

УДК 579. [017.8 : 243 : 811.25/ .26]

РІСТ ПУРПУРОВИХ СІРКОВИХ БАКТЕРІЙ *THIOCAPSA SP.* І *LAMPROCYSTIS SP.* В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ПРИРОДИ ТА ІНТЕНСИВНОСТІ ОСВІТЛЕННЯ

Ю. О. Павлова, С. П. Гудзь, А. М. Федорович

Ріст пурпурових сіркових бактерій *Thiocapsa sp.* і *Lamprocystis sp.* в залежності від природи та інтенсивності освітлення. — Ю.О. Павлова, С.П. Гудзь, А.М. Федорович. — Досліджено ріст пурпурових сіркобактерій *Thiocapsa sp.* та *Lamprocystis sp.* на середовищі з ацетатом за умов різної освітленості. Встановлено, що інтенсивність освітлення суттєво впливає на характер росту і пігментний склад бактерій. При збільшенні освітленості спостерігається швидкий перехід культури у стаціонарну фазу росту. Оптимальний ріст *Thiocapsa sp.* мав місце при інтенсивності світла 170 лк, а *Lamprocystis sp.* - 75 лк. Освітлення інтенсивністю 200 - 350 лк пригнічує ріст *Thiocapsa sp.* Сповільнення росту *Lamprocystis sp.* відбувається при освітленості 110 - 350 лк. Червоне світло високої інтенсивності не інгібує ріст пурпурових сіркобактерій. Аналіз спектрів поглинання клітин бактерій, вирощених за умов недостатнього та оптимального освітлення, показав, що при освітленості 5 лк *Thiocapsa sp.* утворює менше бактеріохлорофілу *a*, ніж при інтенсивності світла 75 лк. У *Lamprocystis sp.* змін в синтезі бактеріохлорофілу *a* за освітлення 5 лк і 75 лк не відмічено.

Ключові слова: пурпурові сіркові бактерії, *Thiocapsa sp.*, *Lamprocystis sp.*, освітленість, аноксигенний фотосинтез, бактеріохлорофіл *a*.

Адреса: Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, м. Львів 79005, Україна, e-mail: indrekis@icmp.lviv.ua

Development of purple sulfur bacteria *Thiocapsa sp.* and *Lamprocystis sp.* depending on light character and intensity. — J.O. Pavlova, S.P. Gudzy, A.M. Fedorowych. — The development of purple sulfur bacteria *Thiocapsa sp.* and *Lamprocystis sp.* on acetate medium in different illumination conditions was investigated. It was shown that light intensity had essential influence on the character of development and pigment composition of bacteria. The light intensity increase stimulates fast transfer of culture to stationary growth phase. The optimal growth of *Thiocapsa sp.* was at light intensity of 170 lx, and *Lamprocystis sp.* at light intensity of 75 lx. The *Thiocapsa sp.* growth was depressed by light intensity of 200 - 350 lx. The development of *Lamprocystis sp.* was slowing down at light intensity of 110 - 350 lx. The red light of high intensity does not inhibit the purple sulfur bacteria growth. The light-absorption spectra analysis of cells grew under deficient and optimal light conditions was made. Under light intensity of 5 lx *Thiocapsa sp.* synthesize bacteriochlorophyll *a* in smaller amount than under illumination of 75 lx. No changes in bacteriochlorophyll *a* synthesis for *Lamprocystis sp.* at light intensity 5 lx and 75 lx were notice.

Key words: purple sulfur bacteria, *Thiocapsa sp.*, *Lamprocystis sp.*, light intensity, anoxygenic photosynthesis, bacteriochlorophyll *a*.

Address: Ivan Franko National University in Lviv, 79005, Ukraine, Lviv, Hrushevsky Str., 4, e-mail: indrekis@icmp.lviv.ua

Вступ

Пурпурові сіркові бактерії (родина *Chromatiaceae*) об'єднують фізіологічно і генетично споріднені види та роди мікроорганізмів [13], які здатні до аноксигенного фотосинтезу. На відміну від вищих рослин чи ціанобактерій пурпурові сіркобактерії містять фотохімічні реакційні центри лише одного типу і потребують як донор електронів сполуки більш відновлені ніж вода (сульфіди, водень, різноманітні органічні речовини тощо).

Фотосинтезуючі сіркобактерії можуть рости на мінеральних середовищах, використовуючи вуглекислоту як єдине джерело вуглецю. Вони можуть також асимілювати у процесі фотосинтезу органічні сполуки. Для їх фотоасиміляції необхід-

на наявність сульфідів та гідрокарбонату у середовищі [12].

Важливими факторами, що впливають на процес фотосинтезу, а отже, і на ріст фотосинтезуючих культур є інтенсивність освітлення та спектральна характеристика світла. Максимально ефективними для фотосинтезу рослин та ціанобактерій є оранжеві та червоні промені (600 - 700 нм), довжини хвиль яких співпадають з областю поглинання хлорофілу. Менш ефективними є синьо-фіолетові промені. Вони поглинаються каротиноїдами і частково хлорофілами [15]. Показано можливість розвитку пурпурових сіркових бактерій за рахунок енергії світла різного спектрального складу [8]. Фотосинтез може відбуватися і за умов освітлення монохроматичним світлом - синім, на

яке припадають максимуми поглинання каротиноїдів, червоним та інфрачервоним, в якому знаходиться область поглинання бактеріохлорофілів [7].

Динаміка розвитку бактерій залежить і від інтенсивності освітлення. Коли вона близька до насичення (при якому світло вже не є лімітуючим фактором), нагромадження біомаси відбувається пропорційно. При подальшому збільшенні освітленості настає пригнічення росту. Величина, при якій відбувається світлове насичення залежить від виду бактерій та умов культивування [5, 6, 8, 11].

У лабораторних умовах для селективного нагромадження тих чи інших груп або видів пурпурових сіркових бактерій використовують різну освітленість. Інтенсивність освітлення в межах 1000 - 2000 лк сприяє розвитку невеликих за розміром форм *Chromatiaceae* (*Thiocapsa roseopersecina*, *Allochrochromatium vinosum*) [4, 16]. Великі за розміром клітини (*Chromatium okenii*, *Lamprocystis roseopersecina*) отримують у нагромаджувальних культурах за освітлення 50 - 300 лк [4, 16].

Ряд робіт вказує на можливість зниження інтенсивності освітлення під час культивування пурпурових сіркових бактерій на поживних середовищах з ацетатом [6, 10].

Ця робота присвячена вивченню впливу червоного світла на нагромадження біомаси *Thiocapsa sp.* та *Lamprocystis sp.* на середовищі з ацетатом.

Матеріали і методи досліджень

У досліджах використовували культури пурпурових сіркових бактерій *Lamprocystis sp.* та *Thiocapsa sp.*, які виділені з водоїм Яворівського сіркового родовища [2]. Бактерії попередньо вирощували протягом 16 діб в анаеростатах (GENbox jars, bioMerieux, Франція) на агаризованому середовищі Ван Ніля при температурі 25 - 30°C за умов постійного освітлення лампами денного світла. Для створення анаеробних умов застосували генератори (GENbox generators, bioMerieux, Франція). Вирощені клітини використовували як посівний матеріал для культивування у рідких середовищах АТСС 1449 і Ван Ніля, або на відповідних середовищах, що містили крім сульфідів і бікарбонату ацетат (0,1 %). Культивування у рідкому середовищі проводили у скляних пробірках об'ємом 50 мл, які закривали стерильними гумовими корками так, щоб не залишилось пухирців повітря.

Як джерела освітлення використовували лампи розжарювання різної потужності з пониженою напругою живлення. Зміна світлової температури нитки розжарювання лампи дозволила зсунути спектр випромінювання лампи у червону область.

Різні інтенсивності світла створювали зміною відстані між джерелом світла і об'єктом. Інтенсивність освітлення вимірювали люксометром Ю116.

Концентрацію клітин визначали фотоелектроколориметрично при довжині хвилі 660 нм [1].

Спектри поглинання клітин бактерій у видимій ділянці спектра записували на реєструвальному двохвильовому спектрофотометрі "Specord M-40".

Всі експерименти проводили у трьохкратній повторності. Статистичне опрацювання результатів виконували за допомогою програм Excel та Origin.

Результати досліджень та їх обговорення

Культивування *Thiocapsa sp.* на середовищах Ван Ніля та АТСС 1449 з ацетатом збільшує приріст біомаси у 2,5 рази, порівняно із вирощуванням бактерій на відповідних мінеральних середовищах (рис. 1). Найкращий ріст бактерій забезпечує середовище АТСС 1449 з 0,1 % ацетатом (рис. 1). Середовище такого складу дозволяє за 12 діб культивування нагромадити до 1,4 г/л клітин бактерій (рис. 1). Отже, для *Thiocapsa sp.* більш характерний фотолітогетеротрофний спосіб живлення.

Засвоєння ацетату пурпуровими сірковими і несірковими бактеріями відбувається в реакціях зворотніх до циклу трикарбонових кислот [4], або за допомогою гліюксилатного шунта [14]. Наявність у *Thiocapsa sp.* та *Lamprocystis sp.* ключового ферменту гліюксилатного шунта - ізоцитратліази [3], дозволяє припустити можливість споживання ацетату у даних бактерій саме за таким механізмом. Виходячи з одержаних результатів для культивування пурпурових сіркобактерій *Thiocapsa sp.* та *Lamprocystis sp.* доцільно використовувати середовище АТСС 1449 з ацетатом.

У наступних експериментах досліджували вплив освітлення на ріст культур і виявили, що при збільшенні освітленості тривалість логарифмічної фази росту *Thiocapsa sp.* скорочується, і культура переходить у стаціонарну фазу (рис. 2). Максимальне нагромадження біомаси (1,36 г/л) спостерігали на 168 год культивування при інтенсивності світла 170 лк. Подальше зростання освітленості суттєво не впливає на рівень біомаси. Низькі інтенсивності освітлення (60, 100, 120 лк) дозволяють нагромаджувати біомасу протягом усього періоду культивування завдяки більш тривалій експоненційній фазі росту (рис. 2). Таким чином, збільшення інтенсивності освітлення забезпечує швидкий перехід культури у стаціонарну фазу. Інтенсивність освітлення 100 лк сприяє збільшенню біомаси на 12 добу культивування лише на 7 %, в той час як освітленість 170 лк забезпечує зростання біомаси на 32 %, порівняно з інтенсивністю світла 60 лк.

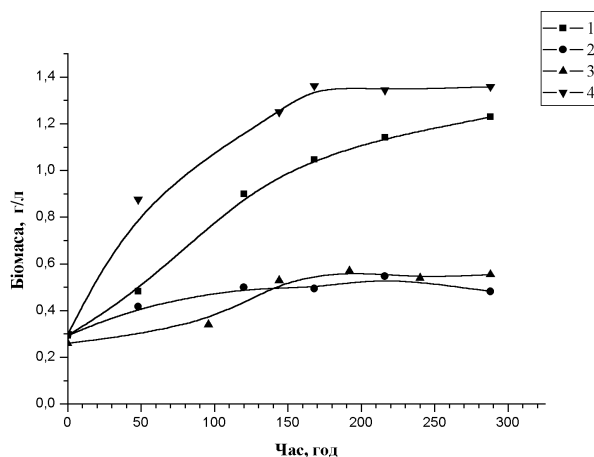


Рис. 1. Ріст бактерій *Thiocapsa sp.* на середовищах Ван Ніля і ATCC 1449 з ацетатом (1, 4, відповідно) та без ацетату (2, 3, відповідно).

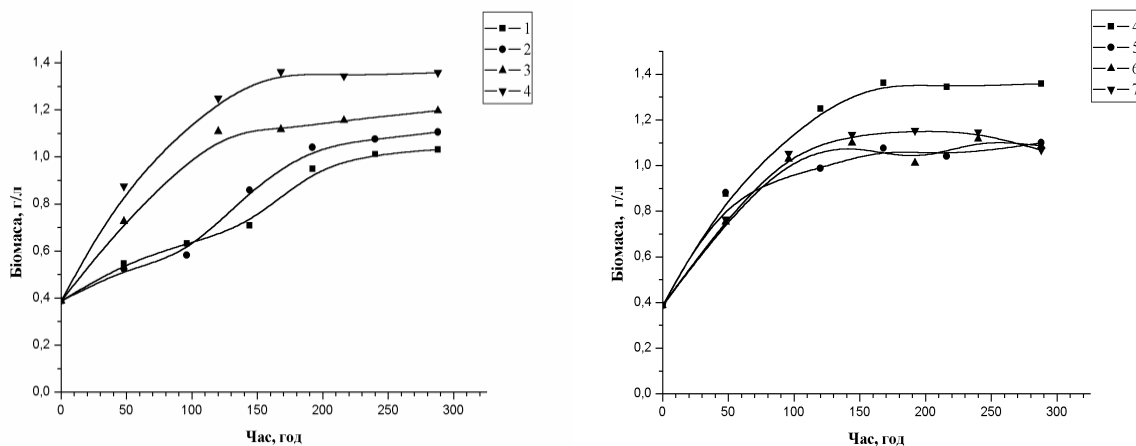


Рис. 2. Ріст бактерій *Thiocapsa sp.* при інтенсивностях освітлення 60 лк (1), 100 лк (2), 120 лк (3), 170 лк (4), 200 лк (5), 240 лк (6), 340 лк (7).

Наступне збільшення інтенсивності освітлення веде до зниження метаболічних процесів у клітині і нагромадження біомаси на 6 % (200 лк), 5 % (240 лк), 3 % (340 лк) більше, порівняно з освітленістю 60 лк (рис. 2). Такий характер впливу освітлення на *Thiocapsa sp.* може бути пов'язаний з ефектом "світлового насичення" або із швидким використанням донора електронів.

У ряді експериментів під час культивування бактерій *Lamprocystis sp.* та *Thiocapsa sp.* було використано червоний світлофільтр, що відітнув частину спектра експериментальної лампи розжарювання та дозволив дослідити вплив тільки основної червоної складової спектра на ріст бактерій при інтенсивностях освітлення від 5 до 230 лк.

Зміна інтенсивності освітлення червоними променями з 5 до 14 лк дозволяє після 8 днів культивування *Lamprocystis sp.* нагромадити в 1,6 раз більше біомаси (рис. 3). Зростання освітленості до 70 лк сприяє отриманню біомаси лише в 2 рази більшої, ніж при вирощуванні мікроорганізмів

при 5 лк. За освітлення 160 - 230 лк можна спостерігати значний приріст біомаси вже на 4 добу культивування (до 1,09 г/л) (рис. 3). Криві росту бактерій за таких умов характеризуються скороченням тривалості експоненційної фази до 100 год.

З метою виявлення оптимального освітлення та порівняння біомаси, нагромадженої бактеріями *Lamprocystis sp.* та *Thiocapsa sp.* після 12 діб культивування вивчали криві залежності біомаси від освітлення. За умов сприятливого освітлення (160 - 180 лк) *Thiocapsa sp.* на 288 год нагромаджує $1,28 \pm 0,02$ г/л клітин (рис. 4, А). Оптимальним для вирощування *Lamprocystis sp.* є освітленість 70 - 100 лк (Рис. 4, А). Варто відзначити, що сприятливими для росту *Lamprocystis sp.* є низька освітленість. Якщо вона перевищує 100 лк, то відбувається пригнічення росту *Lamprocystis sp.* У бактерій *Thiocapsa sp.* сповільнення росту спостерігається як при надмірному, так і недостатньому освітленні.

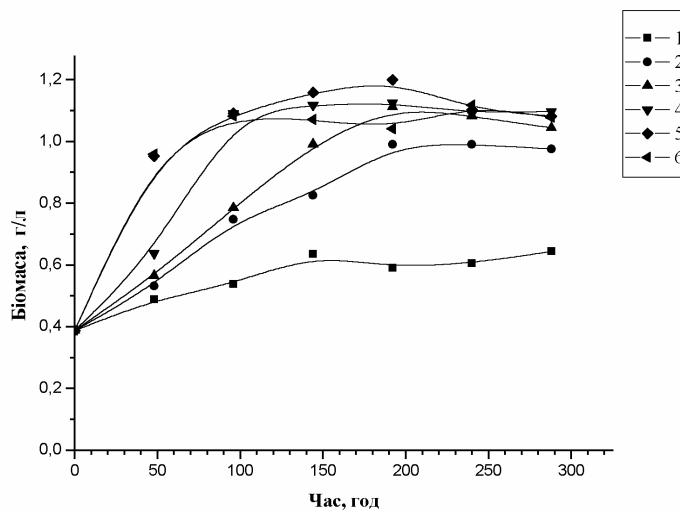


Рис. 3. Нагромадження біомаси бактеріями *Lamprocystis sp.* за інтенсивності освітлення 5 лк (1), 14 лк (2), 70 лк (3), 160 лк (4), 170 лк (5), 230 лк (6).

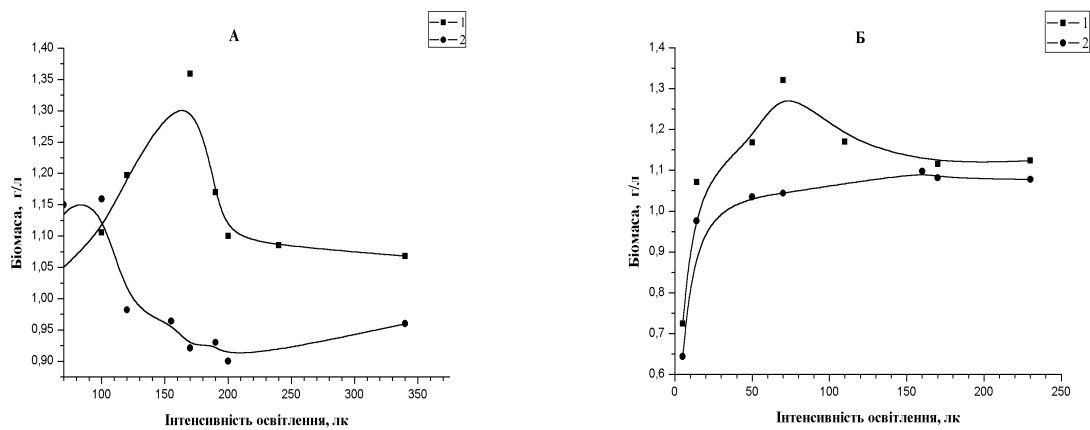


Рис. 4. Урожай клітин *Thiocapsa sp.* (1) та *Lamprocystis sp.* (2) після 12 днів культивування при різному освітленні: А - без застосування світлофільтра; Б - із застосуванням червоного світлофільтра.

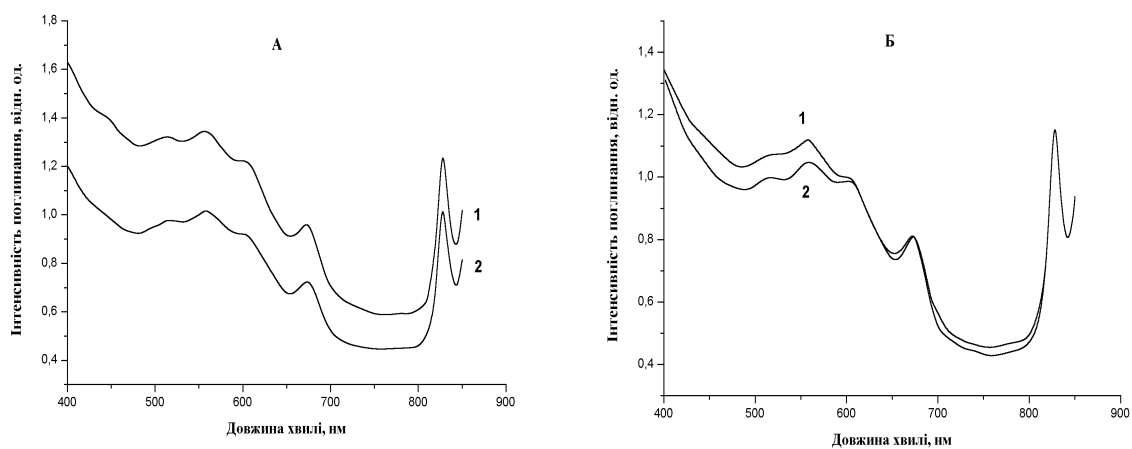


Рис. 5. Електронні спектри поглинання суспензій живих клітин *Thiocapsa sp.* (А) та *Lamprocystis sp.* (Б) за освітлення 75 лк (1) та 5 лк (2).

Застосування червоного світлофільтра зменшує потребу мікроорганізмів у освітленні, однак не впливає на нагромадження біомаси, про що свідчить активне використання червоної ділянки спектра у фотосинтезі. Червоне світло інтенсивністю 100 - 230 лк не пригнічує ріст *Lamprocystis sp.* та *Thiocapsa sp.* Таким чином, ефект "світлового насичення" можна спостерігати і за високих інтенсивностей освітлення червоними променями (рис. 4, Б). Отже, інтенсивність освітлення виявляє різний вплив на ріст *Thiocapsa sp.* та *Lamprocystis sp.* Відомо, що при низькій освітленості у фототрофних бактерій синтезується додаткова кількість компонентів антени, особливо молекул бактеріохлорофіла а, що поглинають світло з довжинами хвиль 800 нм і 820 - 860 нм [9]. Висока інтенсивність освітлення інгібує експресію фотосинтетичних пігментів, зумовлює зменшення розмірів периферичної антени. Збільшення чи зменшення розмірів антени і зміна числа фотосинтетичних одиниць у відповідь на зміну інтенсивності освітлення забезпечує оптимальне поглинання світла і координує процеси фотосинтезу в реакційному центрі [9].

З метою вивчення відповіді клітин *Thiocapsa sp.* та *Lamprocystis sp.* на недостатнє освітлення вивчали спектри поглинання клітин даних бактерій. Культури пурпурових сірковок бактерій вирощували до кінця логарифмічної фази росту при інтенсивності освітленості 5 лк та 75 лк із застосуванням червоного світлофільтра. Виявилось, що за умов недостатнього та оптимального освітлення у клітинах *Thiocapsa sp.* та *Lamprocystis sp.* синтезуються пігменти (каротиноїди та бактеріохлорофіл а) однакового якісного складу, про що свідчать спектри поглинання клітин (рис. 5). Освітленість 5 лк не призводить до зростання кількості бактеріохлорофіла а у *Thiocapsa sp.*, а це ставить під сумнів можливість процесу фотосинтезу за таких

умов у цих бактерій (рис. 5, А). У *Lamprocystis sp.* при інтенсивностях освітлення 5 і 75 лк синтезується де-що різна кількість каротиноїдів, але однакова кількість бактеріохлорофіла а, оскільки великий та малий піки поглинання бактеріохлорофіла за різних умов освітлення збігаються (рис. 5, Б). Таким чином, бактерії *Lamprocystis sp.* краще пристосовані до умов недостатнього освітлення, порівняно із *Thiocapsa sp.*

Дослідження спектрів поглинання клітин і росту культур за умов різної інтенсивності освітлення показало, що в клітинах різних представників пурпурових сірковок бактерій відбуваються суттєві зміни в процесі фотосинтезу, і в першу чергу в пігментному складі бактерій. Низька освітленість супроводжується зниженням синтезу пігментів, а це призводить до зниження процесу фотосинтезу. Висока інтенсивність світла пригнічує ріст бактерій.

Пурпурові сірковок бактерії у процесі фотосинтезу активно використовують H_2S як донор електронів, а отже, можуть бути перспективними модельними організмами для створення біотехнологічних процесів, таких як очистка стічних вод, забруднених сірководнем, продукція молекулярного водню, вітамінів, органічних кислот тощо. Використання цими бактеріями світла як джерела енергії і вуглекислоти як джерела вуглецю та ріст в анаеробних умовах дозволять суттєво знизити вартість виробництва чи процесу ремедіації. Вивчення оптимальних умов освітлення при культивуванні пурпурових сірковок бактерій, виявлення лабільних до інтенсивності освітлення культур дозволить у майбутньому контролювати процеси росту та біосинтезу біологічно активних речовин пурпуровими сірковими бактеріями, а також успішно застосовувати їх для захисту навколишнього середовища від сірководню.

- Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Прак. пособие. - М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. - 215 с.
- Кіт Л.Я., Баран І.М., Федорович А.М. та ін. Пігменти фототрофних зелених та пурпурових сірковок бактерій водойм Яворівського сіркового родовища // III з'їзд Укр. біофіз. т-ва. Львів, 2002. - С. 128.
- Кіт Л., Мороз О., Федорович А., Гнатуш С. та ін. Метаболізм сульфідів та вуглецевих сполук у фототрофних пурпурових сірковок бактерій // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. - 2004. - №35. - С. 199 - 204.
- Кондратьева Е.Н., Максимова И.В., Самуилов В.Д. Фототрофные микроорганизмы. - М.: Изд. Москов. ун-та, 1989. - С. 6-82.
- Минеева Л.А. Влияние интенсивности света на автотрофное и гетеротрофное питание *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus obliquus* // Микробиология. - 1962. - Т.31, №3. - С. 411-416.
- Нестеров А.И., Гоготов И.Н., Кондратьева Е.Н. Значение интенсивности света для использования различных соединений углерода фотосинтезирующими бактериями // Микробиология. - 1966. - Т.35, №2. - С. 193-199.
- Осницкая Л.К. Фотосинтетическое развитие пурпурных серных бактерий *Chromatium vinosum* в узких участках спектра // Микробиология. - 1965. - Т. 34, №2. - С. 204-215.
- Осницкая Л.К., Чудина В.И. Значение спектрального состава света и его интенсивности для развития фотосинтезирующих пурпурных серных бактерий *Chromatium vinosum* // Микробиология. - 1965. - Т. 34, №1. - С. 19-23.
- Современная микробиология. Прокариоти: В 2-х томах / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005.
- Федоров В.Д., Белоусова А.А. Влияние некоторых органических соединений на рост *Chlorobium thiosulfatophilum* в зависимости от условий освещения и наличия бикарбоната // Микробиология. - 1969. - Т.38, №4. - С.589 - 598.
- Шапошников В.Н., Осницкая Л.К., Чудина В.И. Развитие пурпурной серной бактерии *Chromatium vinosum* при разных интенсивностях света // Микробиология. - 1961. - Т.30, №5. - С. 825-832.
- Eraso J., Kaplan S. Photoautotrophy // Encyclopedia of life sciences. - Nature publishing group, 2001.
- Fowler V., Pfennig N., Schubert W., Stackebrandt E. Towards a phylogeny of phototrophic purple sulfur bacteria—16S rRNA oligonucleotide cataloging of 11 species of *Chromatiaceae* // Archives of Microbiology. - 1984. - V. 139. - P. 382-387.
- Meister M., Saum S., Alber B., Fuchs G. L-malyl-coenzyme A/β-methylmalyl-coenzyme A lyase is involved in acetate assimilation of the isocitrate lyase-negative bacterium *Rhodobacter capsulatus* // J. Bacteriol. - 2005. - V. 187, №4. - P. 1415-1425.
- Moore R., Clark D., Stern R., Vodopich D. Botany. - Wm. C. Brown Publishers, 1995. - P. 136-142.
- Phennig N., Trüper H. The family *Chromatiaceae* // The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. - 2nd edn. - New York: Springer, 1992. - P. 3200-3221.

Отримано: 12 січня 2007 р.

Прийнято до друку: 1 лютого 2007 р.