

УДК 543.94+579.843.1+579.843.4

## ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ СВЕЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ И ИХ АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА

*Кацев А.М.*

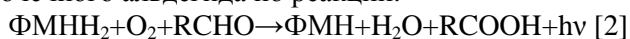
*Крымский государственный медицинский университет имени С. И. Георгиевского,  
Симферополь, Россия,  
E-mail: katsev@mail.ru*

Изучены ферментативные свойства светящихся бактерий с разным типом люциферазной кинетики. Для бактерий с быстрым кинетическим типом установлены корреляционные зависимости между каталазной активностью клетки и ее удельной люциферазной активностью, а также с чувствительностью бактериальной биолюминесценции к перекиси водорода. Для бактерий с медленным кинетическим типом люциферазы таких корреляций не прослеживалось. Сделаны предположения об участии люциферазы в антиоксидантной защите клетки и о роли генетических механизмов *quorum sensing* и SOS в регуляции синтеза и активности ферментов в условиях окислительного стресса и сред с различной соленостью.

**Ключевые слова:** люминесцентные бактерии, активные формы кислорода, люцифераза, каталаза.

### ВВЕДЕНИЕ

Биолюминесценция – свечение, возникающее в результате биохимических реакций в живых организмах, достаточно широко представлено на разных уровнях организации живой материи [1]. Оно возникает в результате окисления субстрата люциферина и катализируется ферментом люциферазой. Для светящихся бактерий наиболее распространенных морских биолюминесцентных организмов излучение является результатом окисления восстановленного флавиномононуклеотида при участии длинноцепочечного альдегида по реакции:



Несмотря на значительный прогресс в изучении физиологии, биохимии и генетики светящихся бактерий, биологическая роль бактериальной люминесценции остается неясной [2]. Как показано в исследованиях [2–4], биолюминесценция может играть определенную роль в защите клеток живых организмов от окислительного стресса, а люцифераза как фермент, катализирующий свечение, может выполнять антиоксидантную функцию вместе с другими антиоксидантными ферментами (каталаза, супероксиддисмутаза, пероксидаза).

Целью работы было изучение ферментативной активности и антиоксидантных систем светящихся бактерий, выделенных из вод Черного и Азовского морей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы 20 штаммов светящихся бактерий, выделенных из вод Черного и Азовского морей на территории Крыма. Идентификация выделенных бактерий, а также их фенотипические свойства описаны в работах [5, 6].

Для определения клеточной активности фотобактерии культивировали в колбах в режиме постоянного перемешивания при комнатной температуре (18–20 °С) или повышенной температуре (в термостате), в зависимости от вида бактерий. Через сутки процесс останавливали и в полученных бактериальных суспензиях измеряли интенсивность биолюминесценции, каталазную активность и концентрацию клеток.

Количественное определение каталазной активности проводили с помощью спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, Россия) по уменьшению поглощения при 240 нм, вызванное снижением концентрации перекиси водорода. Для этого 20 мкл суспензии светящихся бактерий, выращенных в течение ночи, смешивали с 2,5 мл 3%-го раствора хлорида натрия, содержащего 50 мкл 3%-й перекиси водорода. Измеряли значения поглощения в течение 60 минут и рассчитывали каталазную активность в единицах активности на бактериальную клетку. Одна единица каталазной активности соответствовала разложению 1 мкмоль перекиси водорода в минуту. Количество бактериальных клеток определяли по поглощению при 600 или 620 нм.

Для определения ферментативной активности *in vitro* бактериальную массу, полученную после культивирования, осаждали центрифугированием при 5000 об./мин. в течение 30 мин. на центрифуге ОПН-8 (для небольших объемов) или MLM K24D (Германия). Бактерии трижды отмывали 3% раствором хлорида натрия, ресуспендировали в небольшом количестве фосфатного буфера с pH=7,0 (0,01 моль/л) и разрушали клетки трехкратной ультразвуковой обработкой по 30 с, используя дезинтегратор UD-11 ("Techpan", Польша). Субклеточные структуры осаждали центрифугированием при 5000 об./мин. в течение 30 мин. Из супернатанта осаждением сульфатом аммония (30–75% от насыщения) выделяли ферментный препарат, который использовали для определения каталазной и люциферазной активностей, а также для изучения кинетики люциферазной реакции.

Определение кинетики люциферазной реакции проводили с использованием додеканая (Fluka, Switzerland) с использованием измерительного комплекса, представленного на рис. 1.

Изменения биолюминесценции во времени регистрировали с помощью люминометра БЛМ-8801 с самописцем в системе: 20 мкл препарата люциферазы (разведения подбирались экспериментально), 20 мкл 0,001–0,01% эмульсии альдегида, после инициирования реакции 0,5 мл  $10^{-5}$  моль/л фотовосстановленного флавиномононуклеотида (ФМНН<sub>2</sub>), содержащего  $10^{-3}$  моль/л трилона Б. Восстановление ФМН проводили в стеклянном змеевике, который освещался лампой дневного света мощностью 25 Ватт (рис. 1). Критерием восстановления было исчезновение желтой окраски ФМН. Дозирование восстановленного ФМНН<sub>2</sub> осуществляли с помощью дозатора А-2 (Украина) через иглу непосредственно в кювету люминометра.

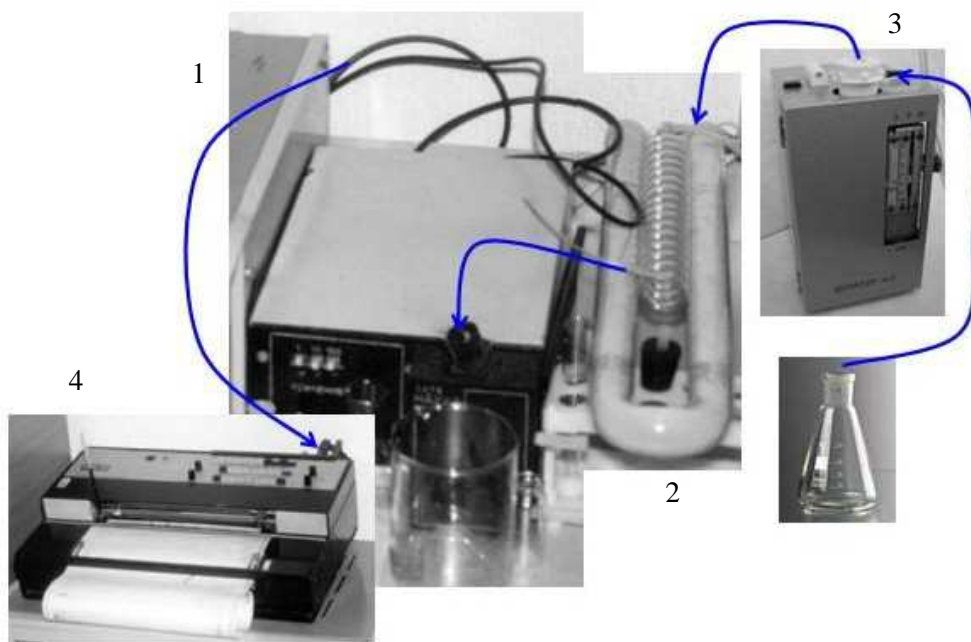


Рис. 1. Схема измерительного комплекса для изучения люциферазной кинетики: 1 – биолоуминометр БЛМ-8801; 2 – змеевик с лампой для восстановления ФМН; 3 – дозатор А-2; 4 – самописец (ЛКВ, Швеция).

После инициирования ферментативной реакции самописец регистрировал дальнейшее изменение биолоуминесценции во времени. По полученным графическим зависимостям интенсивности биолоуминесценции от времени определяли время полузатухания ( $t_{1/2}$ ), что представлено на рис. 2. Значение  $t_0$  соответствует началу реакции при добавлении к реакционной смеси фотовосстановленного ФМНН<sub>2</sub>.

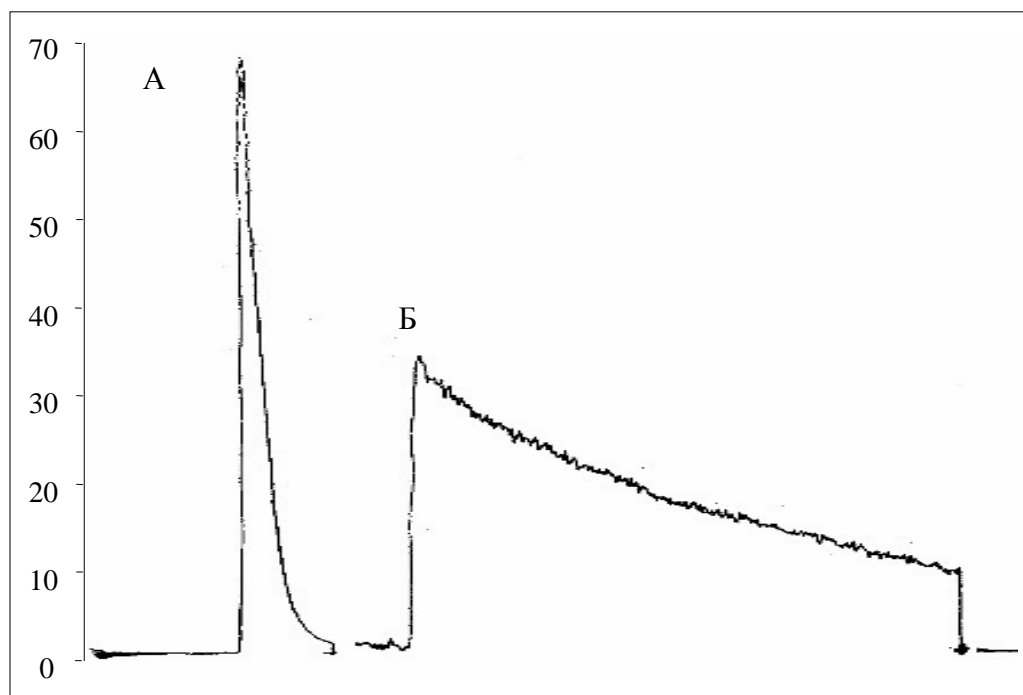


Рис. 2. Определение кинетики люциферазной реакции: А – быстрый тип люциферазной кинетики, Б – медленный тип люциферазной кинетики.

Для оценки люциферазной активности ферментных препаратов в кюветах люминометра смешивали 10 мкл бактериального экстракта, 0,5 мл фосфатного буфера с рН=7,0 (0,1 моль/л), содержащего 0,0002% тетрадеканала. Реакцию инициировали добавлением 0,5 мл фотовосстановленного ФМН<sub>2</sub>, как описано выше. Измеряли максимальное значение интенсивности возникающей биолуминесценции в мВ на мг белка. Концентрацию белка в бактериальных экстрактах определяли по Бредфорду.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что устойчивость светящихся бактерий к окислительному стрессу зависит от кинетических свойств люциферазы. Установлено, что штаммы с быстрым типом люциферазной кинетики обладают меньшей устойчивостью к перекиси водорода, чем бактерии с медленным кинетическим типом. При этом активности люциферазы и антиоксидантного фермента каталазы не коррелировали друг с другом, что может означать независимость их функционирования. В тоже время бактерии с быстрым типом кинетики оказались более устойчивы к действию больших концентраций перекиси водорода, чем к действию малых. Было показано, что их свечение усиливалось при увеличении концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с 0,0005% до 0,005%, что позволило высказать предположение об участии в этом процессе

генетической SOS регуляции. Её активация вызывала увеличение активности или синтеза люциферазы в ответ на стрессовый фактор – высокие концентрации перекиси водорода [7].

Дальнейшее исследование этого вопроса показало, что штаммы с быстрым типом кинетики обладают и другими отличиями. По сравнению с бактериями, имеющими медленный кинетический тип, они характеризовались более высокой интенсивностью удельной клеточной биолюминесценции и активностью люциферазы, а также обладали меньшей способностью накапливать биомассу (таблицы 1 и 2). Отмечены и отличия в качественном тесте на каталазную активность, которая оценивалась по способности бактериальных клеток расщеплять перекись водорода. Все штаммы с медленным типом кинетики были каталазо-положительными, а бактерии с быстрым типом кинетики характеризовались отсутствием или низкой способностью разлагать перекись водорода [7]. При этом анализ каталазной активности *in vitro* не выявил существенных отличий между двумя группами бактерий, как показано в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Свойства штаммов светящихся бактерий с быстрым типом люциферазной кинетики

Штамм	Рост, кл/мл	Люцифераза				Каталаза	
		$t_{1/2}$ , с	мВ/кл	мВ/мл	мВ/мг	Ед/кл	Ед/мг
<i>P. leiognathi</i> W1	$4,8 \cdot 10^7$	1,5	$2,8 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^{-8}$	$2,4 \cdot 10^2$
<i>P. leiognathi</i> W2	$4,2 \cdot 10^7$	1,5	$3,2 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^{-8}$	$3,3 \cdot 10^2$
<i>P. leiognathi</i> Sh1	$3,9 \cdot 10^7$	1,5	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^{-8}$	$3,0 \cdot 10^2$
<i>P. leiognathi</i> Cr1	$5,4 \cdot 10^7$	1,5	$2,6 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^{-8}$	$2,0 \cdot 10^2$
<i>P. leiognathi</i> F1	$4,5 \cdot 10^7$	2,2	$2,8 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^{-8}$	$9,4 \cdot 10^2$
<i>P. phosphoreum</i> Sq1	$2,6 \cdot 10^7$	2,3	$3,6 \cdot 10^{-3}$	$9,3 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^{-8}$	$4,8 \cdot 10^2$
<i>P. phosphoreum</i> Sq3	$3,2 \cdot 10^7$	2,4	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$9,5 \cdot 10^4$	$3,7 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^{-8}$	$3,3 \cdot 10^3$
<i>P. phosphoreum</i> F2	$2,1 \cdot 10^7$	2,4	$5,3 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^{-8}$	$1,3 \cdot 10^3$
<i>V. fischeri</i> F7	$1,1 \cdot 10^8$	1,9	$8,9 \cdot 10^{-4}$	$9,4 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^{-7}$	$1,1 \cdot 10^3$
<i>V. fischeri</i> Sh2	$9,0 \cdot 10^7$	1,5	$9,9 \cdot 10^{-4}$	$8,9 \cdot 10^4$	$6,8 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^{-7}$	$9,4 \cdot 10^2$
<i>V. fischeri</i> F1	$1,8 \cdot 10^8$	1,7	$7,1 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^{-7}$	$8,7 \cdot 10^3$
<i>V. logei</i> Sq1	$3,0 \cdot 10^7$	2,3	$4,5 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$6,7 \cdot 10^{-8}$	$2,3 \cdot 10^3$
<b>М (среднее)</b>	<b><math>6,0 \cdot 10^7</math></b>	<b>1,9</b>	<b><math>2,8 \cdot 10^{-3}</math></b>	<b><math>1,2 \cdot 10^5</math></b>	<b><math>1,3 \cdot 10^6</math></b>	<b><math>6,3 \cdot 10^{-8}</math></b>	<b><math>1,7 \cdot 10^3</math></b>
<b>±m</b>	<b><math>4,6 \cdot 10^7</math></b>	<b>0,4</b>	<b><math>1,4 \cdot 10^{-3}</math></b>	<b><math>1,9 \cdot 10^4</math></b>	<b><math>1,9 \cdot 10^5</math></b>	<b><math>5,6 \cdot 10^{-8}</math></b>	<b><math>2,4 \cdot 10^3</math></b>

Таблица 2

Свойства штаммов светящихся бактерий с медленной люциферазной кинетикой

Штамм	Рост, кл/мл	Люцифераза			Каталаза		
		$t_{1/2}$ , с	мВ/кл	мВ/мл	мВ/мг	Ед/кл	Ед/мг
<i>V. harveyi</i> Ms1	$2,5 \cdot 10^8$	22,0	$3,7 \cdot 10^{-4}$	$9,3 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^3$	$6,9 \cdot 10^{-8}$	$6,4 \cdot 10^2$
<i>V. harveyi</i> Ms2	$2,4 \cdot 10^8$	17,5	$3,4 \cdot 10^{-4}$	$8,1 \cdot 10^4$	$4,4 \cdot 10^4$	$4,9 \cdot 10^{-8}$	$9,0 \cdot 10^1$
<i>V. harveyi</i> Ms3	$2,4 \cdot 10^8$	16,0	$4,3 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^{-8}$	$1,8 \cdot 10^2$
<i>Vibrio sp.</i> W3	$1,9 \cdot 10^8$	17,0	$4,7 \cdot 10^{-4}$	$9,0 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^3$	$3,6 \cdot 10^{-8}$	$1,1 \cdot 10^3$
<i>Vibrio sp.</i> Mo1	$2,8 \cdot 10^8$	15,0	$3,9 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^3$	$4,8 \cdot 10^{-8}$	$1,9 \cdot 10^3$
<i>Vibrio sp.</i> F8	$9,0 \cdot 10^7$	9,0	$5,6 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^{-8}$	$1,3 \cdot 10^3$
<i>Vibrio sp.</i> Sh3	$1,2 \cdot 10^8$	17,0	$8,7 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^5$	$9,1 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^{-8}$	$3,1 \cdot 10^2$
<i>Vibrio sp.</i> Ms4	$2,4 \cdot 10^8$	15,0	$5,1 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^5$	$7,9 \cdot 10^{-8}$	$5,8 \cdot 10^2$
<b>М (среднее)</b>	<b><math>2,1 \cdot 10^8</math></b>	<b>16,1</b>	<b><math>4,9 \cdot 10^{-4}</math></b>	<b><math>9,4 \cdot 10^4</math></b>	<b><math>4,7 \cdot 10^4</math></b>	<b><math>5,0 \cdot 10^{-8}</math></b>	<b><math>7,6 \cdot 10^2</math></b>
<b><math>\pm m</math></b>	<b><math>8,7 \cdot 10^7</math></b>	<b>7,1</b>	<b><math>7,6 \cdot 10^{-4}</math></b>	<b><math>3,2 \cdot 10^4</math></b>	<b><math>6,7 \cdot 10^5</math></b>	<b><math>1,4 \cdot 10^{-8}</math></b>	<b><math>7,9 \cdot 10^2</math></b>

Для штаммов с быстрым типом кинетики наблюдались корреляции между клеточной активностью каталазы (Ед/кл) и удельной активностью люциферазы (мВ/мг) (рис. 3), а также с действующими на биOLUMИНЕСЦЕНЦИЮ бактерий концентрациями (ЭК<sub>50</sub>) перекиси водорода (рис. 4) [7]. При этом удельная каталазная активность *in vitro* (ЕД/мг) не коррелировала ни с чувствительностью к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ни с удельной люциферазной активностью. Таким образом, получается, что способность бактерий с быстрым кинетическим типом расщеплять перекись водорода (каталазная активность, Ед/кл), определяется именно внутриклеточной активностью люциферазы, которая значительно выше (в среднем в 28 раз), чем у бактерий с медленным кинетическим типом (таблицы 1, 2).

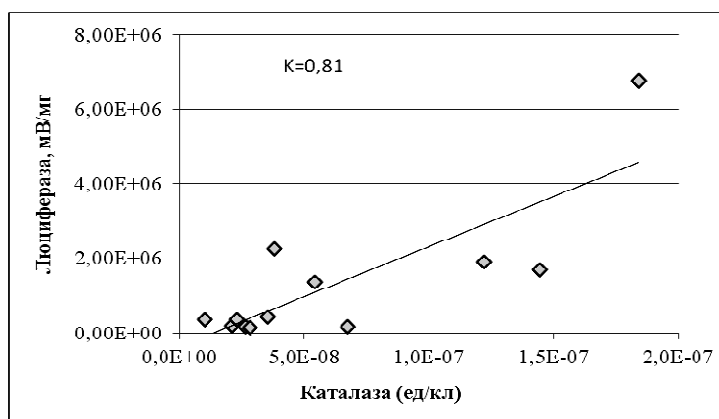


Рис. 3. Корреляция между каталазной активностью клеток светящихся бактерий с быстрой кинетикой люциферазы и люциферазной активностью *in vitro*.

Для штаммов с медленным типом люциферазной кинетики корреляций между клеточными активностями люциферазы и каталазы между собой, а также с чувствительностью биолуминесценции к перекиси водорода не наблюдалось. В тоже время этот тип бактерий проявлял большую устойчивость к действию перекиси водорода. Эффективные концентрации ( $ЭК_{50}$ )  $H_2O_2$  для штаммов с медленным типом кинетики ( $4,06 \cdot 10^{-4} \pm 2,78 \cdot 10^{-4} \%$ ) были в 10–40 раз выше, чем для бактерий с быстрой люциферазной кинетикой ( $4,67 \cdot 10^{-5} \pm 4,06 \cdot 10^{-5} \%$ ). Таким образом, несмотря на меньшую удельную активность люциферазы и практически одинаковую клеточную активность каталазы, группа бактерий с медленным типом кинетики оказалась лучше защищенной от действия перекиси водорода. Это дает возможность предположить наличие у них дополнительных защитных антиоксидантных систем.

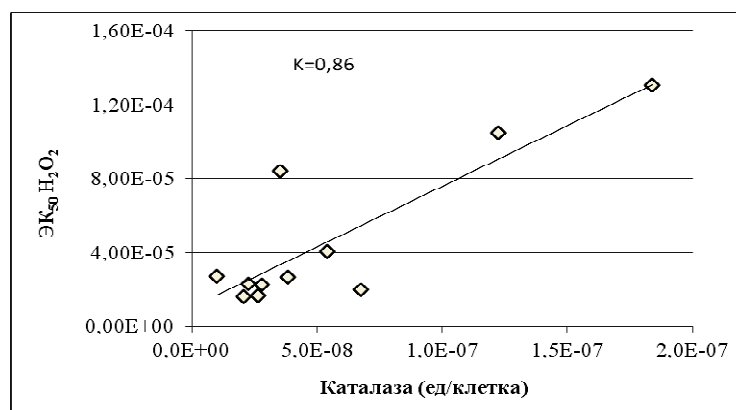


Рис. 4. Корреляция между каталазной активностью клеток светящихся бактерий с быстрой кинетикой люциферазы и чувствительностью бактерий к перекиси водорода.

Так как бактерии с медленной кинетикой способны накапливать большую биомассу, то одним из таких механизмов может быть генетическая регуляция *quorum sensing*, связанная с числом клеток и концентрацией автоиндуктора в среде [1, 2]. Кроме того, анализ усредненных данных ферментативной активности бактерий показывает, что в пересчете на общую клеточную биомассу, штаммы с медленным типом кинетики обладают активностью люциферазы ( $9,40 \cdot 10^4 \pm 2,15 \cdot 10^4$  мВ), практически одинаковой с бактериями с быстрым кинетическим типом ( $1,17 \cdot 10^5 \pm 1,92 \cdot 10^4$  мВ). Наличие при этом более высокой общей каталазной активности, а также каталазаположительные результаты качественного теста (см. выше), дают основание полагать, что антиоксидантная защита бактерий с медленным типом люциферазной кинетики обеспечивается преимущественно каталазой. Синтез этого фермента, по всей видимости, имеет индуцибельный характер и регулируется *quorum sensing*, а также условиями окислительного стресса [8].

Как было показано в многочисленных публикациях, а также в ходе собственных исследований, рост бактерий и их биолуминесценция при различной концентрации

соли происходит не одинаково. Накопление большей биомассы наблюдается при более низкой концентрации соли – хлорида натрия (1,5–2%), когда концентрация кислорода в среде выше, в то время как большая биолюминесценция наблюдается при более высокой концентрации соли (4–5%), при которой концентрация кислорода ниже [1, 6]. Исходя из этого и полученных данных об участии люциферазы в антиоксидантных процессах в клетке, можно предположить следующую схему функционирования люциферазно-каталазной антиоксидантной системы бактерий. При концентрации кислорода, достаточной для роста бактерий (при низкой солености, отсутствии окислительного стресса), включается механизм *quorum sensing*, приводящий к наблюдаемым фенотипам и антиоксидантным свойствам. При более высокой концентрации соли и снижении кислорода, когда достаточного накопления биомассы не происходит и возрастает концентрация активных форм кислорода в клетке, для их детоксикации включается SOS механизм, который приводит к возрастанию активности люциферазы (возможно и каталазы) в клетке, что проявляется в большей интенсивности биолюминесценции.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Показаны отличия ферментативных свойств бактерий с быстрым и медленным типами люциферазной кинетики.
2. Полученные данные указывают на то, что люцифераза, также как и каталаза обладает антиоксидантными свойствами, участвуя в защите бактериальной клетки от окислительного стресса, вызванного перекисью водорода.
3. Предполагается, что у бактерий с быстрым типом люциферазной кинетики большую антиоксидантную роль играет люцифераза, синтез и ферментативная активность которой, регулируется не только генетическим *quorum sensing*, но и SOS механизмом.
4. Бактерии с медленной люциферазной кинетикой, для которых характерно накопления большей биомассы, были лучше защищены от действия перекиси водорода, что связано с более высокой активностью каталазы и участием преимущественно механизма *quorum sensing* в регуляции синтеза ферментов.
5. Предполагается, что одним из факторов переключающих антиоксидантную защиту светящихся бактерий с каталазной на люциферазную, может быть содержание соли в среде. Возможно, что от концентрации соли в среде зависит и запуск генетических механизмов *quorum sensing* и SOS.

### Список литературы

1. Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д.Г. Дерябин. – М: Наука, 2009. – 248 с.
2. Dunlap P. Biochemistry and Genetics of Bacterial Bioluminescence // Adv Biochem Eng Biotechnol. – 2014. – Vol.144. – P. 37–64. doi: 10.1007/978-3-662-43385-0-2.
3. Haddock S. H.D., Moline M.A., Case J.F. Bioluminescence in the Sea / S. H.D. Haddock, M.A. Moline, J.F. Case // Annu. Rev. Mar. Sci. – 2010. – Vol. 2. – P. 443–493.
4. The origins of marine bioluminescence: Turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools / J.F. Rees, B. DeWergifosse, O. Noiset, etc. // J. Exp. Biol. –1998. – Vol. 201. – P. 1211–1221.



5. Кацев А. М. Идентификация светящихся бактерий, выделенных из Черного и Азовского морей / А.М. Кацев, Джон Макемсон // Ученые записки ТНУ им. В.И. Вернадского, серия «Биология, химия». – 2006. – Т. 19, № 4. – С. 111–116.
6. Кацев А. М. Новые термофильные люминесцентные бактерии, выделенные из Азовского моря // Таврический медико-биологический вестник. – 2014. – Т. 17, № 2. – С. 130–142.
7. Katsev A. M. Effects of hydrogen peroxide on light emission by various strains of marine luminescent bacteria / A. M. Katsev, G. Wegrzyn, H. Szpilewska // J. Basic Microbiol. – 2004. – Vol. 44, No. 3. – P. 178–184.
8. Visick K.L., Ruby E.G. The periplasmic, group III catalase of *Vibrio fischeri* is required for normal symbiotic competence and is induced both by oxidative stress and by approach to stationary phase / K.L. Visick, E.G. Ruby // J Bacteriol. – 1998. – Vol. 180, No.8. – P. – 2087–2092.

## **ENZYME ACTIVITY OF BIOLUMINESCENT BACTERIA FROM BLACK AND AZOV SEAS AND THEIR ANTIOXIDANT DEFENSE**

*Katsev A.M.*

*Crimean State Medical University named after S.I. Georgievskiy, Simferopol, Crimea, Russia  
E-mail: katsev@mail.ru*

Previously, effects of hydrogen peroxide on light emission were investigated among various strains of luminescent bacteria. It was found that luminescence of strains with luciferase of fast kinetics of reaction decreased at considerably lower concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than that of strains with luciferase of the slow kinetics. The action (either direct or indirect) of luciferases as anti-oxidants seemed to be independent of activity of catalase, which was found to be different in various strains. Therefore, it seems that luciferases of the slow kinetics are more efficient in detoxification of reactive oxygen species than those of the fast kinetics.

In this work enzymatic properties included cells' and specific activities of luciferases and catalases of luminous bacteria with different types of luciferase kinetics have been further studied and analyzed. It had been found that bacteria with fast kinetics manifested both higher intensity of cells' bioluminescence and luciferase activity but had lower growth ability in comparison with bacteria with slow kinetics type.

For luminescent bacteria with luciferase of fast kinetics cells' catalase activity were revealed to correlate with specific luciferase activity, as well as with the sensitivity of bacterial bioluminescence to hydrogen peroxide with coefficients 0,81 and 0,86 respectively. For bacteria with a slow luciferase kinetic such correlations were not observed. However they were significantly less sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> action and therefore stronger protected against oxidation. It has been assumed that luciferase plays the main antioxidant role in bacteria with fast kinetics while bacteria with slow kinetic type use for this purposes both catalase and luciferase (perhaps mostly catalase).

Beside oxidative stress another external factor that may switch bacterial antioxidant defense system from catalase to luciferase was supposed to be salinity. Luminous bacteria is known to be characterized by both lower growth and brighter bioluminescence when grow in a media with high salinity (4–5%). In conditions of lower salinity (1–2 %) bacteria on the contrary produce higher biomass with lower level of bioluminescence.

Perhaps the behavior of luminous bacteria under oxidative stress and in conditions with different salinity connects with two genetic mechanisms: *quorum sensing* that switches on at large number of bacterial cells, as well as SOS regulation that may increase luciferase activity in stress conditions even at lower number of cells.

**Keywords:** luminescent bacteria, reactive oxygen species, luciferase, catalase..

#### References

1. Deryabin D.G. Bacterial bioluminescence: fundamental and application aspects, 248 p. (M: Science, 2009).
2. Dunlap P. Biochemistry and Genetics of Bacterial Bioluminescence, *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, **144**:37 (2014); doi: 10.1007/978-3-662-43385-0-2.
3. Haddock S.H.D., Moline M.A., Case J.F. Bioluminescence in the Sea, *Annu. Rev. Mar. Sci.* **2**, 443, (2010).
4. Rees J.F., DeWergifosse B., Noiset O., Dubuisson M., Janssens B., Thompson E.M. The origins of marine bioluminescence: Turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools, *J. Exp. Biol.*, **201**, 1211, (1998).
5. Katsev A. M., Makemson J. Identification of luminous bacteria isolated from the Black and Azov Seas, *Sc. Notes of Taurida National V.I. Vernadsky University. Series Biol. and Chem.*, **19** (4), 111 (2006).
6. Katsev A. M., Wegrzyn G., Szpilewska H. Effects of hydrogen peroxide on light emission by various strains of marine luminescent bacteria, *J. Basic Microbiol.*, **44** (3), 178 (2004).
7. Katsev A.M. New thermophilic luminescent bacteria isolated from Azov sea, *Tavrisheskiy Mediko-Biologicheskij Vestnik*, **13** (2), (2014)
8. Visick K.L., Ruby E.G. The periplasmic, group III\_catalase\_of *Vibrio fischeri* is required for normal symbiotic competence and is induced both by oxidative stress and by approach to stationary phase, *J. Bacteriol.*, **180** (8), 2087, (1998).

Поступила в редакцию 26.10.2014 г