

Я. Е. ДОСКОЧ, Н. Н. БОГДАНОВА, И. М. ПАРХОМЕНКО,
Н. Н. МАЗОХИНА, Б. Н. ТАРУСОВ

**ВЛИЯНИЕ РЕЖИМА ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ СПОР
ВАС. AEROTHERMOPHILUS НА ИХ ИНДУЦИРОВАННУЮ
ЭЛЕКТРОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ**

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 15 XII 1971)

Сверхслабое свечение живых клеток, так называемая хемилюминесценция (х.л.), в основе которой лежат химические реакции окисления лабильных внутриклеточных компонентов, все шире используется в биологии, медицине, а также в некоторых отраслях промышленности, как средство получения информации о состоянии биологического объекта (¹⁻⁴). Особенно перспективными в практическом плане являются исследования биологических объектов с помощью регистрации их х.л., индуцированной различными приемами.

Наши исследования были проведены с суспензией спор термофильного микроорганизма *Vas. aerothermophilus* (штамм 8), в результате чего впервые удалось наблюдать их индуцированную х.л.

К настоящему времени в литературе имеется лишь несколько работ, касающихся хемилюминесценции микроорганизмов. Так, было показано, что микроорганизмы в фазе деления испускают свечение в видимой области спектра (⁵). Обнаружено было свечение также у дрожжей после облучения (^{6, 7}). Мы попытались выяснить связь свечения суспензии спор термофильных бактерий с их термоустойчивостью, а также установить особенности свечения при различных режимах термоинактивации спор.

Получение споровой суспензии и прогревание осуществляли по известным методикам (⁸). Суспензию спор на дистиллированной воде (титр $3 \cdot 10^7$ клеток/мл) расфасовывали по 2 мл в ампулы. Последние запаивали и прогревали при разном соотношении температуры и времени. Прогревы проводили в термостате типа ТС-24, с глицерином в качестве теплопередающей среды. Из прогретой суспензии, находящейся в ампулах, 0,1 мл высевали на мясо-пептонный агар с 0,5% глюкозы и 0,2% крахмала с разведением или без разведения, в зависимости от предполагаемого количества выживших спор. Учет результатов проводили через трое суток термостатирования при 55° в термостате с увлажнением. Оставшаяся часть суспензии из прогретых ампул использовалась для изучения х.л.

Сверхслабую спонтанную х.л. микроорганизмов и индуцированную электрическим потенциалом — электрохемилюминесценцию (э.х.л.) регистрировали на квантометрических фотоэлектронных установках (⁴). Для снятия кривых х.л. споровую суспензию термофильного микроорганизма помещали в стеклянную кювету емкостью 1,5 мл с платиновыми электродами.

Спонтанную сверхслабую х.л. нам не удалось наблюдать ни у нативной, ни у прогретой суспензии спор *Vas. aerothermophilus*. Поэтому было предпринято изучение индуцированной э.х.л. спор. Поскольку оно проводилось впервые, то необходимо было найти наилучший режим регистрации э.х.л. спор. Оптимальными условиями для возникновения индуцированной э.х.л. оказались: стабильное напряжение на электродах, равное 15 в, и концентрация спор в кювете порядка 10^7 .

При пропускании постоянного тока через суспензию спор возникает свечение, интенсивность которого возрастает во времени.

В эксперименте суспензия спор подвергалась термоинактивации при 115, 120, 125 и 130° при варьировании длительности нагревания. Кинетические кривые э.х.л. суспензии спор, прогретой при 120°, представлены на рис. 1. Аналогичный характер имеют кривые э.х.л. спор, прогретых при 115, 125 и 130°.

Анализируя полученные данные, можно отметить следующее. Свечение нативной суспензии спор значительно ниже уровня свечения про-

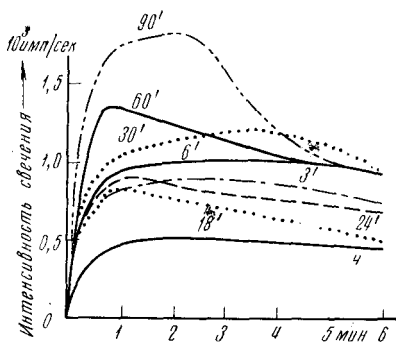


Рис. 1. Кинетические кривые индуцированной электрохемилюминесценции суспензии спор *Bac. aerotherophilus* при различных длительностях прогрева при 120°. Цифры на кривых — экспозиции прогрева (мин.); n — кривая, соответствующая непрогретой суспензии (контроль). Фон установки смещен на ось абсцисс

гретой суспензии. Интенсивность свечения непрогретой суспензии во всех опытах приблизительно одинакова. Кинетические кривые э.х.л. прогретых спор имеют обычно один максимум. Из сравнения максимумов свечения (рис. 2), взятых из кинетических кривых э.х.л. спор, прогретых определенное время при 115, 120, 125 и 130°, видно, что максимальная интенсивность свечения зависит от длительности прогрева. При всех исследуемых температурах наблюдается увеличение интенсивности свечения при увеличении длительности прогрева, затем некоторое плато или даже спад свечения, и далее новый подъем свечения. Этот второй подъем свечения наблюдается в суспензии полностью инактивированных нагреванием спор. Увеличение э.х.л. в прогретой суспензии спор свидетельствует о большей скорости реакции рекомбинации радикалов по сравнению с контрольной суспензией.

Наряду с регистрацией интенсивности э.х.л. суспензии спор, было отмечено изменение силы тока, проходящего через кювету при стабилизированном напряжении. Возрастание силы тока в суспензии спор, как правило, сопровождается увеличением уровня свечения. Так, при постоянном потенциале на электродах, равном 15 в, в кювете с нативной суспензией возникал ток от 5—6 ма в начале опыта до 3—4 ма к концу опыта. Максимальная сила тока (14 ма) зафиксирована у суспензии спор, прогретых при 120°, на протяжении 90 мин., а у суспензии спор, прогретых при 130°, в течение лишь 3 мин.

Изменение электропроводности суспензии связано, возможно, с изменением проницаемости оболочек спор и выходом из них веществ. Для выяснения влияния пропускаемого через суспензию спор тока на их жизнеспособность были проведены высевы из суспензии спор после определения их э.х.л. Результаты показали, что в непрогретой суспензии спор до измерения э.х.л. в 0,1 мл суспензии содержалось $3,82 \cdot 10^6 \pm \pm 0,45 \cdot 10^6$ микроорганизмов, после измерения э.х.л. $7,16 \cdot 10^6 \pm 1,18 \cdot 10^6$; при прогревании суспензии спор до 130° (0,5 мин.) до измерения э.х.л. в 0,1 мл суспензии содержалось $22,5 \cdot 10^4 \pm 3,53 \cdot 10^4$, после измерения э.х.л. $25,5 \cdot 10^4 \pm 6,36 \cdot 10^4$.

Следовательно, пропускаемый через суспензию ток не оказывает губительного влияния на споры.

Таким образом, возникновение э.х.л. в прогретой суспензии объясняется, по-видимому, следующими причинами. Термическая обработка

приводит к глубоким изменениям в структуре и проницаемости оболочек спор, что способствует выделению споровых веществ наружу. Так, при летальном воздействии температур из спор выделяется дишколиновая кислота (⁹, ¹⁰). В экстракте, полученном автоклавированием спор *Vas. subtilis*, обнаружены витамины группы В и коэнзимы (¹¹). При нагревании клеток дрожжей после их гибели в среду диффундируют также

аминокислоты (¹²). Выделение внутриклеточных веществ наблюдалось и при нагревании стафилококка (¹³).

При пропускании электрического тока через прогретую суспензию спор в сосуде идет процесс электролиза. По-видимому, проведение тока через суспензию связано с выходом из спор различных ионов, а э.х.л. генерируется за счет электролитического окисления вышедших из спор органических веществ. Свечение появляется при рекомбинации свободных радикалов, возникающих в процессе окисления. Э.х.л. нативной суспензии спор происходит, очевидно, за счет того небольшого количества веществ, которые выделяются из проросших спор. Индуцированное свечение прогретой суспензии растет по мере прогрева, т. е. температуры прогрева и экспозиции, и особенно резко возрастает к моменту полной инактивации спор, что может быть результатом разрушения липопротеиновых мембран и структур спор, а также термического распада эндогенных антиоксидантов.

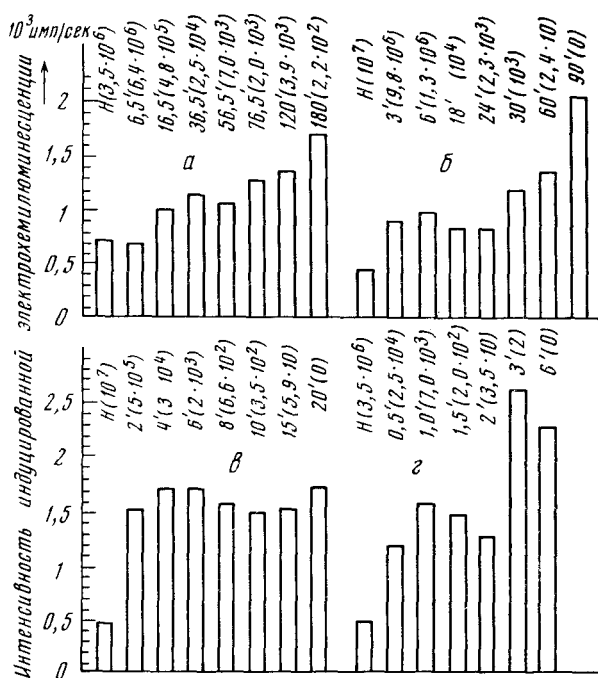


Рис. 2. Гистограммы максимальной интенсивности индуцированной электрохемилюминесценции спор термофильного микроорганизма при 115° (а), 120° (б), 125° (в), 130° (г) при различных экспозициях прогрева. Первая цифра — экспозиция прогрева в минутах, в скобках — титр суспензии

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Всесоюзный научно-исследовательский институт
консервной и овощесушильной промышленности
Москва

Поступило
24 XI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Б. Н. Тарусов, С.-х. биол., 3, № 3 (1968).
- Я. Е. Доскоч, Г. Э. Лимбергер, Б. Н. Тарусов, С.-х. биол., 2, № 3 (1967).
- Б. Н. Тарусов, Природа, № 2 (1966).
- Я. Е. Доскоч, Информационное значение сверхслабой хемилюминесценции в оценке термоадаптации растительных организмов, Кандидатская диссертация, МГУ, 1968.
- Р. Ф. Полищук, Н. Н. Глущенко, Тез. докл. симпозиума: Сверхслабые свечения в биологии, М., 1969.
- Б. Ф. Киричинский, Э. З. Рябова и др., Тез. докл. симпозиума: Сверхслабые свечения в биологии, М., 1969.
- Ю. М. Петрушевич, А. Г. Конопляников, Биофизика, 10, в. 3 (1965).
- В. И. Рогачев, Н. Н. Мазохина и др., Термостойчивость микроорганизмов и разработка режимов стерилизации консервов, М., 1968.
- Н. Н. Мазохина, Н. В. Богданова, Микробиология, 11, в. 4 (1971).
- J. Farkas, J. Kiss, Acta microbiol., 12, 16 (1965).
- W. G. Murrel, The Bacterial Endospore, Sydney, 1955.
- K. Vas, Agrokémia és táptan, 2, № 1 (1965).
- M. C. Allwood, A. D. Russel, Appl. Microbiol., 15, № 6 (1967).