiorhodococcus kakina-densis* sp. nov. **JSEM**, 2007, 57(11): 2458–2461.
9. Barns S.M, Pelletier D.A, Lane D.J. Weisburg W.G. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol**, 1991, 173(2): 697–703.
10. Britton G. General carotenoid methods. **Meth. Enzymol**, 1985; 3(B): 113–145.
11. Bryantseva I.A., Gorlenko V.M., Kompantseva E.I. *Thiorhodospira sibirica* gen.nov., sp. nov., a new alkaliphilic purple sulfur bacterium from a Siberian soda lake. **J. Syst. Bacteriol**, 1999; 49: 69–703.
12. Gernerden H. Growth measurements of Chromatium cultures. **Arhiv. Mikrobiol**, 1968; 64: 103–110.
13. Gorlenko V.M., Bryantseva I.A, Rabold S. et al. *Ectothiorhodospira variabilis* sp. nov., an alkaliphilic and halophilic purple sulfur bacterium from soda lakes. **JSEM**, 2009, 59(4): 658–64.
14. Imhoff J. Caumette P. Recommended standards for description of new species of anoxygenic phototrophic bacteria. **J. Syst. Bacteriol**, 2004; 54: 1415–1421.
15. Imhoff J., Suling J., Petri R. Phylogenetic relationships among the *Chromatiaceae*, their taxonomic reclassification and description of the new genera *Allochromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thiococcus*, *Thiohalocapsa* and *Thermochromatium*. **JSEM**, 1998, 48 (4): 1129–1143.
16. Koizumi Y., Kojima K., Oguri K. Vertical and temporal shifts of microbial communities in the water column and sediment of saline meromictic Lake Kaiike (Japan), as determined by a 16S rDNA-based analysis, and related to physicochemical gradients. **Appl. Environ. Microbiol**, 2004; 6: 622–637.

17. Peduzzi S., Welsh A., Demarta A. et al. *Thiocystis chemoclinalis* sp. nov. and *Thiocystis cadagnonensis* sp. nov., motile purple sulfur bacteria isolated from the chemocline of a meromictic lake. **JSEM**, 2011, 61(7):1682–1687.
18. Puchkova N. N., Imhoff J. F., Gorlenko V. M. *Thiocapsa litoralis* sp. nov., a new purple sulfur bacterium from microbial mats from the White Sea. **JSEM**, 2000, 50 (4): 1441–1447.
19. Rabold S., Gorlenko V., Imhoff J. *Thiorhodococcus mannitoliphagus* sp. nov., a purple sulfur bacterium from the White Sea. **JSEM**, 2006, 56(8): 1945–1951.
20. Reynolds E.S. The use of lead citrate at pH as an electronopaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol**, 1963; 17: 208–212.
21. Sorensen K., Canfield D., Oren A. Salinity responses of benthic microbial communities in a solar saltern (Eilat, Israel). **Appl. Environ. Microbiol**, 2004; 70(3): 1608–1616.
22. Zaar A., Fuchs G., Golecki JR., Overmann J. A new purple sulfur bacterium isolated from a littoral microbial mat, *Thiorhodococcus drewsii* sp. nov. **Arch Microbiol**, 2003, 179(3): 174–183.
23. **ГОСТ 26426-85. Почвы. Метод определения ионов сульфата в водной вытяжке.** Москва: Изд-во стандартов, 1985.
24. **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. 9 с.

IDENTIFICATION AND PROPERTIES OF THE PURPLE PHOTOSYNETIC SULFUR BACTERIA OF GENUS *THIORHODOCOCCUS* ISOLATED FROM SAKI LAKE (AR CRIMEA)

S. Hnatush¹, S. Lavryk², I. Medyna³

¹Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

²Pedagogical college of Ivan Franko National University of Lviv
7, Tuhan-Baranovsky Street, 7, Lviv 79005, Ukraine
e-mail: sofi_lavryk@email.ua

³Mediterranean Institute of Neurobiology (INMED/INSERM), Marseilles, France

The phototrophic bacteria were isolated from water and silt of Saki lake (AR Crimea). They were brown-red coloured. These bacteria used hydrogen sulfide in anaerobic photosynthetic process and stored elemental sulfur inside the cells. According to physiological, biochemical, morphological properties, these bacteria were ascribed to *Chromatiaceae* family.

The 16S DNA gene sequence analysis based on using BLASTN program revealed that investigated consecution has 94% similarity to *Thiohalocapsa halophila*, *Thiorhodococcus bheemlicus*, *Marinimicrobium koreense*, *Marichromatium bheemlicum*, and 93% similarity to *Thiorhodococcus minor*, *Thiorhodovibrio winogradsky* of Gammaproteobacteria domain. Based on the study of morphological, physiological characteristics and 16S rRNA nucleotide gene sequences, phototrophic purple bacteria of Sa-2010/A strain from water of Saki lake (AR Crimea) belong to *Thiorhodococcus* genus.

Keywords: purple sulfur bacteria, intracellular sulfur, *Chromatiaceae*, *Thiorhodococcus*.

ИДЕНТИФАКАЦИЯ И СВОЙСТВА ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ПУРПУРНЫХ СЕРОБАКТЕРИЙ РОДА *THIORHODOCOCCLUS* ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОЗЕРА САКСКОЕ (АР КРЫМ)

С. Гнатуш¹, С. Лаерик², І. Медина³

¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевського, 4, Львов 79005, Украина

²Педагогический колледж Львовского национального университета имени Ивана Франко
ул. Туган-барановского, 7, Львов 79005, Украина
e-mail: sofii_lavryk@email.ua

³Средиземноморский Институт Нейробиологии (INMED/INSERM) Марсель, Франция

Из воды и ила Сакского озера (АР Крым, Украина) были выделены фотосинтезирующие бактерии, суспензии которых имели выраженный красно-коричневый цвет. Выделенные бактерии использовали сероводород в процессе аноксигенного фотосинтеза и как промежуточный продукт откладывали внутриклеточные глобулы серы. По морфофизиологическим характеристикам исследуемые бактерии были отнесены к семейству *Chromatiaceae*.

По результатам анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рПНК с использованием программы BLASTN, показано, что проанализированная последовательность на 94% идентична *Thiohalocapsa halophila*, *Thiorhodococcus bheemlicus*, *Marinimicrobium koreense*, *Marichromatium bheemlicum*, на 93% – *Thiorhodococcus minor*, *Thiorhodovibrio winogradskyi*, которые относятся к домену Gamma-proteobacteria.

На основании исследования морфофизиологических характеристик и анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рПНК пурпурные фотосинтезирующие бактерии штамма Sa-2010/A, выделенные из воды Сакского озера (Крым), отнесены к роду *Thiorhodococcus*.

Ключевые слова: пурпурные фотосинтезирующие бактерии, внутриклеточная сера, *Chromatiaceae*, *Thiorhodococcus*.

Одержано: 26.07.2012