

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ
СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ
PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM ИМВ В-7071**

Изучена биолюминесценция штамма светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* ИМВ В-7071. Штамм характеризовался высоким уровнем свечения и высокой удельной скоростью роста, короткими лаг-периодом и временем генерации. Установлено действие pH, температуры, концентрации NaCl на уровень биолюминесценции. Максимальный уровень биолюминесценции наблюдался в диапазоне концентраций NaCl в среде культивирования от 2 до 8%, в области значений pH от 5,5 до 9,1 и в температурном диапазоне от 10 до 28°C. Проведено сравнение физиологических особенностей штамма *Ph. phosphoreum* ИМВ В-7071, выделенного из Черного моря со штаммом *Ph. phosphoreum*, обитающим в Белом море.

Ключевые слова: светящиеся бактерии, *Photobacterium phosphoreum*, биолюминесценция, условия культивирования.

Бактериальная биолюминесценция в видимой области спектра привлекает внимание исследователей возможностью использования этого признака для решения различных фундаментальных и прикладных задач. Высокая чувствительность и скорость реакции-ответа на действие различных химических соединений (в сравнении с другими биологическими тестами) делает биолюминесценцию бактерий эффективным инструментом для их определения [6].

К светящимся бактериям относится разнородная группа микроорганизмов, обладающая способностью испускать свет в зелено-голубой области спектра видимого диапазона. Она включает в себя 17 видов, которые относятся к четырем родам: *Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella*, *Photorhabdus* [1]. Большинство из них является морскими представителями.

Светящиеся бактерии *Photobacterium phosphoreum* отличаются среди прочих наиболее длительным и интенсивным свечением [8, 10, 11]. При использовании данного вида в качестве чувствительного элемента биотеста для решения различных прикладных задач важно знать физиологические особенности конкретного используемого штамма, т.к. ими будут определяться характеристики биосенсора.

Цель работы – изучение бактериальной люминесценции *Ph. phosphoreum* ИМВ В-7071 при различных условиях культивирования.

Материалы и методы. Объект исследования – штамм морских светящихся бактерий *Ph. phosphoreum*, зарегистрированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины под номером ИМВ В-7071. Для сравнения интенсивности свечения также были использованы 3 неидентифицированных штамма светящихся бактерий из коллекции Крымского государственного медицинского университета им. С.И. Георгиевского, любезно предоставленные доцентом А.М. Кацевым.

Для культивирования светящихся бактерий в глубинной культуре использовали питательную среду следующего состава (г/л): пептон – 5,0; дрожжевой экстракт – 5,0; NaCl – 30,0; $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ – 15,0; $(NH_4)_2HPO_4$ – 0,5; $MgSO_4$ – 0,1; $CaCO_3$ – 0,2; глицерин – 3,0 мл/л, вода дистиллированная – до 1 л, pH 6,8-7,0. [2]

Как посевной материал использовали культуру из середины экспоненциальной фазы роста, выращенную на среде указанного выше состава. Количество инокулята – 2 % от объема засеваемой среды. При изучении параметров роста культивирование осуществляли в 750 мл колбах с объемом среды 100 мл на качалке (145 об/мин) при температуре 22°C в течение 48 часов.

Измерение оптической плотности и интенсивности люминесценции проводили с интервалом 1-2 часа. Оптическую плотность измеряли при 670 нм на фотоэлектроколориметре КФК-2 в кювете с длиной оптического пути 5,0 мм. Количество клеток определяли по калиб-

ровочному графику «оптическая плотность/число клеток». Ростовые показатели определяли для каждого штамма, используя общепринятые методы [4]. Интенсивность свечения регистрировали с помощью флюориметра ФЭУ-115 в образце объемом 5 мл после трехкратного взбалтывания при выходе свечения на максимальный уровень и выражали в значениях биоломинесцентного индекса – БЛИ [5], как отношение интенсивности люминесценции опытного образца к интенсивности свечения контрольного образца: $БЛИ = I_o/I_k$.

Для установления зависимости интенсивности биоломинесценции от температуры среды культивирования применяли портативный термостат TDB-120 (Латвия) с точностью задания температуры 0,1°C. При определении оптимальных для свечения бактерий значений кислотности использовали среду культивирования с разными значениями pH. Измерение pH проводили стандартным pH электродом на pH-метре-милливольтметре «pH-150 МА».

Все опыты проводили в 3 повторностях. Полученные данные обрабатывали с помощью программы OriginPro 8.5. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Сравнительное исследование люциферазной активности изучаемых бактерий при их культивировании в течение 48 часов показало, что для большинства культур характерно увеличение интенсивности свечения в период с 8-го по 20-ый час культивирования (рис. 1). При этом начало свечения у бактерий *Ph. phosphoreum* ИМВ В-7071 отмечалось на 8-ой час с момента посева, у штаммов из коллекции КГМУ № 1, №2 на 11-ый, а у штамма №3 на 14-ый час от начала культивирования. Максимум свечения у бактерий *Ph. phosphoreum* и у штамма № 1 пришелся на 11 час с момента посева, а у штаммов №2 и №3 на 17 час. Максимальное значение интенсивности биоломинесценции *Ph. phosphoreum* ИМВ В-7071 было в 4,2 раза выше, чем у штамма № 1 и в 7,2 раза выше, чем у штамма № 2.

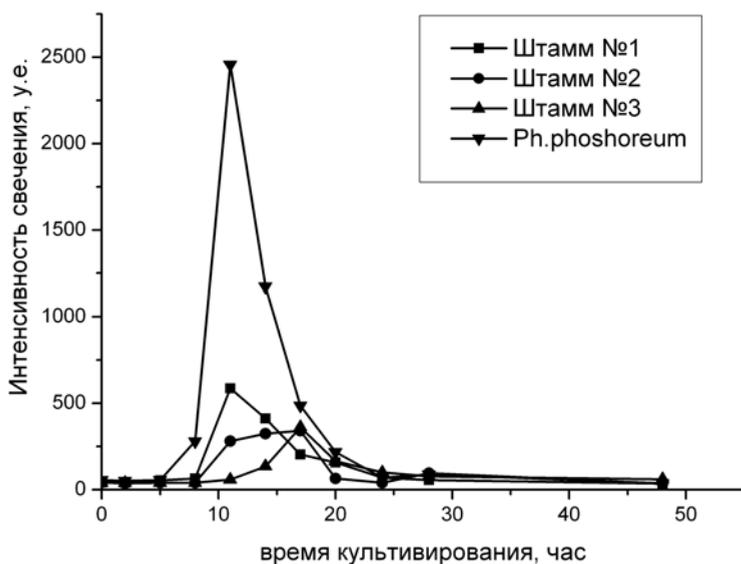


Рис. 1. Динамика бактериальной люминесценции светящихся бактерий при глубинном культивировании

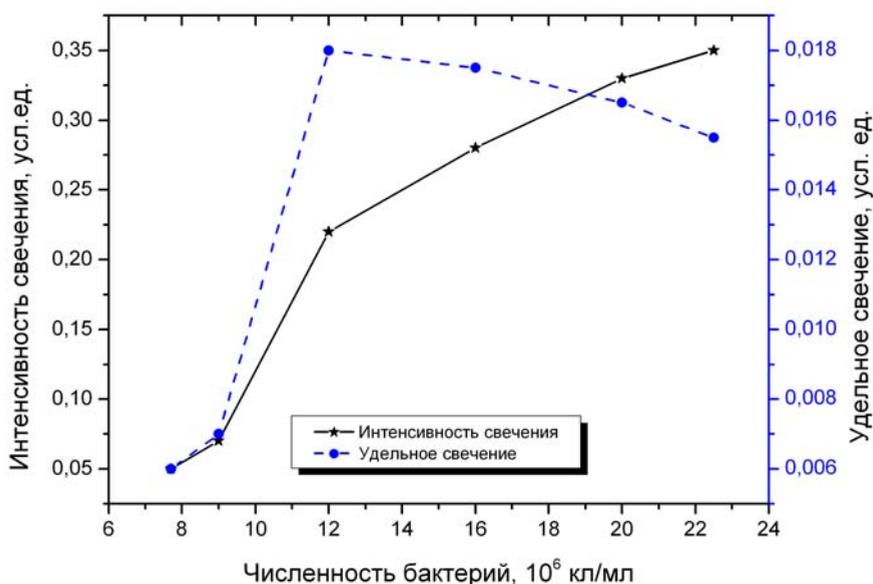
Проведенные исследования ростовых характеристик бактерий (табл. 1) свидетельствовали, что, несмотря на различный уровень биоломинесценции, все штаммы характеризовались приблизительно подобными показателями удельной скорости роста. Минимальные значения длительности лаг-фазы были отмечены у бактерий *Ph. phosphoreum* ИМВ В-7071 и у штамма № 1, максимальные – у штамма № 3. Таким образом, было установлено, что интенсивность свечения имела видовые и штаммовые отличия и не коррелировала с удельной скоростью роста.

Ростовые характеристики исследуемых культур

Исследуемый показатель	<i>Photobacterium phosphoreum</i> ИМВ В-7071	Штамм из коллекции КГМУ		
		№1	№2	№3
Удельная скорость роста, μ , час ⁻¹	0,25±0,03	0,25±0,02	0,24±0,02	0,23±0,05
Время генерации, g, час	2,77	2,77	2,89	3,01
Длительность лаг-фазы L, час	6,5	7	7,5	8

Результаты анализа биолюминесценции исследуемых микроорганизмов показали, что *Ph. phosphoreum* ИМВ В-7071 характеризовался не только наибольшей люцефизазной активностью, но и высокой удельной скоростью роста, короткими лаг-периодом и временем генерации. Учитывая это, последующие исследования были сосредоточены на оптимизации условий люминесценции штамма *Ph. phosphoreum* ИМВ В-7071.

Было установлено, что бактериальная биолюминесценция регистрировалась при достижении определенной плотности бактериальной популяции (кворума) (рис. 2). Данное явление впервые было обнаружено в начале 70-х годов у светящейся морской бактерии *Vibrio fischeri* и получило название «чувство кворума» (от англ. – quorum sensing) [12]. При низкой плотности суспензии, соответствующей ранней логарифмической фазе роста, свечение бактерий было крайне низким. При достижении численности клеток в суспензии более 10^7 кл/мл происходило скачкообразное повышение величины удельного свечения (количество излучаемых фотонов света на количество бактерий). При этом динамика общей интенсивности свечения культуры возрастала менее выражено.

Рис. 2. Зависимость интенсивности свечения *Ph. phosphoreum* от численности бактерий

При культивировании *Ph. phosphoreum* ИМВ В-7071 были отмечены незначительные изменения кислотности среды (в пределах от 6,7 до 7,1). Однако, снижение pH, а затем слабое подщелачивание, нельзя игнорировать (отнести за счет погрешности измерения), поскольку эти изменения, по-видимому, связаны с процессом свечения [7, 13].

Интенсивность биолюминесценции при разных значениях кислотности среды культивирования была определена в диапазоне pH от 2,0 до 12,0 (рис. 3). Максимальный уровень свечения сохранялся постоянным в области значений pH от 5,5 до 9,1. Изменение кислотности среды как в кислую, так и в щелочную зоны сопровождалось резким снижением люминесценции, вплоть до полного исчезновения при достижении значений pH менее 4,0 или более 10,0.

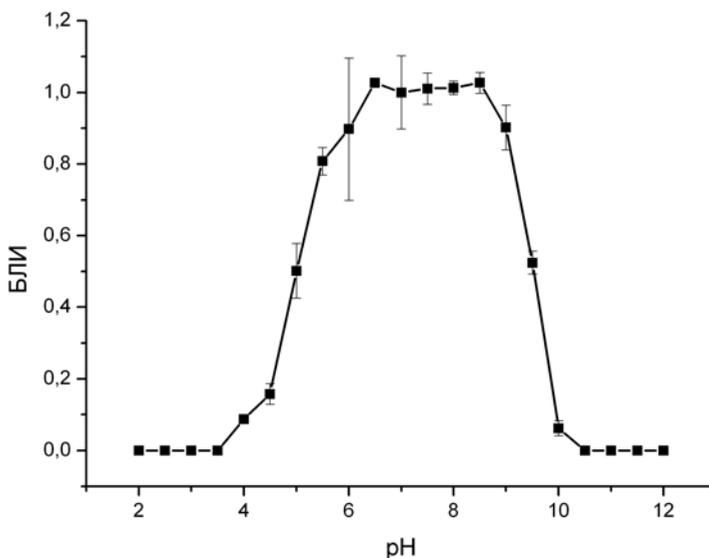


Рис. 3. Влияние pH среды культивирования на интенсивность свечения бактерий *Ph. phosphoreum*

Известно, что биолюминесценция морских светящихся бактерий зависит от концентрации NaCl в среде культивирования [6, 9, 14]. В ходе проведенных исследований было установлено, что максимальный уровень свечения для исследуемого штамма наблюдался в диапазоне от 2 до 8 % NaCl (рис. 4).

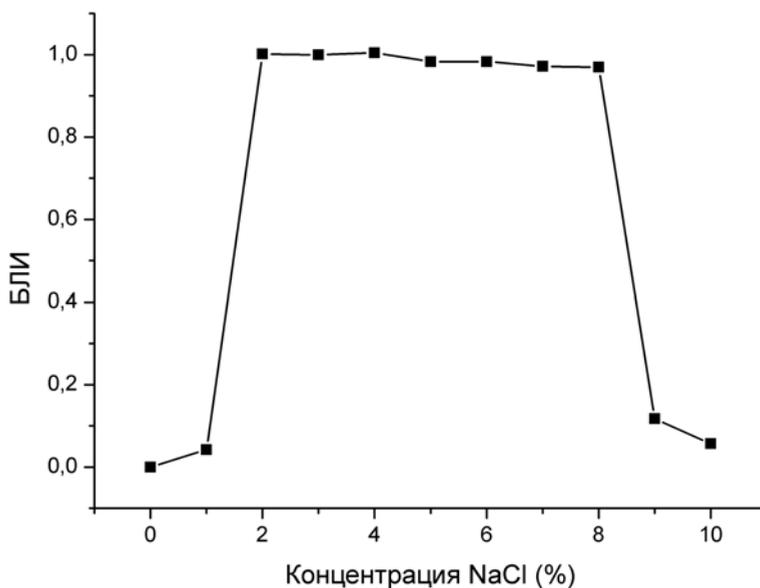


Рис. 4. Влияние концентрация NaCl в среде культивирования на интенсивность свечения бактерий *Ph. phosphoreum*

Изучение влияния температуры на интенсивность свечения *Ph. phosphoreum* ИМВ В-7071 проводили на клетках из фазы логарифмического роста (рис. 5).

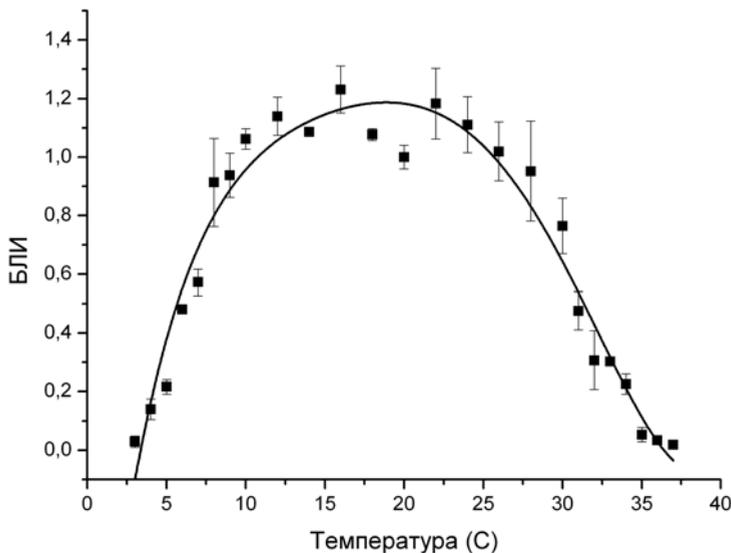


Рис. 5. Температурная зависимость свечения бактерий *Ph. phosphoreum*

Было установлено, что максимальный уровень свечения наблюдался в диапазоне температур от 10 до 28 °С. При повышении температуры выше 28 °С отмечено значительное снижение свечения, а при достижении 35 °С наблюдалась необратимая потеря люминесценции, т.к. после возвращения к оптимальным значениям температуры свечение не восстанавливалось.

Таким образом, в ходе исследований выявлено, что влияние на биолюминесценцию бактерий оказывали рН, температура, концентрация NaCl в среде культивирования. Вместе с тем данные по оптимальным значениям этих параметров имеют отличия для разных штаммов светящихся бактерий.

Представляло интерес провести сравнение оптимальных условий биолюминесценции бактерий, выделенных из различных экологических ниш. Анализ физиологических и эмиссионных характеристик штаммов *Ph. phosphoreum* ИМВ В-7071 и *Ph. phosphoreum* КМ МГУ №331, выделенного из Белого моря [3], показал, что биолюминесценция рассматриваемых культур характеризовалась различными оптимальными параметрами. Максимальный уровень свечения для штамма *Ph. phosphoreum* ИМВ В-7071 проявлялся в диапазоне значений рН 5,5-9,0, в то время как для штамма *Ph. phosphoreum* КМ МГУ № 331 соответствующие значения величины рН составляли 7,0-9,0. Штамм *Ph. phosphoreum* ИМВ В-7071, в отличие от штамма *Ph. phosphoreum* КМ МГУ №331, обладал устойчивой биолюминесценцией в более широких границах значений концентраций хлорида натрия (от 2 до 8% против 0,2-3,8%). Температурный оптимум свечения штамма *Ph. phosphoreum* ИМВ В-7071, составивший диапазон 10°-28°С, по сравнению со штаммом *Ph. phosphoreum* КМ МГУ №331, был в среднем выше на 5 °С, что, по-видимому, связано с различными температурными условиями обитания.

Таким образом, как показали проведенные исследования, интенсивность свечения рассматриваемых бактерий не связана с их удельной скоростью роста и характеризуется как штаммовыми отличиями, так и условиями естественной среды обитания. Установленный широкий диапазон оптимальных физико-химических параметров биолюминесценции позволяет рекомендовать штамм *Ph. phosphoreum* ИМВ В-7071 для решения широкого круга биотехнологических задач.

І.О. Грецький

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, Київ

ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ СВІТНИХ БАКТЕРІЙ *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM* ИМВ В-7071

Резюме

Вивчено біолюмінесценцію штаму світних бактерій *Photobacterium phosphoreum* ИМВ В-7071. Штам характеризувався високим рівнем світіння, високою питомою швидкістю росту, короткими лаг-періодом

і часом генерації. Встановлено дію рН, температури, концентрації NaCl на рівень біоломінесценції. Максимальний рівень біоломінесценції спостерігався в діапазоні концентрацій NaCl від 2 до 8%, в області значень рН від 5,5 до 9,1 і в температурному діапазоні від 10 до 28°C. Проведено порівняння фізіологічних особливостей штаму *Ph. phosphoreum* IMV B-7071, виділеного з Чорного моря зі штамом *Ph. phosphoreum*, що мешкає в Білому морі.

Ключові слова: світні бактерії, *Photobacterium phosphoreum*, біоломінесценція, умови культивування.

I.A. Gretsky

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

INVESTIGATION OF PHYSIOLOGICAL FEATURES OF LUMINOUS BACTERIA *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM* IMV B-7071

S u m m a r y

Bioluminescence of the strain of luminous bacteria *Photobacterium phosphoreum* IMV B-7071 has been studied. The strain was characterized by a high level of luminescence, high specific growth rate, short lag period and generation time. The authors have established the action of pH, temperature, concentration of NaCl on the level of bioluminescence. The maximum level of bioluminescence was observed in NaCl concentration range of 2 to 8%, in the range of pH from 5.5 to 9.1 and a temperature range of 10 to 28 °C. A comparison of the physiological characteristics of the strain *Ph. phosphoreum* IMV B-7071 isolated from the Black Sea with the strain of *Ph. phosphoreum*, living in the White Sea.

The paper is presented in Russian.

К е у о р д с: luminous bacteria, *Photobacterium phosphoreum*, bioluminescence, culture conditions.

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s: *Gretsky I.A.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. *Дерябин Д. Г.* Бактериальная биоломінесценция. Фундаментальные и прикладные аспекты. – Москва: Наука, 2009. – 255 с.
2. *Малыгина И.Ю., Кацев А.М.* Светящиеся бактерии Черного и Азовского морей // *Экология моря*. – 2003. – **64**. – С. 18–23.
3. *Куц В.В., Исмаилов А.Д.* Физиологические и эмиссионные характеристики *Photobacterium phosphoreum* из Белого моря // *Микробиология*. – 2009. – **78**, №5. – С.612–617.
4. *Перт С. Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток: Пер. с англ. / Под ред. И.Л. Работнова. – Москва: Мир, 1978. – 330 с.
5. *Родичева, Э.К., Кузнецов А.М., Медведева С.Е.* Биоломінесцентные биотесты на основе светящихся бактерий для экологического мониторинга // *Вестник ОГУ–РАН*. – 2004. – №5 – С. 96–100.
6. *Светящиеся бактерии* / Гительзон И. И., Родичева Э. К., Медведева С. Е. и др. – Новосибирск: Наука, 1984. – 279 с.
7. *Hastings J.W., Neilson K.H.* Bacterial bioluminescence // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1977. – **31**. – P. 549–595.
8. *Hendrie M.S., Hodgkiss W., Shewan J.M.* Identification, taxonomy and classification of luminous bacteria // *J. Gen. Microbiol.* – 1970. – **64**. – P. 157–169.
9. *Lee B., Lee J., Shin D., Kim E.* Statistical optimization of bioluminescence *Photobacterium phosphoreum* KCTC 2852 // *Environ. Int.* – 2006. – **32**, N 2. – P. 265–268.
10. *Meighen E.* Autoinduction of light emission in different species of bioluminescent bacteria // *Luminescence*. – 1999. – **14**. – P. 3–9.
11. *Neilson K.H., Hastings J.W.* Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance // *Microbiol. Rev.* – 1979. – **43**, N 4. – P. 406–518.
12. *Stevens A.M., Greenberg E.P.* Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes // *J. Bacteriol.* – 1997. – **179**. – P.557–562.
13. *Watanabe T., Nacamura T.* Bioluminescence and cell growth of *Photobacterium phosphoreum* // *J. Biochem.* – 1980. – **88**, N 3. – P. 815–817.
14. *Waters P., Lloyd D.* Salt, pH and temperature dependencies of growth and bioluminescence of three species of luminous bacteria analyzed on gradient plates // *J. Gen. Microbiol.* – 1985. – **11**, N 131. – P. 2865–2869.

Отримано 10.02.2013