

Л. Ю. БЕРЖАНСКАЯ, И. И. ГИТЕЛЬЗОН, А. М. ФИШ,
Р. И. ЧУМАКОВА

ОБ ИМПУЛЬСНОМ ХАРАКТЕРЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

(Представлено академиком Г. М. Франком 28 II 1975)

Несмотря на интенсивные исследования биолюминесценции бактерий (¹⁻⁴), структурная организация светоизлучающей системы бактериальной клетки на надмолекулярном уровне остается неясной. Существенный интерес в этом отношении могут представить данные об особенностях светового сигнала одной бактериальной клетки, так как обычно наблюдаемое свечение бактериальной культуры является несинхронным и не дает информацию о характере биолюминесцентного сигнала отдельной клетки.

Известно, что световые сигналы большинства светящихся организмов имеют форму импульсов, вспышек. Для организма с внутриклеточной люминесценцией характерны вспышки длительностью от 50 до 750 мсек., для организмов с внеклеточной люминесценцией от ~ 2 до 50 сек. (⁵⁻⁸). Интенсивность вспышек для различных организмов меняется в широких пределах: от $0,1 \cdot 10^{-6}$ мквт/см² (у простейших) до $6,3 \cdot 10^{-2}$ мквт/см² (у ракообразных) (⁶⁻⁹). Морские биолюминесцентные организмы излучают в основном только при стимуляции. Исследования возбужденной внешними раздражителями биолюминесценции показали, что форма светового импульса не зависит от вида и интенсивности раздражителя. Это дало основание предположить, что стимуляция необходима лишь для запуска люминесцентной реакции, а форма и длительность биолюминесцентного сигнала определяются излучающей системой организма (⁹).

Фотобактерии, в отличие от большинства люминесцирующих организмов, светят без внешней стимуляции в течение многих суток. Широко распространено мнение, что бактерии и грибы являются единственными биолюминесцентами, обладающими сплошным, неимпульсным свечением (¹⁰). Но обычно наблюдаемая биолюминесценция миллионов бактерий не отражает истинного характера свечения клетки. В связи с этим предпринимались попытки определить режим свечения отдельных бактерий, и было высказано предположение о, возможно, импульсном характере свечения клетки (^{9, 11}). Однако экспериментальное подтверждение этой гипотезы до сих пор отсутствует, что связано с методической сложностью регистрации и анализа биолюминесцентного сигнала отдельной бактериальной клетки. Светящиеся бактерии являются самыми маленькими (~ 2 мкм) живыми источниками света. При регистрации сигнала в одной и той же культуре встречаются клетки с различной интенсивностью свечения — от 20 до 10^3 квант/сек. Энергия свечения одной бактерии *Vibrio indicus* (максимум спектра свечения при 510 нм), определенная расчетным путем, равна $4,95 \cdot 10^{-10}$ мквт/см² (¹⁰), что соответствует интенсивности свечения 10^3 квант/сек.

Исследование свечения небольшого числа бактерий *Photobacterium belozerskii* ($\sim 5-10$ клеток), проведенное нами ранее (^{12, 13}) на установке с высокой чувствительностью с применением корреляционного и спектрального анализа при обработке экспериментальных результатов, показало, что для биолюминесцентного сигнала клетки характерна определенная рит-

мичность. Корреляционные функции биолюминесцентного сигнала обнаруживают низкочастотную периодическую составляющую (¹³). Эти данные позволили предположить, что свечение бактерий происходит вспышками, причем длительность вспышки должна быть на порядок меньше периода между вспышками.

Настоящая работа посвящена экспериментальному доказательству импульсного характера свечения клетки. Определены форма и длительность светового сигнала, частота следования и энергия вспышек отдельных бактериальных клеток.

Рис. 1. Последовательность импульсных пакетов в световом сигнале отдельной клетки *Photobacterium belozerskii*. Длительность вспышек (пакетов) $\sim 5-10$ сек., частота следования пакетов $\sim 0,02$ гц

Рис. 2. Форма отдельного импульса в биолюминесцентном сигнале клетки

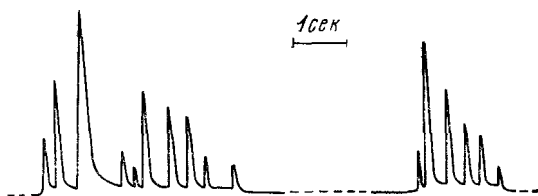


Рис. 1

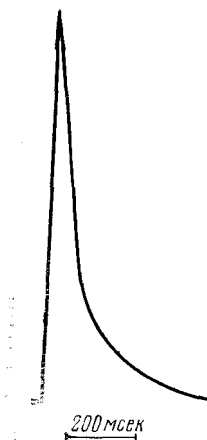


Рис. 2

В качестве объекта исследования выбрана одна из яркосветящихся линий бактерий *Photobacterium belozerskii*, выделенных в Тихом океане (¹⁴). Бактерии выращивались на скошенном агаре в течение нескольких часов при температуре 24°. Отмытые бактерии суспендировали в $\frac{1}{15}$ M фосфатном буфере с 3% раствором NaCl. Капли суспензии (объемом $\sim 1 \cdot 10^{-3}$ мл) наносили микропипеткой на поверхность световода, соединенного с катодом фотоумножителя. Число клеток в эксперименте определялось посевом непосредственно со световода и контрольным посевом из этого же разведения на чашки Петри. Свечение клеток регистрировали высокочувствительным охлажденным фотоумножителем, работающим в режиме счетчика фотонов, на установке, описанной ранее (¹³). Информация о временной структуре исследуемого процесса на выходе регистрирующей системы представлена в виде импульсного потока. Для обнаружения периодичностей в биолюминесцентном сигнале клетки и восстановления формы отдельных вспышек были разработаны специальные программы для УВМ «Днепр» и ЭВМ М-222.

В экспериментах зарегистрированы световые сигналы нескольких клеток с равными, но сдвинутыми по фазе частотами, а также свечение отдельных бактерий (рис. 1). Анализ показывает, что биолюминесцентный сигнал отдельной клетки представляет собой последовательность импульсных пакетов длительностью от 5 до 10 сек. Частота следования пакетов в свечении одной клетки равна 0,02 гц. Пакет состоит из хорошо сформированных импульсов с крутым фронтом нарастания и экспоненциальным спадом. Число импульсов в пакете для каждой клетки меняется в процессе свечения от 5 до 10, частота следования импульсов ~ 1 гц.

Форма отдельного импульса показана на рис. 2. Длительность импульсов меняется от 200 до 800 мсек. В течение одного импульса высвечивается $\sim 10^3$ фотонов. Энергия свечения одной бактерии *Photobacterium belozerskii*

($\lambda_{\max}=480$ нм) в течение однократного высвечивания (импульса) равна $1,6 \cdot 10^{-9}$ эрг; энергия всей вспышки соответственно равна $0,8 \cdot 10^{-8}$ – $1,6 \cdot 10^{-8}$ эрг. Кинетика спада интенсивности свечения в отдельных импульсах для двух различных клеток показана на рис. 3. Для построения взяты импульсы разной амплитуды и длительности, принадлежащие различным пакетам. Из рис. 3 видно, что скорость спада

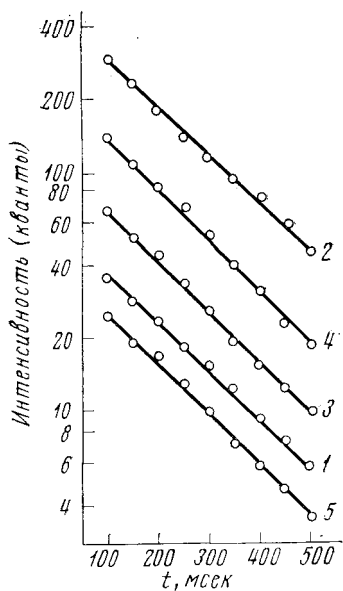


Рис. 3. Кинетика спада интенсивности свечения в отдельных импульсах (1–5) *Photobacterium belozerskii*

для всех импульсов одинакова, а постоянная спада $\alpha_{\text{имп}}=5$ сек $^{-1}$. Амплитуда импульсов в пакете также убывает по экспоненциальному закону (рис. 1). Постоянная скорость спада свечения для вспышек $\alpha_{\text{всп}}=0,3$ – $0,5$ сек $^{-1}$.

Люминесцентная реакция бактерий представляет собой ферментативное окисление восстановленного флавинмонокнуклеотида молекулярным кислородом, для световой эмиссии требуется длинноцепочечный альдегид (^{1, 2}). При изучении биолюминесценции бактерий *in vitro* обнаружено, что световая эмиссия может продолжаться в течение длительного времени даже после того, как весь субстрат реакции исчерпан (³). На этом основании было предположено существование долгоживущего промежуточного соединения, которое представляет собой перекисный комплекс люциферазы и восстановленного флавина. Время жизни комплекса измеряется десятками секунд, при этом спад биолюминесцентной реакции *in vitro* оказывается точно экспоненциальным с постоянной скорости спада $\alpha=0,05$ сек $^{-1}$ (⁴).

Значения, полученные нами для постоянной скорости спада биолюминесцентной реакции в клетке ($\alpha_{\text{всп}}=0,3$ – $0,5$), превышают эти данные в 6–10 раз. Следовательно, биолюминесцентная реакция в клетке идет несколько быстрее, а длительность вспышек (пакетов) определяется, видимо, как и *in vitro*, характерным временем жизни промежуточного комплекса.

Таким образом, свечение бактерий, вопреки существовавшему ранее представлению, не является непрерывным и не составляет в этом смысле исключения. Как и все изученные биолюминесцентные, бактерии генерируют свет импульсами.

Институт физики им. Л. В. Киренского
Сибирского отделения Академии наук СССР
Красноярск

Поступило
18 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. D. McElroy, A. A. Green, Arch. Biochem. and Biophys., v. 56, 240 (1955).
- ² J. W. Hastings, Q. H. Gibson, J. Biol. Chem., v. 238, 2538 (1963).
- ³ J. W. Hastings, Q. H. Gibson et al., Bioluminescence in Progress, 1966, p. 151.
- ⁴ J. W. Hastings, C. Balny et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, № 12, 3468 (1973).
- ⁵ J. A. C. Nicol, J. Marine Biol. Assoc. U.K., v. 36, 529 (1957).
- ⁶ J. A. C. Nicol, J. Marine Biol. Assoc. U.K., v. 37, 33 (1958).
- ⁷ G. L. Clarke, K. L. Conover et al., J. Marine Biol. Assoc. U.K., v. 42, № 3 (1962).
- ⁸ J. W. Hastings, B. M. Sweeney, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 43, 804 (1957).
- ⁹ И. И. Гительзон, В сб.: Биолюминесценция моря, М., 1969, стр. 153.
- ¹⁰ E. N. Harvey, Bioluminescence, N.Y., 1952.
- ¹¹ А. М. Фиш, Р. И. Чумакова, Н. М. Саланский, В сб.: Биоэнергетика и биологическая спектrophотометрия, М., 1967, стр. 75.
- ¹² Л. Ю. Бержанская, И. И. Гительзон и др., В сб.: Колебательные процессы в биологических и химических системах, т. 2, Пушино-на-Оке, 1971, стр. 141.
- ¹³ Л. Ю. Бержанская, И. И. Гительзон и др., Биофизика, т. 18, № 2, 285 (1973).
- ¹⁴ Р. И. Чумакова и др., Микробиология, т. 41, № 4, 613 (1972).