

УДК 576.8.093.3:576.8.095.6

МИКРОБИОЛОГИЯ

И. И. ГИТЕЛЬЗОН, А. М. ФИШ, Р. И. ЧУМАКОВА, А. М. КУЗНЕЦОВ

МАКСИМАЛЬНАЯ СКОРОСТЬ РАЗМНОЖЕНИЯ БАКТЕРИЙ И ВОЗМОЖНОСТЬ ЕЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

(Представлено академиком А. А. Имшенецким 10 IV 1973)

Исследование предельных скоростей роста бактерий, выявление внешних параметров, лимитирующих этот процесс и изучение внутриклеточной организации биосинтетического аппарата, определяющего генетически детерминированный предел скорости роста, представляет большой интерес. Бактерии являются наиболее быстрорастущими живыми существами, поэтому измерение предельной скорости роста у них является в то же время определением биологического предела скорости самоорганизации в живой природе вообще.

Трудность определения генетического предела скорости бактериального биосинтеза заключается в том, что в обычных условиях скорость роста бактерий лимитирована внешними параметрами, и бактерии адаптированы к этой пониженной скорости роста.

В широко применяемом классическом методе поддержания чистых культур (периодическом культивировании) наибольшая скорость роста наблюдается в логарифмической фазе. Однако продолжительность этой фазы в обычной периодической культуре ограничена несколькими генерациями, после которых изменения состава среды, вызванные метаболизмом бактерий, замедляют их скорость роста. Как отмечено в (1), условия среды в периодической культуре изменяются настолько быстро, что клетки не успевают к ним приспособливаться. Весьма вероятно, что времени, в течение которого клетки при периодическом культивировании находятся в логарифмической фазе роста, недостаточно для полной адаптации бактериальных клеток к среде, и поэтому генетически детерминированный предел скорости роста и размножения не может быть достигнут в условиях периодической культуры.

Непрерывное культивирование, в отличие от периодического, поддерживает неограниченно долго постоянство условий внешней среды. А один из двух широко распространенных способов ведения непрерывной культуры — турбидостатный — обладает основным преимуществом, позволяющим использовать этот способ для решения поставленной задачи — определения верхнего предела скорости роста. Это преимущество заключается в том, что решающая роль в управлении процессом культивирования при турбидостатном способе принадлежит самим микроорганизмам. Благодаря положительной обратной связи между размножающейся культурой и системой подачи свежей питательной среды, в течение длительного времени может поддерживаться нелимитированная скорость роста, которая зависит только от скорости синтетических процессов, протекающих в клетке при достатке всех компонентов питательной среды.

Объектом нашего исследования были светящиеся бактерии, выделенные из тропических вод Тихого океана и описанные как новый вид *Photobacterium Belozerskii* (2).

В экспериментах использовали установку для непрерывного культивирования светящихся бактерий (3). Большое внимание было уделено

скорости подачи свежей питательной среды и оттока бактериальной суспензии. Устройство для притока и оттока среды позволяло вести процесс со скоростью разбавления до $13\text{--}14\text{ час}^{-1}$, т. е. полностью заменять среду в культиваторе примерно за 4 мин.

Отличительной особенностью установки является то, что реактор в ней, как особая емкость, отсутствует. Его заменяет замкнутая система проточных кювет соответствующих датчиков, в которой происходит циркуляция бактериальной суспензии.

Культуральная жидкость последовательно проходит через датчики всех регистрируемых параметров (оптической плотности, концентрации

растворенного в суспензии бактерий кислорода, температуры, интенсивности свечения) системы термостабилизации, газообмена и поддержания постоянства концентрации биомассы.

Снабжение кислородом осуществляется путем барботирования через культуру воздуха или чистого кислорода со скоростью от 3 до 20 л/час, что полностью обеспечивает культуру кислородом при всех скоростях роста.

Культивирование проводили в стерильных условиях при оптимальной для скорости роста исследуемых бактерий температуре $28 \pm 0,1^\circ$.

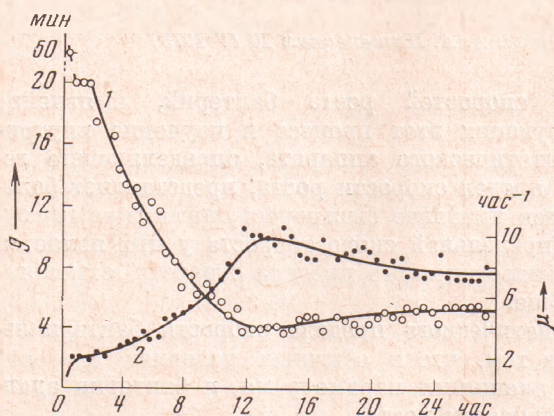


Рис. 1. Динамика изменения времени генерации (1) и удельной скорости роста (2) светящихся бактерий при непрерывном культивировании

Скорость роста в первые моменты непрерывного культивирования примерно такая же, как и в логарифмической фазе периодической культуры. Время генерации порядка 40 мин. Но очень скоро, если все условия оптимальны, время генерации начинает сокращаться и постепенно в течение многих генераций приближается к своим предельным значениям.

Динамика изменения удельной скорости роста $\mu = f(t)$ и, соответственно, времени генерации $g = f(t)$ при стабилизации всех внешних параметров представлена на рис. 1. Этот рисунок демонстрирует 28-часовой эксперимент. В первый момент время генерации было порядка 50 мин. Процесс увеличения скорости роста длился в данном эксперименте в течение 12 час. За это время через реактор прошло около 50 генераций бактерий. После 12-часового адаптационного периода установилось время генерации порядка 4—5 мин. Эта колоссальная скорость роста поддерживалась в течение 16 час., до прекращения эксперимента. Более 220 генераций прошло через реактор за это время. В логарифмической фазе периодической культуры такая скорость роста не наблюдается. Следует заметить, что возможное обрастание реактора может искажать расчеты скорости роста как в сторону завышения, так и в сторону уменьшения ее.

Достижение таких скоростей роста возможно только в случае снятия лимитов культивирования бактерий. Во-первых, это лимит по концентрации компонентов питательной среды и кислорода, во-вторых, это скорость доставки элементов к поверхности клетки. Но эти внешние лимиты тем или иным способом могут быть сняты, что и показано в экспериментах.

В отличие от них внутренний лимитирующий фактор — это скорость воспроизводства клеточных структур. Ее предел определяется внутриклеточными лимитами, информация о которых в настоящее время недостаточна и противоречива. Так, Уотсон (4) полагает, что предел времени генерации бактерий составляет 20 мин. Как видно из представленного

эксперимента, скорости роста могут быть значительно более высокими. Непрерывная культура, снимая внешние лимиты, может послужить тем инструментом, который позволит определить скорости репродукции элементов клетки и подойти к исследованию внутриклеточных механизмов, лимитирующих эту скорость.

Показанный разрыв между обычно проявляющейся и потенциальной скоростями роста, очевидно, не является специфическим свойством исследованного вида бактерий. Вероятно, он характерен для многих одноклеточных. Так, Паркер ⁽⁵⁾ сообщает, что для бактерий *Streptococcus salivarius* при непрерывном культивировании получено время генерации порядка 8 мин.

Возникает вопрос: какой биологический смысл может иметь потенциальная способность бактериальных клеток к столь высоким скоростям роста, если обычно используется лишь малая часть этого потенциала?

Можно полагать, что резерв скорости биосинтеза является эффективным средством экологического давления вида, так как он позволяет пассивно адаптирующимся к среде одноклеточным организмам осваивать ресурсы среды с максимальной скоростью, когда случайным образом складываются благоприятные условия и давящее действие внешнего лимитирования временно ослабевает. Очевидно, значение этого преимущества достаточно для того, чтобы в генетически запрограммированной норме реакций вида сохранялся потенциал скорости роста, многократно превышающий ее обычные значения. Сигналом, приводящим в действие этот потенциал, является длительное — в течение многих генераций — пребывание клеток в нелимитирующих условиях среды.

Институт физики им. Л. В. Киренского
Сибирского отделения Академии наук СССР
Красноярск

Поступило
10 IV 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. Д. Иерусалимский, В сборн. Биохимия микробов, Горький, 1964, стр. 22. ² Р. И. Чумакова, Б. Ф. Ванюшин и др., Микробиология, 41, в. 4, 613 (1972). ³ И. И. Гительзон, А. М. Фиш, Р. И. Чумакова, Микробиология, 34, в. 6, 1086 (1965). ⁴ Дж. Уотсон, Молекулярная биология гена, М., 1967. ⁵ R. B. Parker, Biotechnol. Bioeng., 8, 4, 473 (1966).