

**Т. Сегін, С. Гнатуш, О. Масловська, О. Василів**

Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна,  
тел.: +38 (067) 732 51 33, e-mail: segint@ukr.net

## **АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ ГЛУТАТІОНОВОЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ БАКТЕРІЙ *CHLOROBIVM LIMICOLA* ІМВ К-8 ЗА ВПЛИВУ КУПРУМ (II) СУЛЬФАТУ**

**Мета.** Дослідити зміни активностей ензимів глутатіонової антиоксидантної системи бактерій *Chlorobium limicola* ІМВ К-8 за впливу купрум (II) сульфату. **Методи.** У роботі використовували бактерії *C. limicola* ІМВ К-8, які вироцували у середовищі *Green sulfur bacteria*. Глутатіонпероксидазну активність визначали за швидкістю окиснення відновленого глутатіону до і після інкубації з гідропероксидом третинного бутилу за допомогою кольорової реакції з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою. Глутатіон-S-трансферазну активність визначали за швидкістю утворення кон'югату відновленого глутатіону в реакції з 1-хлор-2,4-динітробензолом. **Результати.** Досліджено глутатіон-S-трансферазну, глутатіонпероксидазну та глутатіонредуктазну активності безклітинних екстрактів *C. limicola* ІМВ К-8 за впливу купрум (II) сульфату у концентраціях, які спричиняли зниження накопичення біомаси на 10–70%. Показано, що за впливу всіх досліджуваних концентрацій купрум (II) сульфату зростали глутатіон-S-трансферазна та глутатіонпероксидазна активності, порівняно з контролем. Активність цих ензимів змінювалася залежно від концентрації купрум (II) сульфату в середовищі інкубації та тривалості культивування бактерій. Також встановлено, що у досліджуваних бактерій відсутня глутатіонредуктазна активність. **Висновок.** Зростання глутатіонпероксидазної активності у 2–12 разів та глутатіон-S-трансферазної активності у 1,5–2 рази, порівняно з контролем, у безклітинних екстрактах *C. limicola* ІМВ К-8 за впливу купрум (II) сульфату свідчить про накопичення у клітинах гідрофобних і гідрофільних органічних пероксидів, а також про те що, ймовірно, ця система є одним із важливих способів захисту клітин зелених фотосинтезуювальних бактерій, зокрема *C. limicola*, від активних метаболітів кисню.

**Ключові слова:** зелені бактерії, *Chlorobium limicola*, глутатіон-S-трансфераза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, купрум (II) сульфат.

Мікроорганізми у навколишньому середовищі, особливо у техногенно трансформованих біотопах, зазнають впливу стресових чинників. Важливим забруднювачем кар'єрних водойм у місцях промислового видобування сірки, є гідроген сульфід, який утворюється у значних кількостях і згубно впливає на функціонування організмів [8, 10]. Виділені нами зелені фотосинтезуюваль-



ні бактерії *Chlorobium limicola* IMB K-8 з води озера Яворівське (Україна, Львівська обл.) використовують водень сульфід як донор електронів, внаслідок чого водойма очищується від нього [1]. Такі властивості *C. limicola* IMB K-8 можуть бути використані для створення біотехнологій для очищення вод, забруднених воднем сульфідом. Відомо, що забруднювачами навколишнього середовища, у тому числі і техногенних водойм, є сполуки важких металів [10]. Йони металів із змінною валентністю спричиняють утворення активних метаболітів кисню (АМК) [2, 4, 6]. Щоб протидіяти шкідливому впливу АМК багато анаеробних мікроорганізмів виробили систему захисту, важливою ланкою якої є глутатіонзалежна антиоксидантна система [8, 11]. Її функціонування у клітинах прокариот досліджено не достатньо. Відомо, що глутатіонова антиоксидантна система є видоспецифічною, а інколи і штамоспецифічною [11]. Гени, які кодуєть глутатіонпероксидазу чи глутатіон-S-трансферазу у бактерій *C. limicola* у базі даних GenBank не виявлено. Однак, ідентифіковано амінокислотні та нуклеотидні послідовності ензимів глутатіонової системи у близькоспоріднених родів і задепоновано послідовність ензиму штаму *Chlorobium tepidum* TLS (NP\_661153.1) довжиною 164 амінокислоти, який характеризується глутатіон-S-трансферазною активністю. Також задепоновано дві амінокислотні послідовності ензимів штаму *Chlorobium* sp. GBChlB довжиною 163 (GI:662569203) та 157 амінокислот (GI:662568093), для яких характерна глутатіонпероксидазна активність [9]. Глутатіонова система забезпечує відновлення  $H_2O_2$  і різних органічних гідропероксидів та знешкодження токсичних альдегідів, внаслідок кон'югації з відновленим глутатіоном [2, 4, 11]. У літературі немає даних щодо функціонування такої системи у зелених сіркобактерій.

Метою роботи було дослідити зміни активностей ензимів глутатіонової антиоксидантної системи бактерій *C. limicola* IMB K-8 за впливу купрум (II) сульфату.

### Матеріали і методи

У роботі використовували бактерії *Chlorobium limicola* IMB K-8, які вирощували у середовищі Green sulfur bacteria (GSB) [1] як описано в роботі [6]. Суспензію клітин бактерій з експоненціальної фази росту обробляли упродовж однієї години трис-НСІ буфером (50 мМ, рН 7,0), який містив купрум (II) сульфат у концентраціях від 0,05 до 0,5 мМ як описано у нашій попередній роботі [6]. У зразки, що слугували за контроль, купрум (II) сульфат не вносили. Обрані концентрації купрум (II) сульфату зумовлювали зниження нагромадження біомаси від 10% до 70%, що дозволяє оцінити зміни показників антиоксидантної системи за зростання пригнічувального впливу [6]. Безклітинні екстракти одержували руйнуванням клітин на ультразвуковому гомогенізаторі УЗДН-2Т (22 кГц, 5 хв, 0 °С) [6]. Концентрацію білків у безклітинних екстрактах визначали за методом Лоурі [7]. Глутатіонпероксидазну активність визначали за швидкістю окиснення відновленого глутатіону до та після інкубації з гідропероксидом третинного бутилу за допомогою кольорової реакції з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою [2]. Глутатіон-S-трансферазну активність визначали за швидкістю утворення кон'югату відновлено-



го глутатіону в реакції з 1-хлор-2,4-динітробензолом, який характеризується максимумом поглинання за довжини хвилі 340 нм [3]. Глутатіонредуктазну активність визначали за зниженням вмісту НАДФН упродовж 1 хв, вимірюючи оптичну густину за довжини хвилі 340 нм [2]. Вираховували основні статистичні показники за отриманими даними (середнє арифметичне – М; стандартну похибку середнього арифметичного – m). Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками трьох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стюдента. Критичний рівень значимості «р» був прийнятий рівним 0,05 [5]. Для обробки даних використовували пакети програм MS Excel 2003 та Origin 8.

### Результати досліджень та їх обговорення

Внесення купрум (II) сульфату, як стресового чинника, до середовища інкубації *C. limicola* ІМВ К-8 в концентраціях 0,05–0,5 мМ спричиняє вільно-радикальне окиснення ліпідів, що призводить до активації системи антиоксидантного захисту [6].

Глутатіон-S-трансферазна активність *C. limicola* ІМВ К-8 у контролі була найвищою на сьому добу культивування ( $41 \pm 2,7$  од. акт./мг білка) (рис. 1).

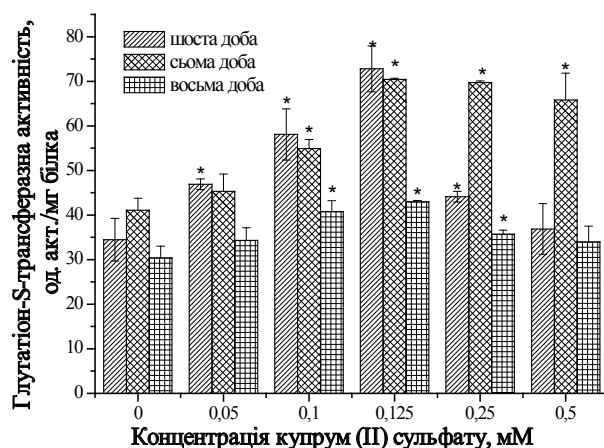


Рис. 1. Глутатіон-S-трансферазна активність безклітинних екстрактів *C. limicola* ІМВ К-8 за впливу купрум (II) сульфату (\* –  $p = 0,05$ ,  $n = 3$  – вірогідні зміни, порівняно з контролем)

Fig. 1. Glutathione-S-transferase activity of cell-free extracts *C. limicola* of IMV K-8 under the influence of copper (II) sulfate (\* –  $p = 0.05$ ,  $n = 3$  – probable changes compared with control)

Внесення купрум (II) сульфату в інкубаційне середовище зумовлювало зростання глутатіон-S-трансферазної активності у безклітинних екстрактах *C. limicola* ІМВ К-8, порівняно з контролем. За внесення купрум (II) сульфату в інкубаційне середовище у концентраціях 0,05–0,125 мМ глутатіон-S-транс-

феразна активність була найвищою на шосту добу вирощування і зі збільшенням тривалості вирощування до восьми діб знижувалася. Ензиматична активність безклітинних екстрактів *C. limicola* ІМВ К-8, інкубованих у середовищі із 0,25 та 0,5 мМ купрум (II) сульфату, була найвищою на сьому добу культивування (відповідно  $70 \pm 0,34$  та  $66 \pm 6,02$  од. акт./мг білка). Упродовж шостої та восьмої діб глутатіон-S-трансферазна активність не змінювалася, порівняно з контролем. За впливу цих концентрацій купрум (II) сульфату біомаса *C. limicola* ІМВ К-8 знижувалася у 2,7 та 3,2 рази, порівняно з контролем.

Припускаємо, що за цих умов у клітинах *C. limicola* ІМВ К-8 пошкоджується поліпептидний ланцюг глутатіон-S-трансфери внаслідок впливу АМК, оскільки відомо, що токсичні продукти перекисного окиснення ліпідів, зокрема малоновий диальдегід та 4-гідроксिनоненаль, здатні взаємодіяти з амінокислотами і, таким чином, знижувати або унеможливити ензиматичну активність [4]. Також, причиною зниження активності глутатіон-S-трансфери може бути пошкодження генів, які кодують цей ензим або забезпечують його синтез, внаслідок взаємодії АМК з ДНК. Тому клітини *C. limicola* ІМВ К-8, інкубовані у буфері із купрум (II) сульфатом у концентраціях 0,25–0,5 мМ, внаслідок пошкодження структури ензиму або зниження його синтезу не здатні відновлювати гідропероксильні групи окиснених фосfolіпідів, що, ймовірно, негативно впливає на функціональний стан мембрани і відображається у значному зниженні накопичення біомаси за впливу цих концентрацій купрум (II) сульфату.

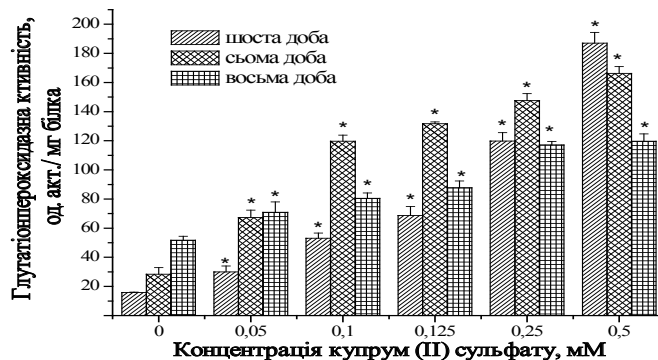


Рис. 2. Глутатіонпероксидазна активність безклітинних екстрактів *C. limicola* ІМВ К-8 за впливу купрум (II) сульфату

(\* –  $p = 0,05$ ,  $n=3$  – вірогідні зміни, порівняно з контролем)

Fig. 2. Glutathione peroxidase activity of cell-free extracts of *C. limicola* of IMV K-8 under the influence of copper (II) sulfate

(\* –  $p = 0.05$ ,  $n = 3$  – probable changes compared with control)

Під час дослідження глутатіонпероксидазної активності безклітинних екстрактів *C. limicola* ІМВ К-8, інкубованих без внесення купрум (II) сульфату, виявлено зростання активності ензиму зі збільшенням тривалості куль-



тивування (рис. 2). За внесення усіх досліджуваних концентрацій купрум (II) сульфату в середовище інкубації спостерігали зростання глутатіонпероксидазної активності. За впливу купрум (II) сульфату у концентраціях 0,05; 0,1 та 0,125 мМ на сьому добу культивування бактерій активність ензиму зростала відповідно у 2,4; 4,2 та 4,7 рази, порівняно з контролем. За впливу купрум (II) сульфату найвищу активність ензиму ( $187 \pm 7$  од. акт./мг білка) спостерігали на шосту добу вирощування за впливу 0,5 мМ купрум (II) сульфату, що в 12 разів вище за контрольний показник. Глутатіонпероксидазна активність безклітинних екстрактів *C. limicola* IMB K-8, інкубованих у буфері, який містив купрум (II) сульфат у концентраціях 0,1–0,25 мМ, була найвищою на сьому добу вирощування, а за впливу 0,5 мМ купрум (II) сульфату була найвищою на шосту добу вирощування. За подальшого збільшення тривалості культивування глутатіонпероксидазна активність за впливу 0,5 мМ купрум (II) сульфату знижувалася, що може бути зумовлено зниженням вмісту відновленого глутатіону.

Біорегенерація окисненого глутатіону, який утворюється в глутатіонпероксидазній реакції, здійснюється з участю глутатіонредуктази [2], активності якої ми не виявили у *C. limicola* IMB K-8. У базі даних GenBank не виявлено гени, які кодують цей ензим у *C. limicola*, однак є задепонована послідовність гіпотетичного ензиму, який характеризується глутатіонредуктазною активністю у бактерій *Chlorobium ferrooxidans* DSM 13031 (EAT59077.1) [9]. У *E. coli* для оновлення вмісту відновленого глутатіону більш важливими процесами є синтез глутатіону *de novo*, ніж його відновлення глутатіонредуктазою [11]. Ймовірно, бактерії *C. limicola* IMB K-8 також синтезують відновлений глутатіон *de novo*, а не відновлюють окиснену форму у глутатіонредуктазній реакції. Однак, це буде предметом наших наступних досліджень.

Отже, зростання глутатіонпероксидазної активності у 2–12 разів та глутатіон-S-трансферазної активності у 1,5–2 рази, порівняно з контролем, у безклітинних екстрактах *C. limicola* IMB K-8 за впливу купрум (II) сульфату свідчить про накопичення у клітинах гідрофобних і гідрофільних органічних пероксидів, а також про те що, ймовірно, ця система є одним із важливих способів захисту клітин зелених фотосинтезуючих бактерій, зокрема *C. limicola*, від активних метаболітів кисню.

**T. Segin, S. Hnatush, O. Maslovska, O. Vasylyv**

Department of Microbiology, Biological Faculty of Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevsky Str., Lviv, 79005, Ukraine,  
tel.: +38 (067) 732 51 33, e-mail: segint@ukr.net

## ENZYMES ACTIVITY OF GLUTATHIONE ANTIOXIDANT SYSTEM OF *CHLOROBIVM LIMICOLA* IMV K-8 BACTERIA UNDER THE INFLUENCE OF COPPER (II) SULFATE

### Summary

**Aim.** Investigation of changes of glutathione antioxidant system enzymes activity of *Chlorobium limicola* IMV K-8 bacteria under the influence of copper (II) sulfate.



**Methods.** In this investigation there were used *C. limicola* IMV K-8 bacteria which were cultivated in Green sulfur bacteria medium. Glutathione peroxidase activity was determined by the rate of oxidation of reduced glutathione before and after incubation with tert-butyl hydroperoxide by color reaction with 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid. Glutathione S-transferase activity was determined by the rate of formation of conjugate of reduced glutathione with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene.

**Results.** Glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity of cell free extracts of *C. limicola* IMV K-8 were investigated under the influence of copper (II) sulfate in concentrations that caused decrease of biomass accumulation from 10 to 70%. It was shown that under the influence of all investigated copper (II) sulfate concentrations glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase activity increased in comparison with control. Activity of these enzymes changed in dependence on copper (II) sulfate concentration in incubation medium and duration of cultivation. Also it was determined that glutathione reductase activity is absent in investigated bacteria. **Conclusion.** The increase of activity of glutathione peroxidase by 2–12 times and glutathione-S-transferase by 1.5–2 times, in comparison with control, in cell free extracts of *C. limicola* IMV K-8 under the influence of copper (II) sulfate indicates on accumulation of hydrophobic and hydrophilic organic peroxides inside the cells. It also shows that, possibly, this system is one of the important ways of cell defense of green photosynthetic bacteria, in particular *C. limicola*, against reactive oxygen species.

*Key words:* green bacteria, *Chlorobium limicola*, glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, copper (II) sulfate.

**Т. Сегін, С. Гнатуш, О. Масловская, О. Васылив**

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина,  
тел.: +38 (067) 732 51 33, e-mail: segint@ukr.net

## **АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ГЛУТАТИОНОВОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ БАКТЕРИЙ *CHLOROBIVM LIMICOLA* ИМВ К-8 ПРИ ВЛИЯНИИ КУПРУМ (II) СУЛЬФАТА**

### **Реферат**

**Цель.** Исследовать изменения активностей ферментов глутатионовой антиоксидантной системы бактерий *Chlorobium limicola* ИМВ К-8 под влиянием купрум (II) сульфата. **Методы.** В работе использовали бактерии *C. limicola* ИМВ К-8, которые выращивали в среде *Green sulfur bacteria*. Глутатионпероксидазную активность определяли по скорости окисления восстановленного глутатиона до и после инкубации с гидропероксидом третичного бутила с помощью цветной реакции с 5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислотой. Глутатион-S-трансферазную активность определяли по скорости образования конъюгата восстановленного глутатиона в реакции с 1-хлор-2,4-динитробензолом. **Результаты.** Исследовали глутатион-S-трансферазную, глутатионредуктазную и глутатионпероксидазную активности бесклеточных экстрактов *C. limicola* ИМВ К-8 под влиянием купрум (II) сульфата.



та при концентрациях, которые повлекли снижение накопления биомассы на 10–70%. Под воздействием купрум (II) сульфата при всех исследуемых концентрациях увеличивались глутатион-S-трансферазная и глутатионпероксидазная активности по сравнению с контролем. Активность этих ферментов изменялась в зависимости от концентрации купрум (II) сульфата в инкубационной среде и продолжительности культивирования бактерий. Также установлено, что в исследуемых бактериях отсутствует глутатионредуктазная активность. **Вывод.** Увеличение глутатионпероксидазной активности в 2–12 раз и глутатион-S-трансферазной активности в 1,5–2 раза, по сравнению с контролем, в бесклеточных экстрактах *C. limicola* ИМВ К-8 под влиянием купрум (II) сульфата свидетельствует о накоплении в клетках гидрофобных и гидрофильных органических пероксидов, а также о том, что, вероятно, эта система является одним из важных способов защиты клеток зелёных фотосинтезирующих бактерий, в частности *C. limicola*, от активных метаболитов кислорода.

Ключевые слова: зелёные бактерии, *Chlorobium limicola*, глутатион-S-трансфераза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, купрум (II) сульфат.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гнатуш С., Горишний М., Сегин Т. Фотосинтезирующие зелёные серобактерии, выделенные из озера Яворовское (Украина, Львовская область) // Интер-медикал. – 2014. – № 3. – С. 63–68.
2. Головчак Н. П., Тарновська А. В., Коцюмбас Г. І., Санагурський Д. І. Процеси перекисного окиснення ліпідів у живих організмах. – Львів: ЛНУ ім. Івана Франка, 2012. – 250 с.
3. Мартинчик А., Бондарев И. Активность глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы в печени крыс в зависимости от содержания восстановленного глутатиона // Вопр. мед. химии. – 1986. – 32, № 2. – С. 39–43.
4. Меньшикова Е., Ланкин З., Зенков Н., Боднарь И., Кругловых Н., Труфакин В. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – Москва: Слово, 2006. – 553 с.
5. Лакин Г. Биометрия. – Москва: Высшая школа, 1990. – 352 с.
6. Сегин Т., Гнатуш С., Горишний М. Процеси ліпопероксидації у клітинах *Chlorobium limicola* ИМВ К-8 за впливу купрум (II) сульфату // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Сер. Біол. Екол. – 2016. – 24, № 1. – С. 72–77.
7. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement, with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193. – P. 265–275.
8. Fareleira P., Santos B. Response of a strict anaerobe to oxygen: survival strategies in *Desulfovibrio gigas* // Microbiology. – 2003. – 149. – P. 1513–1522.
9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
10. Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N., Mathew B., Beeregowda K. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals // Interdiscip. Toxicol. – 2014. – 7, № 2. – P. 60–72.
11. Rui-Yan F., Jian C., Yin L. The function of the glutathione/glutathione peroxidase system in the oxidative stress resistance systems of microbial cells // Chinese J. Biotechnol. – 2007. – 23, № 5. – P. 770–775.



### References

1. Hnatush S, Goryshnyi M, Segin T. Photosynthetic green sulfur bacteria, isolated from Yavoriv lake (Lviv region, Ukraine). *Inter-medykal. J.* 2014; 3:63-68 (in Russian).
2. Holovchak N., Tarnovs'ka A., Kotsyumbas H., Sanahurs'kyi D. Processes of lipid peroxidation in living organisms. Lviv: LNU im. Ivana Franka. 2012. 250 p. (in Ukrainian).
3. Martinchik A, Bondarev G. The activity of glutathione reductase and glutathione-S-transferase in rat liver in dependence of content of reduced glutathione. *Vopr. med. himii.* 1986; 32(2):39-43 (in Russian).
4. Menshikova E., Lankin V., Zenkov N., Bodnar I., Kruglovyih N., Trufakin V. Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants. Moskva: Slovo. 2006. 553 p. (in Russian).
5. Lakin G. Biometrics. Moskva: Vyssh. Shkola. 1990. 352 p. (in Russian).
6. Segin T, Hnatush S, Gorishnyi M. The processes of lipid peroxidation in the cells of *Chlorobium limicola* IMV K-8 under the influence of copper (II) sulfate. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol.* 2016; 24(1):72-77 (in Ukrainian).
7. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement, with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193:265-275.
8. Fareleira P, Santos B. Response of a strict anaerobe to oxygen: survival strategies in *Desulfovibrio gigas*. *Microbiology.* 2003; 149:1513-1522.
9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
10. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew B, Beeregowda K. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* 2014; 7(2):60-72.
11. Rui-Yan F, Jian C, Yin L. The function of the glutathione/glutathione peroxidase system in the oxidative stress resistance systems of microbial cells. *Chinese J. Biotechnol.* 2007; 23(5):770-775.

Стаття надійшла до редакції 04.12.2017 р.

