

Мікробіологія

УДК 579.266 / 68 (474)

**МЕТАБОЛІЗМ ГЛЮКОЗИ ТА ГЛІКОГЕНУ У КЛІТИНАХ
ЗЕЛЕНИХ ФОТОСИНТЕЗУВАЛЬНИХ СІРКОВИХ БАКТЕРІЙ
*CHLOROBIVM LIMICOLA YA-2002***

М. Горішний, С. Гудзь, С. Гнатуш

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: M_Gorishniy@ukr.net 8 067 492 76 81*

Зелені сіркові бактерії *Chlorobium limicola Ya-2002* в процесі аноксигенного фотосинтезу нагромаджують у клітинах глюкозу та глікоген. На середовищах з глюкозою, сахарозою, галактозою, мальтозою, лактатом, малатом кількість внутрішньоклітинних вуглеводів не змінювалася. Зростання рівня глікогену в клітинах спостерігали при додаванні до середовища пірувату й ацетату. При цьому зменшення рівня вуглекислоти в середовищі (на 20%) супроводжувалося зниженням рівня біомаси при одночасному зростанні кількості глікогену в клітинах. Подальше зниження концентрації вуглекислоти веде до зменшення рівня біомаси і глікогену. Внутрішньоклітинна глюкоза і глікоген використовувалися відмитими клітинами *C. limicola Ya-2002*. На третю добу інкубації в темноті вміст вуглеводів у клітинах знижувався приблизно в три рази. При цьому у середовищі спостерігалося нагромадження ацетату. При інкубації клітин на світлі рівень внутрішньоклітинних вуглеводів практично не змінювався. Таким чином, утворені на світлі глюкоза і глікоген використовуються клітинами в темноті для підтримання конструктивного та енергетичного метаболізму.

Ключові слова: зелені сіркобактерії, глікоген.

Зелені фотосинтезувальні сіркобактерії (родина *Chlorobiaceae*) – облигатні фотолітоавтотрофи. Особливістю цих мікроорганізмів є наявність у клітинах спеціальних світлочутливих везикул хлоросом, які містять бактеріохлорофіли і каротиноїди [4, 6, 9].

Подібно до представників родини *Chloroflexaceae* та *Chromatiaceae*, вони не можуть використовувати воду як донор електронів і не утворюють молекулярний кисень у процесі фотосинтезу [7, 15]. Донорами електронів, які потрібні для утворення відновних еквівалентів, є сполуки сірки (здебільшого сірководень), які використовуються для асиміляційного відновлення CO₂.

У випадку достатньої освітленості водойм ці бактерії стають головними споживачами сірководню, використовуючи його як донор електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу [11].

При культивуванні зелених сіркобактерій *C. thosulfatophilum* у мінеральному середовищі за наявності H₂S і CO₂ на світлі в клітинах може нагромаджуватися глюкоза або продукти її полімеризації – поліглюкоза [14] чи глікоген [13, 14, 16].

Умови синтезу та роль цих вуглеводів у метаболізмі зелених сіркобактерій за різних умов культивування не з'ясовані. Можливо, глюкоза та продукти її полімеризації є резервним джерелом енергії при потраплянні бактерій в екстремальні умови [10].

У цій роботі наведені результати досліджень закономірностей нагромадження глюкози та продуктів її полімеризації у клітинах зелених сіркобактерій *C. limicola Ya-2002* залежно від умов культивування.

Використовували культуру зелених фотосинтезувальних сіркових бактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002, виділену на кафедрі мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка з водою Яворівського сіркового родовища, багатих сірководнем [1]. Бактерії культивували у рідкому середовищі Ван-Ніля [4] протягом 8–10 діб при температурі 24–25°C. Культуру вирощували в колбах Ерленмейера, заповнених середовищем так, щоб не залишалося пухирців повітря, остаточне зв'язування кисню забезпечувалося його взаємодією зі сірководнем, що входить до складу середовища. Засіяні бактеріями колби протягом усього періоду інкубування освітлювали променями з довжиною хвиль 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).

Клітини бактерій руйнували за допомогою ультразвукового дезінтегратора УЗДН–2Т частотою 22 кГц протягом 5 хв у скляних товстостінних пробірках, занурених у лід. Уламки клітин відділяли центрифугуванням при 15 тис. об./хв протягом 45 хв при 4°C. Отримані неклітинні екстракти відразу використовували для визначення вмісту глюкози. Вміст глюкози в неклітинних екстрактах визначали ферментативно, за допомогою аналітичного набору “Діаглюк-2” [2], глікоген із клітин виділяли за методом Захарової-Косенко [3].

Гідроліз полісахаридів проводили кип'ятінням у присутності 10Н H_2SO_4 протягом трьох годин. Гранули глікогену у клітинах виявляли за допомогою електронного трансмісійного мікроскопа УЕМВ–100Б. Вміст ацетату визначали за методом Бобко-П'ятницького [5]. Відмиті клітини бактерій інкубували в 50 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,0. Осадження компонентів культурального середовища проводили абсолютним ацетоном за методом [3]. Природу продуктів катаболізму глюкози і глікогену, що нагромаджувалися при інкубації відмитих клітин *C. limicola* Ya-2002, вивчали, використовуючи методи елементного аналізу та ІЧ-спектронетрії [3, 10]. На відміну від пурпурових сіркових бактерій, описані в літературі штами зелених сіркобактерій ростуть виключно фотолітоавтотрофно. Діоксид карбону в них зв'язується у відновному циклі трикарбонових кислот [4, 7], ключовими ферментами якого є 2-оксоглутарат: ферредоксин-оксидоредуктаза, фумаратредуктаза і АТФ-залежна цитрат-ліаза. Цей “спрощений” цикл трикарбонових кислот забезпечує клітини попередниками для біосинтезу клітинних компонентів. За наявності в середовищі H_2S і CO_2 зелені сіркобактерії можуть використовувати прості органічні сполуки (ацетат і піруват) для біосинтетичних процесів. За присутності ацетату в середовищі частка біомаси зелених сіркобактерій на 1 моль сульфіді зростає приблизно у три рази [11].

Для виявлення вуглеводів, які утворюються у клітинах *C. limicola* Ya-2002 у процесі фотосинтезу, культуру вирощували за умов освітленості та наявності CO_2 і H_2S . Після 10 діб культивування клітини бактерій руйнували, а неклітинний екстракт аналізували на наявність у ньому редуруючих цукрів [3]. В неклітинних екстрактах у великих кількостях була наявна глюкоза, вміст якої досягав 25–30 мг/г сухої ваги клітин. При кислотному гідролізі екстракту рівень глюкози зростав у два-три рази. Це свідчило про те, що глюкоза в клітинах перебуває як у вільному, так і в полімеризованому стані. На ультратонких зрізах клітин, вирощених за умов різної освітленості та наявності CO_2 і H_2S , добре видно розеткоподібні, не оточені мембраною, гранули глікогену, вміст якого сягає від 5 до 15% сухої ваги клітин (рис. 1).

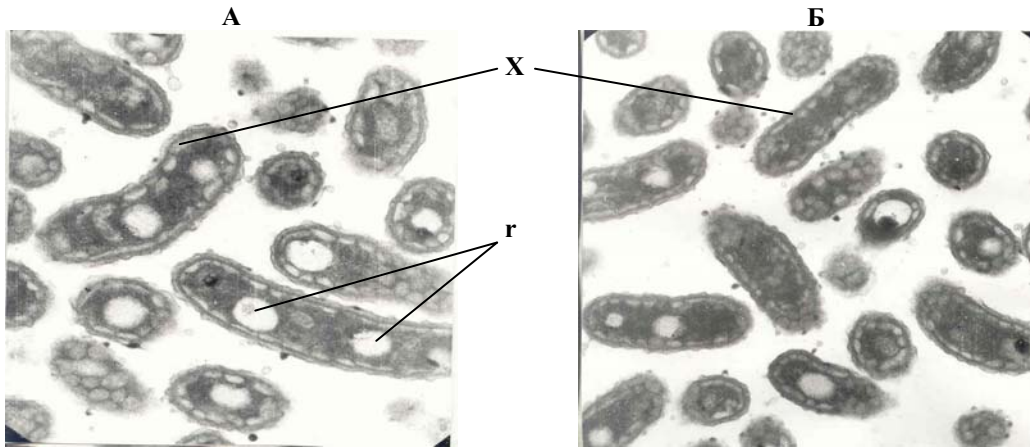


Рис. 1. Ультратонкі зрізи клітин *C. limicola* Ya-2002, вирощених за умов різної інтенсивності освітлення (А – 40 лк, Б – 100 лк) : X – хлоросоми, г – гранули глікогену (x 50 000).

Цікаво зазначити, що додавання до середовища глюкози, сахарози, галактози, мальтози, лактату, малату не супроводжувалося зміною рівня внутрішньоклітинної глюкози та глікогену (рис. 2).

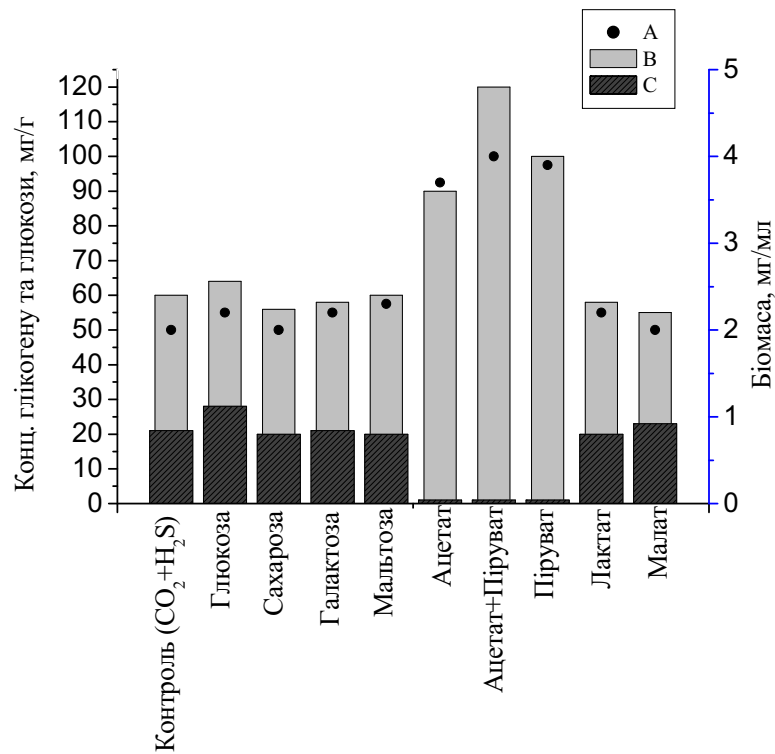


Рис. 2. Ріст (А), синтез глікогену (В) та глюкози (С) *C. limicola* Ya-2002 при додаванні до середовища органічних джерел живлення.

Лише внесення у середовище пірувату й ацетату супроводжувалося зростанням рівня глікогену в клітинах *C. limicola* Ya-2002 що, очевидно, пояснюється функціонуванням у досліджуваних бактерій циклу Арнона. У процесі його роботи утворюється ацетат, який за участю специфічної ацетаткарбоксілази карбоксилюється до пірувату з подальшим його перетворенням, у реакціях глюконеогенезу до глікогену [11, 14]. Характерно, що клітини з підвищеним рівнем синтезу глікогену, який спричинений додаванням пірувату й ацетату, на відміну від клітин, що виростили в присутності інших джерел вуглецю, практично повністю використовували ендогенну глюкозу (рис. 2).

Відсутність впливу екзогенної глюкози на рівень глікогену в клітинах, очевидно, обумовлена нездатністю *C. limicola* Ya-2002 транспортувати глюкозу в клітини. Відсутність росту зелених сіркобактерій на середовищах із глюкозою спостерігали інші автори [4, 8].

За наявності пірувату й ацетату в середовищі спостерігаються деякі відмінності в фотоасиміляції CO_2 клітинами. Так, при концентрації CO_2 у середовищі на рівні 60 мМ спостерігали максимальний ріст клітин і підвищений на 50% рівень глікогену в них (рис. 3). Незначне зменшення рівня вуглекислоти в середовищі на 20% супроводжувалося зниженням рівня біомаси, при одночасному зростанні рівня глікогену в клітинах приблизно на 30%. Подальше зменшення вмісту CO_2 супроводжувалося зниженням інтенсивності фотосинтезу. Зростання рівня глікогену в клітинах при незначному дефіциті вуглекислоти в середовищі, очевидно, можна пояснити пригніченням реакції карбоксилювання пірувату в оксалоацетат і його використання в конструктивному метаболізмі.

Дослідження вмісту вуглеводів у культуральній рідині *C. limicola* Ya-2002 показало, що утворені в процесі аноксигенного фотосинтезу вуглеводи не виділяються в середовище, а запасуються виключно в клітині. Про це свідчить негативний тест на глюкозу та інші редуруючі цукри до і після гідролізу культуральної рідини.

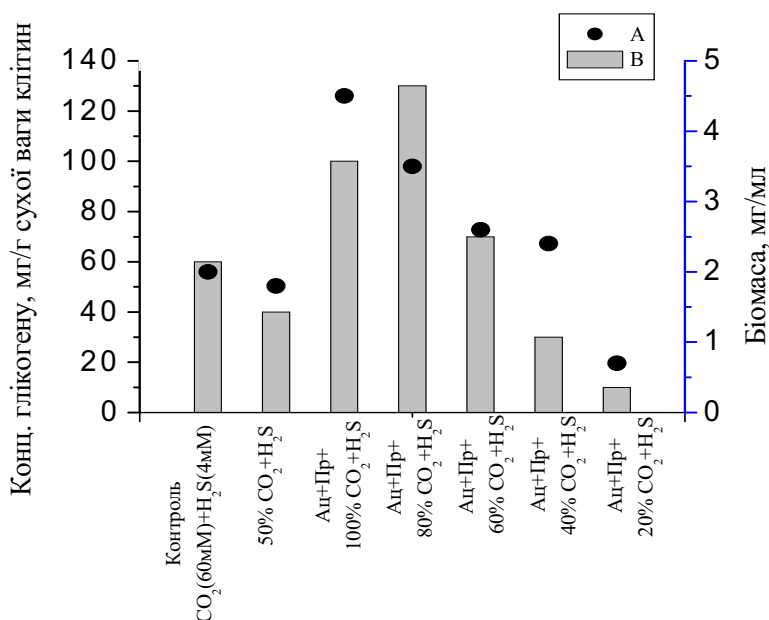


Рис. 3. Вплив ацетату (Ац) та пірувату (Пр) на ріст (А) і синтез глікогену (В) при зміні концентрації CO_2 в середовищі.

Щоб з'ясувати шляхи подальшого перетворення глікогену в наступних експериментах, відмиті клітини *C. limicola* Ya-2002 з високим вмістом цього полісахариду інкубували на світлі та в темноті. Після цього визначали рівень глікогену в клітинах і аналізували природу органічних речовин, які нагромаджувалися в інкубаційному середовищі. Виявилось, що за відсутності джерела енергії та наявності CO_2 і H_2S у середовищі клітини *C. limicola* Ya-2002 використовували значну кількість глікогену. Про це свідчило суттєве зниження його рівня у клітинах (рис. 4).

Елементний аналіз продуктів метаболізму глюкози, одержаних після їх осадження зі середовища інкубації, показав, що в культуральній рідині відмитих клітин, інкубованих у темноті, нагромаджуються органічні сполуки (С – 40,25%, Н – 4,5%, N – 0%).

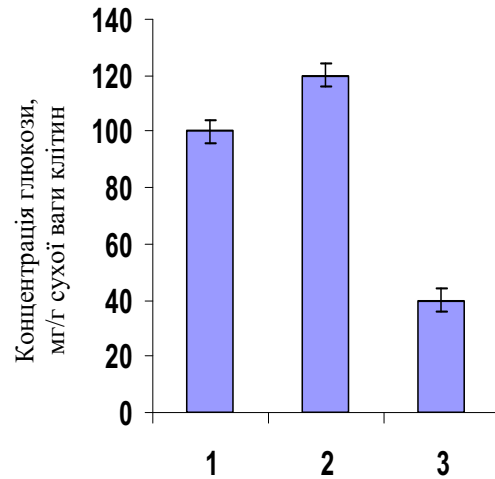


Рис. 4. Вміст глюкози (після гідролізу глікогену) в клітинах *C. limicola* Ya-2002 при інкубації на світлі (2) та в темноті (3). Час інкубації 80 год. Концентрація клітин в інкубаційній суміші 3 мг/мл. Контролем (1) були клітини, відділені від середовища вирощування.

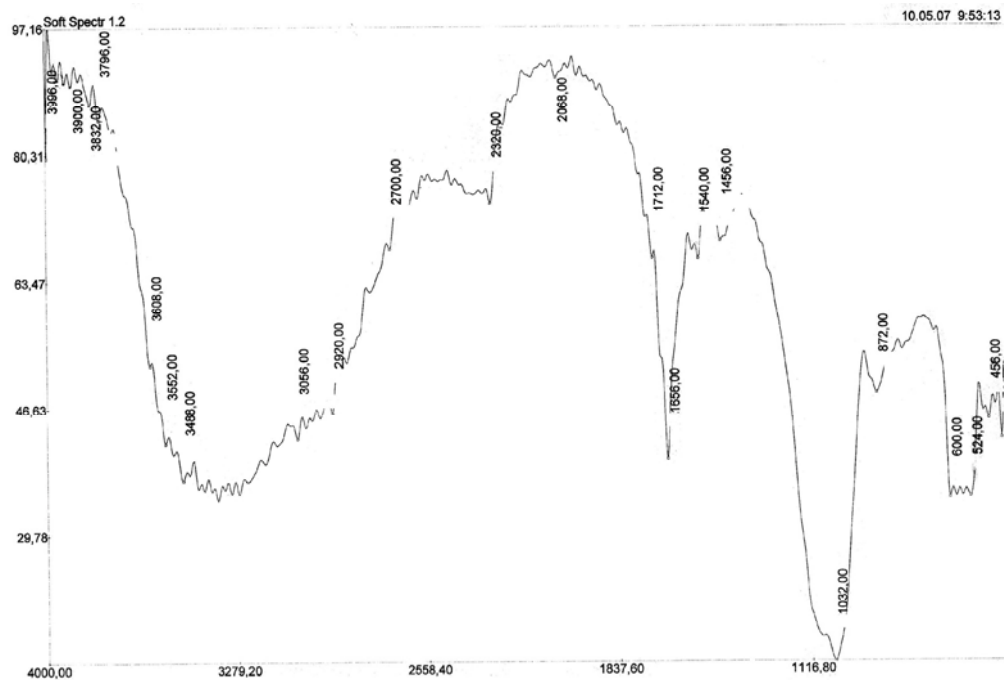


Рис. 5. Інфрачервоний спектр компонентів культуральної рідини *C. limicola* Ya-2002 за умов інкубації клітин у темноті.

Інфрачервона спектроскопія етилацетатної витяжки показала, що ці речовини характеризуються наявністю О–Н зв'язків (інтервал 3608–3056 cm^{-1}), $\text{CH}_3\text{--CH}_2$ зв'язків (1456 cm^{-1}), виявлено специфічне поглинання в області карбонільної групи (1656 cm^{-1}), метильної групи (2920 cm^{-1}), а також R–COOH груп (2700 cm^{-1}) та інших, що свідчить про наявність у культуральній рідині карбонових кислот (рис. 5).

Отримані результати узгоджуються з даними Сіреваг і співавторів [16], згідно з якими при інкубації клітин *C. thiosulfatophilum* у темноті в культуральній рідині нагромаджуються карбонові кислоти: ацетат (основний компонент, який становить 68–70%), пропіонат, сукцинат, капронат. Вони, на думку авторів [11, 13, 14], утворюються внаслідок розщеплення глюкози по гліколітичному шляху, у реакціях декарбоксілювання пірувату та в інших реакціях.

За умов інкубації відмитих клітин *C. limicola* Ya-2002 на світлі нагромадження органічних сполук у культуральній рідині не спостерігалось, а загальний вміст глюкози, після гідролізу глікогену, суттєво не відрізнявся від контрольного варіанту (рис. 4).

На рис. 6 показано динаміку зміни концентрації глюкози (після гідролізу глікогену) і нагромадження ацетату при інкубації клітин *C. limicola* Ya-2002 у темноті.

Як видно з рис. 6, на 40-ву годину інкубації вміст глікогену (по глюкозі) в інкубаційній суміші знижувався майже в три рази, одночасно спостерігалось нагромадження ацетату в середовищі.

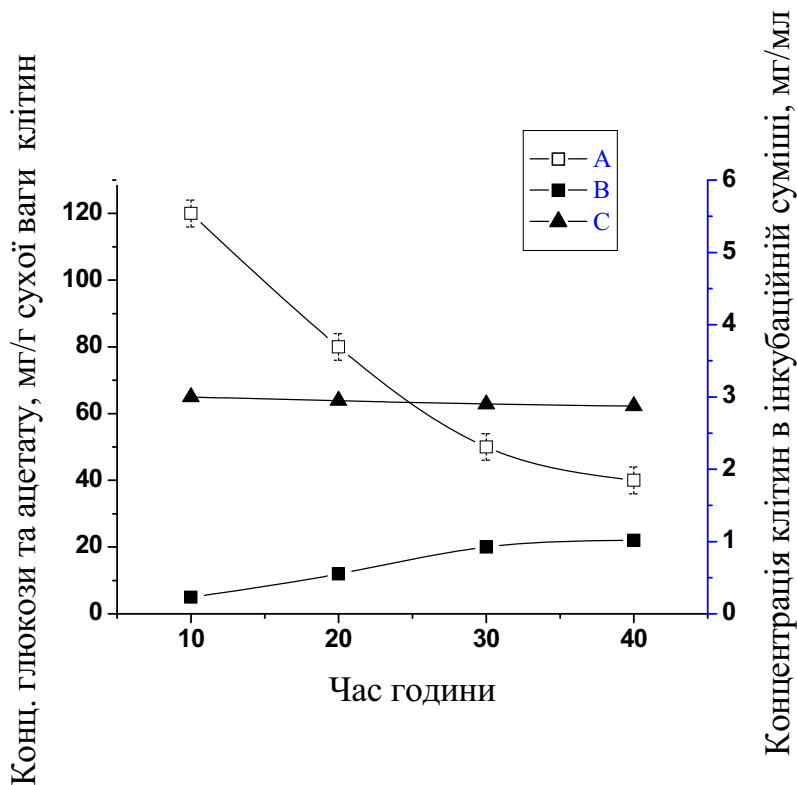


Рис 6. Концентрація глюкози (A), нагромадження ацетату (B) при інкубації клітин *C. limicola* Ya-2002 у темноті, а також концентрація клітин в інкубаційній суміші (C).

Таким чином, синтезовані в процесі фотосинтезу клітинами *C. limicola* Ya-2002 глюкоза та глікоген відіграють важливу роль у життєдіяльності цих бактерій при їх перебуванні на світлі та в темноті. У першому випадку у процесі фотоасиміляції CO₂ спостерігається нагромадження глюкози та її перетворення в глікоген. В темноті глікоген деполімеризується до глюкози, катаболізм якої забезпечує енергетичний і конструктивний метаболізм бактерій.

Зелені фотосинтезуючі сіркобактерії є важливою ланкою природного циклу сірки, що в останні роки піддається посиленому антропогенному впливу, внаслідок чого у навколишньому середовищі відбувається нагромадження токсичних сполук сірки, насамперед чергу сірководню.

У водних екосистемах зелені сіркові бактерії є першою перешкодою на шляху поширення сірководню, що утворюється сульфатредуквальними бактеріями мікробних матів, у верхні шари водойм [10, 12]. Тому дослідження особливостей метаболізму зелених сіркових бактерій і можливість їх використання для детоксикації сірководню є надзвичайно актуальною проблемою охорони довкілля в місцях промислового видобутку сірки.

1. 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.
2. Гончар М. В. Аналітичний набір “Діаглюк-2”. Львів, 2006.
3. Захарова І. Я., Косенко Л. В. Синтез бактеріальних полісахаридов. М.: Мир, 1982. С. 24–26.
4. Кондратьева Е. Н. Фотосинтезирующие бактерии. М.: Изд-во Москов. ун-та, 1989. С. 82–103.
5. Кульський Л. А., Гороновський І. Т. Справочник по свойствам, методам анализа и очистки вод. К.: Наук. думка, 1980. 1260 с.
6. Пирог Т. П., Корж Ю. В. Синтез мікробного екзополісахариду етаполану // Мікробіол. журн. 2007. Т. 68. № 3. С. 3–15.
7. Современная микробиология / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. Т. 1. С. 207–215, 413–416.
8. Хоулт Дж., Криг Р., Снит П. Определитель бактерий Берджи. М.: Мир, 1997. С. 361–370.
9. Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987. С. 372–393.
10. 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. 131–137.
11. 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. N 5. P. 579–587.
12. Guerrero R., Pigueras M. Microbial mats and the search for minimal ecosystems // Int. Microbiol. 2002. Vol. 5. P. 177–188.
13. Overmann J., Tuschak C. Phylogeny and molecular fingerprinting of green sulfur bacteria // Arch. Microbiol. 1997. Vol. 167. P. 302–309.
14. Overmann J., Tilzer M. Control of primary productivity and the significance of photosynthetic bacteria in a meromictic kettle lake, Mittlerer Buchensee, West Germany // Aquatic Sciences, 1988. Vol. 51. P. 261–278.

15. Pffening N., Widdel F. The bacteria of sulfure cycle // Phil. Trans. R. Soc. Lond. 1982. Vol. 298. P. 433–441.
16. Sirevag R., Ormerod J. Synthesis, storage, and degradation of polyglucose in *Chlorobium thiosulfatophilum* // Arch. Microbiol. 1977. Vol. 111. P. 239–246.

METABOLISM OF GLUCOSE AND GLYCOGEN IN THE CELLS OF GREEN PHOTOSYNTHETIC SULPHUR BACTERIA *CHLOROBIVM LIMICOLA YA-2002*

M. Gorishnyi, C. Gudz, S. Hnatush

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: M_Gorishniy@ukr.net 8 067 492 76 81*

Green sulphur bacteria *Chlorobium limicola Ya-2002* accumulate glucose and glycogen in the cells during anoxygenic photosynthesis. In the medium with glucose, sucrose, galactose, maltose, lactate, and malate the amount of intracellular carbohydrates underwent no alternations. The increase in the level of glycogen in the cells was observed after the addition of pyruvate and acetate into the medium. The reduction of the carbonic acid in the environment (20%) was accompanied by the decrease in the level of the biomass under the simultaneous increase of glycogen in the cells. Further drop in the concentration of carbonic acid leads to the reduction of the biomass and glycogen. Intracellular glucose and glycogen were used by the washed cells of *Chlorobium limicola Ya-2002*. On the third day of the incubation in dark the content of carbohydrates in the cells decreased by three times. At the same time acetate was accumulated in the environment. At the incubation of the cells by the light the level of intracellular carbohydrates practically did not alter. Consequently, glucose and glycogen generated by the light were used by the cells in the dark in order to sustain beneficial and energetic metabolism.

Key words: green sulphur bacteria, glycogen.

Стаття надійшла до редколегії 07.11.07

Прийнята до друку 20.12.07