

М.Б. Горішний, С.П. Гудзь

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

ОСОБЛИВОСТІ КОНСТРУКТИВНОГО АНАБОЛІЗМУ ВУГЛЕВОДІВ У КЛІТИНАХ ЗЕЛЕНИХ СІРКОВИХ БАКТЕРІЙ *CHLOROBIVM LIMICOLA* ІМВ К-8

Зелені сіркові бактерії Chlorobium limicola ІМВ К-8 в процесі аноксигенного фотосинтезу нагромаджують в клітинах глікоген. Зростання рівня глікогену в клітинах спостерігали за умов внесення до середовища культивування органічних донорів карбону при одночасному мінеральному голодуванні. За цих умов 20% зменшення концентрації діоксиду карбону та внесення нітрат іону в інкубаційну суміш супроводжувалось зниженням рівня біомаси та зростанням інтенсивності конструктивного анаболізму вуглеводів в клітинах *C. limicola* ІМВ К-8. Подальше зниження концентрації діоксиду карбону та мінеральних компонентів середовища GSB веде до пригнічення інтенсивності фотосинтезу у клітинах зелених сіркові бактерії.

Ключові слова: зелені сіркові бактерії, глюкоза, глікоген.

Зелені фотосинтезувальні сіркові бактерії (родина *Chlorobiaceae*) — облігатні фотолітоавтотрофи [1]. Подібно до представників родини *Chloroflexaceae* та *Chromatiaceae*, вони не можуть використовувати воду як донор електронів і не утворюють молекулярний кисень у процесі фотосинтезу [2, 3]. Натомість донорами електронів, які потрібні для асиміляційної редукції CO₂, є відновлені сполуки сірки, здебільшого гідроген сульфід. При культивуванні зелених сіркових бактерій *C. limicola* ІМВ К-8 у мінеральному середовищі GSB [5] за наявності донора електронів і CO₂ на світлі в клітинах може нагромаджуватись глюкоза і продукт її полімеризації — глікоген [3]. Умови синтезу та роль цих інтермедіатів у метаболізмі зелених сіркових бактерій за різних умов культивування остаточно не з'ясовані.

У цій роботі наведені результати досліджень деяких особливостей конструктивного анаболізму вуглеводів у клітинах зелених сіркових бактерій *C. limicola* ІМВ К-8.

Матеріали і методи

Дослідження були проведені з використанням культури зелених фотосинтезувальних сіркових бактерій *Chlorobium limicola* ІМВ К-8 [3].



Бактерії культивували у рідкому середовищі GSB [1, 3] протягом 8–10 діб при температурі 24–25 °С. Біомасу бактерій визначали фотоелектроколориметрично [7]. Як контроль в експериментах використовували культури, що розвивались у повноцінному поживному мінеральному середовищі GSB без внесення додаткових сполук.

Клітини бактерій руйнували за допомогою ультразвукового дезінтегратора УЗДН–2Т частотою 22 кГц протягом 5 хв у скляних товстостінних пробірках, занурених у лід. Уламки клітин відділяли центрифугуванням при 15 тис. об/хв протягом 45 хв при 4 °С. Отримані безклітинні екстракти відразу використовували для визначення вмісту глюкози. Вміст глюкози у безклітинних екстрактах визначали ферментативно, за допомогою аналітичного набору «Діаглюк-2» [6]. Концентрацію глікогену розраховували по глюкозі після проведення кислотного гідролізу. Гідроліз глікогену проводили кип'ятінням в присутності 1Н H₂SO₄ протягом трьох годин [4]. Визначення вмісту амінного азоту поводили використовуючи нінгідриновий реактив [6].

Результати є статистично достовірні, розбіжності подані ідентично величині кожної окремої точки, згідно величини символу. Кількість повторів була десятикратною у кожній паралелі.

Результати та їх обговорення

На відміну від пурпурових сіркових бактерій, описані в літературі штами зелених сіркових бактерій ростуть виключно фотолітоавтотрофно [3, 6]. Діоксид карбону у них редукується у відновному циклі трикарбонових кислот [2], ключовими ферментами якого є 2-оксоглутарат:ферредоксин-оксидоредуктаза, фумаратредуктаза і АТФ-залежна цитрат ліаза [3]. Відновний цикл трикарбонових кислот забезпечує клітини попередниками для біосинтезу клітинних компонентів, зокрема вуглеводів [8]. Глюкоза в клітинах зелених сіркобактерій знаходиться як у вільному так і полімеризованому стані, що представлений глікогеном, вміст якого у клітинах *S. limicola* ІМВ К-8 може сягати від 5 до 12% сухої ваги клітин [1, 3]. Оскільки біотехнологічне виробництво глікогену є перспективним напрямком його промислового отримання, наступним кроком у нашій роботі було вивчення деяких особливостей конструктивного анаболізму цього полісахариду у клітинах штаму *S. limicola* ІМВ К-8 [1, 2].

Перш за все була перевірена можливість збільшення синтезу глікогену за умов одночасного нітрогенного та фосфорного голодування клітин (рис. 1).

Встановлено, що окреме нітрогенне та фосфорне голодування призводить до стимулювання глікогенолізу і спричиняє зростання кількості глікогену до 70–80 мг/г сухої ваги клітин [1, 3]. Натомість одночасне голодування по обох цих сполуках призводить до подвійного зростання кількості глікогену (рис. 1) в порівнянні із мінеральним середовищем GSB (контроль).



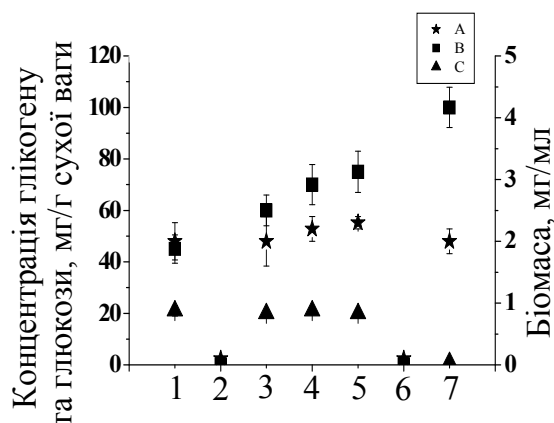


Рис. 1. Ріст (А), синтез глікогену (В) та глюкози (С) у клітинах *C. limicola* ІМВ К-8

1 – (повноцінне GSB), 2 – (GSB без фосфору), 3 – (GSB 50% фосфору), 4 – (GSB без азоту), 5 – (GSB 50% азоту), 6 – (GSB без азоту і фосфору), 7 – (GSB з 50% фосфору і 50% азоту)

Fig. 1. Growth (A), glycogen synthesis (B) and glucose (C) in cells of *C. limicola* IMB K-8

1 – (full GSB), 2 – (GSB without phosphorus), 3 – (GSB 50% phosphorus), 4 – (GSB without nitrogen), 5 – (GSB 50% nitrogen), 6 – (GSB without nitrogen and phosphorus), 7 – (GSB with 50% phosphorus and 50% nitrogen)

Раніше нами було встановлено [1, 2, 3], що з усієї різноманітності органічних низькомолекулярних інтермедіатів, лише внесення у середовище пірувату і ацетату супроводжувалось зростанням рівня глікогену в клітинах *C. limicola* ІМВ К-8 що, очевидно, пояснюється функціонуванням у досліджуваних бактерій циклу Арнона, в процесі роботи якого утворюється ацетат, який за участю специфічної ацетаткарбоксилази, карбоксилюється до пірувату з подальшим його перетворенням, у реакціях глікогенолізу.

Натомість за умов нітрогенного і фосфорного голодування внесення ацетату у середовище культивування стимулювало нагромадження глікогену до 150–160 мг/г сухої ваги. Слід зазначити, що за цих умов спостерігали зниження біомаси *C. limicola* ІМВ К-8. Характерно, що клітини з підвищеним рівнем синтезу глікогену, практично повністю використовували ендogenous молекулярну глюкозу (рис. 2).

Аналогічні дослідження були проведені, за умов нітрогенного та фосфорного голодування, із додатковим внесенням пірувату та ацетату. За цих умов спостерігали також зниження біомаси клітин *C. limicola* ІМВ К-8, проте рівень глікогену в порівнянні з контролем зростав майже у чотири рази (рис. 3).

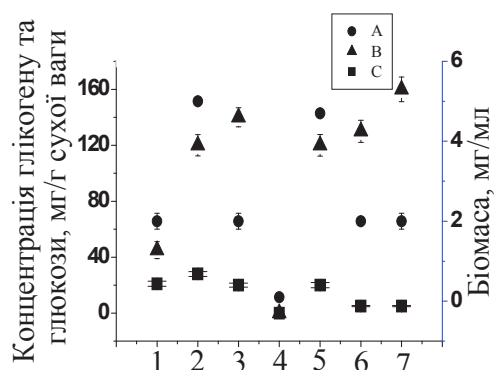


Рис. 2. Вплив ацетату на ріст (A) і синтез глікогену (B) та глюкози (C) за умов голодування по сполукам нітрогену та фосфору

1 – (повноцінне GSB), 2 – (GSB + ацетат), 3 – (GSB з 50% фосфору + ацетат), 4 – (GSB без фосфору + ацетат), 5 – (GSB з 50% азоту + ацетат), 6 – (GSB без азоту + ацетат), 7 – (GSB з 50% фосфору і 50% азоту + ацетат).

Fig. 2. Effect of acetate on growth (A) and glycogen synthesis (B) and glucose (C) under nitrogen starvation in the compounds and phosphorus

1 – (full GSB), 2 – (GSB + acetate), 3 – (GSB with 50% phosphorus + acetate), 4 – (GSB without phosphorus + acetate), 5 – (GSB with 50% nitrogen + acetate), 6 – (GSB without nitrogen + acetate), 7 – (GSB with 50% phosphorus and 50% nitrogen + acetate).

Також слід зазначити, що за наявності органічних донорів карбону (пірувату, ацетату, ізоцитрату та α -кетоглутарату) в середовищі спостерігаються деякі відмінності у фотоасиміляції CO₂ клітинами.

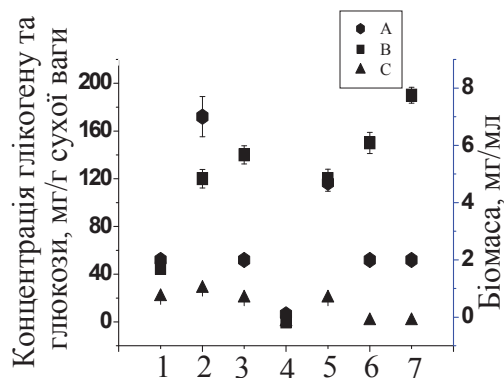


Рис. 3. Вплив ацетату та пірувату на ріст (A), синтез глікогену (B) і глюкози (C) за умов голодування по сполукам нітрогену та фосфору

1 – (повноцінне GSB), 2 – (GSB + ацетат + піруват), 3 – (GSB з 50% фосфору + ацетат + піруват), 4 – (GSB без фосфору + ацетат + піруват), 5 – (GSB з 50% азоту + ацетат + піруват), 6 – (GSB без азоту + ацетат + піруват), 7 – (GSB з 50% фосфору і 50% азоту + ацетат + піруват).

Fig. 3. Effect of acetate and pyruvate on growth (A), glycogen synthesis (B) and glucose (C) under nitrogen starvation in the compounds and phosphorus

1 – (full GSB), 2 – (GSB + acetate + pyruvate), 3 – (GSB with 50% phosphorus + acetate + pyruvate), 4 – (GSB without phosphorus + acetate + pyruvate), 5 – (GSB with 50% nitrogen + acetate + pyruvate), 6 – (GSB without nitrogen + acetate + pyruvate), 7 – (GSB with 50% phosphorus and 50% nitrogen + acetate + pyruvate).



Так при концентрації CO_2 у середовищі на рівні 60мМ спостерігали максимальний ріст клітин і підвищений у три рази рівень глікогену у них (рис. 4). Натомість нами встановлено, що за умов нітрогенного і фосфорного голодування та внесення органічних донорів карбону, зменшення рівня CO_2 в середовищі на 20% супроводжувалось зниженням рівня біомаси, при одночасному зростанні рівня глікогену в клітинах приблизно до 200–220 мг/г сухої ваги (рис. 4). Подальше зменшення вмісту CO_2 супроводжувалось зниженням інтенсивності фотосинтезу. Зростання рівня глікогену в клітинах при незначному дефіциті діоксиду карбону в середовищі, очевидно, можна пояснити пригніченням реакції карбоксилування фосфоенолпірувату в оксалоацетат і його використання у конструктивному анаболізмі вуглеводів [2, 3].

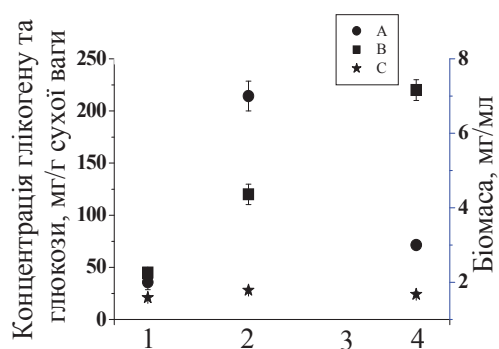


Рис. 4. Вплив органічних джерел карбону на ріст (A) і синтез глікогену (B) та глюкози (C) за умов зниження концентрації CO_2 в середовищі та голодуванні по сполуках нітрогену та фосфору

1 – (повноцінне GSB), 2 – (GSB з 50% фосфору і 50% азоту + ацетат + піруват + а – кетоглутарат + ізоцитрат + 100% CO_2), 3 – (GSB з 50% фосфору і 50% азоту + ацетат + піруват + а – кетоглутарат + ізоцитрат + 80% CO_2).

Fig. 4. Effect of organic carbon sources on growth (A) and glycogen synthesis (B) and glucose (C) under reducing CO_2 concentration in the atmosphere, and starvation on nitrogen and phosphorus compounds

1 – (full GSB), 2 – (GSB with 50% phosphorus and 50% nitrogen + acetate + pyruvate + a – ketoglutarate + isocitrate + 100% CO_2), 3 – (GSB with 50% phosphorus and 50% nitrogen + acetate + pyruvate + a – ketoglutarate + isocitrate + 80% CO_2).

Після встановлення вищевказаних закономірностей наступним кроком у роботі було з'ясування можливості зростання синтезу глікогену за умов внесення нітрат іону у середовище культивування відмитих клітин зелених сіркових бактерій. З цією метою було проведено забір клітин з експоненціальної фази росту та проведено їх інкубації у суміші, що містила NO_3^- , HS^- , CO_2 , за умов освітлення.

Згідно робіт [9, 10, 11] внесення нітрат іону в середовище культивування *C. limicola* IMB K-8 призводить до блокування протеїногенезу і як

наслідок переключення конструктивного анаболізму на глюко- і глікогеногеноліз. Слід зазначити, що за цих умов стимулюючий вплив на анаболізм вуглеводів виявляє зменшення концентрації мінеральних компонентів інкубаційної суміші, оскільки вони виступають інтермедіатами синтезу інших макромолекул у клітинах досліджуваних прокариот. З цією метою було також проведено зниження концентрації на 50% у інкубаційній суміші таких сполук (KCl , $CaCl_2$, $MgSO_4$). Забір клітин для вищевказаного експерименту проводився за умов максимального надсинтезу глікогену (рис. 4). Слід зазначити, що внесення клітин в інкубаційну суміш проводилось паралельно з контролем (мінеральне середовище GSB) (рис. 5). Після 48 годин інкубації за умов освітлення нами було встановлено, що вміст глікогену у клітинах *C. limicola* IMB K-8 становив 250 мг/г сухої ваги, що в п'ять разів перевищувало контрольні зразки.

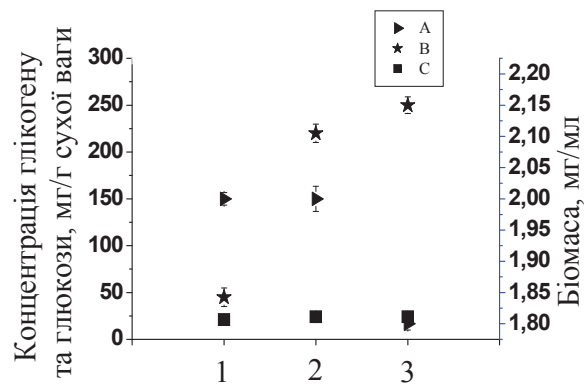


Рис. 5. Вплив різних компонентів інкубаційної суміші на біомасу (А), синтез глікогену (В) та глюкози (С) у клітинах *C. limicola* IMB K-8.

Час інкубації 48 годин: 1 – (повноцінне GSB), 2 – (GSB з 50% фосфору і 50% азоту + ацетат + піруват + α -кетоглутарат + ізоцитрат + 80% CO_2), 3 – (GSB з 50% фосфору і 50% азоту + ацетат + піруват + α -кетоглутарат + ізоцитрат + 80% CO_2 + NO_3^- + 50% мінеральне голодування).

Fig. 5. Effect of different incubation mixture components on biomass (A), glycogen synthesis (B) and glucose (C) in cells of *C. limicola* IMB K-8.

Incubation time 48 hours: 1 – (full GSB), 2 – (GSB with 50% phosphorus and 50% nitrogen + acetate + pyruvate + α -ketoglutarate + isocitrate + 80% CO_2), 3 – (GSB with 50% phosphorus and 50% nitrogen + acetate + pyruvate + α -ketoglutarate + isocitrate + 80% CO_2 + NO_3^- + 50% mineral starvation).

Згідно літературних даних [12, 13, 14] конструктивний анаболізм фотореакційних молекул в середовищі культивування аноксигенних фотосинтетиків, повністю інгібується за відсутності солей магнію. За цих умов, частково, основні енергетичні ресурси клітини спрямовуються на біосинтез ендогенних вуглеводів. Нами була перевірена можливість



інкубації відмитих клітин з максимальним вмістом глікогену за умов відсутності магній хлориду в інкубаційній суміші та за умов його 20% наявності, слід зазначити, що таку концентрації $MgSO_4$ ми встановили раніше експериментально [3] (рис. 6). Слід зазначити, що за цих умов різкого зростання концентрації глікогену не спостерігалось.

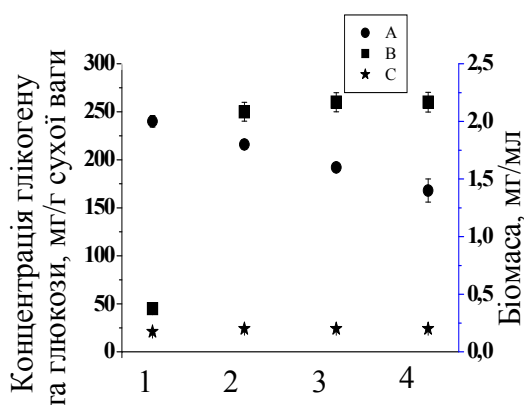


Рис. 6. Вплив факторів середовища GSB на біомасу (A) і синтез глікогену (B) та глюкози (C) за умов зниження концентрації $MgSO_4$.

Час інкубації 48 годин: 1 – (повноцінне GSB), 2 – (GSB 1 (з 50% фосфору і 50% азоту + ацетат + піруват + α -кетоглутарат + ізоцитрат + 80% CO_2 + NO_3^- + 50% мінеральне голодування)), 3 – (GSB 1 + 20% $MgSO_4$), 4 – (GSB 1 + 0% $MgSO_4$).

Fig. 6. Influence of environmental factors on GSB biomass (A) and glycogen synthesis (B) and glucose (C) under reducing concentrations $MgSO_4$.

Incubation time 48 hours: 1 – (full GSB), 2 – (GSB 1 (with 50% phosphorus and 50% nitrogen + acetate + pyruvate + α -ketoglutarate + isocitrate + 80% CO_2 + NO_3^- + 50% mineral starvation)), 3 – (GSB 1 + 20% $MgSO_4$), 4 – (GSB 1 + 0% $MgSO_4$).

Наступним кроком у нашій роботі було дослідження, закономірностей одночасного нагромадження глікогену та амінного нітрогену у клітинах зелених сіркових бактерій. З цією метою клітини одночасно вирощували за умов зростання синтезу ендогенних вуглеводів (без внесення NO_3^-) з подальшим визначенням концентрації ендогенних вуглеводів та аміної форми нітрогену (рис. 7). Слід зазначити, що зростання концентрації глікогену супроводжувалось нагромадженням амінного нітрогену в кількості 230 мг/г сухої ваги. Натомість у контрольних зразках (мінеральне середовище GSB) вміст ендогенних вуглеводів становив 50 мг/г сухої ваги, а концентрація амінного нітрогену 180–200 мг/г сухої ваги.

Таким чином нами встановлені деякі закономірності нагромадження ендогенних вуглеводів у клітинах зелених сіркових бактерій.

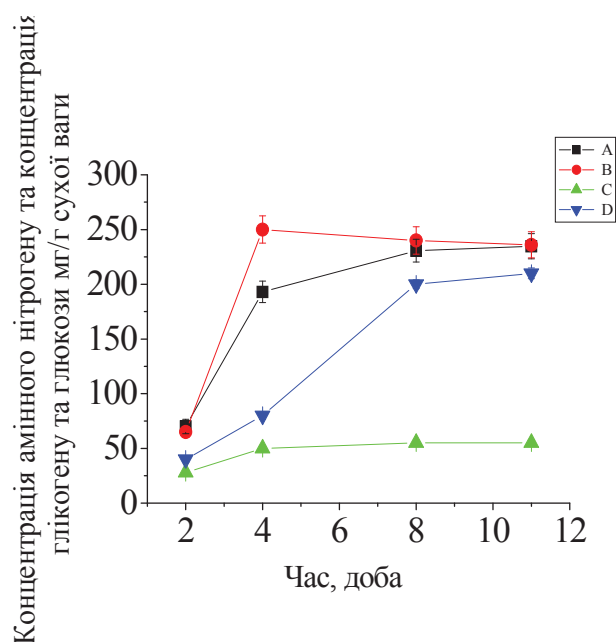


Рис. 7. Нагромадження аміної форми нітрогену клітинами *C. limicola* ІМВ К-8 за різних умов культивування

A — дослідний зразок (концентрація амінного нітрогену за умов стимуляції синтезу глікогену при відсутності NO_3^-). B — дослідний зразок (зростання синтезу глікогену за умов відсутності NO_3^-). C — контроль, нагромадження ендогенних вуглеводів клітинами на повноцінному середовищі GSB. D — контроль, нагромадження амінного нітрогену клітинами у повноцінному середовищі GSB.

Fig. 7. Accumulation amine nitrogen form by cells *C. limicola* ІМВ К-8 under various conditions of cultivation

A — prototype (the concentration of amino nitrogen under the stimulation of glycogen synthesis in the absence of NO_3^-). B — prototype (glycogen synthesis increase in the absence of NO_3^-). C — control, accumulation of endogenous carbohydrate cells in full medium GSB. D — control, accumulation of amino nitrogen cells in full medium GSB.

Слід зазначити, що за умов мінерального голодування, зниження концентрації діоксиду карбону в середовищі, наявності різних джерел органічного карбону та внесення нітрат іону метаболізм зелених сіркових бактерій *C. limicola* ІМВ К-8 зміщується в сторону конструктивного анаболізму вуглеводів. Однак, зміщення метаболізму в сторону анаболізму вуглеводів, спричиняє зниження біомаси клітин досліджуваного штаму.

ЛІТЕРАТУРА

1. Горішний М.Б., Гудзь С.П., Гнатуш С.О. Метаболізм вуглеводів у клітинах зелених сіркових бактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002 "Український біохімічний журнал" — 2009. — N. 5, Т. 81. — С. 26—33.
2. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Білінська І.С. Мікробіологія — Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2009. — 306 с.
3. Гудзь С.П., Горішний М.Б., Гнатуш С.О. Бактеріальний фотосинтез — Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2011. — 180с.
4. Кондратьева Е.Н. Фотосинтезирующие бактерии. — М.: Изд. Моск. ун-та, 1989. — С. 107.
5. Современная микробиология / Под. ред. Й. Ленгера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля — М.: Наука, 2005. — 449 с.
6. Blankenship M.T. Madigan C.E. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. — Boston: Kluwer Academic Publishers Dordrecht, 1997. — P. 49—89.
7. Castenholz R.W., Pierson B.K. The prokaryotes. — New York: Springer, 1978. — P. 290—298.
8. Cork D., Carunas R., Sajjad A. *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum* biocatalyst in the production of sulfur and organic carbon from gas stream containing H₂S and CO₂ // Appl. And Envir. Microbiol. — 1983. — Vol. 45. — P. 913—918.
9. Sireveg R., Buchanan B. Mechanisms of CO₂ fixation in bacterial photosynthesis studied by carbon isotope fractionation technique // Arch. Microbiol. — 1977. — Vol. 16, N 112. — P. 35—38.
10. Sireveg R., Ormerod J. Synthesis, storage, and degradation of polyglucose in *Chlorobium thiosulfatophilum* // Arch. Microbiol. 1977. — Vol. 111. — P. 239.
11. Hanson T.E., Tabita F.R. A ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase / oxygenase (Rubisco)-like protein from *Chlorobium tepidum* that is involved with sulfur metabolism and the response to oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. — 2001. — P. 4397—4402
12. Herter S., Farfsing J., Gad'On N. et al. Autotrophic CO₂ fixation by *Chloroflexus aurantiacus*: study of glyoxylate formation and assimilation via the 3-hydroxypropionate cycle // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 267. — P. 20256—20273.
13. Mas J., Gernerden H. Storage products in purple and green sulfur bacteria. In: Anoxygenic photosynthetic — D.: Kluwer Acad. Pub. (Netherlands), 1995. — P. 973—990.
14. Ugolkova N.V., Ivanovsky R.N. On the mechanism of autotrophic fixation of CO₂ by *Chloroflexus aurantiacus* // Microbiology. — 2000. — Vol. 5. — P. 139—142.

Стаття надійшла до редакції 06.06.2012 р.



М.Б. Горишний, С.П. Гудзь

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

**ОСОБЕННОСТИ КОНСТРУКТИВНОГО АНАБОЛИЗМА
УГЛЕВОДОВ В КЛЕТКАХ ЗЕЛЕННЫХ СЕРНЫХ БАКТЕРИЙ
CHLOROBIVM LIMICOLA IMB K-8**

Реферат

Зеленые серные бактерии *Chlorobium limicola* IMB K-8 в процессе аноксигенного фотосинтеза накапливают в клетках гликоген. Рост уровня гликогена в клетках наблюдали при условии внесения в среду культивирования органических доноров углерода при одновременном минеральном голодании. В этих условиях 20% уменьшение концентрации диоксида углерода и внесение нитрат иона в инкубационную смесь сопровождалось снижением уровня биомассы и ростом интенсивности конструктивного анаболизма углеводов в клетках *C. limicola* IMB K-8. Снижение концентрации диоксида углерода и минеральных компонентов среды GSB ведет к снижению интенсивности фотосинтеза в клетках зеленых серных бактерий.

Ключевые слова: зеленые серные бактерии, глюкоза, гликоген.

M.B. Gorishniy, S.P. Gudz

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

**FEATURES OF CONSTRUCTIVE ANABOLISM
OF CARBOHYDRATES IN THE CELLS OF GREEN SULFUR
BACTERIA *CHLOROBIVM LIMICOLA* IMB K-8**

Summary

Green sulfur bacteria *Chlorobium limicola* IMB K-8 accumulate glycogen in the cells during the process of anoxyphotosynthesis. There were observed increasing of glycogen levels in the cells under conditions of adding organic carbon donor into the culture medium while mineral starvation. Under these conditions, 20% reduction in carbon dioxide concentration and introducing nitrate ion in the incubation mixture was accompanied by reduction of biomass and increasing the intensity of anabolic structural carbohydrates in the cells *C. limicola* IMB K-8. Further reducing of the concentration of carbon dioxide and mineral components of the environment GSB leads to intensity decreasing of photosynthesis in the cells of green sulfur bacteria.

Key words: green sulfur bacteria, glucose, glycogen.

