

УДК 579.23+579.22

ОПИСАНИЕ НОВЫХ ШТАММОВ И ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАТОНКОГО СТРОЕНИЯ КЛЕТОК ПУРПУРНОЙ СЕРНОЙ БАКТЕРИИ *THIORHODOSPIRA SIBIRICA*

© 2025 г. И. А. Брянцева*

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071, Россия
*e-mail: bryantseva@mail.ru

Поступила в редакцию 17.06.2024 г.

После исправления 21.08.2024 г.

Принята к опубликованию 25.08.2024 г.

Изучены свойства четырех штаммов алкалофильной галотолерантной пурпурной серной бактерии *Thiorhodospira sibirica*, выделенных из степных содовых озер (минерализация 7–35 г/л; pH 9.0–9.8), расположенных в Забайкальском крае и Республике Бурятия (Россия) и северо-восточной Монголии. Все исследованные штаммы имели характерные для *Trs. sibirica* морфо-физиологические свойства: уникальный спектр поглощения пигментов *in vivo*, имеющий четыре максимума поглощения бактериохлорофилла *a* в ближней инфракрасной области, и необычно расположенные фотосинтетические мембраны ламеллярного типа. Бактерии всех исследованных штаммов, как и типовой штамм A12^T (= ATCC 700588^T), в качестве промежуточного продукта окисления сульфида образовывали элементную серу, глобулы которой имели внутриклеточную локализацию, а не внеклеточную, как у других *Ectothiorhodospiraceae*. На примере типового штамма на ультратонких срезах было показано внутриклеточное расположение глобул элементной серы с помощью специфической реакции с нитратом серебра. Все исследованные штаммы имели 93–95% сходства по результатам ДНК–ДНК гибридизации или 98.55–98.61% сходства последовательностей гена 16S рРНК с *Trs. sibirica* A12^T (= ATCC 700588^T), что подтверждает их принадлежности к виду *Trs. sibirica*.

Ключевые слова: пурпурные серные бактерии, алкалофилы, бактериохлорофилл, спектр поглощения пигментов, *Thiorhodospira sibirica*, фототрофные сообщества содовых озер

DOI: 10.31857/S0026365625010033

Пурпурные серные бактерии являются обширной группой микроорганизмов, в которую входят представители семейств *Chromatiaceae*, *Ectothiorhodospiraceae* и *Halorhodospiraceae* (Imhoff et al., 2022). Между фототрофными бактериями этих семейств существует легко выявляемое четкое морфологическое различие. Бактерии *Chromatiaceae* образуют видимые под световым микроскопом глобулы элементной серы внутри клеток бактерий, тогда как *Ectothiorhodospiraceae* и *Halorhodospiraceae* откладывают серные глобулы вне клеток (Imhoff 2005a; Frigaard, Dahl, 2009; Oren 2014; Dahl, 2017). Исключением является алкалофильная галотолерантная пурпурная серная бактерия *Thiorhodospira sibirica*, которая относится к сем. *Ectothiorhodospiraceae*, но глобулы элементной серы, образующиеся как промежуточный продукт окисления сульфида, накапливаются внутри клеток (Bryantseva et al., 1999). Эта бактерия имеет крупный размер (3–4 × 7–20

мкм) и вибриоидную или спиралловидную форму клеток, что делает ее морфологически сходной с бактерией сем. *Chromatiaceae* *Thiospirillum jenense* (Imhoff, 2005b).

У *Trs. sibirica* также отмечены другие уникальные свойства. Спектр поглощения бактериохлорофилла (бхл) *a* не имеет аналогов и характерен только для этого вида (Bryantseva et al., 1999). В целых клетках он имеет четыре максимума поглощения в ближней инфракрасной области (799, 830, 858 и 901 нм), в то время как у большинства пурпурных серных бактерий – три пика (800, 850 и 870–880 нм). Только некоторые виды показывают максимумы поглощения при 820–830 нм при одновременном исчезновении пика при 850 нм, что большей частью вызвано уменьшением интенсивности света при культивировании (Sidorova et al., 1998).

Кроме того, внутренние фотосинтетические мембраны *Trs. sibirica* расположены необычным

образом. Длинные пряди ламелл пронизывают клетку, могут образовывать завитки и располагаться по периферии клетки, тогда как у видов *Ectothiorhodospiraceae* и *Halorhodospiraceae* ламеллы располагаются в упорядоченные стопки. Такое необычное строение мембранного аппарата фотосинтеза не встречалось ранее до описания *Trs. sibirica*. Позднее такие же ламеллы были обнаружены у другой крупной пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira magna* (Bryantseva et al., 2010). Возможно, подобная организация внутренних фотосинтетических мембран связана с большим размером клеток этих бактерий.

Филогенетический анализ, основанный на сравнении последовательностей генов 16S рРНК показывает, что *Trs. sibirica* относится к семейству *Ectothiorhodospiraceae* и имеет 91.7–94.6% сходства с другими видами этого семейства (Bryantseva et al., 1999). Данные анализа полного генома *Trs. sibirica* подтверждают выделение этой бактерии в отдельный род сем. *Ectothiorhodospiraceae*. На геномном филогенетическом дереве *Trs. sibirica* образует отдельную ветвь, средний процент идентичности нуклеотидов (ANI) составляет 68.3–70% относительно других видов *Ectothiorhodospiraceae*, что соответствует родовому разграничению (Imhoff et al., 2022). Содержание Г + Ц в ДНК у *Trs. sibirica* низкое и составляет 56–57.4 (T_m) и 56.7 (геномные данные) мол. %, в отличие от 60.9–68.3 мол. % (геномные данные) у других видов этого семейства (Imhoff et al., 2022). Только *Ectothiorhodospira mongolicus* имеет близкое содержание Г + Ц в ДНК – 57.5 (T_m) и 55.6 (геномные данные) мол. % (Gorlenko et al., 2004).

Из небольшого меромиктического содового озера Soap Lake (США) из пробы природной воды с глубины 22 м (максимальная глубина озера составляет ≈24 м) был выделен новый алкалофильный галотолерантный штамм пурпурной серной бактерии, обозначенный SLG (Asao et al., 2011). По результатам анализа последовательности гена 16S рРНК (98.4% сходства с *Trs. sibirica* A12^T) этот штамм был идентифицирован как *Thiorhodospira* sp. Клетки штамма SLG имеют форму вибриона размером 1–2 × 3–6 мкм, образуют глобулы элементной серы, которые кажутся расположенными внутри клеток. Но более тщательное микроскопическое исследование показало, что, скорее всего, серные глобулы прикреплены к внешней поверхности клеток, а не находятся внутри. Спектр поглощения *in vivo* бактерий штамма SLG имеет три максимума поглощения бхл *a*. Внутриклеточное расположение фотосинтетических мембран не было определено. Таким образом, штамм SLG хоть и был отнесен к роду *Thiorhodospira*, но не имел уникальных фенотипических свойств, присущих виду *Trs. sibirica*.

За четверть века с первого упоминания о *Trs. sibirica* только дважды сообщалось о выделении

новых штаммов, точно относящихся к этому виду (Tourova et al., 2011; Burganskaya et al., 2018). Детальное исследование свойств этих штаммов не проводилось. Все штаммы *Trs. sibirica*, включая типовой, были изолированы из мелководных степных слабоминерализованных содовых озер одного и того же географического региона (Бурятия и Забайкальский край, Россия).

Данная работа представляет обобщенные результаты многолетних исследований свойств новых и уже известных штаммов уникальной пурпурной серной бактерии *Trs. sibirica*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Объектом исследования были пять штаммов пурпурной серной бактерии *Trs. sibirica*: A12^T (=ATCC 700588^T), BG35, M31, B8-1 и Kir-3. Все штаммы были выделены из природных образцов, отобранных в прибрежной зоне содовых озер (минерализация 1.94–35 г/л; pH 9.0–9.8), расположенных в Забайкальском крае и Республике Бурятия (Россия) и северо-восточной части Монголии в период с 1995 по 2015 годы.

В экспериментах по определению внутриклеточной локализации серных глобул, образующихся в процессе окисления сульфида, для сравнения в качестве контроля служила пурпурная серная бактерия *Thioalkalicoccus limnaeus* A26^T (= ATCC BAA32^T).

Культивирование. Культивирование исследованных штаммов *Trs. sibirica* проводили на среде следующего состава (г/л): NH₄Cl – 0.5; KH₂PO₄ – 0.5; MgCl₂ – 0.2; NaCl – 0.5; NaHCO₃ – 2.5; Na₂CO₃ – 2.5; дрожжевого экстракта – 0.1; ацетата натрия – 0.5; Na₂S · 9H₂O – 0.5–0.7; витамина B₁₂ – 20 мкг/л; раствора микроэлементов – 1 мл; pH 9.0–9.5. Растворы NaHCO₃ (10%), Na₂CO₃ (10%) и сульфида (10%) готовили и стерилизовали отдельно. Непосредственно перед посевом в основную среду вносили необходимое количество ингредиентов из данных растворов. Культуры выращивали фототрофно в анаэробных условиях при температуре 25–30°C и интенсивности света 2000 лк. Чистые культуры получали методом предельных разведений после многократного пересева отдельных колоний, выросших на агаризованной среде (0.8%). На жидких средах культуры выращивали в стеклянных флаконах с закручивающимися крышками.

Морфология и тонкое строение. Морфологию бактериальных клеток изучали с помощью светового микроскопа Olympus BX 41 (“Olympus”, Токио, Япония). Целые клетки и ультратонкие срезы исследовали под электронным микроскопом JEOL JEM-100C (“JEOL”, Токио, Япония) при 80 кВ. Целые клетки контрастировали

1% фосфорновольфрамовой кислотой. Для получения ультратонких срезов использовали описанный ранее метод (Ryter, Kellenberger, 1958; Bryantseva et al., 2000). Полученные срезы клеток помещали на медные сеточки, покрытые коллоидной пленкой (2% раствор коллоидов в амилацетате) и напыленные углеродом, контрастировали цитратом свинца (Reynolds, 1963) и исследовали под электронным микроскопом. Для выявления локализации глобул серы клетки бактерий дополнительно обрабатывали 2% раствором AgNO_3 , а затем осуществляли вышеперечисленные процедуры за исключением контрастирования (Scheminzy et al., 1972).

Пигменты. Спектры поглощения пигментов определяли в диапазоне 350–1100 нм на спектрофотометре СФ-56А (“ЛОМО”, Санкт-Петербург, Россия), как для целых клеток (ресуспендированных в 50% глицерине), так и в ацетон-метанольных (7 : 2, об./об.) экстрактах.

Физиология. Отношение бактерий к кислороду выясняли по характеру роста в столбиках агаризованной среды (0.7%) в пробирках под ватными пробками. Расстояние заметного бактериального роста от поверхности среды регистрировали через две недели. Для определения пригодных для фототрофного роста субстратов использовали минеральную среду с сульфидом (0.5 г/л) и небольшим количеством дрожжевого экстракта (0.05 г/л). Тестируемые органические вещества вносили в концентрации 0.5 г/л. При выяснении потребностей исследуемых бактерий в минеральных донорах электронов, а также проверки их способности расти при разных значениях pH и концентрациях NaCl применяли основную среду, варьируя состав тестируемых параметров и компонентов. Требуемый pH регулировали добавлением HCl или Na_2CO_3 (растворы 18.25 или 53 г/л соответственно). Прирост биомассы определяли с помощью фотометра КФК-3 (Сергиев Посад, Россия) по оптической плотности суспензии при длине волны 650 нм в стационарной фазе роста, когда культура практически не содержала элементной серы. Содержание $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_3^{2-} и $\text{H}_2\text{S} + \text{HS}^-$ определяли йодометрическим титрованием (Резников и соавт., 1970). Сульфат определяли нефелометрическим методом (Dodgson, 1961).

Молекулярно-генетические исследования. ДНК чистых культур выделяли по методу Мармура (1961). Содержание Г + Ц в ДНК определяли методом термической денатурации (Owen et al., 1969). Гомологию ДНК определяли методом оптической реассоциации (De Lay et al., 1970). Для установления филогенетического родства штаммов использовали последовательности 16S рРНК генов со следующими номерами доступа в Genbank: NR_028867 (*Trs. sibirica* A12^T = ATCC 700588^T), HQ877088

(*Trs. sibirica* B8-1), KY620119 (*Trs. sibirica* Kir-3), EU908045 (*Thiorhodospira* sp. SLG), NR_108987 (*Ect. magna* DSM 22250^T), X93476 (*Ect. marina* DSM 241^T), HG970164 (*Ect. mobilis* DSM 237^T), X93479 (*Ect. haloalkaliphila* BN 9903^T), HG970163 (*Ect. marismortui* DSM 4180^T), M59151 (*Ect. shaposhnikovi* DSM 243^T), FR733667 (*Ect. vacuolata* DSM 2111^T), AM943121 (*Ect. variabilis* DSM 21381^T), FM244738 (*Ect. salini* JA430^T), OQ618219 (*Ect. lacustris* DSM 116064^T), NR_042831 (*Ect. mongolicus* DSM 15479^T) и CP000544 (*Halorhodospira halophila* DSM 244^T). Выравнивание последовательностей для сравнений 16S рРНК генов было выполнено с помощью программы Mafft v.7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>). Построение филогенетического дерева реализовано в программе Mega6. Парные сравнения последовательностей 16S рРНК генов проводили с использованием BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>), по состоянию на 6 мая 2024 г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика природного местообитания. Все штаммы *Trs. sibirica* были выделены из степных содовых озер, расположенных в Забайкальском крае и Республике Бурятия (Россия) и северо-восточной части Монголии (табл. 1). Этот регион имеет резко континентальный климат, для которого характерны большие перепады суточных (до 20–25°C) и годовых (от 40 до –40°C) температур, а также большая сухость воздуха и малое количество атмосферных осадков (средняя годовая сумма 250–270 мм), выпадающих преимущественно в летний период (более 70%).

Озера, из которых выделены штаммы, представляют собой в основном небольшие и мелководные (<1 км² и <1 м соответственно), часто пересыхающие водоемы с разной степенью минерализации, в которых помимо содержания карбонатов, за счет которых формируются стабильные щелочные условия с pH выше 9.0, присутствуют хлорид натрия или сульфат натрия. Минерализация воды в озерах формируется в ходе концентрации раствора при испарении и вымораживании. Озера имеют ограниченный водосбор, а климатические условия региона приводят к очень неустойчивому водному и химическому режиму озер. Минерализация озер меняется, причем не только в течение года, но и в одни и те же периоды разных лет в зависимости от метеорологических условий.

Источником выделения всех штаммов *Trs. sibirica* были образцы тонких (1–5 мм) цианобактериальных матов и/или микробных пленок, образующихся на поверхности ила и на разлагающейся растительной массе в прибрежной зоне содовых озер.

Таблица 1. Исследованные штаммы *Trs. sibirica* и характеристика их местообитаний

Штамм	Озеро	рН	Минерализация, г/л	Щелочность, г/л		Координаты
				НСО ₃ [−]	СО ₃ [−]	
Забайкальский край, Россия						
A12 ^T 1995 г.	Малый Касытуй	9.49	1.94	1.403	0.24	Н.д.
B8-1 2008 г.	Зун-Торей	9.5	7	1.9	0.6	50°04'00" N, 115°48'00" E
Республика Бурятия, Россия						
BG35 1997 г.	Нухэ-Нур	9.9	16.8	4.56	3.24	54°01'91" N, 110°16'77" E
Kir-3 2015 г.	Киран (Соленое)	9.0—9.3	35	14.644	3.601	50.332236N, 106.853580E
Восточный (Дорнод) аймак, северо-восточная Монголия						
M31 1999 г.	Тосон-Нур	9.8	7.6	Н.д.	Н.д.	48°28'07" N, 114°57'55" E

Примечание. Н.д. — нет данных.

Озеро Малый Касытуй, из которого был выделен первый штамм (A12^T) *Trs. sibirica*, расположено в Ононском районе Забайкальского края и имеет наиболее низкую минерализацию и щелочность (табл. 1; Bryantseva et al., 1999). В природных условиях фототрофные пурпурные бактерии развивались в пурпурном слое тонкого микробного мата, образующегося на поверхности темных иловых отложений с характерным запахом сульфида и растительных остатках литоральной зоны озера.

Зун-Торей (штамм B8-1) — это бессточное соленое озеро, входящее в систему Торейских озер, находится в Ононском районе в 5 км от с. Кулустай на границе с Монголией на абсолютной высоте около 598 м (табл. 1). Территориально входит в состав Даурского заповедника. Зун-Торей, один из крупнейших водоемов Забайкальского края, можно считать остатками древнего моря, существовавшего здесь в период от 150 до 80 млн. лет назад. Свидетельством тому являются довольно часто встречающиеся на побережье обломки доисторических кораллов (Гениатулин, 2009). Озеро имеет округлую форму, слабоизрезанную береговую линию, а также остров, превращающийся в полуостров при понижении уровня воды в водоеме. Дно озера выложено каменистым грунтом, галькой и щебнем, его неровности заполнены песком. Площадь поверхности озера в годы повышенной водности достигает 300 км² при длине 23 км и средней ширине 13 км. Средняя глубина 1.5–1.6 м, наибольшая глубина 7 м. При высоком наполнении озеро соединяется единственной протокой Утичьа (Утыча) с соседним озером Барун-Торей, в которое впадают реки Улдза и Ималка. Зун-Торей притоков не имеет, питание его осуществляется преимущественно

за счет перетока воды из оз. Барун-Торей, поэтому оба озера имеют примерно одинаковый водный режим. Вода в озере непрозрачная, молочно-белого цвета, слабоминерализованная содового типа. Минерализация озера меняется в зависимости от объема воды от 1 до 10 г/л. В засушливые годы озеро почти полностью высыхает, остаются лишь мелкие разобщенные озерца (Гениатулин, 2009). Микробные маты были отобраны в прибрежной части озера.

Озеро Нухэ-Нур (штамм BG35) находится в Курумканском районе Бурятии в 15 км от с. Барагхан. Оно расположено в надпойменном понижении на степном участке долины по правому берегу реки Баргузин. Площадь водного зеркала в разные годы по разным источникам составляет 0.2–4 км², глубина достигает 2 м (Намсараев, 2009; Захарюк и соавт., 2011). Озеро обладает сульфатно-натриевым типом воды. Дно озера твердое, равномерно выстлано мелкодисперсным илом. Береговая почва в отдельные сезоны покрывается выпцветами солей. Водно-солевое питание озеро получает за счет атмосферных осадков и ключа, выходящего вблизи южного берега среди болот.

Озеро Киран (штамм Kir-3), также известное под названиями Соленое и Киранское, расположено в Яхтинском районе Бурятии в долине реки Киран недалеко от границы с Монголией. Площадь водного зеркала составляет 0.36 км², глубина 1.5 м. Озеро не имеет стока, водно-солевое питание получает за счет грунтовых вод и временных дождевых потоков. Характеризуется неустойчивым уровнем воды, зависящим от времени года и количества осадков (Vlasova et al., 1962). Оно относится к типу содово-соленых озер и известно как рапное, карбонатное, с повышенным

содержанием хлоридов, иловое. В настоящее время сульфидсодержащие донные отложения оз. Киран используются в бальнеологических целях. В озере на поверхности отложившегося слоя планктонных цианобактерий образовывается цианобактериальный мат толщиной 1–5 мм. Природные образцы, из которых был изолирован штамм *Trs. sibirica*, были собраны вдоль северо-восточного побережья, где вследствие преобладающих ветров постоянно происходило скопление разлагающегося планктона (Burganskaya et al., 2018).

Озеро Тосон-Нур (штамм М31), небольшое мелководное слабосоленое, расположено в сухой степи северо-восточной части Монголии (табл. 1). Отложения в озере представлены черными и песчаными глинами с сильным сульфидным запахом (Sorokin et al., 2004). В литорали озера наблюдали обильно развитые на поверхности разложившегося органического вещества тонкие микробные маты и биопленки, в которых присутствовал розовый слой.

Морфология и ультраструктура. Все четыре исследованные штамма бактерий (B8-1, BG35, Kir-3 и М31) имели одинаковую морфологию и не отличались от типового штамма *Trs. sibirica* A12^T. Клетки бактерий имели вибриоидную или спиралловидную форму и размер 3–4 × 7–20 мкм (рис. 1). Размножение происходило бинарным делением, путем образования перегородки. Клетки были подвижны с помощью полярного пучка жгутиков, иногда видимого в световой микроскоп при закручивании жгутиков в жгут (рис. 1б, 1в).

Клеточная стенка грамотрицательного типа. Внутритцитоплазматические фотосинтезирующие мембраны, так же как и у *Trs. sibirica* A12^T, были представлены длинными прядями ламелл, пронизывающих клетку, образовывали завитки, выстилали клетки по периферии, а не располагались упорядоченными стопками ламелл, как у большинства видов *Ectothiorhodospiraceae* и *Halorhodospiraceae* (рис. 1г, 1ж, 1з). Элементная сера, образующаяся в процессе роста на сульфиде, откладывалась в виде глобул серы внутри клеток в периплазматическом пространстве и инвагинатах цитоплазмы (рис. 1в). На ультратонких срезах внутриклеточная локализация глобул серы была определена с помощью обработки клеток нитратом серебра. В результате специфической реакции элементной серы с AgNO₃ образовывался нерастворимый сульфид серебра (Ag₂S), который на ультратонких срезах имел вид темных гранул разного размера. Гранулы сульфида серебра также сливались в единую массу и имели вид темных пятен по периметру пространства, в котором накапливалась элементная сера (рис. 1д, 1е). Для сравнения в качестве контроля, чтобы оценить достоверность полученного результата, использовали пурпурную серную бактерию с внутренними

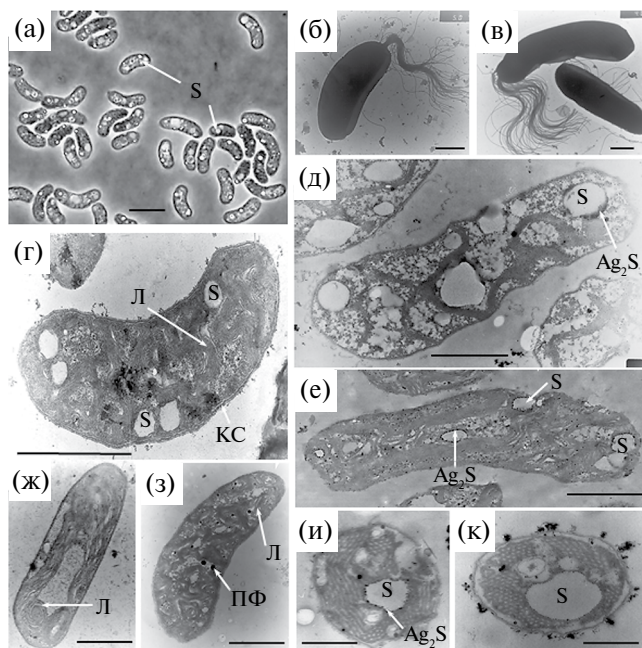


Рис. 1. Морфология и ультратонкое строение *Trs. sibirica* штаммов B8-1 (а), A12^T (б–ж) и BG35 (з): а – световой микроскоп, фазовый контраст; б–в – электронный микроскоп, целые клетки; г, ж–з – электронный микроскоп, ультратонкие срезы; д–е – электронный микроскоп, ультратонкие срезы, клетки обработаны AgNO₃; и–к – электронный микроскоп, ультратонкие срезы, клетки обработаны AgNO₃, *Thioalkalicoccus limnaeus* A26^T. Масштаб: (а) – 10 мкм; (б–з) – 2 мкм; (и–к) – 0.5 мкм. Обозначения: КС – клеточная стенка; Л – ламеллярные фотосинтетические структуры; ПФ – полифосфаты; S – элементная сера; Ag₂S – сульфид серебра.

фотосинтетическими мембранами тубулярно-го типа *Thioalkalicoccus limnaeus* A26^T (ATCC BAA32^T), которая относится к сем. *Chromatiaceae* и откладывает серные глобулы внутри клеток. На ультратонких срезах клеток *Tac. limnaeus*, обработанных нитратом серебра также были выявлены скопления темных нерастворимых гранул сульфида серебра (рис. 1и, 1к). Различий в локализации серных глобул между бактериями *Trs. sibirica* A12^T и *Tac. limnaeus* A26^T на препаратах ультратонких срезов клеток, обработанных нитратом серебра, не обнаружено.

Известно, что анаэробные фототрофные серные бактерии серу, образующуюся как промежуточный продукт, никогда не откладывают в цитоплазме. Члены семейств *Ectothiorhodospiraceae* и *Halorhodospiraceae*, как и зеленые серные бактерии, образуют внеклеточные глобулы серы, а у членов семейства *Chromatiaceae* глобулы серы заключены в белковую оболочку и располагаются внутри клеток в периплазматическом пространстве (Brune 1995; Pattaragulwanit et al., 1998).

О белковых оболочках для внеклеточных глобул серы никогда не сообщались. Гены, кодирующие белки глобул серы (у разных видов комбинация белков глобул серы варьирует), встречаются во всех секвенированных геномах *Chromatiaceae*, но отсутствуют у *Ectothiorhodospiraceae* и *Halorhodospiraceae* (Dahl, 2017). В геноме *Trs. sibirica* A12^T, как и у других членов *Ectothiorhodospiraceae*, не обнаружено ни одного гена, кодирующего белки серных глобул (Dahl, 2017).

Пигменты. Пигментами фотосинтеза у всех исследованных штаммов *Trs. sibirica* были бхл *a* и каротиноиды спириллоксантиновой группы. Спектры поглощения *in vivo* всех штаммов имели четыре максимума бхл *a* в ближней инфракрасной области и показывали полное сходство

с обнаруженными у *Trs. sibirica* A12^T, разница в положении пиков составляла 3–5 нм (рис. 2; Burganskaya et al., 2018). В ацетон-метаноловом экстракте главный максимум поглощения бхл *a* зарегистрирован при 770 нм (рис. 2).

Физиологические свойства. Все исследованные штаммы *Trs. sibirica* были строгими анаэробами и фототрофами. Фотолитоавтотрофный рост происходил на среде с сульфидом, элементарной серой и полисульфидом в качестве доноров электронов, но не с тиосульфатом и сульфитом. При росте на сульфиде элементарная сера образовывалась как промежуточный продукт, затем окислялась до сульфата. В присутствии сульфида и бикарбоната ацетат, пируват, пропионат, сукцинат, фумарат

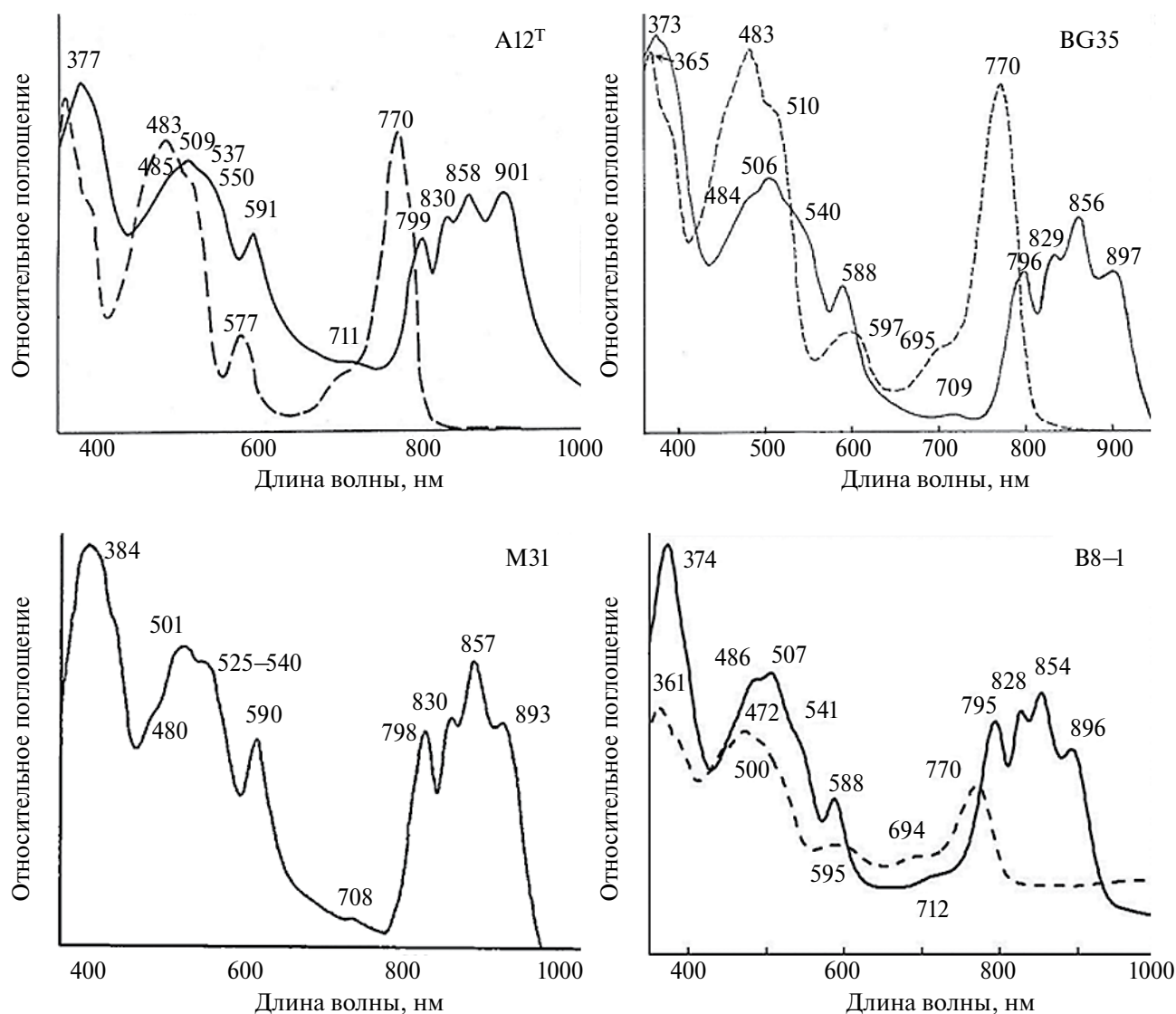


Рис. 2. Спектр поглощения целых клеток (сплошная линия) и ацетон-метанолового экстракта (пунктирная линия) клеток разных штаммов *Trs. sibirica*.

Таблица 2. Использование органических субстратов изученными штаммами *Trs. sibirica*

Субстрат	ATCC 700588 ^T	BG35	M31	B8-1	Kir-3
Ацетат	+	+	+	+	+
Аскорбат	—	—	—	—	—
Аргинин	—	—	—	—	—
Аспартат	—	—	—	—	—
Бутират	—	—	—	—	—
Бензоат	—	—	—	—	—
Валерат	—	—	—	—	—
Гидролизат казеина	—	—	—	—	—
Глицерин	—	—	—	—	—
Гликолят	—	—	—	—	—
Глюкоза	—	—	—	—	—
Глутамат	—	—	—	—	—
Дрожжевой экстракт	—	—	—	—	—
Каприлат	—	—	—	—	—
Капроат	—	—	—	—	—
Лактат	—	—	—	—	—
Малонат	—	—	—	—	—
Маннит	—	—	—	—	—
Малат	+	+	+	+	+
Метанол	—	—	—	—	—
Пропионат	+	+	+	+	+
Пируват	+	+	+	+	+
Сорбит	—	—	—	—	—
Сукцинат	+	(+)	+	+	+
Тартрат	—	—	—	—	—
Формиат	—	—	—	—	—
Фруктоза	—	—	—	—	—
Фумарат	+	(+)	(+)	+	+
Цитрат	—	—	—	—	—
Этанол	—	—	—	—	—

Обозначения: “+” — использует субстрат; “—” — не использует субстрат; “(+)” — слабый рост на субстрате.

и малат использовались в качестве источника углерода при фотосинтезе (табл. 2).

Различий в использовании органических веществ бактериями всех исследованных штаммов не выявлено. Аскорбат, аргинин, аспартат, бутират, бензоат, валерат, гидролизат казеина, глицерин, гликолят, глюкоза, глюконат, глутамат, дрожжевой экстракт, каприлат, капроат, лактат, малонат, маннит, метанол, сорбит, тартрат, формиат, фруктоза, цитрат и этанол не поддерживали рост бактерий исследованных штаммов (табл. 2). К аэробному и микроаэробному росту исследованные бактерии не были способны даже в присутствии органических веществ. В факторах роста не нуждались, но дрожжевой экстракт стимулировал рост.

Бактерии всех штаммов были алкалофилами с оптимумом роста при pH 9–9.5 (диапазон pH 7.5–10.2) (рис. 3).

Бактерии штамма BG35, подобно *Trs. sibirica* A12^T, облигатно нуждались в присутствии карбонат-иона. Рост происходил при концентрации Na₂CO₃ 0.5–7% с оптимумом 2–5%. Для других штаммов зависимость роста от количественного содержания Na₂CO₃ не исследовали. Бактерии всех штаммов в NaCl не нуждались, но были галотолерантами, рост был возможен на среде, содержащей до 6–7% NaCl (рис. 4). Бактерии всех исследованных штаммов были мезофилами с оптимумом роста около 25–30°C.

Генетические свойства и таксономическое положение. Содержание оснований Г + Ц в ДНК

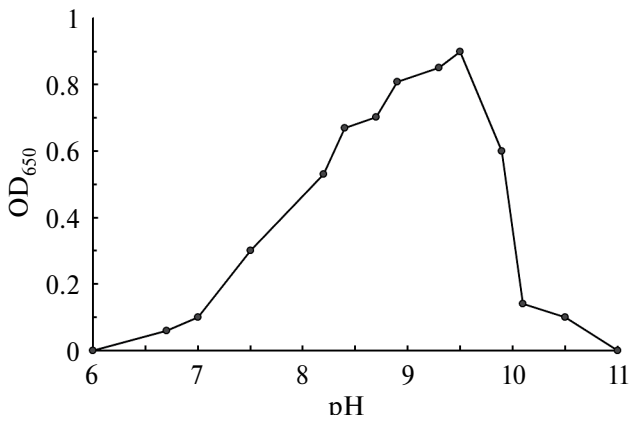


Рис. 3. Влияние pH на рост бактерий *Trs. sibirica* BG35.

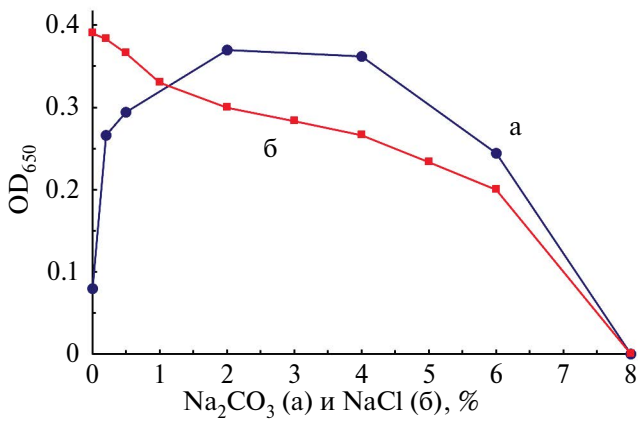


Рис. 4. Влияние Na₂CO₃ и NaCl на рост бактерий *Trs. sibirica* BG35.

штаммов BG35 и M31, по сравнению с известными бактериями рода *Ectothiorhodospira*, было низким и составляло 57.9 и 57.5 мол. % (T_m)

соответственно (табл. 3). По результатам молекулярной ДНК–ДНК гибридизации штаммы BG35 и M31 имели 93–95% сходства с типовым штаммом *Trs. sibirica* A12^T, что указывало на их принадлежность к одному виду.

Филогенетическое положение штаммов B8-1 и Kir-3, основанное на сравнении последовательностей гена 16S рРНК, показано на рис. 5.

Анализ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>, по состоянию на 6 мая 2024 г.) показал 99.93% сходства последовательностей гена 16S рРНК штаммов B8-1 и Kir-3 между собой и 98.55–98.61% сходства с типовым штаммом *Trs. sibirica* A12^T (табл. 3). Штамм SLG, идентифицированный ранее как бактерия рода *Thiorhodospira*, имел 97.64% сходства с *Trs. sibirica* A12^T и 98.77% сходства со штаммами B8-1 и Kir-3. Сходство штаммов B8-1, Kir-3, SLG и *Trs. sibirica* A12^T с *Ect. magna* DSM 22250^T составляло 94.5–95.73%, что свидетельствовало о принадлежности к разным родам. Таким образом, штаммы BG35, M31, B8-1 и Kir-3 по совокупности морфо-физиологических и генетических свойств принадлежат к виду *Trs. sibirica*. Штамм *Thiorhodospira* sp. SLG генетически близок со штаммами *Trs. sibirica*, но имеет некоторые другие отличия (меньший размер клеток, спектр поглощения пигментов, не изучено тонкое строение клеток и многие другие свойства), поэтому его таксономическое положение окончательно не определено.

Содовые озера как экстремальные местообитания, в которых формируются микробные сообщества, возможно являющиеся реликтовым аналогом наземной биоты раннего протерозоя (Заварзин, 1993), являются объектом изучения уже на протяжении длительного времени, и интерес к их исследованию не убывает. Содовые озера с соленостью от пресной воды до сильно насыщенных рассолов широко распространены по всему миру. Аноксигенные фототрофные

Таблица 3. Филогенетическое родство изученных штаммов *Trs. sibirica* на основании сравнения последовательностей 16S рРНК гена и ДНК–ДНК гибридизации

	Штамм	Г + Ц в ДНК, мол. %	ДНК–ДНК гомология, %						
			1	2	3	4	5	6	7
16S рРНК гомология, %	1 <i>Trs. sibirica</i> ATCC 700588 ^T (NR_028867)	56.0–57.4 (56.7)	100	95	93	–	–	–	–
	2 <i>Trs. sibirica</i> BG35	57.9	–	100	–	–	–	–	–
	3 <i>Trs. sibirica</i> M31	57.5	–	–	100	–	–	–	–
	4 <i>Trs. sibirica</i> B8-1 (HQ877088)	–	98.61	–	–	100	–	–	–
	5 <i>Trs. sibirica</i> Kir-3 (KY620119)	–	98.55	–	–	99.93	100	–	–
	6 <i>Trs. sp.</i> SLG (EU908045)	–	97.64	–	–	98.77	98.77	100	–
	7 <i>Ect. magna</i> DSM 22250 ^T (NR_108987)	59.2 (60.9)	94.50	–	–	95.73	95.66	95.44	100

Примечание. В скобках указаны инвентарные номера последовательностей 16S рРНК гена в GenBank. Содержание Г + Ц в ДНК определено методом термической денатурации (T_m), в скобках приведены значения на основании данных геномной ДНК.

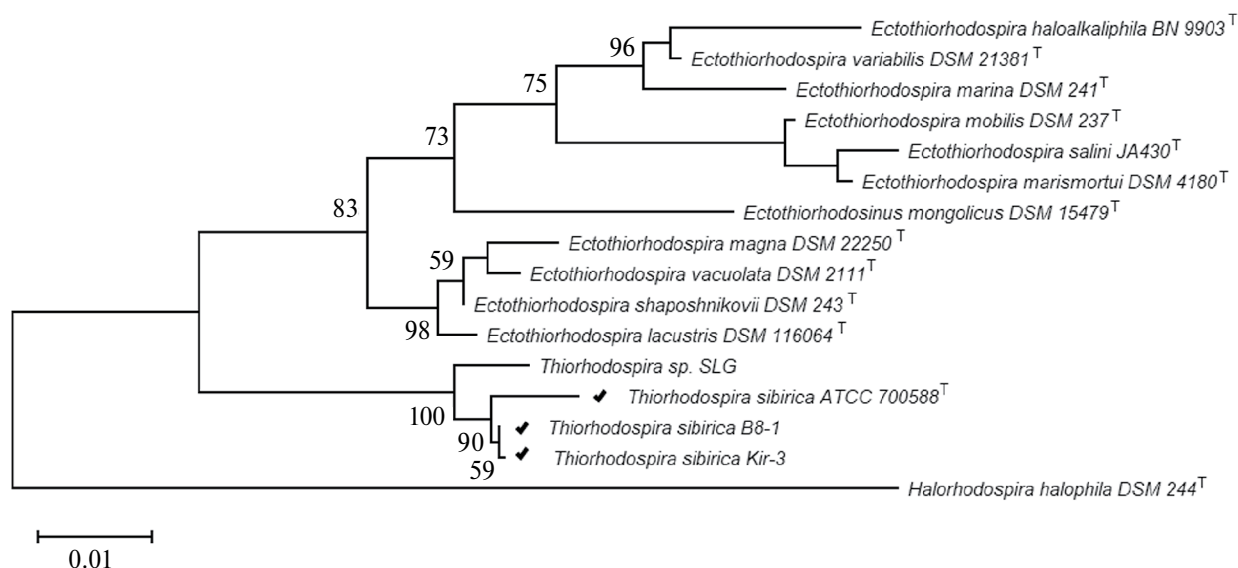


Рис. 5. Филогенетическое положение штаммов *Trs. sibirica* среди фототрофных членов семейства *Ectothiorhodospiraceae*, основанное на сравнении последовательностей гена 16S рРНК. Последовательность *Halorhodospira halophila* DSM 244^T включена в дерево в качестве внешней группы. Дерево построено с использованием алгоритма Neighbour-Joining. Bootstrap значения получены из 1000 bootstrap раундов (значения меньше 50 не показаны).

бактерии являются важным компонентом микробных сообществ содовых озер. Виды семейств *Ectothiorhodospiraceae* и *Halorhodospiraceae*, большинство из которых предпочитают природные местообитания с высокими значениями pH и различным содержанием NaCl, являются характерными обитателями морских и соленых вод во всем мире (Imhoff, 2017).

Алкалофильная галотолерантная, облигатно зависящая от присутствия в среде карбонат-иона пурпурная серная бактерия *Trs. sibirica* хорошо приспособлена к условиям обитания в содовых водоемах. Эта бактерия обладает характерными фенотипическими свойствами, позволяющими идентифицировать ее, даже не используя молекулярно-генетические методы. Ни одна из известных анаэробных фототрофных бактерий не имеет комбинации свойств, присущих этой бактерии: крупный размер спиралловидной формы клеток (3–4 × 7–20 мкм), внутриклеточное отложение серных глобул, фотосинтезирующие мембраны ламеллярного типа, пронизывающие клетку (а не упорядоченные стопки ламелл), уникальный спектр поглощения *in vivo* с четырьмя максимумами бхл *a* в ближней инфракрасной области. Отличие *Trs. sibirica* от других видов и родов также подтверждается филогенетическими исследованиями (Imhoff et al., 2022). Все штаммы *Trs. sibirica* выделены из содовых озер с невысокой минерализацией (минерализация 1.94–35 г/л; pH 9.0–9.8), расположенных в Бурятии и Забайкальском крае России и в северо-восточной

Монголии на относительно малом расстоянии друг от друга. До сих пор *Trs. sibirica*, наряду с другими автохтонными обитателями фототрофных сообществ содовых озер этого географического региона (*Tac. limnaeus*, *Ectothiorhodospinus mongolicus* и др.), в других местонахождениях не обнаружена. Возможно, происхождение этой бактерии (как и *Tac. limnaeus*, *Ectothiorhodospinus mongolicus* и др.) указывает на обособленную эволюцию изолированных экосистем, существовавших также и в геологическом прошлом Земли, что и является причиной отдаленного родства *Trs. sibirica* с другими видами семейств *Ectothiorhodospiraceae* и *Halorhodospiraceae* (Imhoff et al., 2022).

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность Митюшиной Л.Л. за приготовление ультратонких срезов для электронной микроскопии, Лысенко А.М. за определение содержания Г + Ц в ДНК и проведение ДНК–ДНК гибридизации, Игнатенко А.В. за помощь в построении филогенетического дерева и Горленко В.М. за полезную научную дискуссию.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брянцева И.А., Турова Т.П., Ковалева О.Л., Кострикина Н.А., Горленко В.М. Новая крупная алкалофильная пурпурная серобактерия *Ectothiorhodospira magna* sp. nov. // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 782–792.
- Bryantseva I.A., Tourova T.P., Kovaleva O.L., Kostrikin N.A., Gorlenko V.M. *Ectothiorhodospira magna* sp. nov., a new large alkaliphilic purple sulfur bacterium // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 780–790. <https://doi.org/10.1134/S002626171006010X>
- Гениатулин Р.Ф. (гл. ред.). Малая энциклопедия Забайкалья: Природное наследие, Новосибирск: Наука, 2009. 698 с.
- Geniatulin R.F. (ed.). Small Encyclopedia of Transbaikalia: Natural Heritage, Novosibirsk: Nauka, 2009. 698 p.
- Горленко В.М., Брянцева И.А., Пантелеева Е.Е., Турова Т.П., Колганова Т.В., Махнева З.К., Москаленко А.А. *Ectothiorhodospira mongolicum* gen. nov., sp. nov. — новая пурпурная серная бактерия из содового озера Монголии // Микробиология. 2004. Т. 73. С. 80–88.
- Gorlenko V.M., Bryantseva I.A., Pantelieva E.E., Tourova T.P., Kolganova T.V., Makhneva Z.K., Moskalenko A.A. *Ectothiorhodospira mongolicum* gen. nov., sp. nov., a new purple bacterium from a soda lake in Mongolia // Microbiology (Moscow). 2004. V. 73. P. 66–73. <https://doi.org/10.1023/B:MICL.0000016371.80123.45>
- Заварзин Г.А. Эпиконтинентальные содовые водоемы как предполагаемые реликтовые биотопы формирования наземной биоты // Микробиология. 1993. Т. 62. С. 789–800.
- Zavarzin G.A. Epicontinental alkaline water bodies as relict biotopes for the development of terrestrial biota // Microbiology (Moscow). 1993. V. 62. P. 473–479.
- Захарюк А.Г., Абидуева Е.Ю., Ульзетуева И.Д., Намсараев Б.Б. Гидрохимическая и микробиологическая характеристика минеральных озер Нухэ-Нур восточное и Нухэ-Нур западное (Забайкалье) // Вестн. Бурятского гос. ун-та. 2011. № 4. С. 168–171.
- Намсараев Б.Б. (ред.). Солоноватые и соленые озера Забайкалья: гидрохимия, биология, Улан-Удэ: Изд-во Бурят. гос. ун-та, 2009, 340 с.
- Namsaraev B.B. (ed.). Saltish and salt lakes of Zabaikalie: hydrochemistry, biology. Publishing House of Buryat State University, 2009, Ulan-Ude. 340 p.
- Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М.: Недра, 1970. 118 с.
- Reznikov A.A., Mulikovskaya E.P., Sokolov I.Yu. Methods for natural water analysis. M.: Nedra, 1970. 118 p.
- Турова Т.П., Ковалева О.Л., Бумажкин Б.К., Патутина Е.О., Кузнецов Б.Б., Брянцева И.А., Горленко В.М., Сорокин Д.Ю. Использование генов рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы-оксигеназы в качестве молекулярного маркера для оценки разнообразия автотрофных микробных сообществ поверхностных слоев осадков соленых и содовых озер Кулундинской степи // Микробиология. 2011. Т. 80. С. 803–817.
- Tourova T.P., Kovaleva O.L., Bumazhkin B.K., Patutina E.O., Kuznetsov B.B., Bryantseva I.A., Gorlenko V.M., Sorokin D.Yu. Application of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes as molecular markers for assessment of the diversity of autotrophic microbial communities inhabiting the upper sediment horizons of the saline and soda lakes of the Kulunda Steppe // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 812–825. <https://doi.org/10.1134/S0026261711060221>
- Asao M., Pinkart H.C., Madigan M.T. Diversity of extremophilic purple phototrophic bacteria in Soap Lake, a Central Washington (USA) Soda Lake // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. P. 2146–2157. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02449.x>
- Brune D.C. Isolation and characterization of sulfur globule proteins from *Chromatium vinosum* and *Thiocapsa roseopersicina* // Arch. Microbiol. 1995. V. 163. P. 391–399.
- Bryantseva I., Gorlenko V.M., Kompantseva E.I., Imhoff J.F., Süling J., Mityushina L. *Thiorhodospira sibirica* gen. nov., sp. nov., a new alkaliphilic purple sulfur bacterium from a Siberian soda lake // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49. P. 697–703. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-697>
- Bryantseva I.A., Gorlenko V.M., Kompantseva E.I., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Osipov G.A., Alkaliphilic heliobacterium *Heliorestis baculata* sp. nov. and emended description of the genus *Heliorestis* // Arch. Microbiol. 2000. V. 174. P. 283–291. <https://doi.org/10.1007/s002030000204>
- Burganskaya E.I., Bryantseva I.A., Gaisin V.A., Grouzdev D.S., Rysina M.S., Barkhutova D.D., Baslerov R.V., Gorlenko V.M., Kuznetsov B.B. Benthic phototrophic community from Kiran soda lake, south-eastern Siberia // Extremophiles. 2018. V. 22. P. 211–220. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0989-0>
- Dahl C. Sulfur metabolism in phototrophic bacteria // Modern topics in the phototrophic Prokaryotes / Ed. Hallenbeck P.C. Springer: Cham., 2017. P. 27–66. https://doi.org/10.1007/978-3-319-51365-2_2
- De Lay J., Cattoir H., Reynaerts A. The quantitative measurement of DNADNA hybridization from

- renaturation rates // Eur. J. Biochem. 1970. V. 12. P. 133–142.
- Dodgson K.S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymatic and nonenzymatic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters // Biochem. J. 1961. V. 78. P. 312–329.
- Imhoff J.F. Order I. *Chromatiales* ord. nov. // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Eds. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M. New York, NY, USA: Springer, 2005a. V. 2. Part B. P. 1–3.
- Imhoff J.F. Genus XXIII *Thiospirillum* // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Eds. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M. New York, NY, USA: Springer, 2005a. V. 2. Part B. P. 39–40.
- Imhoff J.F. Anoxygenic phototrophic bacteria from extreme environments // Modern topics in the phototrophic Prokaryotes / Ed. Hallenbeck P. Springer, Cham: 2017. P. 427–480.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-46261-5_13
- Imhoff J.F., Kyndt J.A., Meyer T.E. Genomic comparison, phylogeny and taxonomic reevaluation of the *Ectothiorhodospiraceae* and description of *Halorhodospiraceae* fam. nov. and *Halochlorospira* gen. nov. // Microorganisms. 2022. V. 10. Art. 295.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10020295>
- Frigaard N.U., Dahl C. Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria // Adv. Microb. Physiol. 2009. V. 54. P. 103–200.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)00002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)00002-7)
- Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms // J. Mol. Biol. 1961. V. 3. P. 208–218.
- Oren A. The Family *Ectothiorhodospiraceae* // The Prokaryotes / Eds. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Springer: Berlin, Heidelberg, 2014. P. 199–222.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1_248
- Owen R.J., Hill L.R., Lapage S.P. Determination of DNA base composition from melting profiles in dilute buffers // Biopolymers. 1969. V. 7. P. 503–516.
- Pattaragulwanit K., Brune D.C., Trüper H.G., Dahl C. Molecular genetic evidence for extracytoplasmic localization of sulfur globules in *Chromatium vinosum* // Arch. Microbiol. 1998. V. 169. P. 434–444.
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. 1963. V. 17. P. 208–218.
<https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
- Ryter A., Kellenberger E., Birch-Andersen A., Maaløe O. Etude au microscope électronique des plasmes contenant de l'acide déoxyribonucléique 1 Les nucléoides des bactéries en croissance active // Z. Naturforsch. 1958. V. 13. P. 597–605.
<https://doi.org/10.1515/znb-1958-0908>
- Scheminzky F., Klas Z., Job C. Über das Vorkommen von *Thiobacterium bovista* in Thermalwässern // Int. Revue ges. Hydrobiol. 1972. V. 57. P. 801–813.
<https://doi.org/10.1002/iroh.19720570507>
- Sidorova T.N., Makhneva Z.K., Puchkova N.N., Gorlenko V.M., Moskalenko A.A. Characteristics of photosynthetic apparatus of *Thiocapsa* strain BM3 containing okenone as the main carotenoid // Microbiology (Moscow). 1998. V. 67. P. 199–206.
- Sorokin D.Y., Gorlenko V.M., Namsaraev B.B., Namsaraev Z.B., Lysenko A.M., Eshinimaev B.Ts., Khmelenina V.N., Trotsenko Yu.A., Kuenen J.G. Prokaryotic communities of the north-eastern Mongolian soda lakes // Hydrobiologia. 2004. V. 522. P. 235–248.
<https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000029989.73279.e4>
- Vlasova N.A., Tkachuk V.G., Tolstikhina N.I. (eds). Mineral water of South-East Siberia region. M.: Publishing House of Academy of Sciences of the USSR, 1962

EXPERIMENTAL ARTICLES

Description of New Strains and Features of the Ultra-Fine Structure of Cells of the Purple Sulfur Bacteria *Thiorhodospira sibirica*

I. A. Bryantseva*

S.N. Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology”
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071, Russia

*e-mail: bryantseva@mail.ru

Abstract. The properties of four strains of the alkaliphilic halotolerant purple sulfur bacterium *Thiorhodospira sibirica* isolated from steppe soda lakes (mineralization 7–35 g/l, pH 9.0–9.8) located in the Zabaikalsky Krai and the Republic of Buryatia (Russia) and northeastern Mongolia were studied. All the studied strains had morpho-physiological properties characteristic of *Trs. sibirica*: a unique spectrum of pigment absorption in vivo, having four absorption maxima of bacteriochlorophyll *a* in the near infrared region

and unusually located photosynthetic membranes of the lamellar type. Bacteria of all the studied strains, as well as the type strain A12^T (= ATCC 700588^T), formed elemental sulfur as an intermediate product of sulfide oxidation, the globules of which had an intracellular localization, and not extracellular as in other *Ectothiorhodospiraceae*. Using the example of the type strain, the intracellular location of the elemental sulfur globules was shown on ultrathin sections using a specific reaction with silver nitrate. All the studied strains had 93–95% similarity according to the results of DNA–DNA hybridization or 98.55–98.61% similarity of the 16S rRNA gene sequences with *Trs. sibirica* A12^T (= ATCC 700588^T), which confirms their belonging to the species *Trs. sibirica*.

Keywords: purple sulfur bacteria, alkaliphiles, bacteriochlorophyll, pigment absorption spectrum, *Thiorhodospira sibirica*, phototrophic communities of soda lakes