

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

4692/82

24/9-82

19-82-480

М.Г.Аносова, А.И.Аношин, В.В.Ужинский

ВЛИЯНИЕ СВЕТА НА СОБСТВЕННОЕ СВЕЧЕНИЕ
PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM

Направлено в журнал "Биофизика"

1982

§1. ВВЕДЕНИЕ

Виды, в той или иной степени способные к люминесценции, представляют значительную часть биосферы Океана. Они распространены практически повсеместно, во всех соленых морях и океанах, от поверхности до глубин более 7 км^{1/1/}. Поэтому без преувеличения можно сказать, что свечение моря имеет планетарный характер. Явление такого масштаба, естественно, не может не привлекать внимания исследователей, поэтому число работ, посвященных феномену биолюминесценции, постоянно увеличивается. Однако несмотря на большой объем накопленных экспериментальных данных о различных характеристиках биолюминесценции, на вопрос о роли люминесцентной реакции и света в жизнедеятельности простейших организмов, которыми в основном и определяется свечение моря, до сих пор нет удовлетворительного ответа. Возможно, что люминесценция является "побочным продуктом" метаболических реакций. В этом случае следует ожидать, что внешнее освещение в определенных пределах не будет оказывать заметного влияния на жизнедеятельность организмов. Если же биолюминесценция имеет адаптационное значение, то должна быть реакция на внешнее световое воздействие, зависящее от состояния культуры. Ниже мы приведем результаты исследования люминесценции светящихся бактерий, которые, по нашему мнению, подтверждают вторую точку зрения.

Несколько слов о светящихся бактериях. В основном они относятся к родам *Photobacterium*, *Vibrio fishery*, *Lucibacterium*. Испускаемый ими свет лежит в спектральной области от 450 до 650 нм, т.е. в области наибольшей прозрачности морской воды. Излучение носит импульсный характер. Какой-либо стимуляции свечения при действии механических, электрических, химических раздражителей не наблюдалось^{1,2/}. Биолюминесцентная реакция имеет типичные черты ферментативных реакций^{2,3/}. Характерная зависимость интенсивности свечения культуры бактерий, растущих на твердой питательной среде, от времени /кривая светимости/ представлена на рис.1. Согласно данным работы^{4/} существует связь между состояниями культуры и интенсивностью ее собственного свечения: минимуму кривой светимости соответствует начало логарифмической фазы роста, а максимуму - ее конец. Следовательно, по интенсивности собственного свечения и характеру ее изменения можно судить о состоянии культуры. Это, в свою очередь, позволяет проверить адаптационное значение люминесценции светящихся бактерий по их реакции на внешнее световое воздействие.

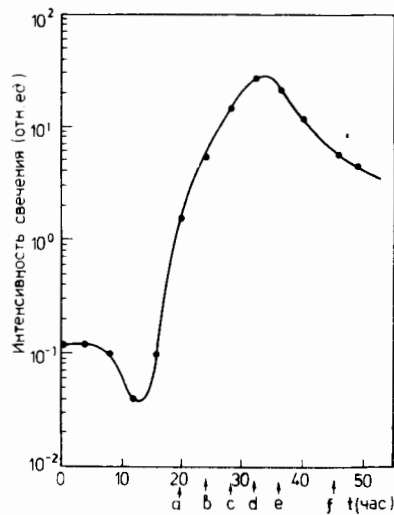


Рис. 1. Зависимость интенсивности собственного свечения культуры *Photobacterium phosphoreum* от времени, отсчитываемого с момента посева. Точки — экспериментальные данные, плавная кривая проведена от руки. Дополнительные сведения см. в тексте.

§2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Необходимый для работы штамм *Photobacterium Phosphoreum* /ВКМ В-1306/ был получен из отдела типовых культур Института микробиологии АН СССР /Москва/. При культивировании в жидкой питательной среде он обнаруживал все характерные признаки *Photobacterium phosphoreum*, перечисленные в работе /2/.

При культивировании использовались:

- а/ среда для разведения следующего состава: NaCl — 22,13 г; KCl — 0,77 г; CaCl₂ — 1,2 г; MgCl₂ — 2,55 г; NaHCO₃ — 0,11 г; MgSO₄ — 3,5 г; дистиллированной воды — 500 мл; pH среды — 7,3;
- б/ жидкая питательная среда, состоящая из 60 мл бульона бычьего сердца с дрожжевым гидролизатом и 40 мл среды для разведения; pH среды — 7,3;
- в/ твердая питательная среда, содержащая 60 мл двухпроцентного мясо-пептонного агара и 40 мл среды для разведения.

Жидкая питательная среда использовалась для получения суточной культуры. Суточная культура, после разведения до требуемой концентрации, высевалась на твердый питательный агар.

Были опробованы следующие методы посева:

- 1/ посев с помощью шпателя;
- 2/ посев методом агаровых слоев /5/;
- 3/ распределение по поверхности агара небольших объемов культуры бактерий с последующим подсушиванием.

Первый вариант не позволял получать равномерного распределения бактерий по поверхности агара. Во втором варианте, несмотря на хорошую однородность посева, бактерии оказывались в плохих условиях аэрации, в связи с чем они плохо светились. Поэтому в работе был использован третий вариант, согласно которому посев осуществ-

лялся в чашке Петри диаметром 20 см / D = 20 см/. Засеянная твердая питательная среда после подсушивания разрезалась круглым штампом / D = 2 см/ на агаровые кружки /пробы/, которые с помощью скальпеля помещались в маленькие чашки Петри / D = 4 см/. Последние тщательно светоизолировались и помещались в термостат. Культивирование бактерий осуществлялось при температуре 22,5° ± 0,5°С.

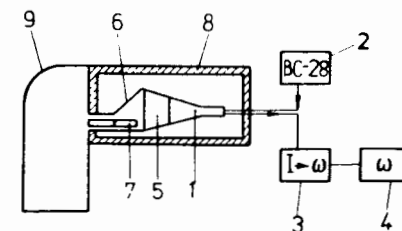
Изложенный выше метод позволял получать достаточное количество проб с одинаковой толщиной агарового слоя и с удовлетворительной однородностью посева.

Для определения характеристик свечения пробы перемещались из термостата в чувствительный объем регистрирующей аппаратуры, где выдерживались в течение полутора-двух часов до стабилизации или интенсивности, или характера изменения интенсивности собственного свечения культуры. После чего производилась серия опытов.

§3. РЕГИСТРИРУЮЩАЯ АППАРАТУРА

Для наблюдения свечения микроорганизмов использовалась установка, схематически изображенная на рис. 2. Принцип ее работы следующий. Исследуемая культура бактерий помещалась в выдвижную кювету /7/. Световой поток, излучаемый ею, с помощью светосборного "домика" /6/ и светопровода /5/ направлялся на фотоумножитель /ФЭУ-49/, работающий в токовом режиме. Рабочее напряжение /1,6 кВ/ подавалось на ФЭУ от высоковольтного выпрямителя ВС-28. Для измерения величины анодного тока ФЭУ использовался преобразователь ток-частота /3/, дающий на выходе систему импульсов с постоянной амплитудой и с периодом, регулируемым входным током. Частота следования импульсов измерялась с помощью цифрового частотомера /4/. Поскольку калибровка аппаратуры по световому потоку не проводилась, все данные по интенсивности свечения представлены в относительных единицах /отн. ед./ . Регистрирующая аппаратура сглаживала сигнал ФЭУ так, что флуктуация частоты во время эксперимента составляла в среднем 0,002 отн. ед. за время опроса 0,1 с. Проверка линейности аппаратуры по световому потоку показала, что она не хуже 8% в интервале интенсивностей светового потока 0,004-200 отн. ед. Темновой ток ФЭУ составлял 0,004 отн. ед.

Рис. 2. Схема регистрирующей аппаратуры. 1 — фотоумножитель, 2 — высоковольтный выпрямитель, 3 — преобразователь ток-частота, 4 — частотомер, 5 — светопровод, 6 — светосборный "домик", 7 — вставная кювета, 8 — стальной светозащитный корпус, 9 — светозащитный рукав.



Для облучения проб в кювету помещался на кронштейне светодиод /АЛ 102 В/, дающий зеленый свет. Поскольку кронштейн поглощал примерно половину света, излучаемого пробой, а излучение светодиода было направлено вниз, на пробу, определить точно уровень внешней освещенности пробы при выбранной конструкции аппаратуры не представлялось возможным. По крайней мере, фиксировалось, что интенсивность света, излучаемого диодом и отраженного от пробы, превосходит собственное свечение пробы и остается неизменной в серии испытаний.

§4. РЕЗУЛЬТАТЫ

Зависимость интенсивности свечения культуры *Photobacterium phosphoreum*, растущей на твердой питательной среде при температуре $22,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, от времени представлена рис.1*. Для снятия этой характеристики проба помещалась во вставную кювету на все время культивирования. Результаты, полученные на других пробах, аналогичны представленным, однако положения минимума и максимума кривых сильно варьируют. Они наиболее существенно зависят от температуры культивирования и плотности посева. При одинаковой плотности посева ρ , выраженной в числе микроколоний на см^2 /мк/см²/, при равных температурах культивирования и толщинах питательных слоев разные пробы дают близкие характеристики.

Кривая, приведенная на рис.1, была получена при $\rho \approx 2 \cdot 10^8$ мк/см². При уменьшении ρ в два раза положение максимума смещается примерно на 16 часов вправо по оси времени, а интенсивность свечения в максимуме увеличивается почти на порядок.

Пробы облучались внешним источником света в разные фазы роста. В частности, проба с кривой светимости, изображенной на рис.1, облучалась в моменты времени, указанные на этом рисунке стрелками. Отраженный световой поток источника света составлял 340 ± 7 отн. ед. Ток светодиода представлял прямоугольный импульс длительностью 5 с. Изменение интенсивности свечения в первую минуту после облучения показано на рис.3. Пунктирные линии соответствуют исходному уровню, а буквы у кривых - моментам культивирования, указанным на рис.1. Как видно из рис.3, сразу после облучения имеет место быстрое уменьшение уровня собственного свечения, вероятно обусловленное индуцированной люминесценцией продуктов метаболизма. Через двадцать-тридцать секунд уровень свечения стабилизируется и в дальнейшем слабо меняется, причем прежнее значение интенсивности свечения в течение одной минуты не достигается. Имитация подобного эффекта работой аппаратуры вследствие возможного накопления объемного заряда в ФЗУ была

*Все моменты времени, указанные в тексте и на рисунках, отсчитывались с момента посева культуры.

Рис.3. Изменение интенсивности собственного свечения культуры /сплошные кривые/ после освещения длительностью 5 с. Буквы у кривых представляют моменты времени, указанные на рис.1. Пунктирные кривые - первоначальный уровень свечения.

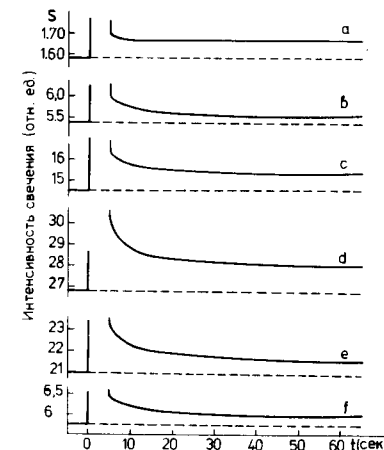
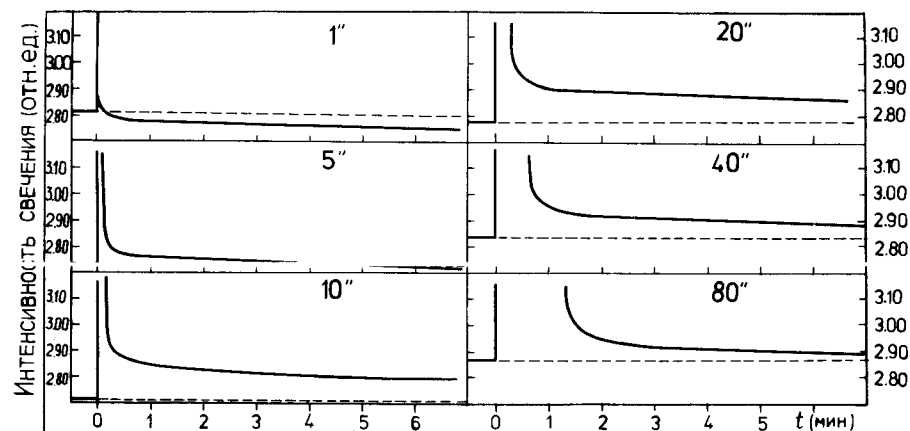


Рис.4. Зависимость интенсивности остаточного "послесвечения" от длительности внешнего освещения. Сплошные кривые - уровень собственного свечения культуры на стадии уменьшения выхода биолюминесцентной реакции.



исключена в экспериментах с отсутствующей пробой. При этом на заднем фронте светового импульса остаточное "послесвечение" не наблюдалось. Не отмечалась и люминесценция незаселенной питательной среды. Следовательно, отмеченный эффект обусловлен жизнедеятельностью бактерий.

Представляется интересной зависимость величины эффекта /интенсивности остаточного "послесвечения"/ от длительности действующего фактора. Для ее определения проводилось облучение проб световыми импульсами разной длительности. При этом в большой серии измерений были получены результаты, аналогичные представленным на рис.4, на котором показаны изменения интенсивности свечения пробы под действием серии световых воздействий, следовавших с интервалами в 7 минут. Длительность световых импульсов указана на рисунке. Кривые были получены в экспериментах с культурой, проращиваемой около 50 часов и находящейся в стадии спада све-

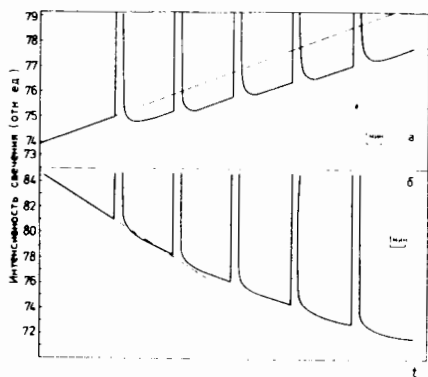
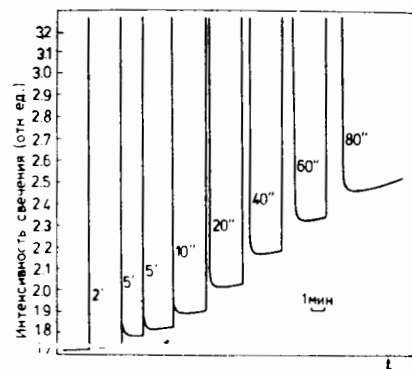


Рис.5. Изменение интенсивности собственного свечения культуры /сплошные кривые/, находящейся на стадиях увеличения а/ и уменьшения б/ выхода биолюминесцентной реакции под действием серии световых импульсов длительностью 30 с, следующих с интервалом 3,5 мин. Пунктирные кривые - экстраполяция естественного изменения уровня собственного свечения.

Рис.6. Изменение интенсивности собственного свечения культуры, находящейся в начале логарифмической фазы роста, под действием световых импульсов разной длительности.



чения /правее точки f на рис.1/. Как видно из рис.4, величина эффекта немонотонно зависит от длительности воздействия и не может быть обусловлена только люминесценцией продуктов метаболизма. Следовательно, в данном случае мы имеем дело с изменением скорости биолюминесцентной реакции в зависимости от интенсивности /длительности/ внешнего освещения, или, другими словами, с влиянием света на клеточную жизнедеятельность.

Наиболее четко на это указывают данные рис.5а,б, где представлены результаты воздействия серии световых импульсов длительностью 30 с с интервалами в 3,5 мин на пробы, находящиеся на стадии увеличения /рис.5а, момент времени, аналогичный моменту с на рис.1/ и спада /рис.5б, момент времени, аналогичный моменту e на рис.1/ интенсивности собственного свечения. Пунктиром на рис.5 представлены экстраполяции естественного изменения уровня светимости с течением времени. Обращает на себя внимание отличие нижних огибающих сплошных кривых на рис.5 от экстраполяционных линий.

В областях с-d рис.1 эффект практически не наблюдается. Однако и здесь, после длительных световых воздействий, отмечается "подавление" собственного свечения.

В минимуме кривой светимости внешнее освещение имеет стимулирующий характер, причем изменение уровня собственного свечения культуры происходит ступенчатым образом /рис.6/.

§5. ВОЗМОЖНАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Быстрота реакции клеток светящихся бактерий на внешнее освещение, а также ее зависимость от фазы роста культуры, указывают на то, что свет существенно влияет на жизнедеятельность микроорганизмов. Это подтверждает предположение о том, что у них люминесценция имеет адаптационное значение. Если дело обстоит именно так, то приобретает смысл вопрос о роли люминесценции в метаболизме клеток.

Интенсивность метаболизма, как известно, зависит от фазы роста. Поэтому можно полагать, что эта роль будет различной на разных стадиях развития культуры. Например, на начальной стадии роста у клеток сильно затянута процесс деления. Автор работы /6/ объясняет это тем, что клетки "ждут" внешнего импульса, инициатором которого, по его мнению, является прохождение космической заряженной частицы. В темных глубинах Океана, куда космическое излучение проникает сильно ослабленным, согласно этой гипотезе, следует ожидать очень низкой скорости деления клеток. Однако заметим, что значительная часть глубоководных микроорганизмов обладает способностью к биолюминесценции. Поэтому кажется естественным предположить, что биолюминесценция в этих условиях является фактором, стимулирующим деление клеток. То есть в этих условиях свет выступает как средство межклеточной коммуникации, посредством которой осуществляется регуляция процессов деления. Отметим, что такое предположение объясняет, почему спектры биолюминесценции лежат в области наибольшей прозрачности морской воды. С этой же точки зрения данные, приведенные на рис.6, можно объяснить "включением" новых групп клеток в процесс активного метаболизма.

По-видимому, несколько иначе обстоит дело на логарифмической и стационарной фазах роста. На этих стадиях развития интенсивность жизнедеятельности микроорганизмов в значительной степени определяется диффузией питательных веществ. Поэтому можно предположить, что собственное свечение бактерий не только стимулирует деление клеток, но и влияет на скорость диффузии питательных веществ. Реальность такой возможности следует из того, что фотоны сине-зеленого света имеют энергию, достаточную для разрыва водородных связей, благодаря которым в воде создается кристаллическая структура ближнего порядка. Последняя служит препятствием при транспортировке питательных веществ и продуктов метаболизма. Разрыв же водородных связей вследствие поглощения фотонов приводит к нарушению кристаллической структуры и тем самым к большей подвижности молекул воды, что сказывается на

увеличении скорости диффузии. Таким образом, возможно, что светящиеся микроорганизмы посредством собственного излучения увеличивают диффузию питательных веществ и продуктов метаболизма.

Это позволяет понять общую взаимосвязь роста и интенсивности свечения бактерий. В самом деле, на логарифмической стадии роста в среде питательных веществ достаточно и бактериям нет "необходимости" стимулировать диффузию и тратить энергию на свечение. Поэтому увеличение свечения на этом этапе обусловлено только ростом числа клеток. К концу логарифмической фазы роста происходит исчерпание питательных веществ в непосредственной окрестности клетки, однако поддержание прежней скорости роста культуры достигается увеличением количества производимого света. По достижении максимальной для данной среды концентрации клеток дальнейшая жизнедеятельность сопровождается еще большим уменьшением количеств питательных веществ, чем и обуславливается медленный спад интенсивности свечения.

Рассмотрим теперь, как действует внешнее облучение. На стадии логарифмического роста добавочный свет "избавляет" бактерии от "необходимости" поддерживать световую активность на должном уровне. Поэтому здесь наблюдается подавление собственного свечения /рис.5а/ при сохранении, по-видимому, прежней скорости роста. На завершающей стадии развития культуры внешний свет стимулирует диффузию питательных веществ, чем способствует увеличению выхода биолюминесцентной реакции, т.е. поддержанию прежнего уровня собственного свечения /рис.5б/. Если количество и интенсивность внешнего света достаточны для обеспечения деления клеток, то в этих условиях возможна смена знака эффекта. Этим, наверно, и объясняется выполаживание кривых рис.5б.

В заключение хотелось бы отметить, что, выдвигая эти гипотезы и предположения, мы надеемся на то, что они найдут прямое экспериментальное подтверждение, которое, по-видимому, не заставит себя ждать.

Авторы выражают благодарность Е.С.Кузьмину и О.В.Савченко за оказанное содействие в выполнении экспериментов, а В.И.Корогодину и Л.А.Блюменфельду за плодотворные обсуждения, поддержку и интерес к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гительзон И.И. Живой свет океана. "Наука", М., 1976.
2. Гительзон И.И., Чумакова М.А. Светящиеся бактерии. "Наука", М., 1975.
3. Эйринг Г., Эрри Д.У. В сб.: Теоретическая и математическая биология. "Наука", М., 1968, с.92.
4. Nealson K.H. et al. J.Bacteriol., 1970, 104, p.300.
5. Gratia A. Ann.Inst.Pasteur, 1936, 57, p.652.
6. Козлов А.А. Радиобиология, 1971, 11, с.935.

Рукопись поступила в издательский отдел
23 июня 1982 года.

Аносова М.Г., Аношин А.И., Ужинский В.В. 19-82-480
Влияние света на собственное свечение
Photobacterium phosphoreum

Культура светящихся бактерий подвергалась кратковременному воздействию зеленого света. При этом отмечалось изменение /стимуляция или подавление/ собственного свечения микроорганизмов, зависящее от стадии развития культуры. Выяснены основные черты этого явления и предложена гипотеза для его объяснения.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1982

Anosova M.G., Anoshin A.I., Uzhinskii V.V. 19-82-480
Influence of Light on Intrinsic Luminosity
of *Photobacterium Phosphoreum*

Culture of luminous bacteria has been exposed to short-time influence of green light. Change of intrinsic luminosity of the micro-organisms (stimulation or suppression) depending on growth phase of the culture has been noted. The main features of this phenomenon are established and a hypothesis for its explanation is given.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1982

Перевод О.С.Виноградовой.