

Fraktalni rast soja *Pseudomonas* sp. na podlogama sa različitim koncentracijama glukoze i prostornim rasporedima kolonija

Ispitivan je rast soja *Pseudomonas* sp. u uslovima gladovanja. Soj je kultivisan na čvrstim hranljivim podlogama u prisustvu različitih koncentracija glukoze kao jedinog nutrijenta, kao i u prisustvu jedne, odnosno dve susedne kolonije. Da bi se kvantifikovala razuđenost kolonija praćena je promena njihove fraktalne dimenzije tokom vremena. Prisustvo susednih kolonija je znatno uticalo na formiranje fraktalnog morfotipa. Njihov uticaj je bio izraženiji u ekstremnijim uslovima gladovanja, gde je sa povećanjem broja inokulisanih kolonija rasla njihova razuđenost. Kolonije različitih prostornih rasporeda su za približno iste vrednosti fraktalne dimenzije zauzele različitu površinu. Tako je u postavci sa jednom kolonijom došlo do osvajanja najveće površine, a u postavci sa većim brojem kolonija osvojena površina je manja. Povećanje koncentracije glukoze je dovelo do povećanja fraktalne dimenzije kolonija, kao i do povećanja njihove površine.

Uvod

Bakterije na površini čvrste hranljive podloge formiraju agregacije ćelija – bakterijske kolonije (Jemcev i Đukić 2000). Deobom ćelija kolonija raste i dobija određeni oblik koji zavisi od faktora sredine u kojima se kolonija razvija. Jedan od značajnih faktora je koncentracija nutrijenata u podlozi. U uslovima dobre snabdevenosti nutrijentima rast kolonije omogućen je u svim pravcima, pa ona dobija kružan oblik (Kievit 2009). U uslovima gladovanja rast kolonije je

ograničen samo na one pravce u kojima ima dostupnih nutrijenata, što dovodi do intenzivnijeg rasta pojedinih delova kolonije i formiranja ispućenja na njoj. Dalji rast kolonije odvija se grananjem ovih ispućenja na nova, gde je svako ispućenje sličnog oblika kao kolonija u celini (Ben-Jacob 1993). Ovakav oblik kolonije ima izgled fraktala, geometrijske strukture čiji su delovi u određenoj meri umanjene kopije celine. Za kvantifikovanje razuđenosti kolonije može se koristiti fraktalna dimenzija. Ona opisuje u kojoj meri određen fraktalni oblik ispunjava prostor u kome se nalazi (Fereydoon i Viscek 1991).

Poređenjem fraktalnih dimenzija bakterijskih kolonija koje su kultivisane u različitim uslovima sredine može se ispitati kako ti uslovi utiču na formiranje fraktalnog morfotipa kod nekog bakterijskog soja (Ben-Jacob 1993). Uslovi sredine koji bi mogli uticati na formiranje i razuđenost fraktalnog morfotipa su koncentracija nutrijenata u podlozi, kao i prisustvom drugih kolonija u okolini, pošto susedne kolonije međusobno interaguju u kompeticiji za prostor i nutrijente (Ben-Jacob *et al.* 1994).

U našem straživanju fraktalni rast soja *Pseudomonas* sp. razmatran je praćenjem vremenske promene fraktalne dimenzije i površine kolonija ovog soja. Na ovaj način je ispitano kako koncentracije glukoze u podlozi, kao i prisustvo susednih kolonija, utiču na grananje i razuđenost morfotipa. Pretpostavljeno je da će u ekstremnijim uslovima gladovanja patern kolonije biti razuđeniji, kao i da će prisustvo susednih kolonija, usled bakterijske kompeticije za prostor i hranu, dovesti do razvoja paternna veće razuđenosti.

Iva Atanasković (1993), Beograd, Kneza Miloša 64, učenica 3. razreda gimnazije „Sveti Sava” u Beogradu

Marjan Biočanin (1991), Beograd, Ilije Stojadinovića 8, student I godine Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

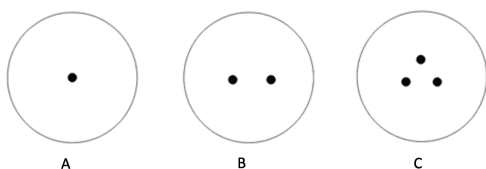
MENTORI:

Saša Šviković, student II godine Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Vladimir Jovanović, istraživač saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Beograd

Materijal i metode

Fraktalni rast soja *Pseudomonas* sp. praćen je njegovom kultivacijom na čvrstoj hranljivoj podlozi koja je sadržala glukozu kao jedini izvor energije. Formirana su tri prostorna rasporeda kolonija (slika 1) i za svaki raspored ispitane su tri različite koncentracije glukoze u podlozi (1, 2 i 4 mg/mL). Na osnovu fotografija kolonija načinjenih u različitim trenucima vremena određene su fraktalne dimenzija kolonija i njihove površine. Na ovaj način praćeno je kako koncentracija glukoze i prisustvo suseda utiču na rast i razuzdenost kolonija.



Slika 1. Prostorni raspored sa jednom (A), dve (B) i tri (C) kolonije; rastojanje između kolonija je po 1 cm.

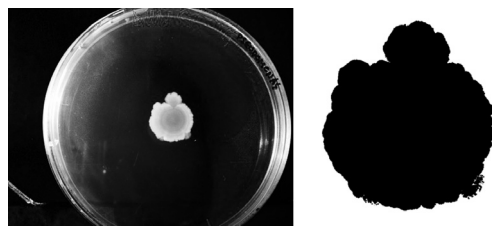
Figure 1. Spatial distribution with one (A), two (B) and three (C) colonies; distance between the colonies is 1 cm.

Kultivacija bakterijskog soja. U istraživanju je korišćen soj *Pseudomonas* sp. iz kolekcije Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Sposobnost soja da produkuje biosurfaktante ispitana je Drop collapse testom (Končarević 2009). Suspenzija korišćena za ovaj test dobijena je inkubacijom soja na 37°C (24 h) u tečnoj podlozi koja je kao jedini zvor ugljenika sadržala glukozu (20 g glukoze, 0.7 g KH_2PO_4 , 2 g Na_2HPO_4 , 0.4 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g NH_4NO_3 u 1000 mL destilovane H_2O ; Končarević 2009).

Za ispitivanje fraktalnog rasta vršena je kultivacija na sledećoj mineralnoj podlozi: 6 g Na_2HPO_4 , 3 g KH_2PO_4 , 0.5 g NaCl, 1 g NH_4Cl , 1 mL MgSO_4 , 1 mL CaCl_2 , 15 g agra u 1000 mL destilovane H_2O (Knežević-Vukčević i Simić 2009) kojoj je dodavano 1 mg/mL, 2 mg/mL i 4 mg/mL glukoze kao jedinog izvora ugljenika. Kultivacija je vršena na čvrstoj hranljivoj podlozi debljine 5 mm u Petrijevim kutijama dijametara 9 cm. Kao izvor inokuluma korišćena je

prekonoćna kultura inkubirana na 37°C (Knežević-Vukčević i Simić 2009). Zasejavanje bakterija vršeno je inokulacionom iglom, pri čemu su formirani prostorni rasporedi sa jednom, dve ili tri kolonije (slika 1). Nakon zasejavanja kolonije su inkubirane na sobnoj temperaturi ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) narednih 624 h.

Praćenje fraktalnog rasta. Petri kutije sa kolonijama fotografisane su nakon 24, 48, 72, 96, 144, 240, 624 časa. Fotografije su snimane na crnoj pozadini. Snimci su obrađivani u programu GIMP 2.6 (Kimball i Mattis 1997). Pri obradi fotografija korišćeni su sledeći parametri: desaturation (lightness), contrast (+15), sharpen (+24), unsharp mask (0.5; 0.5; 0), NL filter (0.62; 0.60), treshold (2; 255). Fotografije su svedene na rezoluciju od 512x512 piksela sa centrom u mestu zasejavanja kolonije. Na ovako obrađenim fotografijama bakterijske kolonije su predstavljene crnom bojom na beloj pozadini (slika 2).



Slika 2. Fotografija kolonije *Pseudomonas* sp. pre i nakon obrade.

Figure 2. Rough and processed photographs of *Pseudomonas* sp. colony

Dobijenim paternima određivana je fraktalna dimenzija, pri čemu je korišćena box counting aproksimacija (D_{BC}), računata po formuli (Obert 2009):

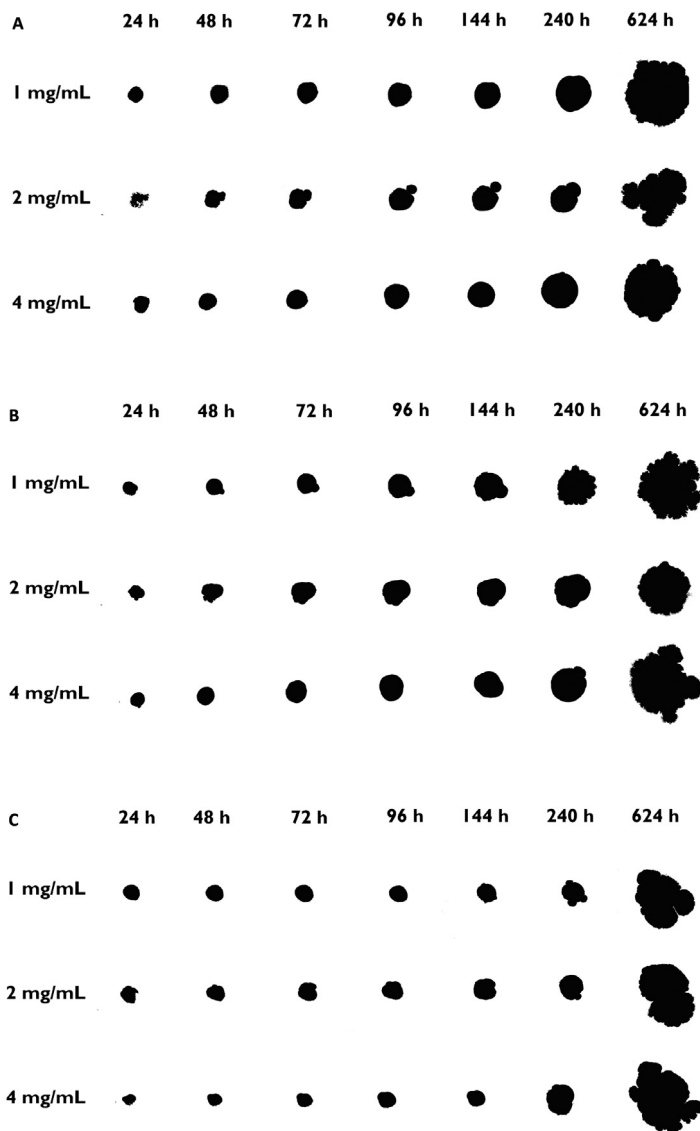
$$D_{BC} = \lim (\epsilon \rightarrow 0) (\log N(\epsilon) / \log \epsilon)$$

gde je ϵ dužina stranice kvadrata, a N broj kvadrata stranice ϵ koje kolonija zauzima. Izračunavanja su rađena programu Fractalyse 2.4 (Vuidel *et al.* 2006). U istom programu određen je i koeficijent korelacije funkcije zavisnosti $N(\epsilon)$ sa funkcijom fraktalnog zakona $N = \epsilon^{D_{bc}}$, kao mera usaglašenosti paternna kolonije sa fraktalnim zakonom. Za određivanje površine kolonija korišćen je program ImageJ 1.44p (Rasband 2011).

Rezultati i diskusija

Promena oblika kolonije sa vremenom prikazana je na slici 3, gde je uočljiv razvoj fraktalnog morfološkog tipa po Communicating Walkers modelu (Ben-Jacob *et al.* 1998; Shapiro 1998). Shodno ovom modelu u prvih 48-96 h inkubacionog perioda sve ćelije u koloniji su bile dovoljno snabdevene nutrijentima i svaka je imala sposobnost deobe. U ovakvim uslovima kretanje ćelija se odvijalo nasumično, verovatnoća rasta

kolonije bila je ista u svim pravcima, pa je stoga kolonija kružnog oblika (Fereydoon i Viscek 1991; Ben-Jacob *et al.* 1998). Nakon 96 h inkubacije dolazi do potrošnje glukoze u centru kolonije i javlja se razlika u njoj koncentraciji između perifernog i centralnog dela. Stoga u ovom periodu kolonija raste samo svojim perifernim delom. Usled daljeg sniženja koncentracije glukoze, verovatnoća rasta se dodatno sužava samo na najisturenije ćelije kolonije. Ove ćelije iskorišćavaju najviše nutrijenata, imaju najveću stopu deoba i na koloniji formiraju ispuččenja, koja

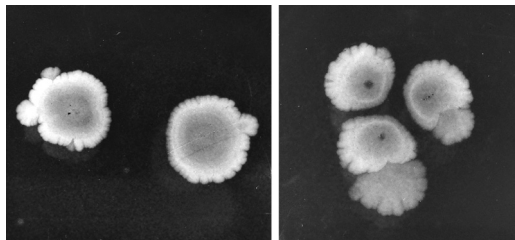


Slika 3.
Razvoj kolonija pri različitim koncentracijama glukoze; A je prostorni raspored sa jednom, B je sa dve, a C je raspored sa tri kolonije

Figure 3.
Colony development with different glucose concentrations; A is the spatial distribution with one, B is with two and C is with three colonies

su vidljiva nakon 144 h inkubacije. Nakon 240 h inkubacije dolazi do grananja ovih ispupčenja i kolonija dobija izgled fraktala.

Smer grananja kolonija određen je i prisustvom drugih kolonija (slika 4). U prostoru između kolonija došlo je do inhibicije njihovog grananja. To može biti posledica nedostatka nutrijenata u ovom prostoru, ali i posledica interakcije bakterijskih ćelija iz dve susedne kolonije, kao što je opisano i u nekim prethodnim istraživanjima (Shapiro 1998).

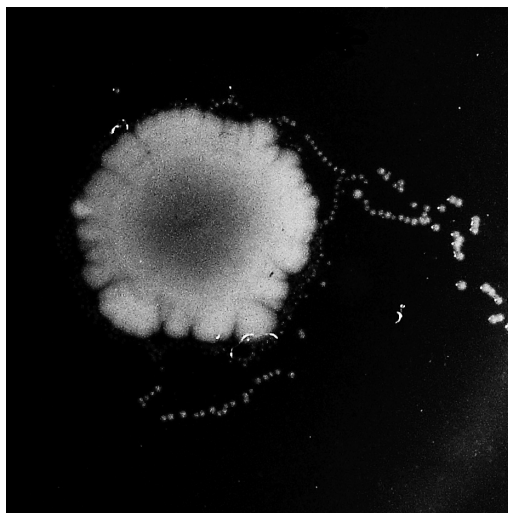


Slika 4. Inhibicija grananja u prostoru između kolonija

Figure 4. Branching inhibition in the space between colonies

U našem istraživanju uočljive su i dve biohemijske karakteristike soja *Pseudomonas* sp: sposobnost sinteze biosurfaktanata i pokretljivost. Sintaza biosurfaktanata pokazana je Drop Collapse testom, dok se pokretljivost ćelija ispoljila izdvajanjem manjih zasebnih kolonija oko centralne (slika 5). Ove karakteristike bile su neophodne za formiranje fraktalnog morfolitpa kod prethodno ispitivanih pripadnika roda *Pseudomonas* (Takahashi *et al.* 2008), pa pretpostavljamo da su i u našem slučaju bile preduslov za formiranje fraktalnog morfolitpa.

Grafikonima na slici 6 prikazana je zavisnost fraktalne dimenzije kolonija od njihovog prostornog rasporeda. U postavci sa najnižom koncentracijom glukoze (slika 6A) sa povećanjem broja inokulisanih kolonija opada njihova D_{BC} , odnosno oblik kolonije je razudeniiji. Tako najmanju D_{BC} ima prostorni raspored sa tri (slika 1C), a najveću prostorni raspored sa jednom kolonijom (slika 1A). Ovakav odnos fraktalnih dimenzija javlja se nakon 72 h inkubacije, i nepromenjen do kraja eksperimenta. Na slici 3 uočljivo je da nakon 72 h počinje i formiranje ispupčenja na periferiji kolonija, dok u periodu od 24 do 48 h kolonije rastu kružno, sve su sličnog oblika, pa

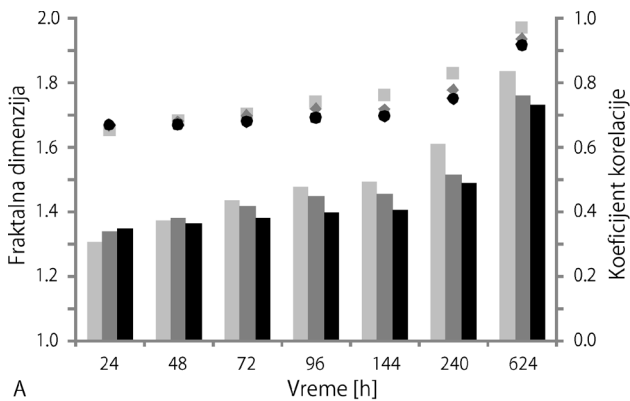


Slika 5. Izdvajanje manjih kolonija usled pokretljivosti ćelija

Figure 5. Development of smaller colonies induced by cell motility

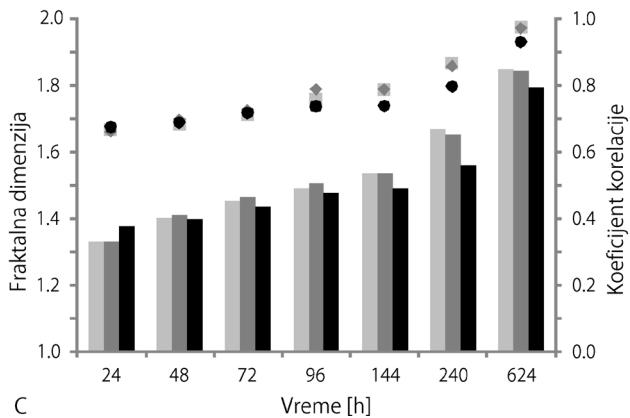
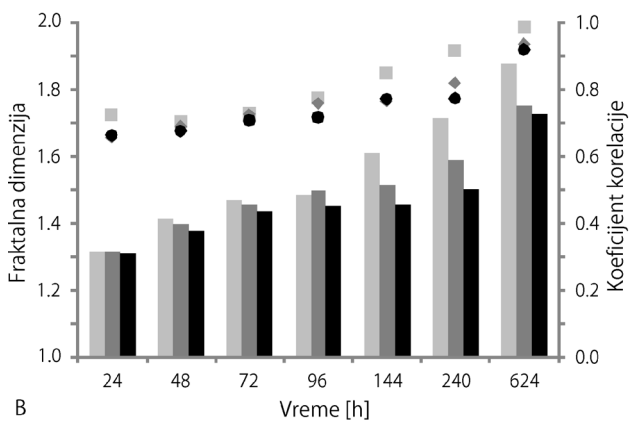
nema razlika u njihovim fraktalnim dimenzijama. Odnos fraktalnih dimenzija kolonija različitih prostornih rasporeda na podlozi sa 2 mg/mL glukoze prikazan je na slici 6B. I u ovoj postavci sa povećanjem broja zasejanih kolonija opada njihova fraktalna dimenzija, odnosno povećava se razudjenost. Stanje u kojem najmanju fraktalnu dimenziju ima raspored sa tri, a najveću sa jednom kolonijom uspostavlja se nakon 144 h inkubacije, odnosno kasnije nego na podlozi sa 1 mg/mL glukoze. U postavci sa najvišom koncentracijom glukoze (slika 6C) stanje u kojem prostorni raspored sa većim brojem kolonija ima manju fraktalnu dimenziju uspostavlja se najkasnije, nakon 240 h inkubacije. Ovakvo stanje se ne održava do kraja eksperimenta, jer u slučaju prostornih rasporeda sa jednom i dve kolonije fraktalne dimenzije teže izjednačavanju. Dakle, u ekstremnijim uslovima gladovanja izraženiji je uticaj prostornog rasporeda kolonija na njihovu razudjenost, dok se u uslovima bogatijim nutrijentima fraktalne dimenzije kolonija ujednačeniije.

Na slici 7 dat je uticaj koncentracije glukoze na fraktalnu dimenziju kolonija iz različitih prostornih rasporeda. Kod prostornog rasporeda sa jednom kolonijom (slika 7 A) najveća D_{BC} uočava se u postavci sa 2 mg/mL glukoze. U uslovima sa dve i tri kolonije



Slika 6.
 Uticaj prostornog rasporeda kolonija na fraktalnu dimenziju u uslovima sa 1 mg/mL (A), 2 mg/mL (B) i 4 mg/mL (C) glukoze

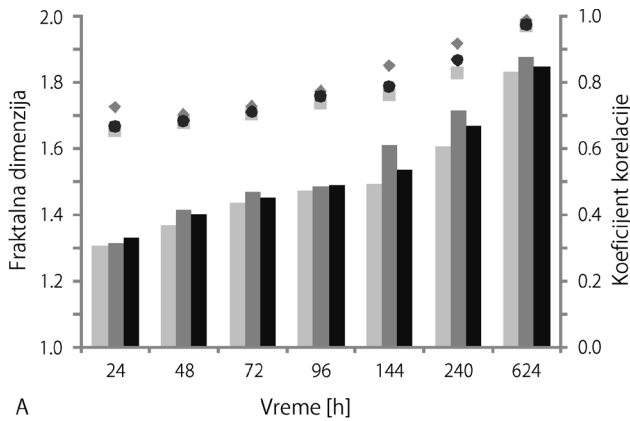
Figure 6.
 Effect of colonies spatial distribution on fractal dimension in conditions with 1 mg/mL (A), 2 mg/mL (B) and 4 mg/mL (C) of glucose



(slika 7B i 7C) veću razućenost imaju kolonije kultivisane u ekstremnijim uslovima gladovanja, odnosno u uslovima nižih koncentracije glukoze. Sledi da u uslovima sa većim brojem kolonija ekstremniji uslovi gladovanja dovode do veće razućenosti. Na kraju inkubacionog preioda došlo je do izjednačavanja

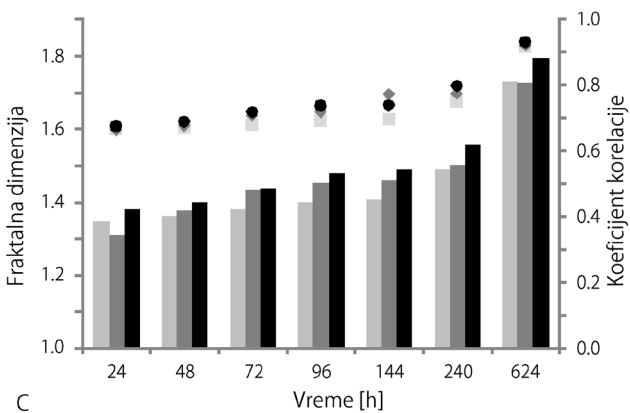
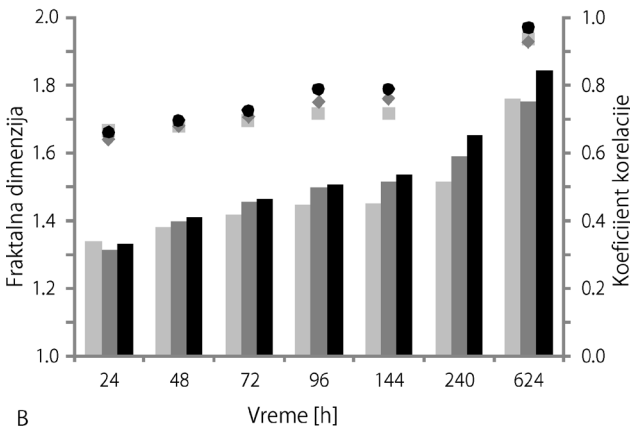
DBC kolonija kultivisanih pri 1 i 2 mg/mL glukoze u postavci sa dve (slika 7 B) i tri kolonije (slika 7 C).

Na slici 8 prikazana je veza između fraktalne dimenzije i površine kolonije. U postavci sa jednom kolonijom (slika 8A) povećanjem koncentracije glukoze sa 1 na 2 mg/mL dolazi do povećanja po-



Slika 7.
 Uticaj koncentracije glukoze na fraktalnu dimenziju u prostornom rasporedu sa jednom (A), dve (B) i tri (C) kolonije

Figure 7.
 Effect of glucose concentration on fractal dimension in conditions with one (A), two (B) or three (C) colonies

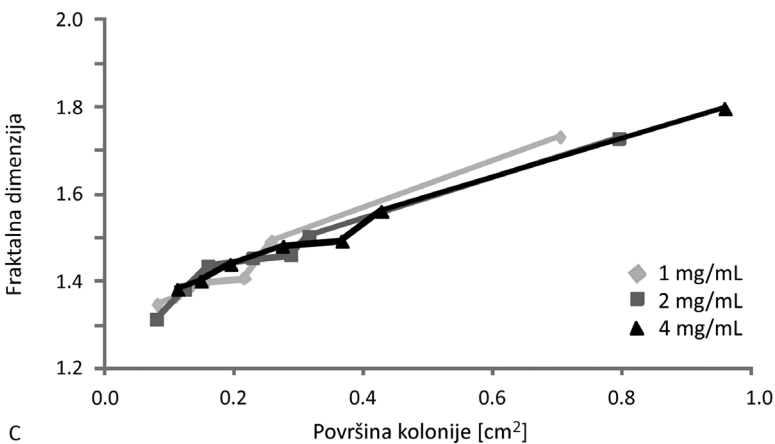
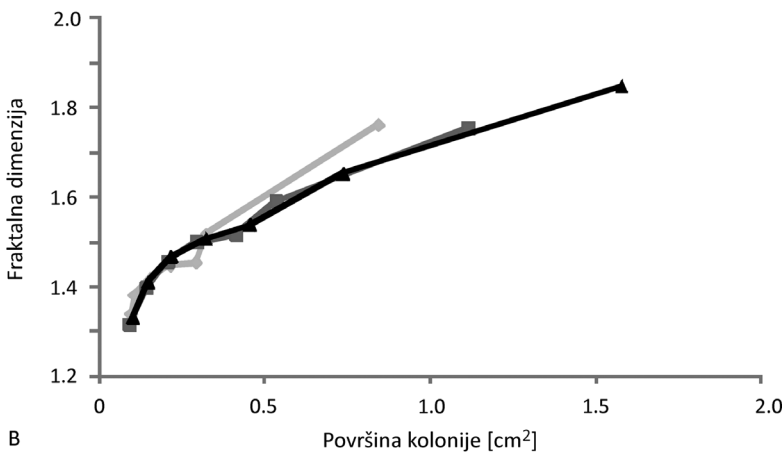
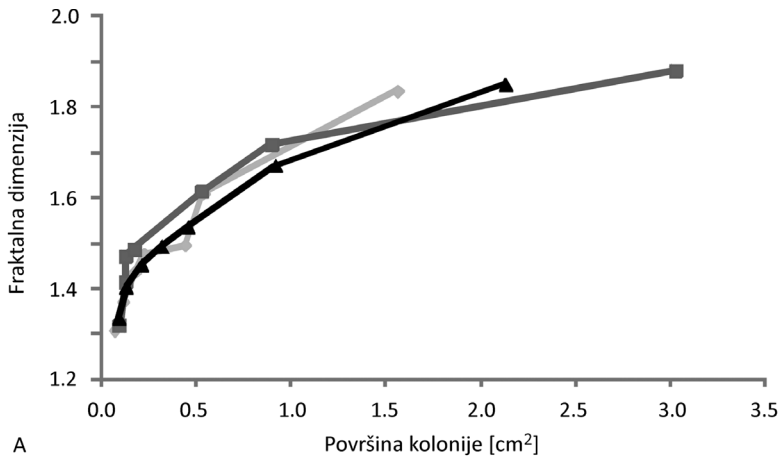


■ 1 mg/mL
 ◆ 2 mg/mL
 ● 4 mg/mL

vršine. Ovo povećanje u površini izraženo je tek nakon inkubacionog perioda od 144 h, kada započinje grananje kolonije (slika 3). Sa daljim povećanjem koncentracije glukoze na 4 mg/mL, zbog povećanja količine dostupnih nutrijenata, očekivao bi se i porast površine kolonije. No u uslovima sa većom koncen-

tracijom glukoze površina kolonije je manja a oblik razuzdeniji. U postavci sa dve i tri kolonije (slika 8B i 8C) ova pojava nije izražena i površina opada sa koncentracijom glukoze.

Pri približno istoj vrednosti fraktalne dimenzije, kolonije osvajaju različitu površinu u zavisnosti od



Slika 8.
Fraktalna dimenzija kolonije u funkciji od površine za prostorni raspored sa jednom (A), dve (B) i tri (C) kolonije

Figure 8.
Fractal dimension in function of colony area for spatial distributions with one (A), two (B) and three (C) colonies

prostornog rasporeda. Tako se u uslovima sa jednom kolonijom osvaja najveća površina, dok je u uslovima sa dve i tri kolonije oblik nešto razuđeniji i površina kolonije manja. Sledi da je pri ovim prostornim rasporedima došlo do grananja kolonije i povećavanja složenosti oblika bez povećavanja površine.

Zaključak

U ovom istraživanju ispitivan je rast soja *Pseudomonas* sp. u uslovima gladovanja, gde je praćena promena oblika kolonije se vremenom. Promena oblika odvijala se po Communicating Walkers modelu (Ben-Jacob *et al.* 1998; Shapiro 1998), gde je sa crpljenjem nutrijenata u podlozi dolazilo do cepanja kolonije i promene razuđenosti njenog oblika. Ova razuđenost kvantifikovana je računanjem fraktalnih dimenzija kolonija kultivisanih u uslovima sa različitim koncentracijama glukoze i sa različitim brojem susednih kolonija.

Sa povećanjem broja inokulisanih kolonija opadala je njihova fraktalna dimenzija, odnosno patern je bio razuđeniji. Na podlogama sa nižom koncentracijom glukoze uticaj broja kolonija na njihovu razuđenost bio je izraženiji. Takođe, sa smanjenjem koncentracije glukoze razuđenost patern je bila veća, što se ispoljilo pri postavkama sa dve i tri kolonije.

Površina koju kolonije osvajaju pri približno istim vrednostima fraktalne dimenzije zavisi od broja kolonija. U uslovima sa jednom kolonijom najveća površina je praćena najmanjom razuđenošću, dok je u uslovima sa dve i tri kolonije razuđenost bila veća i osvojena površina manja.

Literatura

Ben-Jacob E., Cohen I., Gutnick D. L. 1998. Cooperative organization of bacterial colonies: from genotype to morphotype. *Annual Reviews in Microbiology*, **52**: 779.

Ben-Jacob E. 1993. From snowflake formation to growth of bacterial colonies, Part 1 – Diffusive patterning in azoic systems. *Contemporary Physics*, **34** (5): 247.

Ben-Jacob E., Schochet O., Tenenbaum A., Cohen I., Czirók A., Vicsek T. 1994. Generic modelling of cooperative growth patterns in bacterial colonies. *Nature*, **368**: 46.

Fereydoon F., Viscek T. 1991. *Dynamics of fractal surfaces*. Singapore: World Scientific Publishing

Fujikawa H., Matsushita M. 1989. Fractal growth of *Bacillus subtilis* on agar plates. *Journal of the Physical Society of Japan*, **58** (11): 3875.

Jemcević V., Đukić A. D. 2000. *Mikrobiologija*. Beograd: Vojnoizdavački zavod

Kievit T. 2009. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, **11** (2): 279.

Kimball S., Mattis P. 1997. GNU Image Manipulation Program 2.66, besplatan softver dostupan na <http://www.gimp.org/>

Končarević M. R. 2009. Ispitivanje mikroorganizama producenata površinskih aktivnih supstanci izolovanih iz uzoraka zemljišta kontaminiranih naftom i naftnim derivatima – diplomski rad. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, Studentski trg 12-16, Beograd

Knežević-Vukčević J., Simić D. 2009. *Metode u mikrobiologiji* – prvi deo. Beograd: Biloški fakultet

Matsuyama T., Matsushita M. 1992. Self-similar colony morphogenesis by gram-negative rods as the experimental model of fractal growth by a cell population. *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (4): 1227.

Obert M., Pfeifer P., Sernetz M. 1990. Microbial growth patterns described by fractal geometry. *Journal of Bacteriology*, **172** (3): 1180.

Rasband M. 2011. ImageJ 1.44p, besplatan softver dostupan na <http://imagej.nih.gov/>

Shapiro J. A. 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annual Reviews Microbiology*, **52**: 81.

Takahashi C., Nozawa T., Tanikawa T., Nakagawa Y., Wakita J., Matsushita M., Matsuyama T. 2008. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 without differentiation into elongated hyperflagellates on hard agar minimal medium. *FEMS Microbiol. Lett.*, **280**: 169.

Vuidel G., Frankhauser P., Tannier C. 2006. Fractalysse 2.4, besplatan softver dostupan na <http://fractalysse.org/>

Fractal Growth of *Pseudomonas* sp.
Strain on Minimal Media with
Different Glucose Concentrations and
Different Spatial Distribution of
Colonies

Pseudomonas sp. strain showed fractal growth during starvation conditions. Fractal dimension was used for quantifying roughness of these shapes. Also, it was surveyed how different glucose concentrations and different spatial distributions affect pattern formation. Influence of nearby colonies on fractal morphotype in more extreme starving conditions was shown. It was also shown that in these conditions increased spatial distribution was followed by increased colony roughness. Therefore, in the experimental setup with one colony, larger nutrient media surface was populated by bacteria. But in the experimental setup with more colonies nutrient media surface populated by bacteria was smaller, although roughness was increased. Increased glucose concentrations led to decreased colonial fractal dimensions, but on the other side increased colonial surface was shown. 