



Одиннадцатая Международная научно-техническая конференция
«Оптические методы исследования потоков»
Москва, 27 — 30 июня 2011 г.

УДК 581.192:546

Е.Л. Барский, Я.В. Саванина, С.Ю. Королева, Ю.Н. Королев, Е.С. Лобакова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия

119899, Москва, Ленинские горы, 1, строение 12, E-mail: cordekor@list.ru

СПЕКТРАЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ ВОЗРАСТАНИЯ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПРОСТРАНСТВЕННО- ВРЕМЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ (И БИОРАЗНООБРАЗИЯ) ПРИ ПЕРЕХОДЕ БИОСИСТЕМЫ В БОЛЕЕ УСТОЙЧИВОЕ СОСТОЯНИЕ

В работе эмпирически показано, что увеличение гетерогенности в биосистеме (повышает устойчивость системы) находит отражение в изменении разности дихроичных отношений в большую сторону. В работе использованы данные по динамике развития гетерогенности при культивировании синхронных культур микроорганизмов в качестве "инструмента" исследования. На примере микроорганизмов рассматривалась возможность изучения отличий делящихся клеток гетерогенной и синхронной культур при регистрации изменений градиента концентрации биохимических компонентов нативных клеток с помощью анализа изменений интенсивности полос поглощения и дихроичных отношений в ИК-диапазоне.

**МИКРООРГАНИЗМЫ, ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ,
СПЕКТРОСКОПИЯ ВНУТРЕННЕГО ОТРАЖЕНИЯ.**

ВВЕДЕНИЕ

Масштабы антропогенного воздействия на окружающую природу приводят к глубокой перестройке биоценозов. Биоценоз реагирует на изменение окружающей среды как единое целое. Его существование в широком диапазоне изменений окружающей среды возможно благодаря приспособительным изменениям биоценозов. Последние представляют собой единую взаимообусловленную систему приспособлений, включающую в себя различные способы достижения соответствия интенсивности и характера метаболизма биоценоза изменяющимся условиям среды, механизмы саморегуляции численности популяции, регуляторные механизмы особи, приспособительные изменения органов, приспособительные реакции в их элементарном проявлении на клеточном и субклеточном уровнях.

Увеличение внутреннего разнообразия биоценоза позволяет ему стабильно поддерживать высокий уровень метаболизма в широком диапазоне флуктуации тех или иных факторов внешней среды в тесном соответствии с обеспеченностью важнейшими жизненными ресурсами.

Считают, что биосистема характеризуется определенной направленностью развития целого комплекса очень общих по своему экологическому значению признаков. Среди них наиболее изученными признаками следует считать уменьшение энтропии, увеличение устойчивости к внешним возмущениям, усложнение межвидовых отношений, увеличение пространственной гетерогенности, увеличение длины жизненных циклов и усложнение временной структуры.

Известно, что наибольшая приспособленность системы к устойчивому существованию в конкретных условиях среды достигается при строго определенном, обусловленном

свойствами среды уровне организации этой системы. Превышение необходимого уровня организации уменьшает приспособленность системы к условиям ее существования. Иначе говоря, для устойчивого существования и функционирования биоценоза уровень его организации должен соответствовать условиям среды, должен быть достаточно высоким, но не избыточным: неоправданный условиями среды чрезмерно высокий уровень организации биоценоза, лишает его целесообразного соответствия среде и уменьшает его приспособленность к ней. Таким образом, это на существование некоторого предела уровня организации биоценоза, определяемого конкретными условиями среды. Следовательно, среда, изменяемая человеком, среда, в которой существуют биоценозы, оказывается фактором, определяющим и интенсивность метаболизма биоценозов, и уровень их организации. Не только уровень организации отдельных видов организмов, но и уровень организации их сообществ зависит от окружающей среды. Основные направления изменений биоценозов в условиях загрязнения окружающей среды отражают сущность этой зависимости.

Наличие различных способов метаболического прогресса обуславливает высокую пластичность биоценозов — их способность быстро и глубоко перестраиваться, приспособляясь к изменениям среды.

СПЕКТРАЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ ВОЗРАСТАНИЯ

Если известный принцип [1], который запрещает «избыточную» организацию для биоценозов (превышение уровня организации сообщества видов снижает приспособленность биоценоза к условиям его существования), распространить на биологические системы других структурных уровней, то можно говорить о существовании ограничения уровня организации клеточной популяции, определяемого конкретными условиями среды. Внешние условия, таким образом, определяют не только интенсивность метаболизма, но и уровень организации биосистем. Можно сказать, что организация биосистемы и ее состояние выступают как адаптация к изменившимся условиям среды существования.

Необходимость характеризовать существенные различия в состоянии клеток и в осуществляемых ими внешне однотипных процессах приводит к введению понятия о суммарных физиологических показателях. Поскольку материальным носителем жизнедеятельности биологической системы является ее структурная организация, при изучении реакций клеток на факторы воздействия необходимы неинвазивные методы исследования, т. е. обеспечивающие получение информации о степени упорядоченности живых структур без их разрушения. Степень упорядоченности структур обуславливает свойства и функциональные возможности исследуемых объектов. Индикатором изменений состояния живого организма (с учетом взаимосвязи его морфологии, физиологии и биохимии) могут служить динамические изменения его пространственной и временной структуры.

Изменения среды обитания находят обязательное отражение в реакциях живых систем. Реакция проявляется либо в количественном варианте (в определенном объеме клетки изменяется количество биохимических компонентов либо их пространственная организация), либо в качественном варианте.

Поскольку материальным носителем жизнедеятельности биологической системы является ее структурная организация, при изучении реакций клеток на факторы воздействия необходимы неинвазивные методы исследования, т. е. обеспечивающие получение информации о степени упорядоченности живых структур без их разрушения.

Наиболее полно в настоящее время отвечают перечисленным выше требованиям методы спектроскопии внутреннего отражения, которые дают возможность анализировать непрозрачные объекты в любом спектральном диапазоне любыми методами, регистрирующими изменения параметров электромагнитных излучений при их взаимодействии с объектами исследований. Спектральная характеристика представляет собой своего рода кривую закона распределения, которая отражает определенные изменения в структурах клетки, происходящие при наложении внешних электромагнитных волн или в

процессе отдачи ими информации. Для оценки функционального состояния клетки необходимо проанализировать содержание в клетках важнейших биополимеров (белков, нуклеиновых кислот, липидов, полисахаридов), их пространственное распределение, а также структурную организацию, включая пространственную ориентацию определенных химических связей в макромолекулах.

С примерами реализации предложенной в данной работе методологии можно познакомиться в ряде публикаций [2], рассматривающих в качестве такого инструмента методы спектроскопии внутреннего отражения (СВО).

Экспериментальные данные по изменению анизотропии в виде ИК спектров были получены в поляризованном свете (угол падения измерительных элементов удобно выбрать равным 45° , так как для него в случае изотропного распределения молекул дихроичные отношения (А) $d_{эф1}/d_{эф2} = 2$, где $d_{эф1}$, $d_{эф2}$ - эффективные толщины исследуемого образца для параллельной и перпендикулярной компонент плоскополяризованного света). Оценка эффективной толщины проводилась по оптической плотности (D), которая связана с $d_{эф}$ зависимостью $D = \ln R = \alpha N d_{эф}$, где R - коэффициент отражения, измеряемый в опыте; α - показатель поглощения, см^{-1} ($\alpha = \varepsilon C$; ε - экстинкция, л/см·моль; C - концентрация, моль/л); N - число отражений в элементе. Любое отклонение этого значения от $d_{эф1}/d_{эф2} = 2$ характеризует преимущественную ориентацию образца относительно плоскости падения света. В работе был использован ИК пленочный реплика-поляризатор на основе полиэтилена 1200 штрихов/мм, степень поляризации 95-96%, пропускание поляризатора 46-48%. Для регистрации сигнала использовали преобразование сигнала с ИК спектрофотометра ИКС-29 мультиметром METEX ME-22 для ввода в компьютер и последующего анализа данных на базе стандартной программы «MICROSOFT EXCEL», позволяющей провести обшчѐт площадей поглощения. Проведены статистические обработки результатов измерений.

Динамика отличий дихроичных отношений (А) для внешних структур и целых клеток как характеристика функционального состояния системы.

При изменении среды обитания биосистема пытается адаптироваться к этим изменениям, осуществляя обмен информацией со средой. В процессе адаптации изменяется и степень анизотропии биосистемы в разных ее слоях, что связано с изменением пространственной организации как целых клеток, так и их внешних структур. Степень же анизотропии можно определять с помощью регистрации спектральных характеристик, полученных при разных поляризациях электромагнитного излучения (так называемые дихроичные отношения) и получения цифровых данных. По соотношению этих данных для целых клеток и их внешних структур (А) можно характеризовать организованность биосистемы и, следовательно, ее функциональное состояние. Анализ проводили по полосам поглощения белков амид 1 (A_1) и амид 2 (A_2).

Рассматривалась возможность изучения отличий делящихся клеток гетерогенной и синхронной культур галофильных микроорганизмов *Halobacterium halobium* [3]. Динамика развития гетерогенности регистрировалась по изменениям градиента концентрации биохимических компонентов нативных клеток с помощью анализа изменений интенсивности полос поглощения и дихроичных отношений (таблица 1).

Таблица 1. Значения А полосы амид1 синхронной и несинхронной культур *Halobacterium halobium* в различные часы роста

Время, час.	Несинхронная культура		Синхронная культура	
	Анализируемый слой			
	Внешние структуры	вся клетка	Внешние структуры	вся клетка
3	2,0	1,6	1,8	1,6
4	2,1	1,7	1,9	1,6

5	2,0	1,5	1,8	1,5
6	2,0	1,6	1,9	1,5
7	1,9	1,5	2,0	1,5
8	2,1	1,6	1,9	1,5

Целым клеткам несинхронной культуры свойственна определенная степень упорядоченности находящихся в них биополимеров, практически незаметная в их внешних структурах. В синхронной культуре анизотропия наблюдается даже в тех областях поглощения, где она не выявлена для несинхронной. При рассинхронизации культуры величины значений A практически стали совпадать с величинами, характеризующими несинхронную культуру.

Итак, увеличение гетерогенности в биосистеме, связанное с повышением её устойчивости, отражается в изменении разности значений A в большую сторону. Полученные результаты позволяют рассматривать синхронные культуры клеток в качестве одного из "инструментов" исследования поведения популяций микроорганизмов при изменении внешней среды. Показано возрастание гетерогенности пространственно-временной организации (и биоразнообразия) при переходе экосистемы в более устойчивое состояние. Синхронная культура (неустойчивая система) рассинхронизируется в процессе развития – постепенно становится устойчивой, подобно процессу сукцессии на макроуровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты представлены в таблице. В таблице приведены расчетные данные периодов развития культуры. Из таблицы видно, что соотношение указанных полос для синхронной и несинхронной культур значительно отличается. Расчет дихроичных отношений спектров с разных глубин проникновения света для синхронной и несинхронной культур показал, что клеткам свойственна определенная степень упорядоченности находящихся в них биополимеров, которая почти исчезает для слоя, затрагивающего лишь внешние структуры. Результаты, полученные для несинхронной культуры, практически совпадают со сказанным выше, а для синхронной - значительно отличаются: анизотропия наблюдается даже в тех областях поглощения, где она не выявлена для несинхронной. При рассинхронизации культуры величины дихроичных отношений практически стали совпадать с величинами, характеризующими несинхронную культуру. Полученные результаты дают основание предположить, что является перспективным использование синхронных культур клеток в качестве одного из "инструментов" для спектрального исследования поведения популяций микроорганизмов при изменении внешней среды.

Вывод: увеличение гетерогенности в биосистеме (связанное с повышением ее устойчивости) отражается изменением разности DO в большую сторону.

Результаты иллюстрируют возрастание гетерогенности пространственно-временной организации (и биоразнообразия) при переходе системы в более устойчивое состояние. Синхронная культура (неустойчивая система) рассинхронизируется в процессе развития – постепенно становится устойчивой. Подобно процессу сукцессии на макроуровне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хильми Г.Ф. Основы физики биосферы. Л.: Гидрометеиздат, 1966.
2. Калабеков А.Л., Королев Ю.Н. Экологический мониторинг: Некоторые методы неинвазивного анализа интактных клеток. М.: Прима-Пресс-М, 2000.
3. Чекулаева Л.Н., Королев Ю.Н. Анализ гетерогенности культуры клеток методом спектроскопии НРВО. // Биофизика, 1985, т. 30, вып. 1. С. 173-177.

E.L. Barsky, Ya.V. Savanina, S.U. Koroleva, U.N. Korolev, E.S. Lobakova

*M.V.Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, Russia
119899, Moscow, Leninskie Gori, 1, Bld 12, E-mail: cordekor@list.ru*

SPECTRAL CONTROL THE GROWING HETEROGENEITY OF SPACE-TIME ORGANIZATION WHEN YOU MOVE IN A STEADY STATE BIOSYSTEMS

The empirically demonstrates that the increased heterogeneity in your (improves system) is reflected in the difference of dihydroicnyh relations. The data on the dynamics of heterogeneity in synchronous cultures of micro-organisms cultivation as an "instrument". For example, microorganisms possibility study differences dividing cells heterogeneous and synchronous crops when recording changes of biochemical component concentration gradient of native cells via analysis of intensity of absorption bands and dihydroicnyh relations in the infrared range.

MICROORGANISMS, SPACE-TIME ORGANIZATION, ATTENUATED TOTAL REFLECTION