

**УДК 544.723.2:579.81.843.4:661.183**

## **ИЗУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ МОРСКИХ СВЕЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ НА ВЫСОКОДИСПЕРСНОМ КРЕМНЕЗЕМЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРАДИЦИОННЫХ И ЦИФРОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

*Шемшединова Э. Ш., Морозкина Е. В., Шарох А. А., Бейтуллаев А. М., Кацев А. М.*

*Медицинская академия имени С.И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО  
«Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь, Республика  
Крым, Россия  
E-mail: elvisa.shemshedinova@mail.ru*

Биолюминесцентные системы находят широкое применение в различных областях медико-биологических исследований. Их использование основано на эмиссионном ответе фотобактерий на токсический фактор, что служит интегральной оценкой токсичности. Контроль интенсивности свечения (биолюминесценции) в процессе измерений осуществляется инструментально, с помощью био- и хемиллюминометров. Однако, биолюминесцентные технологии использования эмиссии живых микроорганизмов, как аналитического сигнала, требует дорогостоящего оборудования. В данной работе были получены образцы иммобилизованных на высокодисперсном кремнеземе (ВДК) фотобактерий. Исследована возможность оценки интенсивности свечения морских светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* Sh1 приборными методами и с использованием фотографических изображений и последующей компьютерной обработкой с помощью программы ImageJ.

**Ключевые слова:** биолюминесцентные аналитические технологии, *Photobacterium leiognathi* Sh1, биолюминесценция, высокодисперсный кремнезем, программа ImageJ.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Использование биосенсорных систем в аналитических целях находят всё большее применение в различных областях медико-биологических исследований [1–3]. Важным этапом в создании чувствительного элемента оптического биосенсора является изучение количественных характеристик биолюминесценции. Собственное свечение морских или рекомбинантных бактерий, возникающее в результате жизнедеятельности является аналитическим сигналом в биолюминесцентных аналитических технологиях. Данная технология основана на эмиссионном ответе фотобактерий на токсический фактор, что служит интегральной оценкой токсичности. Контроль интенсивности свечения (биолюминесценции) в процессе измерений осуществляется инструментально, с помощью био- и хемиллюминометров. Однако, данная аналитическая технология требует дорогостоящего оборудования, а также длительной и трудоёмкой процедуре пробоподготовки [4, 5]. В данной работе исследуется возможность оценки интенсивности свечения морских светящихся бактерий приборными методами и с использованием фотографических изображений и последующей компьютерной обработкой с помощью программы ImageJ. Image J –

это программа для обработки изображений, написанная на языке Java сотрудниками National Institutes of Health [6–12].

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В настоящей работе использовались морские светящиеся бактерии Азовского моря (*Photobacterium leiognathi* Sh1). Бактерии культивировали на жидком питательном бульоне (NIMEDIA, Индия) в течение 20–24 ч при температуре 25 °С. В качестве сорбента использовали высокодисперсный кремнезём – ВДК (Полисорб МП, АО «Полисорб» Россия, Челябинская обл., г. Копейск). Исследуемые образцы содержали 10 мг/мл сорбента и различное количество ( $2,6 \cdot 10^7$ ;  $7,0 \cdot 10^7$ ;  $1,2 \cdot 10^8$ ;  $1,7 \cdot 10^8$ ;  $2,3 \cdot 10^8$  кл/мл) суточной бактериальной суспензии. Контрольные пробы не содержали сорбента. Все образцы готовили с добавлением 0,3 мл 0,1 М трис-НСI буферного раствора с рН=7,2 и доводили 3 % раствором хлорида натрия до общего объема 3 мл. Для установления сорбционного равновесия образцы инкубировали 30 мин в режиме постоянного перемешивания (СВ-1, Россия). Носитель с иммобилизованными бактериями отделяли от жидкой среды центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин с помощью центрифуги ОПн-3 («Дастан», Кыргызская республика).

Биолюминесцентный сигнал регистрировали на биолюминометре БХЛ 06 (Россия). Результаты биолюминесцентного анализа рассчитывали в %, как:

$$I = I/I_0 \times 100 \%,$$

где  $I$  – интенсивность биолюминесценции в присутствии ВДК;  $I_0$  – интенсивность биолюминесценции в контроле.

Концентрацию бактерий в контрольных образцах без сорбента оценивали по значению оптической плотности. Измерения вели при 600 нм с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ЛОМО, Россия). Для пересчета значений оптической плотности в концентрацию бактериальных клеток использовали калибровочный график  $y = 9 \cdot 10^{-10x} + 0,025$  описанный в работе [5]. Концентрацию бактерий на сорбенте определяли по разности оптической плотности в контрольном образце и в среде после отделения сорбента.

Все эксперименты проводили в трехкратных повторениях. Полученные результаты обрабатывали с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

Изображения свечения фотобактерий были получены с помощью цифрового фотоаппарата Nikon D5200 (Япония, f/7.1, 30с, 28мм). Анализ и обработка изображений проводился с помощью программы Image J (National Institutes of Health, USA), программа находится в свободном доступе.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Ранее проведенные исследования [4] показали, что при контакте фотобактерий с высокодисперсным кремнеземом (ВДК) происходит адсорбционная иммобилизация клеток на поверхности носителя. С целью изучения количественных характеристик процесса адсорбции были использованы приборные

методы (спектрофотометрический и биолюминесцентный). Для этого были получены образцы *P. leiognathi* Sh1, иммобилизованные на сорбенте, с различным количеством бактериальных клеток в твердой фазе носителя. По результатам измерений оптической плотности ( $\lambda=600$  нм) надосадочной жидкости в исследуемых образцах было рассчитано количество иммобилизованных на сорбенте клеток (таблица 1). Полученные данные показали, что с ростом количества бактериальной суспензии в пробах наблюдается закономерное увеличение количества клеток на твердой фазе сорбента и достигает максимального значения  $1,44 \cdot 10^8$  кл/мл.

**Таблица 1**

**Приблизная оценка (спектрофотометр) содержания бактериальных клеток *P. leiognathi***

Количество клеток	Содержание бактериальной суспензии, мкл				
	100	200	300	400	500
контроль	$2,6 \cdot 10^7$	$7,0 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^8$
надосадочная жидкость	$9,0 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^7$	$5,3 \cdot 10^7$	$7,1 \cdot 10^7$	$8,9 \cdot 10^7$
осадок	$1,7 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$	$6,8 \cdot 10^7$	$1,08 \cdot 10^8$	$1,44 \cdot 10^8$

Биолюминесцентный анализ надосадочной жидкости и твердой фазы сорбента с адсорбированными фотобактериями также демонстрирует рост интенсивности свечения с увеличением содержания бактериальных клеток в суспензии (таблица 2). Полученные данные хорошо согласуются с представленными выше результатами спектрофотометрического измерения оптической плотности.

**Таблица 2**

**Приблизная оценка (биолюминиметр) интенсивности свечения *P. leiognathi***

Биолюминесценция в (%)	Содержание бактериальной суспензии, мкл				
	100	200	300	400	500
надосадочная жидкость	47,1	94,1	164,7	205,9	276,5
осадок	364,7	964,7	1611,8	2117,6	2764,7

Важной характеристикой процесса иммобилизации является удельная активность эмиссии. В ряде работ [4, 5] показано, что в ходе процедуры иммобилизации происходит изменение эмиссионной активности клеток. Это может быть связано как с методикой иммобилизации, так и с выбором носителя. Поэтому представляет интерес определение удельной биолюминесценции свободных и связанных с носителем бактерий (рисунок 1). Как следует из рисунка 1, удельное свечение

иммобилизованных фотобактерий на ВДК возрастает в 9–13 раз по отношению к свободным. В то время как увеличение удельной люминесценции свободных бактерий и бактерий в жидкой фазе после отделения сорбента незначительно и связано с ростом содержания бактериальных клеток в исследуемых образцах.

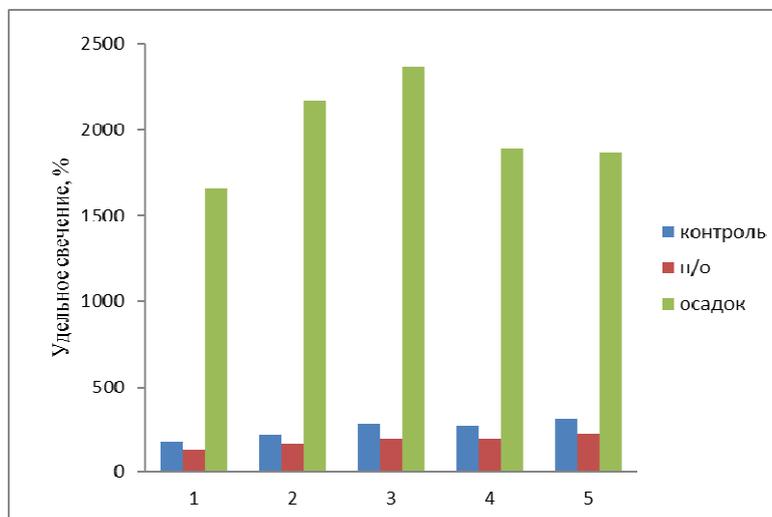


Рис. 1. Удельное свечение свободных и иммобилизованных бактерий.

Следует отметить, что приборные методы регистрации свечения и его количественная оценка длительны и трудоемки. Поэтому для этих целей в данной работе были использованы компьютерные технологии с применением программы Image J. ImageJ — программа с открытым исходным кодом для анализа и обработки изображений. Написана на языке Java сотрудниками National Institutes of Health и распространяется без лицензионных ограничений как общественное достояние. Функциональные возможности программы и гибкость настроек позволяет применять ее в широком спектре гистологических и микробиологических исследованиях других дисциплинах, связанных с анализом изображений, в качестве альтернативы частному программному обеспечению [6]. В данной работе графический редактор ImageJ был использован для упрощения трудоемкой процедуры пробоподготовки и приборной регистрации интенсивности свечения и оптической плотности контрольных и исследуемых образцов. С этой целью предварительно были получены снимки собственного свечения свободных бактерий (рисунок 2) и иммобилизованных на носителе (рисунок 3) в темноте. Как видно из рисунка 2 снимки контрольных образцов были с разной интенсивностью эмиссии. Визуальная оценка иммобилизованных форм светящихся бактерий продемонстрировала, что биолюминесценция образцов наиболее интенсивна в нижней части пробирок, во всём объёме сорбента, чем в надосадочной жидкости. Интенсивность свечения увеличивались с ростом содержания бактериальной

суспензии как в контрольных (рисунок 3), так и в исследуемых образцах с ВДК (рисунок 2).

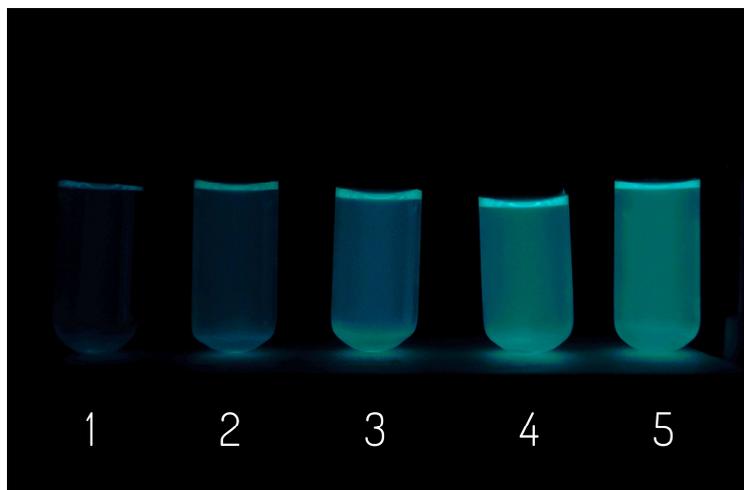


Рис. 2. Фотографическое изображение контрольных образцов в темноте под действием собственного излучения *P. leiognathi* Sh1 с различным содержанием бактериальной суспензии (кл/мл): 1 –  $2,6 \cdot 10^7$ ; 2 –  $7,0 \cdot 10^7$ ; 3 –  $1,2 \cdot 10^8$ ; 4 –  $1,7 \cdot 10^8$ ; 5 –  $2,3 \cdot 10^8$ .

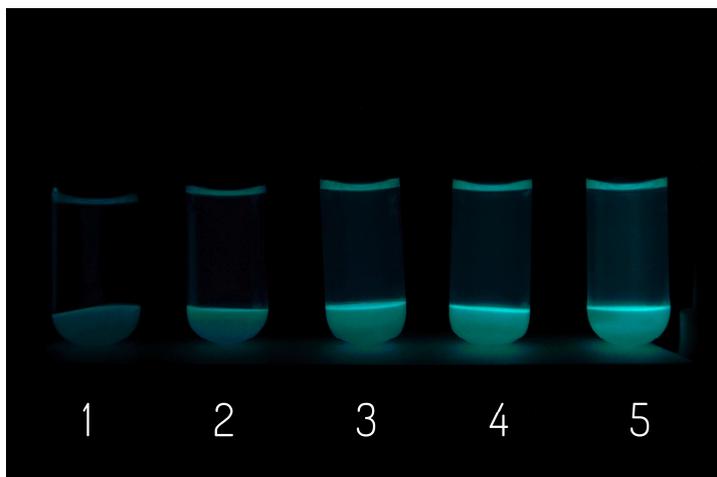


Рис. 3. Фотографическое изображение образцов, полученных в темноте под действием собственного излучения иммобилизованных на ВДК *P. leiognathi* Sh1 с различным содержанием бактериальной суспензии (кл/мл): 1 –  $2,6 \cdot 10^7$ ; 2 –  $7,0 \cdot 10^7$ ; 3 –  $1,2 \cdot 10^8$ ; 4 –  $1,7 \cdot 10^8$ ; 5 –  $2,3 \cdot 10^8$ .

Далее снимки свечения полученных образцов обработали с помощью графического редактора программы Image J. Анализ снимков проводился после перевода их в 8-битный формат (рисунок 4).

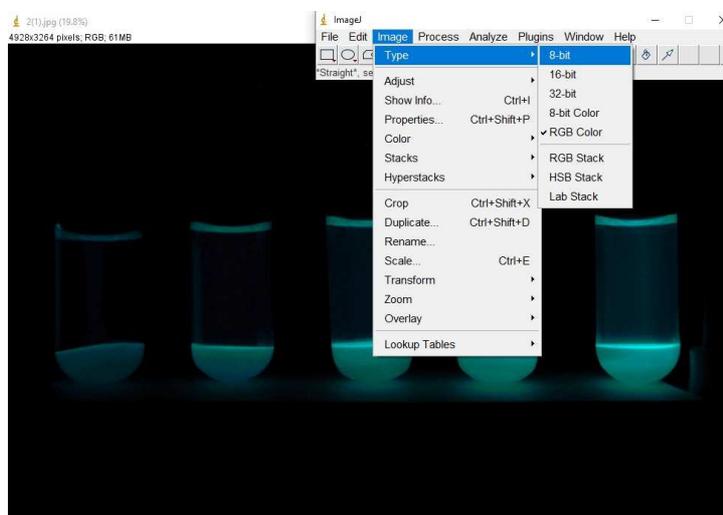


Рис. 4. Открытие снимка свечения в командном окне программы Image J для перевода в 8-битный формат.

После этого были заданы параметры для измерения, выбирался инструмент Point-Tool и расставлялись "маркеры" на исследуемых областях (рисунок 5).

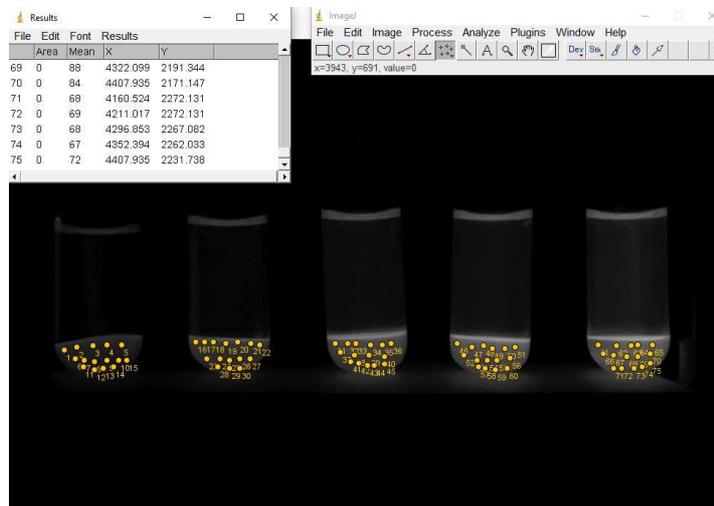


Рис. 5. Выбор параметров для измерения и расстановка маркеров на исследуемых объектах.

После чего измерялась интенсивность свечения (градация серого) надосадочной жидкости и осадка (связанные сорбентом микроорганизмы). Полученные результаты сохранялись: Analyze-Measure. Данные обработки приведены в таблице 3.

**Таблица 3**  
**Анализом снимков с помощью графического редактора программы ImageJ**

Билюминесценция (%) в осадке	Содержание бактериальной суспензии, мкл				
	100	200	300	400	500
	7,52	12,00	15,90	20,15	21,61

Для целесообразности использования программы ImageJ в изучении количественных характеристик иммобилизации фотобактерий на ВДК была проведена корреляция между приборными и бесприборными методами. Для этого были построены корреляционные графики данных билюминесцентного и спектрофотометрического методов анализа с приборной оценкой по осадку с иммобилизованными фотобактериями (рисунок 6, 7).



Рис. 6. Корреляционный график сравнения данных билюминесцентного анализа и приборной оценкой по осадку.

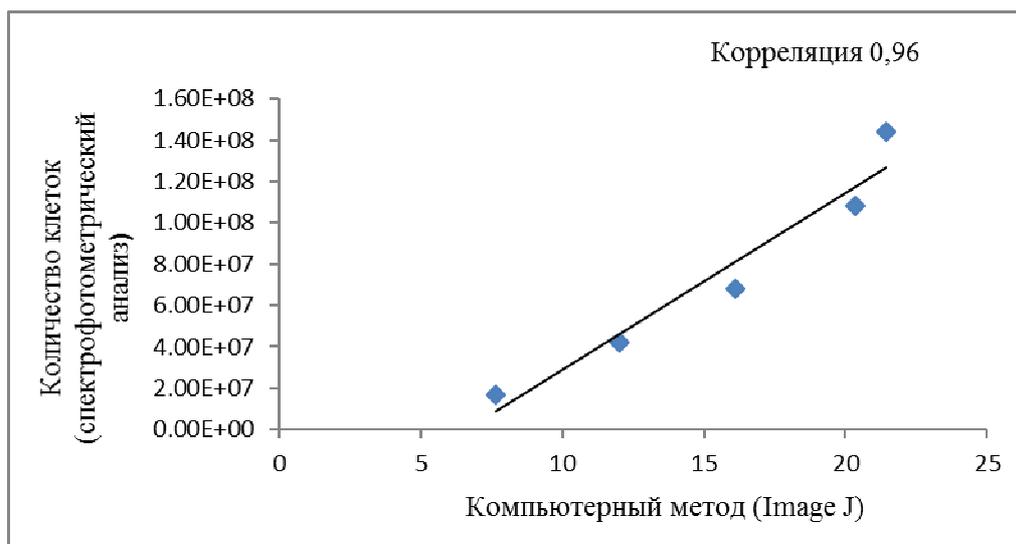


Рис. 7. Корреляционный график сравнения данных по количеству иммобилизованных на сорбенте бактериальных клеток и приборной оценкой по осадку.

Как видно из графиков зависимость приборных и бесприборного методов демонстрирует линейный характер с коэффициентами корреляции между данными приборной оценки биоломинесценции и компьютерной, а также между данными спектрофотометрических измерений и компьютерной составил 0,98 и 0,96.

Таким образом, полученные результаты показывают перспективность использования графического редактора программы ImageJ в оценке интенсивности эмиссии люминесцирующих бактерий и оптической плотности.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Были получены образцы иммобилизованных на ВДК фотобактерий с различным количеством бактериальных клеток и проведена их количественная оценка с использованием приборных (спектрофотометрический и биоломинесцентный анализ) и бесприборных (программа Image J) методов.
2. Установлено, что удельное свечение иммобилизованных фотобактерий на ВДК возрастает в 9–13 раз по отношению к свободным
3. Показано, что данные по интенсивности бактериальной люминесценции по осадку, полученные приборным (биоломинесцентный анализ) и программным методом (программа ImageJ), хорошо коррелируют между собой со значением коэффициента корреляции 0,98. Коэффициент корреляции между количеством иммобилизованных на сорбенте клеток, рассчитанных на основе данных спектрофотометрического анализа и интенсивности свечения оцененной с помощью программы ImageJ составил 0,96.

4. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования и совершенствования бесприборных способов регистрации аналитического сигнала в биолюминесцентных аналитических технологиях.

*Исследование выполнено в рамках поддержанного программой развития федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» гранта № ВГ19/2018 и проекта №И/2018/16*

#### Список литературы

1. Дерябин Д. Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д. Г. Дерябин. – М.: Наука, 2009. – 248 с.
2. Polakovič M., Progress in biocatalysis with immobilized viable whole cells: systems development, reaction engineering and applications / J. Švitel, M. Bučko, J. Filip, V. Neděla, M. B. Ansorge-Schumacher, P. Gemeine // *Biotechnology Letters*. – 2017. –V. 39. – № 5. – P. 667–683.
3. Исмаилов А. Д. Фотобиосенсоры на основе светящихся бактерий / А. Д. Исмаилов, Л. Э. Алескерова // *Биохимия*. – 2015. – Т. 80 (6). – С. 867–881.
4. Морозкина Е. В. Оценка возможности применения высокодисперсного кремнезема как носителя в чувствительном элементе биосенсора / Е. В. Морозкина, Э. Ш. Шемшединова, Э. Р. Абдураманова, А. М. Кацев // *Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского, серия «Биология, химия»*. – 2018. – Т. 4(3). – С. 208–218.
5. Абдураманова Э. Р. Функциональные характеристики свободных и иммобилизованных на неорганических носителях фотобактерий Черного и Азовского морей / Э. Р. Абдураманова, Н. В. Наумова, Л. М. Дерзян, А. М. Кацев // *Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского, серия «Биология, химия»*. – 2018. – Т. 4 (70), №1. – С. 179–187.
6. Мыщик А. В. Использование программы ImageJ для автоматической морфометрии в гистологических исследованиях / Мыщик А. В. // *Омский научный вестник*. – 2011. – Т. 2 (100). – С. 187–189.
7. Dougherty G. Digital image processing for medical application / G. Dougherty. – Cambridge: Cambridge University Press, 2009. – 485 p.
8. Collins T. J. ImageJ For Microscopy / T. J. Collins // *BioTechniques*. – 2007. – Vol. 43, № 1. – P. 25–30.
9. Schindelin J. The ImageJ Ecosystem: An Open Platform For Biomedical Image Analysis / Schindelin J., Rueden C. T., Hiner M. C., Eliceiri K. W. // *Mol Reprod Dev*. – 2015. – Vol. 82, № 7–8. – P. 518–29.
10. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. 2012;9(7):671–675. 2009. 82 639–646.
11. Rueden C. T. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data / C. T. Rueden, J. Schindelin, M. C. Hiner, B. E. DeZonia, A. E. Walter, E. T. Arena, K. W. Eliceiri // *BMC Bioinformatics*. – 2017. – Vol. 18, № 1. – P. 529.
12. Domínguez C. IJ-OpenCV: Combining ImageJ and OpenCV for processing images in biomedicine. / Domínguez C., Heras J., Pascual V. – 2017. – 1(84). – P. 189–194.

**STUDYING IMMOBILIZATION OF MARINE BIOLUMINESCENT BACTERIA  
ON HIGH-DISPERSED SILICA WITH USING TRADITIONAL AND DIGITAL  
TECHNOLOGIES**

*Shemshedinova E. Sh., Morozkina E. V., Sharokh A. A., Beytullaev A. M., Katsev A. M.*

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia  
E-mail: elvisa.shemshedinova@mail.ru*

Bioluminescent systems, based on the emission response of photobacteria to the toxic factor, are widely used in various fields of biomedical research. The intrinsic luminescence of marine or recombinant bacteria is an analytical signal in these technologies and arises as a result of their vital activity. In this work, samples of photobacteria immobilized on highly dispersed silica with different numbers of bacterial cells on the solid phase of the sorbent were obtained. A quantitative assessment of the bioluminescence of the studied samples was carried out using instrumental (spectrophotometric and bioluminescent analysis) methods. It was shown that the specific luminescence of immobilized photobacteria on highly dispersed silica increases 9–13 times to specific luminescence of free photobacteria.

The possibility of estimating the luminescence intensity of samples of marine luminous bacteria *Photobacterium leiognathi* Sh1 using photographic images and subsequent computer processing using the ImageJ program was investigated.

The feasibility of using the ImageJ program in the study of the quantitative characteristics of photobacteria immobilization on VDK is shown. The data of the instrumental assessment of the intensity of bacterial luminescence (spectrophotometric and bioluminescent analysis) and the program method (the ImageJ program) correlate well with each other with high values of the correlation coefficients. The data obtained indicate the prospects for the use and improvement of non-choice methods for recording the analytical signal in bioluminescent analytical technologies.

This work was partially supported by the V. I. Vernadsky Crimean Federal University Development Program for 2015–2024 grant № БГ19/2018 and project №И/2018/16

**Keywords:** bioluminescent analytical technologies, *Photobacterium leiognathi* Sh1, bioluminescence, highly dispersed silica, ImageJ programs.

**References**

1. Deryabin D. G., *Bacterial bioluminescence: fundamental and applied aspects*, 248 p. (Science, Moscow, 2009). (in Russ).
2. Polakovič M., Švitel J., Bučko M., Filip J., Neděla V., Ansorge-Schumacher M. B., Gemeine P., Progress in biocatalysis with immobilized viable whole cells: systems development, reaction engineering and applications, *Biotechnology Letters*, **39** (5), 667, (2017).
3. Ismailov A. D., Aleskerova L. E., Photobiosensors based on luminous bacteria, *Biochemistry*, **80** (6), 867, (2015). (in Russ).
4. Morozkina E. V., Shemshedinova E. Sh., Abduramanova E. R., Katsev A. M., High dispersed silica applicability as a carrier of the biosensor sensitive element, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University, series «Biology, chemistry»*, **4** (70), 208, (2018). (in Russ).

5. Abduramanova E. R., Naumova N. V., Derzyan L. M., Katsev A. M., Functional characteristics of free and immobilized photobacterial of Black and Azov seas, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University, series «Biology, chemistry»*, **4** (70), 179, (2018). (in Russ).
6. Mytsik A. V., Using ImageJ software application for automated morphometry of histological studies, *Omsk Scientific Bulletin*, **2** (100), 187, (2011). (in Russ).
7. Dougherty G., *Digital image processing for medical application*, 485 p. (Cambridge University Press, Cambridge, 2009).
8. Collins T. J., ImageJ For Microscopy, *BioTechniques*, **43** (1), 25, (2007).
9. Schindelin J., Rueden C. T., Hiner M. C., Eliceiri K. W., The ImageJ Ecosystem: An Open Platform For Biomedical Image Analysis, *Mol Reprod Dev.*, **82** (7–8), 518, (2015).
10. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nature Methods*, **9** (7), 671, (2012).
11. Rueden C. T., Schindelin J., Hiner M. C., DeZonia B. E., Walter A. E., Arena E. T., Eliceiri K. W., ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data, *BMC Bioinformatics*, **18** (1), 529, (2017).
12. Domínguez C., Heras J., Pascual V. IJ-OpenCV: Combining ImageJ and Open CV for processing images in biomedicine, *Computers in Biology and Medicine*, **84**, 189, (2017).