

**ВПЛИВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ВЛАСТИВОСТІ
PELOCHROMATIUM ROSEO-VIRIDAE****І. Кушкевич, С. Гнатуш, С. Гудзь, М. Друль, А. Федорович**

Львівський національний університет імені Івана Франка

вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net

Вивчено ріст фототрофних зелених сіркобактерій *Pelochromatium roseo-viridae* за впливу різних концентрацій солей важких металів. Показано, що їх внесення у середовище пригнічує ріст бактерій. Визначено якісний і кількісний склад основних фотосинтезувальних пігментів у клітинах за цих умов.

Ключові слова: Кадмій, Цинк, Плюмбум, Купрум, сіркобактерії, бактеріохлорофіли, каротиноїди.

У природних умовах на межі анаеробної ділянки водойм розвиваються мікроорганізми, які здійснюють біологічне окиснення сірководню [1]. Фототрофні бактерії, зокрема зелені сіркобактерії, є першим бар'єром на шляху поширення сірководню у верхні шари водойми, що забезпечує можливість розвитку там рослинних і тваринних організмів. За достатньої освітленості ці мікроорганізми разом з пурпуровими сіркобактеріями стають основними споживачами сірководню, використовуючи його як донор електронів у процесі фотосинтезу [2]. При цьому вони здійснюють окиснення сірководню до сірки і сульфатів.

Із водойм, що безпосередньо прилягають до Яворівського сіркового родовища, виділені фототрофні зелені сіркобактерії. Вони можуть формувати угруповання, де навколо центрального мікроорганізму розміщуються зелені сіркобактерії. Про природу мікроорганізмів, які утворюють асоціації, немає достатньо інформації. Залишаються також нез'ясованими причини їхнього формування.

Метою роботи було вивчення фізіолого-біохімічних властивостей зелених сіркових бактерій *Pelochromatium roseo-viridae* за впливу солей важких металів.

У роботі використовували фотосинтезувальні сіркобактерії *Pelochromatium roseo-viridae*, виділені з водойм Яворівського сіркового родовища.

Бактерії вирощували у рідкому середовищі для зелених сіркових бактерій (GSB) такого складу (г/л): Калій дигідрофосфат – 0,30; Амоній хлорид – 0,34; Калій хлорид – 0,34; Кальцій хлорид дигідрат – 0,15; Магній сульфат гептагідрат – 0,5.

Перед посівом у середовище стерильно вносили вітамін B₁₂, а також речовини з 10%-х розчинів (мл/л): Натрій ацетат – 10; Натрій гідрокарбонат – 15; Натрій сульфід наногідрат – 2,5; Натрій піруват – 10; Розчин мікроелементів – 1,0. рН середовища – 6,8.

Розчин мікроелементів містив (мг/л): FeSO₄ · 7H₂O – 2000; CoCl₂ · 6H₂O – 190; MnCl₂ · 4H₂O – 100; ZnCl₂ – 70; Na₂MoO₄ · 2H₂O – 36; NiCl₂ · 6H₂O – 24; H₃BO₃ – 6; CuCl₂ · 2H₂O – 2.

FeSO₄ розчинений 25%-м розчином HCl (10 мл), решта – дистильована вода.

Для нагромадження біомаси бактерії *P. roseo-viridae* культивували протягом 10 діб за анаеробних умов при температурі 25–28°C і постійному освітленні лампою розжарю-

вання з використанням червоного світлофільтра. Анаеробних умов досягали, заповнюючи 20 мл пробірки середовищем так, щоб під гумовим корком не залишалося повітря.

Для дослідження впливу на ріст мікроорганізмів різних концентрацій металів їх вносили у середовище у вигляді солей CdSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ та CuSO_4 у концентраціях 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 та 2,5 мМ. Біомасу культури визначали турбідометрично, використовуючи КФК-3 ($\lambda=450$ нм, оптичний шлях 3 мм).

Для визначення якісного та кількісного складу фотосинтезувальних пігментів висушені клітини бактерій руйнували розтиранням із кварцовим піском [5]. Для цього суспензію *P. roseo-viridae* центрифугували протягом 45 хв при 8000 об/хв. Надосадову рідину зливали, а одержану біомасу наносили на поверхню скла і висушували при температурі 40°C.

Пігменти екстрагували сумішшю етанолу й ацетону (1:1) до повного знебарвлення осаду. Одержані екстракти використовували для реєстрації спектрів поглинання [6–8].

Хроматографічне розділення пігментів проводили на силуфолових пластинках (“Sorbfil”, Росія) у висхідному потоці системи розчинників бензин : ацетон : петролейний ефір : гексан (10:10:3:10) [5]. Стандартними зразками (свідками) були астаксантин із панцира креветок та β -каротин із клітин гриба *Blakeslea trispora*.

Ідентифікацію пігментів проводили за забарвленням на хроматограмах, значеннями R_f та максимумами поглинання при різних довжинах хвиль [8, 9].

Спектри поглинання екстрагованих пігментів записували у видимій і ультрафіолетовій ділянках спектра на двопроменевому спектрофотометрі “Specord M-40”. Вміст пігментів розраховували на 1 г сухої ваги за формулою [5]:

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

де A – кількість пігменту, мг/г, C – концентрація пігменту, г/л; V – об’єм екстракту, мл; H – навязка клітин, г; K – відношення об’єму елюату до об’єму розчину, нанесеного на хроматограму.

Концентрацію пігментів 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, $E_{\text{охл}}=930,0$ при 770 нм), $\text{л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; l – товщина поглинаючого шару, см.

Статистичні показники вираховували з експериментальних даних (середнє арифметичне – M ; стандартна похибка середнього арифметичного – m). Для оцінки достовірності різниці між статистичними параметрами альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента [3]. Достовірною вважалася різниця при $P>0,95$. Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програму Origin.

Мікроскопічні дослідження виділеної культури показали, що вона є грамнегативною, клітини нерухомі. Їх розміри коливаються в межах $0,3\text{--}1,2 \times 0,7\text{--}2,7$ мкм. Розмножуються бінарним поділом. При цьому клітини інколи залишаються сполученими у ланцюжки різної форми і довжини. Ендоспор не виявили. Ріст зелених сіркобактерій спостерігали за наявності світла, що забезпечує процес фотосинтезу. Культуру ідентифікували як *Pelochromatium roseo-viridae*.

Визначали вплив різних концентрацій CdSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ та CuSO_4 на ріст *P. roseo-viridae* у середовищі протягом десяти діб. Як видно з рис. 1, при вирощуванні культури у середовищі, яке не містило солі металу (контроль), біомаса була максимальною. Внесення солей різних металів впливало на ріст бактерій по-різному. Найменший вплив виявляв цинк сульфат за всіх досліджуваних концентрацій (рис. 1, Б). На десяту добу вирощування біомаса культури знижувалася від 2% (за внесення 1 мМ солі) до 20% (за внесення 2,5 мМ ZnSO_4).

Дещо сильніший вплив на нагромадження біомаси спостерігали за наявності в середовищі різних концентрацій CuSO_4 (рис. 1, Г). Внесення 0,5 мМ солі і вище в середовище вже з другої доби росту пригнічувало нагромадження біомаси. На восьму добу біомаса знижувалася на 26% – при 0,5 мМ купрум сульфату та на 40% – при збільшенні концентрації до 1 мМ. При внесенні солі у концентраціях 1,0; 1,5 та 2 мМ ми не спостерігали суттєвої різниці у нагромадженні біомаси. Лише збільшення концентрації до 2,5 мМ знижувало нагромадження біомаси культури на 50%. Найсильніший вплив виявляли за внесення в середовище кадмій сульфату (рис. 1, А). Вже за концентрації 0,5 мМ

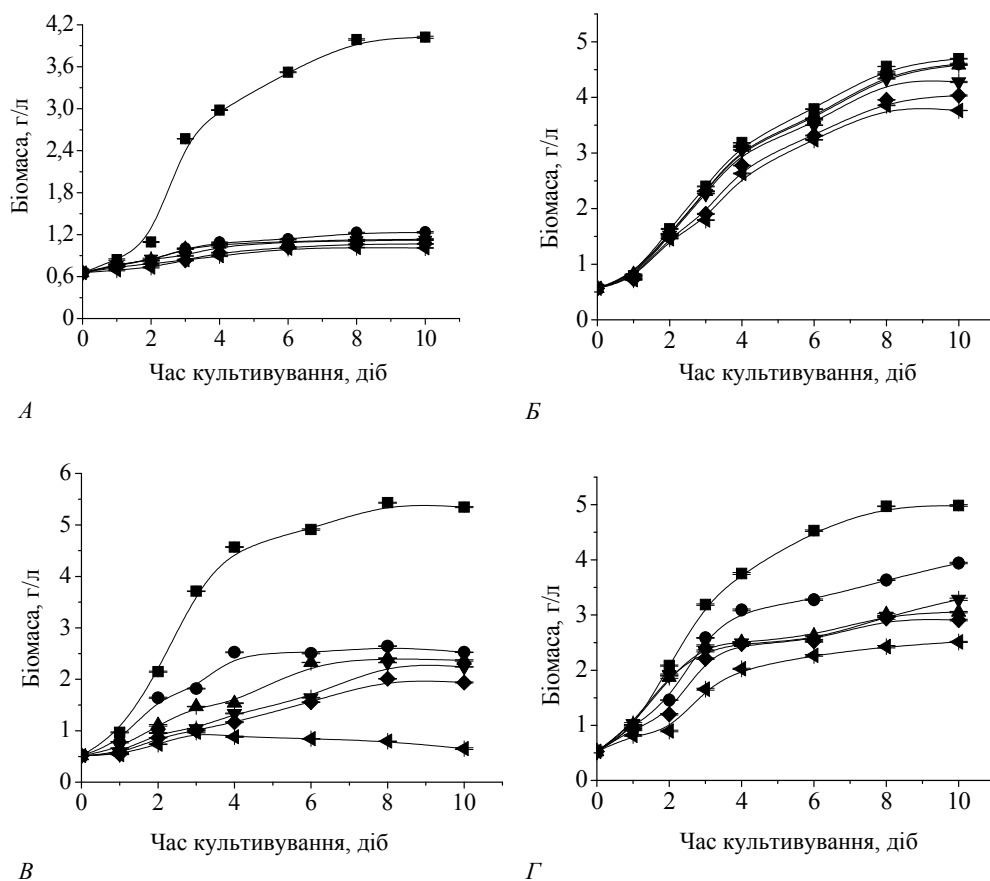


Рис. 1. Ріст *P. roseo-viridae* у середовищі GSB за різних концентрацій солей важких металів: А – CdSO_4 ; Б – ZnSO_4 ; В – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; Г – CuSO_4 ; ■ – контроль; ● – 0,5 мМ; ▲ – 1 мМ; ▼ – 1,5 мМ; ◆ – 2 мМ; ◀ – 2,5 мМ.

солі в середовищі біомаса знижувалася на третю добу росту на 60%. При збільшенні концентрації до 1 мМ і вище не спостерігали росту протягом 10 діб.

При внесенні в середовище плюмбум нітрату (рис. 1, *B*) спостерігали залежність нагромадження біомаси від концентрації солі в середовищі. 2,5 мМ $Pb(NO_3)_2$ в середовищі призводило до повного інгібування ростових процесів. Плюмбум нітрат у концентрації від 0,5 до 2 мМ знижував нагромадження біомаси у 2–3 рази.

У фотосинтезувальних зелених сіркобактерій частина пігментів локалізується безпосередньо в цитоплазматичній мембрані, а частина – в особливих структурах – хлоросомами. Це еліпсоподібні утвори, оточені тонкою білковою оболонкою, яка складається з окремих глобул. Хлоросоми розміщуються біля цитоплазматичної мембрани [4]. Немає достатньо чітких даних про походження такого фотосинтезувального апарату. Процес його утворення і форма залежать від умов росту бактерій.

Відомо, що основними пігментами зелених бактерій є бактеріохлорофіли *c* і *d*. У незначній кількості вони містять бактеріохлорофіл *e* [9]. Крім того, всі фототрофні бактерії містять каротиноїди, склад яких у різних видів неоднаковий. У зелених сіркобактерій основним каротиноїдом є хлоробактин. Крім того, вони синтезують ізоренієратин. Від складу та співвідношення пігментів залежить забарвлення бактерій.

За впливу різних концентрацій $CdSO_4$, $ZnSO_4$, $Pb(NO_3)_2$, $CuSO_4$ у розчині екстрагованих пігментів із клітин *P. roseo-viridae* основні максимуми поглинання спостерігали при 356, 384, 408, 430, 466, 592, 654, 668 нм, що підтверджує наявність бактеріохлорофілів *c*, *d*, *e* і каротиноїдів ізоренієратину та хлоробактину [8, 9] (рис. 2, 3).

Як видно з рис. 2, внесення у середовище $CdSO_4$ і $ZnSO_4$ практично не впливало на якісний склад пігментів. За наявності в середовищі $CdSO_4$ спостерігали появу піків у ділянці 356 нм і 384 нм, що відповідають бактеріохлорофілові *c*. За внесення $ZnSO_4$ лише у варіанті з 0,5 мМ солі спостерігали пік у ділянці 356 нм.

Хроматографічне розділення компонентів екстрактів клітин *P. roseo-viridae* дало змогу виявити пігменти, різні за забарвленням та величиною *Rf* (табл. 1). Зазначимо, що на хроматограмах переважали темно-зелені, світло-зелені, коричнево-зелені, яскраво-жовті та коричнево-рожеві ділянки. Дослідження спектрів поглинання та хроматографічний розподіл дозволили ідентифікувати пігменти і визначити їхній вміст у клітинах бактерій *P. roseo-viridae*, вирощених при різних концентраціях солей важких металів.

За наявності у середовищі $CuSO_4$ спостерігали піки в ділянці 408 нм (бактеріохлорофіл *d*), які були слабше виражені за наявності інших солей. Піки в ділянці 430 нм, 466 нм (хлоробактин, ізоренієратин відповідно) спостерігали за внесення у середовище $Pb(NO_3)_2$ і $CuSO_4$.

Проведено визначення вмісту пігментів у клітинах *P. roseo-viridae*. При рості у контрольному середовищі Ван Ніля вміст бактеріохлорофілів *c*, *d* та *e* в клітинах бактерії *P. roseo-viridae* був найвищим (рис. 4).

Таблиця 1

Хроматографічна характеристика пігментного складу бактерій *P. roseo-viridae*

Назва пігменту	Колір пігменту	Спектри поглинання, λ , нм	Значення <i>Rf</i>
Бактеріохлорофіл <i>c</i>	Темно-зелений	356, 384, 668	0,45
Бактеріохлорофіл <i>d</i>	Світло-зелений	408, 654	0,59
Бактеріохлорофіл <i>e</i>	Коричнево-зелений	592	0,62
Хлоробактин	Яскраво-жовтий	430	0,91
Ізоренієратин	Коричнево-рожевий	466	0,85

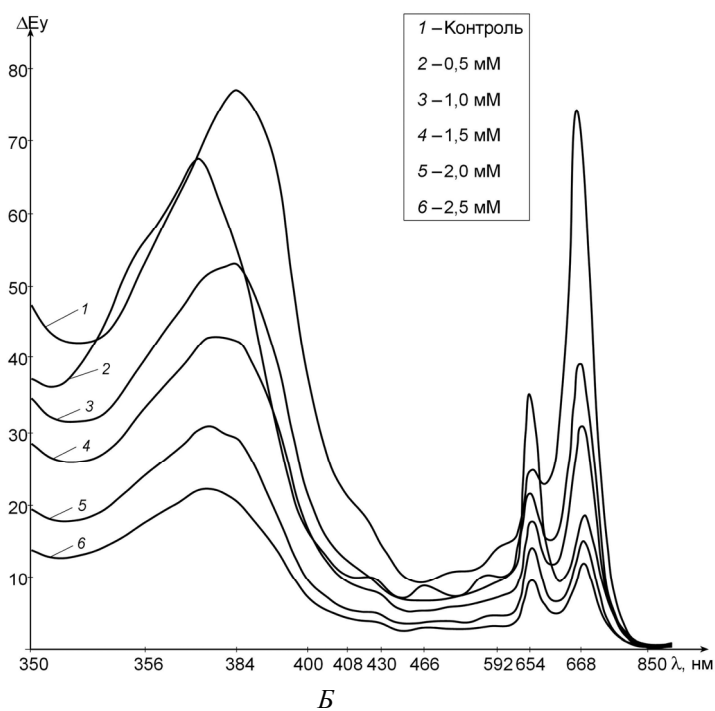
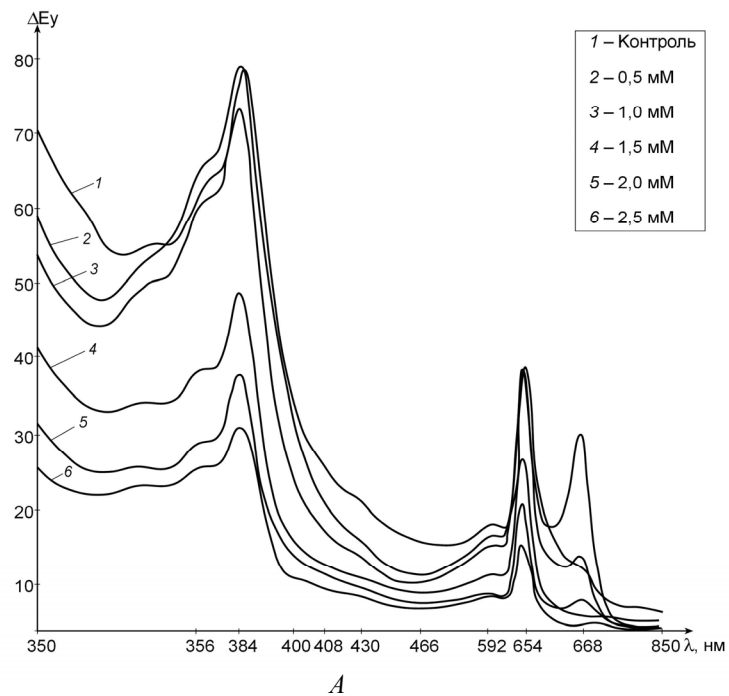


Рис. 2. Спектри поглинання пігментів із клітин *P. roseo-viridae*, вирощених за різних концентрацій: А – CdSO_4 ; Б – ZnSO_4 .

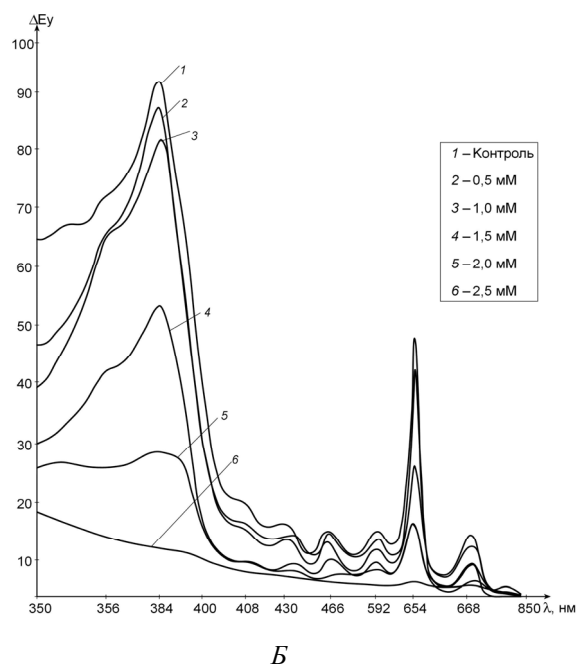
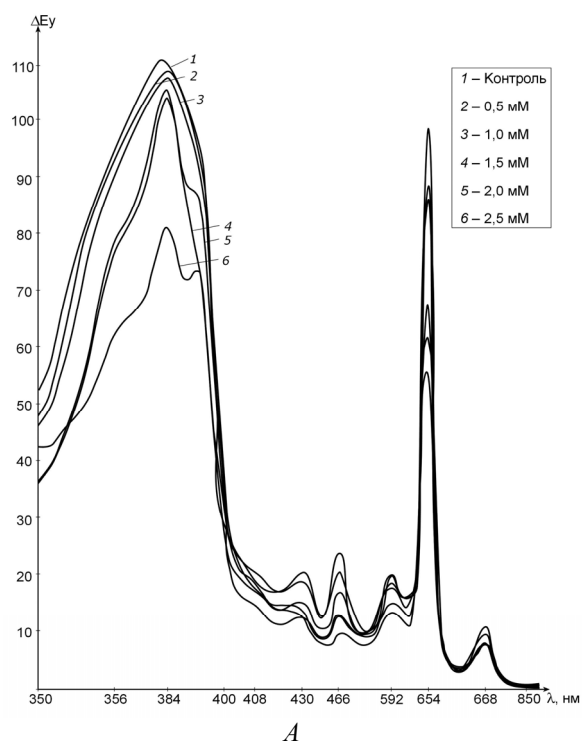


Рис. 3. Спектри поглинання пігментів із клітин *P. roseo-viridae*, вирощених за різних концентрацій: А – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; Б – CuSO_4 .

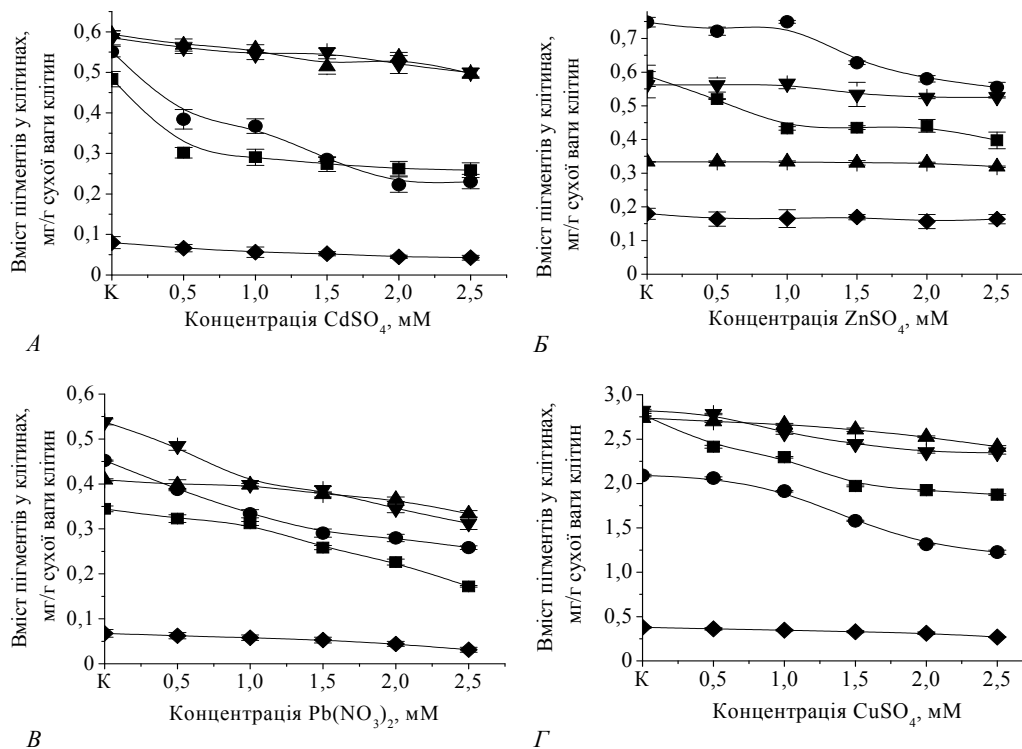


Рис. 4. Вміст фотосинтезувальних пігментів бактерій *P. roseo-viridae* за впливу різних концентрацій солей металів: А – CdSO₄; Б – ZnSO₄; В – Pb(NO₃)₂; Г – CuSO₄; ■ – ізоренієратин; ● – хлоробактин; ▲ – бактеріохлорофіл d; ▼ – бактеріохлорофіл c; ◆ – бактеріохлорофіл e.

Як видно з рис. 4 (Б, Г), внесення ZnSO₄ і CuSO₄ в концентрації 0,5 мМ не впливало на вміст пігментів у клітинах. Збільшення концентрації цих солей до 1 мМ і вище знижувало вміст ізоренієратину і хлоробактину. Незначно знижувався рівень бактеріохлорофілів e і c за внесення в середовище CuSO₄ у концентрації 1,5 мМ і вище.

Вплив CdSO₄ і Pb(NO₃)₂ на вміст пігментів у клітинах бактерій *P. roseo-viridae* був виражений значно сильніше (рис. 4, А, В). Внесення в середовище Pb(NO₃)₂ у концентрації 0,5 мМ знижувало вміст бактеріохлорофілів d, c, ізоренієратину та хлоробактину. Зростання концентрації п्लомбум нітрату до 2,5 мМ знижувало вміст ізоренієратину на 50%, хлоробактину – на 43%, бактеріохлорофілу c – на 42%, бактеріохлорофілу d – на 18%.

Аналогічні закономірності спостерігали і за умови внесення CdSO₄ в середовище. Внесення солі в концентрації 2,5 мМ знижувало вміст хлоробактину на 58%, ізоренієратину – на 47%, бактеріохлорофілу d – на 16%, бактеріохлорофілу c – на 15%.

Вміст бактеріохлорофілу e в усіх досліджуваних варіантах не залежав від концентрації металу в середовищі.

Очевидно, що за умов росту *P. roseo-viridae* в середовищі Ван Ніля зі солями важких металів відбувається пригнічення ростових процесів за рахунок зниження інтенсивності фотосинтезу. Синтез пігментів зелених сіркових бактерій *P. roseo-viridae* є найбільш чутливим до впливу кадмій сульфату і п्लомбум нітрату і менше чутливим – до цинк сульфату і купрум сульфату.

1. *Галушка А., Перетятко Т., Гудзь С.* Бактерії циклу сірки та їхня роль у природі // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2007. Вип. 43. С. 61–77.
2. *Гудзь С. П., Баран І. М., Гнатуш С. О., Кім Л. Я.* Зелені сіркобактерії водойм Яворівського сіркового родовища // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2002. Вип. 28. С. 246–251.
3. *Лакін Г. Ф.* Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
4. *Ленгелер Й., Дреус Г., Шлегель Г.* Современная микробиология. Прокариоты: В 2 т. Т. 1. М.: Мир, 2005. 656 с.
5. *Мусієнко М. М., Паршикова Т. В., Славний П. С.* Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин. К.: Фітоцентр, 2001. 200 с.
6. *Паперно Т. Я., Позняков В. П., Смирнова А. А., Элагин Л. М.* Физико-химические методы исследования в органической и биологической химии. М.: Просвещение, 1977. 176 с.
7. *Britton G.* General carotenoid methods // *Methods in enzymology*. London: Academic press, 1985. Vol. 3. Part B. P. 113–145.
8. *Frigard et al.* Spectrochromatography of photosynthetic pigments as fingerprinting technique for microbial phototrophs // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1996. N 20. P. 69–77.
9. *Oelze J.* Analysis of Bacteriochlorophylls // *Method microbial.* 1985. N 18. P. 257–284.

INFLUENCE OF HEAVY METALS ON THE *PELOCHROMATIUM ROSEO-VIRIDAE* PROPERTIES

I. Kushkevych, S. Hnatush, S. Gudz, M. Drul, A. Fedorovych

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

The growth of phototrophic sulfur bacteria *Pelochromatium roseo-viridae* under the influence of different heavy metals' salts concentrations was investigated. The repression of the bacteria growth after metals' salts addition into medium was shown. Qualitative and quantitative composition of basic photosynthetic pigments in cells under these conditions was determined.

Key words: Cadmium, Zinc, Lead, Copper, sulfur bacteria, bacteriochlorophylls, carotenoids.

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА СВОЙСТВА *PELOCHROMATIUM ROSEO-VIRIDAE*

И. Кушкевич, С. Гнатуш, С. Гудзь, М. Друль, А. Федорович

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

Изучен рост фототрофных зелёных бактерий *Pelochromatium roseo-viridae* под воздействием различных концентраций солей тяжелых металлов. Показано, что их внесение в среду угнетает рост бактерий. Определены качественный и количественный составы главных фотосинтезирующих пигментов в этих условиях.

Ключевые слова: Кадмий, Цинк, Свинец, Медь, серные бактерии, бактериохлорофиллы, каротиноиды.

Стаття надійшла до редколегії 12.01.09

Прийнята до друку 19.02.09