

Мікробіологія

УДК 579.266 / 68 (474)

ФОТОСИНТЕЗУВАЛЬНІ ПІГМЕНТИ *CHLOROBIVM LIMICOLA* YA-2002

М. Горішний, С. Гудзь

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: M_Gorishniy@ukr.net*

Досліджено природу фотосинтезувальних пігментів у зелених сіркових бактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002. За хроматографічною рухливістю і максимумами поглинання при 668 та 655 нм пігменти ідентифіковані як бактеріохлорофіли *c* та *d*. Серед каротиноїдних пігментів виявлені хлоробактин та ізореніератин.

Ключові слова: зелені сіркобактерії, бактеріохлорофіли, каротиноїди.

Невелика група бактерій у природі здатна здійснювати аноксигенний фотосинтез, який не супроводжується виділенням O_2 . Їх поділяють на три групи: зелені та пурпурові бактерії і геліобактерії. Як донор електронів усі вони використовують відновлені сполуки сірки. Для перетворення енергії світла у клітинах цих бактерій виявлено ряд пігментів (бактеріохлорофільної та каротиноїдної природи [2, 5]), які забезпечують трансформацію енергії світла в хімічну енергію.

У зелених сіркобактерій ці процеси відбуваються в спеціалізованих везикулах, які отримали назву хлоросом. Саме в цих структурах містяться бактеріохлорофіли *c*, *d* та *e*, а також ліпіди і каротиноїди. Бактеріохлорофіли виконують функцію світловловлюючих антен. Останні зв'язані з реакційним центром, локалізованим у плазматичній мембрані, через бактеріохлорофіл *a*, який міститься в базальній пластинці та виконує функцію проміжної ланки при перенесенні енергії світла від хлоросом на реакційні центри [2, 7, 11, 12]. Склад фоторецепторних молекул у різних видів зелених сіркобактерій досліджено недостатньо.

У цій роботі наводяться дані про природу фотосинтезувальних пігментів *Chlorobium limicola* Ya-2002.

У досліджах використовували культуру зелених фотосинтезувальних сіркових бактерій *C. limicola* Ya-2002 [17]. Бактерії вирощували у рідкому середовищі GSB [16] протягом 8–10 діб за температури 24–25°C у колбах Ерленмейєра, заповнених середовищем так, щоб не залишалось пухирців повітря. Засіяні колби протягом усього періоду вирощування освітлювали лампою розжарювання потужністю 25 Вт, використовуючи червоний світлофільтр, що пропускає світлові промені з довжиною хвилі 700–800 нм. Інтенсивність освітлення вимірювали за допомогою люксметра Ю-116.

Біомасу бактерій визначали фотоелектроколориметрично на ФЕК-2 МП-УХЛЧ 4.2 ($\lambda = 450$ нм, довжина оптичного шляху 3 мм).

Пігментний склад клітин аналізували після їх відділення від культуральної рідини, центрифугуванням при 8 000 об/хв протягом години. Надосадову рідину зливали, клітини двічі відмивали мінеральним середовищем GSB, висушували на склі та розтирали з кварцовим піском. Окремі пігменти екстрагували сумішшю етанолу й ацетону у співвідношенні 1:1, процедуру екстракції повторювали чотири рази. Екстракти

об'єднували та використовували для хроматографічного розділення пігментів і вивчення їхніх спектральних характеристик.

Хроматографічне розділення пігментів проводили на силуфольних пластинках Silufol (Kavalier, Чехословаччина) у системі розчинника ацетон: бензин: петролейний ефір: гексан (10:10:3:10) [10]. Швидкість руху пігментів при хроматографії визначали за величиною Rf. Окремі пігменти знімали зі силікагелю, переносили у пробірки і проводили їх елюцію. Каротиноїди елюювали ацетоном і потім етанолом, бактеріохлорофіли – етанолом. Спектри поглинання екстрагованих пігментів реєстрували на спектрофотометрі Specord M – 40.

Склад і природа бактеріохлорофілів та каротиноїдів у різних представників фототрофів суттєво відрізняється [11]. Для попереднього вивчення природи пігментів *C. limicola* Ya-2002 спочатку визначили спектри поглинання клітин. Цей показник досить часто застосовують у практиці попередньої ідентифікації пігментів фотосинтезувальних сіркових бактерій. На рис. 1 наведений спектр поглинання клітин *C. limicola* Ya-2002, на якому чітко виділяють два абсорбційні максимуми в ділянці 400–450 нм та 720–760 нм, що характерно для пігментів каротиноїдної та бактеріохлорофільної природи.

Для більш повного вивчення природи окремих пігментів клітини бактерій руйнували. Бактеріохлорофіли та каротиноїди екстрагували сумішшю етанолу з ацетоном і визначали характер поглинання пігментів. Як і у випадку з інтактними клітинами, максимуми поглинання отриманих екстрактів припадали на зони, характерні для каротиноїдів і бактеріохлорофілів (рис. 2).

При хроматографічному розділенні екстракту виявилось, що пігменти на хроматограмах розділяються на чотири основні зони (рис. 3), які відрізняються за забарвленням і швидкістю руху (табл. 1).

Остаточна ідентифікація пігментів була проведена після їхньої елюції з хроматограм із подальшим визначенням їхніх спектральних характеристик. Очищені

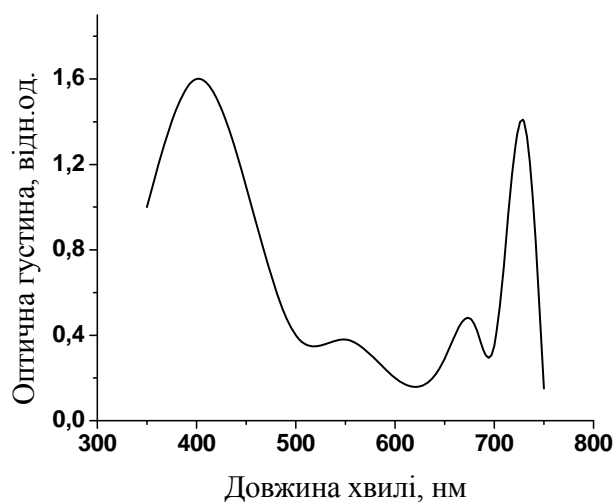


Рис. 1. Спектр поглинання інтактних клітин *C. limicola* Ya-2002.

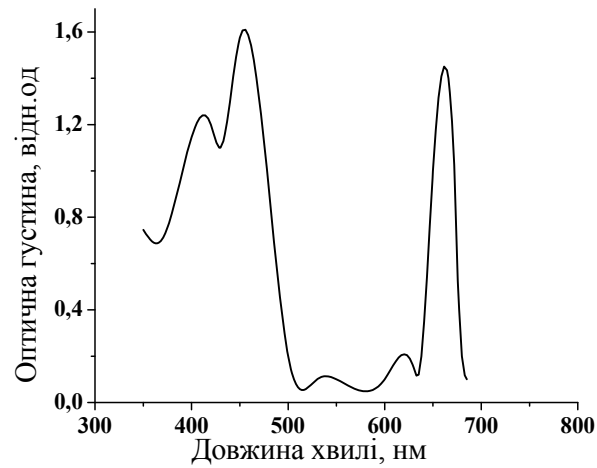


Рис. 2. Спектр поглинання екстрагованих пігментів *C. limicola* Ya-2002.

хроматографічно каротиноїди виявляли максимуми поглинання при 430 і 466 нм, що характерно для хлоробактину й ізореніратину (рис. 4).

Основними бактеріохлорофілами екстракту клітин *C. limicola* Ya-2002 виявилися бактеріохлорофіл – *c* (його максимум поглинання припадає на 668 нм), та бактеріохлорофіл – *d* (максимум поглинання при 655 нм) (рис. 5, 6, табл. 1), що відповідає даним літератури [10, 11].

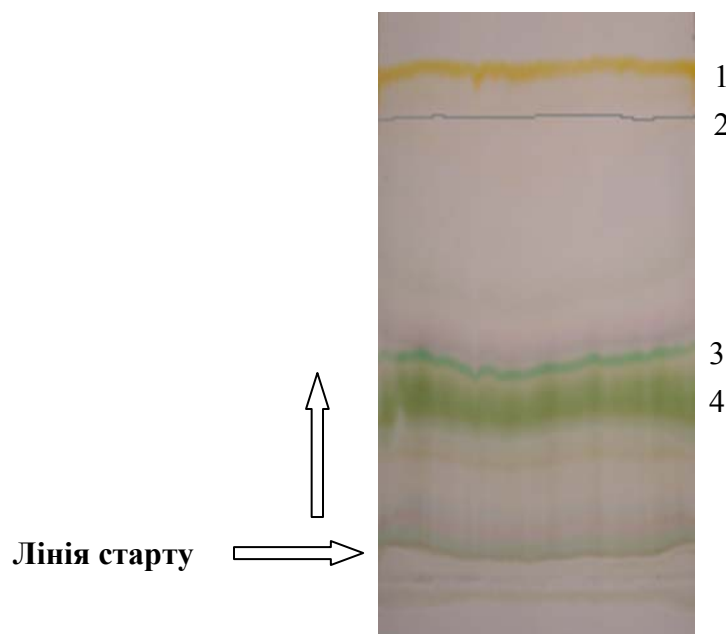


Рис. 3. Хроматограма пігментів, екстрагованих із *C. limicola* Ya-2002. 1,2 – каротиноїди, 3,4 – бактеріохлорофіли.

Таблиця 1

Властивості пігментів зелених сіркобактерій *C. limicola* Ya-2002

Фракція	Забарвлення	Величина Rf	Основні максимуми поглинання	Ідентифікація пігментів	Максимуми поглинання пігментів у органічних розчинниках (згідно з даними літератури)
1	Яскраво-жовте	0,90	433	Хлоробактин	430–433 [9, 10]
2	Коричнево-рожеве	0,86	466	Ізоренієратин	466 [9, 10]
3	Світло-зелене	0,60	655	Бактеріо хлорофіл – <i>d</i>	650–655 [11, 13]
4	Темно-зелене	0,46	668	Бактеріо хлорофіл – <i>c</i>	660–668 [11, 13]

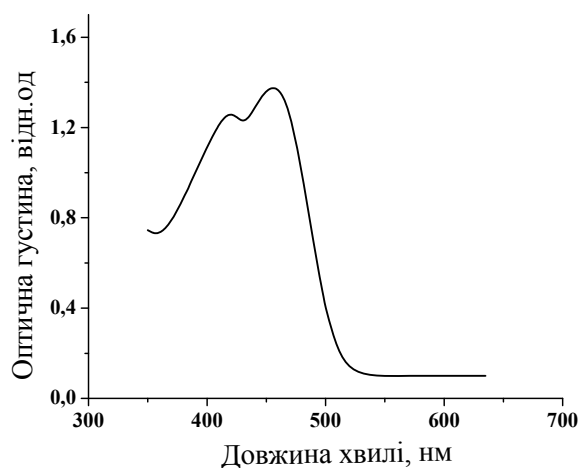


Рис. 4. Спектр поглинання каротиноїдів, елюйованих із хроматограм (430 – хлоробактин, 466 – ізоренієратин).

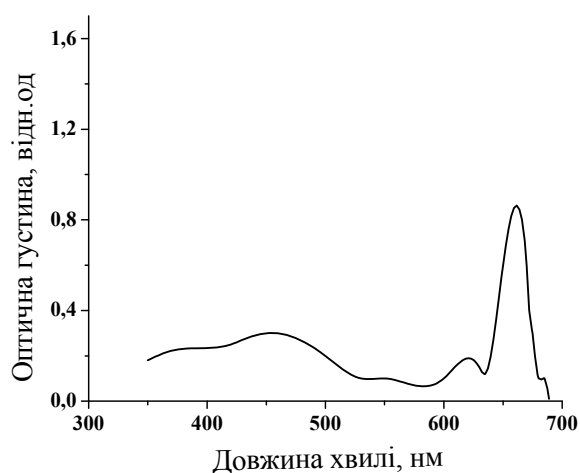


Рис. 5. Спектр поглинання світло-зеленого пігменту (бактеріохлорофіл *c*).

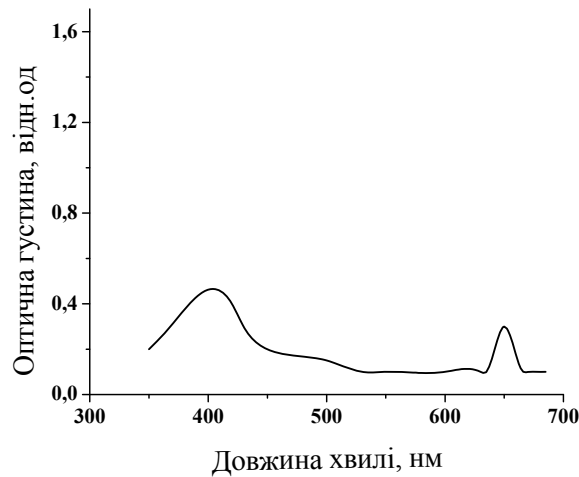


Рис. 6. Спектр поглинання темно-зеленого пігменту (бактеріохлорофіл *d*).

Таким чином, у клітинах *C. limicola* Ya-2002 виявлено фотосинтезувальні пігменти, які за хроматографічною рухливістю та спектральними характеристиками ідентифіковано з бактеріохлорофілами *c* і *d*, каротиноїди в клітинах представлені хлоробактином та ізоренієратином.

1. Горішний М. Б., Гудзь С. П., Гнатуш С. О. Метаболізм глюкози та глікогену у клітинах зелених фотосинтезувальних сіркових бактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002 // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 46. С. 129–136.
2. Кондратьєва Е. Н. Фотосинтезирующие бактерии. М.: Изд-во Москов. ун-та, 1989. С. 82–103.
3. Современная микробиология // Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. Т. 1. С. 207–215, 413–416.
4. Brockmann J. H., Lipinski A. Bacteriochlorophyll *g*. A new bacteriochlorophyll from *Heliobacterium chlorum* // Arch. Microbiol. 1983. Vol. 136. P. 17–19.
5. Brune D. C., Gerola P. D., Olson J. M. Circular dichroism of green bacterial chromosomes // Photosynth. Research. 1990. Vol. 24. P. 253–263.
6. Dorssen R. J., Gerola P. D., Olson J. M., Amesz J. Optical and structural properties of chromosomes of the green photosynthetic bacteria *Chlorobium limicola* // Biochim. Biophys. Acta. 1986. Vol. 848. P. 69–76.
7. Frigaard N. Spectrochromatography of photosynthetic pigments as a fingerprinting technique for microbial phototrophs // FEMS Microbiol. Ecol. 1996. Vol. 20. P. 69–77.
8. Gest H., Favinger J. *Heliobacterium chlorum*, an anoxy genie brownish-green photosynthetic bacterium, containing a new form of bacteriochlorophyll // Arch. Microbiol. 2002. Vol. 136. P. 11–16.
9. Holo H., Broch-Due M., Ormerod J. G. Glycolipids and the structure of chlorosomes in green bacteria // Arch. Microbiol. 1985. Vol. 143. P. 94–99.
10. Kjaer B., Frigaard N.U., Yang F. et al. The reaction center complex from the green sulphur bacterium *Chlorobium vibrioforme* contains menaquinone-7 which functions as the electron acceptor A1 // Biochem. 1998. Vol. 37. P. 3237–3242.

11. *Larkum A. W.* The evolution of chlorophylls, in: Chlorophylls. Boca Raton.: CRC Press, 1991. P. 367–383.
12. *Olson J. M.* Chlorophyll organization in green photosynthetic bacteria // Biochim. Biophys. Acta. 1980. Vol. 594. P. 33–51.
13. *Otte S. C., van de Meent E. J., van Veelen P. A.* et al. Identification of the major chromosomal bacteriochlorophylls of the green sulfur bacteria *Chlorobium vibrioforme* and *Chlorobium phaeobacteroides*; their function in lateral energy transfer // Photosynth. Res. 1993. Vol. 35. P. 159–169.
14. *Overmann J., Tuschak C.* Phylogeny and molecular fingerprinting of green sulfur bacteria // Arch. Microbiol. 1997. Vol. 167. P. 302–309.
15. *Repeta D. J., Simpson D. J., Jorgensen B. B., Janasch H. W.* Evidence for anoxygenic photosynthesis from the distribution of bacteriochlorophylls in the Black Sea // Nature. 1989. Vol. 12. P. 69–72.
16. *Savikhin S., Zhou W., Blankenship R. E., Struve W. S.* Femtosecond energy transfer and spectral equilibration in bacteriochlorophyll a-protein antenna trimers from the green bacterium *Chlorobium tepidum* // Biophys. J. 1994. Vol. 66. P. 110–114.
17. *Smith H.* Nomenclature of the bacteriochlorophylls *c*, *d* and *e* // Photosynth. Res. 1994. Vol. 41. P. 23–26.

PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS *CHLOROBIVM LIMICOLA* YA-2002

M. Gorishniy, C. Gudz

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: M_Gorishniy@ukr.net*

The nature of photosynthetic pigments of green sulfur bacteria *Chlorobium limicola* Ya-2002 was investigated. According to chromatographic mobility and absorption maxima at 668 and 655 nm, pigments were identified as bacteriochlorophylls *c* and *d*. Among carotenoid pigments chlorobactin and isorenieratene were revealed.

Key word: green sulfur bacteria, bacteriochlorophylls, carotenoids.

ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЕ ПИГМЕНТЫ *CHLOROBIVM LIMICOLA* YA-2002

М. Горишний, С. Гудзь

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: M_Gorishniy@ukr.net*

Исследована природа фотосинтезирующих пигментов у зеленых серных бактерий *Chlorobium limicola* Ya-2002. По хроматографической подвижности и максимумам поглощения при 668 и 655 нм пигменты идентифицированы как бактериохлорофиллы *c* и *d*. Среди каротиноидных пигментов обнаружены хлоробактин и изорениэратин.

Ключевые слова: зеленые серобактерии, бактериохлорофиллы, каротиноиды.

Стаття надійшла до редколегії 02.04.09

Прийнята до друку 09.04.09