

**Мікробіологія**

УДК 579.266/68(477)

**ЗЕЛЕНІ СІРКОБАКТЕРІЇ ВОДОЙМ ЯВОРІВСЬКОГО СІРКОВОГО РОДОВИЩА****С.Гудзь, І.Баран, Л.Кіт, С.Гнатуш, О.Кулачковський***Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського 4, м. Львів 79005, Україна,  
e-mail: biolog@franko.lviv.ua*

Метою нашої роботи являється дослідити особливості метаболізму зелених сіркобактерій, які наявні у водоймах на території недіючого сіркородовища на Яворівщині. Зелені фотосинтезувальні сіркоокислювальні бактерії являються першим бар'єром на шляху поширення сірководню у верхні шари водойм. Завдяки їхній здатності утилізувати  $H_2S$ , ця токсична речовина не перешкоджає розвитку рослинних і тваринних організмів водойм. На цьому етапі роботи отримано і проаналізовано значну кількість нагромаджувальних культур зелених сіркобактерій. Виділено чисту культуру зелених сіркобактерій роду *Pelodiction*. Згідно з отриманими результатами культуру ідентифіковано як *Pelodiction luteolum*. Крім того, зафіксовано наявність симбіотичних консорцій цих бактерій з пурпуровими сіркобактеріями, які мають лабораторну назву „*Pelochromatium roseo-viride*”.

**Ключові слова:** Сіркобактерії, сірководень, аноксигенний фотосинтез, бактеріохлорофіл

Промислова розробка Яворівського сіркового родовища суттєво порушила природні процеси, що підтримували рівновагу сполук сірки в цьому районі [2]. Відкритий спосіб видобутку сірки зробив її доступною для впливу атмосферного кисню, забезпечив оптимальні умови для діяльності аеробних сіркоокиснювальних бактерій, а продукти їхньої життєдіяльності – сульфати, відповідно, активізували розвиток і зростання активності сульфатредукуювальних бактерій, продуктом життєдіяльності яких є сірководень. Саме цей продукт нагромаджується у воді, яка постійно наповнює величезний розритий кар'єр. Зрозуміло, така вода є непридатною для всього живого внаслідок високої токсичності сірководню.

Деякі сіркові бактерії, зокрема зелені й пурпурові, що забезпечують аноксигенний фотосинтез, використовують сірководень як донор електронів [13]. Саме завдяки їхній діяльності, а також значною мірою і діяльності тіонових бактерій водойми очищуються від сірководню. Фотосинтезуючі бактерії, які ростуть на глибині, не дають змоги сірководню поширюватись у верхніх шарах води, що запобігає розвитку там багатьох рослинних і тваринних організмів [6].

Зелені й пурпурові сіркобактерії – фізіологічно подібні групи, їхній ріст лімітований світлом певної довжини хвиль, концентрацією кисню та сірководню. Однак якщо пурпурові сіркобактерії легко виявити за їхнім забарвленням, то виділення зелених утруднене внаслідок їхньої схожості з деякими зеленими водоростями [5,6].

Зелені сіркобактерії – грамнегативні, анаеробні, аноксигенні фототрофи, представлені родами: *Chlorobium*, *Prosthecochloris*, *Pelodictyon*, *Ancalochloris*, *Chloroherpeton* [12].

Клітини цих бактерій відрізняються за формою, розмірами та забарвленням, можуть бути поодинокими й зібраними в ланцюжки. Трапляються клітини вібриодної форми, кільцеподібні, овальні, сферичні або прями. Вони часто формують агрегати неправильної форми. Зелені сіркобактерії, залежно від наявних фотосинтетичних пігментів, забарвлені в зелений або коричневий колір. Зелені штами містять бактеріохлорофіли *c* і *d* та незначні кількості бактеріохлорофілу *a* [12]. Їхнім головним каротиноїдом є хлоробактин. У коричневих штамів головними є бактеріохлорофіл *e* та каротиноїд ізореніератин. Бактеріохлорофіли зелених сіркобактерій вловлюють червоні промені світла, які здатні проникати на глибини, що сягають мулу, багатого на сірководень. Це дає змогу їм заселяти різні екологічні ніші [9,11].

Для засвоєння вуглецю органічних сполук зелені сіркобактерії використовують реакції зворотного циклу лимонної кислоти, що є однією з найбільших відмінностей між зеленими сіркобактеріями та іншими аноксигенними фототрофними бактеріями [14].

Здатність зелених сіркобактерій рости на глибинах забезпечує певні переваги, оскільки більшість фототрофних бактерій живе у верхніх шарах водойм [3]. Зелені сіркобактерії наявні у водоймах із достатньою кількістю сірководню, оптимальне рН – 7,0–7,3, температура – 25–30°C. Описані термофільні види [10].

Більшість видів описаних зелених сіркобактерій виділені в нагромаджувальній культурі [6]. Ціла низка питань потребує дослідження. Передусім це стосується визначення видового складу бактерій, виділення серед них активних перетворювачів сполук сірки.

Нашою метою було одержання нагромаджувальної культури зелених сіркобактерій з водойм Яворівського сіркового родовища, визначення їхнього видового складу.

Для одержання нагромаджувальних культур зелених сіркових бактерій використовували пробірки (50 мл), які на 2/3 заповнювали відібраними зразками води чи мулу. Решта об'єму – рідке середовище Ван Ніля. У кожную пробірку вносили 1,5–2,0 г гіпсу та декілька клаптиків фільтрувального паперу [6]. Пробірки поміщали в термостат при температурі 30°C або залишали при кімнатній температурі. Для освітлення культур використовували лампи денного світла або лампи розжарювання. В окремих випадках у разі освітлення культур застосовували різні інтерферен-

ційні фільтри, що пропускають світло з довжинами хвиль від 600 до 800 нм і більше. Пересівали культури за методом Ван Ніля.

Аналіз нагромаджувальної культури зелених сіркобактерій

Номер проби	Ріст	Забарвлення	Зони росту культури	Мутність середовища
Під час росту на середовищі Ван Ніля				
1	+	Темно-зелене, брудно-салатове	Шар на поверхні і в товщі мулу, наліт на стінках циліндрів	++
2	+	Брудно-салатове	Слизовий шар на поверхні осаду і врослає в товщу	+
3	+	Темно-зелене	Плями-наліт на стінках і в шарі мулу	+/-
4	+	Темно-зелене, салатове	Слизовий шар на поверхні мулу, наліт-плями на дні	+/-
5	+	Насичено-зелене	Наліт на стінках і в товщі мулу	++
6	+	Коричнево-жовте	Наліт на поверхні осаду	-
7	+	Салатове	Легкий наліт на поверхні і на стінках	+/-
8	+	Насичено-зелене	Наліт на стінках, "клапті" на поверхні осаду	-
9	+/-	Темно-зелене	Ледь помітні крапки-наліт на стінках в мулі	+/-
10	+/-	Темно-зелене	Наліт на стінках у товщі у вигляді крапок	+/-
Під час росту на середовищі Пфеніга				
1	+	Темно-зелене	Наліт на стінках циліндра і на поверхні мулу	+
2	+	Коричнево-зелене	Шар на поверхні осаду	+
3	+	Жовто-коричневе	Наліт на поверхні мулу з проростанням в товщу	-
4	+/-	Салатове	Наліт на стінках, на поверхні осаду	-
5	+	Коричнево-зелене	Легкий наліт на поверхні мулу, "плями" на дні	+
6	+	Темно-зелене, салатове	Чіткий темно-зелений і салатований шар на поверхні осаду, наліт на дні	+/-
7	-	-	-	-
8	+	Салатове	Плями-наліт у верхньому шарі осаду	-
9	+	Темно-зелене	Слизовий шар на поверхні мулу	+/-
10	+	Салатове,	Незначний наліт у вигляді плямок	+/-

коричнево-зелене на стінках та в товщі осаду

Примітка. ++ – дуже добре; + – добре; +/- – помірно.

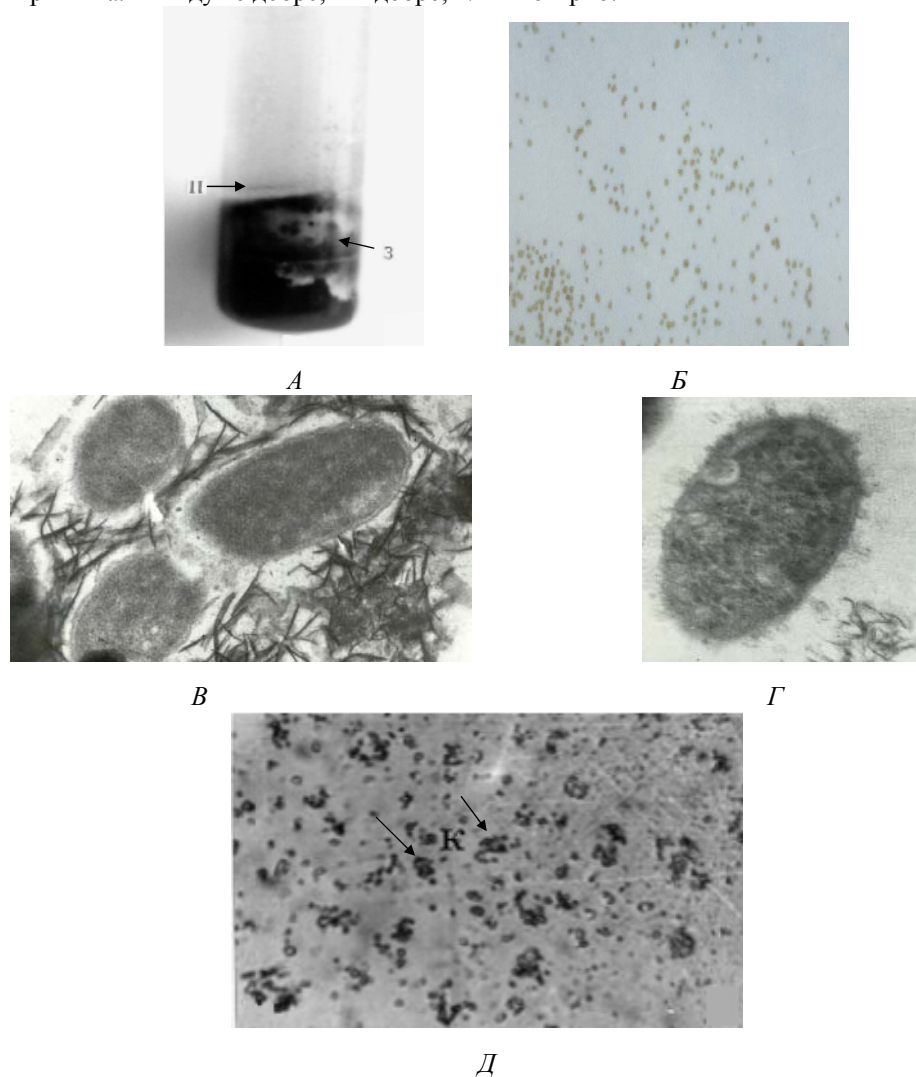


Рис. 1. Зелені сіркобактерії. А – нагромаджувальна культура зелених сіркобактерій; Б – колонії зелених сіркобактерій після вирощування на середовищі Ван Ніля протягом 14 діб; В, Г – ультратонкі зрізи клітин зелених сіркобактерій,  $\times 33000$  і  $58000$ , відповідно; Д – угруповання клітин зелених сіркобактерій. 3 – зона зелених сіркобакте-

рій; *П* – зона пурпурових сіркобактерій; *zв* – газові вакуолі; *х* – хлоросоми; *МП* – місце бінарного поділу клітини; *вк* – включення; *К* – симбіотичні консорції.

Для одержання колоній зелених фотосинтезувальних сіркобактерій культури вирощували на агаризованому середовищі Ван Ніля в анаеростатах. Чистоту культури перевіряли мікроскопуванням. Наявність сульфатредуючих бактерій та гетеротрофів визначали на середовищі, що забезпечує ріст сульфатредукторів, та на МПА [1,7]. Проби води та мулу брали з річки Гноєнець (1,2), водосховища Гноєнець (3,4), річки Терешка (5,6), водосховища Шкло (7,8), річки Шкло (9,10); (1,3,5,7,9 – мул; 2,4,6,8,10 – вода).

У разі одержання нагромаджувальної культури зелених сіркобактерій у трьох із п'яти зразків, відібраних із різних водойм, простежувалась сильна конкуренція з боку пурпурових сіркобактерій. Використання середовища Ван Ніля запобігло більшу швидкість росту, однак на середовищі Пфенінга пізніше з'являлась зона пурпурових бактерій (рисунок, *А*). З'ясовано, що найдоцільнішим є використання інтерференційного фільтра КС-15. У таблиці наведені дані візуального аналізу нагромаджувальних культур зелених сіркобактерій, одержаних із використанням середовищ Ван Ніля та Пфенінга.

Виконували по декілька пересівань зелених сіркобактерій зі всіх зразків до отримання візуально однорідної культури.

Колонії виділених зелених сіркобактерій, які висівали на агаризоване середовище, мали три різні відтінки: брудно-салатовий, темно-зелений і коричневий. Колонії однорідні, мають рівні краї, слизисті і внаслідок проліферації, можуть зливатись в одну слизову пляму (рисунок, *Б*). Цей факт свідчить про необхідність частих пересівань культури для її подальшого дослідження.

Результати мікроскопічних досліджень засвідчили, що ці бактерії яйцеподібної форми, мають газові вакуолі (рисунок, *В, Г*); під час росту утворюють хаотичні скупчення (рисунок, *Д*). Однорідність культури та відсутність росту на середовищах для сульфатредуючих бактерій та МПА дає нам змогу стверджувати про виділення чистої культури зелених сіркобактерій роду *Pelodiction*.

Отримано ультратонкі зрізи клітин бактерій (рисунок, *В, Г*). На фото можна розрізнити фотосинтезуючі структури – хлоросоми, газові вакуолі. Для виду характерний бінарний поділ.

З урахуванням морфологічних та фізіологічних особливостей та згідно з визначником Берджі [8] культуру ідентифікував як *Pelodiction luteolum*.

Клітини цієї культури містять такі фотосинтетичні пігменти, як бактеріохлорофіл *c*, *d* або *e*, оскільки виростили з використанням інтерференційного фільтра, який пропускає промені світла довжиною хвиль 600–800 нм, що відповідає спектрам поглинання цих бактеріохлорофілів. Крім того, в клітинах цих бактерій є „сліди” бактеріохлорофілу *a*, це пояснює „заростання” нагромаджувальної культури зелених сіркобактерій пурпуровими сіркобактеріями; хоча цей факт в окремих випадках можна пояснювати існуванням консорцій, які характерні для представ-

ників роду *Pelodiction* (рисунок, Д). Можна припустити, що в окремих водоймах бактерії *Pelodiction luteolum* існують у симбіотичній асоціації з пурпуровими бактеріями, утворюючи консорцію, яка вже одержала лабораторну назву „*Pelochromatium roseo-viride*” [4,8].

1. *Борисова Л.Б.* Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. М.: Медицина, 1979. С. 65–66.
2. *Гайдин А.Г.* Яворівщина – погляд в майбутнє. Львів: В-во ВАТ Гірхімпром, 1999. С. 5–9.
3. *Горленко В.М., Дубина Г.А., Кузнецов С.И.* Экология водных микроорганизмов. М.: Наука, 1977. 289 с.
4. *Каравайко Г.И., Кузнецов С.И., Голомзик А.И.* Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. М.: Наука, 1972. 215 с.
5. *Кондратьева Е.Н.* Систематическое положение и физиолого- биохимическое разнообразие фототрофных микроорганизмов// Фототрофные микроорганизмы. Сб. науч. трудов. М.: Научный центр биол. исслед. АН СССР, 1988. С.3-9.
6. *Кондратьева Е.Н.* Фотосинтезирующие бактерии. М., 1963. 314 с.
7. *Кузнецов С.И., Дубина Г.А.* Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. С. 136–140.
8. *Хоулт Дж., Криг Р., Снит П.* и др. Определитель бактерий Берджи. М.: Мир, 1997. Т. 1. 368 с.
9. *Andrevs J.H.* Comparative ecology of microorganisms and macroorganisms// Springer-Verlag. New York, 1991.
10. *Holt John G., Noel R.Krieg, Peter H.A.Sneath et al.* Bergey’s manual of determinative bacteriology 9<sup>th</sup>ed. Baltimor: Williams and Wilkins, 1994.
11. *Madigen M.T., Martinc J.M., Parker J., Brock.* Biology of microorganism// Prentice hall, Upper Saddle River. N. J., 2000.
12. *Pfening N.* Green bacteria// Staley J.T.(ed) Bergey’s manual of systemanic bacteriology. Baltimor, 2<sup>th</sup>td, 1989. P. 1662–1667.
13. *Pfening N., Trueper H.G.* Anoxygenic phototrophic bacteria// Bergey’s manual of systematicbacteriology. 1989. Sec. 18. P. 1635–1637.
14. *Wahlund T.M., Tabita R.F.* The reductive tricarboxylic acid cycle of carbon dioxide assimilation: initial studies and purification of ATP citrat lyase from the green sulfur bacteria *Chlorobium*// Bacteriology, 1997. 179 p.

**GREEN SULFUR BACTERIA WHICH ARE PRESENT IN  
STORAGE LAKES, DRAIN RIVERS AND RESERVOIRS  
AROUND YAVORIV SULFUR DEPOSIT**

**S. Gudz, I. Baran, L. Kit, S. Hnatush ,O. Kulachkovskiy**

*Ivan Franko National University of L'viv,  
Hrushevskoho st. 4, L'viv 79005, Ukraine,  
e-mail: [biolog@franko.lviv.ua](mailto:biolog@franko.lviv.ua)*

The aim of our research is to investigate the peculiarities of metabolism of Green Sulfur bacteria which are present in storage lakes, drain rivers, and reservoirs around Yavoriv sulfur deposit. The major problem is hydrogen sulfide toxic water that permanently fills the invalid sulfur quarry. According to our results, we assume that pure culture of green sulfur bacteria is obtained. After identification we presume that we obtain *Pelodictyon luteolum*. The next tasks are: to investigate the nature of their pigments using the cells that we selected, to investigate the special features of metabolism of the selected culture. These investigations will be useful for us as a key to solve Yavoriv ecological problem, about purification of water from H<sub>2</sub>S.

*Keywords:* sulfur bacteria, hydrogen sulfide, anoxygenic photosynthesis, bacteriochlorophyll.

Стаття надійшла до редколегії 10.07.2001

Прийнята до друку 16.07.2001