

**І.В. Кушкевич, С.О. Гнатуш**

Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна,  
тел.: +38 (096) 107 42 39, e-mail: Ivan\_Kushkevych@ukr.net

## **ПІГМЕНТИ ФОТОСИНТЕЗУВАЛЬНИХ ЗЕЛЕНИХ СІРКОБАКТЕРІЙ *CHLOROBIVM LIMICOLA* YA-2002 ЗА ВПЛИВУ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ**

*Досліджено вплив солей важких металів на пігментний склад фототрофних зелених сіркобактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002. Показано, що внесення  $CdSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $Pb(NO_3)_2$  чи  $CuSO_4$  у середовище знижує вміст фотосинтезувальних пігментів у клітинах *C. limicola* Ya-2002. Встановлено, що найменша кількість пігментів у клітинах бактерій є за внесення у середовище 2,5 мМ солей важких металів.*

*Ключові слова: фотосинтезувальні пігменти, фототрофи, зелені сіркобактерії, *Chlorobium limicola* Ya-2002, важкі метали.*

Фотосинтезувальні зелені сіркобактерії родини *Chlorobiaceae* поширені в безкисневих ділянках озера Яворівське [2]. Завдяки їхній життєдіяльності токсичний сірководень, який утворюється сірко- та сульфатвідновлювальними бактеріями [7], використовується як донор електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу [1, 2].

У зелених сіркобактерій частина пігментів локалізується безпосередньо у цитоплазматичній мембрані, а частина — в особливих структурах — хлоросомах [14]. Вони розміщуються біля цитоплазматичної мембрани. Процес утворення і форма такого фотосинтезувального апарату залежать від умов культивування бактерій [9].

Відомо, що основними пігментами цих мікроорганізмів є бактеріохлорофіли *c* і *d* [1, 2, 14]. Крім того, всі фототрофні бактерії містять каротиноїди, склад яких у різних видів неоднаковий. У зелених сіркобактерій основним каротиноїдом є хлоробактин. Крім того, вони синтезують ізореніератин. Від складу та співвідношення пігментів залежить забарвлення бактерій [1, 2].

Результати аналізу вмісту у воді іонів важких металів, зокрема  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  та  $Cu^{2+}$  протягом кількох останніх років показали їх швидке нагромадження у придонних відкладах, що призводить до порушень функціонування мікробіоценозів [5].

Відомо, що іони важких металів у концентрації 1–2 мМ негативно впливають на клітини мікроорганізмів [3]: порушують фотосинтез, ціліс-



ність мембран, процеси трансляції [12], структуру та функціонування багатьох ферментів [5, 7].

Вплив солей важких металів на аноксигенні зелені фотосинтезувальні сіркобактерії, зокрема на пігментний вміст, не вивчено.

Метою нашої роботи було дослідити вміст фотосинтезувальних пігментів зелених сіркобактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002 за впливу різних концентрацій  $\text{CdSO}_4$ , або  $\text{ZnSO}_4$ , або  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  чи  $\text{CuSO}_4$ .

### Матеріали і методи

Фототрофні зелені сіркобактерії *Chlorobium limicola* Ya-2002 виділені й ідентифіковані на кафедрі мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка [2].

Бактерії вирощували 10 діб за анаеробних умов при температурі  $+25$ – $+28$  °C у середовищі GSB (Green Sulfur Bacteria) [14]. Освітлення при вирощуванні зелених сіркових бактерій було цілодобовим, забезпечувалося лампою розжарювання потужністю 60 Вт. Інтенсивність світла становила 40 лк [2]. Крім того, використовували червоні світлофільтри, які пропускали світло оптимальної для даних бактерій довжини хвилі. Значення рН середовища було нейтральним (рН 7,0) [14].

З метою дослідження здатності фотосинтезувальних сіркобактерій до росту в присутності солей важких металів до середовища вносили різні концентрації (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 та 2,5 мМ)  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  чи  $\text{CuSO}_4$ .

Для одержання екстракту пігментів клітини зелених сіркобактерій відмивали від середовища ізотонічним розчином натрій хлориду, центрифугували 30 хв при 8000 об/хв. Надосадкову рідину зливали, а одержану пастоподібну біомасу тонким шаром наносили на поверхню скла і висушували за температури  $+40$  °C. Висушені клітини руйнували розтиранням із кварцовим піском [6, 10].

Екстракцію пігментів проводили сумішшю етанолу та ацетону в об'ємному співвідношенні 1:1 до повного знебарвлення осаду. Одержані екстракти використовували для реєстрації спектрів поглинання [6].

Розділення суміші пігментів на окремі компоненти проводили хроматографічно з використанням силуфолових пластинок ("Sorbfil", Росія) у висхідному потоці системи розчинників бензин : ацетон : петролейний ефір : гексан в об'ємному співвідношенні 10:10:3:10 [6, 10, 15].

Ідентифікацію пігментів проводили за забарвленням, величинами  $R_f$  та основними максимумами поглинання при відповідній довжині хвилі [13, 15].

Спектри поглинання екстрагованих пігментів фототрофних сіркобактерій записували у діапазоні довжин хвиль від 350 до 900 нм на реєструвальному двопробеновому спектрофотометрі "Specord M-40".

Концентрації основних пігментів пурпурових та зелених сіркобактерій розраховували за формулою:



$$C = \frac{D}{E \cdot l}$$

де  $C$  — концентрація пігменту, г/л;

$D$  — оптична густина розчину;

$E$  — питомий коефіцієнт екстинкції відповідного пігменту ( $E_{\text{кар}}$  — 271,8 при 474 нм,  $E_{\text{бхл}}$  — 930,0 при 770 нм), л · (г · см)<sup>-1</sup>;

$l$  — товщина поглинаючого шару, см, ( $l=0,3$  см).

Вміст пігментів з розрахунку на 1 г сухої ваги клітин обчислювали за формулою:

$$A = \frac{C \cdot V \cdot K}{H}$$

де  $A$  — кількість пігменту на 1 г сухої ваги клітин, мг/г;

$C$  — концентрація пігменту, г/л;

$V$  — об'єм екстракту, мл;

$H$  — наважка клітин, г;

$K$  — відношення об'єму елюату до об'єму розчину, нанесеного на хроматограму [6].

Вираховували основні статистичні показники за безпосередніми даними (середнє арифметичне —  $M$ ; стандартна похибка середнього арифметичного —  $m$ ). Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних, обраховували коефіцієнт Ст'юдента [4]. Достовірною вважалася різниця при показнику достовірності  $P > 0,95$ . Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програми Excel та Origin.

### Результати та їх обговорення

Хроматографічне розділення компонентів екстрактів клітин *C. limicola* Ya-2002 дало змогу виявити пігменти різні за забарвленням та величиною  $R_f$  (див. таблицю).

Таблиця

Пігментний склад фотосинтезувальних зелених сіркобактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002

Table

Pigments composition of photosynthetic green sulfur bacteria *Chlorobium limicola* Ya-2002

Пігмент	Колір пігменту	Максимум поглинання, λ, нм	Значення $R_f$
Бактеріохлорофіл <i>c</i>	Темно-зелений	356, 384, 668	0,43
Бактеріохлорофіл <i>d</i>	Світло-зелений	408, 654, 608	0,61
Хлоробактин	Яскраво-жовтий	430	0,89
Ізоренієратин	Коричнево-рожевий	466	0,84



За впливу різних концентрацій  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  у розчині екстрагованих пігментів з клітин *C. limicola* Ya-2002 основні максимуми поглинання спостерігали при 356, 384, 408, 430, 466, 608, 654, 668 нм, що підтверджує наявність бактеріохлорофілів *c*, *d* і каротиноїдів — ізоренієратину та хлоробактину (рис. 1).

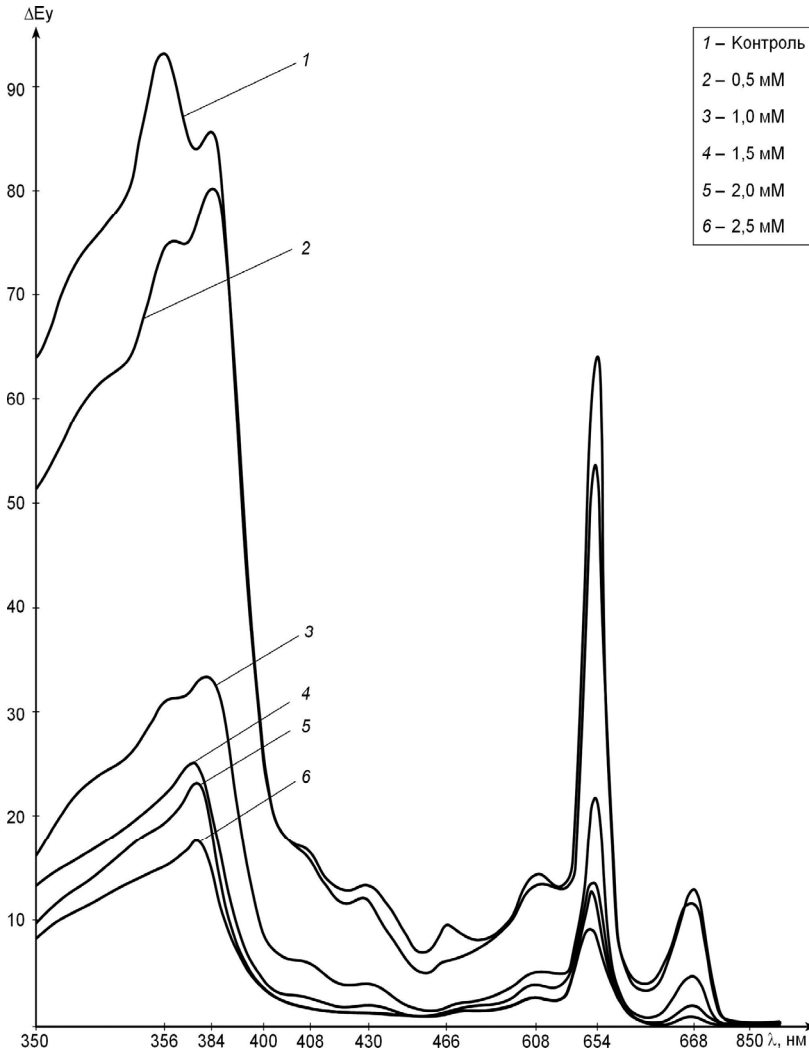


Рис. 1. Спектри поглинання пігментів *Chlorobium limicola* Ya-2002, вирощених за впливу  $\text{CuSO}_4$

Fig. 1. Absorption spectra of *Chlorobium limicola* Ya-2002 pigments grown under the influence of  $\text{CuSO}_4$

Дослідження спектрів поглинання та хроматографічний розподіл дозволили підтвердити наявність досліджуваних [10, 13] пігментів і визначити їхній вміст у клітинах бактерій *C. limicola* Ya-2002, вирощених за різних концентрацій солей важких металів.

Як видно з рис. 2, на хроматограмах переважали темно-зелені, світло-зелені, коричнево-зелені, яскраво-жовті та коричнево-рожеві ділянки.

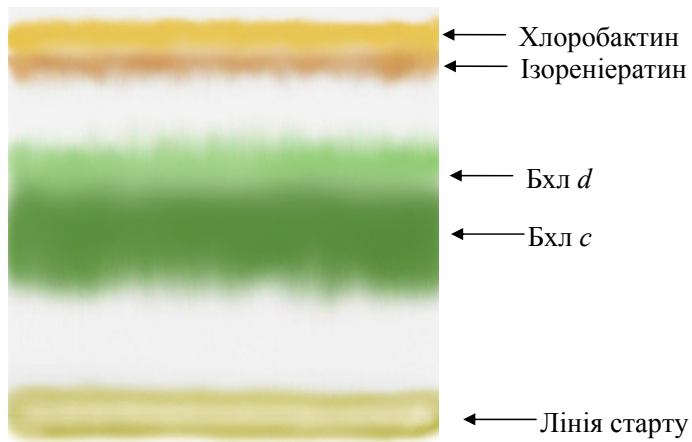


Рис. 2. Хроматографічне розділення фотосинтезувальних пігментів клітин *Chlorobium limicola* Ya-2002, вирощених у середовищі GSB

Fig. 2. Chromatographic separation of the photosynthetic pigments of *Chlorobium limicola* Ya-2002 cells grown in GSB medium

Досліджували кількісні зміни пігментного складу за впливу солей важких металів. Під час росту в середовищі без внесення солей металів вміст фотосинтезувальних пігментів у клітинах *C. limicola* Ya-2002 був найвищим. У клітинах бактерій визначена більша кількість бактеріохлорофілів *c* та *d*, значно менше — каротиноїдів (рис. 3–6).

Внесення солі Кадмію у середовище культивування спричинило суттєве зменшення кількості фотосинтезувальних пігментів у клітинах бактерій *C. limicola* Ya-2002. За найвищої досліджуваної концентрації  $\text{CdSO}_4$  кількість бактеріохлорофілів *c* та *d* зменшилася відповідно на 20% та 23%, порівняно з контролем. Вміст хлоробактину та ізоренієратину за цих умов зменшився, відповідно, на 23% та 33%, порівняно з вмістом цих пігментів у клітинах контрольного варіанту (рис. 3).

Відомо, що кадмій сульфат у концентрації 50 мг/дм<sup>3</sup> спричиняє зникнення забарвлення бактерій *Pseudomonas aeruginosa* [8]. Очевидно, іони Кадмію включаються у структуру фотосинтезувальних пігментів, наслідком чого є пригнічення їх функції та зменшення кількості.

За внесення  $\text{ZnSO}_4$  у середовище також відмітили зменшення кількості пігментів у клітинах зелених сіркобактерій *C. limicola* Ya-2002, порівняно з контролем. Збільшення концентрації солі металу до 2,5 мМ призвело до зменшення вмісту бактеріохлорофілів *c* та *d*, відповідно, на 33% та 32%, порівняно з контролем. Вміст хлоробактину та ізоренієратину

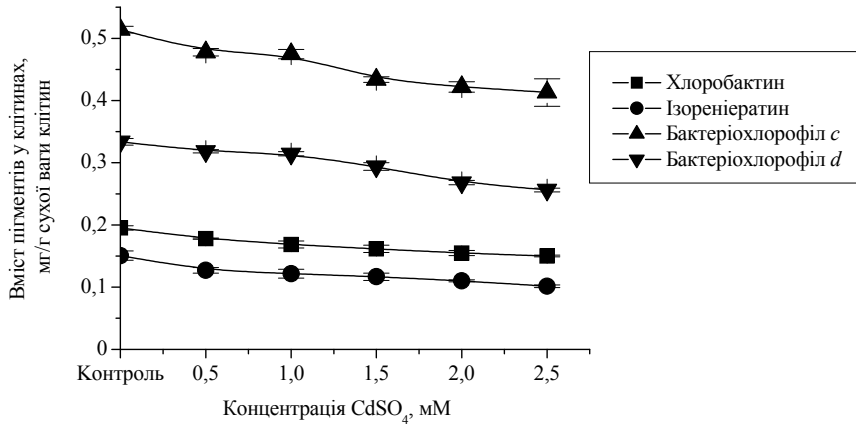


Рис. 3. Вміст фотосинтезувальних пігментів у клітинах *Chlorobium limicola* Ya-2002 за впливу різних концентрацій CdSO<sub>4</sub>

Fig. 3. Content of photosynthetic pigments in the cells of *Chlorobium limicola* Ya-2002 under the influence of different CdSO<sub>4</sub> concentrations

вже зменшився за внесення 0,5 мМ ZnSO<sub>4</sub> (рис. 4). Найбільший вплив виявляв цинк сульфат у концентрації 2,5 мМ, що, можливо, обумовлено здатністю Zn<sup>2+</sup> конкурувати з Mg<sup>2+</sup> за активний центр у молекулі бактеріохлорофілів [9].

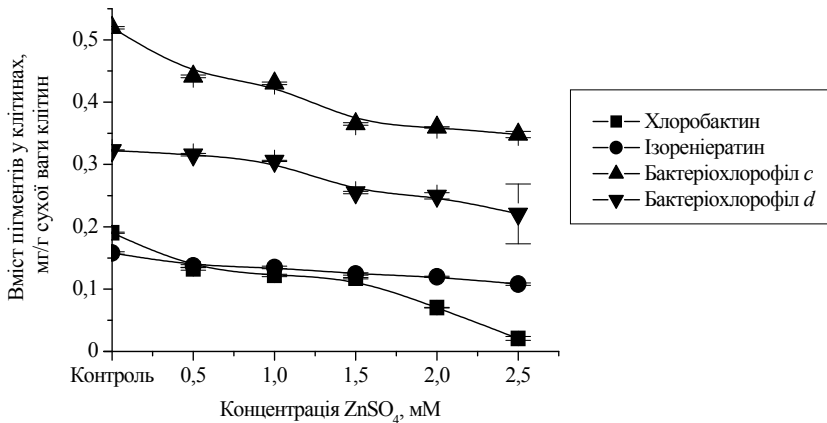


Рис. 4. Вміст фотосинтезувальних пігментів у клітинах *Chlorobium limicola* Ya-2002 за впливу різних концентрацій ZnSO<sub>4</sub>

Fig. 4. Content of photosynthetic pigments in the cells of *Chlorobium limicola* Ya-2002 under the influence of different ZnSO<sub>4</sub> concentrations

За впливу 2,5 мМ плумбум нітрату кількість бактеріохлорофілів c та d зменшилася відповідно на 7% та 25%, порівняно з контролем. За цих умов зменшувався вміст хлоробактину та ізоренієратину відповідно

на 53% та 28%, порівняно з контролем (рис. 5). Можливо, така дія  $Pb^{2+}$  зумовлена негативним впливом на плазматичну мембрану, що у свою чергу зв'язана із фотосинтезуючим апаратом.

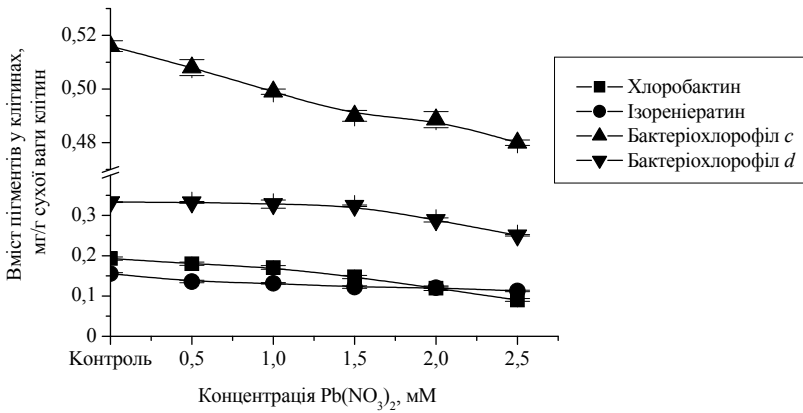


Рис. 5. Вміст фотосинтезувальних пігментів у клітинах *Chlorobium limicola* Ya-2002 за впливу різних концентрацій  $Pb(NO_3)_2$

Fig. 5. Content of photosynthetic pigments in the cells of *Chlorobium limicola* Ya-2002 under the influence of different  $Pb(NO_3)_2$  concentrations

Купрум сульфат також суттєво зменшував вміст фотосинтезувальних пігментів у клітинах *C. limicola* Ya-2002. Внесення 2,5 мМ солі Купруму спричинило зменшення вмісту бактеріохлорофілів c та d відповідно на 31% та 27%, порівняно з контролем. Кількість каротиноїдів у клітинах *C. limicola* Ya-2002 за цих умов зменшувалась подібно до вмісту бактеріохлорофілів (рис. 6).

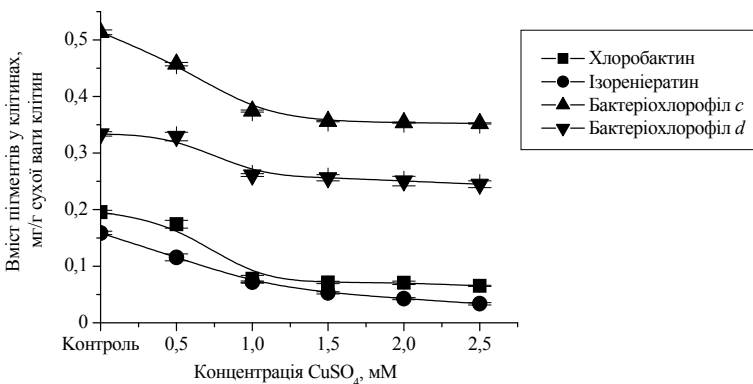


Рис. 6. Вміст фотосинтезувальних пігментів у клітинах *Chlorobium limicola* Ya-2002 за впливу різних концентрацій  $CuSO_4$

Fig. 6. Content of photosynthetic pigments in the cells of *Chlorobium limicola* Ya-2002 under the influence of different  $CuSO_4$  concentrations



Припускаємо, що подібно до інших іонів металів,  $\text{Cu}^{2+}$  проникає у клітину і входить до складу життєвоважливих молекул, включаючи пігменти, викликаючи їх дезактивацію [11].

Таким чином, за умов росту *C. limicola* Ya-2002 у середовищі зі солями важких металів зменшується кількість фотосинтезувальних пігментів у клітинах бактерій, що, очевидно, призводить до пригнічення фотосинтезу. На основі результатів наших досліджень побудували узагальнюючу схему впливу солей важких металів на вміст пігментів у клітинах *C. limicola* Ya-2002:

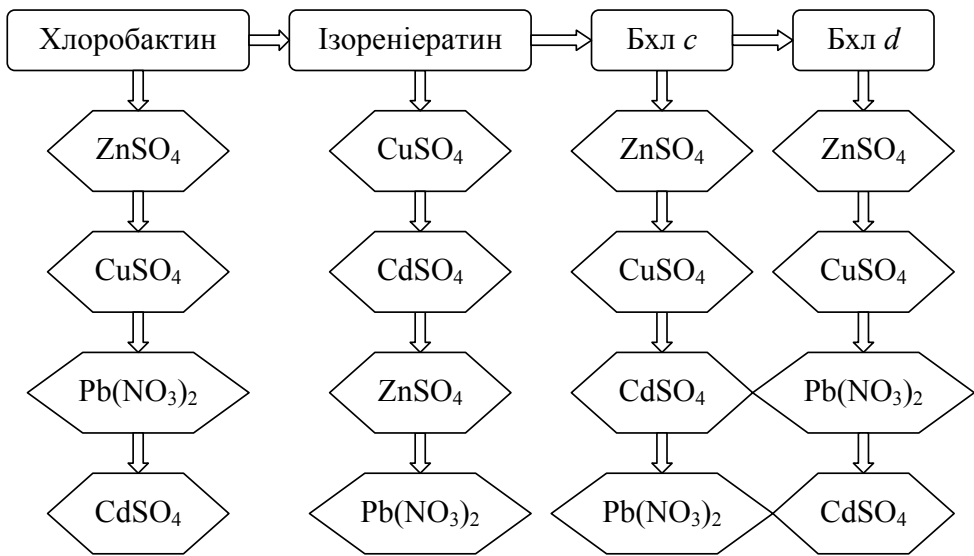


Рис. 7. Узагальнююча схема впливу солей важких металів на вміст пігментів клітин *C. limicola* Ya-2002

Fig. 7. The generalized scheme of the influence of heavy metals salts on the pigments content of *C. limicola* Ya-2002 cells

У клітинах *C. limicola* Ya-2002 за впливу 2,5 мМ кадмій сульфату вміст хлоробактину та бактеріохлорофілу *d* знизився на 23%, а бактеріохлорофілу *c* та ізоренієратину — на 20 і 33%, відповідно. За таких умов плумбум нітрат інгібував синтез клітинами бактеріохлорофілу *d* та ізоренієратину на 25–28%, а бактеріохлорофілу *c* та хлоробактину — на 7 і 53%, порівняно з контролем. Внесення 2,5 мМ  $\text{ZnSO}_4$  спричинило зниження вмісту ізоренієратину та бактеріохлорофілів на 32–33%, а хлоробактину на 89%. Найвища концентрація (2,5 мМ) купрум сульфату по-різному пригнічувала синтез пігментів: хлоробактину — на 67%, ізоренієратину — на 79%, бактеріохлорофілів *d* і *c* — на 27–31%, порівняно з контролем.



## ЛІТЕРАТУРА

1. Баран І.М., Кушкевич І.В., Гнатуш С.О., Гудзь С.П. Систематичне положення, фізіолого-біохімічні властивості та екологія зелених фототрофних бактерій // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. — 2007. — Вип. 43. — С. 48–60.
2. Горішний М.Б. Екологічне значення зелених сіркових бактерій в утилізації сірководню: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2008. — 20 с.
3. Кушкевич І.В. Вплив солей важких металів на фізіолого-біохімічні характеристики бактерій циклу сірки: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2010. — 20 с.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
5. Мороз О.М., Гудзь С.П., Подопрігора О.І. та ін. Вплив важких металів на ріст та відновлення сульфатів *Desulfovibrio desulfuricans* // Наук. вісн. Ужгор. ун-ту. Сер. Біол. — 2009. — Вип. 26. — С. 193–202.
6. Мусієнко М.М. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин. — К.: Фітосоціоцентр, — 2001. — 200 с.
7. Перетятко Т.Б. Екологічне значення сульфатвідновлювальних бактерій штучних водойм (на прикладі Яворівського родовища сірки): Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., — 2007. — 20 с.
8. Рильський О.Ф. Реакція пігментсинтезуючих бактерій *Pseudomonas fluorescens* та *Pseudomonas aeruginosa* на дію важких металів // Актуальні питання біології, екології та хімії. — 2009. № 1. — С. 47–51.
9. Blankership R.E. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Advances in Photosynthesis. — USA, 1995. — 1368 p.
10. Britton G. General carotenoid methods. Methods in enzymology. — London: Academic press, 1985. — Vol. 3, Part B. — P. 113–145.
11. Brown N.L. Copper resistance determinants in bacteria // Plasmid. — 1992. — № 27. — P. 41–51.
12. Gadd G.M. Metals and microorganisms: a problem of definition // FEMS Microbiol. Letts. — 1992. — № 10. — P. 197–204.
13. Oelze J.M. Analysis of bacteriochlorophylls // Meth. microbiol. — 1985. — Vol. 18. — P. 257–284.
14. Overmann J. Green sulfur bacteria. — New York: Springer-Verlag, 1999. — P. 245–256.
15. Spectrochromatography of photosynthetic pigments as fingerprinting technique for microbial phototrophs / Frigard et al. FEMS Microbiol. Ecol., 1996. — № 20. — P. 69–77.

**І.В. Кушкевич, С.А. Гнатуш**

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,  
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина,  
тел.: +38 (096) 107 42 39, e-mail: Ivan\_Kushkevych@ukr.net

**ПИГМЕНТЫ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ЗЕЛЕННЫХ  
СЕРОБАКТЕРИЙ *CHLOROBIVM LIMICOLA* YA-2002  
ПОД ВЛИЯНИЕМ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ**

**Реферат**

Исследовано влияние солей тяжелых металлов на пигментный состав фототрофных зеленых серобактерий *Chlorobium limicola* Ya-2002. Определено, что внесение  $CdSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $Pb(NO_3)_2$  или  $CuSO_4$  в среду снижает содержание фотосинтезирующих пигментов в клетках *C. limicola* Ya-2002. Установлено, что наименьшее количество пигментов в клетках бактерий наблюдается при внесении в среду 2,5 мМ солей тяжелых металлов.

**К л ю ч е в ы е с л о в а :** фотосинтезирующие пигменты, фототрофы, зеленые серобактерии, *Chlorobium limicola* Ya-2002, тяжелые металлы.

**I.V. Kushkevych, S.O. Hnatush**

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevsky str., Lviv, 79005, Ukraine,  
tel.: +38 (096) 107 42 39, e-mail: Ivan\_Kushkevych@ukr.net

**PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS OF GREEN SULFUR  
BACTERIA OF *CHLOROBIVM LIMICOLA* YA-2002 UNDER  
THE INFLUENCE OF HEAVY METALS SALTS**

**Summary**

The influence of heavy metals salts on the pigment composition of phototrophic green sulfur bacteria *Chlorobium limicola* Ya-2002 has been studied. It was shown that the introduction of  $CdSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $Pb(NO_3)_2$  or  $CuSO_4$  in the medium reduces the content of pigments in cells photosynthetic *C. limicola* Ya-2002. It is established that the least amount of pigment is in the bacteria cells in the medium under the introducing 2.5 mM of heavy metals salts.

**К e y w o r d s :** photosynthetic pigments, phototrophs, green sulfur bacteria, *Chlorobium limicola* Ya-2002, heavy metals.

