

ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ

УДК 535.372

**СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КУЛЬТУРЫ
ПУРПУРНЫХ СЕРНЫХ БАКТЕРИЙ *Chromatium* sp. В ВОДНОЙ
СРЕДЕ****А. С. Милюков, С. В. Пацаева, В. И. Южаков, Е. Л. Ростовцева*)***(кафедра общей физики)*

E-mail: spatsaeva@mail.ru

Проведено спектроскопическое исследование с целью выяснения спектральных особенностей пурпурных фотосинтезирующих серных бактерий рода *Chromatium* sp. для различных стадий развития культуры и при изменении условий выращивания. Описаны возможности использования спектров поглощения и люминесценции клеток бактерий для оценки их численности в определенном диапазоне концентраций. Соотношения полос порфиринов и «синей» люминесценции могут применяться для оценки физиологического состояния культуры.

Прибрежная зона морей в первую очередь подвержена антропогенным воздействиям, которые охватывают все новые акватории. Поэтому мониторинг этой зоны, в том числе биологический, важен с точки зрения контроля состояния биоты наиболее интенсивно загрязняемых акваторий и как звено фонового мониторинга биосферы [1].

Экологический мониторинг может быть эффективным при условии достаточной разветвленности сети станций наблюдения и регулярности поступления с них первичной информации. Список абиотических параметров для мониторинга достаточно традиционен: температура, соленость, концентрация основных элементов и т.п. С биотическими параметрами, прежде всего с обилием отдельных видов, ситуация гораздо сложнее. Для определения отдельных видов требуется участие квалифицированных специалистов. Попыткой обойти эту трудность является концепция видов-индикаторов, по состоянию которых судят об изменениях в сообществе. Для мониторинга особое значение приобретает разработка экспресс-методов, позволяющих судить о состоянии сообщества.

Методы спектрального анализа с успехом применяются для исследования фитопланктона [2–3] и определения растворенного органического вещества [4–6] в природной воде. Авторы сделали попытку применить спектральный анализ для учета численности и оценки состояния пурпурных серных бактерий, которые являются важной составляющей биоты прибрежных акваторий.

Объектом исследования данной работы стали пурпурные серные бактерии рода *Chromatium*. Пур-

пурные фотосинтезирующие бактерии широко распространены в природе. Они встречаются почти в каждом водном бассейне, а также в почве. Основными местами их обитания являются пресные и соленые водоемы, содержащие сероводород. В водоемах застойного типа, богатых органическими веществами, пурпурные бактерии развиваются в огромных количествах, образуя массовые скопления. Эти бактерии осуществляют фотосинтез, поглощая свет с длиной волны от 800 до 900 нм [7].

Наиболее часто встречаются в природных водах представители рода *Chromatium*, которые растут в толще воды и образуют скопления на дне водоемов, легко адаптируясь к различному солевому составу воды, содержанию растворенного кислорода, концентрации органических веществ, температуре и рН. Эти микроорганизмы являются важным звеном в цепи превращения серы в различных водоемах. Благодаря их способности окислять сероводород водоемы очищаются от этого ядовитого соединения [8].

Применение спектральных методов для изучения физиологического состояния пурпурных серных бактерий в перспективе может служить инструментом биомониторинга водоемов, позволяющим быстро оценивать реакцию сообщества фототрофных бактерий на изменения физико-химических условий внешней среды.

Целью нашего исследования являлось выяснение спектральных особенностей пурпурных серных бактерий рода *Chromatium* для различных стадий развития культуры и при изменении условий выращивания. Проводились измерения спек-

*) Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова.

тров поглощения, возбуждения и испускания флуоресценции для культуры в различных фазах развития (экспоненциальной, стационарной и др.) и для культуры, выращенной при различном освещении. Спектры поглощения измерялись на спектрофотометре Spesord M40 в области длин волн 200–900 нм. Спектры люминесценции при возбуждении на 270 и 390 нм регистрировались приборами Jobin Yvon 3CS и Perkin Elmer LS55 в спектральном диапазоне до 800 нм. Все измерения культур бактерий проводились в стандартных кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см.

Спектры поглощения культуры *Chromatium* sp.

Спектры поглощения бактериальной культуры *Chromatium* sp., приведенные на рис. 1, имеют ярко выраженные максимумы поглощения протопорфина при $\lambda = 390$ нм и одной из форм бактериохлорофилла (Бхл800) около $\lambda = 800$ нм. Цвет пурпурных серных бактерий определяется наличием каротиноидов, интенсивно поглощающих в сине-зеленой области спектра. Однако пики индивидуальных соединений каротиноидов не различимы на широком фоне поглощения других органических соединений и рассеяния клеток. В спектрах поглощения культуры *in vivo*, в отличие от экстрактов в органических растворителях, присутствует довольно интенсивное рассеяние света клетками. Вклад рассеяния увеличивается с уменьшением длины волны света и в УФ-области превалирует над поглощением пигментов клеток.

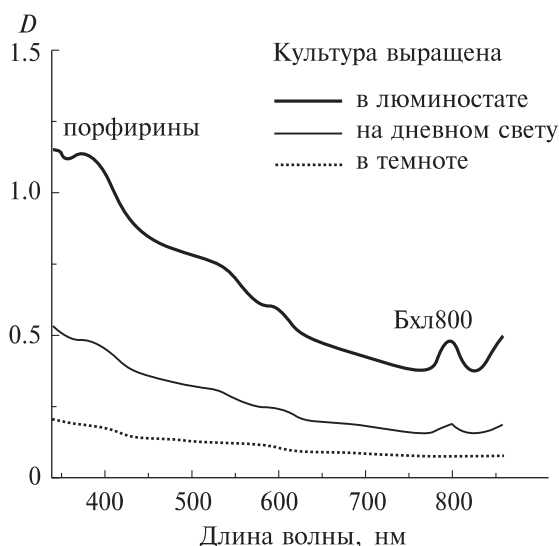


Рис. 1. Спектры поглощения культуры *Chromatium* sp., выращенной в различных условиях

При разведении питательной средой культуры с известной численностью, установленной путем прямого счета [9], оптическая плотность монотонно падает во всем исследованном спектральном диапазоне. Последовательное разведение культуры пита-

тельной средой дало возможность оценить область применимости спектров поглощения для учета численности бактерий. Значение оптической плотности в области поглощения пигментов пурпурных бактерий — протопорфиринов (390 нм), каротиноидов (около 600 нм) и бактериохлорофилла (800 нм) — описывается линейной зависимостью от концентрации бактерий в воде вплоть до концентраций 6 млн клеток/мл (рис. 2). При больших концентрациях бактерий оседание клеток в процессе измерения не позволяет провести измерения корректно.

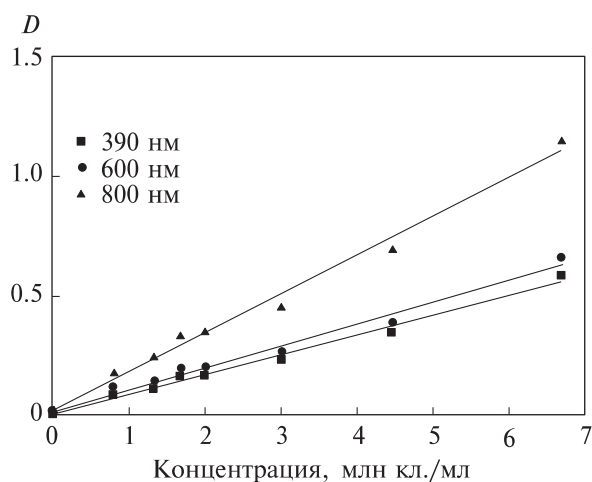


Рис. 2. Зависимость оптической плотности от численности бактерий

Сравнение оптической плотности семидневной культуры бактерий, выращенной в различных условиях (в темноте, при дневном свете и в люминистате), показывает (рис. 1), что более быстрый рост клеток в экспоненциальной фазе развития культуры происходит при большей интенсивности освещения.

Спектры люминесценции культуры *Chromatium* sp.

В спектре испускания культуры бактерий *Chromatium* sp. можно выделить три главные полосы в УФ и видимой областях спектра:

- УФ-полоса триптофановых остатков белковых комплексов с максимумом при $\lambda = 340 \div 350$ нм при возбуждении длиной волны короче 270 нм;
- широкая синяя полоса люминесценции клеток с максимумом при $\lambda = 440 \div 450$ нм;
- узкие полосы свечения порфириновых соединений с максимумом на 616 нм и 680 нм, максимум спектра возбуждения которых приходится на 390 нм.

Зависимость интенсивности люминесценции от численности клеток для различных полос испускания при возбуждении излучением с длиной волны 390 нм показана на рис. 3.

Для выяснения вопроса о применимости люминесцентного метода учета численности бактерий

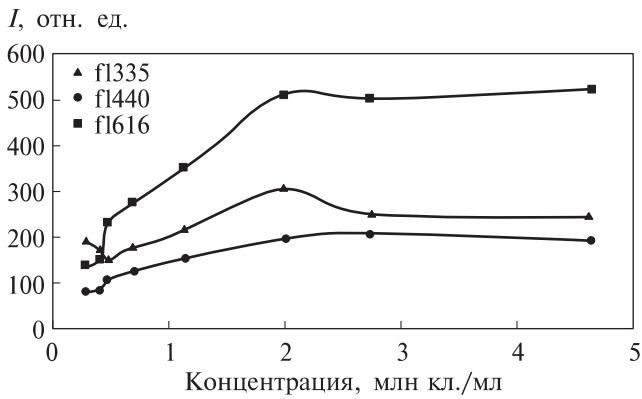


Рис. 3. Зависимость интенсивности люминесценции культуры пурпурных бактерий в фазе экспоненциального роста от численности клеток для различных полос испускания

проводился эксперимент по разведению культуры бактерий питательной средой в известное число раз. Было обнаружено, что интенсивность свечения для всех трех полос флуоресценции при увеличении концентрации клеток в растворе сначала линейно возрастает, а затем выходит на насыщение (отклонение от линейного роста, иногда даже падает). Наличие предельной концентрации (около 2 млн клеток/мл), после которой интенсивность флуоресценции практически перестает расти, может быть обусловлено большим поглощением возбуждающего света и испущенного сигнала флуоресценции в концентрированном растворе (перепоглощение).

Таким образом, собственная флуоресценция пурпурных серных бактерий в водной среде может быть использована для их количественной диагностики, так как линейная зависимость интенсивности свечения и численности клеток наблюдается в определенном концентрационном диапазоне — для численности бактерий до 2 млн клеток/мл.

Интенсивность люминесценции зависит не только от численности клеток, но и от условия их выращивания. На рис. 4 приведены спектры люминесценции при возбуждении на длине волны 390 нм для культуры бактерий, выращенной в различных условиях — в темноте, при естественном освещении и в люминостате. На каждом графике для сравнения показаны спектры для культуры возраста 7 (экспоненциальная фаза роста) и 28 дней (стационарная фаза). Наибольшие значения интенсивности

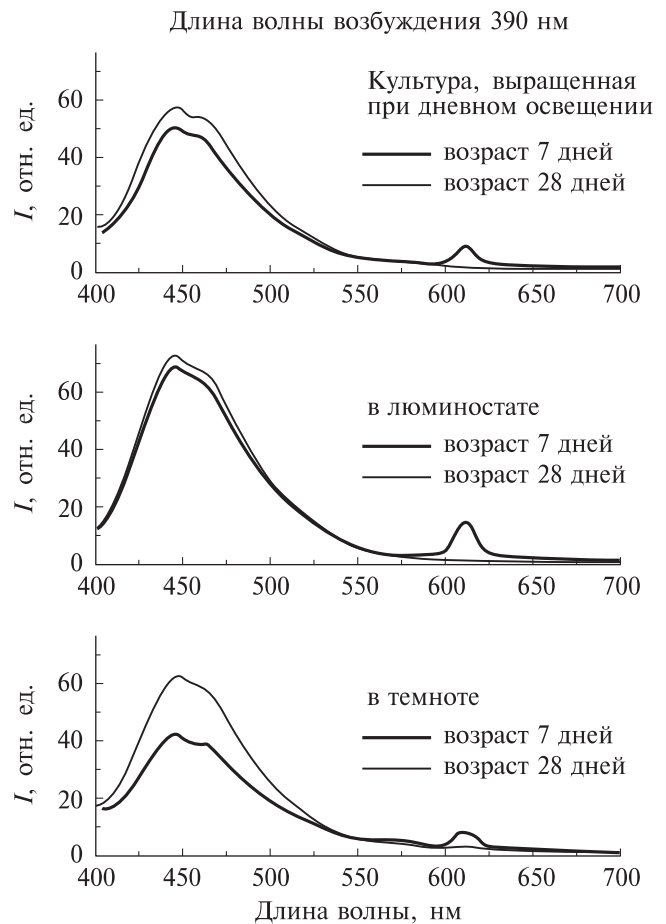


Рис. 4. Спектры флуоресценции культуры пурпурных бактерий, выращенной в различных условиях, в различном физиологическом состоянии

«синей» люминесценции и свечения порфиринов для семидневной культуры наблюдались для бактерий, выращенных в люминостате, а наименьшие — для бактерий, выращенных в темноте, что находится в хорошем согласии с соответствующими спектрами поглощения. Через 3 недели хранения проб при естественной освещенности концентрации клеток в пробах приблизительно выравниваются, что хорошо видно из спектров флуоресценции при сопоставлении «синей» люминесценции для различных проб. Также можно заметить, что с течением времени практически исчезает полоса свечения порфириновых пигментов при переходе в стационарную фазу развития.

Соотношения интенсивностей полос в максимуме порфиринов I_p и «синей» люминесценции I_f

Концентрация, %	Молодая культура			Зрелая культура		
	I_p , отн. ед.	I_f , отн. ед.	I_p/I_f	I_p , отн. ед.	I_f , отн. ед.	I_p/I_f
10	14	26	0.54	8	35	0.22
15	24	40	0.60	13	56	0.23
22	25	45	0.55	10	44	0.23
33	18	48	0.38	14	87	0.16
50	33	58	0.57	11	49	0.22

Следовательно, на интенсивность полосы флуоресценции порфиринов для культуры *Chromatium* sp. оказывает влияние не только различная освещенность, но также фаза развития культуры. При «старении» культуры сильно уменьшается интенсивность свечения порфиринов, и при этом меняется соотношение интенсивностей полос порфиринов и «синей» люминесценции клеток [10, 11].

Проводились специальные эксперименты с культурами различного возраста, в которых было обнаружено, что соотношение интенсивностей УФ полосы и «синей» люминесценции клеток при «старении» культуры возрастает почти в 2 раза. В то же время соотношение полос порфиринов и «синей» люминесценции, наоборот, при старении культуры значительно падает — в 2.5 раза (таблица). Эти соотношения могут применяться для оценки физиологического состояния культуры клеток.

Основные результаты и выводы

1. Спектры поглощения и люминесценции клеток бактерий могут быть использованы для оценки численности бактерий *in vivo* в водной среде в определенном диапазоне концентраций клеток:

— значение оптической плотности в области поглощения пигментов пурпурных бактерий — протопорфиринов (390 нм) и бактериохлорофилла (800 нм) — описывается линейной зависимостью от концентрации бактерий в воде вплоть до концентраций 6 млн клеток/мл;

— флуоресценция пурпурных бактерий в области свечения триптофановых остатков (350 нм) при возбуждении длиной волны 270 нм и «синей» люминесценции клеток (450 нм) при возбуждении длиной волны 390 нм может быть использована для оценки численности пурпурных серных бактерий до концентрации 2 млн клеток/мл.

2. Сравнение спектрально-люминесцентных свойств культуры пурпурных серных бактерий, выращенных при различном освещении, показало, что численность бактерий в экспоненциальной фазе роста наибольшая для культуры, выращенной в люминистате, и наименьшая для культуры, выращенной в темноте. Через 3 недели содержания при естественном освещении в стационарной фазе концентрации бактерий становятся близкими, но меняется соотношение пигментов в клетках, что

проявляется изменением отношения интенсивностей полос.

3. Эксперименты с культурами в разной фазе роста показали, что соотношение полос порфиринов и «синей» люминесценции могут применяться для оценки физиологического состояния культуры пурпурных серных бактерий.

На основе полученных закономерностей в дальнейшем могут быть разработаны методы экспрессного экологического мониторинга.

Литература

1. Михайловский Г.Е., Лившиц А.В. Биологический мониторинг прибрежных вод Белого моря. М., 1990.
2. Фадеев В.В., Бунин Д.К., Венедиктов П.С. // Квант. электрон. 1996. **23**, № 11. С. 963.
3. Маслов Д.В., Фадеев В.В., Литвинов П.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2002. № 1. С. 34 (Moscow University Phys. Bull. 2002. N 1. P. 30).
4. Пацаева С.В., Фадеев В.В., Южаков В.И. и др. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1992. **33**, № 5. С. 38 (Moscow University Phys. Bull. 1992. **47**, N 1. P. 35).
5. Пацаева С.В., Филиппова Е.М., Южаков В.И. и др. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1991. **32**, № 4. С. 76 (Moscow University Phys. Bull. 1991. **46**, N 4. P. 73).
6. Пацаева С.В., Чубаров В.В., Южаков В.И. и др. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1991. **32**, № 6. С. 71 (Moscow University Phys. Bull. 1991. **46**, N 6. P. 66).
7. Кондратьева Е.Н. Фотосинтезирующие бактерии и бактериальный фотосинтез. М., 1972.
8. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в природоведческую микробиологию. М., 2001.
9. Разумов А.С. // Микробиология. 1932. **1**, № 2. С. 131.
10. Милюков А. С., Пацаева С.В., Ростовцева Е.Л., Южаков В.И. // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2005». Секция «Физика». Физический факультет МГУ. Москва. 10–15.04.2005. **1**. С. 61.
11. Агеев Д.В., Пацаева С.В., Южаков В.И., Ростовцева Е.Л. // Физические проблемы экологии (экологическая физика). 2004. № 12. С. 129.

Поступила в редакцию
01.03.06