

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МОРСКИХ СВЕЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ АРКТИЧЕСКОГО РЕГИОНА

Аленина К.А., Алескерова Л.Э., Исмаилов А.Д.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, РФ; e-mail: anvaris@list.ru

Поступила в редакцию: 20.07.2020

Аннотация. Изучены физиологические и эмиссионные характеристики новых, выделенных из акваторий Белого, Берингова и Охотского морей симбиотических светящихся бактерий. Установлено, что все выделенные штаммы независимо от способов существования и мест обитания относятся к группе психрофильных фотобактерий *Photobacterium phosphoreum*. Все штаммы отличаются высокостабильной биолюминесценцией при глубинном культивировании в диапазоне температур 4-20°C. Выявлены наиболее важные факторы, определяющие эмиссионную активность и стабильность свечения интактных клеток фотобактерий. Показано, что наиболее критическим фактором для свечения является температурный режим культивирования и инкубации бактерий.

Ключевые слова: биолюминесценция, фотобактерии, светящиеся бактерии, *Photobacterium phosphoreum*.

Светящиеся бактерии обладают характерным географическим и сезонным распределением видов в акваториях морей и океанов. Установлена прямая связь между температурным режимом среды обитания и таксономической композицией видов фотобактерий [1, 2]. Выявлено, что в глубинах океанов ниже 300 м, доминирует только один вид бактерий *Photobacterium phosphoreum*. Планктонные формы в холодных зонах морей и океанов не встречаются. *Vibrio harvey*, *Vibrio fisheri* и другие мезофильные виды распределяются в поверхностных слоях при более высоких температурах. Светящиеся бактерии Арктических морей исследованы крайне ограниченно. Представлены физиологические спектральные и эмиссионные характеристики фотобактерий Белого моря [3], фотобактерии Берингова и Охотского морей практически не изучены.

В соответствии с литературными данными [1-3] среда обитания формирует вид фотобактерий. Кроме того, выявлено, что в качестве эндосимбионтов донных рыб фотобактерии преимущественно проявляются как *Photobacterium phosphoreum*, хотя, могут присутствовать и другие виды. Температурный режим арктических морей соответствует условиям существования фотобактерий в глубинах океанов. Что позволяет предполагать, что фотобактерии в этих зонах могут существовать только как симбионты внутренних органов рыб или беспозвоночных. Особую значимость исследованиям низкотемпературных фотобактерий придает возможность их использования в качестве биосенсоров в тест системах биомониторинга токсинов [4].

В данной работе представлен анализ специфических кинетических и эмиссионных свойства светящихся бактерий, выделенных из кишечника рыб: корчака европейского *Mioxocephalus scorpius*, палтуса белокорого *Hippoglossus hippoglossus*, камбалы *Pleuronectes platessa* Белого, Берингова и Охотского морей. Все выделенные штаммы симбиотических фотобактерий по биолюминесцентным, физиологическим и ростовым признакам соответствовали психрофильным бактериям группы *P. phosphoreum*. Вместе с тем были выявлены незначительные различия в спектрах эмиссии, кинетике роста и свечения, что могло указывать на гетерогенность популяций низкотемпературных симбиотических штаммов светящихся бактерий.

Настоящая работа выполнена в целях изучения биоразнообразия светящихся организмов Арктических морей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и культивирование бактерий описано в работах [3]. Интактные клетки получали после центрифугирования (4000 g, 20 мин) и однократного отмывания 0,1М Na-фосфатным буфером с 2% NaCl, pH 7,6. Отмытые клетки ресуспендировали в той же буферной среде и хранили в холодильнике при 4°C. Биомассу контролировали по оптической плотности при 660 нм на спектрофотометре «Beckman-26» (США). Люминесценцию регистрировали на люминометре 1250 LKB-Wallac (Швеция-Финляндия). Температурные зависимости снимали на фотометре с термостатируемым кюветным отделением и термодатчиком. Интенсивность эмиссии выражали в относительных единицах (ОЕ) или в абсолютных величинах выхода фотонов (квант/с.кл). Установки калибровались по стандарту Гастингса, Вебера [5].

Температурные зависимости эмиссии изолированных клеток снимали в 2 % NaCl, 0,1М Na-фосфатный буфере с 2% NaCl, pH 7,5, или в среде для глубинного культивирования (СК). Концентрация клеток в пробах $\sim 10^7$ кл/мл.

Удельную скорость роста рассчитывали из графика в полулогарифмических координатах: $\ln N / t$, где N – концентрация клеток, кл/мл, t – время, ч. Общий выход фотонов при выращивании бактерий рассчитывали, как светосумму от начала культивирования до падения свечения ниже 0,1 % по отношению к максимальной.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рост и люминесцентная активность.

Сравнительный анализ биолюминесцентных и физиологических параметров 14 штаммов, выделенных из разных акваторий, показал ряд общих признаков. Все выделенные штаммы обладали ярким голубоватым свечением с выходом фотонов в оптимизированных условиях до 10^5 квант/с.кл. Спектры биолюминесценции выделенных штаммов близки. Основная полоса с широким максимумом при 478 ± 2 нм, проявляется плечо при 500–515 нм. Необходимо отметить, что специфический спектр биолюминесценции с максимумом при 476–480 нм и плечом в области 500–515 нм является характерным видовым признаком для бактерий группы *P. phosphoreum*. У бактерий *Vibrio harvey*, *Vibrio fisheri* максимум эмиссии сдвинут в длинноволновую область (495–500 нм.), у *V. fisheri* Y-1 максимум при 530 нм.

Рост и свечение в глубинной культуре

На рисунке 1 представлена типичная динамика роста биомассы и интенсивности эмиссии одного из штаммов, выделенных фотобактерий в стандартной богатой среде при 17°C .

Температурные оптимумы роста для выделенных штаммов $15-17^\circ\text{C}$. При указанных температурах стационарная фаза роста достигается через 20–24 часа, длительность стационарной фазы ~100–140 часов, длительность свечения (люминесцентный цикл) до 280 часов. Максимальная эмиссионная активность клеток наблюдается в поздней экспоненциальной фазе роста, удельная люминесцентная активность ($10^4-5 \cdot 10^4$ квант/с.кл.) не изменяется в логарифмической фазе роста бактерий, что свидетельствует об отсутствии у данных штаммов фотобактерий явления аутоиндукции в процессе синтеза люциферазы *de novo*.

Влияние pH, NaCl и температуры.

Информация по солевой, pH и температурной зависимости биолюминесценции *in vivo* служат не только важными показателями видовых и штаммовых отличий, но и отражает адаптационные изменения физиологического состояния клетки в специфических условиях среды обитания.

Известно, что в ходе глубинного роста фотобактерий pH среды сдвигается в кислую область, за счет образования кислых продуктов метаболизма. Сдвиг pH прямо отражается на длительности и интенсивности люминесцентной активности популяции. Величина сдвига pH существенно отличается у разных видов и штаммов, наибольшая скорость образования кислот характерна для быстро растущих мезофильных фотобактерий *V. harveyi*, наименьшая у психрофильных *P. phosphoreum*. Нами установлено, что подкисление среды всеми выделенными штаммами протекало с низкой скоростью, – изменение pH среды не превышало 0,3 ед. pH, и происходило в логарифмической фазе роста. С переходом в стационарную фазу pH среды стабилизируется.

pH-зависимость свечения интактных клеток показала, что все штаммы имеют ярко выраженную алкалотолерантность. В диапазоне pH 7,5–9,0 биолюминесцентная активность на максимальном уровне. Можно полагать, что низкая скорость темного энергетического метаболизма психрофильных бактерий является одним из основных факторов высокой стабильности люминесцентного цикла.

Люминесцентная активность проявляется в диапазоне концентраций NaCl 0,5–4%, с максимальными величинами при 2,5%. В 1% NaCl биолюминесцентная активность составляет ~20% от максимальной. При концентрациях ниже 0,5% и выше 4% соли происходит резкое подавление свечения клеток. Нижний порог

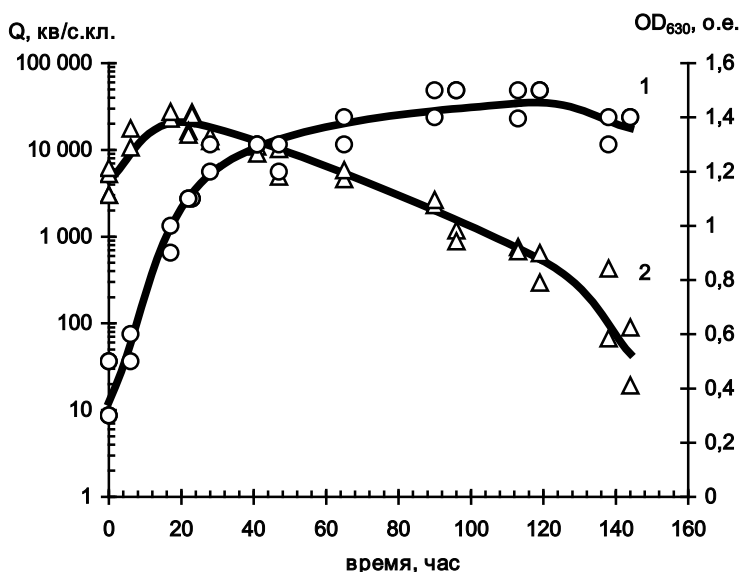


Рисунок 1. Накопление биомассы (кривая 1) и свечение (кривая 2) при культивировании фотобактерий на морской воде с добавлением пептона (5 г/л), дрожжевого экстракта (0,1 г/л) и глицерина (0,3%), pH 7,6, при температуре 17°C

солевой зависимости характерен для всех выделенных низкотемпературных штаммов, и также указывает на адаптационные особенности метаболизма бактерий к условиям Северных морей.

Литературный анализ по чувствительности фотобактерий к температурному воздействию *in vivo* свидетельствует, что интенсивность и стабильность свечения фотобактерий прежде всего обусловлена специфическими природными особенностями вида и штамма [6]. В значительной степени эмиссионная активность определяется эффективностью сопряжения NAD – зависимой электронтранспортной системы с люциферазой. Принципиально, что величины темновых утечек в цепи по альтернативным путям, в сочетании с неферментативным автоокислением FMNН₂ индивидуальны для разных штаммов фотобактерий [7,8]. Кроме того, природа потери свечения при температурном воздействии однозначно не определена.

Природа потери свечения низкотемпературными штаммами фотобактерий при температурном воздействии неизвестна. Для психрофильных бактерий не представлены критические значения температурного эффекта (доза/время), способные вызывать образование темновых мутантов, обратимость или необратимость потери свечения. Считается, что наиболее «узким» звеном эмиссионной активности может быть сопряженность цепи переноса электронов на люциферазу [8].

Действие температуры на эмиссионную активность интактных клеток представлено на рисунок 2. Эксперименты на изолированных клетках ставили целью более четкого описания температурного профиля свечения. При этом учитывалось, что чувствительность изолированных клеток к температуре может отличаться от таковой для растущей культуры. Особое внимание уделено критическим значениям температуры, вызывающим полную или частичную потерю свечения и протекторным свойствам среды инкубации клеток.

Как было отмечено выше, протекторное действие на стабильность свечения оказывают ряд факторов, в том числе компоненты среды культивирования и pH среды инкубации. Соответственно анализ температурного воздействия проводился в соответствующих средах: солевом растворе, богатой среде для глубинного культивирования, и фосфатно-карбонатном буфере, pH 8,5.

На рисунке 2 показаны температурные профили свечения клеток в 2,5% NaCl и среде культивирования (СК). Температурные профили свечения для обоих случаев близки. Вместе с тем обнаружено, что температурный максимум свечения сдвинут к более высоким значениям (~ 20°C) по сравнению с оптимумом свечения растущей культурой (~15°C). Устойчивость к температурному воздействию проверялась путем инкубации клеток при различных температурах и времени, с последующим быстрым охлаждением до 4°C, и последующим измерением температурной зависимости. Установлено, что уже 15-минутная инкубация при 30°C в солевом растворе приводит к необратимой потере свечения. Среда культивирования оказывает протекторный эффект, однако увеличение времени температурного воздействия до 30 минут и в этих условиях приводят к необратимой потере свечения. Щелочная среда инкубации (0,1 М фосфатно-карбонатный буфер, pH 8,5) оказывает протекторное действие, сходное со средой культивирования.

Влияние температуры на временную кинетику свечения интактных клеток фотобактерий из логарифмической фазы роста представлено на рисунке 3.

Результаты свидетельствуют, что при температурах от 4°C до 15°C свечение стабильное в течении 4 часов времени наблюдения. Резкое изменение в кинетике затухания свечения происходит уже при температуре 22°C, при 30°C клетки полностью теряют свечение за 30 мин инкубации.

Как известно, оптимальная температура свечения и роста для *V. harveyi*, *V. fischeri* и *P. leiognathi* 25-30°C, в то время как психрофильные штаммы *P. phosphoreum* проявляют максимальную люминесцентную активность при температурах 15-20°C [1,3].

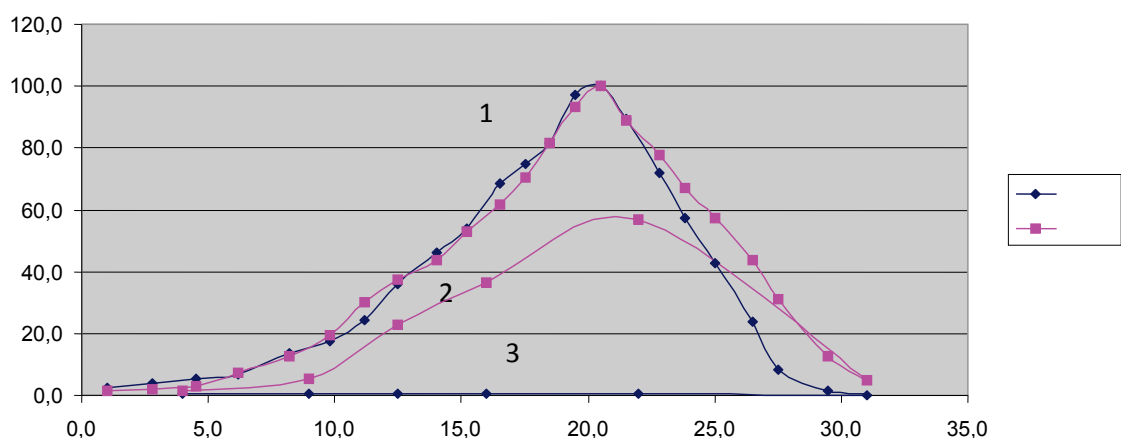


Рисунок 2. Температурные зависимости свечения в 2,5% NaCl (кривые 2,4), и среде культивирования (кривые 1,3). Кривые 3 и 4 получены после 15 мин инкубации при 30°C

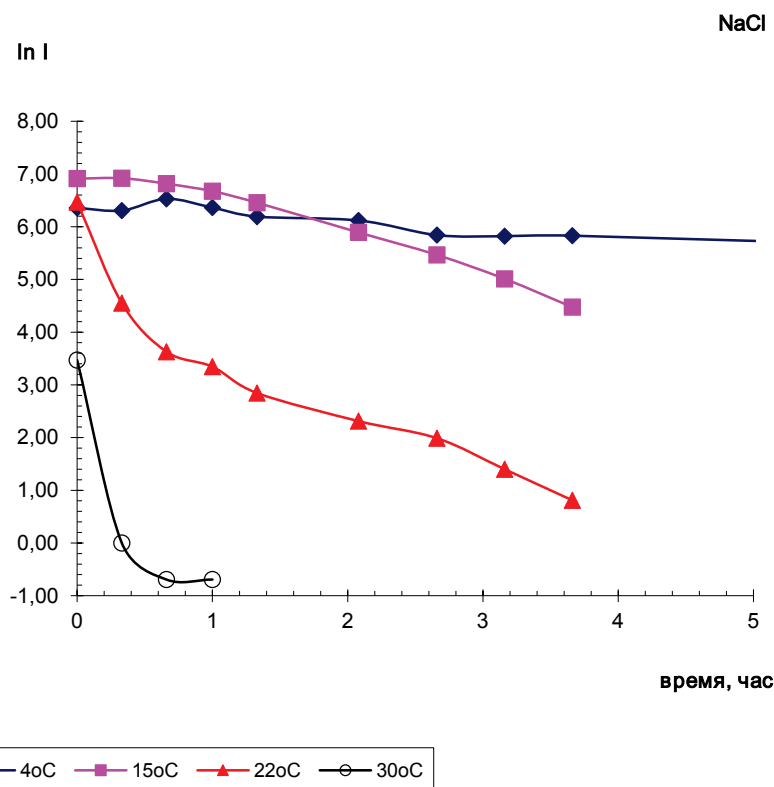


Рисунок 3. Кинетика затухания свечения клеток фотобактерий в 2,5 % NaCl при разных температурах

В то же время четкие данные о значениях обратимого и необратимого температурно-временной инактивации свечения для конкретных видов и штаммов фотобактерий отсутствуют. Результаты работы свидетельствуют в пользу предположения, что наиболее вероятным процессом потери свечения при температурах свыше 20°C для психрофильных видов является разобщение цепи процесса переноса электронов на люциферазу. Можно полагать, что фотобактерии из холодных морей Арктики обладают высокоспряженной системой переноса электронов на люциферазу, что проявляется в высокой люминесцентной активности клеток и повышенной длительности эмиссии. Наиболее важным свойством психрофильных фотобактерий арктических морей является повышенная, по сравнению с мезофильными удельная активность и стабильность свечения.

Совокупность данных также показывает доминирующую роль температуры среды обитания в адаптации энергетических и физиологических характеристик светящихся бактерий, и хорошо согласуются с данными по глубинному распределению видов фотобактерий [1-3].

Основные физиологические и биолюминесцентные характеристики фотобактерий из арктических морей представлены в таблице 1.

Высокая интенсивность и стабильность свечения, создает возможность практического применения данных штаммов как биосенсора [4] в люминесцентных тест-системах и применения бактериальных биосенсоров в дискретном и непрерывном режиме биотестирования загрязнителей окружающей среды.

Таблица 1

Максимум эмиссии	478-480нм
Температурный оптимум свечения	15-17°С
Удельная скорость роста в глубинной культуре	0,1-0,15 ч ⁻¹
Длительность люминесцентного цикла в глубинной культуре (15°С)	до 200 ч
Оптимум и диапазон рН свечения	8,5; 7,0 – 9,0
Оптимум и диапазон NaCl	2,2; 0,5 – 4,0
Максимальная удельная активность <i>in vivo</i>	10 ⁵ квант/с·кл,
Температурный диапазон свечения	4-25°С

Список литературы / References:

1. Nealson K.H., Hastings J.W. Bacterial bioluminescence: Its control and ecological significance. *Microbiology Reviews*, 1979, vol. 43, no. 4, pp. 406-518.
2. Nealson K.H. Seasonal changes in the species composition of luminous bacteria in the nearshore seawater. *Luminology and Oceanography*, 1978, vol. 23, pp. 164-169.
3. Kuts V., Ismailov A.D. Physiological and emission characteristics of the luminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* from the White Sea. *Microbiology*, 2009, vol. 78, no. 5, pp. 554-558.
4. Ismailov A.D., Aleskerova L.E., Alenina K.A., Efremenko E.N. Biosensors using free and immobilized cells of luminous bacteria. Bioluminescence. *Analytical Applications and Basic biology*, 2019, pp. 43-57.
5. Hastings J.W., Weber G. Total quantum flux of isotropic sources. *Journal of the Optical Society of America*, 1963, vol. 53, no. 12, pp. 1410-1415.
6. Cline T.W. Isolation and characterization of luminescence system mutants in bacteria. *Methods in Enzymology*, 1978, vol. 57, pp.166-171.
7. Waters P., Lloyd D. Salt, pH and temperature dependencies of growth and bioluminescence of three species of luminous bacteria analyzed on gradient plates. *Journal of General Microbiology*, 1985, vol. 11, pp. 2865-2869.
8. Nealson K.H., Platt T., Hastings J.W. The cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology*, 1970, vol. 104, no. 3, pp. 313-322.

ECOLOGICAL FEATURES OF MARINE LUMINOUS BACTERIA FROM THE ARCTIC REGION**Alenina K.A., Aleskerova L.E., Ismailov A.D.**

Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory, 1, bld. 12, Moscow, Russia; e-mail: anvaris@list.ru

Abstract. The physiological and emission characteristics of new symbiotic luminous bacteria isolated from the fishes in the White, Bering and Okhotsk seas have been studied. It was found that all isolated strains, regardless of the mode of existence and habitats, belong to the group of psychrophilic photobacteria *Photobacterium phosphoreum*. All strains are distinguished by highly stable bioluminescence during submerged cultivation in the temperature range of 4-20 °C. The most important factors determining the emission activity and luminescence stability of intact photobacteria cells have been identified. It has been shown that the most critical factor for luminescence is the temperature value of bacterial cultivation and incubation.

Key words: photobacteria, bioluminescence, *Photobacterium phosphoreum*.