

**О.В. Левицька, М.Б. Горішний, С.П. Гудзь**

Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна,  
тел.: +38 (066) 663 64 06, e-mail: o\_levytska@yahoo.com

## **ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК АЗОТНОГО ЖИВЛЕННЯ ТА УТВОРЕННЯ ГЛІКОГЕНУ В КЛІТИНАХ *CHLOROBIVM LIMICOLA***

*Досліджено здатність зелених фотосинтезувальних сіркобактерій Chlorobium limicola Ya-2002 засвоювати різні джерела азоту. Бактерії використовують амонійний, амінний та молекулярний азот. Найкращий ріст бактерій спостерігався у середовищі з солями амонію. Окремі амінокислоти – аспарагін, пролін, триптофан та глутамін – забезпечували ріст культури, а тирозин, триптофан, фенілаланін і серин не використовувалися як джерела азоту. Нітрати не використовувалися C. limicola і виявляли інгібуючий вплив на засвоєння інших форм азоту. Показано, що дефіцит амонійного азоту і/або наявність нітрату у середовищі стимулюють утворення глікогену.*

*Ключові слова: зелені сіркобактерії, Chlorobium limicola, азотфіксація, глікоген, джерела азоту.*

Фотосинтезувальні зелені бактерії родини *Chlorobiaceae* є облігатними анаеробами, для яких характерний фотолітоавтотрофний тип живлення. Як донори електронів в процесі аноксигенного фотосинтезу вони використовують відновлені сполуки сірки (найчастіше  $H_2S$ ) [9]. Представники цієї родини не засвоюють органічні сполуки як джерело вуглецю. Основним джерелом вуглецю для *C. limicola* є діоксид карбону. Подібно до інших фотосинтезувальних прокариот вони використовують ацетат і піруват як допоміжні джерела вуглецю [10]. Засвоєння цих органічних кислот відбувається лише за наявності  $CO_2$  [4]. Представники *Chlorobium* суттєво різняться за здатністю утилізувати різні джерела азоту [12]. В клітинах бактерій за певних умов культивування нагромаджується глікоген. Умови біосинтезу глікогену в клітинах фотосинтезувальних зелених сіркобактерій та механізми його регуляції досліджені недостатньо [11]. Зелені сіркобактерії можуть виявитися джерелом дешевого органічного карбону, тому питання умов нагромадження глікогену має теоретичне і практичне значення.

Метою цієї роботи було дослідити здатність фотосинтезувальних зелених сіркових бактерій використовувати різні джерела азоту та їх вплив на біосинтез глікогену в клітинах *C. limicola* Ya-2002.

### **Матеріали та методи**

В досліджах використовували штам зелених фотосинтезувальних бактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002, виділений із водойм Яворівського сіркового родовища [2, 3]. Бактерії вирощували за анаеробних умов у рідкому середовищі для зелених



сіркобактерій GSB (green sulfur bacteria) [14] протягом 7–8 діб при температурі 24–25 °С. До середовища культивування вносили натрію сульфід дев'ятиводний (4 мМ), натрію гідрокарбонат (18 мМ) та натрію ацетат і натрію піруват як додаткові джерела вуглецю (4,5 та 6,1 мМ, відповідно). Наведені концентрації є кінцевими для цих сполук у середовищі культивування. Культуру освітлювали променями з довжиною хвилі 700–800 нм інтенсивністю 40 лк [4]. Бактерії вирощували в анаеростатах Genbox Jar 7.0 L. France, для поглинання кисню використовували генератори для анаеробів Genbox anaer (фірми Biomerieux). Амінокислоти додавали у концентрації 0,05%. Біомасу визначали фотоелектроколориметрично ( $\lambda=450$  нм, довжина оптичного шляху 3 мм, фотометр КФК-3). Клітини осаджували центрифугуванням при 8000 об/хв. Концентрацію гідроген сульфід у середовищі визначали фотоелектроколориметрично після його взаємодії з *n*-амінодиметиланіліном [17]. Клітини міроскопували за допомоги електронного мікроскопа УЕМВ-100Б. Безклітинні екстракти отримували шляхом руйнування попередньо відмитих клітин за допомоги ультразвукового дезінтегратора УЗДН-2Т при температурі 4 °С. Гідроліз глікогену безклітинних екстрактів проводили кип'ятінням протягом трьох годин з 1н сірчаною кислотою. Вміст глюкози в екстрактах до і після гідролізу визначали ферментативно за допомоги аналітичного набору «Діаглюк» [1]. Побудову графіків та статистичну обробку даних [5] здійснювали за допомоги комп'ютерної програми Origin 6.1.

### Результати та їх обговорення

На початку роботи дослідили закономірності росту *C. limicola* за наявності в середовищі різних концентрацій  $\text{CO}_2$  та донора електронів  $\text{Na}_2\text{S}$ , а також використання ним натрію пірувату і натрію ацетату. Початковий рівень діоксиду вуглецю та натрію сульфід у вихідному середовищі забезпечують утворення відносно невеликої біомаси клітин (рис. 1).

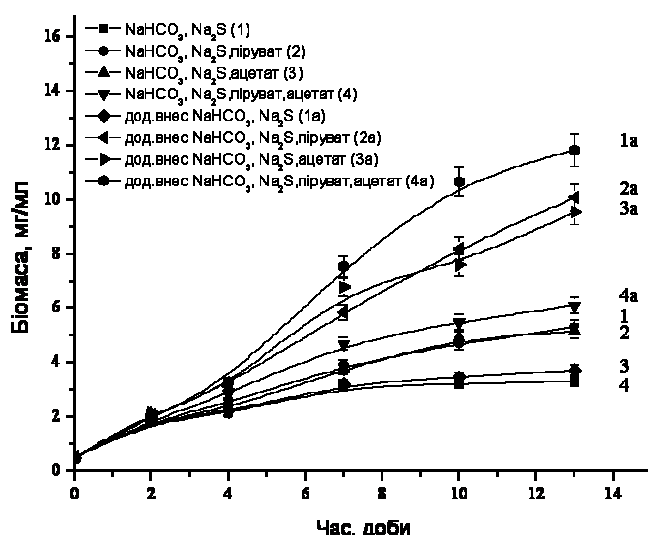


Рис. 1. Ріст *C. limicola* Ya-2002 у середовищі GSB з додатковим внесенням джерел вуглецю і донора електронів

Fig. 1. The growth of *C. limicola* Ya-2002 in the medium GSB with addition of carbon sources and electron donor



На сьому добу культивування її максимальний рівень складав приблизно 2,5 мг/мл. Додаткове внесення до середовища натрію пірувату і натрію ацетату сприяло незначному підвищенню рівня біомаси (в 1,3–1,8 раза, відповідно). Одночасне внесення пірувату і ацетату було більш ефективним і сприяло збільшенню біомаси в два рази. Можна припустити, що додавання до середовища ацетату стимулювало реакцію його карбоксилювання і перетворення до пірувату, який в подальшому використовується для синтезу фосфоенолпірувату (ФЕП) — акцептора  $\text{CO}_2$ . Продуктом цієї реакції є оксалоацетат — один із ключових метаболітів відновного циклу трикарбонових кислот, який забезпечує біосинтетичні процеси клітини необхідними метаболітами. З іншого боку, ФЕП є проміжним метаболітом, який використовується для біосинтезу глікогену [15]. В процесі росту *C. limicola* рівень діоксиду вуглецю та натрію сульфід у середовищі постійно знижується [2], тому доцільно було перевірити, як впливає на ріст цих бактерій додаткове внесення джерел вуглецевого живлення і донора електронів. Додаткове внесення цих сполук здійснювали на п'яту та десятю доби культивування для другої половини варіантів. Виявилось (рис. 1), що збільшення концентрацій натрій гідрокарбонату (джерела карбону) і натрій сульфід (донора електронів) помітно не впливало на ріст бактерій (рис. 1, 4а). Однак, якщо разом із додатковим внесенням джерела вуглецю і донора електронів до середовища додавали натрію піруват і натрію ацетат, то біомаса зростала у 3–4 рази (рис. 1, 2а–3а). Таким чином, додаткове внесення до середовища пірувату і ацетату позитивно впливало на біосинтетичні процеси бактерій, що необхідно враховувати при оптимізації середовища для вирощування *C. limicola* Ya-2002. Виходячи з цього, в наступних експериментах бактерії вирощували у середовищі, що містило натрію піруват і натрію ацетат.

Природа джерел азоту, закономірності їхнього використання та вплив на утворення глікогену описані лише для одного представника *Chlorobiaceae* — *C. thiosulfatophylum* [12]. В наступному експерименті дослідили здатність *C. limicola* Ya-2002 використовувати різні джерела азоту (рис. 2). Виявилось, що досліджувані бактерії подібно до *C. thiosulfatophylum* найкраще ростуть у середовищі, що містить солі амонію (амонію хлорид у концентрації  $6,4 \cdot 10^{-3}\text{M}$ , що відповідає складу середовища GSB). За наявності амоній хлориду біомаса культури на 14 добу складала 7,7 мг/мл. У середовищі, до якого не вносили жодних джерел азоту, бактерії росли і нагромаджували відносно велику біомасу (рис. 2), що свідчить, очевидно, про здатність *C. limicola* Ya-2002 фіксувати атмосферний азот. Ця властивість широко розповсюджена серед представників *Chlorobiaceae* [5, 12, 16]. У середовищі з нітратами помітного росту клітин не спостерігалось (рис. 2), що свідчить про те, що *C. limicola* не використовують нітрати як джерело азотного живлення. А оскільки ці бактерії здатні до азотфіксації (в середовищі без додавання джерел азоту спостерігався доволі значний ріст, приблизно 80% від контролю), то з цього випливає, що нітрати не тільки не використовуються як джерело азоту, а й інгібують використання інших форм азоту, в тому числі й молекулярного. Крім солей амонію бактерії добре використовують амінний азот. У середовищі з аспарагіном біомаса клітин була лише на 30% меншою, ніж у середовищі з амонієм.

Крім того, дослідили, як *C. limicola* використовують інші амінокислоти, зокрема фенілаланін, пролін, треонін, триптофан, тирозин, серин та глютамін. Виявилось, що пролін, триптофан і глютамін забезпечували нагромадження приблизно такої ж біомаси, як у середовищі з аспарагіном, а фенілаланін, тирозин, треонін і серин



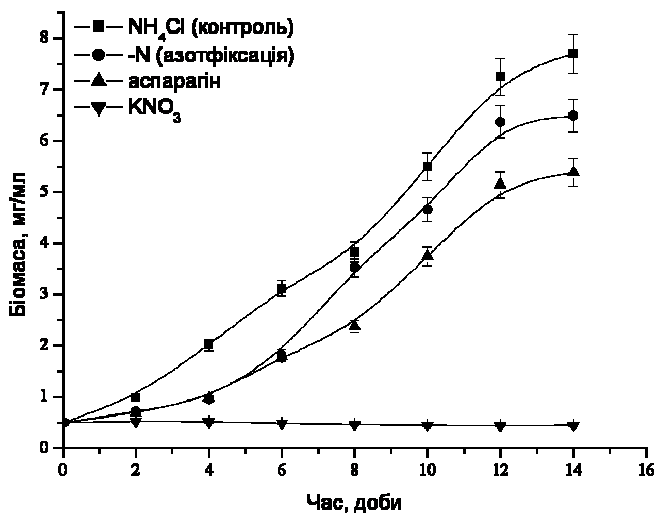


Рис. 2. Ріст *C. limicola* Ya-2002 у середовищах з різними джерелами азоту  
 Fig. 2. The growth of *C. limicola* Ya-2002 in the media with various nitrogen sources

пригнічували ріст культури. Про подібні результати впливу амінокислот на ріст *C. thiosulfatophylum* повідомляли Kelly D.P. et al [13]. Калію нітрат у концентрації 4 mM не засвоювався *C. limicola*.

На рис. 3 представлені дані про ріст *C. limicola* у середовищах з різними джерелами азоту в присутності калію нітрату. У всіх випадках нітрати інгібують ріст бактерій.

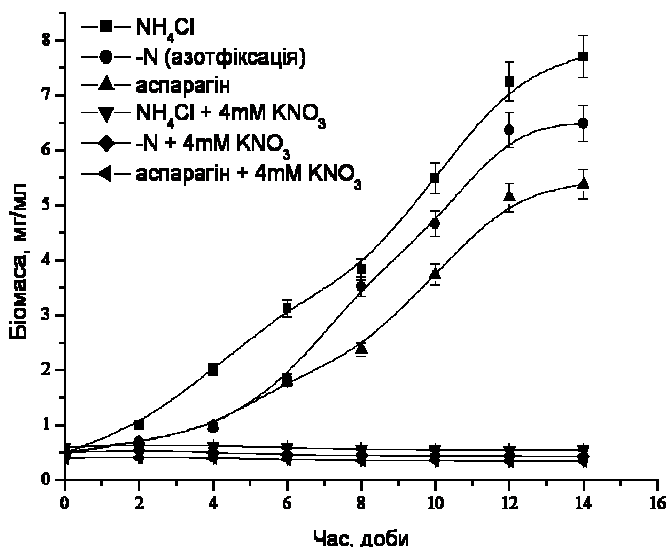


Рис. 3. Нагромадження біомаси *C. limicola* Ya-2002 у середовищах з різними джерелами азоту за наявності нітратів  
 Fig. 3. Biomass accumulation by *C. limicola* Ya-2002 in the media with various nitrogen sources and nitrate addition



Згідно з даними Dietzler D. et al. дефіцит азоту в середовищі стимулює нагромадження глікогену в клітинах *E. coli* [7, 8]. Здатність *C. limicola* Ya-2002 до азотфіксації затрудняє вивчення цього процесу у досліджуваних бактерій.

Тому для дослідження впливу різних джерел азоту на синтез глікогену застосували встановлену нами властивість нітратів інгібувати засвоєння інших форм азоту для створення його дефіциту в клітинах (рис. 3). Експериментально показано, що концентрації нітрату 4мМ і вище практично повністю інгібували ріст культури. При нижчих концентраціях цієї сполуки бактерії нагромаджували незначну біомасу. Концентрацію нітратів 4 мМ (найменшу концентрацію, що інгібувала ріст культури) використовували в подальших експериментах для створення дефіциту азоту.

Відомо, що для більшості бактерій, які синтезують глікоген, найвищий рівень його в клітинах спостерігається, як правило, у стаціонарній фазі росту. Для встановлення часу культивування, необхідного для максимального нагромадження глікогену в клітинах, використали електронну мікроскопію та визначили ендогенний рівень глікогену. Із електронномікроскопічних фотографій клітин з різних фаз росту (рис. 4) видно, що на 4 добу культивування в клітинах ще не помітно сформованих гранул глікогену.

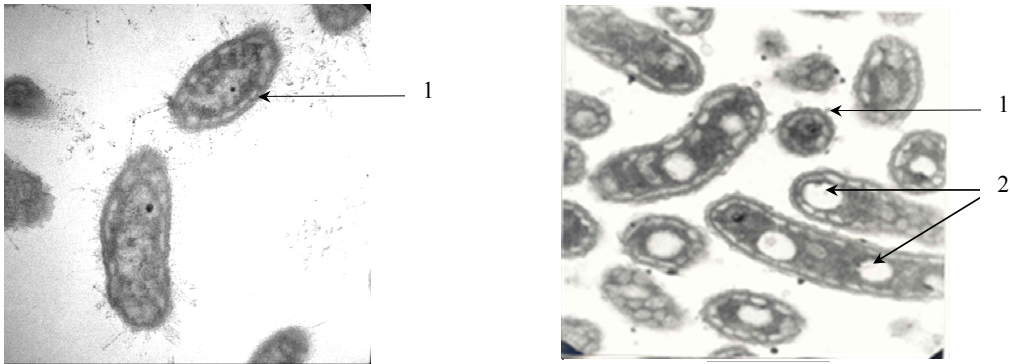


Рис. 4. Електронні мікрофотографії клітин *C. limicola* Ya-2002 ( $\cdot 15000$ ) із логарифмічної та стаціонарної фаз росту  
1 — хлоросоми; 2 — гранули глікогену

Fig. 4. Electrone micrograph of the cells of *C. limicola* Ya-2002 ( $\cdot 15000$ ) from logarithmic and exponential growth phase  
1 — chlorosome; 2 — glycogen granules

Вони є досить чіткими на мікрофотографіях клітин із стаціонарної фази росту. З цими даними узгоджуються результати аналізу вмісту глікогену в клітинах, що приведені на рис. 5. Зростання рівня глікогену в клітинах спостерігається вже на 7 добу культивування і досягає максимуму на 12 добу, після чого рівень глікогену починає знижуватися.

*C. limicola* здатні фіксувати молекулярний азот. Його засвоєння, як було показано вище (рис. 2), повністю інгібується нітратом. Для вивчення впливу дефіциту азоту на синтез глікогену у *C. limicola* Ya-2002 відмиті клітини бактерій інкубували у середовищі GSB, до якого додавали нітрат у концентрації 4 мМ. На рис. 6 показано утворення глікогену відмитими клітинами *C. limicola* Ya-2002. У випадку інкубування клітин з амонійним азотом (рис. 6а) вміст глікогену в них

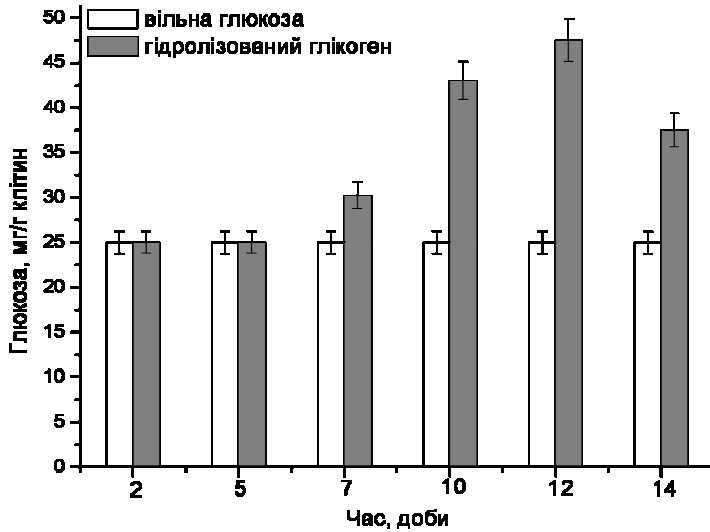


Рис. 5. Нагромадження глікогену у клітинах *C. limicola* Ya-2002

Fig. 5. Intracellular glycogen accumulation by *C. limicola* Ya-2002

після дводобового інкубування (рівень глікогену на другу добу інкубування був максимальним) зростав на 30% порівняно з вихідними клітинами, а додавання нітрату до середовища з амонієм сприяло зростанню вмісту глікогену на 76% порівняно з відмитими вихідними клітинами і на 46% порівняно з клітинами, інкубованими у середовищі з амонієм. Подібні результати отримано з відмитими клітинами, які інкубували у середовищі GSB без азоту (умови азотфіксації) (рис. 6б).

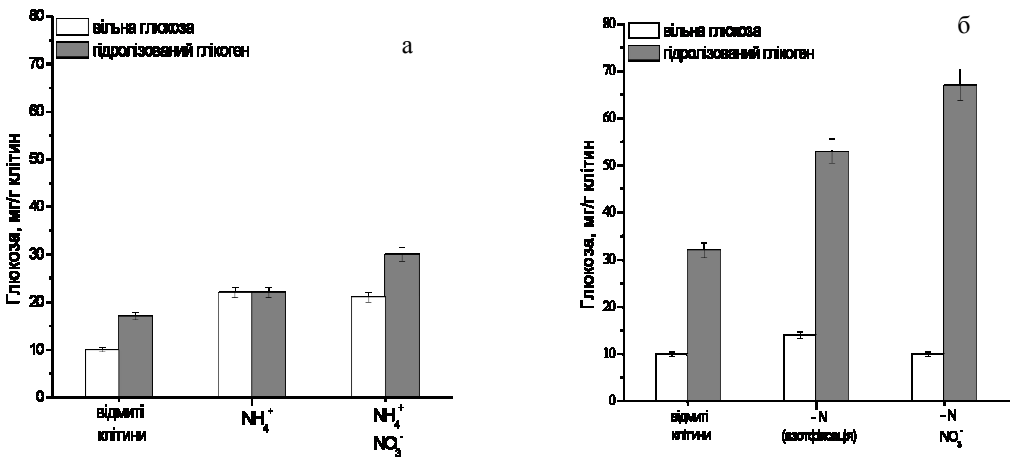


Рис. 6. Рівень вільної глюкози та глікогену у клітинах *C. limicola* Ya-2002 за умов засвоєння амонійної (а), молекулярної форм азоту та дефіциту азоту у середовищі (б)

Fig. 6. Free glucose and glycogen levels in the cells of *C. limicola* Ya-2002 under the conditions of utilization of ammonia (a), molecular nitrogen and nitrogen deficiency of amino group (b)



Інкубування клітин у середовищі без додавання солей амонію (умови азотфіксації) збільшувало рівень внутрішньоклітинного глікогену на 70%, а додавання до такого середовища 4 мМ калію нітрату сприяло зростанню нагромадження глікогену на 120%. Отже, додавання до середовища інгібуючої концентрації нітратів (умови дефіциту азоту) сприяє значній стимуляції нагромадження глікогену в клітинах *C. limicola* Ya-2002 за умов різного забезпечення азотом. Це можна пояснити функціонуванням лише тієї частини відновного ЦТК, що відповідає за перетворення ацетату і пірувату до глюкози і далі — до глікогену.

Таким чином, дослідження впливу різних джерел азоту на ріст і синтез глікогену у клітинах *C. limicola* Ya-2002 показало, що найбільш оптимальним джерелом азоту для росту цих бактерій є солі амонію. Дещо нижчий рівень нагромадження біомаси забезпечував амінний азот аспарагіну, проліну, триптофану і глутаміну. Не всі амінокислоти як джерело азоту були рівноцінними, зокрема тирозин, триптофан фенілаланін і серин інгібували ріст культури. У середовищі без внесення джерела азоту бактерії нагромаджували доволі високу біомасу, що була лише на 16% нижчою, ніж у середовищі з амонієм. Це, очевидно, свідчить про те, що, подібно до інших представників *Chlorobiaceae*, *C. limicola* Ya-2002 здатний фіксувати атмосферний азот. У всіх випадках зниження концентрації азоту в середовищі спостерігається зростання рівня глікогену в клітинах. Нітрати не використовуються як джерело азоту *C. limicola*, а в концентрації 4 мМ і більше інгібують засвоєння інших форм азоту. Ця властивість нітратів може бути використана для вивчення механізмів регуляції біосинтезу глікогену в клітинах *C. limicola* Ya-2002.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Гончар М.В. Чутливий метод кількісного визначення пероксиду водню та субстратів оксидаз у біологічних об'єктах // Укр. біохім. журн. — 1998. — Т. 70, № 5. — С. 157–163.
2. Горішний М., Гудзь С., Гнатуш С. Вплив факторів середовища на швидкість використання  $H_2S$  *Chlorobium limicola* // Агроекологічний журнал. — 2007. — № 4. — С. 65–67.
3. 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.
4. 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.
5. Лакін Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
6. 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.
7. Dietzler D., Leckie M., Lais C. Periodic inventory review as a strategy for survival in *Escherichia coli* // JBC. — 1979. — Vol. 254. — P. 8288–8294.
8. Dietzler D., Leckie M., Sternheim W. Regulation of glycogen synthesis and glucose utilization in *Escherichia coli* during maintenance of energy charge // JBC. — 1979. — Vol. 254. — P. 8276–8287.
9. Eisen J.A., Nelson K.E. et al. The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 99, № 14. — P. 9509–9514.
10. Frigaard N., Chew A., Li H., Maresca J. A., Bryant D.A. *Chlorobium tepidum*: insights into the structure, physiology, and metabolism of a green sulfur bacterium derived from the complete genome sequence // *Photosynthesis Research*. — 2003. — Vol. 78. — P. 93–117.





11. Hara F., Akazawa T., Kojima K. Glycogen biosynthesis in *Chromatium* strain D: I. Characterization of glycogen // *Plant and Cell Physiology*. — 1973. — V. 14, N. 4. — P.737–745.
12. Heda G.D., Madigan M.T. Aspects of nitrogen fixation in *Chlorobium* // *Arch Microbiol*. — 1986. — Vol. 143. — P. 330–336.
13. Kelly P.D. Growth and metabolism of the obligate photolithotroph *Chlorobium thiosulfatophilum* in the presence of added organic nutrients // *Arch Microbiol*. — 1974. — Vol. 100. — P. 163–178.
14. Overmann J. Green sulfur bacteria // *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*, 2nd edn. V. 1 / Eds. Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. New York, Berlin, Heidelberg: Springer, 2001. — P. 601–605.
15. Reidun Sireveg. Carbon Metabolism in Green Bacteria / eds. Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. Anoxygenic photosynthetic bacteria: Kluwer academic publishers, 1995. — P. 871–883.
16. Rodionov Y.V., Lebedeva N.V., Kondratieva E.N. Ammonia inhibition of nitrogenase activity in purple and green bacteria // *Arch Microbiol*. — 1986. — Vol. 143. — P. 345–347.
17. Truper H.G., Schlegel H.G. Sulphur metabolism in Thiorhodaceae. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // *Antonie van Leewenhock*. — 1964. — Vol. 30. — P. 225–238.

О.В. Левицька, М.Б. Горішний, С.П. Гудзь

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,  
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина, e-mail: o\_levytska@yahoo.com

## ВЗАИМОСВЯЗЬ АЗОТНОГО ПИТАНИЯ И ОБРАЗОВАНИЯ ГЛИКОГЕНА В КЛЕТКАХ *CHLOROBIVM LIMICOLA*

### Реферат

Исследована способность зеленых серных бактерий *Chlorobium limicola* Ya-2002 ассимилировать разные источники азота. *Chlorobium* утилизирует аммонийный, аминный и молекулярный азот. Аммоний оказался наиболее доступным источником азота. Некоторые аминокислоты L-конформации, включая аспарагин, пролин, триптофан и глутамин, стимулировали рост бактерий, в то время, как фенилаланин, серин, тирозин и треонин угнетали его. Нитраты не усваиваются *C. limicola* и ингибируют поглощение других форм азота. Дефицит аммония и/или нитраты в среде стимулируют накопление гликогена в клетках.

К л ю ч е в ы е с л о в а : зеленые серные бактерии, *Chlorobium limicola*, азотфиксация, гликоген, источники азота.





O.V. Levytska, M.B. Gorishniy, S.P. Gudz

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Grushevskiy str., Lviv, 79005, Ukraine,  
e-mail: o\_levytska@yahoo.com

## INTERRELATION OF NITROGEN NUTRITION AND GLYCOGEN ACCUMULATION IN THE CELLS OF *CHLOROBBIUM LIMICOLA*

### Summary

Ability of green sulfur bacteria *Chlorobium limicola* Ya-2002 to assimilate various nitrogen sources was investigated. It was shown that *Chlorobium* utilize nitrogen of ammonium, amino group and fixes molecular nitrogen. Nitrogen of ammonium was found to be the most suitable for these bacteria. Addition of several amino acids of L-conformation including asparagine, proline, tryptophane and glutamine as nitrogen sources substantially increased the growth rate of *C. limicola*. On the other hand phenylalanine, serine, tyrosine and threonine inhibited the growth of bacteria. We also showed that nitric acid salts could not be used as nitrogen source by *C. limicola* and inhibited uptake of other nitrogen forms. We showed that ammonia deficiency and/or nitrate addition to the medium stimulate the intracellular glycogen accumulation.

**Key words:** green sulfur bacteria, *Chlorobium limicola*, nitrogen fixation, glycogen, nitrogen sources.

