

УДК 579.[22:811.41]:546.221.1

А.А. Галушка, М.Б. Горішний, О.Р. Кулачковський, С.П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів,
79005, Україна, тел.: +38 (032) 239 43 57, e-mail: a_halushka@mail.ru

ВПЛИВ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА ФОТОСИНТЕЗУВАЛЬНИЙ АПАРАТ БАКТЕРІЙ *CHLOROBIVM LIMICOLA* ІМВ К-8

*Досліджено вплив гідроген сульфїду на склад фотосинтезувальних пігментів і ультраструктуру клітин бактерій *Chlorobium limicola* ІМВ К-8. Встановлено, що підвищені концентрації H_2S спричиняють зниження вмісту бактеріохлорофілів і каротиноїдів у клітинах бактерій, втрату зв'язку хлоросом із цитоплазматичною мембраною та їхнє руйнування.*

*Ключові слова: *Chlorobium limicola*, фотосинтезувальний апарат, фотосинтезувальні пігменти, гідроген сульфїд.*

Гідроген сульфїд у великих кількостях утворюється сульфатвідновлювальними бактеріями в кар'єрних водоймах, що утворилися в місцях промислового видобування сірки, та є важливим чинником забруднення довкілля [7]. Ця сполука спричиняє різноманітні захворювання людей і тварин: запалення органів зору, порушення функціонування дихальної та нервової систем [13], а також викликає пригнічення росту та загибель мікроорганізмів [14], виявляє мутагенну та канцерогенну дію [3, 12].

Сірководокиснювальні хемолітотрофи використовують H_2S як джерело енергії [8], а фотосинтезувальні сіркові бактерії та ціанобактерії — як донор електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу [17], однак у підвищених концентраціях гідроген сульфїд пригнічує ріст цих бактерій [4].

Метою роботи було визначити зміни в пігментному складі фотосинтезувальних зелених сіркових бактерій *Chlorobium limicola* та структурі їхнього фотосинтезувального апарату за впливу підвищених концентрацій гідроген сульфїду.

Матеріали та методи

У дослідах використовували бактерії *Chlorobium limicola* ІМВ К-8 [1].

Бактерії вирощували в середовищі GSB [17], до якого додавали 1 г/л натрій ацетату та 1 г/л натрій пірувату, оскільки раніше було показано, що ці речовини стимулюють ріст досліджуваних бактерій [4]. Культивування проводили в анаеробних умовах при температурі 30 °С за умов

© А.А. Галушка, М.Б. Горішний, О.Р. Кулачковський, С.П. Гудзь, 2012



постійного освітлення (червоний світлофільтр, 40 лк). Для створення анаеробних умов пробірки повністю заповнювали середовищем і закривали гумовими корками.

Для дослідження впливу гідроген сульфід на склад пігментів у клітинах бактерій до тридобової культури, вирощеної в середовищі з оптимальною концентрацією H_2S (4 мМ) [4], додавали натрій сульфід у концентраціях 5, 6 та 7 мМ і продовжували культивування ще протягом 1 доби. Контролем слугувала чотиридобова культура, яку культивували без додаткового внесення Na_2S . Екстракцію та розділення пігментів здійснювали, як описано раніше [5]. Спектри поглинання отриманих екстрактів визначали на спектрофотометрі СФ-46.

Для дослідження ультраструктурних змін у клітинах бактерій їх вирощували протягом трьох діб і вносили натрій сульфід до концентрації 7 мМ. Через добу клітини двічі відмивали дистильованою водою, осаджували центрифугуванням при 15 000 g протягом 15 хв і фіксували в 1,5% розчині OsO_4 в какодилатному буфері (рН 7,2) протягом 90 хв при 0 °С. Фіксовані клітини зневоднювали в розчинах зі зростаючими концентраціями етанолу та пропілен оксиду й переносили в епоксидну смолу Embed-812. Ультратонкі зрізи клітин отримували на ультрамікроскопі УМТП–6 і контрастували плумбум цитратом за Рейнольдсом [18]. Перегляд і фотографування зразків здійснювали в електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 за прискорювальної напруги 75 кВ.

Концентрацію гідроген сульфід визначали фотоелектроколориметрично [20] на КФК-3.

Усі досліди проводили в трикратній повторності. Статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням програми «Origin 6.1». Результати представлені як середнє значення з поправкою на стандартну похибку ($M \pm m$). Достовірність даних та різниці між ними оцінювали за коефіцієнтом Стьюдента при рівні достовірності $P < 0,05$ [6].

Результати та їх обговорення

Відомо [4], що оптимальною концентрацією гідроген сульфід для росту бактерій *C. limicola* ІМВ-К-8 є 4 мМ. Збільшення концентрації цієї сполуки призводить до сповільнення росту, а за наявності в середовищі 6 мМ H_2S ріст бактерій інгібується повністю.

У бактерій *C. limicola* описані чотири основні фотосинтезувальні пігменти: бактеріохлорофіли *c* та *d* й каротиноїди ізореніератин і хлоробактин [5]. У реакційному центрі та в складі пластинки, що з'єднує хлоросоми з цитоплазматичною мембраною, у невеликих кількостях виявлений бактеріохлорофіл *a* [17, 2].

Екстракти з клітин *C. limicola*, не оброблених гідроген сульфідом (контроль), мали максимуми поглинання при 421, 630, 665 та 765–767 нм (рис. 1). Перший максимум (421 нм) відповідає бактеріохлорофілу *d*, але може доповнюватися максимумами поглинання бактеріохлорофілу *c*



та хлоробактину. Другий — це один із максимумів бактеріохлорофілу *c*. 665 нм перебуває між близько розміщеними максимумами поглинання бактеріохлорофілів *c* та *d*, а 765–767 нм близький до основного максимуму поглинання бактеріохлорофілу *a* — 773 нм [10]. Цей максимум поглинання виражений слабо.

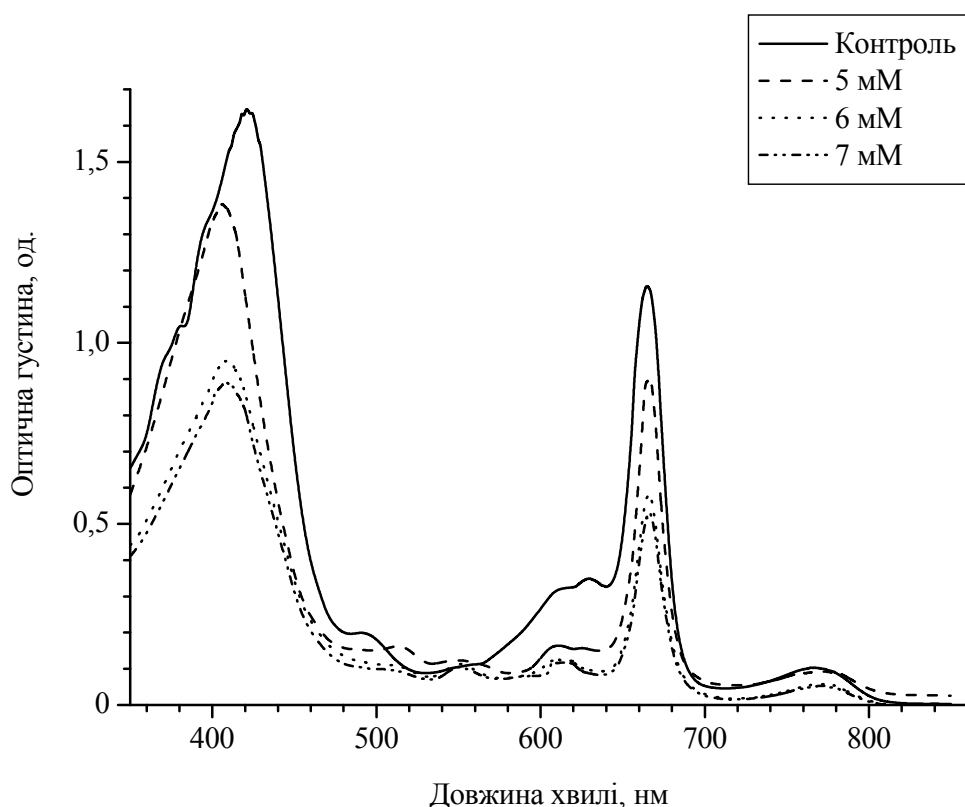


Рис. 1. Спектри поглинання світла екстрактами з клітин бактерій *C. limicola* IMV K-8 за наявності в середовищі різних концентрацій гідроген сульфїду (біомаса — 0,32 мг/мл, оптичний шлях — 1 см)

Fig. 1. Light absorption spectra by *C. limicola* IMV K-8 cells extracts (0.32 mg of cells/ml, optical length — 1 cm) at the presence of different hydrogen sulfide concentrations

Для дослідження вмісту різних пігментів за дії підвищених концентрацій гідроген сульфїду спочатку екстрагували пігменти з клітин, на яких діяли гідроген сульфїдом концентрацією 5–7 мМ протягом однієї доби. Їхні спектри поглинання світла при довжинах хвиль 350–850 нм представлені на рис. 1. Аналіз досліду показав, що гідроген сульфїд спричиняє зниження загальної оптичної густини екстрактів і зміщення максимуму поглинання в області 421 нм у більш короткохвильову зону (406–408 нм).

Таким чином, максимум поглинання при 421 нм може бути сумою максимумів поглинання щонайменше трьох пігментів, тому його зміщення під дією гідроген сульфїду може свідчити або про хімічну модифікацію пігментів [11], або про зміну їхнього кількісного співвідношення.

На наступному етапі роботи дослідили кількісні зміни фотосинтезувальних пігментів за умов впливу H_2S . Для цього проводили розділення пігментів методом тонкошарової хроматографії [5].

Результати аналізу кількісного складу пігментів після їхньої елюції з хроматограм показали, що гідроген сульфід спричиняє зниження концентрації як бактеріохлорофілів, так і каротиноїдів у клітинах. При цьому концентрація бактеріохлорофілів знижується в 2,3 разу порівняно з контролем вже за концентрації H_2S 5 мМ. Подальше зростання концентрації гідроген сульфїду суттєво не впливає на вміст бактеріохлорофілів. Концентрація каротиноїдів за наявності 5–6 мМ гідроген сульфїду зменшується поступово (рис. 2).

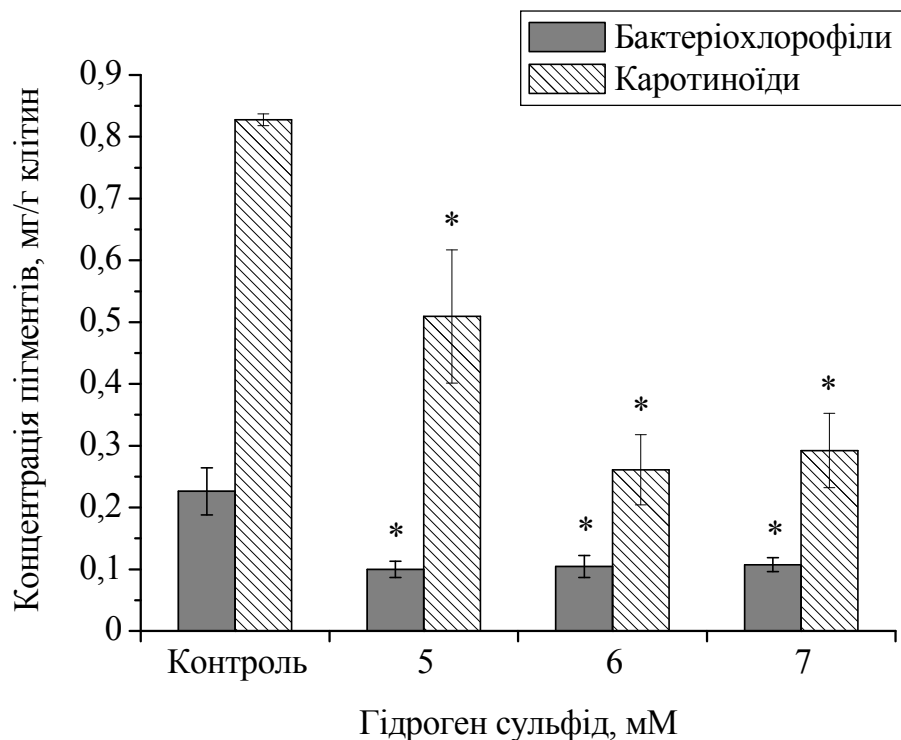


Рис. 2. Вміст бактеріохлорофілів і каротиноїдів у клітинах *C. limicola* IMV K-8 після додаткового внесення різних концентрацій гідроген сульфїду.

* — результати, достовірно відмінні від контролю

Fig. 2. Bacteriochlorophylls and carotenoids content in the cells of *C. limicola* IMV K-8 after the addition of different hydrogen sulfide concentrations.

* — reliably different from the control results

Оскільки бактеріохлорофіли містять у своєму складі атом магнію [8], зниження їхньої концентрації може бути пов'язане з безпосередньою взаємодією металу з гідроген сульфідом [9]. Відомо, що гідроген сульфід інгібує активність металовмісних ферментів [13]. Отже, зниження вмісту бактеріохлорофілів може бути пов'язане з пониженням активності порфобіліногенсинтетази (КФ 4.2.1.24), яка містить цинк і активується магнієм [15], і протохлорофілідредуктази (КФ 1.3.1.33), у складі якої виявлений Ферум [17]. Зниження вмісту каротиноїдів можна пов'язати з активністю ферменту 4-гідрокси-3-метилбутил-2-енілдіфосфатредуктази (КФ 1.17.1.2), який містить ферум [19] і також, можливо, інгібується гідроген сульфідом [13].

Електронномікроскопічні дослідження клітин бактерій *C. limicola*, оброблених підвищеними концентраціями H_2S , показали, що наявність гідроген сульфід у середовищі викликає помітні зміни в структурі фотосинтезувального апарату. Зокрема, за концентрації цієї сполуки 7 мМ спостерігається відділення хлоросом від цитоплазматичної мембрани та зменшення їхньої кількості (рис. 3). Очевидно, після відділення від цитоплазматичної мембрани вони деградують.

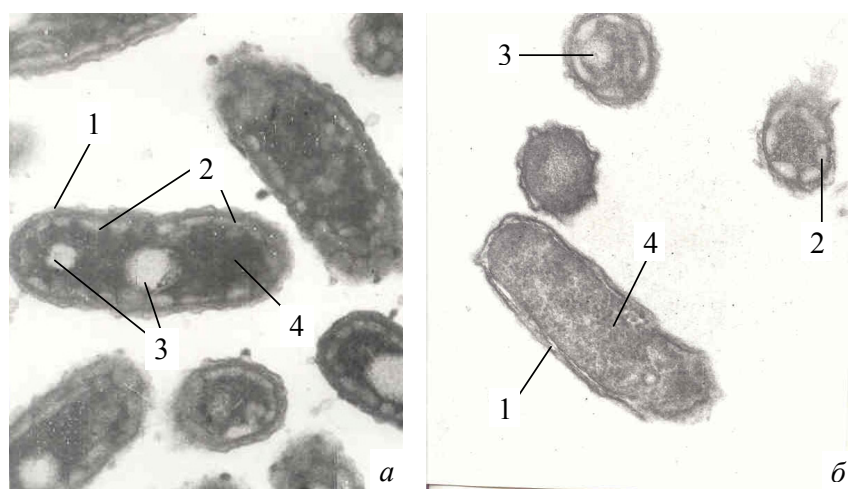


Рис. 3. Вплив гідроген сульфід на ультраструктуру клітин *C. limicola* IMV K-8:
a – контроль, *б* – 7 мМ ($\times 12\ 000$).

1 – клітинна стінка, 2 – хлоросоми, 3 – включення глікогену, 4 – цитоплазма

Fig. 3. Influence of hydrogen sulfide on *C. limicola* IMV K-8 cell ultrastructure:
a – control, *b* – 7 mM ($\times 12\ 000$).

1 – cell wall, 2 – chlorosomes, 3 – glycogen incorporations, 4 – cytoplasm

Таким чином, результатами досліджень показано, що гідроген сульфід пригнічує синтез фотосинтезувальних пігментів і порушує структуру й функції фотосинтезувального апарату зелених сіркових бактерій.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баран І.М., Кім Л.Я., Коструба М.Ф., Подопрігора О.І., Клім І.Р., Гнатуш С.О., Гудзь С.П. Сіркобактерії водойм Яворівського родовища та Стебницького державного гірничо-хімічного підприємства «Полімінерал» // Біорізноманіття. Екологія. Еволюція. Адаптація: ювілейна наук. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених, присвячена 180-річчю з дня народження Л.С. Ценковського (Одеса, березень – квітень 2003 р.): тези доп. – Одеса, 2003. – С. 11.
2. Баран І., Кушкевич І., Гнатуш С., Гудзь С. Систематичне положення, фізіолого-біохімічні властивості та екологія зелених фототрофних бактерій // Вісн. Львівського ун-ту. Серія біол. – 2007. – в. 43. – С. 48–60.
3. Галушка А.А., Перетятко Т.Б., Гудзь С.П. Вплив сірководню на *Saccharomyces cerevisiae* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2008. – № 3. – С. 49–57.
4. Горішний М.Б. Екологічне значення зелених сіркових бактерій в утилізації сірководню: дис. на здобуття наук. ступеня кандидата біол. наук. Львів, 2008. – 130 с.
5. Горішний М., Гудзь С. Фотосинтезувальні пігменти *Chlorobium limicola* Ya-2002 // Вісн. Львівського ун-ту. Серія біол. – 2009. – в. 50. – С. 95–100.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
7. Перетятко Т., Гнатуш С., Гудзь С. Сульфатвідновлювальні бактерії Яворівського сіркового родовища // Мікробіологічний журнал. – 2006. – 68, № 5. – С. 84–91.
8. Современная микробиология. Прокариоты: в 2-х т. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля; пер. с англ. – М.: Мир, 2005. – Т. 1. – 656 с.
9. Химическая энциклопедия: в 5 т. / Под ред. Зефирова Н.С. – М.: Большая Российская энциклопедия, 1995. – Т. 4. – 639 с.
10. Хлорофиллы [Электронный ресурс] // Химик: сайт о химии. – Усл. доступа: <http://www.ximuk.ru/encyklopedia/2/5058.html>.
11. Frigaard N.-U., Larsen K.L., Cox R.P. Spectrochromatography of photosynthetic pigments as fingerprinting technique for microbial phototrophs // FEMS microbiol. ecol. – 1996. – v. 20. – P. 69–77.
12. Huysckе M.M., Gaskins H.R. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models // Exp. biol. med. – 2004. – v. 229. – P. 586–597.
13. Hydrogen sulfide: human health aspects [Electronic resource] / World health organization: Cicads 53. – Geneva, 2003. – Online article available at: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad53.htm>
14. Kuster E., Dorush F., Altenburger R. Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, and *Daphnia magna* // Env. toxicol.chem. – 2005. – 24, № 10. – P. 2621–2629.



15. Mitchell L.W., Jaffe E.K. Porphobilinogen synthase from *Escherichia coli* is a Zn(II) metalloenzyme stimulated by Mg(II) // Arch. biochem. biophys. — 1993. — 300, № 1. — P. 169–177.

16. Nomata J., Ogawa T., Kitashima M., Inoue K, Fujita Y. NB-protein (BchN-BchB) of dark-operative protochlorophyllide reductase is the catalytic component containing oxygen-tolerant Fe-S clusters // FEBS letters. — 2008. — 582, № 9. — P. 1346–1350.

17. Overmann J. The family *Chlorobiaceae* [Electronic resource]// The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community / M.Dworkin et al. — 3rd ed. — New York: Springer-Verlag, 2000. — Online article available at: <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>

18. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // Journ.cell. biol. — 1963. — v. 17. — P. 208–212.19. Wolff M., Seemann M., Tse Sum Bui B., Frapart Y., Tritsch D., Garcia Estrabot A., Rodriguez-Concepcion M., Boronat A., Marquet A., Rohmer M. Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphatereductase (LytB/IspH) from *Escherichia coli* is a [4Fe-4S] protein // FEBS letters. — 2003. — 541, № 1–3. — P. 115–120.

20. Pat. 6,340,596 B1 USA, Int. Cl. G 01 N 33/00. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen / Sugiyama M.; assignee Fujirebio Inc. — № 09/248,316; fil. 02.11.1999; date of pat. 22.01.2002.

УДК 579.[22:811.41]:546.221.1

А.А. Галушка, М.Б. Горишний, О.Р. Кулачковский, С.П. Гудзь

Львовский национальный университет имени Ивана Франко, ул. Грушевского, 4, Львов,
79005, Украина, тел. +38 (032) 239 43 57,
e-mail: a_halushka@mail.ru

ВЛИЯНИЕ СЕРОВОДОРОДА НА ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЙ АППАРАТ БАКТЕРИЙ *CHLOROBIVM LIMICOLA* ИМВ К-8

Реферат

Исследовано влияние сероводорода на состав фотосинтезирующих пигментов и ультраструктуру клеток бактерий *Chlorobium limicola* ИМВ К-8. Установлено, что H₂S в концентрациях 5–7 мМ вызывает уменьшение общей оптической плотности экстрактов пигментов и смещение максимума поглощения при 421 нм в более коротковолновую зону (406–408 нм).



Результаты количественного анализа пигментов после их разделения методом тонкослойной хроматографии показали, что в концентрации 5 мМ сероводород вызывает понижение содержания бактериохлорофиллов в клетках бактерий в 2,3 раза по сравнению с контролем. При концентрациях этого соединения 5–6 мМ наблюдается постепенное уменьшение концентрации каротиноидов.

В концентрации 7 мМ H₂S вызывает отделение хлоросом от цитоплазматической мембраны и уменьшение их количества. По-видимому, после отделения от мембраны они деградируют.

Ключевые слова: *Chlorobium limicola*, фотосинтезирующий аппарат, фотосинтезирующие пигменты, сероводород.

УДК 579.[22:811.41]:546.221.1

A.A. Halushka, M.B. Gorishny, O.R. Kulachkovsky, S.P. Gudz

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Grushevsky str., Lviv, 79005, Ukraine, tel.: +38 (032) 239 43 57, e-mail: a_halushka@mail.ru

INFLUENCE OF HYDROGEN SULFIDE ON THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF *CHLOROBIVM LIMICOLA* IMV K-8

Summary

Influence of hydrogen sulfide on *Chlorobium limicola* IMB K-8 photosynthetic pigments composition and cells ultrastructure is studied. H₂S at concentrations 5–7 мМ causes the decrease of pigments extracts optical density and absorption maximum at 421 nm transition to lower wavelength (406–408 nm). The results of pigments quantitative analysis after their separation by thin-layer chromatography have shown that at concentration 5 мМ hydrogen sulfide causes 2.3 times decrease of bacteriochlorophylls content in bacterial cells, compared to control. The decrease of carotenoids content at this compound concentrations 5–6 мМ is observed.

At concentration 7 мМ H₂S causes the disconnection of chlorosomes from cytoplasm membrane and the decrease of their quantity. Probably, chlorosomes degrade after the disconnection from membrane.

Key words: *Chlorobium limicola*, photosynthetic apparatus, photosynthetic pigments, hydrogen sulfide.

Одержано 26.01.2012.

