

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РАЗВИТИЯ МУЗЕЙНЫХ И СВЕЖЕВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОРГАНИЗМА ШТАММОВ

© 2005 С.Д. Колпакова, Г.А. Колпакова¹

Изучена динамика развития музейных и свежевыделенных из организма штаммов бактерий в реальном режиме времени. Показано различие в механизмах развития музейных и свежевыделенных бактериальных культур в лаг-фазе, которое можно использовать в качестве критерия их идентификации.

Введение

Большинство микробиологических исследований при изучении свойств микроорганизмов, как возбудителей заболеваний, используют традиционные методы [1, 2], длительность которых составляет единицы, десятки часов (72–96 часов и более). Жизнедеятельность выделенной из организма культуры поддерживается в этом случае на искусственных питательных средах. Этого времени вполне достаточно для проявления индуцированных мутаций по таким признакам, как токсинообразование, устойчивость микроорганизмов к антибиотикам, возникающая в результате замедления процесса размножения, изменения рибосом, возникновения новой энзимной цепи для определенного процесса, связанного с изменением условий существования и т.д. В связи с этим традиционные микробиологические методы не позволяют выявить различия в механизмах развития свежевыделенных из организма и длительное время культивируемых на искусственных питательных средах штаммов (музейных), т.к. в их основе и лежит необходимость длительного культивирования и, следовательно, они регистрируют уже изменившиеся свойства свежевыделенных культур. Другим недостатком этих методов является невозможность проведения исследований в реальном режиме времени, что еще более усугубляет вероятность появления заведомо неадекватных результатов исследований. Использование этих результатов в практической деятельности врача может привести к ошибочным выводам.

¹Колпакова Светлана Дмитриевна, Колпакова Галина Анатольевна, кафедра общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии Самарского государственного медицинского университета, 443090, Россия, г. Самара, ул. Гагарина, 18.

Поэтому целью настоящей работы является выявление степени различия между свежевыделенными и музейными штаммами непосредственно в динамике их развития.

1. Материалы и методы исследования

Для исследований использовали музейные штаммы *Staphylococcus aureus* (штамм 209), *Escherichia coli* (штамм К-12), *Pseudomonas aeruginosa* (штамм 4), полученные из Государственного института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича, а также свежевыделенные с поверхности ожоговой раны 3–4 степени культуры *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

В качестве измерительного устройства для изучения динамики развития бактерий в реальном режиме времени использовался фотометр КФК-2МП. Этот прибор требует прецизионных методов приготовления образцов [3,4], т.к. только в этом случае можно получить высокую степень воспроизводимости результатов исследований динамики развития бактерий. Для регистрации малейших отличий динамики развития исследуемых штаммов шаг измерения их параметров составлял 5 с.

Внесение инокулята на поверхность питательной среды осуществлялось с помощью специально разработанного устройства, позволяющего дозировать объем внесения инокулята (рис. 1).

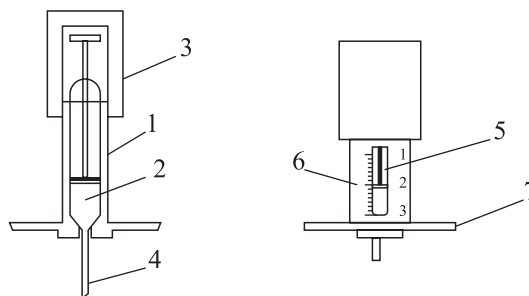


Рис. 1. Устройство дозированного внесения инокулята: корпус (1), шприц с инокулятом (2), микрометрический винт (3), игла к шприцу (4), отверстие для наблюдения за поршнем шприца (5), шкала с ценой деления (6), опорная подставка (7)

Стерильный и прошедший специальную очистку от поверхностных загрязнений шприц заполняется инокулятом и помещается в корпус устройства. Диаметр шприца и внутренний диаметр корпуса подобраны таким образом, что исключаются малейшие колебания шприца в корпусе, не препятствуя при этом изъятию его из корпуса по окончании работы. После этого на корпус навинчивается микрометрический винт, верхняя стенка которого при навинчивании входит в контакт с поршнем шприца и при дальнейшем на-

винчивании приводит его в движение, формируя каплю инокулята на конце иглы. Отверстие (5) позволяет вести наблюдения за движением поршня шприца. Дозированное внесение инокулята (постоянство параметров капли) обеспечивается диаметром отверстия в игле и строго контролируемым с помощью шкалы деления движением микровинта. Высокая точность перемещения винта обеспечивалась его малым перемещением по вертикали и составляла 0,4 мкм. Площадь опорной подставки устройства выбиралась исходя из устойчивости его установки на поверхности крышки кюветного отделения фотометра.

2. Результаты и обсуждение

Результаты исследований механизмов развития музейных и свежевыведенных из организма штаммов представлены на рис. 2–5.

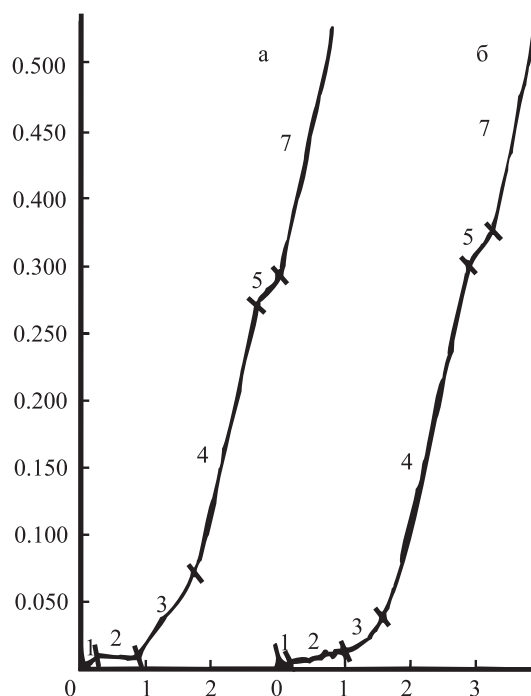


Рис. 2. Кривые динамики развития *St.aureus*: а — лабораторного штамма, б — свежевыведенного штамма. По оси абсцисс — время (в ч), по оси ординат — оптическая плотность (в усл. ед.)

Анализ представленных зависимостей позволяет выделить на кривых динамики развития всех исследуемых культур 6 характерных участков, воспроизводимость которых была не ниже 93%.

Рассмотрим механизмы формирования этих участков на примере кривой динамики развития *St.aureus* (рис. 2 а, б), поскольку здесь они хорошо выражены.

Характер участка 1 кривой (при $0 < t < 6$ мин), представленной на рис. 2, а, говорит о полном отсутствии какой-либо активности микроорганизмов, внесенных в питательный бульон, т.к. инокулят представляет собой в этот период совокупность независимых друг от друга частиц (бактериальных клеток), находящихся в состоянии покоя, и их перемещение в растворе определяется диффузионными процессами [5].

Этот процесс характеризуется глубокой консервацией бактериальных клеток и, следовательно, хорошей их защищенностью от воздействий внешней среды, отсутствием функционирования внутриклеточных процессов ввиду полной инертности свойств внешней поверхности мембраны и полным отсутствием межклеточных взаимодействий [6]. При этих условиях и разности плотностей капли инокулята и питательного бульона инокулят, по крайней мере, в первый момент времени сохраняет форму капли в питательном бульоне. Ввиду большой скорости растворения жидкостей друг в друге, наличия градиента концентрации микроорганизмов в капле относительно бульона и теплового движения участок 1 музейного штамма не должен сильно отличаться от аналогичного участка кривой динамики развития микроорганизмов свежесделанного штамма (рис. 2, б). Однако на реальной кривой этот участок не только вдвое превышает участок 1, но и имеет восходящий участок кривой в диапазоне $6 < t < 24$ мин (рис. 2, а). Это свидетельствует о более длительном периоде сохранения капель своей формы и ее прохождении через световой поток фотометра, т.е. распад капли инокулята происходит под световым лучом, поэтому в процессе установления равновесного состояния часть микроорганизмов попадает в область светового луча (рис. 2, а, участок кривой при $6 < t < 24$ мин). Аномально большая длительность участка 1 связана, по-видимому, с тем, что в процессе длительного культивирования микроорганизмов на искусственных средах в инокуляте всегда присутствуют в равной степени особи, сохранившие первичную активность внутриклеточных процессов и частично или полностью потерявшие ее. В первом случае, согласно [6–8], на внешней поверхности мембраны формируется отрицательный заряд, а во втором - величина этого заряда значительно меньше, что адекватно возникновению у этих особей положительного заряда. Таким образом, в инокуляте музейных штаммов возникают кулоновские силы межклеточного притяжения, которые в совокупности с силами поверхностного натяжения капли способствуют сохранению целостности капли инокулята как единого целого в диапазоне при $0 < t < 6$ мин. В диапазоне $6 < t < 24$ мин силы, возникающие в капле инокулята из-за градиента концентрации микроорганизмов и их теплового движения, начинают преобладать, и капля инокулята растворяется в питательном бульоне. При $t = 24$ мин. в питательном бульоне устанавливается равновесное состояние, сохраняемое в течение 27 мин (рис. 2, а, участок 2 кривой). Отсутствие активности в этот период является характерным только для микроорганизмов, ослабленных длительным культивированием на искусственных средах или имеющих узкоспецифические условия жизнедея-

тельности. У таких микробов длительное культивирование на искусственных средах привело к гипертрофированному развитию какого-то одного механизма потребления однообразной питательной среды, действие которого в данных условиях является наиболее эффективным. О доминировании одного механизма развития микроорганизмов в начальный период говорит и жесткая, строго воспроизводимая закономерность лаг-фазы на участке кривой при $24 < t < 51$ мин и плавное, непрерывное, в рамках той же закономерности, вхождение ее в логарифмическую фазу (рис. 2, а, участок 3 кривой).

Анализ аналогичных участков кривой динамики развития свежeweделенных штаммов показал, что процесс растворения капли инокулята в питательной среде начинается значительно раньше, чем у музейных штаммов (рис. 2, б). Это можно объяснить тем, что в этом случае в процесс растаскивания капли инокулята включаются дополнительно еще два явления: 1 — неглубокая консервация клеток, большая их чувствительность к питательному раствору и, следовательно, более раннее возникновение механического движения бактерий; 2 — большая активность внутриклеточных процессов, формирующих равный отрицательный заряд на внешней поверхности мембраны, который формирует кулоновские силы отталкивания.

Циклический характер развития микроорганизмов в период $3 < t < 57$ мин (рис. 2, б, участок 2 кривой) свидетельствует о начале их активной жизнедеятельности, выражающейся в подборе эффективных механизмов потребления конкретной питательной среды. Наличие флуктуаций в этой фазе говорит о размножении бактерий по механизму синхронного деления [9]. Видимо, этот механизм является способом практической проверки его эффективности в обеспечении жизнедеятельности микроорганизмов в конкретных условиях. Если это так, то *St.aureus*, находясь в ожоговой ране, испытывает комплекс негативных воздействий, включая и воздействие иммунной системы, и вынужден формировать механизмы потребления питательной среды, соответствующие этим воздействиям. Попадая в процессе исследования динамики развития микроорганизмов в питательный раствор, он по инерции поочередно запускает эти механизмы, например, на кривой (рис. 2, б) в лаг-фазе апробировано 4 механизма, что говорит о большей потенциальной способности свежeweделенных культур приспосабливаться к условиям внешней среды. Выбрав оптимальный механизм своего развития в заданных условиях, культура вступает в стадию логарифмического роста.

Описанные выше закономерности динамики развития музейных и свежeweделенных культур *St.aureus* прослеживаются и при изучении динамики развития других видов микроорганизмов: *St.epidermidis* (рис. 3), *E.coli* (рис. 4, а,б), *P.aeruginosa* (рис. 5, а,б).

Свежeweделенный штамм *St.epidermidis* (рис. 3) в отличие от свежeweделенного штамма *St.aureus* (рис. 2, б) имеет более длительную лаг-фазу (2 ч), на протяжении которой отмечается несколько синхронных делений, отличающихся между собой по длительности. Различная длительность син-

хронных делений свидетельствует об их различном характере, т.е. каждое синхронное деление — это принципиально новый адаптационный механизм. Большая длительность синхронных делений относительно *St.aureus* говорит о небольшом арсенале имеющихся адаптационных механизмов у *St.epidermidis*, что свидетельствует об узкоспецифической области обитания его в природе.

Действительно, согласно данным [10], *St.epidermidis* обитает в основном на коже и слизистых оболочках верхних дыхательных путей.

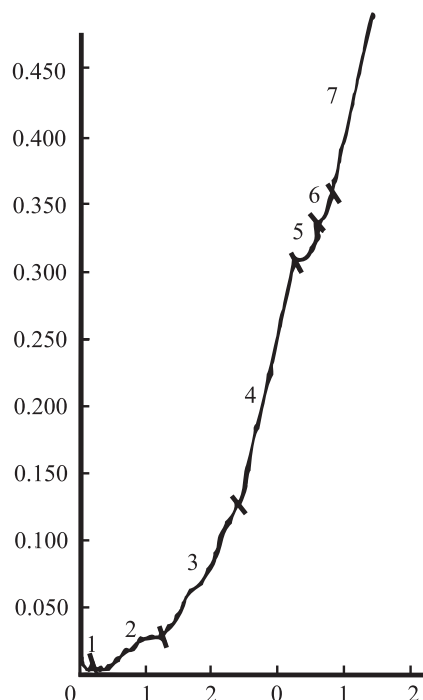


Рис. 3. Кривая динамики развития свежевыделенного штамма *S.epidermidis*. По оси абсцисс — время (в ч), по оси ординат — оптическая плотность (в усл. ед.)

Кроме того, более длительную лаг-фазу можно объяснить и тем, что *St.epidermidis* более инертен, медленнее адаптируется к условиям внешней среды, метаболически менее активен, чем *St.aureus*.

Что же касается *E.coli* как музейного (рис. 4, а), так и свежевыделенного (рис. 4 б) штаммов, то по параметрам динамики их развития в лаг-фазе можно сделать заключение о более высокой метаболической активности и адаптационных возможностях *E.coli*, чем *St.aureus*, что подтверждается традиционной биохимической характеристикой этих бактерий [11]. Об этом свидетельствует также более короткая лаг-фаза и у музейного, и у свежевыделенного штаммов *E.coli* (рис. 4, а, б, участок 2 кривой) относительно тех же штаммов *St.aureus*, на протяжении которой наблюдается значительно большее количество синхронных делений, т.е. адаптационных

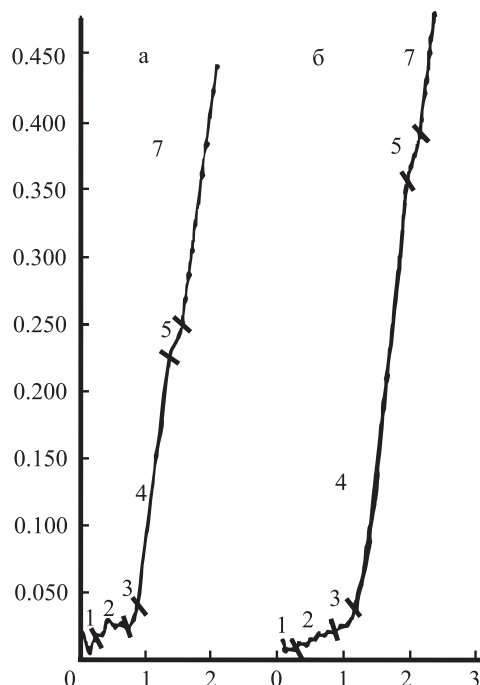


Рис. 4. Кривые динамики развития *E.coli*: а — лабораторного штамма, б — свежeweделенного штамма. По оси абсцисс — время (в ч), по оси ординат — оптическая плотность (в усл. ед.)

механизмов. Кроме того, несмотря на длительное культивирование в одних и тех же условиях (мясопептонный бульон), музейный штамм *E.coli* (рис. 4, а) сохраняет в своей "памяти" не один, как *St.aureus* (рис. 4, а), а несколько адаптационных механизмов.

Отличительной особенностью всех без исключения исследуемых культур является полное соответствие параметров участков логарифмического роста свежeweделенных и музейных штаммов внутри рода (рис. 2, а, б; 3; 4, а, б; 5, а, б, участки 4 кривых). Это можно объяснить тем, что у бактерий одного и того же рода эти участки формируются одними и теми же внутриклеточными механизмами. Эта идентичность механизмов развития может быть объяснена неизменностью во времени и пространстве типа энергии питательной среды, используемой на внутриклеточные процессы. Выполнение этого условия возможно, если предположить, что в ответ на воздействие внешней среды на основе первичных (фундаментальных) внутриклеточных процессов сформировалась разветвленная по определенным для каждого рода закономерностям сеть адаптационных механизмов, задачей которых и является преобразование энергии питательной (внешней) среды в форму, удобную для реализации ее в процессе метаболизма.

Анализ кривых динамики развития микроорганизмов на стадии логарифмического роста показывает, что и в этом случае наблюдается смена механизма их развития (рис. 2, а, б; 3; 4, а, б; 5, а, б, участки 5 кривых).

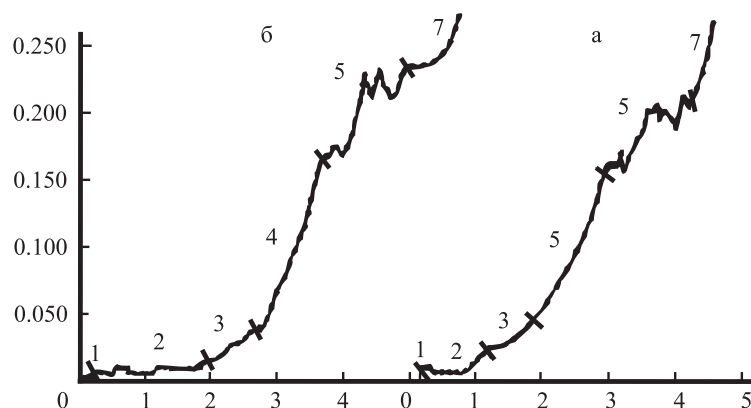


Рис. 5. Кривые динамики развития *P.aeruginosa*: а — лабораторного штамма, б — свежевыделенного штамма. По оси абсцисс — время (в ч), по оси ординат — оптическая плотность (в усл. ед.)

Однако причиной этой смены механизма является реакция не на воздействие внешней среды, а реакция на изменение условий внутри популяции, а именно уменьшение межклеточного расстояния до пределов критической величины [11]. Следовательно, на этих участках осуществляется выбор механизма развития, учитывающего дефицит окружающего пространства. Новый механизм развития (рис. 2–5, участки 7 кривых) существует до возникновения условия механического контакта между клетками и формирования механизмов консервации (коллапсирования) бактерий [11].

Обращает на себя внимание то, что в период смены механизма развития скорость размножения *St.aureus* уменьшается на значительно большую величину, чем скорость размножения *E.coli*, а *St.epidermidis* даже останавливается в своем развитии, что подтверждает сделанные ранее выводы о большей приспособительной способности *E.coli*. Наличие же двух адаптационных механизмов у *St.epidermidis* (рис. 3, участки 5 и 6 кривой) свидетельствует о структурных различиях *St.aureus* и *St.epidermidis* на стадии логарифмического роста. Поскольку в литературе подобных сведений не отмечено, то данный вывод позволяет поставить вопрос о необходимости изучения ультраструктуры бактерий на разных стадиях развития.

Таким образом, характер изменения кривой динамики развития микроорганизмов в лаг-фазе содержит в себе информацию об адаптационных механизмах и закономерностях их взаимодействия, приобретенных в процессе эволюции клетки, а в логарифмической фазе — о первичных фундаментальных внутриклеточных процессах, отличительной чертой которых является неизменность их свойств в процессе эволюции. Из этого следует, что параметры участка кривой логарифмического роста можно использовать в качестве критериев идентификации бактерий на уровне родовой и видовой принадлежности, а лаг-фазы — на уровне штаммовой принадлежности.

Литература

- [1] Методы общей бактериологии / Под ред. Ф.Герхардта. М.: Мир, 1983. С. 474.
- [2] Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О.Биргера. М.: Медицина, 1982. 462 с.
- [3] Колпакова С.Д., Колпакова Г.А. Разработка методики применения фотоэлектроколориметра в микробиологических исследованиях // Труды конф. "III международная школа-семинар". СПб., 2001. С. 108–111.
- [4] Колпакова С.Д., Колпаков А.И. Исследование влияния внешних биофизических факторов на воспроизводимость характеристик бактерий рода *Escherichia* // Вестник РАМН. 1994. №7. С. 49–52.
- [5] Колпакова С.Д. Дифференциальные уравнения закона Фика II рода в микробиологии. // Тезисы докл. Международного семинара "Дифференциальные уравнения и их приложения". Самара, 1996. С. 24.
- [6] Либерман Е.А. Биоэнергетика и протонно-электронные системы мембран // Биофизика. 1978. Т. 23. Вып. 1. С. 174–179.
- [7] Девятков Н.Д., Голант М.Б. Особенности частотно-зависимых биологических эффектов при воздействии электромагнитных излучений // Электронная техника. Электроника СВЧ. 1982. Сер. 1. Вып. 12 (348). С. 46–50.
- [8] Карбахш М., Перль Х. Мембранные процессы в медицине и биотехнологии (ст. из ФРГ) // Журн. Всесоюзн. хим. о-ва им. Д.И.Менделеева. 1987. Т. 32. №6. С. 669–673.
- [9] Колпакова С.Д., Колпаков А.И. Исследование особенностей механизма развития бактерий в лаг-фазе // Бюл. экспер. биол. и медицины. 1994. №3. С. 331–336.
- [10] Нейчев С. Клиническая микробиология. София, 1977. 317 с.
- [11] Колпакова С.Д. Биоэлектромагнитная модель механизма развития кишечной палочки // ЖЭМИ. 1995. №3. С. 70–74.

Поступила в редакцию 29/VII/2005;
в окончательном варианте — 29/VII/2005.

**INVESTIGATION OF DEVELOPMENT FEATURES
OF MUSEUM AND FRESH EXTRACTED
FROM AN ORGANISM SHTAMMES**

© 2005 S.D. Kolpackova, G.A. Kolpackova²

Development dynamics of museum and fresh extracted from an organism bacterium shtammes is studied in real-time mode. Distinction of development mechanisms of museum and fresh bacterial cultures in lag-phase is shown. This can be used as a criterion for their definition.

Paper received 29/*VII*/2005.

Paper accepted 29/*VII*/2005.

²Kolpackova Svetlana Dmitrievna, Kolpackova Galina Anatolievna, Dept. of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University, Samara, 443099, Russia.