

ЭКОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФОТОТРОФНОЙ БАКТЕРИИ *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS* ИЗ МИНЕРАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ ДЖЕРМУКА

А.Х. ПАРОНЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 2201, г. Абовян

Из разных образцов вод минеральных источников Джермука выделена и описана пурпурная несерная бактерия *Rhodopseudomonas palustris*, шт. Д-6. На основании сравнительного анализа морфологических и физиологических признаков установлены штаммовые различия между выделенной культурой и типовым видом *Rhodopseudomonas palustris*. Это относится к галотолерантности, использованию органических источников углерода и азота, витаминных потребностей, термостойкости. Показано регулярное присутствие штамма в минеральных источниках Джермука.

Ջերմուկի հանքային աղբյուրների ջրերի տարբեր նմուշներից անջատվել է նկարագրվել է *Rhodopseudomonas palustris*, Д-6 ոչ ձծնքային պուրպուր բակտերիան: Սորֆոլոգիական և Ֆիզիոլոգիական հատկանիշների համեմատական անալիզի հիման վրա շտամային տարբերություններ են հայտնաբերվել անջատված կուլտուրայի և *Rhodopseudomonas palustris* տիպային տեսակի միջև: Դրանք վերաբերում են հալոտոլերանտությանը, ածխածնի և ազոտի օրգանական աղբյուրների օգտագործմանը, վիտամինային պահանջներին և ջերմակայունությանը: Ցույց է տրվել շտամի մշտական գոյությունը Ջերմուկի հանքային աղբյուրներում:

From various samples of waters of hydrocarbonate mineral springs of Jermuk a purple nonsulfur bacterium *Rhodopseudomonas palustris*, D-6 was isolated and described. On the bases of comparative analysis of morphological and physiological properties between typical and studied species some differences have been established. They are halotolerance, use of carbon and nitrogen organic compounds, vitamin requirements and thermostability. The regular presence of this species in mineral springs of Jermuk has been shown.

*Пурпурные несерные бактерии - минеральные источники - экология -
Rhodopseudomonas*

Фототрофные бактерии являются одной из активных и широко распространенных групп микроорганизмов в природе и имеют фундаментальное значение в формировании биосферы, сохранении и функционировании экосистем, круговороте таких важных элементов как сера, углерод, водород и азот [9]. Способность к преобразованию солнечной энергии, к детоксикации ядовитых газов, тяжелых металлов, разнообразные пути метаболизма, усвоение различных органических субстратов, часто недоступных для других микроорганизмов, обуславливают огромную экологическую значимость фототрофных бактерий [5, 11]. Они являются продуцентами ценных биологически активных соединений [3, 8]. Однако

применение фототрофных бактерий в биотехнологии весьма ограничено. В связи с этим важной задачей в области использования этих бактерий является выделение и изучение их разнообразия. В задачу нашей работы входило экофизиологическое описание *Rhodospseudomonas palustris*, шт. Д-6, выделенного из минеральных источников Джермука.

Материал и методика. Исследуемый штамм пурпурной несерной бактерии *R. palustris*, шт. Д-6 выделен из образцов минеральной воды Джермука. Пробы отбирали из семи скважин непосредственно у выхода воды из источника. Штамм депонирован в РЦДМ под номером ИНМИА В-6506. Основные методы выделения и очистки культуры описаны ранее [2].

Морфологию и толкое строение клеток культуры изучали с помощью светового (МББ-1А с фазовым контрастом) и электронного микроскопов БС-613 (Тесла). Выращивание культуры в анаэробных условиях проводили в полностью заполненных колбах, закрытых притертыми пробками. Рост культуры определяли измерением оптической плотности суспензии на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 660nm. Спектры поглощения клеток культуры в видимой области регистрировали на спектрофотометре "Specord UV-Vis". Экстракцию каротиноидов проводили методом Иенсена [7]. Идентификацию их проводили на основании спектров поглощения и величины Rf отдельных пигментов, разделенных путем тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинках "Silufol".

Отношение микроорганизма к различным органическим соединениям устанавливали посредством добавления их в среду в концентрации 0,1%. Гидролизат казеина, пептон и неорганические соли азота добавляли в количестве 290 мг/л по азоту. Потребность бактерии в витаминах определяли прямым добавлением их в среды из стерильных водных растворов в разных сочетаниях в следующих количествах, мкг %: биотин - 0,5; тиамин - 100; никотиновая кислота - 100; пиридоксин - 100; p-аминобензойная кислота - 50; витамин В₁₂ - 10. Контролем служила среда без витаминов. Тиосульфат определяли методом Schödl [10]. Сульфат определяли методом Dodgson [4], сульфид - методом Гансена [6]. Содержание гуанина и цитозина (ГЦ) в ДНК определяли методом хроматографии на бумаге [1].

Результаты и обсуждение. Минеральные источники Джермука в основном термальные и по химическому составу относятся к углекислым гидрокарбонатным сульфатным натриевым водам. Горячие углекислые воды образуют резко выраженные термальные поля. Надо отметить, что групповые воды в значительной степени принимают участие в формировании минеральных вод при появлении последних на земной поверхности, являясь во многих случаях мощным фактором, опресняющим и понижающим их температуру. Это явление также способствует распространению фототрофных бактерий в минеральных источниках. Исследования показали, что фототрофные бактерии являются постоянными представителями экосистем минеральных источников. В джермукеких минеральных источниках распространены преимущественно пурпурные несерные бактерии. Чаше всего встречаются представители родов *Rhodobacter* и *Rhodospseudomonas*. В сравнении с другими известными видами род *Rhodospseudomonas* преимущественно представлен *R. palustris*, который регулярно встречается в образцах минеральных вод. По-видимому, физико-химические параметры минеральных вод Джермука соответствуют физиологическим потребностям изучаемого организма.

В таблице представлены физико-химические параметры и распределение *R. palustris*, шт. Д-6 в образцах минеральной воды из некоторых скважин.

Представленные в таблице данные свидетельствуют о том, что питр бактерий зависит от ряда экологических факторов, в том числе от температуры, рН, содержания HCO_3^- аниона. С другой стороны, невысокая численность бактерий, возможно, обусловлена низкими концентрациями биогенных элементов в минеральных источниках.

Таблица. Физико-химические параметры и распределение *R. palustris*, шт. Д-6 в минеральных источниках Джермука

Название источника	Температура на забос, °С	рН	Общая минерализация, г/л	HCO_3^- , г/л	Свободный CO_2 , г/л	Клетки, на 1мл воды
Скважина 1	42	6,9	4,5	2,06	0,36	10^1
Скважина 4	39	7,1	4,79	2,14	0,34	10^1
Скважина 7	45	5,9	1,68	0,74	0,9	10^1
Скважина 9	52	7,6	5,3	2,24	0,2	10^2
Скважина 18/62	51	7,5	3,2	1,67	0,36	10^2
Скважина 20/62	46	7,3	4,58	2,2	0,9	10^2

Интерес представляет тот факт, что представители *R. palustris*, выделенные из разных скважин минерального источника, фенотипически и физиологическими свойствами не различаются. Однако были выявлены некоторые физиологические различия между изучаемым и типовым штаммами.

Морфофизиологические особенности выделенной культуры. Клетки палочковидные, слегка изогнутые, размером $0,5-0,7 \times 2,4-4,3$ мкм (рис. 1).

Подвижные за счет полярных жгутиков. Размножаются путем неравномерного деления. Молодые клетки располагаются одиночно, старые же образуют характерные агрегаты - розетки.

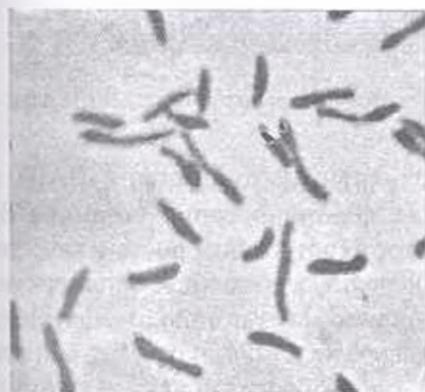


Рис. 1. *R. palustris*, шт. Д-6, выделенный из минеральных источников Джермука. Фазовый микраст, $\times 2000$.



Рис. 2. Фотосинтектический аппарат *R. palustris*, шт. Д-6. Электронная микрофотография Ультратонкий срез, $\times 50000$.

Фотосинтетический мембранный аппарат ламеллярного строения, ламеллы расположены параллельно к цитоплазматической мембране (рис. 2).

Не содержит газовых вакуолей. Культура мезофильная, температурные границы роста 28-35°, оптимальная температура 30-32°. Следует отметить, что в присутствии в среде выращивания витамина B₁₂ культура проявляет умеренный рост до 42°. Значение рН- 6,8-7,5 при оптимуме 7,0-7,2. Слабо галотолерантный, выдерживает в среде до 2% NaCl.

Микроорганизм растет как в анаэробных условиях на свету, так и в аэробных условиях в темноте. Цвет клеточной суспензии бактерии, выросшей анаэробно на свету, красный, в присутствии кислорода цвет культуры становится розовым. На поверхности агара образует крупные колонии кремового цвета, с неровными краями и диаметром 3-6мм. Клетки содержат бактериохлорофилл а и каротиноиды спириллоксантиновой серии. Спектр поглощения целых клеток культуры обнаруживает максимумы бактериохлорофилла при 375, 590, 802, 850нм и каротиноидов при 470, 496 и 528нм (рис. 3). Основными каротиноидами являются спириллоксантин и ликопин.

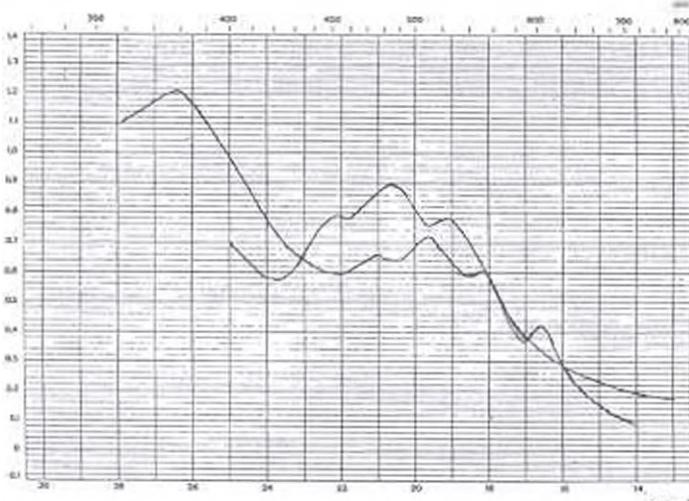


Рис. 3. Спектры поглощения целых клеток (1) и экстракта каротиноидов (2) *R. palustris*, шт. Д-6, выращенных в анаэробных условиях на свету.

В качестве факторов роста микроорганизм нуждается в ПАБК и биотине, хотя при добавлении к среде культивирования витамина B₁₂ наблюдается улучшение роста. При фотогетеротрофном росте в качестве донора электрона и источника углерода использует различные органические соединения- малат, фумарат, сукцинат пируват, ацетат, глюкозу, фруктозу. В отличие от типового вида изучаемая культура не усваивает бензоат, бутират, валерат, маннит, сорбит. Хороший рост обеспечивают некоторые аминокислоты (лизин, метионин, аланин и др.), гидролизат казеина и пептон. Растет на средах с аммонийными солями, нитрат не усваивает. Фотоавтотрофный рост возможен с тиосульфатом, сульфидом и водородом. Не использует элементарную серу. Содержание Г+Ц в ДНК составляет 64,5 ±

0,75 мол. %.

Анализ полученных данных показывает, что изучаемая культура отличается от типового вида рядом физиологических особенностей. Это относится к галотолерантности, термоустойчивости, потребности в витаминах, усвоению органических источников углерода и азота, а также месту обитания. Перечисленные различия штаммовые и являются выражением совокупности тех экологических условий, в которых существует микроорганизм. Широкие метаболические возможности фототрофных бактерий и постоянное присутствие их в минеральных источниках свидетельствуют о том, что они играют значительную роль в формировании компонентного состава минеральных вод.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ванюшин Б.Ф. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1, 236, 1964.
2. Паронян А.Х. Биолог. журн. Армении, 54, 1-2, 91-98, 2002.
3. Шестаков С.В. Биотехнология, М.: Наука, Гл. 3, 212-216, 1984.
4. Dodgson K.S. *Biochem. J.*, 78, 2, 312-319, 1961.
5. Eglund P.G., Gibson J., Hurwood C.S. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1396-1399, 2001.
6. Hansen T.A. *Arch. Microbiol.*, 86, 1, 49-56, 1972.
7. Jensen S.L. The constitution of some bacterial carotenoids and their bearing on biosynthetic problems. Trondheim, 104-118, 1962.
8. Kranz R.G., Gabbert K.K., Locke T.A., Madigan M.T. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 8, 3003-3009, 1997.
9. Madigan M.T. *Photosynthesis Research*, 76, 157-171, 2003.
10. Schön N.-H. *Acta Chem. Scand.*, 13, 3, 525-532, 1959.
11. Straub K., Rainey F., Widdel F. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 729-735, 1999.

Поступила 05.IX.2006