

1 (48) 1995

Биол. журн. Армении, 1 (48) 1995

УДК 579.846

НОВАЯ ФАКУЛЬТАТИВНО АВТОТРОФНАЯ ТИОСУЛЬФАТОКИСЛЯЮЩАЯ БАКТЕРИЯ ИЗ СУЛЬФИДНЫХ МЕСТОРОЖДЕНИЙ АРМЕНИИ

Н.С. ВАРТАНЯН, Э.К. АФРИКЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Из проб отвала руды Тандзутского месторождения выделена новая грамотрицательная бактерия, способная окислять тиосульфат в автотрофных условиях. Окисление бактериями тиосульфата стимулируется в присутствии органических веществ. Бактерии проявляют также способность к гетеротрофному росту на глюкозе, дрожжевом экстракте и гидролизате казеина.

Бактерия мезофильная с оптимумом pH 7,0. При начальном значении pH ниже 6,0 и выше 8,8 бактерии не развиваются. Однако при росте способны снижать pH среды до 4,7.

Предполагается, что выделенная бактерия представляет собой новый подвид факультативно автотрофных тионовых бактерий, окисляющих тиосульфат.

Տանձուտի հանքավայրի հանքարարյունը բաղկենքի նմանեցրեց անջատվել է նոր գրամացրողական բակտերիա, որն ընդունակ է օքսիդացնել թիосульфատն ավտոտրոֆ պայմաններում: Թիосульфատի օքսիդացումը բակտերիայի կողմից խթանվում է օրգանական նյութերի առկայությամբ: Բակտերիան նաեղև է բերում գլյուկոզի, շորտրտանեցրյուն էքստրակտի և կազեինի հիդրոլիզատի վրա անկուր բնդունակություն:

Բակտերիան մեզոֆիլ է, օքսիդումը pH-7,0: Անջատվյալի սկզբնական 6,0-ից ցածր և 8,8-ից բարձր pH-ի պայմաններում բակտերիան չի զարգանում, սակայն անման բերանքում կարող է եղևելնել սնկոցանկացվյալի pH-ը մինչև 4,7: Անջատվում է, որ անջատվում բակտերիան իրենից ներկայացնում է ֆակուլտատիվ ավտոտրոֆ բյունային բնուսէլ-սեռոբիոցնող բակտերիաների նոր ենթատեսակ:

New Gram negative bacteria capable of oxidizing of thiosulfate in the autotrophic conditions from the dump samples of Tandzyt sulfide ore deposits has been isolated. Oxidation of thiosulfate by the bacterial culture was stimulated in the presence of organic compounds. The bacterial strain possessed also an ability of heterotrophic growth on the glucose, yeast extract and caseine hydrolyzate.

The bacteria are mesophilic, optimum pH 7,0, do not grow in the medium with initial pH below 6,0 and higher 8,8, but during growth reduce pH of the medium till 4,7.

The isolated bacterial strain represents a new subspecies of facultative autotrophic thiobacilli capable of oxidizing thiosulfate.

Факультативно автотрофные бактерии ... окисляющие тиосульфат ... тиобациллы.

Образование и накопление серы в природе связано с деятельностью тионовых бактерий, развивающихся при нейтральных и щелочных реакциях

предназначены способных окислять тиосульфат. Первые представители этой группы были открыты Натансоном, Бейеринком и другими исследователями еще в начале нашего столетия [3]. В настоящее время описано и характеризуется около десятка видов этих бактерий. Среди них облигатные хемолитотрофы *Thiobacillus thioparus* [3], *Thiobacillus neapolitanus* [8], факультативные аэротрофы *Thiobacillus novellus* и *Thiobacillus intermedius*, способные переключаться с автотрофного на гетеротрофный обмен [7,9]. Группу бактерий завершают гетеротрофы, окисляющие тиосульфат только в присутствии органических веществ [5].

Нами из Тандзутского месторождения Армении выделена новая разновидность факультативно автотрофных тионовых бактерий.

Целью настоящей работы являлись характеристика и изучение выделенной нами новой бактерии.

Материал и методы. Накопительные культуры были получены посевом проб отвала руды Тандзутского месторождения на среде Баалсруда [3]. В качестве источника энергии использовали тиосульфат. Чистую культуру получали высевом накопительной культуры на твердую среду того же солевого состава и содержащую 0,7% агарозы в качестве уплотняющего вещества.

Выращивание культуры проводили в конических колбах емкостью 250 мл, наполненных 50 мл среды. Инкубирование вели при 30° на водяном встряхивателе типа 357 с режимом работы 180 об/мин.

При изучении миксотрофии у бактерий в среду Баалсруда с тиосульфатом добавляли органические вещества в концентрации 0,02 %. Гетеротрофный рост бактерии изучался на среде Баалсруда, содержащей 0,1 % органического вещества в качестве единственного источника энергии. Для окраски клеток по Граму применяли метод Уукера. Для выявления спор использовали метод Циля-Ожешко [1], а также прогревание на водяной бане в течение 30 минут.

Количественный анализ тиосульфата проводили иодометрическим методом [4].

Результаты и обсуждение. Культуральные и морфологические свойства. При автотрофном росте в жидкой среде с тиосульфатом бактерии образуют пленку из бактериальных клеток и серы. По мере роста жидкость мутнеет и pH среды снижается до 4,7. На плотной среде с тиосульфатом бактерии образуют маленькие колонии диаметров 0,5-1,0 мм, желтые от выпавшей серы. Клетки выделенной бактерии представляют собой палочки размером 0,5-0,8 x 1,0-2,0 мкм. Клетки неподвижные. По Граму окрашиваются отрицательно. Спор не образуют.

Источники энергии и углерода. Выделенные бактерии растут автотрофно на среде, содержащей тиосульфат в качестве единственного источника энергии. Показателем роста при этом служат помутнение среды, образование пленки серы на поверхности жидкости и снижение pH среды. Рост бактерии способен поддерживать также органические вещества, такие как глюкоза, дрожжевой экстракт и гидролизат казеина (табл. 1).

Таблица 1. Рост культуры шт.1 в гетеротрофных условиях (время культивирования-42ч. содержание органических веществ-0,1%; начальный рН-7,9; 30°)

Наличие бактерий	Использованные органические вещества	Оптическая плотность	Конечный рН
Контроль без бактерий	глюкоза	-	7,85
Шт.1	глюкоза	0,30	7,30
Контроль без бактерий	дрожжевой экстракт	-	7,9
Шт.1	дрожжевой экстракт	0,35	7,85
Контроль без бактерий	гидролизат казеина		7,3
Шт.1	гидролизат казеина	0,32	7,7

Окисление бактериями тиосульфата стимулируется органическими веществами. Так, окисление тиосульфата ускоряется примерно в 3,0; 2,3 и 1,8 раза соответственно в присутствии в среде глюкозы, дрожжевого экстракта и гидролизата казеина в концентрации 0,02 % (табл. 2).

Таблица 2. Влияние органических веществ на окисление тиосульфата шт.1 (время культивирования- 45ч; начальный рН - 8,0; 30°)

Наличие бактерий	Использованные органические вещества	Окислено $S_2O_3^{2-}$ г/л	Конечный рН
Контроль без бактерий	-	0	7,95
Шт.1	-	0,40	5,8
Контроль без бактерий	глюкоза	0	
Шт.1	глюкоза	0,17	8,45
Контроль без бактерий	дрожжевой экстракт	0	8,0
Шт.1	дрожжевой экстракт	0,90	8,55
Контроль без бактерий	гидролизат казеина	0	7,8
Шт.1	гидролизат казеина	0,75	8,4

Отношение к температуре и рН. Бактерии мезофильны. Рост при 28° наблюдается в диапазоне рН 6,2-8,5. Оптимальное значение рН -7,0. При начальном значении рН среды ниже 6,0 и выше 8,8 рост бактерии отсутствует (табл. 3). Незначительное уменьшение количества тиосульфата при рН 5,4 и 5,75, вероятно, связано с его

химическим окислением в кислых условиях, так как роста бактерий при этом не наблюдается.

Отношение к кислороду. При автотрофном и миксотрофном росте на среде с тиосульфатом бактерии положительно реагируют на аэрацию. Это связано как с потребностью организма в O_2 , так и CO_2 . В гетеротрофных условиях относительно хорошо растут и без аэрации.

По основным физиологическим свойствам выделенная бактерия проявляет сходство с известными облигатно хемолитотрофными, факультативно автотрофными и гетеротрофными тионовыми бактериями, развивающимися в нейтральных и щелочных условиях [5]. Однако отличается от них по тем и или иным признакам.

Таблица 3. Окисление тиосульфата шт. 1 при разных начальных значениях pH среды культивирования-43ч. содержание $S_2O_3^{2-}$ - 2,64 г/л (300°)

Наличие бактерий	Начальный	Окислено $S_2O_3^{2-}$ г/л	Конечный рН
Контроль без бактерий	5,4	0,16	5,05
Шт. 1	5,4	0,12	5,05
Контроль без бактерий	5,75	0,4	5,4
Шт. 1	5,75	0,14	5,4
Контроль без бактерий	6,25	0	6,25
Шт. 1	6,25	0,21	4,8
Контроль без бактерий	6,5	0	6,5
Шт. 1	6,5	0,30	4,7
Контроль без бактерий	6,95	0	6,95
Шт. 1	6,95	0,72	4,7
Контроль без бактерий	7,7	0	7,7
Шт. 1	7,7	0,66	6,9
Контроль без бактерий	8,5	0	8,4
Шт. 1	8,5	0,25	6,4
Контроль без бактерий	8,8	0	8,6
Шт. 1	8,8	0	8,6
Контроль без бактерий	9,2	0	9,0
Шт. 1	9,2	0	9,0

Так, в отличие от облигатно хемолитотрофной бактерии *T. thioaratus* выделенная бактерия способна к хемосорганотрофному росту на глюкозе, дрожжевом экстракте и гидролизате казеина. Кроме того, оптимум pH у выделенной бактерии 7,0, тогда как у *T. thioaratus* он составляет 8,5-9,8. Отмечено также четкое морфологическое отличие выделенной бактерии от *T. thioaratus*. У другой облигатно хемолитотрофной бактерии *T. neorodanensis* продуктом

окисления тиосульфата являются тетратионат и полиотионаты, а не сера.

В отличие от гетеротрофных бактерий *Thiobacillus parmetabolis* [6] и *Thiobacillus delicatus* [5] потребность выделенной бактерии в органическом веществе необлигатная. Бактерии могут развиваться автотрофно на тиосульфате, однако оптимальными для роста являются миксотрофные условия.

В этом отношении бактерия более близка к факультативно автотрофным организмам *T. novellus*, *T. intermedius* и *Thiobacillus versutus* (*Thiobacillus* A2). Однако *T. novellus* не способна уславивать сахара. Что касается бактерии *T. intermedius*, то она отличается более выраженной кислотоустойчивостью. Оптимальное значение pH у *T. intermedius* составляет 4,0, пределы pH 1,9-7,0 [5]. Бактерии *T. versutus* проявляют способность к росту в анаэробных условиях на среде с KNO_3 и органическими соединениями.

Таким образом, несмотря на некоторое морфологическое и физиологическое различие, выделенная бактерия более близка к факультативно автотрофным тионовым бактериям. Предполагается, что она представляет собой новый подвид факультативно автотрофных тионовых бактерий, развивающихся в нейтральной или щелочной среде и окисляющих тиосульфат. Однако для определения точного таксономического положения выделенной бактерии необходимо исследовать ряд систематически важных биохимических и генетических признаков.

Выполнение данной работы частично финансировалось грантами МНФ (Сороца) RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герхардт Ф. и др. Методы общей бактериологии. I, 66. М., 1983.
2. Захарзин Г.А. Питотрофные микроорганизмы. 122. М., 1972.
3. Караванко Г.П., Кузнецов С.И., Големин А.И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. М., 1972.
4. Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М., 1970.
5. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Eds. Staley J.T., Bryant M.P., Pfennig N., Holt J.G. 3. 1842, 1989.
6. London J., Rittenberg S.C. Arch. Microbiol., 59. 219, 1957.
7. Lu W.P. FEMS Microbiol. Lett., 34,3,313-317, 1985.
8. Trydinger P.A., Meyer T.E., Bartsch R.C., Kamen M.D. Arch. Microbiol., 141. 4, 273-278. 1985.
9. Wood A.P., Kelly D.P. J. Gen. Microbiol., 125, 1, 55-62, 1981.

Поступила 11.X.1994.