

УДК 579. 266 / 68 (474)

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

Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів,
79005, Україна, тел.: +38 (067) 492 76 81,
e-mail: m_gorishniy @ukr.net

ВПЛИВ МІНЕРАЛЬНОГО ТА ОРГАНІЧНОГО ЖИВЛЕННЯ НА КІЛЬКІСНІ ЗМІНИ ФОТОРЕАКЦІЙНИХ МОЛЕКУЛ У КЛІТИНАХ *CHLOROBIVUM LIMICOLA* ІМВ К-8

*Досліджено деякі метаболічні особливості кількісних змін фотореакційних молекул у клітинах зелених сіркових бактерій *Chlorobium limicola* ІМВ К-8. За максимумами абсорбційних поглинань встановлені відмінності у кількісному складі бактеріохлорофілів *c* і *d* та каротиноїдів ізоренієратину та хлоробактину, залежно від різних типів мінерального та органічного живлення. Концентрації бактеріохлорофілів *c* та *d*, та каротиноїдів хлоробактину та ізоренієратину зростали за умов одночасного інгібування процесів азотфіксації та глюконеогенезу і наявності низькомолекулярних джерел карбону.*

*Ключові слова: зелені сіркові бактерії, бактеріохлорофіли *c* і *d*, ізоренієратин та хлоробактин.*

Невелика група бактерій в природі здатна здійснювати аноксигенний фотосинтез — це зелені і пурпурові бактерії та геліобактерії. Перетворення квантової енергії в клітинах цих бактерій здійснюють бактеріохлорофіли та каротиноїди [2]. У зелених сіркобактерій цей процес відбувається у спеціалізованих везикулах — хлоросомах. Саме в цих структурах знаходяться бактеріохлорофіли *c*, *d* та *e*, а також ліпіди і каротиноїди. Бактеріохлорофіли виконують функцію світловловлюючих антен. Останні зв'язані з реакційним центром, локалізованим в плазмолемі, через бактеріохлорофіл *a*, який знаходиться в базальній пластинці і виконує функцію проміжної ланки при перенесенні енергії світла від хлоросом на реакційний центр [4, 5]. Зміни складу фоторецепторних молекул за різних умов живлення зелених сіркобактерій є не досліджені.

Метою роботи було дослідження зміни складу фоторецепторних молекул у клітинах *C. limicola* ІМВ К-8 за різних умов культивування.

© М.Б. Горішний, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш, 2012



Матеріали і методи

Об'єктом досліджень був штам зелених сіркових бактерій *Chlorobium limicola* IMB К-8 [2, 4]. Для вирощування бактерій використовували середовище GSB (green sulfur bacteria), такого складу (г/л): KH_2PO_4 – 0,30, NH_4Cl – 0,34, KCl – 0,34, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,15, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5. Після автоклавування додавали окремо: 10% NaHCO_3 – 15 мл, 1 М $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ – 2,5 мл, розчин вітаміну B_{12} (2 мкг/мл) – 1 мл, мікроелементи – 1 мл [1, 2, 4].

Суміш мікроелементів містила на літр дистильованої води: 25% HCl – 10 мл; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,0 г; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 190 мг; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 100 мг; ZnCl_2 – 70 мг; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 36 мг; $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 24 мг; H_3BO_3 – 6 мг; і $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 2 мг. FeSO_4 розчинений у HCl , інші компоненти у дистильованій воді, рН середовища 6,7–6,8 [2, 4].

Додаткові органічні джерела карбону вносили у мінеральне середовище GSB завжди у концентрації 0,1% [3].

Анаеробні умови для культивування бактерій створювали шляхом заповнення посудини культивування середовищем доверху. При культивуванні на агаризованому середовищі у чашках Петрі використовували анаеростати (Gen box Jar 7.0 L, France) з поглиначем кисню.

Пігментний склад клітин аналізували після їх відділення від культуральної рідини, центрифугуванням при 12 000 г протягом години. Надосадову рідину зливали, клітини двічі відмивали мінеральним середовищем GSB, висушували на склі і розтирали з кварцовим піском. Окремі пігменти екстрагували сумішшю етанолу та ацетону у співвідношенні 1:1, процедуру екстракції повторювали чотири рази. Екстракти об'єднували і використовували для хроматографічного розділення пігментів та вивчення їх спектральних характеристик [2].

Хроматографічне розділення пігментів здійснювали на силуфольних пластинках Silufol у системі розчинника ацетон:бензин:петролейний ефір:гексан (10:10:3:10) [2, 6]. Концентрацію пігментів розраховували за формулою:

$$C = D/a \times l$$

де C – концентрація пігменту, г/л, D – оптична густина розчину, a – питомий коефіцієнт екстинкції [$E_{\text{кар}} = 271,8$ при 474 нм, $E_{\text{б/хл}} = 930$ при 770 нм $\times \text{л} \times (\text{г} \times \text{см}^{-1})$] l – товщина поглинаючого шару ($l = 0,3$ см), C – концентрація пігменту (г/л) [2, 5, 6].

Розрахунок концентрації пігментних молекул на суху вагу клітин досліджуваного штаму здійснювали за формулою:

$$A = C \times V \times K/H$$

де A – кількість пігменту на один грам сухої ваги клітин (мг/г с. в.), C – концентрація пігменту (г/л), V – об'єм екстракту, мл, K – відношення об'єму елюату до об'єму розчину, нанесеного на хроматограму [2, 5].



Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [4] та паралельно за допомогою нінгідринного реактиву [2].

Отримані результати статистично опрацьовували з використанням програми Origin 7.0. Вибір тактики статистичного опрацювання і підготовку даних для аналізу здійснювали, базуючись на загальноприйнятих методах [5] за рівня достовірності $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Склад і природа бактеріохлорофілів і каротиноїдів у різних представників фототрофних прокариот суттєво відрізняються [4, 5]. Ідентифікація пігментів *C. limicola* IMB К-8 була проведена нами раніше [1]. Натомість першим кроком цієї роботи було вивчення впливу низькомолекулярних органічних субстратів на якісні та кількісні зміни фотореакційних молекул. Як додаткові джерела карбону, використовували проміжні метаболіти циклу Арнона та деякі продукти цього циклу. З цією метою культуру вирощували протягом 12 діб у мінеральному середовищі GSB (контроль) з додатковим внесенням органічних джерел карбону. Після екстракції пігментів проводили їх хроматографічне розділення з подальшим кількісним визначенням концентрації пігментів (рис. 1). Встановлено, що за умов внесення органічних джерел карбону у середовище культивування якісних змін фотореакційних молекул не виявлено, доказом цього були результати тонкошарової хроматографії (рис. 1).

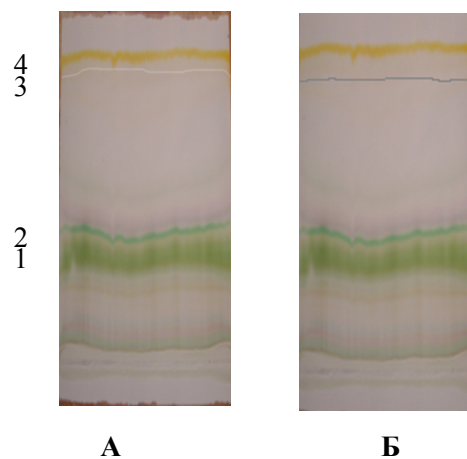


Рис. 1. Хроматограма пігментів, екстрагованих із *C. limicola* IMB – К-8.

1 – бактеріохлорофіл *c*, 2 – бактеріохлорофіл *d*, 3 – хлоробактин,
4 – ізоренієратин. А – CO₂, H₂S (контроль),
Б – CO₂, H₂S, органічні джерела карбону (експеримент)

Fig. 1. Chromatogram of pigments extracted from *C. limicola* IMB – К-8.

1 – bacteriochlorophyll *c*, 2 – bacteriochlorophyll *d*, 3 – chlorobactyn,
4 – izorenieratyn. А – CO₂, H₂S (control),
В – CO₂, H₂S, organic source of carbon (experiment).

Встановлено, що органічні низькомолекулярні інтермедіати (ацетат, піруват, фумарат, гліцин, сукцинат, глутамат) проявляли стимулюючий ефект на кількісні зміни фоторецепторних молекул. Зокрема найвища концентрація бактеріохлорофілів *c* та *d* встановлені за умов внесення глутамату — концентрація бактеріохлорофілу *c* зросла на 58%, а бактеріохлорофілу *d* на 50% (рис. 2).

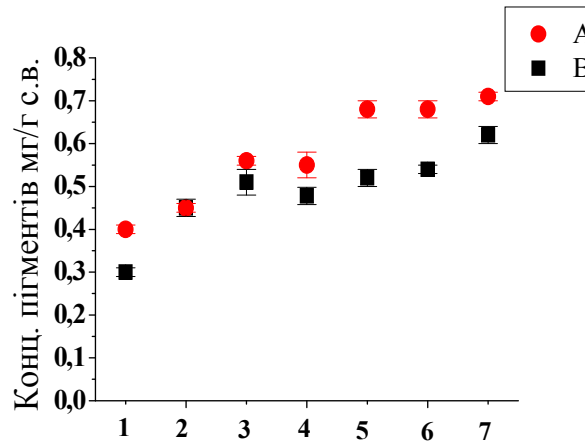


Рис. 2. Вплив різних джерел карбону на біосинтез бактеріохлорофілів *c* (A) і *d* (B)

1 — контроль (мінеральне середовище GSB), 2 — ацетат, 3 — піруват, 4 — фумарат, 5 — гліцин, 6 — сукцинат, 7 — L-глутамат.

Fig. 2. Effect of different carbon sources on biosynthesis bacteriochlorophylls *c* (A) and *d* (B)

1 — control (mineral GSB), 2 — acetate, 3 — pyruvate, 4 — fumarate, 5 — glycine, 6 — succinate, 7 — L-glutamate.

Найвища стимуляція синтезу каротину була за умов внесення ацетату в межах 71% порівняно з контролем (мінеральне середовище GSB) для хлоробактину та на 50% для ізоренієратину (рис. 3).

Згідно літературних даних [2, 5, 7] зелені сіркові бактерії *C. tepidum*, за умов активної азотфіксації нагромаджують катіони амонію які при взаємодії з L-глутаматом призводять до утворення L-глутаміну. Натомість за умов сповільнення процесів азотфіксації L-глутамат в основному використовується на біосинтез фотореакційних молекул. Для перевірки цього припущення, що до штаму *C. limicola* IMB K-8 нами було проведено інкубацію відмитих досліджуваних клітин за умов внесення інгібітора азотфіксації у зелених сіркобактерій — нітрат аніону.

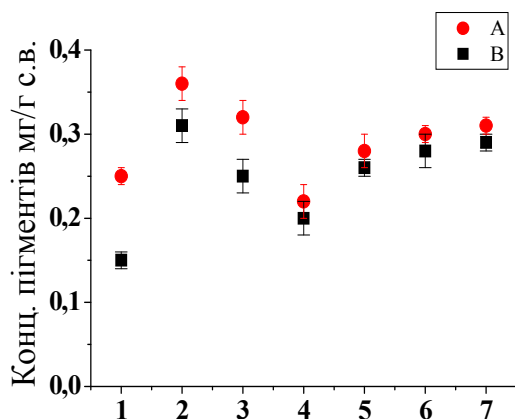


Рис. 3. Вплив різних джерел карбону на біосинтез каротиноїдів хлоробактину (А) і ізоренієратину (В)

1 – контроль (мінеральне середовище GSB), 2 – ацетат, 3 – піруват, 4 – фумарат, 5 – гліцин, 6 – сукцинат, 7 – L-глутамат.

Fig. 3. Effect of different carbon sources on biosynthesis of carotenoids chlorobactyn (A) and izorenieratyn (B)

1 – control (mineral GSB), 2 – acetate, 3 – pyruvate, 4 – fumarate, 5 – glycine, 6 – succinate, 7 – L-glutamate.

Після 48 годин інкубації встановлювали кількісні зміни білкових та фоторецепторних молекул в клітинах досліджуваного штаму (рис. 4).

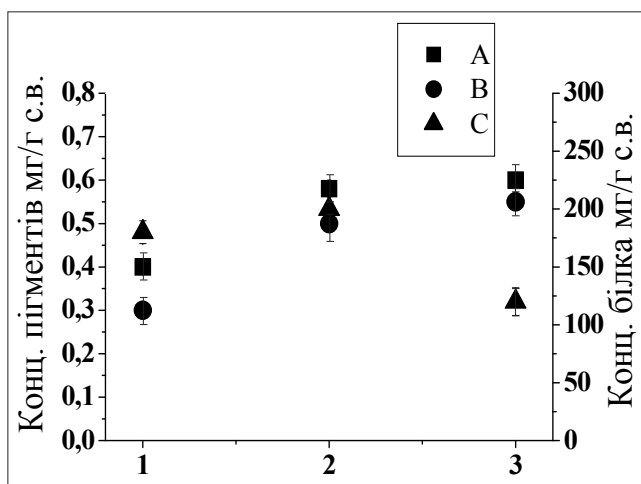


Рис. 4. Вплив факторів середовища на біосинтез бактеріохлорофілів c (А) і d (В) та вміст білка (С)

1 – контроль (мінеральне середовище GSB), 2 – L-глутамат, 3 – L-глутамат, NO₃⁻

Fig. 4. The influence of environmental factors on the biosynthesis of bacteriochlorophylls c (A) and d (B) and protein (C)

1 – control (mineral GSB), 2 – L-glutamate, 3 – L-glutamate, NO₃⁻

Встановлено стимулюючий ефект L-глутамату за умов інгібування азотфіксації на біосинтез бактеріохлорофілів *c* і *d*. Зокрема їх кількість порівняно з контролем зросла на 50 і 75%, відповідно. При цьому вміст концентрації білка в клітинах знизився майже у чотири рази, а хлоробактину та ізренієратину зріс до 10% (рис. 5).

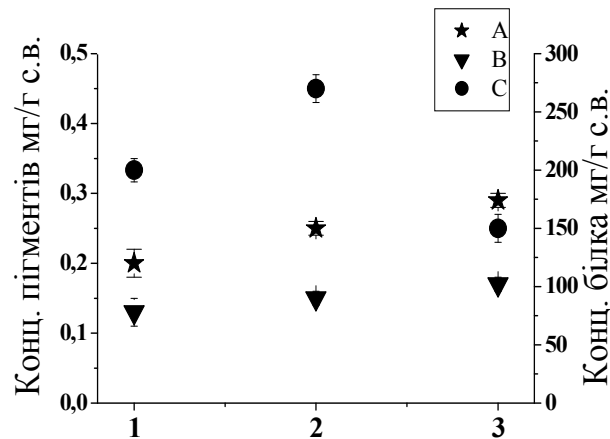


Рис. 5. Вплив різних джерел карбону на біосинтез каротиноїдів хлоробактину (А) та ізренієратину (В) та вміст білка (С)
1 — контроль (мінеральне середовище GSB), 2 — ацетат,
3 — ацетат, NO₃⁻

Fig. 5. Effect of different carbon sources on biosynthesis of carotenoids chlorobactyn (A) and izorenieratyn (B) and biomass cells (C)
1 — control (mineral GSB), 2 — acetate, 3 — acetate, NO₃⁻

В ході проведених досліджень встановлено закономірність у співвідношенні нагромадження відмитими клітинами *C. limicola* ІМВ К-8 фотореакційних молекул за присутності в інкубаційній суміші інгібіторів протеїно- та глюконеогенезу. Цей експеримент було проведено при вирощуванні клітин у мінеральному середові GSB з одночасним внесення низькомолекулярних інтермедіатів (ацетату, L-глутамату, пірувату, фумарату та цитрату). Після 12-добового культивування клітини відмивали і вносили у інгібітори протеїногенезу (нітрат-іон), глюконеогенезу (монойодацетат) та обидва інгібітори разом (рис. 6). Слід зазначити, що інгібітори протеїно- та глюконеогенезу вносили з метою переключення інтермедіатів циклу Арнона на процеси анаболізму фотореакційних молекул.

Показано, що при біосинтезі бактеріохлорофілів та каротиногенезі окреме інгібування протеїногенезу та глюконеогенезу призводить до зростання концентрації фотореакційних молекул у середовищі культивування порівняно з контролем, проте найвища їх концентрація спостерігалася за умов одночасного внесення інгібіторів протеїногенезу (NO₃⁻) та глюконеогенезу (монойодацетату) і наявності одного із кінцевих продуктів циклу Арнона — L-глутамату (рис. 6).



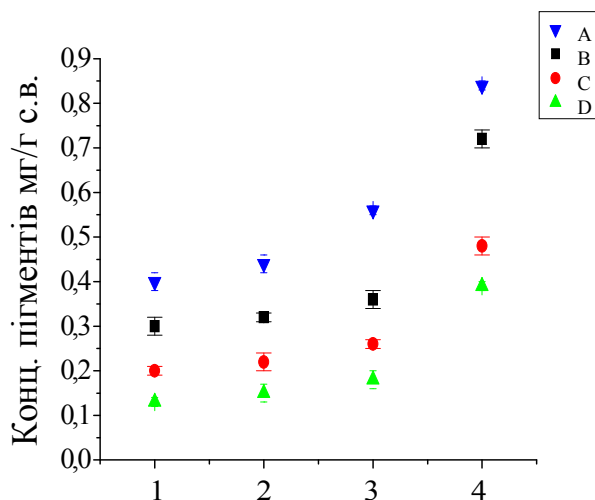


Рис. 6. Вплив факторів середовища біосинтез бактеріохлорофілів *c* (A) і *d* (B) та каротиноїдів хлоробактину (C) і ізоренієратину (D)

1 — контроль (мінеральне середовище GSB), 2 — L-глутамат, моноіодацетат,
3 — L-глутамат, NO₃⁻,
4 — L-глутамат, моноіодацетат, NO₃⁻.

Fig. 6. The influence of environmental factors on biosynthesis bacteriochlorophylls *c* (A), *d* (B) and carotenoids chlorobactyn (C) and izorenieratyn (D)

1 — control (mineral GSB), 2 — L-glutamate, monoyodacetate,
3 — L-glutamate, NO₃⁻, 4 — L-glutamate monoyodacetate, NO₃⁻.

Таким чином встановлено, що наявність інтермедіатів та кінцевих продуктів циклу Арнона стимулює нагромадження пігментних молекул у клітинах зелених сіркових бактерій. Особливе зростання концентрації бактеріохлорофілів *c* та *d*, а також каротиноїдів хлоробактину і ізоренієратину спостерігали за умов одночасного інгібування процесів азотфіксації та глюконеогенезу і наявності низькомолекулярних джерел карбону.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Горішний М., Гудзь С., Гнатуш С. Фотосинтезувальні пігменти *Chlorobium limicola* Ya-2002 // Вісн. Львів.ун-ту, Сер. біол. — 2009. — Вип. 50. — С. 95–100.

2. Горішний М.Б. Екологічне значення зелених сіркових бактерій в утилізації сірководню: автореф. дис. на здобуття ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.16. (екологія). / Горішний Мирослав Богданович. — Київ, 2008. — С. 18.

3. Горішний М., Гудзь С., Гнатуш С. Метаболізм глюкози та глікогену у клітинах зелених фотосинтезувальних сіркобактерій *Chlorobium limicola* // Вісн. Львів.ун-ту, Сер. біол. — 2008. — Вип. 46. — С. 129–136.

4. Гудзь С.П., Горішний М.Б., Гнатуш С.О. Бактеріальний фотосинтез. — Львів Видавничий центр ЛНУ ім. Івана Франка.: Коло, 2011 — 180 с.

5. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
6. Мусієнко М.М. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин. — К.: Фітосоціоцентр, — 2001. — 200 с.
7. Bergstein T., Henis Y., Cavari B.Z. Nitrogen fixation by the photosynthetic sulfur bacterium *Chlorobium phaeobacteroides* from the lake Kinneret // Applied and environmental microbiology. — 1981. — Vol. 41. — P. 8288–8294.

Стаття надійшла до редакції 28.08.2012 р.

M.B. Gorishniy, S.P. Gudz, S.O. Hnathush

Lviv National Ivan Franko University, 4, Hrushevskogo str., Lviv, 79005, Ukraine,
tel.: +38 (067) 492 76 81, e-mail: m_gorishniy@ukr.net

**EFFECT OF MINERAL AND ORGANIC NUTRITION ON
QUALITATIVE CHANGES PHOTOSINTETIC MOLECULES
IN THE CELLS OF *CHLOROBIVM LIMICOLA* IMB K-8**

Summary

Investigate some features of qualitative changes pigments molecules in the cells of green sulfur bacteria *Chlorobium limicola* IMB K-8. For absorption maxima acquisitions established differences in quantitative structure bacteriochlorophils *c* and *d* and carotenoids izorenieratyn and chlorobactyn depending on the different types of mineral and organic nutrition. Investigate some changes to the quantity of pigment molecules under conditions of low organic intermediates and various types of mineral nutrition.

Key words: green sulfur bacteria, bacteriochlorophils *c* and *d*, izorenieratyn and chlorobactyn.



М.В. Горишний, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш

Львовский национальный университет имени Ивана Франко, ул. Грушевского, 4, Львов,
79005, Украина, тел.: +38 (067) 492 76 81,
e-mail: m_gorishniy@ukr.net

ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО И ОРГАНИЧЕСКОГО ПИТАНИЯ НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОТОРЕАКЦИОННЫХ МОЛЕКУЛ В КЛЕТКАХ *CHLOROBIVM LIMICOLA* IMB K-8

Реферат

Исследованы некоторые метаболические особенности количественных изменений фотореакционных молекул в клетках зеленых серных бактерий *Chlorobium limicola* IMB K-8. По максимумам абсорбционных поглощений установлены различия в количественном составе бактериохлорофилов *c* и *d* и каротиноидов изорениератина и хлоробактина в зависимости от разных типов минерального и органического питания. Установлены некоторые изменения количественного состава пигментных молекул в условиях присутствия органических низкомолекулярных интермедиатов и разного типа минерального питания.

Ключевые слова: зеленые серные бактерии, бактериохлорофилы *c* и *d*, изорениератин и хлоробактин.

