

Биолог. журн. Армении, 1-2 (58), 2006

УДК 579.846

НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕРМОАЦИДОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ ШТ.86

Н.С. ВАРДАНЯН*, И.А. ЦАЦЛИЦА**, Т.И. БОГДАНОВА**, А.М. ЛЫСЕНКО*

*Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

**Институт микробиологии РАН, Москва

Some physiological and biochemical peculiarities of the thermoacidophilic bacteria strain 86 have been studied. High activities of sulfur metabolism enzymes such as thiosulfate-oxidizing, rhodanese and sulfite oxidase were revealed. Low activity of ribulose bispophate carboxylase was found in mixotrophic culture of the strain. The key enzyme of TCA cycle 2-oxoglutarate dehydrogenase was not detected in cellular extracts of strain 86. Based on these physiological, biochemical and genetic features strain 86 was described as *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* ssp. *asporogenes*.

*Сульфобациллы - ферменты метаболизма серы - железооксидаза -
рибулозобисфосфаткарбоксилаза*

В настоящее время известно несколько видов умеренно термофильных серо- и железоокисляющих бактерий, относящихся к роду *Sulfobacillus*: *S. thermosulfidooxidans* ВКМ В-1269 (=DSM 9293), шт. 41 и ВС1 [3], *S. acidophilus* (шт. NAL и ALV) [17], *S. "montserratensis"* L-15 [21], *S. yellowstonensis* YTF1 [14] и *S. sibiricus* N1 (ВКМ В-2280) [6], а также к роду *Acidimicrobium* - *A. ferrooxidans* [10].

Исключительное разнообразие эколого-природных условий Армении вместе с богатствами недр цветными и другими металлами предоставляют широкие возможности для изучения биоразнообразия хемолитотрофных микроорганизмов и вызываемых ими процессов в природе. Исследованиями установлено, что в природных и техногенных биотопах месторождений Армении наряду с мезофилами широко представлены термофильные хемолитотрофные бактерии. Недавно нами из медного месторождения Армении Шамлуг выделена умеренно термофильная серо- и железоокисляющая бактерия, отличающаяся высокой активностью в окислении пирита и халькопирита [2].

Целью настоящей работы являлось изучение некоторых физиологических и биохимических особенностей, а также генетических характеристик выделенной термоацидофильной бактерии шт. 86.

Материал и методика. Штамм 86 серо- и железоокисляющих бактерий был выделен из рудничной воды медно-рудного месторождения Шамлуг Армении. Для выделения его использовали модифицированную среду Брауера, содержащую 2,0 г/л Fe^{2+} и дополненную 0,02% дрожжевого экстракта [1], при 50°. Чистую культуру получали путем высева на

плотную среду Маннинга, содержащую 0,5% агарозы (Type 1; Low EEO Sigma), с последующим изолированием отдельно выросших колоний.

Для выделения ДНК использовали метод Мармура [16]. Определение содержания ГЦ оснований в ДНК проводили методом термической денатурации [5]. Степень ДНК-ДНК гибридизации определяли методом оптической реассоциации [11].

Ионы Fe^{3+} и Fe^{2+} определяли комплексометрическим методом трилоном Б [7]. сульфаты - спектрофотометрически [12].

Рибулозобисфосфаткарбоксилазу (КФ 4.1.1.39) определяли радиоизотопным методом [8], α -оксoglутаратдегидрогеназу - по восстановлению НАД [18], железокисляющую активность - колориметрическим методом [9]. Тиосульфатокисляющий фермент (тиосульфатдегидрогеназу, НФ 1.8.2.2) и сульфитоксидазу (сульфит - цитохром с-оксидоредуктазу, НФ 1.8.2.1) измеряли по восстановлению феррицианида в присутствии тиосульфата или сульфита соответственно [19]. Роданазу (тиосульфат-цианидсульфотрансферазу, НФ 2.8.1.1) измеряли по скорости образования тиоцианата из тиосульфата и цианида [15].

Результаты и обсуждение. Морфология. Клетки выделенного штамма представляют собой палочки размером 0,9-1,0 x 1,5-3,5 мкм. Неподвижные, спор не образуют. В активно развивающейся культуре клетки одиночные или спаренные. По Граму окрашиваются положительно.

Отношение к температуре и рН. Оптимальная температура роста шт.86 55°. Рост бактерии возможен в диапазоне температур от 25° до 60°.

Оптимальные значения рН при росте бактерий на среде с Fe^{2+} находятся в пределах рН 1,6-1,8. При значениях рН выше 2,2 наблюдается резкое снижение активности окисления Fe^{2+} . Рост бактерий на среде с элементной серой имеет место в интервале рН 2,0-4,5, оптимальные значения рН составляют 2,3-2,5.

Источники энергии и углерода. Источниками энергии для выделенного штамма являются Fe^{2+} , S^0 и ряд сульфидных минералов (FeS_2 , $CuFeS_2$ и др.). В автотрофных условиях скорость роста бактерии и окисления неорганических субстратов очень низкая. Однако в миксотрофных условиях в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта наблюдалось увеличение скорости окисления Fe^{2+} примерно в 10 раз. Некоторое увеличение удельной скорости роста и окисления Fe^{2+} у шт.86 наблюдалось также в присутствии 0,1% глюкозы и глутаминовой кислоты. В последнем случае, по данным тонкослойной хроматографии, наблюдалось уменьшение в среде количества глутаминовой кислоты, по-видимому, она используется бактериями в конструктивном обмене. Подтверждением тому может служить низкая активность РБФ-карбоксилазы. Так, у миксотрофно растущей культуры шт.86 активность РБФ-карбоксилазы составляла 0,8-1,5 мМ CO_2 /мин на 1 мг белка). В ряде работ показано, что внесенный в среду в виде органических веществ углерод, может частично потребляться умеренно термофильными бактериями как дополнительный источник углерода [3].

Добавление к среде 0,02% дрожжевого экстракта приводило также к стимулированию роста шт.86 на элементной сере, что выражалось в активном образовании SO_4^{2-} и резком снижении рН среды. При этом установлено, что по скорости окисления элементной серы шт.86 значительно превосходит *S.thermosulfidooxidans ssp. asporogenes* шт.41 как в автотрофных, так и миксотрофных условиях (рис.1). Так, за 11 дней культивирования штаммов

41 и 86 в автотрофных условиях образовалось 0,7 и 1,65 г/л SO_4^{2-} , а в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта - 3,5 и 12,9 г/л SO_4^{2-} соответственно (рис. 1а). При этом реакция среды снижалась от 3,1 до 2,2 и 1,7 (рис. 1б). Вероятно, этим обстоятельством можно объяснить высокую активность шт.86, проявленную при окислении кислоторастворимых минералов, таких как халькопирит [2].

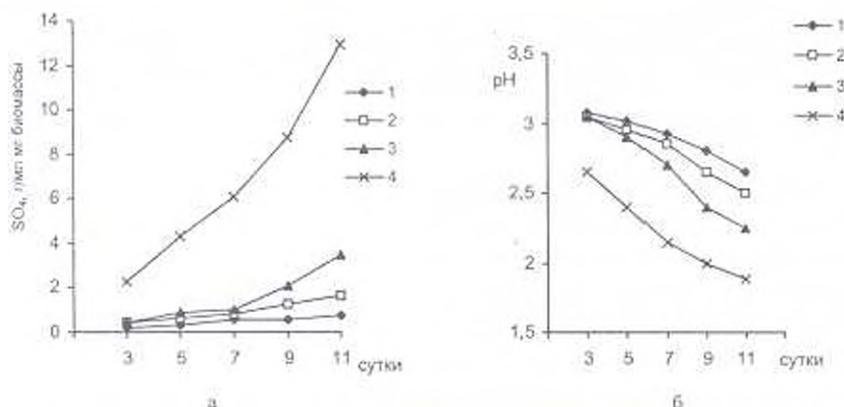


Рис. 1. Динамика образования SO_4^{2-} (а) и изменения pH (б) при окислении S^0 в автотрофных условиях (1, 2) и в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта (3, 4) *S.thermosulfidooxidans subsp. asporogenes* шт.41 и шт.86, соответственно

Следует отметить, что глюкоза при содержании в среде в концентрации 0,1% примерно в 1,5 раза активизировала ее окисление у шт. 86, тогда как рост шт. 41 на сере в ее присутствии ингибировался. Однако шт. 86 не способен к гетеротрофному росту на среде с глюкозой в отсутствие неорганического источника энергии. По-видимому, бактерия не обладает эффективным механизмом получения энергии при окислении органических соединений. Изучение ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) показало, что цикл прерван на уровне 2-оксоглутататдегидрогеназы. Вероятно, реакции ЦТК у этого штамма скорее всего служат для обеспечения клетки некоторыми синтетическими процессами.

Активность ферментов окисления железа и серы. В бесклеточных экстрактах *S.thermosulfidooxidans* шт.86, выращенного на среде с Fe^{2+} , в миксотрофных условиях удельная активность железooksидазы составляла 82-158 нМ FeSO_4 /мин на 1 мг белка. В экстракте обнаружены также сульфитоксидазная (109-124 нмоль) и тиосульфатдегидрогеназная активность (6,7-10,6 нмоль), несмотря на отсутствие соответствующих субстратов. Это свидетельствует о конститутивной природе указанных ферментов у выделенного штамма, что ранее было установлено для тиобацилл [13, 20]. При росте *S.thermosulfidooxidans* шт.86 на элементной сере активность сульфитоксидазы увеличилась до 287 нМ/мин на 1 мг белка. Однако значительных изменений в активности тиосульфатдегидрогеназы и роданазы (тиосульфат цианидсульфотрансферазы), участвующих в превращении тиосульфида, не наблюдалось. Отсюда следует, что промежуточным продуктом

окисления серы у этой бактерии, подобно тионовым бактериям, является сульфит. Следовательно, при росте *S.thermosulfidooxidans* шт.86 на среде с элементарной серой имеет место субстратная индукция сульфитоксидазы. Субстратная индукция сероокисляющих ферментов была отмечена у *S.thermosulfidooxidans* ВКМ В-1269 [3].

Таким образом, изучение ферментов метаболизма восстановленных соединений серы подтверждает, что схема окисления этих соединений у шт. 86 идентична, установленной Сузуки с соавторами для тионовых бактерий [20].

Анализ ДНК. Содержание Г+Ц оснований в ДНК штамма 86 равно 46,5% и близко к таковым *S.thermosulfidooxidans*, *S.thermosulfidooxidans ssp. asporogenes* шт.41 и *S.sibiricus* [3, 6]. Однако результаты ДНК-ДНК гибридизации показали, что выделенный штамм имеет внутривидовой уровень сходства с *S.thermosulfidooxidans* ВКМ В-1269 (85%) и особенно высокую степень сходства с *S.thermosulfidooxidans, subsp. asporogenes* шт.41 (94%), между тем уровень сходства с *S.sibiricus* (45%) находится в пределах межвидового (табл. 1).

Таблица 1. Нуклеотидный состав и уровень сходства ДНК выделенных бактерий с сульфобациллами

Штаммы бактерий	Г+Ц, мол. %	Уровень сходства ДНК, %			
		<i>S.thermosulfidooxidans</i> 1269	<i>S.sibiricus</i> N1	<i>S.thermosulfidooxidans</i> 41	<i>S.thermosulfidooxidans</i> 86
<i>S.thermosulfidooxidans</i> 1269	47,2	100			
<i>S.sibiricus</i> N1	48,2	-	100		
<i>S.thermosulfidooxidans</i> 41	46,5	89	-	100	
<i>S.thermosulfidooxidans</i> 86	46,9	85	45	94	100

Вместе с тем следует отметить, что выделенный шт.86 подобно *S.thermosulfidooxidans subsp. asporogenes* шт.41, характеризуется отсутствием спорообразования.

Таким образом, по сходству основных физиологических и биохимических свойств, а также по содержанию Г+Ц в ДНК, по уровню

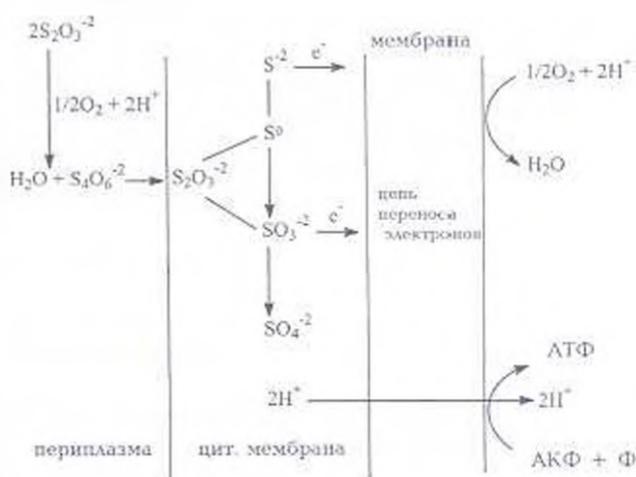


Схема окисления восстановленных соединений серы у тионовых бактерий (по Suzuki et al., 1994).

гомологии в ДНК и по отсутствию спорообразования выделенная бактерия была идентифицирована как неспорообразующий подвид *S.thermosulfidooxidans* - *S.thermosulfidooxidans* subsp. *asporogenes*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биогeотехнология металлов. Практическое руководство (под ред. Г.И.Каравайко, Дж. Росси, А.Агаге, С. Грудева, З.А.Авакян). М.: Центр Международных проектов ГКНТ, 375с., 1989.
2. Варданян И.С. Биотехнология, 6, 48-55, 1998.
3. Красильникова Е.И., Богданова Т.И., Захарчук Л.М., Цаплина И.А., Каравайко Г.И. Микробиология, 67, 2, 156-164, 1998.
4. Каравайко Г.И., Турова Т.П., Цаплина И.А., Богданова Т.И. Микробиология, 69, 857-860, 2000.
5. Мандель М., Шильокраут К., Мармур Д., Методы исследования нуклеиновых кислот. М., Мир, 183-192, 1970.
6. Меламуд В.С., Пивоварова Т.А., Турова Т.П., Колганова Т.В., Осипов Г.А., Лысенко А.М., Кондратьева Т.Ф., Каравайко Г.И. Микробиология, 72, 5, 681-688, 2003.
7. Ретиков А.А., Муликовская Е.И., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М., Недра, 1970.
8. Романова А.К. Биохимические методы изучения автотрофии у микроорганизмов. М.: Наука, 51-133, 1980.
9. Blaylock B.A., Nason A. J. *Biolog. Chemistry*, 10, 238, 1963.
10. Clark D.A., Norris P.R. *Microbiology* 142, 785-790, 1996.
11. Deley J., Cattoir H., Reynaerts A. *Eur. J. Biochem*, 12, 143, 1970.
12. Dodgson R.S. *Biochem. J.*, 78, 312-319, 1961.
13. Hallberg K.B., Dopson M., Lindstrom E.B. *J. Bacteriol.* 178, 1, 6-11, 1996.
14. Johnson D.B., Okibe N., Roberto F.F. *Arch. Microbiol.* 180, 60-68, 2003.
15. Key J.O., Suzuki I. *J. Gen Microbiol.* 99, 397-412, 1977.
16. Marmur J.A. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218, 1961.
17. Norris P.R., Clark D.A., Owen J.P., Waterhouse S. *Microbiology* 142, 775-783, 1996.
18. Sanadi D.R. *Methods in Enzymology*, New York, Acad. Press Inc., 13, 52, 1969.
19. Schook I.B., Berk R.S. *J. Bacteriology*, 133, 3, 1377-1382, 1978.
20. Suzuki I., Chan C.W., Takeuchi T.I. Oxidation of inorganic sulfur compounds by *Thiobacilli*. *Environmental Geochemistry of sulfide oxidation* (Eds. Alperg C.N., Blowers D.W., Washington D.C.) American Chemical Society, 60-67, 1994.
21. Yahya A., Roberto F.F., Johnson D.B. Novel mineral-oxidizing bacteria from Montserrat (W.I.): physiological and phylogenetic characteristics. In: Amilis R., Ballester A. (Eds.) *Biohydrometallurgy and Environment Toward the Mining of the 21st Century*. Elsevier, Amsterdam, 94, 729-740, 1999.

Поступила 17.IV 2006