

УДК 579. 266/68 (474)

## ВПЛИВ ФАКТОРІВ СЕРЕДОВИЩА НА РІСТ І УТВОРЕННЯ ПОЛІСАХАРИДУ *CHLOROBIVM LIMICOLA*

М.Б. Горішний, С.П. Гудзь, А.М. Федорович

**Вплив факторів середовища на ріст і утворення полісахариду *Chlorobium limicola*.** –Горішний М.Б., Гудзь С.П., Федорович А.М.. – Зелені сіркобактерії *Chlorobium limicola* ефективно використовують сірководень в процесі фотосинтезу. В присутності клітин бактерії утилізація сірководню протікала в 6-8 разів швидше. Зростання інтенсивності освітлення і концентрації вуглекислоти в середовищі стимулювало утворення біомаси. В клітинах *Chlorobium limicola* виявлено полісахарид, його утворення в клітинах стимулюється одночасним збільшенням концентрації вуглекислоти в середовищі і зростанням інтенсивності освітлення культури. Серед продуктів гідролізу полісахариду виявлена лише глюкоза.

**Ключові слова:** зелені сіркобактерії, сірководень, полісахарид.

**Адреса:** Львівський національний університет ім. Івана Франка, вул. Грушевського 4, м. Львів, 79005, Україна

**E-mail:** vishko@ukr.net

**Influence of the environmental factors on the growth and formation of polysaccharide *Chlorobium limicola*.** –Horishniy M.B., Gudz S.P., Fedorovich A. M.. – Green sulphuretted bacteria *Chlorobium limicola* effectively use hydrogen sulfide in the process of photosynthesis. In the presence of the cells of the bacteria utilization of hydrogen sulfide appeared to be 6-8 times faster. Increase in light intensity and concentration of carbonic acid in the environment stimulated the formation of a biomass. In the cells of *Chlorobium limicola* there has been noticed polysaccharide, the formation of which is stimulated by the simultaneous increase of carbonic acid concentration in the environment and lighting intensity of a crop culture. Among the products of polysaccharide hydrolysis there has been traced only glucose.

**Key words:** green sulphuretted bacteria, hydrogen sulfide, polysaccharide.

**Address:** Ivan Franco National University in Lviv, 4, Hrushevskogo st., Lviv, 79005, Ukraine

**E-mail:** vishko@ukr.net

Фототрофні мікроорганізми здійснюють перетворення енергії світла в біохімічну енергію [1,4]. Ці організми мають лише одну фотосистему першого типу, в результаті чого вони не здатні використовувати воду в якості первинного донора електронів [2]. Замість води, зелені сіркобактерії використовують відновлені сполуки сірки або молекулярний водень, тому в процесі фотосинтезу вони не утворюють кисню [7].

Фотоасиміляція вуглекислоти цими мікроорганізмами здійснюється завдяки функціонуванню у них відновного циклу трикарбонових кислот [2, 3]

Зелені сіркобактерії - це єдина група фототрофних мікроорганізмів, які не містять дихального апарату, внаслідок цього вони є унікальним об'єктом для дослідження бактеріального фотосинтезу [2, 9].

Метою цієї роботи було дослідження впливу інтенсивності освітлення та концентрації вуглекислоти в середовищі на процес нагромадження ендогенних цукрів та на швидкість утилізації сірко-

водню зеленими сіркобактеріями *Chlorobium limicola* у процесі фотосинтезу.

### Матеріали та методи досліджень

У дослідах використовували культуру зелених сіркових бактерій *Chlorobium limicola*, виділену з водойм Яворівського сіркового родовища. Культуру вирощували в анаеробних умовах, в рідкому середовищі ван Ніля протягом 8-10 діб при температурі 24-25°C і постійному освітленні променями з довжиною хвилі від 700 до 800 нм. Визначення біомаси бактерій проводили фотоелектроколориметрично ( $\lambda = 450$  нм, довжина оптичного шляху 3 мм, ФЕК – 2 МП – УХЛЧ 4. 2)

Кількість сірководню визначали йодометрично [5].

Осадження полісахариду з клітин проводили концентрованим (99,5%) розчином ацетону. Полісахарид очищали від низькомолекулярних сполук діалізом проти дистильованої води. Гідроліз полі-

сахариду проводили 10Н Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Кількісне визначення вмісту глюкози здійснювали за методом Шомоді -Нельсона [5]. Хроматографічний аналіз вуглеводного складу полісахариду проводили після його гідролізу в системі бутанол - вода (4:5). В якості носія було використано хроматографічний папір (Ленінградський середній 20\*50). Цукри на хроматограмах виявляли завдяки їх обробленню сумішшю 2%-ного розчину трифенілтетразолійхлориду і 1Н розчину NaOH у співвідношенні 1:1.

### Результати досліджень та їх обговорення

Зелені сіркобактерії здатні в процесі росту нагромаджувати в підвищеній кількості деякі метаболіти [6,10] , серед яких найчастіше зустрічають-

ся полісахариди. Ці сполуки можуть нагромаджуватись у клітині або виділятись у культуральну рідину [7, 2]. Щоб перевірити здатність *Chlorobium limicola* утворювати полісахариди , ми провели їх екстракцію з клітин . Встановлено, що після екстрагування в пробірках появлялась значна кількість осаду , його гідролізували і отриманий гідролізат розділяли за допомогою хроматографії на папері (рис. 1). В якості свідків використовували глюкозу, ксилулозу, рамнозу і галактозу. Після оброблення хроматограм сумішшю трифенілтетразолійхлориду і NaOH була виявлена лише одна пляма, яка повільно рухалась в системі бутанол-вода і за величиною Rf була ідентична глюкозі (рис. 1), (табл. 1).

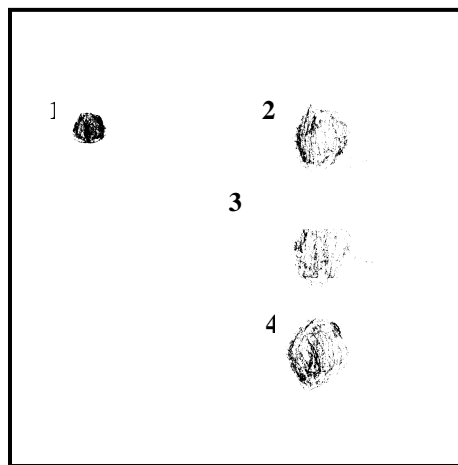


Рис.1. Хроматографічне розділення гідролізату полісахариду *Chlorobium limicola*, 1-гідролізат, 2-глюкоза, 3-ксилулоза, 4-рамноза.

Таблиця 1. Значення величини Rf для моносахаридів і продуктів гідролізу полісахариду.

Свідки	Rf
Гідролізат	0,082
Глюкоза	0,084
Ксилулоза	0,150
Рамноза	0,264
Галактоза	0,175

Ці результати дозволяють зробити висновок, що полісахарид, присутній в клітинах, є поліглюкозидом і, очевидно, запасною речовиною у *Chlorobium limicola*. Він утворюється внаслідок

інтенсивного проходження процесу фотосинтезу, а тому його нагромадження в клітинах може бути показником швидкості протікання фотосинтезу за різних умов.

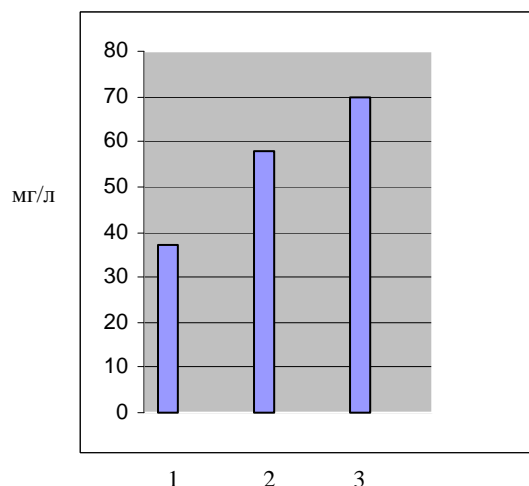


Рис.2. Нагромадження полісахариду *Chlorobium limicola* залежно від інтенсивності освітлення та зміни концентрації вуглекислоти в середовищі: 1 – 3лк, 3г/л CO<sub>2</sub>, 2 – 10 лк, 5 г/л CO<sub>2</sub>, 3 – 50л, 15г/л CO<sub>2</sub>,

Встановлено, що при зростанні освітлення з 3 до 50 лк та збільшенні концентрації CO<sub>2</sub> в середовищі з 3г/л до 15 г/л синтез поліглюкозиду зростає майже у два рази і досягав рівня 70 мг/л. Зменшення інтенсивності освітлення та концентрації вуглекислоти приводило до зниження вмісту ендогенних цукрів в клітинах .

Наступним етапом в наших дослідженнях було визначення утворення біомаси *Chlorobium limicola* залежно від інтенсивності освітлення та збільшення концентрації вуглекислоти в середовищі.

Отримані результати (рис. 3) показують, що збільшення освітлення в шістнадцять раз та паралельне зростання концентрації вуглекислоти в середовищі утричі стимулювало зростання біомаси майже у два рази. Згідно літературних даних [1, 2, 8], циклічний процес переносу електронів під дією квантів світла у хлоросомах зелених сіркобактерій безпосередньо супроводжується фотовідновленням NADP і синтезом АТФ із ADP-Mg комплексу і неорганічного фосфату . Ці відновні еквіваленти використовуються клітиною у циклі Арнона для фотоасиміляції вуглекислоти [2, 8].

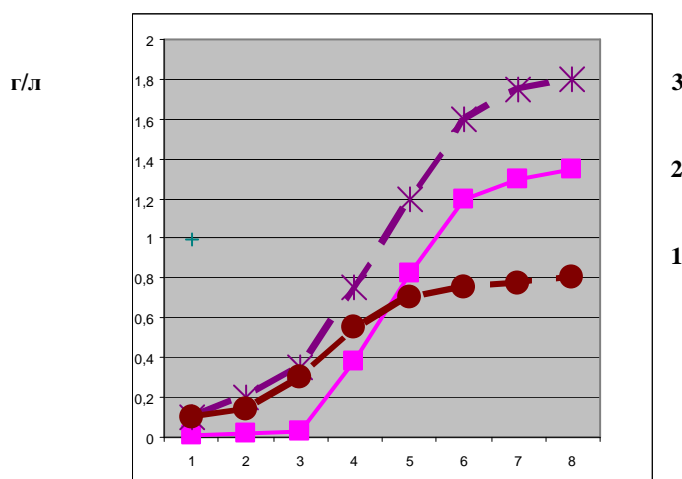


Рис. 3. Утворення біомаси зеленими сіркобактеріями *Chlorobium limicola* протягом 9 діб. 1 – 3лк, 3г/л CO<sub>2</sub>, 2 – 10 лк, 5 г/л-CO<sub>2</sub>, 3 – 50лк, 15г/л CO<sub>2</sub>

На основі отриманих результатів можна зробити висновок: зростання інтенсивності освітлення та концентрації CO<sub>2</sub> в середовищі приводить до суттєвого збільшення біомаси, що свідчить про зростання темпів фотосинтезу.

Аналізуючи накопичення біомаси, слід відмітити, що цей процес корелює з нагромадженням полісахариду (рис 2, 3). Таким чином, утворення поліглюкозиду бактеріями спостерігається в процесі росту культури і відображає фізіологічний стан клітини і загальну інтенсивність фотосинтезу.

Важливим фактором, що забезпечує фотосинтез у зелених сіркобактерій, є використання сірководню як основного донора електронів, тому в наступних експериментах досліджено зміни концентрації цієї сполуки в залежності від інтенсивності фотосинтезу в клітинах *Chlorobium limicola*.

Результати цих експериментів показали (рис. 4), що при освітленні 50 лк і максимальній концентрації вуглекислоти в середовищі культура утилізувала

80 мг/л  $H_2S$  протягом 9 діб культивування, що у 8 раз перевищувало контроль.

Таким чином, дослідження фотосинтетичних процесів у *Chlorobium limicola* показали, що найбільш інтенсивно вони протікають за умов: освітлення культури 50лк, максимальній насиченості середовища вуглекислотою і концентрації сірководню 100мг/л.

Подальше зростання вмісту сірководню в середовищі супроводжувалось пригніченням росту культури, що, очевидно, пов'язано з токсичною дією цієї сполуки на клітини [8, 10].

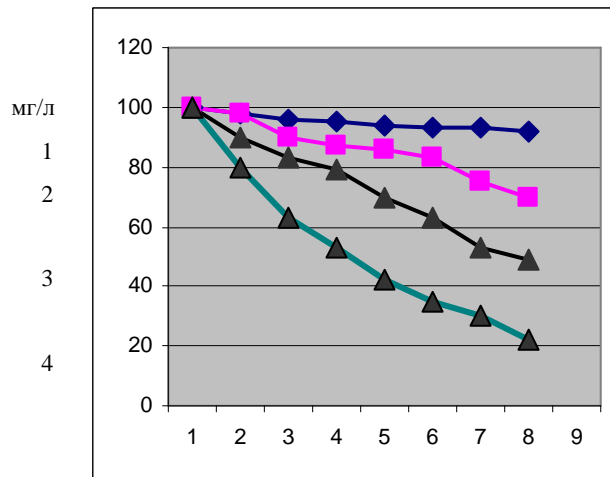


Рис.4. Утилізація сірководню *Chlorobium limicola* за різних умов культивування протягом 9 діб. 1 – К, 2 – 3лк, 3 – 10 лк, 4 – 50 лк, 5 – 15г/л.

Зелені сіркові бактерії здатні використовувати сірководень в процесі аноксигенного фотосинтезу, їх кількість у природних мікробіоценозах незначна. Отримані дані дозволяють стверджувати, що інтенсифікація росту *Chlorobium limicola* буде сприятливо впливати на процес утилізації сірко-

водню в техногенно забруднених водоймах. Ці експерименти демонструють перспективу біотехнологічного використання зелених сіркових бактерій для біологічного очищення водойм від цієї токсичної сполуки.

1. Кондратьева Е.Н. Фотосинтезирующие бактерии. – М.: Изд-во Московск. ун-та, 1989. – С. 82-103.
2. Современная микробиология / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дресса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. Т. 1. – С. 207-215. – С. 413-416.
3. Г. Шлегель. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – С.372-393.
4. Гудзь С.П., Баран І.М., Кіт Л.Я. та ін. Зелені сіркобактерії водойм Яворівського сіркового родовища // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол., 2002. Вип. 28. – С. 246-251
5. Гудзь С.П., Вілінська І.С., Горянська І.І. та ін. Методичні вказівки для лабораторних робіт з мікробіології. – Львів: ЛДУ, 1987. – С.10-11.
6. Баран І., Мороз О., Гудзь С., Гнатуш С. Метаболізм органічних сполук у зелених фототрофних сіркобактерій та утилізація ними сірководню // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол., 2003. Вип. 33. – С. 132-140.
7. Пирог Т.П., Корж Ю.В. та ін. Синтез мікробного екзополіцукриду етанолу на суміші етанолу і м'яса// Мікробіологічний журнал. – Т. 68. № 3. – С. 3-15.

8. Кульский Л.А., Гороновский И.Т. и др. Справочник по свойствам, методам анализа и очистки вод. – К.: Наук. думка, 1980. – 1260 с.
9. Хоулт Дж., Криг Р., Снит П., и др. Определитель бактерий Берджи. – М.: Мир, 1997. – С. 361-373.
10. Overmann J., Tuschak C. Phylogeny and molecular fingerprinting of green sulfur bacteria // Arch Microbiol. – 1997. Vol. 167. – P. 302-309.
11. Alexander B., Cox R., Phylogeny of green sulfur bacteria on the basis of gene sequences of 16s rRNA and of the Fenna-Matthews-Olson protein // Arch. Microbiol. – 2002. Vol. 178. – P. 131 p.
12. Kobayashi H.A., Mah. R.A. Use of Photosynthetic Bacteria for Hydrogen Sulfide removal from anaerobic waste treatment water effluent // Water Res. – 1983. – Vol. 17. № 5. – P. 579-587.
13. Loury. O.H., Parr A.L. Protein measurement with the Folin reagent // J. Biol. Chem. – 1951. Vol. 93. – P. 265-275.
14. Pffening N., Widdel F. The bacteria of sulfure cycle // Phil. Trans. R. Soc. Lond. – 1982. Vol. 298. – P. 433-441.

Отримано: 20 січня 2007 р.

Прийнято до друку: 1 лютого 2007 р.