

АНАЛИЗ ДИНАМИКИ ИНТЕНСИВНОСТИ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ *Photobacterium phosphoreum*

© 2015 г. А.В. Дроздов, Е.Н. Громозова*, И.А. Грецкий*

Институт аналитического приборостроения РАН,
198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А;

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
Д03680, Украина, Киев, ул. Академика Заболотного, 154

E-mail: av@biophys.ru

Поступила в редакцию 10.02.14 г.

После доработки 17.11.14 г.

Представлены результаты анализа динамики биолюминесценции светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* ИМВ В-7071 при оптимальных условиях их роста. Обнаружен квази-гармонический характер динамики биолюминесценции бактерий. Наблюдаемые периоды этих изменений имеют схожие значения с установленными нами ранее периодами изменений физико-химических свойств воды. Обсуждаются вопросы связи между биоритмикой и квази-гармоническим характером изменения физико-химических свойств воды.

Ключевые слова: биолюминесценция, светящиеся бактерии, ритмические процессы, биоритмы, свойства воды.

Изучение периодических изменений характера интенсивности биологических процессов и явлений как на уровне функционирования отдельных клеток [1], так и на уровне целостных организмов [2–5] в настоящее время представлено очень обширно. Имеющиеся литературные данные позволяют утверждать, что временную организацию биологических систем необходимо характеризовать целым спектром периодов различной длительности [6]. Среди факторов, обсуждаемых в качестве причин, вызывающих колебания в биологических системах, указываются: космофизические воздействия, колебания магнитного поля Земли, ритмы солнечной активности и т.д. [7–10]. Однако вопрос о механизме/механизмах действия этих факторов на биологические системы до сих пор остается предметом острых научных дискуссий.

Целью настоящего исследования являлось выявление таких ритмов в целостной биологической системе, что позволило бы в дальнейшем использовать ее в экспериментах по изучению механизма/механизмов влияния внешних физических факторов низкой интенсивности (в том числе космофизического и геомагнитного происхождения) на динамику биологических процессов. Для этой цели хорошо подходят светящиеся бактерии, люминесценция которых в видимой области спектра характеризуется высо-

кой чувствительностью и скоростью реакции-ответа на действие различных факторов и легко регистрируется приборными методами. В работе [11] были описаны колебательные ритмы свечения одиночных бактерий импульсного характера.

К светящимся бактериям относится разнородная группа микроорганизмов, обладающая способностью испускать свет в зелено-голубой области спектра видимого диапазона. Она включает в себя 17 видов, большинство из которых являются морскими представителями. Светящиеся бактерии *Photobacterium phosphoreum* отличаются среди прочих наиболее длительным и интенсивным свечением [12].

Таким образом, целью настоящей работы явилось исследование динамики биолюминесценции *Photobacterium phosphoreum* в условиях роста колоний на плотной питательной среде при оптимальных условиях их роста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – штамм морских светящихся бактерий *P. phosphoreum*, зарегистрированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины под номером ИМВ В-7071.

Для изучения динамики биолюминесценции использовали одиночную колонию светящихся бактерий, растущую на агаризованной синтетической питательной среде следующего состава (г/л): пептон – 5,0; дрожжевой экстракт – 1,0; NaCl – 30,0; Na_2HPO_4 – 5,3; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 2,1; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; агар-агар – 20,0; глицерин – 3,0 мл/л, вода дистиллированная – до 1 л, pH 7,6. Методика культивирования бактерий *P. phosphoreum* подробно описана в работе [13].

Динамику интенсивности свечения бактерий изучали на экспериментальной установке, изготовленной в нашей лаборатории. Методика измерений заключалась в том, что световой поток ($\lambda = 490$ нм) от образца со светящимися бактериями с помощью светосильного высокоапертурного объектива ($A = 0,7$) фокусировался на фотокатод фотоэлектронного умножителя ФЭУ-115. Напряжение питания ФЭУ составляет $U = 1,3$ кВ при $I = 1,5$ мА. Анодный ток ФЭУ усиливался прецизионным усилителем, работающим в режиме преобразователя тока-напряжения. Выходное напряжение с усилителя регистрировали мультиметром с высоким входным сопротивлением. Блок-схема установки для измерения бактериальной биолюминесценции представлена на рис. 1.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Измерение интенсивности свечения бактерий происходило в темной комнате. На первом этапе измеряли уровень «темного» сигнала фотоумножителя – U_0 , затем под объектив помещали образец с бактериями и измеряли сигнал от образца, содержащего колонию бактерий *Photobacterium phosphoreum* ИМВ В-7071, – U_1 . Интенсивность сигнала от бактерий превосходила уровень «темного» сигнала более чем на два порядка. Для дальнейшего анализа использовали разностный сигнал $U = U_1 - U_0$, который был пропорционален интенсивности бактериального свечения.

Интенсивность биолюминесценции регистрировали один раз в минуту (с точностью 0,1 с) в течение трех часов. На результаты анализа частота выборки, с которой проводили снятие экспериментальных данных, не влияла. Температуру окружающей среды в помещении, в котором проводили эксперименты, поддерживали на уровне $(22,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Исследование динамики свечения колонии проводили в разные сроки культивирования клеток (на 3-и; 5-е; 6-е сутки).

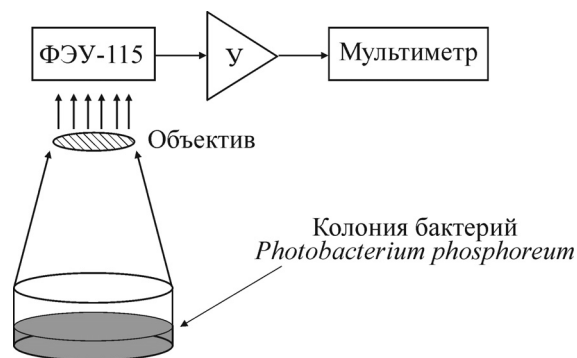


Рис. 1. Блок-схема экспериментальной установки. Пояснения в тексте.

Окончательным этапом исследования являлся частотно-временной анализ интенсивности бактериального свечения.

Необходимо заметить, что получаемые в ходе выполнения работы результаты были сильно зашумленными и являлись нестационарными во временной области. Все это создавало трудности для анализа получаемых данных с помощью общепринятых подходов (преобразования Фурье). В этой связи частотно-временной анализ получаемых экспериментальных результатов осуществлялся с помощью вейвлет-преобразования в среде MATLAB 7.11. В качестве базисной функции вейвлет-преобразования использовали вейвлет Морле.

Вейвлет-преобразование является обобщением спектрального анализа, типичный представитель которого – классическое преобразование Фурье. При анализе нестационарных сигналов, за счет свойства локальности, вейвлеты получают существенное преимущество перед преобразованием Фурье, которое дает нам только глобальные сведения о частотах исследуемого сигнала. В отличие от традиционного преобразования Фурье, вейвлет-преобразование обеспечивает двухмерную развертку исследуемого одномерного сигнала, при этом частота и координата (время появления этой частоты в экспериментальном сигнале) рассматриваются как независимые переменные.

Вейвлет-преобразование используют в тех случаях, когда результат анализа некоего сигнала должен содержать одновременно не только простое перечисление его характерных частот, но и сведения об определенных локальных координатах (время), при которых эти частоты проявляют себя. Таким образом, анализ и обработка нестационарных (во времени) или неоднородных (в пространстве) сигналов разных типов представляют собой основное поле применений вейвлет-анализа.

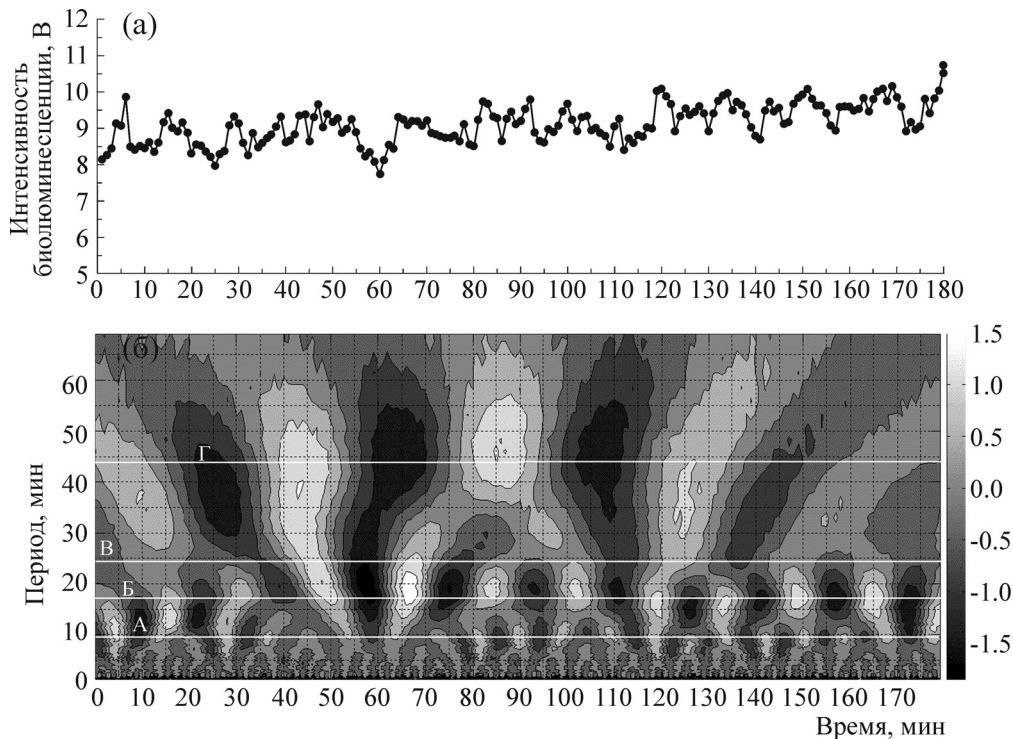


Рис. 2. Динамики интенсивности биолюминесценции бактерий *Photobacterium phosphoreum* ИМВ В-7071. (а) – Реальная динамика интенсивности свечения бактерий *P. phosphoreum*, (б) – вейвлет-преобразование этой динамики.

Проведенное нами отдельное сравнение результатов, полученных с помощью вейвлет-преобразования, с результатами классического преобразования Фурье показало хорошее совпадение значений гармонических составляющих, полученных разными методами [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результат мониторинга изменения интенсивности биолюминесценции бактерий *Photobacterium phosphoreum* ИМВ В-7071 при культивировании в оптимальных для их развития условиях представлен на рис. 2а. Вейвлет-анализ экспериментальных данных показал (рис. 2б), что динамика интенсивности биолюминесценции подчинялась определенным закономерностям и имела квазипериодический характер (рис. 3). Полученные в ходе выполнения данной работы результаты свидетельствуют о том, что в интенсивности свечения биолюминесценции наблюдаются определенные периоды. Значения периодов интенсивности свечения бактерий, обнаруженных в ходе выполнения данной работы, составляют: 6–9, 11–13, 15–18, 21–29, 30–39, 40–55, ~60 мин. Амплитуды этих колебаний варьируются до 10% от среднего значения уровня биолюминесценции (рис. 3).

Для оценки степени влияния измерительной аппаратуры на обнаруженный квазигармонический характер интенсивности свечения бактерий нами были проведены дополнительные эксперименты. Сравнивали динамику интенсивности свечения стабильного источника света (уровень интенсивности соответствовал уровню свечения бактерий) с динамикой биолюминесценции бактерий. Дополнительно сравнивали динамику интенсивности «темного» сигнала фотоумножителя все с той же динамикой излучения бактерий. Сравнение результатов вейвлет-анализа всех перечисленных выше динамик свидетельствуют о том, что обнаруженные периоды наблюдаются только в динамике биолюминесценции бактерий.

Следует отметить, что в процессе культивирования колоний *P. phosphoreum* ИМВ В-7071 значения периодов характеризовались хорошей воспроизводимостью, но не присутствовали полным набором в различных экспериментах. Для объяснения этого факта необходимо понимание механизма наблюдаемой ритмики, но такая задача в рамках данной работы не ставилась.

Анализ динамики свечения в разные сроки культивирования бактерий показал, что с увеличением возраста культуры в динамике излучения исчезала гармоническая составляющая с

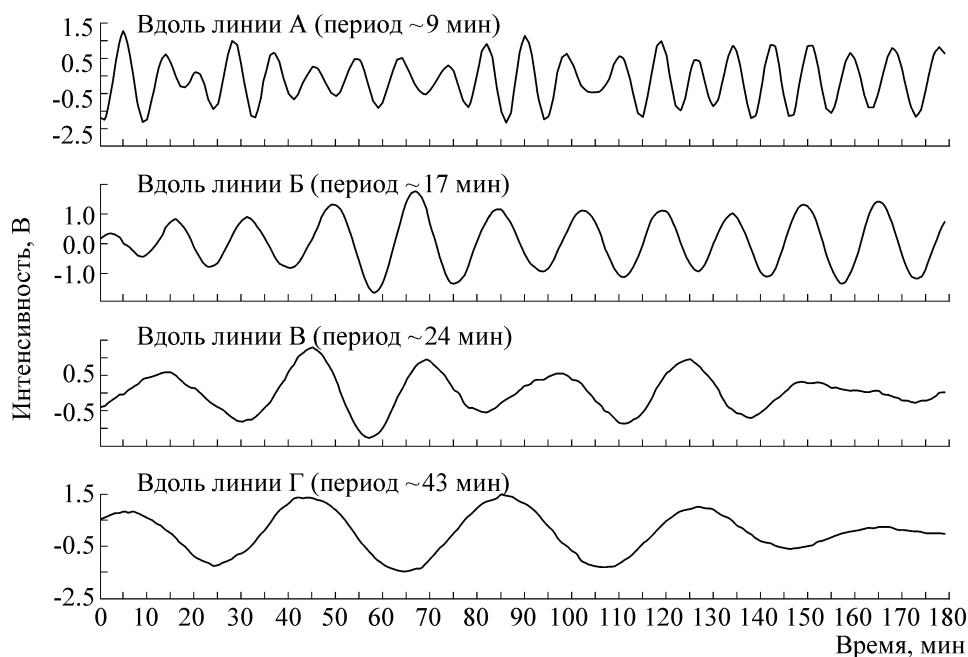


Рис. 3. Мультимодальный характер динамики интенсивности биолюминесценции бактерий *Photobacterium phosphoreum* ИМВ В-7071 (гармонические составляющие динамики интенсивности свечения вдоль соответствующих линий на рис. 2б). Амплитуда гармоник отсчитывается от среднего уровня интенсивности биолюминесценции в абсолютных единицах.

периодом ~60 мин и наблюдалось уменьшение амплитуды выявленных периодов. Это может быть следствием снижения интенсивности метаболических процессов в стареющей бактериальной культуре. Дифференциация клеток в растущей колонии отражалась и на интенсивности их люминесценции. Клетки, представленные в периферической зоне роста, более молодые, с активным метаболизмом демонстрировали яркое свечение. В то же время центральная часть колонии состояла из менее жизнеспособных клеток (рис. 4). Эксперименты, проведенные нами ранее с этой культурой в условиях жидкой питательной среды, показали, что максимальное свечение клеток приходилось на экспоненциальную фазу их роста [15]. Эти данные подтверждают известное положение о том, что бактериальная люминесценция является интегральным показателем активности метаболических процессов, проходящих в клетке [16]. В опытах по свечению колоний *P. phosphoreum* ИМВ В-7071, несмотря на пространственно-временную гетерогенность клеток в колонии, общий уровень свечения в рассматриваемый период оставался неизменным, в связи с приростом исследуемой биомассы.

Периодичность в изменении свечения предполагает ритмичность активности основного фермента реакции люминесценции – люциферазы. Одной из причин этого могут быть око-

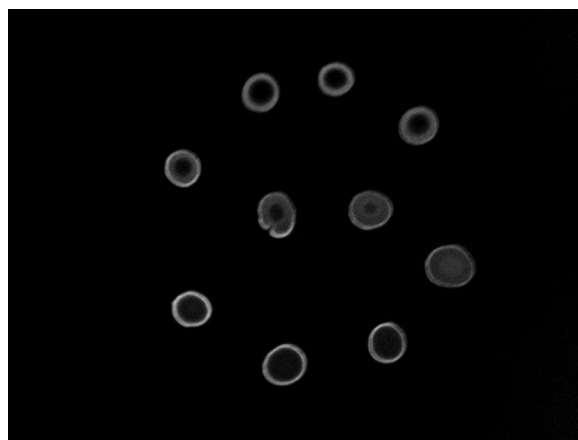


Рис. 4. Фотография дифференцированных бактериальных колоний бактерий *Photobacterium phosphoreum* ИМВ В-7071.

лочасовые ритмы синтеза белка [17], которые, как и более быстрые внутриклеточные ритмы, отражают локальные изменения соотношения золя и геля в клетке [18]. По мнению С.Л. Загускина [18], одним из важных условий фазовых золь-гель переходов является периодичность структурных перестроек в воде и водных растворах.

Таким образом, отмеченные в ходе исследований изменения амплитуды спектральных

составляющих в динамике биолюминесценции могут быть связаны с гетерогенностью бактериальных клеток, которая возникает на более поздних этапах развития колонии, однако это явление требует отдельного изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаруженные в ходе выполнения данной работы периоды динамики биолюминесценции бактерий *P. phosphoreum* ИМВ В-7071 хорошо совпадают со значениями биологических периодов в целостном организме [3–5], а также с периодами изменения физико-химических свойств воды, выявленных в работе [19] (1–3, 5–9, 10–13, 14–19, 21–29, 30–39, 40–55, ~60 мин). Подобное совпадение периодов биологической активности целостного организма [3–5], биолюминесценции бактерий *P. phosphoreum* ИМВ В-7071 и изменчивости физико-химических свойств воды [19] позволяет нам выдвинуть предположение о сопряженности этих процессов.

В эволюционном плане именно космофизическая ритмика может выступать как ведущий синхронизирующий фактор биологических процессов. К настоящему времени известны периоды солнечных пульсаций в минутном диапазоне: ~12, ~17, ~27, ~32, ~45, ~57 мин [7,20]. Обнаруженные нами периоды интенсивности биолюминесценции, полученные ранее периоды биологической активности целостного организма [3–5] и периоды в изменениях физико-химических свойств воды [19], а также хорошая сопоставимость этих значений с ритмами космической погоды [7,20], с нашей точки зрения, является указанием на важную роль воды в передаче сигналов физической природы биологическим объектам. Связь между геомагнитными возмущениями и биолюминесцентной активностью бактерий ранее была показана в работах [21,22].

Подводя итог всему вышеизложенному, можно предположить, что космофизические факторы (влияющие, прежде всего, на магнитное поле Земли и его вариации) синхронизируют работу живых клеток любого биологического организма. Действие магнитного поля, проникающего непосредственно на уровень каждой клетки, может быть направлено на любой из магнитных моментов, присутствующих в биологической системе (спин электрона свободного радикала, ядерный магнитный момент, орбитальный магнитный момент, магнитный момент орто-молекул воды и т.п.). Эти магнитные моменты становятся своего рода «антеннами» внутри биологических объектов, которые могут

воспринимать управляющее воздействие от внешних факторов [23].

ВЫВОДЫ

1. Анализ полученных данных свидетельствует о ритмичности биологических процессов, проходящих в растущей культуре *P. phosphoreum* ИМВ В-7071. Наблюдаемая ритмичность имеет мультимодальный характер и соответствует периодам изменения физико-химических свойств воды.

2. Выявленный квазипериодический характер динамики биолюминесценции бактерий позволяет предложить *Photobacterium phosphoreum* ИМВ В-7071 в качестве тестовой биологической системы для дальнейшего изучения влияния внешних физических воздействий низкой интенсивности (в том числе космофизического и геомагнитного происхождения) на биологические процессы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. J. Morré, P. J. Chueh, J. Pletcher, et al., *Biochemistry* **40**, 11941 (2002).
2. Т. К. Бреус и А. А. Конрадов, *Эффекты ритмов солнечной активности. Атлас временных вариаций природных, антропогенных и социальных процессов* (Янус-К, М., 2002. т.3.).
3. Т. А. Зенченко, А. А. Медведева, Н. И. Хорсева и др., *Геофизические процессы и биосфера* **12** (4), 73 (2013), <http://www.biophys.ru/archive/rhythm-00001.pdf>.
4. Т. А. Зенченко, А. А. Медведева, Л. В. Поскотина и др., *Биофизика* **59** (6), 1186 (2014), <http://www.biophys.ru/archive/rhythm-00002.pdf>.
5. Т. А. Зенченко, А. А. Медведева, Л. В. Поскотина и др. *Биофизика*, **60** (2), 385 (2015).
6. В. С. Мартынюк, Б. М. Владимирский и Н. А. Темуриянц, *Геофизические процессы и биосфера* **3** (4), 91 (2004).
7. Б. М. Владимирский и А. А. Конрадов, *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Сер. Биология, химия* **20** (59), № 1, 92 (2007).
8. В. С. Мартынюк, Н. А. Темуриянц и Б. М. Владимирский, *У природы нет плохой погоды: космическая погода в нашей жизни* (Киев, Mavis publisher, 2008), www.biophys.ru/archive/cosmoweather-00001.pdf
9. А. Н. Павлов, *Воздействие электромагнитных излучений на жизнедеятельность* (Гелиос АРВ, М., 2002).
10. А. С. Пресман, *Организация биосферы и ее космические связи* (Геосинтез, М., 1997).
11. Л. Ю. Бержанская, И. И. Гительзон, А. М. Фиш и др., *Биофизика* **18** (2), 285 (1973).
12. E. Meighen, *Luminescence* **14**, 3 (1999).
13. В. В. Куц и А. Д. Исмаилов, *Микробиология* **78** (5), 612 (2009).

14. A. Drozdov, I. Pomortsev, K. Tyutyukin и et al., *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics* **5** (3), 363 (2014), www.biophys.ru/archive/analyse-00001.pdf.
15. И. А. Грецкий, *Мікробіологічний журн.* **76** (2), (2014).
16. Д. Г. Дерябин, *Бактериальная биолюминесценция. Фундаментальные и прикладные аспекты* (Наука, М., 2009).
17. В. Я. Бродский и Н. В. Нечаева, *Ритм синтеза белка* (Наука, М., 1988).
18. С. Л. Загускин, *Биология клетки* **4**, 389 (2004).
19. А. В. Дроздов, Т. П. Нагорская, *Биофизика* **59** (6), 1195 (2014). www.biophys.ru/archive/h2o-00034.pdf
20. Ю. Д. Жугжда, *Колебания и волны на солнце. Физика космоса* (Советская энциклопедия, М., 1988), т. 4, с. 581.
21. А. Г. Косовичев, *Физическая энциклопедия. Солнечная сейсмология* (Советская энциклопедия, М., 1988), т. 4, с. 581.
22. Л. Ю. Бержанская, В. Н. Бержанский, О. Ю. Белоплотова и др., *Биофизика* **40** (4), 778 (1995).
23. Л. Ю. Бержанская, В. Н. Бержанский, Т. Г. Старчевский и др., *Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского* **17** (56), 127 (2004).
24. А. В. Дроздов, Т. П. Нагорская, С. В. Масюевич и др., *Биофизика* **55** (4), 740 (2010), <http://www.biophys.ru/archive/lednev2010/drozdov.pdf>.

Analysis of the Dynamics of Bioluminescence Intensity of Luminous Bacteria *Photobacterium phosphoreum*

A.V. Drozdov*, E.N. Gromozova**, and I.A. Gretskey**

*Institute for Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences,
ul. Ivana Chernykh, 31–33, lit. A, St. Petersburg, 198095 Russia

**Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine,
ul. Acad. Zabolotny 154, Kyiv, D03680 Ukraine

This contribution presents the results of analysis of the dynamics of the bioluminescence of luminous bacteria *Photobacterium phosphoreum* IMV B-7071 under optimal conditions of their growth. A quasi-harmonic nature of the bacterial bioluminescence dynamics was detected. The observed periods of these changes have similar values compared with those in the earlier defined periods of changes in physicochemical properties of water. The relationship between biorhythms and a quasi-harmonic nature of changes in physicochemical properties of water is discussed.

Key words: bioluminescence, luminous bacteria, rhythmic processes, biorhythms, properties of water