

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА МИКРОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ В ОЦЕНКЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РАЗВИТИЯ ИХ ПОПУЛЯЦИЙ

**М. А. Сафонова*,
О. Ю. Кузнецов, доктор биологических наук**

ГБОУ ВПО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России,
153012, Россия, г. Иваново, просп. Ф. Энгельса, д. 8.

РЕЗЮМЕ Представлены данные о возможности использования микрокамер стационарного и проточного типа при микрокультивировании бактериальных клеток. Проанализированы формализованные показатели развития *Shigella flexneri* начальных поколений. Установлено, что оптимальным и интегральным показателем для оценки физиологического состояния и оценки адаптивного развития популяции является время генерации (τ) второго поколения клеток.

Ключевые слова: микрокультивирование, кворум-сенсинг, камеры стационарного и проточного типа, время генерации, *Shigella flexneri*.

* Ответственный за переписку (corresponding author): e-mail: smarina23@mail.ru

При изучении развития микроорганизмов на клеточном уровне используется метод микрокультивирования с помощью светового микроскопа в различных режимах наблюдения (фазово-контрастном, темного или светлого поля, поляризационного освещения и др.).

Данный метод подразумевает использование специальных микрокамер для прижизненного наблюдения за штаммами микроорганизмов, а сам процесс культивирования обычно происходит в стационарном и проточном режимах.

Метод микрокультивирования применяется преимущественно для изучения развития бактериальных культур. Объясняется это, скорее всего, свойствами бактериальных клеток как объекта исследования, а именно их быстрым ростом, что позволяет закончить эксперимент в течение одного дня. Однако в связи с малыми размерами наблюдаемых клеток, сложностями визуализации их морфологического состояния (возможного полиморфизма в процессе роста), а также

чрезвычайно широкой вариабельностью этапов жизненного цикла отдельных клеток популяции микрокультивирование как метод исследования все-таки не получило широкого распространения в микробиологии.

Существуют и другие сложности. К ним относятся, например, отсутствие общепринятых объективных критериев (показателей), способных при множестве дискретных изучаемых биологических объектов (клеток) данной популяции достаточно быстро охарактеризовать направленность протекания адаптивного процесса. Кроме того, крайне затруднительно изучение, например, кокковых бактериальных культур из-за образования ими кламповых (сцепленных) клеточных структур [3], образующих различные пространственно-ориентированные конгломераты.

Целью данного исследования является обоснование выбора наиболее адекватного и оптимального информативного показателя для характеристики начальных этапов развития бактериальных

IMPROVEMENT OF THE TECHNIQUE OF BACTERIA MICROCULTIVATION IN THE EVALUATION OF THEIR POPULATIONS DEVELOPMENT PECULIARITIES

Safonova M. A., Kuznetsov O. Yu.

ABSTRACT The information concerning the possibility of using of microchambers of stationary and flowing types while microcultivation of bacterial cells was presented. Formalized indices of the development of *Shigella flexneri* S-50 and *Shigella flexneri* Rd were studied. The length and the diameter at the beginning and at the end of cellular cycle were determined so as the time of the second generation production. It was stated that it was useful to take into account the production time for the first two generations as the mostly optimal and integral index for the evaluation of physiological status of bacterial population cells. Special attention should be paid to the adaptive behavior of the second generation cells which was reflected by the time of production.

Key words: microcultivation, quorum-sensing, chambers of stationary and flowing types, generation time, *Shigella flexneri*.

популяций в процессе микрокультивирования с использованием светового микроскопа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были использованы штаммы клеток *Shigella flexneri* S-50 и *Shigella flexneri* Rd с генетически детерминированным формированием липополисахарида клеточной стенки из международной коллекции Simmons. Культивирование клеток для изучения особенностей адаптивного поведения популяции на начальных этапах формирования микроколоний осуществляли в микрокамерах двух разновидностей: М. А. Пешкова [10] и стационарной камере диффузного типа (СКДТ) О. Ю. Кузнецова (Кузнецов О. Ю. Способ сборки стационарной камеры диффузного типа для культивирования микробов: отраслевое рац. предл. МЗ РСФСР № 0-2893, 1987), а также проточной камере О. Ю. Кузнецова [4].

В ходе приготовления камеры Пешкова к работе использовали питательную среду следующего состава: 1000 мл солевого раствора (NH_4Cl – 2,5 г, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 15,0 г, KH_2PO_4 – 6,2 г, $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г, H_2O – 1000 мл), 5 г дрожжевого экстракта Дифко, 10 г триптона Дифко, 10 г агара Дифко и жидкую среду аналогичного состава для стационарной камеры диффузного типа (камеры Кузнецова). Несинхронизированный бактериальный клеточный инокулят для помещения в микрокамеру брали из стационарной фазы развития популяции, выращенной на жидкой питательной среде указанного состава в течение 18 часов.

Для наблюдения и регистрации роста бактериальных клеток нами использована микрокиноустановка МКУ-1 (№ 6027, 30.08.1960 г., фирма «Ломо», г. Ленинград). Микрокамеру после сборки (подготовки к работе) помещали в термостолик микрокиноустановки МКУ-1 при температуре 37°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$). Цейтраферная микрокиносъемка продолжалась в течение 8 часов пленку «Микрат-300» с временной регистрацией 1 кадр в 10 минут в фазовом контрасте. Фотоотпечатки (24×30 см) получали на контрастной бумаге. На первом фотоотпечатке (начальном снимке в серии) всем клеткам в поле зрения присваивали порядковые номера, которые сохраняли и за клетками-потомками. Для каждой клетки в поле зрения определяли момент окончания клеточного цикла и рассчитывали индивидуальное время генерации (τ).

В ходе изучения развития бактерий в микрокамере исходно можно получить довольно мало первичной информации. Эта информация касается в первую очередь морфологии клеток – их длины и

диаметра в начале и конце клеточного цикла (L_0 , L_k ; d_0 , d_k), а также т конкретных клеток. На основе всех этих параметров рассчитываются также несколько формализованных информативных показателей, которые могут характеризовать свойства как отдельных клеток, так и бактериальной популяции в целом [6]:

- С – скорость роста, которая рассчитывается по формуле с учетом времени генерации клеток:

$$C = \frac{\lg L_k / L_0}{0,4343\tau},$$

где L_0 – начальная длина клетки; L_k – конечная длина клетки перед делением, τ – время генерации; 0,4343 – коэффициент пересчета \ln в \lg . Формула получена путем простых преобразований формулы экспоненциального роста бактериальной клетки.

- L_k / L_0 – соотношение длины клетки в конце и начале роста, характеризующее степень соответствия среды жизненным потребностям клетки. Палочковидную бактерию обычно представляют в виде цилиндра с гемисферическими полюсами, а ее площадь поверхности (мкм^2) и объем (мкм^3) рассчитывают по формулам: $S = 2\pi rL$; $V = \pi r^2(L - 2/3r)$, где L – длина бактерии, r – радиус, равный половине ее толщины; d_0 и d_k – начальный и конечный диаметр клетки.
- S_0 , S_k – начальная и конечная площадь поверхности клетки в цикле роста, характеризующая потенциальную возможность интенсивности роста.
- V_0 , V_k – начальный и конечный объем клетки в цикле роста, характеризующий индивидуальную биомассу клетки при условии неизменности роста.
- S_0/V_0 , S_k/V_k – отношение начальной и конечной площади поверхности клеток к ее объему. Характеризует возможную интенсивность жизнедеятельности.

Статистическую обработку данных проводили с использованием электронных таблиц Excel программного обеспечения офиса Microsoft 2010. Достоверность полученных данных оценивали по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки влияния конструктивных особенностей микрокамер на развитие и адаптивные процессы, происходящие с бактериальными клетками, был выполнен эксперимент со штаммом шигелл *S. flexneri* Rd, имеющим неполный липополисахарид оболочки. Наличие такой структуры липополисахарида определяет широкий разброс поведенческих реакций клеток бактериальной популяции, что неизбежно должно было отразиться на регистрируемых показателях. Полученные

с использованием стационарных и проточной микрокамер различной конструкции данные представлены в таблице 1.

Установлено, что во всех камерах стационарного типа наблюдаются достоверные различия всех исследованных показателей в наблюдавших поколениях клеток. Эти различия не совпадают по значениям и по тенденциям изменений, вследствие чего объяснить полученные данные не представляется возможным. Однако обнаружено, что наиболее совпадающим по значениям параметром является τ клеток второго поколения. Только в данном случае отличия полученных данных по критерию Стьюдента не выявлены. Именно это позволяет говорить о том, что процессы, характеризующие развитие популяции клеток во втором поколении, совпадают и поэтому показа-

тель τ является ведущим для оценки физиологического состояния.

Камера проточного типа (камера Кузнецова) характеризуется существенным отличием всех показателей исследованных поколений клеток (по сравнению с конструктивно схожей СКДТ Кузнецова), что свидетельствует об особых условиях роста клеток при повышенной реологии среды культивирования (см. табл. 1).

Из-за обнаружения столь различных данных, характеризующих развитие клеток *S. flexneri* Rd, мы сочли необходимым проверить вероятность повторения результатов для показателя τ на штамме *S. flexneri* S-50. Клетки этого штамма обладают полноценным липополисахаридом клеточной стенки, что может дать однотипную реакцию кле-

Таблица 1. Морфофункциональные показатели клеток *Shigella flexneri* Rd в микроскопических камерах различной конструкции, $M \pm m$

Показатель	Поко- ления клеток	Камера Пешкова ($N_1 = 43$, $N_2 = 70$)	Стационарная камера диффузного типа (камера Кузнецова) ($N_1 = 56$, $N_2 = 104$)	p_1	Проточная камера Кузнецова ($N_1 = 62$; $N_2 = 82$)	p_2
L_0 , мкм	I	$2,04 \pm 0,05$	$2,62 \pm 0,08$	$p < 0,001$	$1,98 \pm 0,06$	$p < 0,001$
	II	$2,22 \pm 0,08$	$2,04 \pm 0,04$	$p < 0,05$	$2,18 \pm 0,04$	$p < 0,01$
L_k , мкм	I	$4,50 \pm 0,08$	$3,88 \pm 0,08$	$p < 0,001$	$3,86 \pm 0,11$	$p < 0,05$
	II	$3,46 \pm 0,09$	$3,72 \pm 0,06$	$p < 0,01$	$4,75 \pm 0,49$	$p < 0,05$
d_0 , мкм	I	$1,04 \pm 0,02$	$1,35 \pm 0,03$	$p < 0,001$	$0,99 \pm 0,02$	$p < 0,001$
	II	$1,19 \pm 0,04$	$1,06 \pm 0,04$	$p < 0,05$	$0,98 \pm 0,02$	$p < 0,05$
d_k , мкм	I	$1,52 \pm 0,03$	$1,38 \pm 0,03$	$p < 0,01$	$1,00 \pm 0,02$	$p < 0,001$
	II	$1,51 \pm 0,05$	$1,24 \pm 0,03$	$p < 0,001$	$1,07 \pm 0,1$	$p < 0,01$
L_k/L_0	I	$2,23 \pm 0,03$	$1,51 \pm 0,02$	$p < 0,001$	$2,07 \pm 0,04$	$p < 0,001$
	II	$1,58 \pm 0,02$	$1,86 \pm 0,02$	$p < 0,001$	$2,28 \pm 0,12$	$p < 0,01$
T , мин	I	221 ± 3	194 ± 5	$p < 0,001$	145 ± 7	$p < 0,001$
	II	132 ± 5	145 ± 6	—	95 ± 4	$p < 0,001$
$C \cdot 10^3$	I	$3,63 \pm 0,06$	$2,06 \pm 0,04$	$p < 0,001$	$4,64 \pm 0,10$	$p < 0,001$
	II	$3,53 \pm 0,11$	$4,26 \pm 0,07$	$p < 0,001$	$7,45 \pm 0,06$	$p < 0,001$
S_0 , мкм ²	I	$6,52 \pm 0,09$	$12,08 \pm 0,21$	$p < 0,001$	$6,07 \pm 0,12$	$p < 0,001$
	II	$8,58 \pm 0,24$	$7,07 \pm 0,12$	$p < 0,001$	$6,71 \pm 0,08$	$p < 0,01$
S_k , мкм ²	I	$21,64 \pm 0,70$	$18,38 \pm 0,28$	$p < 0,001$	$12,30 \pm 0,53$	$p < 0,001$
	II	$16,66 \pm 0,89$	$15,74 \pm 0,51$	$p < 0,01$	$13,14 \pm 0,14$	$p < 0,001$
V_0 , мкм ³	I	$1,40 \pm 0,07$	$3,54 \pm 0,09$	$p < 0,001$	$1,27 \pm 0,09$	$p < 0,001$
	II	$2,22 \pm 0,21$	$1,60 \pm 0,11$	$p < 0,01$	$1,45 \pm 0,03$	$p < 0,01$
V_k , мкм ³	I	$7,41 \pm 0,36$	$2,22 \pm 0,02$	$p < 0,001$	$2,88 \pm 0,19$	$p < 0,01$
	II	$5,45 \pm 0,50$	$4,58 \pm 0,27$	$p < 0,01$	$3,02 \pm 0,05$	$p < 0,001$
S_0/V_0	I	$4,80 \pm 0,08$	$3,48 \pm 0,03$	$p < 0,001$	$5,10 \pm 0,09$	$p < 0,001$
	II	$4,23 \pm 0,15$	$4,61 \pm 0,12$	$p < 0,05$	$4,92 \pm 0,03$	$p < 0,01$
S_k/V_k	I	$2,29 \pm 0,05$	$8,24 \pm 0,08$	$p < 0,001$	$4,54 \pm 0,10$	$p < 0,001$
	II	$3,23 \pm 0,10$	$3,53 \pm 0,09$	$p < 0,01$	$4,52 \pm 0,05$	$p < 0,001$

Примечание. Статистическая значимость различий: p_1 – между результатами в камере Пешкова и стационарной камере диффузного типа Кузнецова, p_2 – между результатами в стационарной камере диффузного типа Кузнецова и проточной камере.

ток в сходных условиях культивирования при использовании стационарных микрокамер.

Исследование штамма *S. flexneri* S-50 показало (табл. 2), что средние значения τ клеток I поколения в стационарной камере Пешкова и в СКДТ Кузнецова значительно отличаются – 205 ± 3 и 259 ± 6 мин соответственно ($p < 0,001$). Напротив, τ клеток II поколения в использованных камерах практически совпадают (110 ± 3 и 119 ± 3 мин соответственно, различия недостоверны).

Значительную разницу τ клеток I поколения *S. flexneri* S-50 в стационарных микрокамерах различной конструкции можно объяснить тем, что в камере Пешкова клетки уже включились в активный рост до начала регистрации процесса. Это происходит вследствие того, что приготовление (сборка) камеры к работе предполагает внесение клеточного инокулята на поверхность полноценной питательной среды на длительное время.

Увеличение τ клеток I поколения в камере Кузнецова возможно объяснить также некоторыми особенностями диффузионных процессов, вызванных предварительным размещением засеваемых клеток инокулята на диск «голодного агара», что вызвало вероятный сбой и некоторую задержку по времени в прохождении клеточного цикла, либо привнесением вместе с клетками 18-часового инокулята аутоингибиторов, принимающих участие в «кворумсенсинге» [9] на стационарной фазе развития микробной популяции.

Разница во времени генерации клеток II поколения в микрокамерах стационарного типа практически отсутствует при одинаковых значениях ошибки средней. Это может свидетельствовать о том, что процессы, в которых участвуют клетки популяции *S. flexneri* S-50 II поколения, в камерах различной конструкции полностью идентичны. Наличие некоторой разницы (в 9 минут) по средним значениям τ для использованных типов микрокамер можно считать несущественным, так как временной промежуток между отдельными снимками при регистрации процесса составляет 10 минут.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обычно использование микрокамер ограничивается получением разовых снимков развития бактериальных клеток от одиночных клеток до состояния микроколоний. Лишь в некоторых работах [1, 7, 11] представлена количественная оценка морфофункционального состояния бактериальных клеток в процессе микрокультивирования. До настоящего времени было предпринято мало практических попыток унифицировать научные подходы к исследованию начальных стадий развития бактериальных культур на популяционном уровне с использованием микрокамер – методы динамической векторной морфометрии [1] и сигмум-морфометрии [7]. Следует особо акцентировать, что оба метода являются очень трудоемкими, а одним из ведущих показателей, используемых для оценки физиологических процессов, происходящих с клетками, является время их генерации.

Для биологических процессов крайне важным является время жизни биологического объекта – клетки, ткани, совокупности клеток, которая в первом приближении может быть рассмотрена как примитивный целостный организм. Такой подход имеет право на существование, если не вдаваться в подробности, касающиеся регуляции взаимодействия клеток между собой, а также моментов регуляции жизнедеятельности всего организма. Существование сложных механизмов регуляции у бактерий при увеличении их количества до этапа формирования структур, сходных с тканевыми структурами многоклеточных организмов, считается сейчас уже доказанным фактом – дистанционное взаимодействие клеток [8], кворум-сенсинг [2].

Поиски зависимости морфологических характеристик и времени их формирования лишь подтверждают необходимость более пристально взглянуть на закономерности прохождения временных процессов в биологических объектах и в микробных популяциях в частности.

Неважно, по каким параметрам регистрации происходит измерение и оценка воздействия фактора на биологический объект – ведущим параметром

Таблица 2. Особенности развития клеток *Shigella flexneri* S-50 в микрокамерах стационарного типа, $M \pm m$

Показатель	Поколения клеток	Камера Пешкова ($N_1 = 56$, $N_2 = 106$)	Стационарная камера диффузного типа Кузнецова ($N_1 = 57$, $N_2 = 117$)
Время генерации клеток τ , мин	I	205 ± 3	$110 \pm 3^*$
	II	110 ± 3	119 ± 4

Примечание. Статистическая значимость различий между результатами, полученными в камере Пешкова и стационарной камере диффузного типа Кузнецова, $p < 0,001$.

ром, являющимся окончательно существенным, на наш взгляд, является время протекания (прохождения) биологических процессов.

Ускорение данного процесса может быть расценено как показатель наиболее оптимальных условий в данный период физического времени, а замедление (вплоть до перехода в состояние покоя) – как показатель неблагоприятного воздействия. В этом случае физическое конвенционное понятие времени приобретает смысл физиологического показателя, способного довольно объективно отражать процесс адаптации клеток к среде обитания.

Зарегистрировать это в условиях микрокультивирования достаточно трудно, но возможно. И в этом случае нет необходимости отслеживать для клеток популяции их линейные размерные характеристики роста (длину, диаметр), поскольку время генерации интегрально отражает всю сумму биологических процессов, происходящих в популяции клеток. В данном случае существенное значение на популяционном уровне приобретает суммарное усредненное время генерации. Оно позволяет определить вектор направленности

адаптивного процесса в популяции клеток – ускорение или замедление биологического времени.

ВЫВОДЫ

1. При микрокультивировании для оценки физиологического состояния бактериальных популяций целесообразно учитывать время генерации первых двух поколений клеток как наиболее оптимальный интегральный показатель.
2. Оценку физиологического состояния клеток и клеточных популяций в микрокамерах следует проводить, регистрируя и особо акцентируя внимание на адаптивном поведении клеток второго поколения, которое отражается в одном показателе – времени генерации.
3. Адаптивное поведение *Shigella flexneri* на ранних стадиях развития не зависит от конструктивных особенностей стационарных камер, в которых осуществляется их культивирование.
4. Обнаружено, что условия проточного микрокультивирования бактериальных клеток являются уникальными вследствие повышенной реологии среды культивирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воскун С. Е., Смирнов С. Г. Структура популяции *Shigella flexneri* в процессе формирования микроколоний // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1984. – № 6. – С. 29–31.
2. Грузина В. Д. Коммуникативные сигналы бактерий // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – № 48 (10). – С. 32–39.
3. Иванов В. Н., Угодчиков Г. А. Клеточный цикл микроорганизмов и гетерогенность их популяций. – Киев : Наукова думка, 1984. – С. 280.
4. Камера для проточного культивирования микроорганизмов и клеток тканей : а. с. 1339123 СССР / О. Ю. Кузнецов. – № 3954951/31-13 ; заявл. 16.09.86; опубл. 23.09.1987. Бюл. № 35. – 3 с.
5. Кузнецов О.Ю. Способ сборки стационарной камеры диффузного типа для культивирования микроорганизмов : отраслевое рац. предл. МЗ РСФСР № 0-2893, 1987.
6. Кузнецов О. Ю. Выбор информативных показателей для характеристики адаптивного процесса в популяции палочковидных бактерий // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2004. – № 6. – С. 13–18.
7. Кузнецов О. Ю. Колонизационная активность популяций прокариотов и микроскопических эукариотов : автореф. ... дис. д-ра биол. наук. – М., 2005.
8. Николаев Ю. А. Дистантные информационные взаимодействия у бактерий // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 5. – С. 597–605.
9. Олескин А. В. Биосоциальность одноклеточных (на материале исследований прокариот) // Журн. общей биологии. – 2009. – Т. 70, № 3. – С. 225–238.
10. Пешков М. А. Цитология бактерий. – М. : Изд-во АН СССР, 1955.
11. Bacterial growth and motility in sub-micron constrictions / J. Mannik [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2009. – Vol. 106, № 35. – P. 14861–14866.