

УДК 577.0:58.04:582.232

Чабан Ю. Л., інженер, Ішмухаметов Р. Р., асп.  
Одеський державний університет, кафедра біохімії,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

## ЗАЛЕЖНІСТЬ ФОТОСИНТЕЗУ ЦІАНОБАКТЕРІЇ *GLOEOBACTER VIOLACEUS* PCC 7421 ВІД КАТІОННОГО СКЛАДУ СЕРЕДОВИЩА

Вивчали вплив катіонного складу середовища інкубації на ріст та фотосинтетичне виділення кисню ціанобактерією *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. Показано, що в нейтральних умовах заміна стандартних 18 мМ Na<sup>+</sup> на 18 мМ K<sup>+</sup> або 9 мМ Ca<sup>2+</sup> не впливають на ріст та фотосинтез *G. violaceus*. У лужному середовищі ріст та фотосинтетичне виділення кисню інгібуються, якщо натрій замінено на калій. Проте перенос культури до стандартного "натрієвого" або модифікованого "кальцієвого" середовища призводить до поновлення фотосинтетичного виділення кисню.

Висловлено припущення, що спроможність *G. violaceus* до фотосинтезу залежить від рівня енергізації зовнішньої мембрани клітин, яка, в свою чергу, контролюється ефективністю використання *G. violaceus* різних типів енергетичного спряження.

**Ключові слова:** фотосинтез, катіони, енергетичне спряження, ціанобактерії.

В ряді досліджень, виконаних в останні 20 років, продемонстровано залежність деяких метаболітичних процесів ціанобактерій від іонного складу навколишнього середовища. Існують дані, що поглинання NO<sub>3</sub><sup>-</sup> та CO<sub>2</sub> ціанобактеріями із зовнішнього середовища потребує присутності іонів натрію [17, 18]. Було також продемонстровано, що відсутність натрію в середовищі інкубації особливо відчутно впливає на ріст та фотосинтез деяких ціанобактерій у лужному середовищі [2, 9]. Проте, ріст щонайменше одного виду прісноводних ціанобактерій, *Gloeobacter violaceus*, в лужних умовах може відбуватися у випадку, коли весь натрій у середовищі замінено на кальцій [8]. Таким чином, постає питання про залежність росту та основного енергопостачаючого процесу ціанобактерій — фотосинтезу — від рН та іонного складу навколишнього середовища.

В зв'язку з цим метою даної роботи було вивчення росту та фотосинтезу ціанобактерії *Gloeobacter violaceus* у різних за катіонним складом середовищах при нейтральних та лужних рН.

### Матеріали та методи

Дослідження провадили на альгологічно чистій культурі ціанобактерій, штам *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (отриманий з Institut für Microbiologie der Georg-August Universität, Геттинген, ФРН) [15, 16]. Культуру вирощували при безперервному освітленні лампами денного світла за температури 26—28 °С, освітленості 300—750 Лк та при періодичному перемішуванні за допомогою шейкера АБУ-6С (Київський експериментальний завод медичних виробів, Україна). Для вирощу-

вання культур використовували стерилізоване автоклавуванням стандартне середовище "BG-11" [16] (далі — натрієве середовище), та його модифіковані варіанти. За модифікації стандартного середовища  $\text{NaNO}_3$  замінювали еквімолярною (по азоту) кількістю  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (далі — кальцієве середовище), або  $\text{KNO}_3$  (далі — калієве середовище), в залежності від мети експерименту. Середовища готували на деіонізованій воді, яку отримували за допомогою установки по очищенню води "Milli Q" (Millipore, США). Для приготування середовищ використовували реактиви марки не нижче х. ч. вітчизняного виробництва (Сіместа, Україна).

Для створення необхідного рН у середовище вносили 20 мМ відповідного буфера. Використовували такі буфери (всі — Sigma, США): BIS-TRIS PROPANE ( $\text{pK}_{a1} = 6,8$ ;  $\text{pK}_{a2} = 9,0$ ); CHES ( $\text{pK}_a = 9,3$ ); MOPS ( $\text{pK}_a = 7,2$ ). Перед автоклавуванням, за допомогою  $\text{KOH}$  и  $\text{HCl}$ , рН середовищ доводили до необхідного значення. Повторно рН визначали безпосередньо перед засівом культури ціанобактерій.

В якості посівного матеріалу використовували культури, які знаходилися в середині логарифмічної фази росту. Перед засівом посівний матеріал промивали трикратним ресуспендуванням у стерильному середовищі без натрію та кальцію, та один раз у середовищі наступного засіву.

Ріст культур оцінювали по вмісту хлорофілу "а", який визначали користуючись загальноновживаною методикою [20]. Вимірювання світлопоглинання екстракту хлорофілу провадили за допомогою спектрофотокolorиметра "SPECOL-11" (Carl Zeiss Jena, НДР).

Інтенсивність фотосинтетичного виділення кисню визначали полярографічним методом за допомогою закритого електроду Кларка [7] та полярографа "POLAROGRAPHIC ANALYZER PA-2" (Laboratorní přístroje Praha, ЧССР). Для експериментів по визначенню інтенсивності фотосинтезу брали культуру в середині логарифмічної фази росту. Підготовку культури здійснювали двократним відмиванням у відповідному стерильному середовищі. Після цього культуру переносили до термостатованої кювети, в якій провадили вимірювання інтенсивності фотосинтезу. Температура під час експериментів складала 25 °С. Перемішування клітинної суспензії в кюветі здійснювали за допомогою магнітної мішалки ММ3М (Завод комплектних лабораторій, Мукачєво, Україна). Освітлення клітинної суспензії здійснювали за допомогою освітлювача ОСВ-1 (Завод комплектних лабораторій), оснащеного червоним світлофільтром КС-14 (ДЕСТ СРСР 9411-66). Інтенсивність освітлення складала 1500 Лк. Обробку отриманих даних здійснювали за допомогою комп'ютерного аналізу з використанням програми Excel-97 (Microsoft, США).

Повторність усіх експериментів — трикратна. В роботі наведено дані типових експериментів.

### Результати досліджень

На рис. 1 зображена динаміка росту *G. violaceus* у натрієвому, кальцієвому та калієвому середовищах за умов нейтрального (6,8—7,0) (а) та лужного (9,3—9,5) (б) рН. При співставленні графіків (а) і (б) видно, що загибель *G. violaceus* у середовищі, з якого вилучено натрій та кальцій, спостерігається лише в лужних умовах. В нейтральному середовищі ріст *G. violaceus* в усіх трьох варіантах середовища майже не відрізнявся (рис. 1, а).

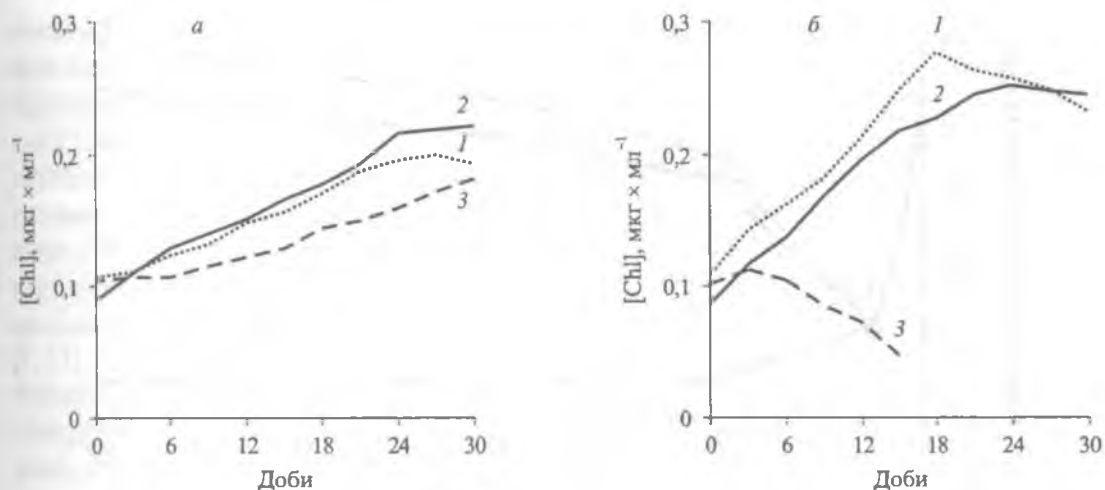


Рис. 1. Динаміка росту *G. violaceus* PCC 7421 при pH 6,2—6,8 (а) та pH 9,0—9,6 (б) у натрієвому (1), кальцієвому (2) та калієвому (3) середовищах

Інтенсивність фотосинтетичного виділення кисню в середині логарифмічної фази росту в нейтральних умовах також була майже однаковою в калієвому, натрієвому та кальцієвому середовищах (рис. 2, а).

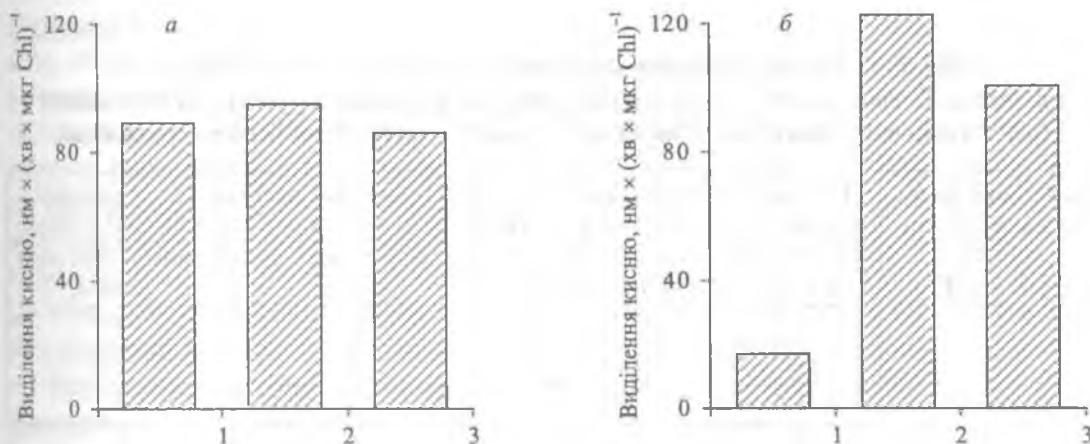


Рис. 2. Інтенсивність фотосинтетичного виділення кисню *G. violaceus* PCC 7421 після 1,5 годин інкубації при pH 6,2—6,8 (а) та pH 9,0—9,6 (б) у калієвому (1), натрієвому (2) та кальцієвому (3) середовищах

В протилежність цьому, у лужному калієвому середовищі через півтори години інкубації спостерігалось майже повне інгібування фотосинтетичного виділення кисню (рис. 2, б).

Однак, після повернення культури з лужного калієвого середовища до лужних натрієвого або кальцієвого, фотосинтетичне виділення кисню відновлювалося (рис. 3).

Час, який був потрібний для відновлення фотосинтезу в лужних натрієвому та кальцієвому середовищах, був прямо пропорційним часу інкубації в лужному калієвому середовищі (табл. 1). Треба, однак, зазначити, що при інкубації *G. violaceus* у лужному калієвому середовищі протягом 4-х діб фотосинтетичне виділення кис-

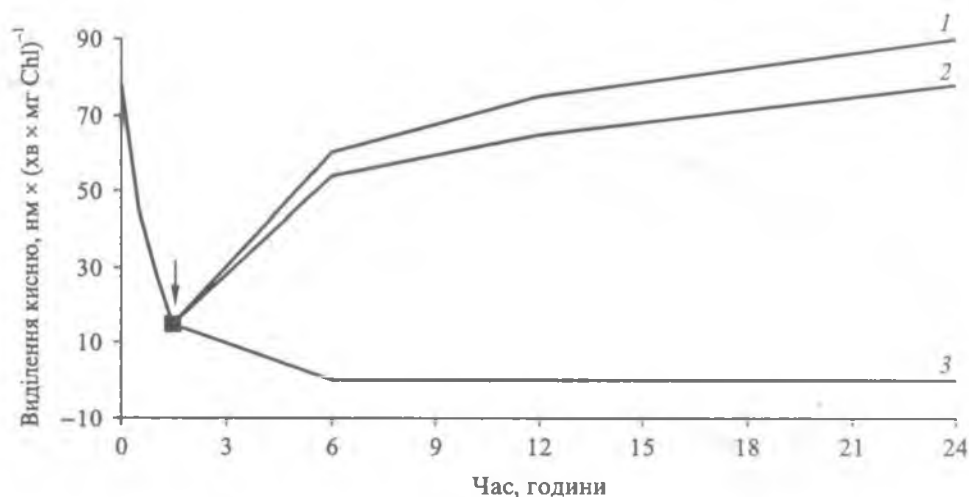


Рис. 3. Інтенсивність фотосинтетичного виділення кисню за перенесення *G. violaceus* PCC 7421 з лужного калієвого (pH 9,4; до стрілки) у лужне натрієве (1), кальцієве (2) та калієве (3) середовища (pH 9,4; після стрілки)

ню не відновлювалося навіть після повернення до натрієвого та кальцієвого середовища і культура гинула (табл. 1).

Таблиця 1

Залежність швидкості відновлення фотосинтетичного виділення кисню клітинами *G. violaceus* PCC 7421 в натрієвому або кальцієвому лужному середовищі (pH 9,4) від часу попередньої інкубації в лужному (pH 9,4) калієвому середовищі

| Початкова інтенсивність фотосинтезу, нМ · (хв · мкг Chl) <sup>-1</sup> | Час інкубації в калієвому середовищі, години | Інтенсивність після інкубації в калієвому середовищі, нМ · (хв · мкг Chl) <sup>-1</sup> | Час інкубації, необхідний для відновлення 1/2 початкової інтенсивності, години |                          |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
|                                                                        |                                              |                                                                                         | в натрієвому середовищі                                                        | в кальцієвому середовищі |
| 85                                                                     | 0,5                                          | 45                                                                                      | 0,5                                                                            | 1                        |
|                                                                        | 1                                            | 30                                                                                      | 2                                                                              | 2,5                      |
|                                                                        | 1,5                                          | 15                                                                                      | 3                                                                              | 4                        |
|                                                                        | 2                                            | 4                                                                                       | 4                                                                              | 6                        |
|                                                                        | 3                                            | 2                                                                                       | 8                                                                              | 12                       |
|                                                                        | 6                                            | 0                                                                                       | 24                                                                             | 30                       |
|                                                                        | 12                                           | 0                                                                                       | 36                                                                             | 48                       |
|                                                                        | 24                                           | 0                                                                                       | 48                                                                             | 60                       |
|                                                                        | 48                                           | 0                                                                                       | 72                                                                             | 120                      |
|                                                                        | 56                                           | 0                                                                                       | загибель                                                                       | загибель                 |

## Обговорення

Як свідчать наведені дані, ріст та фотосинтез *G. violaceus* залежить від присутності натрію та кальцію лише за лужних умов. Це дозволяє, на наш погляд, використати для пояснення отриманих результатів концепції натрієвого [5, 19] та кальцієвого [1, 11] циклів енергетичного sprzęження. Згідно з цими концепціями, зро-

стання рН зовнішнього середовища робить невідповідним використання бактеріальною клітиною градієнту протонів на зовнішній мембрані. В цих умовах, як було продемонстровано для ряду видів мікроорганізмів, в тому числі для галотолерантних ціанобактерій, роль спрягаючого іона може виконувати  $\text{Na}^+$  [3, 8, 10]. Відсутність натрію в середовищі інкубації блокує роботу натрієвого циклу енергетичного спряження і призводить до загибелі ціанобактерій у лужному середовищі [19]. Лугостійкість росту та фотосинтезу *G. violaceus* за відсутності натрію в кальцієвому середовищі свідчить на користь існування у деяких ціанобактерій кальцієвого циклу енергетичного спряження, окрім натрієвого та протонного [8, 11]. Це припущення добре узгоджується з повідомленням про відкриття у ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази Р-типу [13, 14]. Ймовірно, що кальцієвий цикл активується лужними умовами довкілля, коли натрій міститься там у слідових кількостях. Головною загальною рисою натрієвого та кальцієвого циклів енергетичного спряження є транспорт цих іонів назовні і генерація трансмембранного електрохімічного потенціалу на зовнішній спрягаючій мембрані (ціано)бактерій. Цей потенціал в обох випадках може бути використаний для енергозалежного поглинання  $\text{H}^+$  із зовнішнього середовища, що дозволяє мікроорганізмам уникати загибелі від залуговування цитоплазми. Це може мати також вирішальне значення для транспорту у клітину деяких речовин. Так, було показано, що транспорт  $\text{CO}_2$  до клітини *Anabaena variabilis* пов'язаний з поглинанням протонів, але залежить від присутності натрію в середовищі інкубації [18]. Таким чином, інгібування фотосинтетичного виділення кисню в лужному калієвому середовищі може бути наслідком неспроможності *G. violaceus* ефективно підтримувати за таких умов електрохімічний градієнт на зовнішній мембрані. Перенос культури до натрієвого або кальцієвого лужного середовища, вірогідно, призводить до поновлення рівня трансмембранного потенціалу і, як наслідок, відновлення фотосинтетичного виділення кисню. Загибель культур при чотиридобовій інкубації у лужному калієвому середовищі можна пояснити вичерпанням енергетичного резерву клітини і падінням трансмембранного електричного потенціалу нижче критичної межі [4], що може призвести до фізичного ушкодження клітини [6].

Таким чином, отримані дані дають підстави для припущення, що інтенсивність фотосинтезу прісноводних ціанобактерій контролюється рівнем енергізації зовнішньої мембрани. Залежність фотосинтетичного виділення кисню в лужних умовах від вмісту в середовищі натрію або кальцію може розглядатися як ще один аргумент на користь існування у прісноводних ціанобактерій натрієвого та кальцієвого циклів енергетичного спряження. Проте для остаточного висновку необхідні подальші, більш глибокі, дослідження взаємоз'язку процесів фотосинтезу та генерації трансмембранного електрохімічного потенціалу на зовнішній мембрані прісноводних ціанобактерій.

Автори висловлюють вдячність Ігорю Йосиповичу Броуну за цінні поради та рекомендації під час написання статті.

## Література

1. Броун И. И.  $\text{Ca}^{2+}$ : третий сопрягающий ион? // Биохимия. — 1994. — Т. 59, № 12. — С. 1779—1783.
2. Броун И. И., Мирочник О. Ю., Фадеев С. И. Резистентные к протонофору рост и транспорт нат-

- рия из клеток цианобактерии *Synechocystis sp. PCC 6803* // Биологические мембраны. — 1990. — Т. 7, № 6. — С. 662—665.
3. Броун И. И., Гончаров Н. И., Кирик И. И., Мирочник О. Ю., Пушенко М. Я., Северина И. И., Скулачев В. П. Перспективы использования соле- и щелочеустойчивых цианобактерий в технической биоэнергетике // Изв. АН СССР. — 1990. — Т. 3. — С. 465—469.
  4. Кирик И. И. Роль ионов натрия в процессах трансформации энергии у морских цианобактерий // Канд. дисс. — МГУ—ОГУ, 1990. — 159 с.
  5. Скулачев В. П. Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии. — М.: Высшая школа, 1989. — 271 с.
  6. Скулачев В. П. Энергетика биологических мембран. — М.: Наука, 1989. — 567 с.
  7. Трушанов А. А. Изготовление в лабораторных условиях закрытого полярографического электрода Кларка // Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. — М.: Наука, 1973. — С. 78—81.
  8. Brown I. I. The alternative bioenergetics patterns in cyanobacteria as factors of biochemical adaptation // Cyanobacterial Biotechnology. — New Delhi—Calcutta: Oxford & IBH Publishing Co. PVT. Ltd., 1998. — P. 21—35.
  9. Brown I. I., Fadeyev S. I., Gerasimenko L. M., Kirik I. I., Pushenko M. Ya., Severina I. I. Sodium ions are necessary for growth and energy transduction in the marine cyanobacterium *Oscillatoria brevis* // Arch. Microbiol. — 1990. — V. 153. — P. 409—411.
  10. Brown I. I., Fadeyev S. I., Kirik I. I., Severina I. I., Skulachev V. P. Light-dependent  $\Delta\mu\text{Na}^+$ -generation and utilization in the marine cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. FEBS Lett. — 1990. — V. 270. — P. 203—206.
  11. Brown I. I., Ishmukhametov R. R., Karakis S. G., Lovenchuk I. N., Pogorelov D. I., Severina I. I., Chaban Yu. L. Possible mechanisms of bioenergetics coupling in cyanobacteria under low  $\Delta\mu\text{H}^+$  and  $\Delta\mu\text{Na}^+$  (INTAS-93-0742) // Microbial Ecology and Biotechnology with reflection on extremophiles. INTAS Symp. Abstract book. — Moscow: Dialogue-MSU, 1997. — P. 3.
  12. Brown I. I., Chaban Y., Ishmukhametov R., Karakis S., Pogorelov D. The peculiarities of bioenergetics coupling in cyanobacteria under low  $\Delta\mu\text{H}^+$  and  $\Delta\mu\text{Na}^+$  in Marine cyanobacteria // Bulletin de l'Institut Oceanographique, special issue / Charpy L. & Larkum A.W. D. (eds). — Monaco, 1999. — P. 229—234.
  13. Geisler M., Richter J., Schumann J. Molecular Cloning of a P-Type ATPase Gene from the Cyanobacterium *Synechocystis sp. PCC 6803* — Homology to Eukaryotic  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases // J. Mol. Biol. — 1993. — V. 234, № 4. — P. 1284—1289.
  14. Geisler M., Koenen W., Richter J., Schumann J. Expression and characterization of a *Synechocystis sp. PCC 6803* P-type ATPase in *E. coli* plasma membranes // Biochem. Biophys. Acta. — 1998. — V. 1368. — P. 267—275.
  15. Rippka R., Waterbury J. B., Cohen-Bazire G. A. Cyanobacterium wich lacke thilacoids // Arch. Microbiol. — 1974. — V. 100, № 4. — P. 419—436.
  16. Rippka R., Daruelles J., Waterbury J. B., Herdman M., Stanier R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // J. Gen. Microbiol. — 1979. — V. 111, № 1. — P. 1—61.
  17. Rodriguez R., Lara C., Guerrero M. Nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2: kinetic and energetic aspects // Biochem. J. — 1992. — V. 282. — P. 639—643.
  18. Scherer S., Riege H., Buger P. Light-induced proton release by the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // Plant Physiol. — 1988. — V. 86. — P. 769—772.
  19. Skulachev V. P. Chemiosmotic systems and the basic principles of cell energetics // Molecular Mechanisms in Bioenergetics. — Amsterdam: Elsevir, 1992. — P. 37—73.
  20. Tandeau de Marsac N., Houmard J. Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra // Methods in Enzymology / Packer L., Glazer N (eds.). — San Diego: Acad. Press, 1988. — P. 318—328.

Чабан Ю. Л., Ишмухаметов Р. Р.

Одесский государственный университет, кафедра биохимии,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

#### ЗАВИСИМОСТЬ ФОТОСИНТЕЗА ЦИАНОБАКТЕРИИ *GLOEOBACTER VIOLACEUS* PCC 7421 ОТ КАТИОННОГО СОСТАВА СРЕДЫ

##### Резюме

Изучали влияние катионного состава среды инкубации на рост и фотосинтетическое выделение кислорода цианобактерией *Gloeobacter violaceus*. Показано, что в нейтральной

среде замена стандартных 18 мМ Na<sup>+</sup> на 18 мМ K<sup>+</sup> или 9 мМ Ca<sup>2+</sup> не влияет на рост и фотосинтез *G. violaceus*. В условиях щелочной среды рост и фотосинтетическое выделение кислорода ингибируется в среде, где натрий заменен калием. Однако перенос культуры в стандартную натриевую или модифицированную "кальциевую" среду приводил к возобновлению фотосинтетического выделения кислорода.

Высказано предположение, что фотосинтетическая способность *G. violaceus* PCC 7421 зависит от уровня энергизации внешней мембраны, которая, в свою очередь, контролируется эффективностью использования *G. violaceus* PCC 7421 различных циклов энергетического сопряжения.

**Ключевые слова:** фотосинтез, катионы, энергетическое сопряжение, цианобактерии.

**Chaban Yu. L., Ishmukhametov R. R.**

Odessa State University, Department of Biochemistry,  
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

#### THE DEPENDENCE OF CYANOBACTERIUM *GLOEOBACTER VIOLACEUS* PCC 7421 PHOTOSYNTHESIS ON DIFFERENT CATION ENVIRONMENT

##### Summary

It was shown that the growth rate of cyanobacteria *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 was maximal in calcium and sodium media under alkaline pH while in potassium medium it was not observed. There were no differences in the growth when pH of the medium was neutral. After addition of Ca<sup>2+</sup> or Na<sup>+</sup> the growth rate and O<sub>2</sub> production was resumed.

It was supposed that cyanobacteria *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 can use Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> as coupling ion under low  $\Delta\mu\text{H}^+$  background.

**Key words:** photosynthesis, cations, energetic coupling, cyanobacteria.