

**АЛКАЛОФИЛЬНЫЕ СЕРНЫЕ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЕ
БАКТЕРИИ ИЗ СОДОВЫХ СОЛОНЧАКОВ АРМЕНИИ****А.Х. ПАРОНЯН***Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г.Абовян*

Впервые из разных образцов почв, промывных и грунтовых вод содовых солончаков Араратской равнины выделен и охарактеризован ряд алкалофильных галотолерантных миксотрофных серных пурпурных бактерий. Установлено широкое распространение этих микроорганизмов в содовых солончаках, а также их таксономическое и функциональное разнообразие. На основании изучения морфологических и физиолого-биохимических особенностей выделенные культуры отнесены к родам *Chromatium*, *Ectothiorhodospira*, *Lamprocystis*, *Thiocapsa*.

Արարատյան հարթավայրի սոդային աղուտներից վերցված հողի, հոսքային և գրունտային ջրերի տարբեր նմուշներից առաջին անգամ անջատվել և բնութագրվել է մի շարք ալկալոֆիլ հալոտոլերանտ միքսոտրոֆ ծծմբային պուրպուր բակտերիաներ: Հաստատվել է այդ միկրոօրգանիզմների լայն տարածվածությունը սոդային աղուտներում, ինչպես նաև նրանց տատանողական և ֆունկցիոնալ բազմազանությունը: Սորֆոլոգիական և ֆիզիոլոգո-կենսաքիմիական ստանձնահատկությունների ուսումնասիրման հիման վրա որոշվել է անջատված կուլտուրաների պատկանելությունը *Chromatium*, *Ectothiorhodospira*, *Lamprocystis*, *Thiocapsa* ցեղերին:

A number of alcalophilic mixotrophic halotolerant sulfur purple bacteria from various samples of soils and underground waters of soda salted soils of Ararat plain has been isolated and characterized. Their wide distribution in soda salinated soils as well as taxonomical and metabolic diversity have been shown. The cultures isolated were assigned to *Chromatium*, *Ectothiorhodospira*, *Lamprocystis*, *Thiocapsa* genera.

Фототрофные бактерии - алкалофилы - содовые солончаки

Фотосинтезирующие бактерии занимают важное место среди микроорганизмов [6, 9, 13].

В последнее время значительно возрос интерес к микроорганизмам, способным к существованию в экстремальных, в частности алкалофильных условиях окружающей среды. Это объясняется как научной важностью вопроса, так и практическим значением таких микроорганизмов [1, 7, 10].

В литературе мало сведений об алкалофильных фототрофных микроорганизмах, выделенных из солончаковых почв. Имеющиеся данные в основном касаются фототрофной экстремофильной микрофлоры различных соленых (содовых) водных экосистем [2, 7, 12]. Солончаковые почвы Араратской равнины в этом отношении до сих пор не были исследованы. Поиск и выделение фототрофных бактерий с экстремальными свойствами, изучение их физиологических особенностей и путей практического использования представляется актуальной задачей в связи с дальнейшим восстановлением заброшенных земель.

Настоящая работа посвящена выделению и описанию алкалофильных форм фототрофных бактерий из содовых солончаков с целью определения их таксономического статуса.

Материал и методика. Материалом для выделения фотосинтезирующих бактерий служили разные образцы почв, промывных и грунтовых вод содовых солончаков Араратской равнины.

Для получения накопительных культур образцы обрабатывали методом Виноградского [3] или же их вносили непосредственно в различные селективные питательные среды с разным значением pH, содержанием источников питания и хлористого натрия. Накопительные культуры высевали методом серийных разведений в агаризованные среды в пробирки для получения глубинных колоний. Выросшие колонии вырезали из агара и переносили в соответствующие свежие питательные среды. Культуры выращивали в люминостате при температуре 28-35° и освещении 1500-2500 люкс лампами накаливания. Чистоту культур проверяли микрокопированием, а также высевали на МПА и среду Постгейта для обнаружения сульфатредуцирующих бактерий [15].

Рост культур определяли измерением оптической плотности суспензии на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 660 нм. Спектры поглощения клеток культур в видимой области регистрировали на спектрофотометре "Specord UV-Vis". Экстракцию каротиноидов проводили методом Иенсена [11], идентификацию - на основании цвета, спектров поглощения и величин Rf отдельных пигментов, разделенных тонкослойной хроматографией на пластинках "Silufol".

Морфологию клеток изучали с помощью фазово-контрастного и электронного микроскопов [5]. Фиксацию клеток культур для ультратонких срезов проводили методом Келленбергерра. Для выявления элементарной серы клетки после обработки глутаральдегидом помещали в 1%-ный раствор AgNO₃ на 2 ч [2].

Отношение культур к различным углеродным соединениям определяли добавлением в среду последних в качестве единственного источника углерода в количестве 0,2%. В качестве источников азота испытывали различные аминокислоты в количестве 0,1%, гидролизат казеина, мочевины и неорганические соли азота в количествах, соответствующих 290 мг азота на 1 л среды. Потребность культур в витаминах определяли прямым добавлением их в среды в разных сочетаниях.

Опыты по окислению тиосульфата проводили с суспензиями клеток из культур в экспоненциальной фазе роста. Тиосульфат определяли колориметрически [16], а содержание сульфатов - нефелометрическим методом [8].

Результаты и обсуждение. Из разных образцов почв, промывных и грунтовых вод содовых солончаков Араратской равнины выделен, очищен и изучен ряд культур алкалофильных и галотолерантных фототрофных бактерий.

Выделенные микроорганизмы, имея морфологические различия, обладают общими физиологическими признаками: грамотрицательные, мезофильные организмы с оптимумом температуры 30-32°. Диапазон pH роста 7,0-10,0 при оптимуме 9,0-9,5, для роста не требуют NaCl. Будучи выделенными из соленых образцов, являются выраженными галотолерантами и выдерживают в среде до 6-8% NaCl. За исключением изолятов, принадлежащих к роду *Chromatium*, которые являются строгими анаэробами, остальные - факультативные анаэробы. Ни одна культура не проявила способности к росту в темноте в анаэробных условиях, но все они строго осуществляли фотосинтез. Миксотрофы, источниками углерода и H-донорами одновременно могут служить и органические, и неорганические соединения.

Анализ данных показывает, что подобно несерным пурпурным бактериям большинство культур, кроме органических кислот, использует также разные сахара и спирты. Следует особо отметить усвоение некоторыми культурами таких полисахаридов, как инулин и декстрин. Действительно, изучение ферментативной деятельности штамма *Ectothiorhodospira sp.* подтвердило наличие щелочной инулиназы [4].

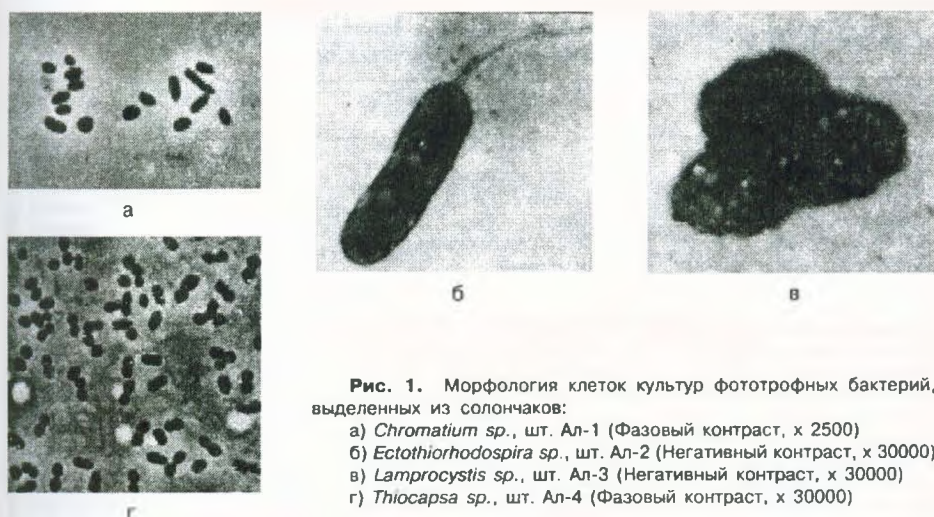


Рис. 1. Морфология клеток культур фототрофных бактерий, выделенных из солончаков:

- а) *Chromatium* sp., шт. Ал-1 (Фазовый контраст, х 2500)
 б) *Ectothiorhodospira* sp., шт. Ал-2 (Негативный контраст, х 30000)
 в) *Lamprocystis* sp., шт. Ал-3 (Негативный контраст, х 30000)
 г) *Thiocapsa* sp., шт. Ал-4 (Фазовый контраст, х 30000)

Эти организмы, будучи миксотрофами, при анаэробном росте способны осуществлять светозависимое окисление восстановленных серных соединений и в качестве Н-донора одинаково хорошо использовать сероводород и тиосульфат.

На основании изучения морфофизиологических и биохимических особенностей эти микроорганизмы дифференцированы как роды *Chromatium*, *Ectothiorhodospira*, *Lamprocystis*, *Thiocapsa* (рис. 1-4, а-г).

Дифференцирующие признаки этих культур представлены в таблицах 1-4.

Таблица 1. Дифференцирующие признаки *Chromatium* sp., шт. Ал-1, выделенного из солончаков

Признаки	<i>Ch. okenii</i> (типовой вид)	<i>Chromatium</i> sp., шт. Ал-1
Морфология		
Форма клетки	Овальные или бобовидные	Овальные
Размеры	8-15 мкм х 4,5-6,0 мкм	0,5-1,2 мкм х 1,4-4,0 мкм
Деление	Бинарное	Бинарное
Наличие жгутиков	Полярно расположенный жгутик	Полярно расположенный жгутик
Фотосинтетический аппарат	Везикулярный	Везикулярный
Газовые вакуоли	Отсутствуют	Отсутствуют
Общая физиология		
Температура роста	20-28°	28-35°
Потребность в NaCl	0-0,5%	0,5-1%
Оптимум pH	6,5-7,6	9,0-9,5
Потребность в витаминах	Витамин B ₁₂	Витамин B ₁₂
Аэробность	Строгий анаэроб	Строгий анаэроб
Фотосинтетические электрон-доноры	Сера, сульфид, в присутствии сульфида и бикарбоната также и органические кислоты	Сульфид, в присутствии бикарбоната также и органические кислоты
Сера накапливается	Внутри клетки	Внутри клетки
Ассимиляционное восстановление SO ₄	Отсутствует	Отсутствует
Источники азота	Соли аммония, мочевины	Соли аммония, мочевины
Цвет культуральной жидкости	Пурпурно-красный	Пурпурно-красный
Пигменты		
Хлорофиллы	Бактериохлорофилл а	Бактериохлорофилл а
Каротиноиды	Океноновой серии (окенон)	Океноновой серии (окенон)

Таблица 2. Дифференцирующие признаки *Ectothiorhodospira* sp., шт. Ал-2, выделенного из солончаков почв

Признаки	<i>Ectothiorhodospira mobilis</i> (типовой вид)	<i>Ectothiorhodospira</i> sp., шт. Ал-2
Морфология Форма клетки Размеры Деление Наличие жгутиков Фотосинтетический аппарат Газовые вакуоли	Короткие палочки 2,0-2,6 мкм x 0,7-1,0 мкм Бинарное Полярно расположенный жгутик Ламеллярный Отсутствуют	Слегка изогнутые палочки 1,-3,5 мкм x 0,5-1,2 мкм Бинарное Полярно расположенный жгутик Ламеллярный Отсутствуют
Общая физиология Температура роста Потребность в NaCl Оптимум pH Потребность в витаминах Аэробность Фотосинтетические электрон-доноры Сера накапливается Ассимиляционное восстановление SO ₄ Источники азота Цвет культуральной жидкости	25-30° 2-3% 7,5-8,0 Витамин B ₁₂ Строгий анаэроб Сера, сульфид, тиосульфат, органические кислоты Вне клетки Способны к сульфатредукции Соли аммония Коричнево-красный	28-35° Галотолерантность 6,5% 9,0-9,5 Не нуждается Строгий анаэроб Сульфид, тиосульфат, органические кислоты Вне клетки Способны к сульфатредукции Соли аммония, некоторые аминокислоты Темно-красный
Пигменты Хлорофиллы Каротиноиды	Бактериохлорофилл а Спириллоксантиновая серия	Бактериохлорофилл а Спириллоксантиновая серия

Таблица 3. Дифференцирующие признаки *Lamprocystis* sp., шт. Ал-3, выделенного из солончаков

Признаки	<i>Lamprocystis roseopersicina</i> (типовой вид)	<i>Lamprocystis</i> sp., шт. Ал-3
Морфология Форма клетки Размеры Наличие жгутиков Фотосинтетический аппарат Газовые вакуоли	От сферических до овальных Диаметр 3,0-35 мкм Один жгутик Везикулярный Содержит газовые вакуоли	Овальные Диаметр 2,5-3,8 мкм Один жгутик Везикулярный Газовые вакуоли неправильной формы
Общая физиология Температура роста Потребность в NaCl Оптимум pH Потребность в витаминах Аэробность Фотосинтетические электрон-доноры Ассимиляционное восстановление SO ₄ Источники азота Цвет культуральной жидкости	20-25° Не нуждается 6,5-7,0 Не нуждается Строгий анаэроб Сера, сульфид, тиосульфат, в присутствии бикарбоната также и некоторые органические источники углерода Отсутствует Соли аммония Пурпурный, пурпурно-фиолетовый	28-35° Галотолерантность 6,5% 9,0-9,5 Аэротолерантный Строгий анаэроб Сульфид, тиосульфат, в присутствии бикарбоната также и некоторые органические источники углерода Отсутствует Соли аммония, некоторые аминокислоты Пурпурный-фиолетовый
Пигменты Хлорофиллы Каротиноиды	Бактериохлорофилл а Ликопенальной серии	Бактериохлорофилл а Ликопенальной серии

Таблица 4. Дифференцирующие признаки *Thiocapsa* sp., шт. Ал-4, выделенного из солончаков

Признаки	<i>Thiocapsa roseopersicina</i> (типовой вид)	<i>Thiocapsa</i> sp., шт. Ал-4
Морфология Форма клетки Размеры Деление Наличие жгутиков Фотосинтетический аппарат Газовые вакуоли	Сферические или овальные Диаметр 1,2-3,0 мкм Бинарное Отсутствуют Везикулярный Всегда со слизистыми капсулами	Сферические или овальные Диаметр 1,5-2,5 мкм Бинарное Отсутствуют Везикулярный Всегда со слизистыми капсулами
Общая физиология Температура роста Потребность в NaCl Оптимум pH Потребность в витаминах Аэробность Фотосинтетические электрон-доноры Сера накапливается Ассимиляционное восстановление SO ₄ Источники азота	25-30° Не нуждается 7,0-7,5 Не нуждается Аэробные фототрофы, растут также аэробно в темноте Сера, сульфид, тиосульфат, некоторые органические источники углерода Внутри клетки Способны к сульфатредукции Соли аммония	28-35° Галогерантность 6,5% 9,0-9,5 Не нуждается Аэробные фототрофы, растут также аэробно в темноте Сульфид, тиосульфат, некоторые органические источники углерода Внутри клетки Способны к сульфатредукции Соли аммония, некоторые аминокислоты
Цвет культуральной жидкости	От розового до розово-красного	Розово-красный
Пигменты Хлорофиллы Каротиноиды	Бактериохлорофилл а Спириллоксантиновая серия	Бактериохлорофилл а Спириллоксантиновая серия

ЛИТЕРАТУРА

1. Заварзин Г.А., Жилина Т.Н., Ковбрин В.В. Микробиология, 68, 5, 579-599, 1999.
2. Компанцева Е.И. Микробиология, 54, 6, 974-982, 1985.
3. Кондратьева Е.Н. Фотосинтезирующие бактерии, 25-37, М., 1963.
4. Маркосян Л.С., Папикян С.Л., Паронян А.Х. Тр. Межд. симпозиума "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии". Дубна, 1, 160-172, 1997.
5. Методы общей бактериологии. Под ред. Ф.Герхарда и др., М., 1, 54-131, 1983.
6. Шестаков С.В. Биотехнология, 212-216, М., 1984.
7. Brayanseva I.A., Gorelenko V.M., Kompantseva E.I. et al. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 3, 697-703, 1999.
8. Dodgson K.S. Biochem. J., 78, 2, 312-315, 1961.
9. Drenes G. The phototrophic prokaryotes. Proc. ninth Int. Symp. of Phototrophic prokaryotes. Vienna, Austria. New York, 1-4, 1999.
10. Horikoshi K. FEMS Microbiol. Rev., 18, 2, 259-270, 1996.
11. Jensen S.L. The constitution of some bacterial carotenoides and their bearing on byosynthetic problems. Trondheim, 98-179, 1962.
12. Jones B.E., Grant W.D., Duckworth A.W., Owenson G.G. Extremophiles, 2, 1, 191-200, 1998.
13. Kondratieva E.N., Pfennig N., Truper H.G. The prokaryotes. Springer-Verlag, New York, 1, 312-330, 1992.
14. Ollivier B.m., Caumette P., Garsia J.L., Mah R.A. Microbiol. Reviews, 58, 1, 27-38, 1994.
15. Postgate J.R., Campbell I.L. Bacteriological Review, 30, 2, 732-738, 1968.
16. Schoon N.H. Acta chem. scand., 13, 3, 525-528, 1959.

Поступила 23.1.2000