

Л. А. САЗОНОВА, И. Ш. ВАЙСМАН

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКОЛОГО-ПОПУЛЯЦИОННЫХ ОТНОШЕНИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КУЛЬТУРАХ БАКТЕРИЙ

(Представлено академиком С. С. Шварцем 5 VI 1972)

Важнейшими характеристиками популяций, как динамических саморегулирующихся многоуровневых систем, являются их численность и механизмы ее регуляции. Исходя из этого, было разработано представление об особом виде метаболитов, которые вырабатываются или активируются и начинают действовать в качестве ингибиторов, когда число особей превышает уровень, обеспечивающий сохранение видовой популяции, служа сигналом к прекращению роста ее численности. В этом принципиальное отличие этих веществ от продуктов жизнедеятельности, обычно вырабатываемых особями на соответствующих стадиях развития популяций вообще^(10, 11). Эта концепция вносит конкретное содержание в понятие «популяционное давление»^(1, 6), которое определяет в биотопе пределы фактического числа особей, более или менее значительно отстающего от того, которое может вместить соответствующее жизненное пространство.

За последние годы развитие генетики, учения о популяционной изменчивости микроорганизмов привело к господству аналитического подхода при изучении микробных популяций: поиск информации идет главным образом по направлению исследования свойств и поведения определенных мутантов или носителей генетических маркеров и их потомства. Теоретическое значение данных в отношении целого ряда бактерий, грибов, водорослей, полученных при этом, трудно переоценить^(1, 2, 4, 12). Тем не менее закрепленный в эволюции способ существования бактерий в виде множеств — культур, колоний, ассоциаций — отнюдь не тождественных простой арифметической сумме особей, устанавливает соответствующий предел информативности работ этого направления.

По предложению С. С. Шварца нами проведено исследование, в основу которого был положен синтетический подход — изучение поведения в целом культур микроорганизмов, которые принимаются в качестве генетически более или менее однородных видовых микробных популяций. На уровне биологической организации такой подход представляется адекватным для характеристики действия сигнала к прекращению роста численности по отношению к популяциям гомологичных, а также гетерогенных видов, с одной стороны, и условий, способствующих реализации действия этого сигнала, с другой.

В качестве объектов исследования были избраны изучаемые в нашей лаборатории «производственные» штаммы А-79 и А-227 *Clostridium oedematiens* и ВР6К *Cl. perfringens* типа А.

При всех манипуляциях стремились обеспечить возможное единообразие методических приемов. Выдержку сред при повторных проверках на стерильность и выращивание культур проводили в анаэробе при +37° и остаточном давлении ~10 мм. Через определенные промежутки времени из развивающихся культур брали пробы, в которых прямым счетом в камере Горяева при помощи микроскопа МБИ-3, снабженного фазово-контрастным устройством КФ-4, учитывали количество жизнеспособных клеток; при засевах число микробных тел, вносимых в среду, учитывали та-

ким же способом; на потенциометре ЛПУ-01 последовательно определяли значения рН среды. Из тех же проб готовили препараты для фазово-контрастной микроскопии по видоизмененной методике М. А. Пешкова⁽⁸⁾, мазки для фиксации и окраски. Выборочно проводили анализ свободных аминокислот в среде методом восходящей хроматографии на бумаге и готовили препараты для электронной микроскопии. Всего исследованы 474 пробы. Численные результаты обрабатывали статистически.

Маточные культуры *Cl. oedematiens* А-79 трижды пассировали на среде Китт — Тароцци, после чего засеивали в матрицы, содержащие по 500 мл жидкой среды, изготовленной по стандартной прописи на основе смеси пепсинного и панкреатического гидролизатов казеина. Эти культуры выращивали до достижения фазы гибели, когда число живых бактериальных клеток снижалось в среднем на 11,85–49,92% по сравнению с предыдущей пробой. После выдерживания при -8° , -4° в течение 2–4 час. среду с культурой пропускали под давлением через фильтры Зейтца с двумя асбестовыми пластинами и по 200,0 мл принимали в колбы (далее обозначается как фильтрат). Стерилизующая фильтрация среды с культурой в фазе гибели позволяла считать, что (а) факторы, действующие в качестве сигнала к прекращению роста численности, к тому времени в ней уже отсутствуют, (б) если они не корпускулярной природы, то должны перейти в фильтрат и (в) фильтрат будет свободен от бактериальных клеток исходной культуры, воспринимающих сигнал к прекращению роста численности.

Пассированные также тоекратно маточные культуры *Cl. oedematiens* А-79 и А-277, а также *Cl. perfringens* ВР6К засеивали в матрицы с казеиновой средой по 500 мл с таким расчетом, чтобы наступление логарифмической фазы размножения совпадало с окончанием срока проверки фильтрата на стерильность (24–48 час.).

По достижении логарифмической фазы, когда концентрация жизнеспособных бактериальных клеток возрастала в пределах 23,38–81,19% по сравнению с предыдущей пробой, бактерии из этих культур вносили в колбы с фильтратом и одновременно в равных, строго учтенных дозах — в колбы с таким же количеством (200,0 мл) свежей среды, служившие контролем. Те и другие помещали в анаэробстат. Пробы опытных и контрольных культур, взятые после начала их размножения, исследовали в указанном выше порядке. По данной схеме с внесением в фильтрат бактерий гетерогенного вида *Cl. perfringens* ВР6К и бактерий гомологичного вида, но гетерогенного штамма *Cl. oedematiens* А-277 проведено по 2, а с гомологичным видом *Cl. oedematiens* гомологичного штамма А-79 — 7 серий опытов. При сопоставлениях повсюду принимается во внимание концентрация бактериальных клеток при посеве, а также серия изготовления среды, в которую они были внесены; так как в работе были среды двух производственных серий, повсюду в графиках представлены парные системы показателей.

Анализ экспериментальных данных показывает, что динамика численности, ее максимум и кратность увеличения по отношению к исходной у популяций гетерогенного вида *Cl. perfringens* ВР6К существенно не различаются при их развитии на фильтрате и в контроле (рис. 1А). В опытах с гетерогенным штаммом того же вида *Cl. oedematiens* А-277 максимальная численность на высоте размножения культуры и, соответственно, кратность увеличения исходной численности особей в популяции при развитии на фильтрате в среднем более чем в 3 раза меньше, чем при развитии в контроле (рис. 1Б).

В культурах *Cl. oedematiens* А-79 на фильтрате при прочих равных условиях максимальная численность особей в популяциях и кратность увеличения исходной численности до 15 раз меньше, чем в контроле (рис. 1В). При этом, поскольку исходная численность была в пределах от 1,5 до 4,35 млн микробных тел в 1 мл, оказалось, что при развитии в филь-

рате между исходной и максимальной (на высоте размножения бактерий) численностью особей популяции выявляется сильная обратная связь с коэффициентом корреляции $r_1 = -0,786$, достоверная с вероятностью $p_1 = 0,95$; между исходной численностью особей и кратностью ее максимального увеличения $r_2 = -0,885$ при $p_2 > 0,95$. В контроле выявлены аналогичные отношения, которые выражены значениями коэффициентов $r_1 = -0,778$ при $p_1 = 0,95$ и $r_2 = -0,95$ при $p_2 > 0,95$.

По сравнению с контролем при развитии культур на фильтрате отмечается удлинение лаг-фазы и первоначальное замедление темпов размножения особей, менее значительное в популяциях гетерогенного вида и достаточно резко выраженное в популяциях гомологичного вида и штамма. В отдельных случаях задержка роста достигает у последних 40 час. и более.

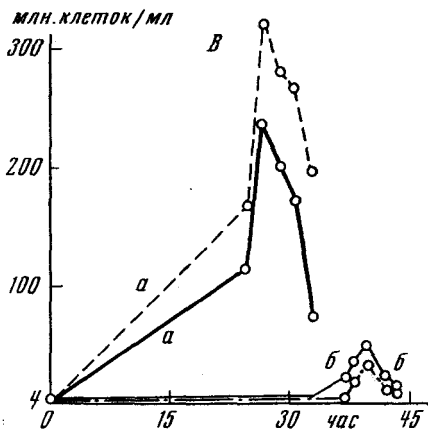
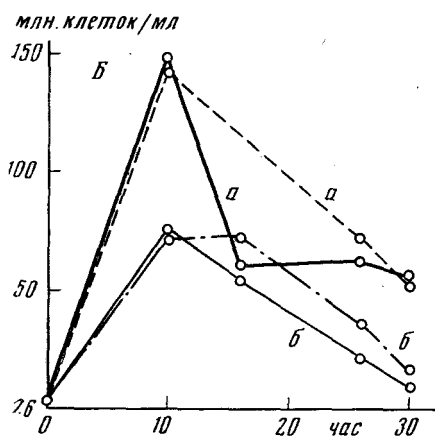
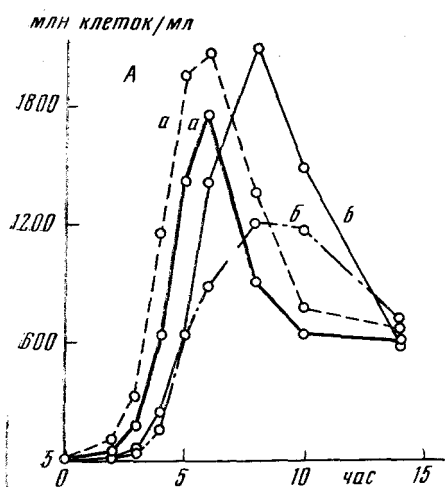


Рис. 1. Графики динамики численности популяций при развитии на фильтрате. а — контроль, б — опыт. Парные кривые относятся к двум сериям опытов

Популяция		Кратность увеличения численности	
		в опыте	в контроле
А	<i>Cl. perfringens</i> BP6K	237—423	380—427
Б	<i>Cl. oedematiens</i> A-277	28—30	54—57
В	<i>Cl. oedematiens</i> A-79	8—11	56—74

В пределах данного сообщения описание совокупности метаболических процессов, происходящих при развитии изучаемых популяций на средах сложного состава, невозможно. При учете лишь одного показателя — динамики содержания в среде 15 свободных аминокислот — установлено, что после выращивания *Cl. oedematiens* A-79 на свежей среде до фазы гибели культуры в фильтрате, исследованном после выдержки для проверки на стерильность, отмечается увеличение, по сравнению со свежей средой количества всех учитываемых аминокислот, кроме треонина и аргинина. Развитие популяций *Cl. oedematiens* A-79 на свежей среде сопровождается снижением содержания лейцина, фенилаланина, треонина, глицина, серина и нарастанием валина, метионина, триптофана, аланина, глутаминовой и аспарагиновой кислот, лизина. При развитии популяций в филь-

трате отмечается увеличение содержания всех аминокислот, включая и те, которые при развитии на свежей среде убывали. Эти данные свидетельствуют о высокой метаболической активности изучаемых микроорганизмов⁽⁹⁾. Наличие указанных аминокислот свидетельствует о присутствии в среде к концу цикла развития культур достаточно значительных для них, как паратрофных некропаразитов, источников азота, углерода и энергетического субстрата, даже если не учитывать остальные питательные вещества, состав и количество которых пока не изучены.

Оптимальным для развития популяций *Cl. oedematiens* является pH среды 7,2–7,8. В ходе размножения культур эти значения обычно снижаются в среднем до 6,7. По сравнению с контролем в опытах на фильтрате кратность увеличения численности популяций, соответствующая максимуму их развития, была наименьшей при наиболее низких значениях pH.

Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что по-видимому, прекращение роста численности микробных популяций в фазе гибели соответствующих культур вызывается появлением в среде биологически активных метаболитов-ингибиторов некорпускулярной природы. Ингибиторы, сохраняющие активность в фильтрате, отличаются высокой специфичностью (максимальная эффективность по отношению к гомологичному штамму и виду, меньшая по отношению к гетерогенному штамму гомологичного вида и отсутствие активности в отношении гетерогенного вида); они оказывают временный бактериостатический и выраженный бактерицидный эффект на размножающиеся популяции; в анаэробных условиях, при температуре +37°, не разлагаются на протяжении до 48 час. и проявляют свое действие при относительно низких значениях pH среды.

При наблюдении в световом микроскопе большинство особей в популяциях гомологичного штамма *Cl. oedematiens* A-79, растущих на фильтрате, представлено цепочками бактерий. Для некоторой части их характерны морфологические особенности, свойственные реактивным инволютивным формам⁽⁵⁾ с неравномерными вздутиями тела, появлением участков вакуолярного типа, исчезновением ядерных структур, отчасти с явными признаками лизиса (рис. 2). Однако часть клеток типичной для данного вида морфологии проявляют, таким образом, устойчивость к действию ингибиторов, что, по-видимому, отражает способность популяции в целом приспособительно реагировать на изменения в среде обитания, сохраняя при этом свою генетическую структуру⁽³⁾. Спорообразования в наших опытах не наблюдалось (рис. 2 см. вклейку к стр. 1211).

Характеристика ингибиторов и конкретный механизм их действия должны быть исследованы особо. Судя по морфологическим данным, представляется вероятным, что под влиянием ингибиторов происходит нарушение взаимных связей единой системы регуляции согласованного синтеза предшественников и репликации ДНК бактериальной хромосомы, увеличения объема и роста микробного тела в длину с наступающим вслед за этим делением бактериальной клетки⁽¹³⁾.

Пермский научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток
Министерства здравоохранения СССР

Поступило
5 VI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Браун, Генетика бактерий, «Наука», 1968. ² Д. М. Гольдфарб, в кн. Общая генетика, «Наука», 1965. ³ Н. П. Дубинин, Я. Л. Глембоцкий, Генетика популяций и селекция, «Наука», 1965. ⁴ И. А. Захаров, К. В. Квитко, Генетика микроорганизмов, Л., 1967. ⁵ А. А. Имшенецкий, ДАН, 16, 2, 223 (1937). ⁶ Э. Майр, Зоологический вид и эволюция, М., 1968. ⁷ Е. Н. Мишустин, В. Т. Емцев, Микробиология, М., 1970. ⁸ М. А. Пешков, Цитология бактерий, Изд. АН СССР, 1955. ⁹ Е. Л. Рубан, Н. М. Вербина и др., Биосинтез аминокислот микроорганизмами, «Наука», 1968. ¹⁰ С. С. Шварц, Изв. АН СССР, сер. биол., № 4, 485 (1971). ¹¹ С. С. Шварц, О. А. Пястолова, Матер. отчетной сессии лаборатории популяционной экологии позвоночных животных, 4, Свердловск, 1971. ¹² W. Hayes, The Genetics of Bacteria and their Viruses, Oxford, 1964. ¹³ F. Jacob, A. Ryter, F. Cuzin, Proc. Roy. Soc., 164, 955, 267 (1966).