

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_gorishnyi @ukr.net

УТВОРЕННЯ СПОЛУК СІРКИ З РІЗНИМ СТУПЕНЕМ ОКИСНЕННЯ БАКТЕРІЯМИ *CHLOROBIVUM* *LIMICOLA* ІМВ К-8

Фотосинтезувальні зелені сіркові бактерії C. limicola ІМВ К-8 в процесі культивування на середовищі з H_2S нагромаджують позаклітинну елементну сірку. Після повного використання гідроген сульфід, вміст сірки знижується, а у середовищі спостерігається утворення сульфат іону, максимальна кількість якого нагромаджується на 13 добу. В дослідях з відмитими клітинами *C. limicola* ІМВ К-8 показано, що на двадцяту годину інкубації концентрація сульфат іону сягає максимуму, як при освітленні так і в темряві. Встановлено, що пріоритетним субстратом окиснення за умов відсутності гідроген сульфід є ендогенна глюкоза та глікоген. Джерела енергії в стресових умовах використовуються у послідовності: глюкоза – глікоген – елементна сірка.

Ключові слова: зелені сіркові бактерії, елементна сірка, сульфат іон, глюкоза, глікоген.

Фотосинтезувальні зелені сіркові бактерії в процесі аноксигенного фотосинтезу здатні використовувати відновлені сполуки сірки, такі як гідроген сульфід, тіосульфат, тетратіонат і молекулярну сірку як донори електронів. За природою використовуваних донорів електронів різні види суттєво відрізняються [1]. Побічним продуктом у процесі фотосинтезу цих бактерій є сірка або сульфат іон [2]. Фотосинтезувальні зелені сіркові бактерії *C. limicola* ІМВ К-8 єдиним донором електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу використовують гідроген сульфід. Інші відновлені сполуки сірки як донори електронів ці бактерії не використовують [1, 2]. При рості у середовищі з гідроген сульфідом у культуральній рідині можна виявити елементну сірку, а на пізніх стадіях розвитку культури сульфат іони. Значення цього процесу в метаболізмі фотосинтезувальних зелених сіркових бактерій не з'ясоване.

Метою роботи було вивчення окремих шляхів метаболізму сполук сірки з різним ступенем окиснення у клітинах фотосинтезувальних зелених сіркових бактерій.



Матеріали і методи

Об'єктом досліджень був штам зелених сіркових бактерій *Chlorobium limicola* IMB K-8 [1, 3]. 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, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,15, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5. Після автоклавування додавали окремо: 10% NaHCO_3 — 15 мл, 1 М $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — 2,5 мл, розчин вітаміну B_{12} (2 мг/мл) — 1 мл, мікроелементи — 1 мл. Суміш мікроелементів містила на літр дистильованої води: 25% HCl — 10 мл; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 2,0 г; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 190 мг; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 100 мг; ZnCl_2 — 70 мг; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 36 мг; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 24 мг; H_3BO_3 — 6 мг; і $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 2 мг. FeSO_4 розчиняли у HCl , інші компоненти у дистильованій воді, рН середовища 6,7–6,8.

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.

Біомасу визначали колориметрично [2] на фотоелектроколориметрі КФК — 3 ($\lambda=450$ нм, кювета з оптичним шляхом 3 мм). Для розрахунків використовували формулу:

$$C, \text{ мг/мл} = (E_{450} \cdot n) / 0,131,$$

де E_{450} — екстинкція при 450 нм, n — ступінь розведення, 0,131 — коефіцієнт перерахунку, визначений експериментально.

Концентрацію гідроген сульфід у визначали фотоелектроколориметрично [2], використовуючи вісмутувий реактив такого складу ($3,4\text{г Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 230$ мл льодяної оцтової кислоти + 500мл (6%) розчину желатину, загальний об'єм доводили до одного літра дистильованою водою). До 5 мл вісмуту реактиву додавали 9,5 мл NaOH (1Н) перемішували і залишали при кімнатній температурі на 10 хв. До суміші додавали 0,5 мл культуральної рідини і визначали оптичну густину при $\lambda = 400$ нм.

Концентрацію гідроген сульфід у (мг/л) визначали за формулою:

$$C = E / R$$

де C — концентрація гідроген сульфід у (мг/л), E — екстинкція при 400 нм,

R — коефіцієнт, визначений за калібрувальною кривою.

Вміст сульфат іонів визначали турбідиметрично [1, 2]. Метод полягає в осадженні сульфат іону барій хлоридом і турбідиметричному визначенні його у вигляді барій сульфату [2, 3]. Для цього до 1 мл культуральної рідини без клітин додавали 10 мл робочого осаджуючого розчину, ретельно перемішували, витримували протягом 10 хв, струшували і фотометрували

у кюветі з оптичним шляхом 10мм при довжині хвилі 520 нм. Сірку визначали спектрофотометрично на СФ-46, при 260 нм [1].

Клітини руйнували за допомогою ультразвукового дезінтегратора УЗДН–2Т при частоті 22 кГц протягом 5 хв у скляних товстостінних пробірках, занурених у лід. Уламки клітин осаджували центрифугуванням при 15 тис об/хв протягом 45 хв. при 4 °С. Гідроліз полісахариду неклітинних екстрактів проводили 1 Н H₂SO₄. Концентрацію глюкози визначали ферментативно [2].

Результати та їх обговорення

Для виявлення сполук сірки з різним ступенем окиснення *C. limicola* ІМВ К-8 вирощували за умов освітлення і за наявності гідроген сульфід, джерелом якого служив Na₂S. За цих умов молекулярна сірка виявлялася протягом усього періоду культивування бактерій (рис. 1). Найбільш інтенсивне утворення сірки спостерігали в експоненціальній фазі росту. З переходом культури в стаціонарну фазу виділення сірки клітинами сповільнювалося і на 12 добу її кількість у середовищі зменшувалася практично до нульового показника. Одночасно в середовищі розпочиналося утворення сульфат іону.

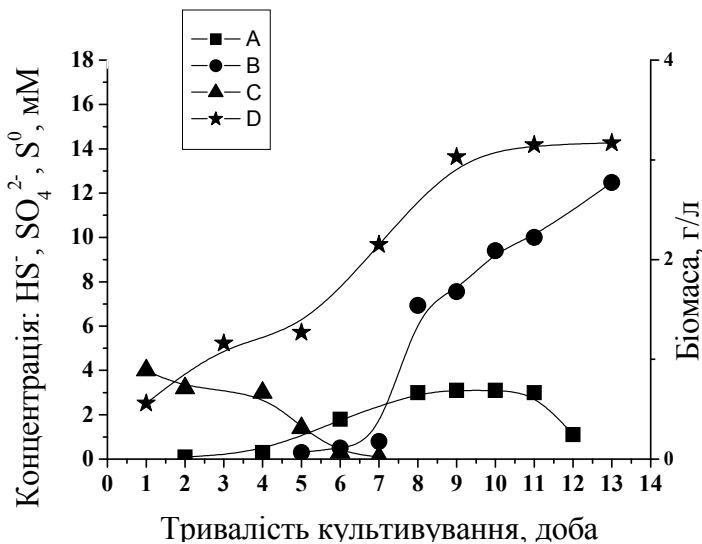


Рис. 1. Перетворення сполук сірки в процесі росту культури *C. limicola* ІМВ К-8 за наявності у середовищі:

A — елементарної сірки, B — сульфат іону, C — гідроген сульфід, D — біомаси.

Fig. 1. Transformation of sulfur compounds in the growth of culture *C. limicola* IMB K-8 in the presence in medium:

A — elemental sulfur, B — sulfate ion, C — hydrogen sulfide, D — biomass.

Використання гідроген сульфід у середовищі супроводжувалося зниженням темпів росту культури і її переходом у стаціонарну фазу. Через короткий період часу знижувався вміст сірки, однак росту клітин практично не відбувалося. При цьому характер кривої росту нагадував діаоксичну криву росту [2, 3]. Можливо, у *C. limicola* IMB K-8 гідроген сульфід є пріоритетною сполукою сірки за умов катаболізму її відновлених сполук у процесі аноксигенного фотосинтезу.

Після використання гідроген сульфід, сірка нульової валентності окиснюється до сульфат іону [5, 6]. Показано, що його нагромадження починається на п'яту добу культивування клітин *C. limicola* IMB K-8 у мінеральному середовищі GSB (рис. 1). Зростання вмісту сульфат іону спостерігається протягом 8 – 13 доби культивування.

Отримані результати дають підставу вважати, що клітини *C. limicola* IMB K-8 при рості на середовищі з гідроген сульфідом окиснюють його на світлі в процесі фотосинтезу до елементної сірки, яка екскретується з клітин у культуральне середовище. За умов відсутності гідроген сульфід, коли фотосинтез припиняється, через відсутність донора електронів, елементна сірка окиснюється до сульфат іону. Однак, за цих умов помітного зростання біомаси клітин *C. limicola* IMB K-8 не спостерігалось.

Щоб з'ясувати чи використовують клітини *C. limicola* IMB K-8 виділювану ними сірку за наявності гідроген сульфід, на сьому добу коли його концентрація знижувалася до нуля (рис. 2), до середовища вносили Na_2S (джерело гідроген сульфід). Як впливає з даних рис. 3 зростання вмісту гідроген сульфід, стимулювало ріст біомаси і вміст елементної сірки в середовищі. Рівень сульфат іону при цьому помітно не змінювався. Очевидно, за умов фотосинтезу енергетичні потреби клітини забезпечуються реакціями фотофосфорилування. Окиснення сірки служить додатковим джерелом енергії, яка забезпечує ріст клітин в стресових умовах (відсутність донора електронів).

Для дослідження закономірності утворення сульфат іону відмитими клітинами *C. limicola* IMB K-8 при внесенні у середовище елементної сірки (рис. 3) використовували клітини вирощені у середовищі GSB, які відмивали та інкубували в середовищі без гідроген сульфід до повного використання ендogenous глікогену та глюкози [3, 5]. Такі клітини переносили в інкубаційну суміш з елементною сіркою та інкубували за умов темряви та освітлення. В обидвох випадках спостерігали зниження концентрації сірки та нагромадження сульфат іону. Динаміка цього процесу практично не відрізнялася. Незважаючи на те, що клітини активно окиснювали сірку до сульфат іону, збільшення біомаси не спостерігали ні за освітлення, ні за темнових умов, що наводить на думку про те, що за цих умов сірка як донор електронів при аноксигенному фотосинтезі не використовувалася, а лише окиснювалася в реакціях субстратного фосфорилування.

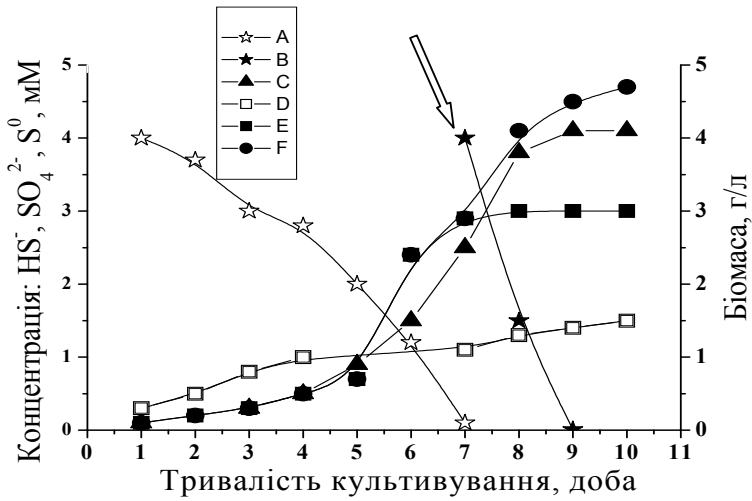


Рис. 2. Нагромадження сполук сірки з різним ступенем окиснення *C. limicola* IMB K-8 за умов додаткового внесення гідроген сульфіді. А – використання гідроген сульфіді внесеного до середовища на початку культивування, В – концентрація гідроген сульфіді внесеного додатково, С – концентрація елементарної сірки, D – концентрація сульфат іону, E – концентрація клітин, F – концентрація клітин після додаткового внесення гідроген сульфіді.

Fig. 2. Accumulation of sulfur compounds with various degrees of oxidation *C. limicola* IMB K-8 under addition of hydrogen sulfide. A – the use of hydrogen sulfide was introduced to the medium at the beginning of cultivation, B – concentration of hydrogen sulfide was introduced additionally, C – concentration of elemental sulfur, D – the concentration of sulfate ion, E – cell concentration, F – concentration cells after addition of hydrogen sulfide.

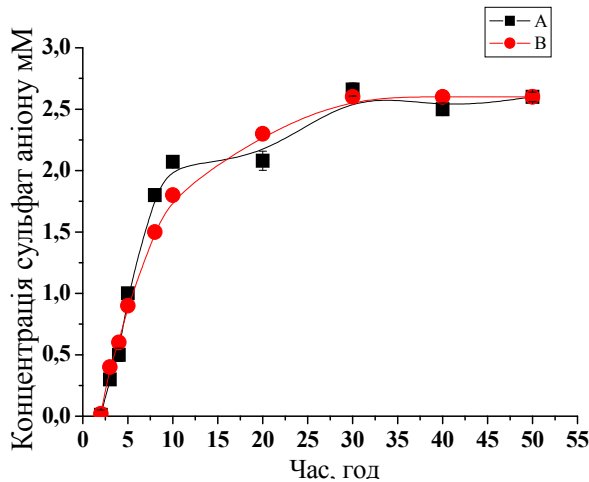


Рис. 3. Нагромадження сульфат іону відмитими клітинами зелених сіркобактерій. А – концентрація сульфат іону за умов освітлення. В – концентрація сульфат іону у темряві.

Fig. 3. Accumulation of sulfate ion washed cells of green sulfur bacteria. A – concentration of ion sulfate on the lightening conditions. B – concentration of ion sulfate in the dark.



Цікаво, що в дослідях з відмитими клітинами сірка використовувалася клітинами лише після того як з клітин вичерпувалася глюкоза і глікоген (рис. 4). Це свідчить про те, що в клітинах функціонує тонкий механізм регуляції використання енергозабезпечуючих метаболітів. Очевидно, енергії окиснення елементарної сірки до сульфат іону недостатньо для забезпечення ростових потреб клітин, однак вона може бути використана подібно як і енергія окиснення глюкози і глікогену для підтримання життєздатності клітин за екстремальних умов (темрява, відсутність донора електронів, тощо) [4, 5].

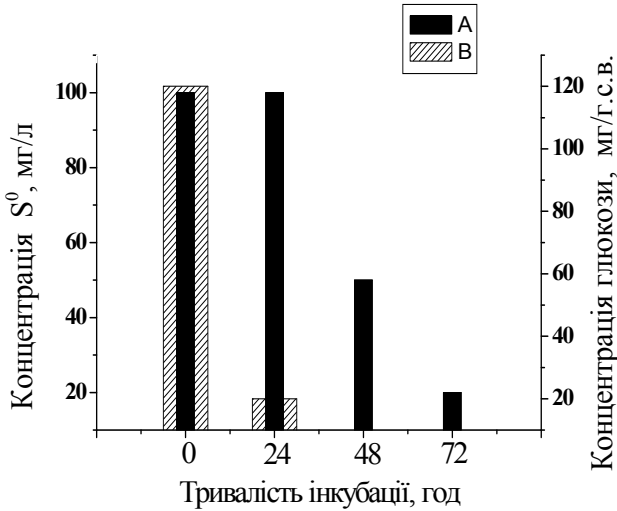


Рис. 4. Використання ендогенної глюкози та сірки відмитими клітинами *C. limicola* IMB K-8.

A — концентрація сірки, B — концентрація глюкози.

Fig. 4. The use of endogenous glucose and sulfur washed cells *C. limicola* IMB K-8.

A — concentration of sulfur, B — concentration of glucose.

Таким чином, зелені сіркові бактерії *C. limicola* IMB K-8 в процесі аноксигенного фотосинтезу використовують як донор електронів гідроген сульфід, який віддаючи електрони перетворюється до молекулярної сірки, що нагромаджується в середовищі. Однак швидке використання гідроген сульфідів веде до припинення фотосинтезу і для клітин створюються несприятливі умови. Раніше нами було показано, що досліджувані клітини *C. limicola* IMB K-8 для підтримання життєздатності, в екстремальних умовах, використовували запасні вуглеводи в першу чергу глікоген [1].

Фрігаард та співробітники [6] запропонували схему перетворень S^0 у *Chlorobium tepidum*, згідно якої сірка у цих бактерій в результаті складних перетворень під дією кінцевого ферментного комплексу АТФ-сульфурилази перетворюється у сульфат іон при цьому шляхом субстратного фосфорилування утворюється АТФ.

Отримані нами результати про перетворення гідроген сульфід у клітинах *C. limicola* ІМВ К-8 підтверджують участь елементної сірки в процесах забезпечення клітин енергією в стресових умовах. Встановлено, що пріоритетним субстратом окиснення *C. limicola* ІМВ К-8 за відсутності гідроген сульфід у ендогенна глюкоза. Джерела енергії в стресових умовах використовуються у послідовності глюкоза — глікоген — елементна сірка.

ЛІТЕРАТУРА

1. Горішний М.Б., Гудзь С.П., Гнатуш С.О. Метаболізм глюкози та глікогену у клітинах зелених фотосинтезувальних сіркових бактерій // Вісник Львів. ун-ту. Серія біол. — 2008. — Вип. 46. — С. 129–136.
2. Горішний М.Б., Гудзь С.П., Гнатуш С.О. Метаболізм вуглеводів у клітинах зелених сіркових бактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002 // Український біохімічний журнал. — 2009. — № 5. — Т. 81. — С. 26–33.
3. Левицька О.В., Горішний М. Б., Гудзь С.П. Взаємозв'язок азотно-го живлення та утворення глікогену в клітинах *Chlorobium limicola* // Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — Вип. 9. — С. 53–61.
4. Pffening N., Widdel F. The bacteria of sulfure cycle // Phil. Trans. R. Soc. Lond. — 1982. — Vol. 298. — P. 433–441.
5. Sireveg R., Ormerod J. Synthesis, storage, and degradation of polyglucose in *Chlorobium thiosulfatophilum* // Arch. Microbiol. — 1977. — Vol. 111. — P. 239.
6. Frigaard N.U., Gomez Maqueo Chew A.H., Maresca J.A., Bryant D.A. Insights into the structure, physiology, and metabolism of a green sulfur bacterium derived from the complete genome sequence *Chlorobium tepidum* // Photosynthesis Research. — 2003. — Vol. 78. — P. 93–117.

М.Б. Горішний, С.П. Гудзь, С.А. 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

ОБРАЗОВАНИЕ СОЕДИНЕНИЙ СЕРЫ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ ОКИСЛЕНИЯ БАКТЕРИЯМИ *CHLOROBIVM LIMICOLA* ІМВ К-8

Реферат

Фотосинтезирующие зеленые серные бактерии *C. limicola* ІМВ К-8 в процессе культивирования на среде с H_2S накапливают внеклеточную элементную серу. После полного использования гидроген сульфида, содержание серы снижается, а в среде наблюдается образование сульфат



иона, максимальное количество которого накапливается на 13 сутки. В опытах с отмытыми клетками *C. limicola* ИМБ К-8 показано, что на двадцатый час инкубации концентрация сульфат иона достигает максимума, как при освещении так и в темноте. Установлено, что приоритетным субстратом окисления в условиях отсутствия гидроген сульфида есть эндогенная глюкоза и гликоген. Источники энергии в стрессовых условиях используются в следующей последовательности: глюкоза — гликоген — элементная сера.

Ключевые слова: зеленые серные бактерии, элементная сера, сульфат ион, глюкоза, гликоген.

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

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

FORMATION OF SULPHUR COMPOUNDS WITH DIFFERENT OXIDATION BACTERIAL CELLS *CHLOROBIDIUM LIMICOLA* ИМБ К-8

Summary

Green sulfur bacteria *C. limicola* ИМБ К-8 during cultivation in medium with H₂S accumulate extracellular elemental sulfur. After full use of hydrogen sulfide, sulfur content decreases, and in the medium it is observed the formation of sulfate ion, the maximum amount of which is piled up in 13 days. In experiments with washed cells *C. limicola* ИМБ К-8 it is shown that the concentration of sulfate ion reaches maximum, in twenty hours of incubation both in the light and in darkness. It is established that priority substrate oxidation in the absence of hydrogen sulfide is endogenous glucose and glycogen. The sources of energy under stress conditions are used in the following sequence: glucose — glycogen — elemental sulfur.

Key words: green sulfur bacteria, elemental sulfur, sulfate ion, glucose, glycogen.

Одержано 20.10.2011.

