

Фази розвитку періодичної культури, обумовлені агрегацією бактерій

В. Г. Войцеховський

Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця
Проспект Перемоги, 34, Київ, 03057, Україна

У роботі досліджували загальні закономірності розвитку споруутворюючих мікроорганізмів. Для цього застосовано періодичне культивування, визначення оптичної густини культури, мікрокультивування бактерій, мікрофотозйомку. Зафіксовано явище агрегації бактерій, якісно описано нові фази розвитку періодичної культури, експериментально доведено життєздатність спорових форм клітин протягом тривалого часу.

Вступ. Відомо, що в умовах періодичного культивування мікроорганізмів відбувається послідовна зміна певних фаз їхнього розвитку, яку графічно зображали у вигляді дзвіноподібної кривої [1].

Криві росту і розмноження бактерій засвідчували кількісні зміни клітин у популяції в залежності від тривалості їхнього культивування. Можливо, такі обставини сприяли своєрідній стандартизації кривих росту і розмноження обмеженням кількісних і якісних показників характеристики фаз і не сприяли глибинному пізнанню суті складного мікробіологічного процесу розвитку бактеріальної популяції. Тому в багатьох монографіях і учбових посібниках з мікробіології [2—4] і дотепер знаходимо зображення лише типових кривих росту бактерій (рис. 1).

Вперше таку криву описав Лейн-Клейптон і розділив її на чотири фази: затримки розмноження, найбільшого розмноження, стаціонарну і фазу загибелі популяції [8]. Згодом на підставі детальнішого аналізу кривих росту мікроорганізмів Бухананом запропоновано розрізнати шість таких фаз: початкову, затримки розмноження, логарифмічного розмноження, негативного прискорення, стаціонарну, прискореної загибелі [5]. Аналогічні результати наведено в працях [6, 7, 15]. Фробішер розділив криву росту бактерій на вісім фаз, назву яких наведено на рис. 2 [2]. Практично такий тип кривої росту бактерій з деякими деталями існує і в

наші дні, незважаючи на численні спроби дослідити навіть гіпотетичні її варіанти.

Мета даної роботи полягала в дослідженні динамічних змін у межах розвитку періодичної культури аеробних споруутворюючих бактерій як з погляду кількісних співвідношень, так і з позиції «взаємин» між клітинами.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були кілька видів споруутворюючих мікроорганізмів, які різнилися швидкістю і синхронністю проростання спор, темпом і інтенсивністю розмноження клітин, а також тривалістю спорогенезу [12]. Використовували чисті культури *Bacillus cereus* 504, *B. cereus* 43, *B. subtilis* 83, *B. megaterium* H та *B. mesentericus* АБ-56. Кожну з них досліджували в межах одного життєвого циклу (від спори до спори, через стадію розмноження первинних вегетативних клітин), тобто в рамках так званого макроциклічного розвитку популяції бактерій.

Для відтворення макроциклу застосовували метод періодичного культивування в рідкому поживному середовищі, лімітованому за вмістом амінного азоту [9], що сприяло ефективному спорогенезу.

Кількісні співвідношення живих і мертвих клітин в популяції періодичної макрокультури з'ясували загальновідомими методами прямих підрахунків (у лічильних камерах, у мазках пофарбованих клітин, на мембранних фільтрах) і непрямих методичних прийомів: метод серійних розведень, підрахунок колоній в різних технічних варіантах,

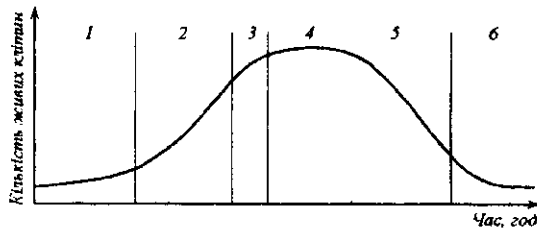


Рис. 1. Типова крива росту мікроорганізмів за результатами підрахунку кількості живих клітин [1]; 1 — лаг-фаза; 2 — експоненціальна фаза; 3 — фаза уповільненого росту; 4 — стаціонарна; 5 — фаза відмирання; 6 — фаза виживання

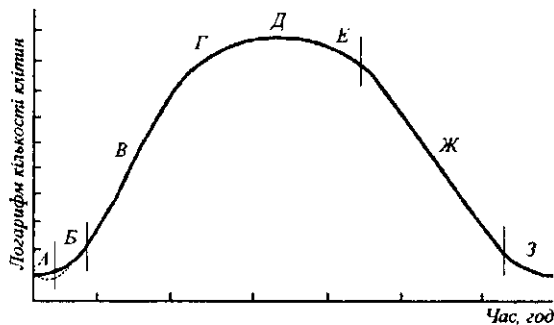


Рис. 2. Крива росту мікроорганізмів за даними роботи [2]: А — латентна фаза; Б — фаза прискорення росту; В — логарифмічна; Г — уповільненого росту; Д — стаціонарна, Е — фаза прискорення загибелі; Ж — логарифмічна фаза загибелі; З — кінцева фаза, яка завершується повною стерилізацією культури

нефелометричний спосіб визначення густини культури [11].

Враховуючи недостатню надійність і точність цих методик, а також неможливість «заглянути» в суть міжклітинних взаємин при їхньому застосуванні, нами було розроблено і використано спеціальний комплекс методичних прийомів, що дозволило реалізувати поставлену мету.

Його основу складали прості і швидкі методи нефелометрії, які виключали суб'єктивність оцінок, метод спостереження за розвитком клітин у нативних препаратах у фазово-контрастному мікроскопі, а також метод мікрофотозйомки, яку здійснювали послідовно в динаміці розвитку культури. Це дозволило значно розширити можливості спостережень за клітинами і одержати якісно нові результати досліджень [9, 10, 12].

Результати і обговорення. Користуючись ком-

плексним підходом до вивчення періодичної спору-творюючої аеробної макрокультури *B. cereus* 504, вперше вдалося з'ясувати, що її розвиток неможливо описати в рамках класичних термінологічних підходів, а окремі виявлені нами стадії не знайшли собі місця серед загально визнаних фаз кривої росту. В той же час деякі процеси, описані раніше [2, 4, 11, 15], не знайшли підтвердження або не змогли бути відтворені в умовах наших дослідів.

У першу чергу це стосується процесів відмирання і руйнування клітин, на які посилаються різні дослідники, які чомусь не побачили в «неминучій стерилізації культури» невідповідності до загальної еволюції бактерій, до долі окремих їхніх видів, які за умов такої «неминучості» давно б втратили своє місце в світі мікроорганізмів. Пошук досконаліших уявлень про розвиток бактерій, об'єднаних у популяції, на прикладі розвитку культури *B. cereus* 504 в умовах безперервного спостереження протягом кількох діб і періодичного — впродовж 25 років показав, що кінцевою фазою розвитку не є руйнування бактерій. Клітини лише обов'язково переходять у стадію спокою із довготривалим збереженням їхньої 100 %-ї життєздатності, готових розпочати новий цикл, в якому морфологічно визначаються не менше 12 фаз розвитку бактерій (таблиця).

Зауважимо, що більшість із зазначених фаз розвитку культури (8 із 12, що становить близько 67 %) є новими, самостійними стадіями, існування яких у будь-який період розвитку може бути чітко ідентифіковано об'єктивними морфологічними критеріями. Навіть фаза «д» (гальмування темпу росту культури), яка має свій аналог на класичних «кривих», у нашому випадку ідентифікується не стільки кількісними співвідношеннями клітин (хоча це має місце), скільки наявністю морфологічних ознак, яких не було ні до, ні після завершення цієї фази. Стосовно ж фаз «є», «ж», «з», «і», «к», «л», «м», то всі вони є новими фазами, чітко визначеними в часі, з оригінальною морфологічною картиною клітинних зв'язків, послідовність зміни яких обумовлена попередніми змінами в культурі, що включилася в процес розвитку за схемою макроциклу.

Кожна з виявлених нових фаз розвитку культури спору-творюючих аеробних бактерій — це, що найвірогідніше, дуже складний в біохімічному, фізіологічному і генетичному сенсі процес, який потребує детального вивчення. З пізнанням нових фаз розвитку та їхніх регуляторних механізмів неодмінно пов'язано з'ясування можливостей практичного застосування одержаних результатів.

Аналіз даних таблиці показує, що, розвиваючись за такою схемою, пройшовши послідовно всі

Фази розвитку спороутворюючої культури *B. cereus* 504

Маркіровка фази	Назва фази і її тривалість	Характеристика фази
а	Латентна фаза, 60 хв	Ініціація і набухання спор, що асинхронно проростають. Відсутні первинні вегетативні клітини. Оптична густина (ОГ) культури знижується при відсутності ознак руйнування клітин
б	Збільшення об'єму клітин, 60—90 хв	Підсилене набухання, визрівання окремих клітин, їхня елонгація; рідко трапляються спори без ознак проростання. Початок підвищення ОГ
в	Прискорення темпу росту, 30—40 хв	Утворення первинних вегетативних клітин на фоні завершення їхнього визрівання із зростанням ОГ
г	Експоненціальна фаза росту, 120 хв	Початок поділу первинних вегетативних клітин, помітно їхню рухливість, інтенсивне розмноження, стрімкий ріст ОГ, відсутність лізуючих форм
д*	Гальмування темпу росту або початок агрегації клітин, 1,5—2 год	Рухливість клітин різко зменшується, гальмується активний поділ клітин, знижується темп росту ОГ, початок об'єднання вегетативних клітин в агрегати. Зростання ОГ можливе лише за умов руйнування агрегатів, у яких клітини ще розмножуються
е*	Інтенсифікація агрегації вегетативних клітин, 90 хв	Збільшуються розміри агрегатів, різко зменшується кількість окремих вегетативних клітин. ОГ зростає лише після можливого ще руйнування агрегатів. Усі клітини живі, приріст біомаси уповільнений
ж*	Фаза максимальних агрегатів вегетативних клітин, 2 год	Всі вегетативні клітини об'єднані в міцні агрегати. Контрастність їхня знизена. ОГ не збільшується навіть після руйнування агрегатів і досягає максимальних величин. Ріст вегетативних клітин припинено. Клітини починають готуватися до споруляції
з*	Фаза інтенсивної споруляції клітин в максимальних агрегатах, 2 год	Клітини в агрегатах перебувають на різних стадіях спороутворення, зустрічаються клітини з гранулами, передспори і майже зрілі спори в агрегатах. Усі клітини є життєздатними, зруйнованих клітин не спостерігається
і*	Визрівання спор в агрегатах, 4 год	У культурі переважають агрегати великих розмірів, котрі складаються із клітин з рефрактильними спорами в оточенні параспоральної частини спорангія. ОГ зростає, 2-й пік. Мертві клітини відсутні
к*	Фаза інтенсивного лізису параспоральних частин агрегованих спорангіїв, ~3 год	Спори залишаються в стані агрегації. Переважають агрегати великих розмірів, частіше неправильної форми. Параспоральна частина спорангія повністю лізувалася. На периферії деяких агрегатів з'явилися окремі вегетативні клітини. ОГ досягла 3-го піка
л*	Фаза дезагрегації, 5 год	Різке ослаблення сил зв'язку між спорами в агрегатах. Агрегати спонтанно і повільно повністю зруйнувалися. В полі зору лишилися тільки ізольовані спори, які зберегли життєздатність
м*	Стаціонарна фаза спор у стані спокою. Довготривала, 25 років	Культура складається з розрізнених спор, що перебувають у стані спокою. Закінчився розвиток бактерій за типом макроциклу — від спори до спори через розмноження вегетативних клітин, їхню агрегацію і період спороутворення в агрегатах з наступною дезагрегацією

*Нова фаза.

виявлені нами фази, культура забезпечує собі довготривале збереження в навколишньому середовищі. Невідомим залишається механізм контролю за переходом культури з однієї стадії в іншу. Та маючи надійну модель розвитку культури, можна сподіватися, що це відкриватиме шлях до пошуку таких механізмів. Незаперечним залишається вис-

новок про те, що розвиток популяції здійснюється завжди в одному напрямку. Ніколи, наприклад, при спороутворенні фаза «з» не спостерігалася раніше фази «е», коли клітини об'єднувалися в агрегати з наступною їх еволюцією. Така однонаправленість розвитку, послідовність певних за змістом фаз є наслідком закономірностей, від яких

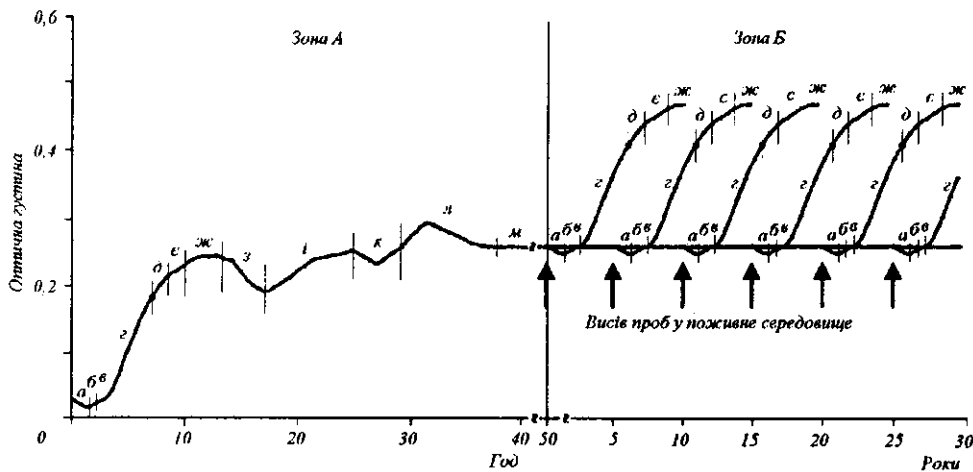


Рис. 3. Графічне зображення макрочиклу розвитку спороутворюючих бактерій з визначенням меж восьми нових фаз, обумовлених явищем агрегації клітин (зона А) і здатності культури прикінцевої фази «м» відтворювати тотожні цикли упродовж наступних 25 років (зона Б). Назва фаз, їхня послідовність — це наслідок комплексного вивчення морфологічних, фізичних і фізіологічних характеристик культури (див. таблицю), на підставі яких побудовано криву

залежить розвиток культури, спрямований лише в одному напрямку. Подібні закономірності встановили Малек і Стрешинский при дослідженні однополюсного розвитку мікробної клітини, який не вдавалося пояснити впливом тільки зовнішніх факторів на мікроорганізми [13, 14].

Таким чином, з аналізу наведених нових фаз розвитку культури аеробних спороутворюючих бактерій впливає ряд особливостей. Найперша з них, хоча й не найважливіша, полягає в тому, що зазначений майже у всіх опублікованих «кривих» розвитку обов'язковий лізис клітин на початкових стадіях розвитку популяції насправді (фактично) не спостерігається. Отже, ймовірна неточність чи помилка попередніх дослідників обумовлена невірним поясненням і оцінкою факту тимчасового зниження густини мікробної популяції в латентній фазі розвитку культури. Нами теж зареєстровано малопомітне падіння оптичної густини культури бактеріальної суспензії під час проростання спор. Але за допомогою об'єктивних методів дослідженнями стану клітин у пробах макрокультури в фазово-контрастному мікроскопі не виявлено ні руйнування, ні загибелі клітин.

У подальшому при застосуванні методу мікрокультур, коли досліджували всі клітини, а не випадкову їхню вибірку, нами показано, що жодна з них не загинула, а розвиток культури був обумовлений не розмноженням «найсильніших» клітин, а неоднорідним, асинхронним проростанням у цій фазі їхніх спорових форм. Можливо, якраз в асинхронності пробудження спор і полягає суть так

званої взаємної підтримки і стимуляції клітин, описаної в літературі під терміном «алельокаталіз». Хоча цей процес пробудження ще недостатньо вивчений, проте одержані експериментальні дані показують, що лізис клітин на початковому відрізку кривої не є обов'язковим, а зниження оптичної густини культури як доказу руйнування чи смерті клітин можна уникнути стандартизацією посівного матеріалу.

Друга і найважливіша особливість — це вперше виявлене нами своєрідне явище агрегації клітин на певному етапі розвитку культури. Суть його полягає в тому, що дочірні клітини первинних вегетативних клітин без зовнішнього штучного впливу здатні об'єднуватися в міцні агрегати (скупчення), в яких згодом культура розпочинала і завершувала спороутворення. Особливістю даного етапу розвитку є те, що відбувається гальмування розмноження клітин, а «крива росту» втрачає свій стрімкий ріст (рис. 3) без відмирання окремих складових популяцій, руйнування клітин або прогресивної смерті. В період між формуванням максимільних агрегатів і початком перетворення агрегованих вегетативних клітин в спори ми дійсно спостерігали за припиненням розмноження бактерій. Однак закінчення розвитку культури набуває нового змісту — в популяції відбувається диференціація клітин. За таких умов втрачаються показники кількісної динаміки процесу розвитку культури. Тому зовні «крива росту» бактерій набуває ознак стаціонарності, хоча в основі її лежить складний якісно-динамічний процес: споруляція ве-

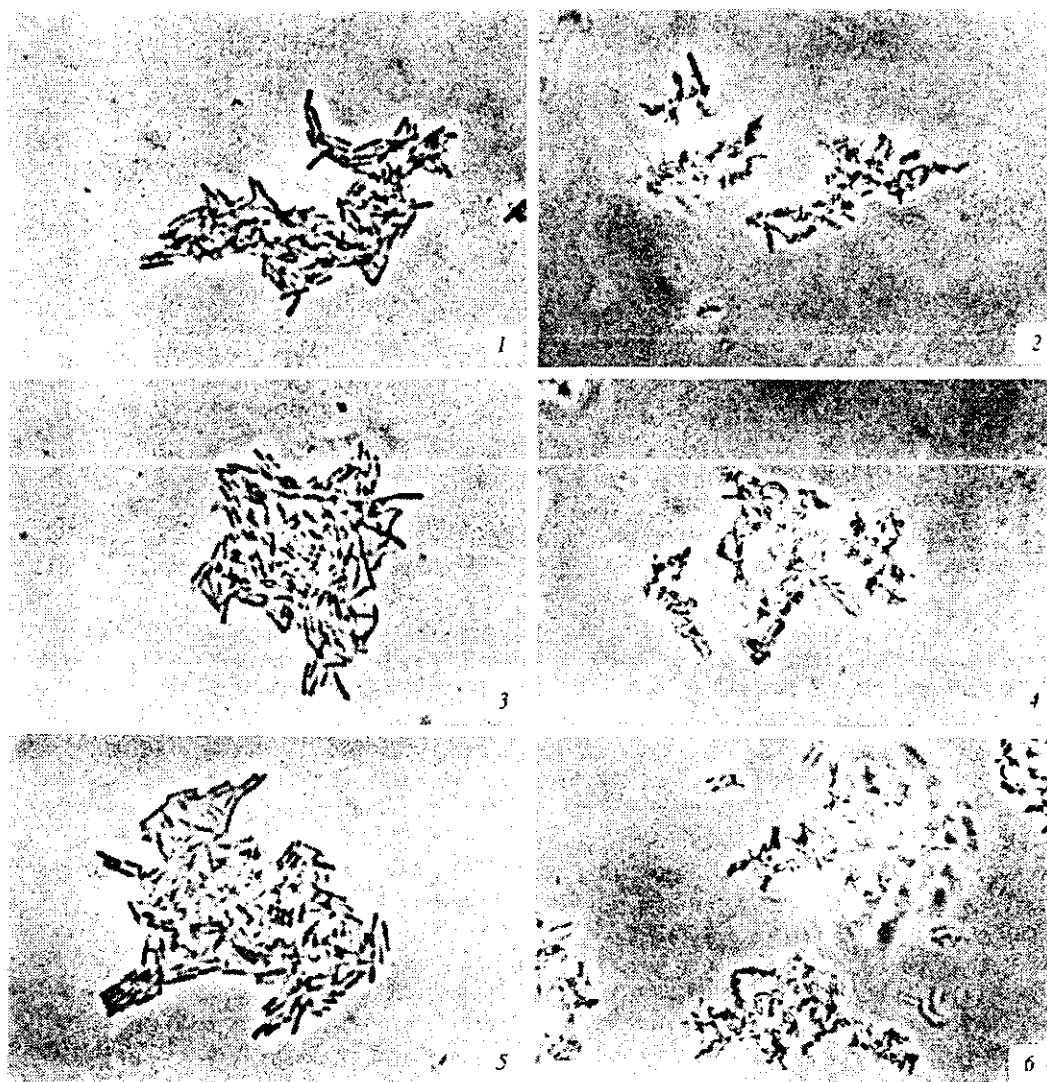


Рис. 4. Формування масивних агрегатів вегетативних клітин *B. cereus* 504 в процесі життєвого циклу розвитку культури. Фаза «ж»; 1, 3, 5 — X 900; 2, 4, 6 — X 400

гетативних клітин в агрегатах з наступною дезагрегацією і завершенням розвитку стадією спокою у вигляді стійких спорових форм, що повністю замінили вегетативні клітини в популяції.

На класичних кривих розвитку цей досить значний відрізок «кривої росту» включає фазу затримки росту клітин, коли знижується інтенсивність їхнього поділу і поступово збільшується частка загиблих клітин; стаціонарну фазу, під час якої число новоутворених клітин дорівнює кількості мертвих, і, накінець, фазу логарифмічного прискорення змертвіння клітин до повної стерилізації популяції.

Виявлена нами розбіжність у самій суті процесу розвитку макрокультури, яка знайшла відо-

браження в нетотожності побудованої «кривої» (див. рис. 3) з відомими на сьогодні, не змогла знайти пояснення в роботах навіть провідних дослідників. Через характер методичної озброєності неможливо було помітити, як рухливі вегетативні клітини, оснащені перитрихіально розташованими джгутиками, раптом ставали менш рухливими, ніби склеювалися своїми тілами по подовженій осі, утворювали окремі субодиноці з подальшим формуванням масивних агрегатів (рис. 4).

У цей час кількість живих клітин в популяції значно зменшується (метод прямого висіву на тверде поживне середовище і підрахунку числа колоній). Однак — це фальшиве уявлення, тому що окрема колонія тепер формується не з окремих

клітин (бо тоді кількість колоній означала б кількість клітин), а з десятків і навіть сотень клітин, невідомо з яких причин об'єднаних у стійкі агрегати (рис. 4).

Збільшення розмірів агрегатів супроводжувалося зменшенням кількості колоній при висівах проб, що імітувало враження про зростання числа мертвих клітин, хоч жодна з них в цей період не вмирала. Та коли б клітини в агрегатах все ж умирали, а не, спорулюючи, залишалися живими, то кінцеві відрізки експериментально відтвореної нами «кривої росту» мали б схожий характер. Цього, як добре видно зі співставлення різних кривих (див. рис. 1—3), не сталося. Навпаки, схожість виявлено лише на початкових відрізках кривих росту бактерій, які суттєво різняться в середній і заключній своїх частинах. Безумовною причиною знайдених особливостей розвитку спорулюючої культури є агрегація клітин у популяції бактерій. Для глибшого пізнання механізмів переключення вегетації клітин на споруляцію агрегованих клітин у періодичній культурі важливим видається дослідження динаміки утворення агрегатів від початку їхньої появи до інволюції як обов'язкової стадії розвитку культури.

Висновки. 1. Вперше виявлено і охарактеризовано вісім нових фаз розвитку періодичної культури спорулюючих бактерій в рамках одного життєвого макроциклу тривалістю близько 40 год.

2. Клітини завершальної фази макроциклу зберігають життєздатність і спроможність відтворення макроциклічного шляху розвитку впродовж 25 років зберігання в умовах, що унеможливають їхню вегетацію.

В. Г. Войцеховський

Фазы развития периодической культуры, обусловленные агрегацией бактерий

Резюме

В работе исследованы общие закономерности развития спорообразующих микроорганизмов. Для этого применяли периодическое культивирование, определение оптической плотности культуры, микрокультивирование бактерий, микрофотосъемку. Зафиксировано явление агрегации бактерий, качественно описаны новые фазы развития периодической культуры, экспериментально доказана жизнеспособность спорных форм клеток на протяжении длительного времени.

V. G. Voitsechovski

The phases of periodical culture development which are conditioned by aggregation of bacteria

Summary

The present investigations hold the light for the study of development regularity of spore-formers. It was used the methods of periodical cultivate, take culture optical thick, microcultivation of bacteria, microphotography. In result was determined the phenomenon of bacteria units, describe the new extension phases of periodical culture, take experimental proof of cell spore forms of great vitality in more time.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Ждан-Пушкина С. М.* Основы роста культур микроорганизмов.—Ленинград: Изд. Ленингр. ун-та, 1983.—187 с.
2. *Фробішер М.* Основы микробиологии.—Москва: Мир, 1965.—678 с.
3. *Тарков М. И.* Вопросы физиологии размножения микроорганизмов и их идентификации.—Кишинев: Карта Молдованяске, 1968.—223 с.
4. *Месробяну Л., Пуэнеску Э.* Физиология бактерий.—Бухарест: Меридиане, 1963.—807 с.
5. *Buchanan R. E.* // *J. Infect. Disease.*—1918.—23.—P. 109 (Цит. по М. И. Таркову, 1968).
6. *Porter J.* 1942 // Цит. по Kochler W., Mochmann H. *Grundriss der Medicinischen Microbiologie.*—Jena, 1964.—481 p.
7. *Winslow J., Welker P.* 1939 // Цит. по Kochler W., Mochmann H., *Grundriss der Medicinischen Microbiologie.*—Jena, 1964.—481 p.
8. *Lane-Clayton J. E.* // *Journal Hygiene.*—1909.—9, N 2.—P. 239—248 (Цит. по М. И. Таркову, 1968).
9. *Войцеховський В. Г.* Вивчення розвитку мікрокультури *Vacillus cereus* 504 // *Мікробіол. журн.*—1977.—39, № 6.—С. 735—740.
10. *Войцеховський В. Г.* Формування агрегатів клітин під час розвитку та диференціації бактерій // *Зб. наук. праць співробітників КМАПО ім. П. Л. Шупика.*—К., 2000.—С. 780—787.
11. *Герхардт Ф.* Методы общей микробиологии.—Москва: Мир, 1983.—Т. 1.—536 с.
12. *Широбоков В. П., Войцеховський В. Г., Тишко О. Г., Завальнюк А. К.* Про деякі умови відтворення агрегативного стану мікробних клітин в процесі росту і розвитку мікроорганізмів // *Актуальные проблемы медицины и биологии.*—Киев, 1993.—II.—С. 3—10.
13. *Стрешицкий М. Д.* Некоторые закономерности роста клетки аэробных спорных бактерий // *Общ. биология.*—1955.—16, № 1.—С. 17—22.
14. *Malek J.* // *Czechoslov. Biol.*—1954.—3.—P. 135 (Цит. по Л. Месробяну, Э. Пуэнеску, 1963).
15. *Monod J.* Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes.—1942 (Цит. по М. И. Таркову, 1968).

УДК 576.8.094.81

Надійшла до редакції 05.07.99