

УДК 579.811.41:579.017.8

**УТВОРЕННЯ ГЛІКОГЕНУ В КЛІТИНАХ *CHLOROBIVM LIMICOLA*
ЗА УМОВ РІЗНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ АЗОТОМ І ФОСФОРОМ****О. Левицька, С. Гудзь**

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: o_levytska@yahoo.com

Досліджено закономірності нагромадження глікогену в клітинах *Chlorobium limicola* Ya-2002 залежно від концентрації азоту і фосфору в середовищі. Встановлено, що вміст глікогену у клітинах бактерій максимальний – 80 мг/г клітин – в умовах інкубування у середовищі, до якого не вносили фосфату чи амонію. Калію нітрат у концентрації 12 мМ повністю інгібує використання амонійного азоту клітинами *C. limicola*.

Ключові слова: *Chlorobium limicola*, глікоген, дефіцит фосфору, дефіцит азоту.

Фотосинтезувальні зелені сіркові бактерії – облігатні фотолітоавтотрофи. Середовища їхнього існування у природі формуються на стику безкисневих і кисневмісних вод, у яких часто виникає дефіцит фосфору й азоту [6]. За цих умов у мікроорганізмів спостерігається біосинтез запасних полісахаридів, зокрема глікогену [17]. Здатність синтезувати цю сполуку описана для *Escherichia coli* [9], *Anabaena variabilis* [13], *C. limicola* [2]. Зелені сіркові бактерії здійснюють аноксигенний фотосинтез, використовуючи H₂S як донор електронів. Джерелом вуглецю для них служить CO₂. Таким чином, ці бактерії можуть бути джерелом біомаси на дешевих середовищах і, крім того, очищувати довкілля від отруйного сірководню. На Прикарпатті, де з 60-х років минулого сторіччя відбувався промисловий видобуток сірки, на місці сірковидобувних кар'єрів утворилися великі водойми (в тому числі озеро Яворівське площею 1080 га), де інтенсивно відбуваються процеси дисиміляційної сульфатредукції, продуктом якої є сірководень. Ця отруйна сполука забруднює навколишнє середовище та є серйозною перешкодою на шляху до ревіталізації водойм і їхнього використання в господарських цілях.

Попередні дослідження, виконані на кафедрі мікробіології, показали, що на середовищі з натрію сульфідом *C. limicola* Ya-2002 може нагромаджувати в клітинах глікоген, аналогічний глікогену печінки бика [2]. Метою цієї роботи було дослідити вплив різних концентрацій амонію та фосфату на утворення глікогену в клітинах *C. limicola*.

У дослідах використовували зелені фотосинтезувальні бактерії *Chlorobium limicola*, штам Ya-2002 [3]. Бактерії вирощували за анаеробних умов в анаеростатах Genbox Jar 7.0 L. France (для поглинання кисню застосовували генератори для анаеробів Genbox anaer фірми Biomerieux) протягом 7–8 діб при температурі 24–25°C у рідкому середовищі для зелених сіркобактерій GSB (green sulfur bacteria) такого складу (г/л): KH₂PO₄ – 0,3, NH₄Cl – 0,34, KCl – 0,34, CaCl₂×2H₂O – 0,15, MgSO₄×7H₂O – 0,5. Після автоклавування додавали (мл/л): 10% NaHCO₃ – 15, 1M Na₂S×9H₂O – 2,5, розчин мікроелементів SL10 – 1 [12]. Культуру освітлювали променями з довжиною хвилі 700-800 нм інтенсивністю 40 лк. Оптичну густину суспензії визначали фотоелектроколориметрично (λ=450 нм, довжина оптичного шляху 3 мм, фотоелектроколориметр КФК-3). Біомасу (мг/мл)

визначали за попередньо побудованою калібрувальною кривою. Клітини осаджували центрифугуванням при 8000 об/хв. Для визначення вмісту глікогену *C. limicola* культивували протягом десяти діб, із відмітої суспензії отримували безклітинні екстракти за допомогою ультразвукового дезінтегратора УЗДН-2Т. Гідроліз глікогену безклітинних екстрактів проводили кип'ятінням протягом трьох годин з 1 н сірчаною кислотою. Глікоген визначали за різницею рівнів глюкози до та після гідролізу ферментативно за допомогою аналітичного набору «Діаглюк» [1]. Концентрацію амонію у середовищі визначали колориметрично за утворенням індофенолу [16]. Фосфати визначали колориметрично реакцією з ванадомолібдофосфатом [4].

У літературі є мало даних про метаболізм фосфору в клітинах фотосинтезуючих бактерій. Відомо, що фототрофні бактерії для росту потребують невеликих кількостей неорганічного фосфату. У пурпурових сіркових бактерій *Chromatium vinosum* виявлено декілька транспортних систем, які забезпечують перенесення фосфору в клітину залежно від його концентрації [6]. Однак вміст фосфору в середовищі значною мірою визначає напрям метаболізму клітини. Зокрема, низький рівень фосфату сприяє біосинтезові полісахариду в клітинах [11]. У цьому аспекті цікавим об'єктом є фотосинтезуючі бактерії *C. limicola*, які здатні утворювати внутрішньоклітинний глікоген [2] і розглядаються як перспективне джерело його промислового одержання [8]. Виходячи з того, що умови нагромадження названого полісахариду ще недостатньо вивчені, ми дослідили спочатку динаміку використання фосфатів ростучою культурою *C. limicola* і встановили (рис. 1), що із 2 мМ фосфату, наявних у середовищі GSB, яке використовується для культивування зелених сіркових бактерій, клітини використовують на восьму добу культивування (перехід у стаціонарну фазу) лише 50% фосфору.

У подальших експериментах ми перевірили, як росте культура за нижчих концентрацій фосфату в середовищі (рис. 2).

Дані цього експерименту показали, що найвищий рівень біомаси бактерії нагромаджували у середовищі з 2 мМ фосфату. При зниженні концентрації цієї солі ріст *C. limicola* був дещо слабшим, зокрема, за наявності в середовищі 0,05 мМ KH_2PO_4 і менше рівень нагромадженої біомаси знизився на 34% порівняно з культурою, що виростила в середовищі GSB, яке містить 2 мМ фосфату. Такого ж рівня біомаси культура досягала і в середовищі без додавання фосфору, що узгоджується з даними Vanegas, згідно з якими фотосинтезувальна активність фототрофних бактерій не визначається концентрацією неорганічного фосфату в середовищі, а незначне нагромадження біомаси свідчить про те, що кліти-

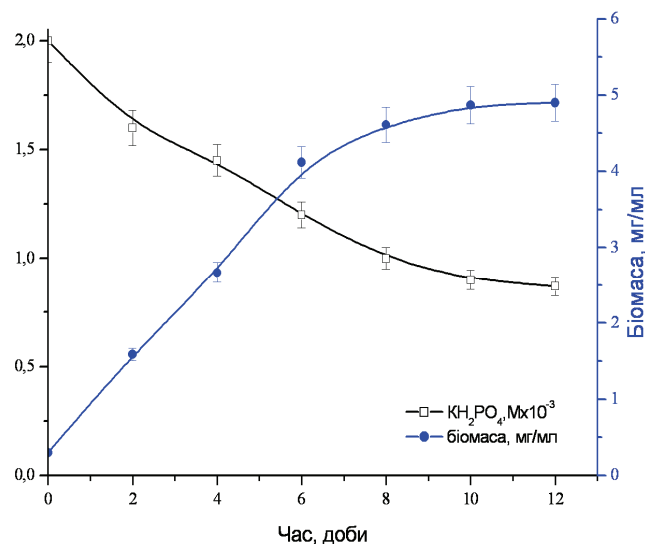


Рис. 1. Поглинання фосфат-іонів у процесі росту *C. limicola*.

ни *C. limicola* містять певні запаси доступного фосфору [6].

Оскільки зелені сіркові бактерії *C. limicola* розглядають як потенційні продуценти глікогену на відносно дешевому середовищі, яким є GSB, то ця властивість бактерій може мати важливе практичне значення. У наступному експерименті дослідили вплив різних концентрацій фосфату на нагромадження глікогену клітинами *C. limicola*. Вихідні відмиті клітини десятидобової культури використовували як контроль. Виявилось, що після 48 год інкубування бактерій у середовищах із різним вмістом фосфату рівень глікогену в клітинах обернено пропорційно залежав від вмісту фосфатів у середовищі та досягав максимуму (80 мг/г клітин) в клітинах, які інкубували без фосфатів (рис. 3). За наявності в середовищі 2 мМ KH_2PO_4 , що відповідає його вмістові у середовищі GSB, рівень глікогену в клітинах був низький і після двох діб інкубування зростав лише на 15% порівняно з вихідними клітинами.

Levy, Ballicoga встановили, що у представників роду *Rhodobacter* і деяких ціанобактерій неорганічний фосфат регулює активність АДФ-глюкозопірофосфорилази (ключового ферменту біосинтезу глікогену) за принципом негативного зворотного зв'язку. Подібний ефект неорганічного фосфату описаний для *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodobacter globiformis* та ціанобактерій *Synechococcus* sp. [5]. Отже, рівень глікогену у клітинах *C. limicola* обернено пропорційно залежав від концентрації фосфату і був максимальним, коли у середовище фосфату не додавали.

Ми вже повідомляли, що *C. limicola* здатний використовувати як джерела азоту солі амонію, аміний азот та здійснювати азотфіксацію. Ці бактерії не можуть викорис-

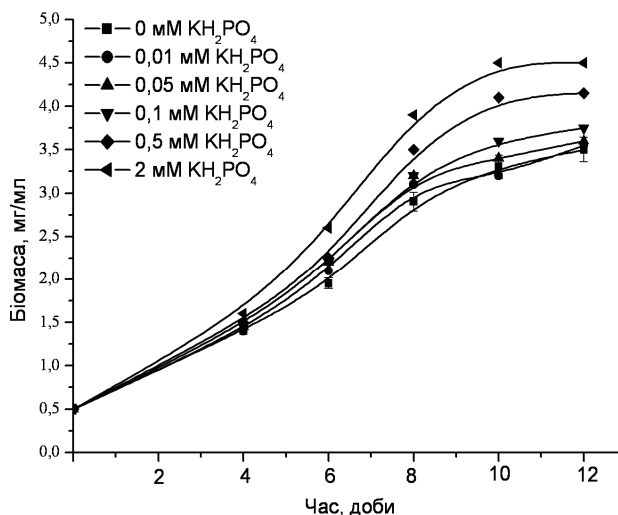


Рис. 2. Ріст *C. limicola* у середовищі з різними концентраціями фосфату.

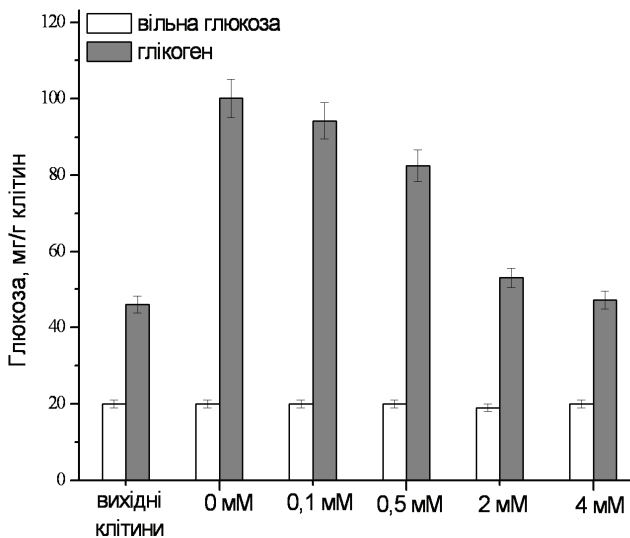


Рис. 3. Вміст вільної глюкози та глікогену у клітинах *C. limicola* після 48 годин інкубування з різними концентраціями фосфату.

товувати нітрати як джерело азоту. Крім того, останні інгібують ріст бактерій [2]. Згідно з даними Dietzler, рівень глікогену в клітинах *E. coli* залежить від вмісту амонійного азоту в середовищі. Подібний ефект цієї форми азоту на синтез полісахаридів показано для *Spirulina maxima* [19] та *Mycobacterium smegmatis* [12].

Ми дослідили вплив різних концентрацій амонійного азоту на синтез глікогену і показали чітку залежність між концентрацією азоту в середовищі і рівнем глікогену в клітинах. Зниження концентрації амоній хлориду в середовищі супроводжується зростанням нагромадження цього полісахариду в клітинах (рис. 4). При мінімальних концентраціях амонію хлориду та за умов його відсутності у середовищі рівень глікогену в клітинах зростає у два рази, тоді як при концентраціях 3,2 мМ та 6,4 мМ спостерігалось дуже незначне зростання вмісту глікогену, а за наявності 12,8 мМ та 19,2 мМ амоній хлориду рівень глікогену в клітинах не змінювався порівняно з вихідними клітинами.

Оскільки *C. limicola*, як і багато інших представників зелених сіркових бактерій, здатні фіксувати атмосферний азот [7, 14, 20], виникли певні труднощі у створенні дефіциту азоту в клітинах. Щоб подолати цей бар'єр, ми використали встановлену нами здатність нітратів інгібувати ріст *C. limicola*. Дослідження впливу різних концентрацій нітратів на засвоєння амонійного азоту показало (рис. 5, а), що інгібуюча дія нітратів залежить від їхньої концентрації у середовищі. Можливо, припинення росту клітин у присутності нітратів є наслідком пригнічення транспорту амонію і створення його дефіциту в клітинах. Згідно з даними Wimpenny та Martinez, інгібуюча дія нітратів у *Aerobacter aerogenes*, *E. coli* та *Rhodobacter capsulatus* спрямована на активність фумарази й аконітази окислювального ЦТК [21]. На відміну від них, у *C. limicola* функціонує відновний ЦТК (цикл Арнона), який відіграє особливо важливу роль, оскільки постачає клітину життєво необхідними акцепторами CO₂. Таким чином ці ферменти забезпечують функціонування енергетичного і конструктивного метаболізму клітин. За умов інгібуючої дії нітратів, очевидно, діє лише частина циклу, пов'язана з функціонуванням піруватсинтази та фосфоенолпіруватсинтази, які забезпечують утворення глікогену.

Встановлено, що у присутності нітратів пригнічується використання інших форм азоту. На рис. 5, а показано вплив різних концентрацій калію нітрату на використання амонійного азоту зі середовища ростучою культурою *C. limicola*. Поглинання амонію клітинами знижувалося зі зростанням вмісту нітрату в середовищі. За відсутності нітрату в середовищі рівень амонійного азоту протягом п'яти діб культивування знизився

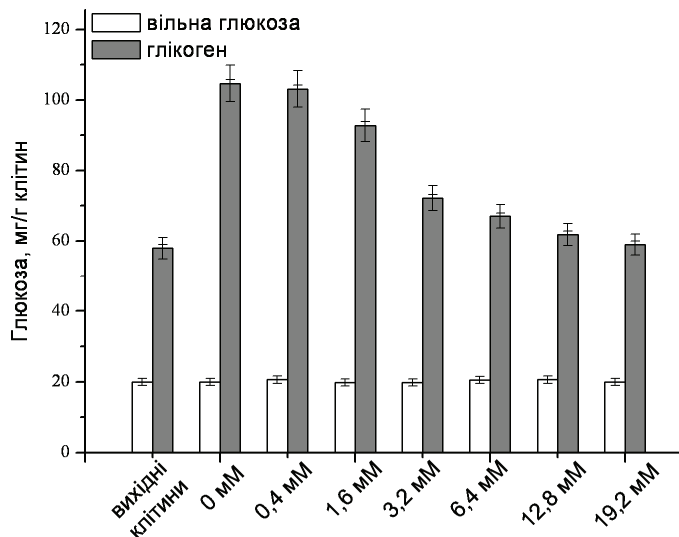


Рис. 4. Вміст вільної глюкози та глікогену у клітинах *C. limicola* після 48 год інкубування з різними концентраціями амонію.

більше ніж у 10 разів. Невисокі концентрації калію нітрату (0,5 мМ та 1 мМ) незначно сповільнювали поглинання амонійного азоту і забезпечували нагромадження невеликої біомаси (рис. 5, б). 12 мМ та 8 мМ калію нітрату в середовищі суттєво пригнічували поглинання амонію клітинами *C. limicola*, і його вміст протягом першої доби не змінювався, а при 4 мМ вміст амонійного азоту знизився менше ніж на 20% порівняно з контролем, де амоній вичерпався на 65%. Концентрація калію нітрату 12 мМ повністю пригнічувала ріст культури (рис. 5, б), що, очевидно, пов'язано з азотним голодуванням.

Наступним етапом роботи було дослідження нагромадження глікогену в процесі культивування бактерій і залежно від ступеня використання амонію. Рис. 6 демонструє взаємозв'язок між ростом і утворенням глікогену в клітинах *C. limicola*.

Протягом перших діб культивування, коли амоній зі середовища повністю не вичерпаний (рис. 5, а), глікоген у клітинах виявляли у слідових кількостях. Зростання рівня глікогену в клітинах після шести діб культивування, очевидно, пов'язане з використанням клітинами амонію зі середовища і виникненням його дефіциту. Подібні результати отримали Ernst та Voger для *Anabaena variabilis* [13]. Максимальний рівень утворення глікогену (35 мг/г клітин) у клітинах *C. limicola* спостерігається на момент майже повного вичерпування амонійного азоту зі середовища (дев'ята доба культивування). Після цього рівень ендогенного глікогену знижувався, хоча біомаса клітин ще продовжувала зростати. Очевидно, така динаміка нагромадження глікогену обумовлена "включенням" нітрогеназної системи, яка, як відомо, регулюється іонами амонію [20], появою у клітинах додаткових кількостей азоту за рахунок азотфіксації та, як наслідок, зниження рівня глікогену в клітинах.

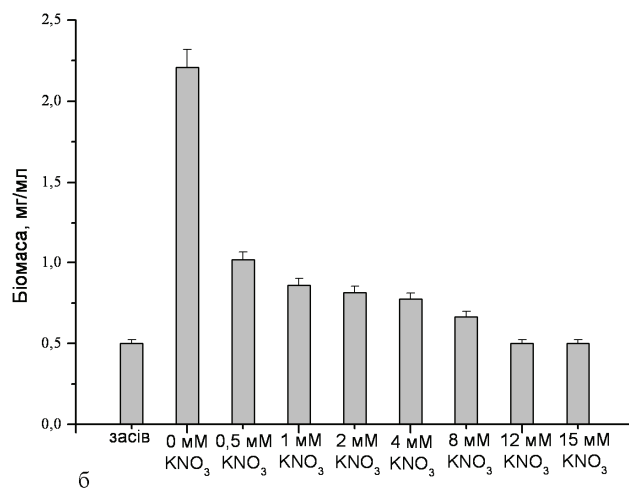


Рис. 5. Поглинання іонів амонію культурою *C. limicola* (а) та нагромаджена біомаса у стаціонарній фазі росту (б) в середовищах із різними концентраціями нітрату.

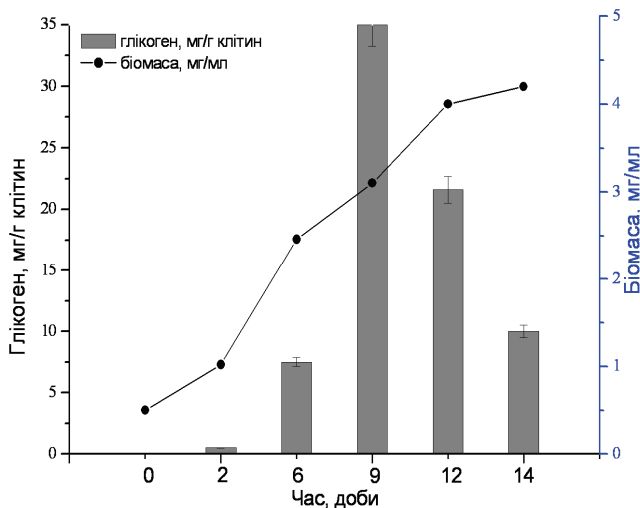


Рис. 6. Нагромадження глікогену та використання амонійного азоту у процесі росту *C. limicola* Ya-2002.

Таким чином, дослідження залежності вмісту глікогену від концентрації амонію та фосфату в середовищі показало, що рівень глікогену в клітинах, які інкубували без амонію чи фосфату, був максимальним і удвічі перевищував контрольний. Такі результати можуть бути використані для розроблення практичних рекомендацій щодо оптимізації середовища культивування *C. limicola* з метою промислового одержання глікогену.

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. Б. Екологічне значення зелених сіркових бактерій в утилізації сірководню: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2008. 20 с.
3. Горішний М., Гудзь С., Гнатуш С. Вплив факторів середовища на швидкість використання H_2S *Chlorobium limicola* // Агроеколог. журн. 2007. № 4. С. 65–67.
4. Уильямс У. Дж. Определение анионов: Справочник. Пер. с англ. М.: Химия, 1982. 624 с.
5. Ballicora M. A., Iglesias A. A., Preiss J. ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. Vol. 67. N. 2. P. 213–225.
6. Vaneras L., Garcia-Gil L. J. Environmental and physiological factors affecting the uptake of phosphate by *Chlorobium limicola* // Arch. Microbiol. 1998. Vol. 170. P. 252–258.
7. Bergstein T., Henis Y., Cavari B. Z. Nitrogen fixation by the photosynthetic sulfur bacterium *Chlorobium phaeobacteroides* from the lake Kinneret // Appl. Environ. Microbiol. 1981. Vol. 41. P. 8288–8294.
8. Cork D. J., Garunas R., Sajjad R. *Chlorobium limicola* forma thiosulphatophylum: biocatalist in the production of sulfur and organic carbon from gas stream containing H_2S and CO_2 // Appl. Environ. Microbiol. 1983. Vol. 45. N. 3. P. 913–918.
9. Dietzler D., Leckie M., Lais C. Periodic inventory review as a strategy for survival in *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. 1979. Vol. 254. P. 8288–8294.
10. Dietzler D., Leckie M., Sternheim W. Regulation of glycogen synthesis and glucose utilization in *Escherichia coli* during maintenance of energy charge // J. Biol. Chem. 1979. Vol. 254. P. 8276–8287.
11. Dicks J. W., Tempest D. W. The influence of temperature and growth rate on the quantitative relationship between potassium, magnesium, phosphorus and ribonucleic acid of *Aerobacter aerogenes* growing in a chemostat // J. Gen. Microbiol. 1966. Vol. 45. P. 547–557.
12. Elbein A. D., Mitchell M. Levels of glycogen and trehalose in *Mycobacterium smegmatis* and the purification and properties of the glycogen synthetase // J. Bacteriol. 1973. Vol. 113. N. 2. P. 863–873.
13. Ernst A., Boger. P. Glycogen accumulation and the induction of nitrogenase activity in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena variabilis* // J. Gen. Microbiol. 1985. Vol. 131. P. 3147–3153.
14. Heda G. D., Madigan M. T. Aspects of nitrogen fixation in *Chlorobium* // Arch. Microbiol. 1986. Vol. 143. P. 330–336.
15. Levy C., Preiss J. Regulatory properties of the ADP-glucose pyrophosphorylase of the blue-green bacterium *Synechococcus* 6301 // Plant. Physiol. 1976. Vol. 58. P. 753–756.
16. Manabe T. New modification of Lubochinsky's indophenols method for direct microanalysis of ammonia-N in sea water // Jap. Soc. Sci. Fish. Bull. 1969. Vol. 35. P. 897–906.
17. Mas J. Storage products in purple and green sulfur bacteria / Eds. Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. Anoxygenic photosynthetic bacteria: Kluwer academic publishers, 1995. P. 973–990.

18. *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.
19. *Philippis R., Sili C., Vincenzini M.* Glycogen and poly- β -hydroxybutyrate synthesii in *Spirulina maxima* // *J. Gen Microbiol.* 1992. Vol. 138. P. 1623-1628.
20. *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.
21. *Wimpenny J. W. T., Warmesleya A. M. H.* The effect of nitrate on krebs cycle enzymes in various bacteria // *Biochim. Biophys. Acta.* 1967. Vol. 156. N. 2. P. 297–303.

**GLYCOGEN SYNTHESIS IN THE CELLS OF *CHLOROBIVM LIMICOLA*
UNDER THE CONDITIONS OF VARIOUS NITROGEN
AND PHOSPHORUS SUPPLEMENTATION**

O. Levytska, S. Gudz

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Grushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: o_levytska@yahoo.com*

The intracellular glycogen accumulation was investigated in *Chlorobium limicola* in dependence of nitrogen and phosphorus concentrations in the medium. Incubation in the media without phosphorus or ammonia provided the highest level of the glycogen in the cells of these bacteria – 80 mg/g of cells. 12 mM of potassium nitrate completely inhibits the uptake of ammonium by the cells of *C. limicola*.

Key words: *Chlorobium limicola*, glycogen, phosphorus limitation, nitrogen limitation.

**ОБРАЗОВАНИЕ ГЛИКОГЕНА В КЛЕТКАХ
CHLOROBIVM LIMICOLA В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО
ОБЕСПЕЧЕНИЯ АЗОТОМ И ФОСФОРОМ**

О. Левицкая, С. Гудзь

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

Исследовано накопление гликогена в клетках *Chlorobium limicola* Ya-2002 в зависимости от концентрации азота и фосфора в среде. Установлено, что содержание гликогена в клетках бактерий максимальное – 80 мг/г клеток – в условиях инкубирования в среде, в которую не вносили фосфата или аммония. Калия нитрат в концентрации 12 мМ полностью ингибирует использование аммонийного азота клетками *C. limicola*.

Ключевые слова: *Chlorobium limicola*, гликоген, дефицит фосфора, дефицит азота.

Стаття надійшла до редколегії 10.12.09
Надійшла після доопрацювання 08.04.10
Прийнята до друку 15.04.10