

М.Б. Горішний, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул.Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна, тел.: 8 (067) 492 76 81,
e-mail: M_Gorishniy@ukr.net

РІСТ *CHLOROBIVUM LIMICOLA* YA-2002 ЗА РІЗНИХ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ

*Досліджено умови росту *C. limicola* Ya-2002. Показано, що максимальний ріст бактерій відбувається за інтенсивності освітлення в 40 лк. Збільшення інтенсивності освітлення супроводжується зниженням росту культури. За допомогою електронної мікроскопії показано, що різна інтенсивність освітлення культури викликає зміни у фотосинтетичному апараті клітин *C. limicola* Ya-2002. Концентрація сірководню, що забезпечує максимальний ріст *C. limicola*, складає 4 мМ, збільшення вмісту сірководню в середовищі супроводжується пригніченням росту культури. Клітини бактерій *C. limicola* Ya-2002 не використовують глюкозу, фруктозу, галактозу як джерело вуглецю та донор електронів. Лише додавання ацетату і пірувату стимулює ріст культури за наявності CO_2 і H_2S в середовищі. Показано, що зелені сіркобактерії *C. limicola* Ya-2002 здатні використовувати амонійний, амінний і молекулярний азот. Нітратна форма азоту не використовується бактеріями. Додавання нітратів до середовища пригнічує процес азотфіксації.*

К л ю ч о в і с л о в а : зелені сіркобактерії, ріст, сірководень.

Зелені фототрофні сіркові бактерії зустрічаються майже в кожному водному басейні. Однак, основними місцями їх існування є прісні та солоні водойми, котрі містять сірководень [2, 9, 11]. Переважно, це водойми застійного типу з високим вмістом органічних речовин. У таких середовищах фотосинтезувальні зелені сіркобактерії розвиваються у великих кількостях і є домінуючою мікрофлорою при концентрації сірководню 50-100 мг/л. Вони утворюють скупчення у вигляді зелених плям чи суцільних нальотів на дні освітлених ділянок водойм [1, 4, 3]. Фототрофні зелені сіркобактерії є першим бар'єром на шляху поширення сірководню у верхні шари водойм, що забезпечує можливість розвитку там багатьох рослинних та тваринних організмів. У випадку достатньої освітленості ці бактерії стають головними споживачами сірководню, використовуючи його як донор електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу [9, 12].

Метою роботи було дослідити вплив освітлення, концентрації сірководню та різних джерел вуглецевого живлення на процес нагромадження біомаси зеленими фотосинтезувальними сіркобактеріями *C. limicola* Ya-2002.



Матеріали і методи

У досліджах використовували культуру зелених фотосинтезувальних сіркових бактерій *C. limicola* Ya-2002, виділену з водойм Яворівського сіркового родовища, що багаті сірководнем [1, 2]. Бактерії вирощували в анаеробних умовах у рідкому середовищі Ван Ніля [2] протягом 8-10 діб при температурі 24–25 °С і постійному освітленні променями з довжиною хвилі 740-800 нм. Інтенсивність освітлення вимірювали за допомогою люксметра Ю-116.

Визначення біомаси бактерій проводили фотоелектроколориметрично ($\lambda=450$ нм, довжина оптичного шляху 3 мм, ФЕК–2 МП–УХЛЧ4.2).

Морфологічні зміни в клітинах бактерій вивчали за допомогою електронного трансмісійного мікроскопа УЕМВ–100Б. Для виготовлення мікрофотографій двічі відмиті дистильованою водою клітини осаджували центрифугуванням при 10 тис. об./хв протягом 15 хв. Клітини фіксували в 1,5 % розчині OsO_4 у какодилатному буфері (рН 7,2) протягом 90 хв при 0 °С. Фіксовані клітини промивали, обезводнювали в розчинах із зростаючими концентраціями етанолу і окису пропілену. Зразки переносили в епоксидну смолу Епон 812. Зрізи клітин отримували на ультрамікромомі УМТП – 6 і контрастували цитратом свинцю за Рейнольдсом. Дослідження зразків проводили на електронному трансмісійному мікроскопі УЕМВ–100Б [2]. Статистичне оброблення отриманих результатів проводили з використанням програми “Microsoft Excel 2003”. Вибір тактики статистичного оброблення і підготовку даних для аналізу здійснювали, базуючись на загальноприйнятих методах [7] за рівня достовірності $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Відомо, що інтенсивність нагромадження біомаси зеленими фотосинтезувальними сіркобактеріями залежить від різних факторів середовища: природи і інтенсивності освітлення, концентрації первинного донора електронів, вуглецевого живлення, мінерального складу середовища, температури тощо [5, 6, 7].

Представники родини *Chlorobiaceae* – облігатні фотолітоавтотрофи. Особливістю цих бактерій є наявність у клітинах спеціальних світлочутливих везикул хлоросом [6]. У цих структурах, залежно від виду бактерій, знаходяться бактеріохлорофіли *c*, *d* та *e*, а також ліпіди і каротиноїди. Локалізовані в хлоросомах бактеріохлорофіли виконують функцію світловловлюючих антен. Останні зв'язані з реакційним центром, локалізованим у плазматичній мембрані через бактеріохлорофіл *a*, який знаходиться в базальній пластинці і виконує функцію проміжної ланки при переносі енергії світла від хлоросом на реакційні центри [6, 8]. Високий ступінь впорядкованості даних пігментів здійснюється за допомогою білкових молекул.

Процес нагромадження біомаси зеленими сіркобактеріями залежить не лише від спектрального складу світлових променів, але і від інтенсивності світлового потоку. На рис 1. показано, як впливає інтенсивність освітлення культури на ріст *C. limicola* Ya-2002.

Дані цього експерименту показують, що інтенсивність освітлення відіграє важливу роль у процесі росту бактерій. Найбільш інтенсивно ріст культури відбувався при слабкому освітленні, інтенсивність якого не перевищувала 40 лк. Подальше зростання інтенсивності освітлення супроводжувалося пригніченням росту культури, про що свідчило зменшення біомаси бактерій. При інтенсивності 150 лк біомаса бактерій зменшувалась у два рази, а при 600 лк рівень біомаси був у п'ять разів меншим від максимального.



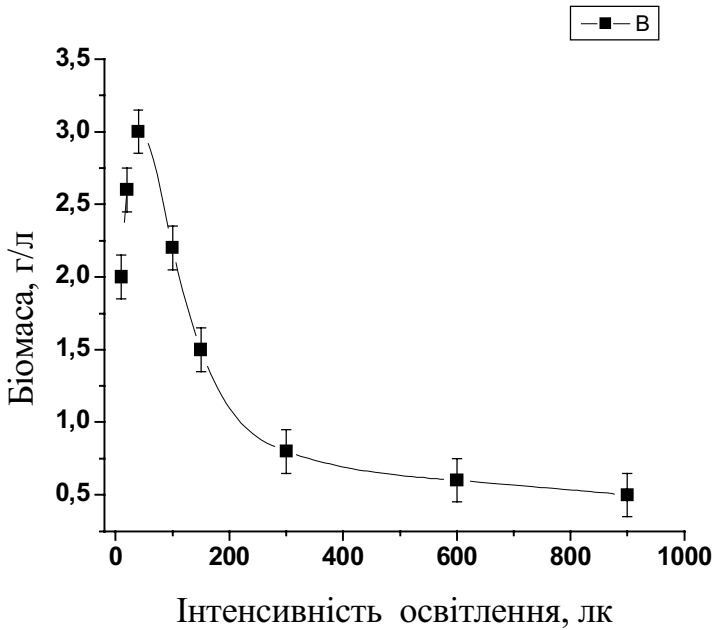


Рис. 1. Вплив інтенсивності освітлення на ріст *C. limicola* Ya-2002

Fig. 1. Correlation between lighting intensity and growth *C. limicola* Ya-2002

Електронна мікроскопія клітин, вирощених за умов різної освітленості, показала, що клітини, вирощені при 40 лк (рис. 2), містять добре розвинену систему хлоросом, що в свою чергу свідчить про високу інтенсивність процесу фотосинтезу в клітинах. У той час, як за освітлення в 600 лк ці структури розвинені слабо. Подібні закономірності синтезу бактеріохлорофілів і утворення хлоросом зеленими сірковими бактеріями описані в літературі [9].

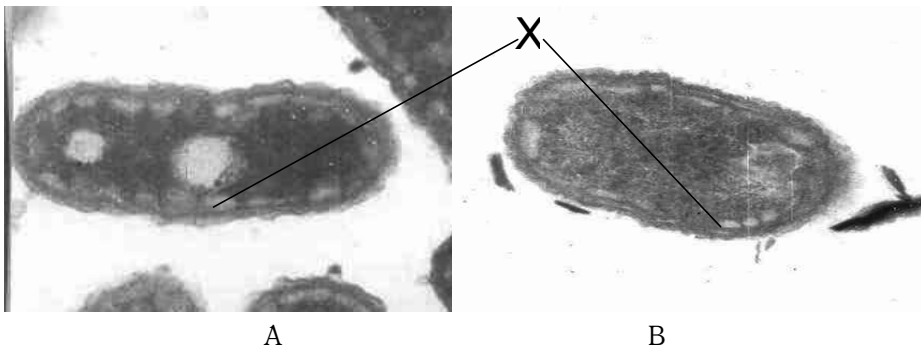


Рис. 2. Ультратонкі зрізи клітин *C. limicola* Ya-2002, вирощених за різної освітленості: А – 40 лк, В – 600 лк. X – хлоросоми (x 50 000)

Fig. 2. Ultrathin sections of the cells *C. limicola* Ya-2002, grown under different intensity of light

Фототрофні сіркові бактерії мають лише одну фотосистему першого типу, в результаті чого не здатні використовувати воду як первинний донор електронів [6]. Замість води, зелені сіркобактерії використовують більш відновлені сполуки, наприклад, сірководень. Побічним продуктом у процесі фотосинтезу у цих бактерій є сірка або сульфати [9, 11]. Очевидно, у фототрофних сіркових бактерій концентрація донора електронів у середовищі відіграє провідну роль у процесі їх життєдіяльності. На рис. 3 показано ріст *C. limicola* Ya-2002 на середовищі з різними концентраціями сульфиду натрію.

Як видно з рис. 3, найвищий вихід біомаси бактерій забезпечує концентрація сірководню, яка складає 4 мМ (рис. 3). Подальше зростання вмісту сульфиду в середовищі не сприяло збільшенню біомаси, а супроводжувалось пригніченням росту культури, що, очевидно, обумовлено токсичною дією цієї сполуки на клітини *C. limicola* Ya-2002.

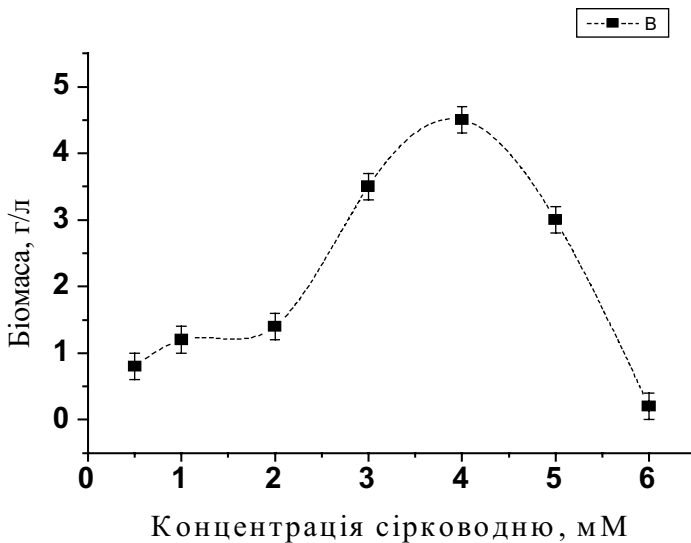


Рис. 3. Вплив різної концентрації сульфиду натрію на ріст *C. limicola* Ya-2002

Fig. 3. Correlation between different sulphur nitrogen concentration and the growth of *C. limicola* Ya-2002

Зелені сіркобактерії є облігатні фотолітоавтотрофи. Однак, у літературі [11, 12] зустрічаються повідомлення про те, що деякі представники родини *Chlorobiaceae* можуть засвоювати невеликі кількості органічних сполук: глюкози, фруктози, цукрози, маніту, мальтози, пірувату, ацетату, цитрату. Додавання цих сполук в середовище супроводжувалось деяким стимулюванням росту культури, завдяки їх використанню як джерела вуглецю. Однак, це використання було можливе лише за наявності в середовищі культивування сірководню та вуглекислоти. При вивченні здатності *C. limicola* Ya-2002 використовувати глюкозу, фруктозу, цукрозу нами показано (рис. 4), що ці цукри не використовувались бактеріями ні як донори електронів, ні як джерело вуглецю.

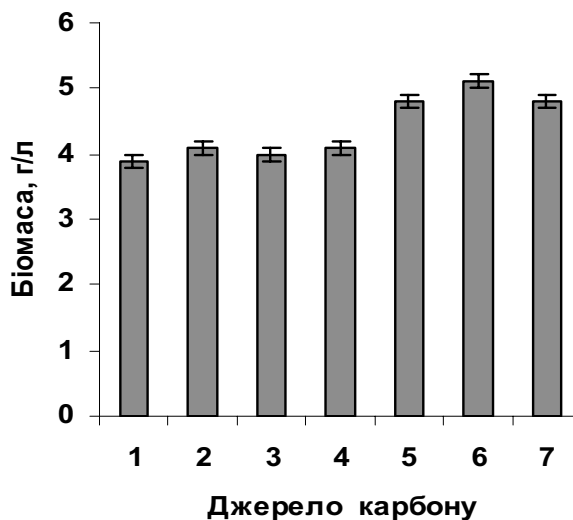


Рис. 4. Вплив органічних сполук на ріст *C. limicola* Ya-2002.
 1 – контроль (без органічних сполук); 2 – глюкоза; 3 – фруктоза;
 4 - сахароза; 5 - ацетат; 6 - піруват + ацетат; 7 - піруват

Fig. 4. Correlation between organic compounds and the growth of *C. limicola* Ya-2002. 1 – control (without any organic compounds); 2 - glucose; 3 - fructose; 4 - sucrose; 5 - acetate; 6 - piruvat + acetate; 7 - piruvat

Лише внесення пірувату та ацетату сприяло збільшенню біомаси *C. limicola* Ya-2002 на 20 %. Такий вплив цих сполук можна пояснити функціонуванням у *C. limicola* Ya-2002 циклу Арнона, одним із проміжних продуктів якого є ацетат. Останній у представників родини *Chlorobiaceae* карбоксилується до пірувату, який використовується у реакціях глюконеогенезу [4, 11]. Слід відмітити, що клітини бактерій не р остуть за відсутності гідрокарбонату натрію в середовищі. Щоб визначити форми азоту, які засвоюються *C. limicola* Ya-2002, бактерії вирощували на середовищах з різними сполуками азоту. Виявилось, що *C. limicola* Ya-2002 здатні використовувати різні джерела азоту в процесі росту (рис. 5).

Після 10-ти діб культивування найбільший вихід біомаси спостерігали при рості бактерій на середовищі з NH_4Cl . Згідно з літературними даними [4, 9, 11], асиміляція солей амонію зеленими сіркобактеріями відбувається за допомогою глутамінсинтетази і глутаматсинтази. Очевидно, у *C. limicola* ці ферменти також проявляють високу активність.

Біомаса клітин на середовищі з пептоном і сумішшю амінокислот була лише на 25-30 % менша, ніж на середовищі з солями амонію, що свідчить про здатність *C. limicola* Ya-2002 засвоювати амінний азот середовища.

Подібно, як на середовищі з амінным азотом, бактерії добре росли і за відсутності джерела азоту, що, очевидно, свідчить про їх здатність до фіксації атмосферного азоту [4]. Ця властивість у *C. limicola* Ya-2002 підтверджується дослідями з 10-ти кратними пересівами культури на середовища без азоту.

Особливої уваги заслуговує експеримент з вивчення нагромадження біомаси бактеріями на середовищі з нітратами. Практично ріст у цьому випадку відсутній. З літературних джерел відомо [11], що у більшості представників родини



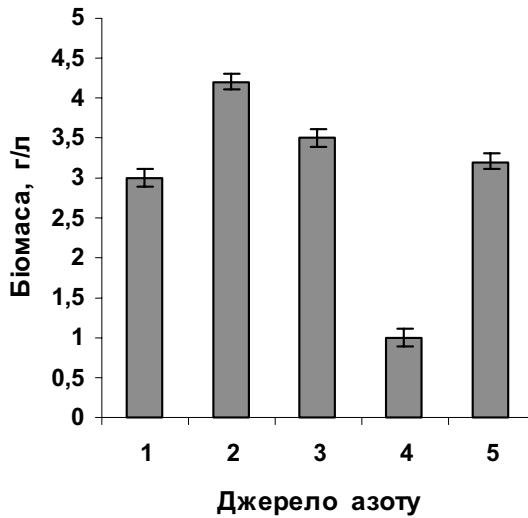


Рис. 5. Ріст *C. limicola* Ya-2002 на середовищі з різними джерелами азоту: 1 – без азоту, 2 – NH_4Cl , 3 – пептон, 4 – KNO_3 , 5 – аспарагін + аргінін + гліцин

Fig. 5. *C. limicola* Ya-2002 growth on the medium with different nitrogen sources: 1 – without nitrogen, 2 – NH_4Cl , 3 – peptone, 4 – KNO_3 , 5 – asparagine + arginine + glycine

Chlorobiaceae відсутня активність нітратредуктази. Однак, якщо врахувати, що бактерії *C. limicola* Ya-2002 здатні до азотфіксації, напрашується висновок, що у цих мікроорганізмів не тільки відсутня нітратредуктаза, але й те, що нітрати виявляють сильну інгібуючу дію на активність нітрогенази.

Таким чином, виділений нами штам зелених сіркобактерій *C. limicola* Ya-2002 добре росте на мінеральному середовищі і нагромаджує біомасу до 5 мг/мл протягом 8-10 діб культивування. Ріст культури визначається наявністю сірководню та вуглекислоти в середовищі культивування. Нагромадження біомаси культурою стимулює низька інтенсивність освітлення (40 лк), збільшення інтенсивності призводить до пригнічення росту. Суттєвий вплив на ріст бактерій має концентрація сірководню. Максимальний ріст бактерій забезпечує 4 мМ Na_2S , збільшення вмісту сульфиду натрію в середовищі супроводжується пригніченням росту культури. Зелені сіркобактерії *C. limicola* Ya-2002 не використовують органічні сполуки, в якості джерел вуглецевого живлення та електронів в процесі фотосинтезу. Виділений штам використовує лише піруват і ацетат як додаткове джерело вуглецю за умов наявності H_2S і CO_2 в середовищі культивування.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баран І., Мороз О., Гудзь С., Гнатуш С. Метаболізм органічних сполук у зелених фототрофних сіркобактерій та утилізація ними сірководню // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2003. Вип. 33. С. 132-140.
2. Гудзь С.П., Баран І.М., Кіт Л.Я. та ін. Зелені сіркобактерії водоїм Яворівського сіркового родовища // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2002. – Вип. 28. – С. 246-251.

3. Грабович М.Ю. Участие прокариот в круговороте серы // Соросовский образовательный журнал. — 1999. — Т.1, №12. — С.16-20.
4. Кондратьева Е.Н. Фотосинтезирующие бактерии. — М.: Изд-во. Москов. ун-та, 1989. — С. 82-103.
5. Кульский Л. А., Гороновский И. Т. Справочник по свойствам, методам анализа и очистке вод. — К.: Наук. думка, 1980. — 1260 с.
6. Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. Современная микробиология. М.: Мир, 2005. Т.1. — С. 207-215.
7. Лапач С.И., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследований с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 408с.
8. Хоулт Дж., Криг. Р., Снит. П. Определитель бактерий Берджи. — М.: Мир, 1997. — С. 361-379.
9. Alexander B., Cox R. Phylogeny of green sulfur bacteria on the basis of gene sequences of 16s rRNA and of the Fenna-Matthews-Olson protein // Arch. Microbiol. — 2002. — Vol. 178. — P. 131.
10. Kuster E., Dorusch F., Altenburger R. Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, and *Daphnia Magna* // Environ. Toxicol. Chem. — 2005. — Vol. 24, № 10. — P. 2621-2629.
11. Overmann j., Tuschak.C. Phylogeny and molecular fingerprinting of green sulfur bacteria //Arch. Microbiol. — 1997. — Vol. 167. — P. 302-309.
12. Sireveg R., Ormerod J. Synthesis, storage, and degradation of polyglucose in *Chlorobium thiosulfatophilum* // Arch. Mikrobiol. — 1977. — Vol. 111. — P.239.

УДК 579. 266 / 68 (474)

М.Б. Горішний, С.П. Гудзь, С.А. Гнатуш

Львовский национальный университет имени Ивана Франко, ул.Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина, тел.: 8 (067) 492 76 81, e-mail: M_Gorishniy@ukr.net

РОСТ *CHLOROBIVM LIMICOLA* YA-2002 ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Реферат

Исследованы условия роста *C. limicola* Ya-2002. Показано, что максимальный рост бактерии происходит при интенсивности освещения в 40 лк. Увеличение интенсивности освещения сопровождается снижением роста культуры. С помощью электронной микроскопии показано, что разная интенсивность освещения культуры вызывает изменения в фотосинтетическом аппарате клеток *C. limicola* Ya-2002. Концентрация сероводорода, что обеспечивает максимальный рост *C. limicola* Ya-2002, составляет 4 мМ, увеличение содержания сероводорода в среде сопровождается снижением роста культуры. Клетки бактерий *C. limicola* Ya-2002 не используют глюкозу, фруктозу, галактозу как источник углерода и донор электронов. Лишь добавление



ацетата и пирувата стимулює рiст культури при наявнiстi CO₂ и H₂S в середi. Показано, що зеленi серобактерии *C. limicola* Ya-2002 способны использовать аммонийный и молекулярный азот. Нитратная форма азота не используется бактериями. Добавление нитратов в среду культивирования подавляет процесс азотфиксации.

К л ю ч е в ы е с л о в а : зеленi серобактерии, рiст, сероводород.

M.B. Gorishniy, C.P. Gudz, S.O. Hnatush

Ivan Franco Lviv National University,
Hrushevskogo st., 4, Lviv, 79005, Ukraine, tel.: 8 (067) 492 76 81,
e-mail: M_Gorishniy@ukr.net

THE GROWTH OF *CHLOROBIVM LIMICOLA* YA-2002 UNDER VARIOUS CULTIVATION CONDITIONS

Summary

The conditions of *Chlorobium limicola* Ya-2002 growth have been studied. It has been shown that the maximum growth of the bacteria takes place under the light intensity of 40 lx. The increase in the light intensity is accompanied by the decrease in the growth of the culture. By means of electronic microscopy it has been revealed that various light intensity causes changes in the photosynthesising apparatus of the cells of *Chlorobium limicola* Ya-2002. The concentration of sulphur hydrogen which insures the maximum growth of *Chlorobium limicola* Ya-2002 amounts to 4 mM. The increase in the sulphur hydrogen content in the environment is accompanied by the decrease in the growth of the culture. The cells of *Chlorobium limicola* Ya-2002 bacteria do not make use of glucose, fructose, galactose as a carbonic source and an electron donor. Exclusively the addition of acetate and piruvat stimulates the growth of the culture, on condition CO₂ and H₂S are present in the environment. It has been shown that green sulphur bacteria *Chlorobium limicola* Ya-2002 are capable of utilizing ammonium, amino and atmospheric nitrogen. Nitrate form of nitrogen is not utilized by the bacteria. Addition of nitrates into the environment decelerates the process of nitric fixation.

K e y w o r d s : green sulphur bacteria, growth, hydrogen sulfide.