

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 574+579.841.11.017.6:631.46

**РАЗВИТИЕ И ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ СМЕШАННЫХ (S + M)
КУЛЬТУР *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
В ПОЗДНЕЙ СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ РОСТА**

© 2008 г. Е. С. Милько*, В. Г. Крейер*, Н. С. Егоров*, Н. Г. Лойко**¹, Н. А. Голод***

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра микробиологии

**Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва

***Российский химико-технологический Университет им. Д.И. Менделеева, Москва

Поступила в редакцию 18.06.2007 г.

В процессе длительного роста (375 ч) в периодическом режиме смешанной культуры S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* на минеральной среде с глюкозой проанализированы: рост популяции, соотношение диссоциантов, изменение pH и концентрация редуцирующих сахаров в среде. Показано, что в поздней стационарной фазе роста культуры (100–375 ч) возможны два варианта развития событий. Первый – интенсивный автолиз клеток, сопряженный с защелачиванием среды и увеличением доли M-диссоцианта. Второй – закисление среды, сопряженное с осциллирующим вторичным ростом культуры, осуществляющимся, в основном, за счет M-диссоцианта, изменение численности клеток которого соответствует изменению оптической плотности культуры. В этом варианте отмечено периодическое появление в среде редуцирующих сахаров, находящееся в противофазе изменению численности клеток M-диссоцианта. Различия в сценариях и развитии культур *P. aeruginosa* в поздней стационарной фазе, по-видимому, обусловлены физиолого-биохимическими особенностями S- и M-диссоциантов: различиями в путях использования глюкозы (дыхание или брожение), устойчивостью к закислению среды и их синтетической активностью (протеолитической), продуктивностью аутоиндукторов.

Ключевые слова: поздняя стационарная фаза, вторичный рост, *Pseudomonas aeruginosa*, S- и M-диссоцианты, популяционный состав культуры.

Осциляция развития микробных популяций почвенного сообщества в целом – хорошо известный факт [1, 2]. Осцилляторный рост популяции происходит (обеспечивается), в том числе, за счет потребления продуктов отмирающих микробных клеток, этот процесс является саморегулируемым [3]. Для лабораторных культур он определяется как их вторичный рост на протяжении длительной стационарной фазы. Так для *Pseudomonas fluorescens* показаны закономерные колебания численности жизнеспособных клеток и углерода, поступающего из автолизирующейся биомассы, при длительном культивировании (2 мес.) бактерий в периодическом режиме без дополнительного внесения питательных веществ. Физиологические или экологические факторы, инициирующие рост бактериальной культуры в поздней стационарной фазе не установлены, равно как и возможное участие в этом процессе внутривидовой диссоциации. Вместе с тем, известно, что в процессе развития микробной культуры ее популяционный состав изменяется [4]. Преимущественный рост того или иного диссоци-

анта (колониально-морфологического варианта) в развивающейся культуре определяется, с одной стороны, его питательными потребностями [5], с другой – устойчивостью к изменяющимся физико-химическим факторам окружения (pH и др.) [6, 7] и концентрации внеклеточных ауторегуляторов, контролирующих физиологическую активность клеток [8]. Показано, что чем ниже потребность клеток в питательных веществах, тем больше будет их удельное количество в смешанных (поликультурах) культурах бактерий к окончанию трофофазы, в стационарной фазе [9]. Питательные потребности зависят от особенностей метаболизма бактерий. Сравнение физиолого-биохимических свойств трех диссоциантов *P. aeruginosa* K2 показало, что у них различаются пути использования глюкозы как энергетического субстрата [10]: у R-клеток преобладало дыхание, у M – брожение с образованием муравьиной кислоты, у S-диссоцианта возможно переключение с одного пути использования глюкозы на другой [10]. Построена вариационная модель изменений популяционного состава этого штамма в стационарной фазе развития их смешанных культур (из 2 или 3 диссоциантов) в зависимости от на-

¹ Адресат для корреспонденции (e-mail: loikonat@mail.ru).

чальной концентрации основных биогенных элементов в среде [11]. Однако, возможная роль диссоциативных переходов в микробной культуре в поздней стационарной фазе, сопряженная с ее вторичным ростом или альтернативным вариантом развития – автолизом культуры, не рассматривалась.

Целью настоящего исследования было изучение изменений популяционного состава смешанных культур S- и M-диссоциантов *P. aeruginosa* в условиях их длительного (375 ч) роста в периодическом режиме без внесения дополнительных источников питания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были S- и M-диссоцианты широко распространенной в природе бактерии *P. aeruginosa* К2. Штамм выделен из пластовых вод сибирского нефтяного месторождения. Бактерии выращивали на минеральной среде следующего состава (г/л): глюкоза – 20, азотнокислый натрий – 5, натрий фосфорнокислый однозамещенный – 0.5, хлористый калий – 0.6, сернокислый магний – 0.2, рН 7.2. Культуры выращивали в пробирках на 50 мл с 10 мл среды, на качалке (180 об/мин), при температуре 30°C в течение 375 ч. В качестве посевного материала использовали клетки односуточных культур диссоциантов псевдомонад, выращенных на агаризованной среде (МПБ + сусло, 1 : 1) и суспендированных до плотности 10^9 клеток в мл по стандарту мутности. Инокулят вносили в количестве 3% по объему.

Рост бактерий оценивали нефелометрически (ФЭК-56М, фильтр № 6). Показания нефелометра для удобства расчетов умножали на 100. Численность клеток (в мл) определяли как описано в работе [4]. Соотношение диссоциантов (в %) в популяции определяли после посева проб культур на агаризованную среду (МПБ + сусло, 1 : 1). Величину рН среды измеряли микропотенциометром Checker (“HANNA Instrument”). Концентрацию редуцирующих сахаров в среде определяли с помощью индикатора (“Диаглюк”). Общую внеклеточную протеолитическую активность определяли модифицированным методом Ансона [12] с использованием в качестве субстрата казеина (при рН 6.7 и 8.5) и гемоглобина (при рН 4.3). За единицу протеолитической активности (ПА) принимали такое количество фермента (в мл), которое за одну минуту высвобождает 1 мкг тирозина.

На графиках и в таблице приведены средние данные из результатов трех опытов с тремя повторностями в каждом.

Протеолитическая активность (ПА) S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* при разных значениях рН

Диссоциант	рН	ПА, ед/мл	ПА, ед/кл
S	4.3	16.7	0.9
	6.7	24.1	1.3
	8.5	18.4	1.0
M	4.3	11.8	1.7
	6.7	23.1	3.3
	8.5	32.0	4.6

РЕЗУЛЬТАТЫ

Периодическое культивирование смешанных культур S- и M-диссоциантов *P. aeruginosa* К2 проводили в течение 375 ч без дополнительного внесения в среду питательных веществ. В посевном материале диссоцианты присутствовали в соотношении S : M = 40 : 60%. В первые 50 ч культивирования (рис. 1, 2) наблюдались: интенсивное размножение бактерий (увеличение ОП культур), уменьшение в популяции доли более медленно растущего M-диссоцианта, потребление глюкозы, снижение рН среды до 5.5. К 75 ч роста в куль-

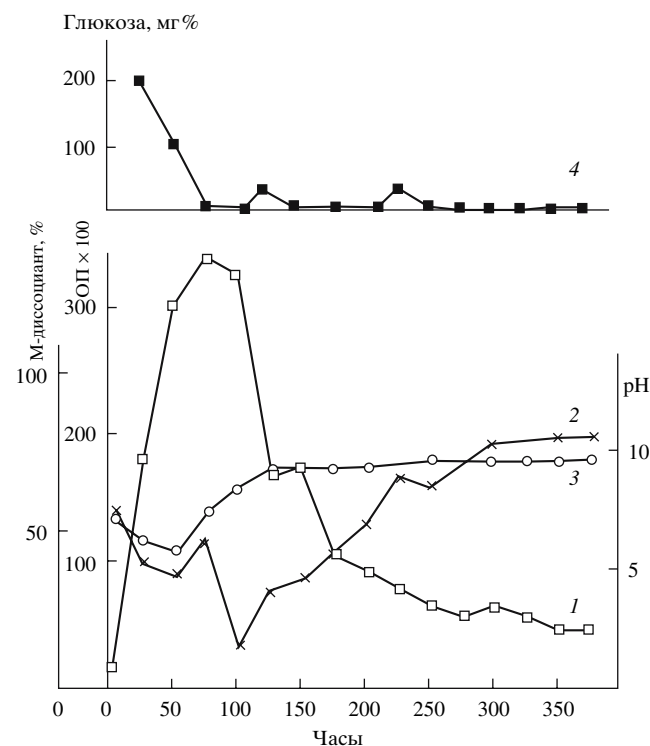


Рис. 1. Динамика роста и состава популяции смешанной культуры S- и M-диссоциантов *P. aeruginosa* в варианте автолиза культур в поздней стационарной фазе: 1 – оптическая плотность культуры (ОП × 100); 2 – доля M-диссоцианта в популяции, %; 3 – рН среды; 4 – содержание редуцирующих сахаров, мг% (в пересчете на глюкозу).

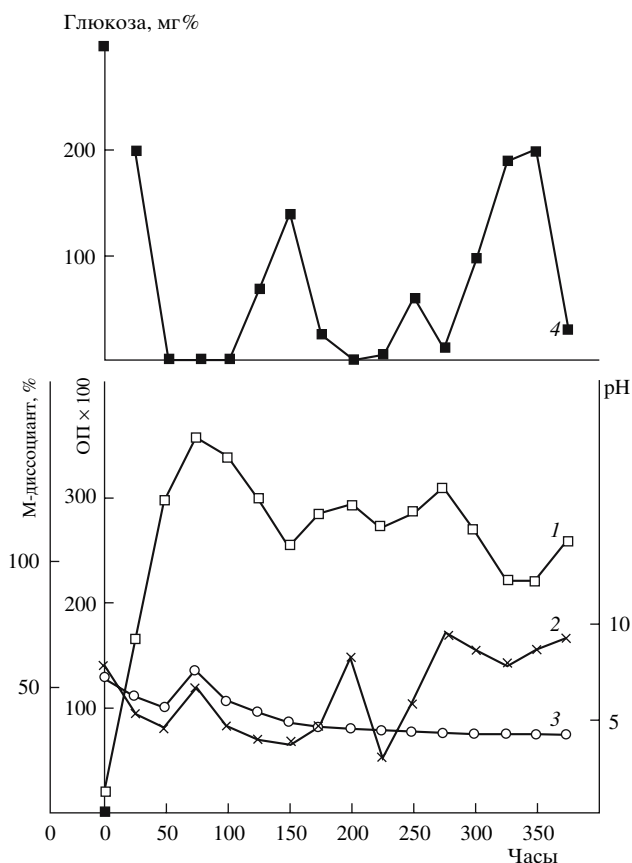


Рис. 2. Динамика роста и состава популяции смешанной культуры S- и M-диссоциантов *P. aeruginosa* в варианте осциллиций вторичного роста культуры. Обозначения как на рис. 1.

турах накапливалось максимальное количество биомассы, соотношение диссоциантов выравнялось (1 : 1), что согласуется с модельными расчетами [11], среда подщелачивалась до pH 7.0–7.3, глюкоза исчерпывалась.

Начиная с 75 ч роста развитие смешанных культур *P. aeruginosa* проходило по двум различным сценариям. В первом варианте (рис. 1) pH среды продолжал возрастать, среда защелачивалась, культура без регистрируемой стационарной фазы переходила в фазу отмирания. Начало фазы отмирания (75–100 ч) проходило, в основном, за счет автолиза клеток M-диссоцианта, удельная доля которого снизилась до 10–15%, в популяции доминирующим становился S-диссоциант (85–90%). Начиная с 100 ч роста наблюдался интенсивный автолиз культуры: за период 100–125 ч ОП культуры уменьшилась в 2 раза, защелачивание среды продуктами автолиза продолжалось, к 125 ч значения pH составили 9.0–9.5. Затем скорость автолиза снижалась, pH среды стабилизировался. Весь период интенсивного отмирания культуры проходил, в основном, за счет клеток S-диссоцианта, доля клеток M-типа увеличилась до 75–85%. Начиная с 275 ч

состояние культуры стабилизировалось, в последние 100 ч наблюдений (275–375 ч) регистрируемые параметры практически не изменялись, наблюдения были прекращены. Оставшиеся интактными клетки, вероятно, переходили в анабиотическое состояние, их пролиферативная способность (число КОЕ) сохранялась.

На рис. 2 представлены усредненные данные другой серии опытов, в которых развитие смешанных культур *P. aeruginosa* в поздней стационарной фазе имело принципиально иной характер – наблюдался осциллирующий вторичный рост бактерий. Еще раз отметим, что в трофофазе роста культур первой и второй серии опытов различий между ними в ростовых характеристиках не было (рис. 1, 2).

Резкие отличия начали выявляться в начале фазы отмирания. В культурах, развивающихся по второму сценарию (рис. 2), в период от 100 до 150 ч роста среда закислялась (в первом варианте роста среда защелачивалась), одновременно в среде начали накапливаться редуцирующие сахара (до 150–170 мг %). Скорость отмирания клеток была существенно ниже (ОП снизилась на 30%), чем в первом варианте (ОП снизилась на 50%). В период интенсивного автолиза популяции (100–150 ч), в основном, отмирали клетки M-типа (в первом варианте – клетки S-типа). В период 150–225 ч роста при стабильно низком pH (4.0–4.5) наблюдалась первая волна вторичного роста – повышение ОП культуры за счет увеличения численности клеток M-диссоцианта при потреблении сахаров. Такие же закономерности были характерны для двух последующих волн вторичного роста. Отметим, что как вторичный рост культуры, так и периодическое отмирание клеток в интервале от 150 до 375 ч проходили, в основном, за счет M-диссоцианта, так как изменения ОП культуры и удельной доли M-клеток в популяции (КОЕ) совпадали во времени и по амплитуде. Отметим также, что возобновлению роста культуры (150–200 ч; 225–275 ч; 325–375 ч) предшествовало появление в среде редуцирующих сахаров, реализуемых в результате автолиза части клеток популяции (соответственно в периоды 100–125 ч; 200–225 ч; 275–325 ч).

Для объяснения полученных результатов следует привлечь еще один блок данных. Так как культуры *P. aeruginosa* развивались в периодическом режиме без дополнительного внесения питательных веществ, их вторичный рост в поздней стационарной фазе мог быть обеспечен только поступлением питательных веществ из автолизата, образующегося при отмирании части клеток популяции. Пусковая роль в процессах автолитической деструкции клеток отводится протеиназам, продуктивность которых у диссоциантов может различаться [4, 6, 13, 14], а их активность зависит от физико-химических параметров среды, в том числе, pH.

В настоящей работе эксперименты планировались исходя из того, что одним из существенных различий в стратегиях развития культур *P. aeruginosa* в поздней стационарной фазе (фазе отмирания) является уровень pH. В наших исследованиях протеолитическую внеклеточную активность в культурах S- и M-диссоциантов в стационарной фазе определяли при разных значениях pH (таблица). При низких значениях pH наибольшей протеолитической активностью в расчете на объем (1 мл) обладал S-диссоциант, в щелочных условиях – M-диссоциант; те же закономерности отмечены при расчете продуктивности (на клетку). Поэтому при защелочении среды в первом варианте развития смешанной (S + M) культуры *P. aeruginosa* (рис. 1) высокая активность протеиназ при повышении удельной доли M-клеток с начала фазы отмирания могла играть пусковую роль в непрекращающемся однонаправленном процессе автолиза. При этом, согласно ранее полученным данным [7], селективные преимущества в культуре с защелоченной средой имели клетки M-диссоцианта, они оставались интактными и жизнеспособными (КОЕ), а M-диссоциант – доминирующим.

В культурах, развивающихся по второму сценарию (рис. 2), при низких значениях pH активность протеиназ у обоих диссоциантов была существенно ниже, чем в щелочных условиях, поэтому клетки автолизировались значительно медленнее. В этом случае более устойчивые и медленно растущие M-клетки [10] получали возможность вторичного роста на продуктах автолиза, в том числе за счет использования редуцирующих сахаров, реализующихся при распаде клеточных биополимеров.

Отметим, что у ряда других бактерий (*Bacillus cereus*, *Rhodococcus rubroperctinctus*, *P. aeruginosa* PAO1) наибольшей протеолитической активностью также обладали M-диссоцианты [6, 13, 14].

Таким образом, развитие смешанной (S + M) культуры *P. aeruginosa* K2 в поздней стационарной фазе может осуществляться в двух вариантах: при однонаправленном автолизе клеток преимущественно S-типа и защелочении среды продуктами автолиза (I путь) или с осциллирующим вторичным ростом культуры, в основном, за счет размножения и автолиза клеток M-типа, при потреблении редуцирующих сахаров, реализуемых из автолизированных клеток, и закислении среды продуктами неполного окисления сахаров (II путь).

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие микробных культур при их длительном культивировании в периодических условиях в отсутствие поступления питательных веществ может протекать по альтернативным сценариям без видимых экологических и физико-химических факторов воздействия. Анализ полученных ре-

зультатов позволяет предположить, что возможной причиной вариабельности развития смешанных (S + M) культур *P. aeruginosa* в поздней стационарной фазе (фазе отмирания) являются различия в физиолого-биохимических свойствах диссоциантов и, прежде всего, в путях использования углеводов среды [10]. Изучение физиолого-биохимических особенностей вариантов полного диссоциативного спектра *P. aeruginosa* K2 показало, что они различаются путями окисления глюкозы. Для R-клеток, обладающих минимальными питательными потребностями и высокой скоростью пролиферации, характерно дыхание; M-клеткам – с максимальными питательными потребностями и низкой скоростью роста, свойственно брожение с образованием муравьиной кислоты и подкислением среды до pH 3.3; S-диссоциант способен к переключению дыхания на брожение [10]. Величина потребности клеток диссоциантов в питательных веществах обратно пропорциональна их численности в смешанных культурах в стационарной фазе роста. Так, ранее нами было показано, что у смешанных культур *P. aeruginosa* (R + S + M, R + S, R + M) в конце трофофазы – стационарной фазе в популяции доминировал R-вариант [4]. Однако при продолжающемся культивировании главную роль играют не трофические связи, а другие – активность протеолитических ферментов, уровень ауторегуляторных факторов, pH среды.

В поздней стационарной фазе смешанной (R + M) культуры *P. aeruginosa* K2 доля M-диссоцианта увеличивалась, значения pH среды монотонно возрастали до 9.5, а вторичного роста культуры не наблюдалось [4]. В настоящем исследовании одним из компонентов смешанной (M + S) культуры был S-диссоциант, для которого характерно переключение метаболизма с окисления (дыхания) на брожение глюкозы, поэтому S-клетки в стационарной фазе – начале фазы отмирания могли с равной вероятностью реализовывать эти альтернативные пути. Это определяло направление в изменении pH среды: либо в область закисления и тогда медленного автолиза части клеток, либо в область защелочения и быстрого и необратимого отмирания популяции. На скорость автолиза существенным образом влияла активность внеклеточных протеиназ, различающаяся у разных диссоциантов (таблица).

Второй блок результатов, которые следует прокомментировать, – это доминирование M-диссоцианта в поздней стационарной фазе (от 200 ч и далее) в обоих вариантах развития смешанных (S + M) культур *P. aeruginosa*. Физиолого-биохимические различия диссоциантов не исчерпываются разницей в показателях их продуктивной биосинтетической активности, но также включают отличия в строении клеток – размерах и химической структуре клеточной стенки, капсулы, компонентном составе цитоплазматической мембраны. Это обуславливает различия клеток диссоциантов в устойчивости к дей-

ствию физических, химических и биологических факторов окружения [6]. Клетки медленно растущего М-диссоцианта обладают, как было показано ранее, более высокой устойчивостью, в частности, к щелочным значениям рН (8.5) [7], и другим повреждающим воздействиям. Этим может объясняться доминирование М-диссоцианта на стадии отмирания смешанных (S + M) культур *P. aeruginosa*, когда клетки оказываются в неоптимальных, стрессовых условиях. Отметим также, что динамика роста и соотношения S- и М-диссоциантов в поздней стационарной фазе контролируются концентрацией и активностью внеклеточных ауторегуляторных факторов и, прежде всего, аутоиндукторов анабиоза, синтез которых показан для бактерий рода *Pseudomonas* [15]. У этих бактерий аутоиндукторы анабиоза представлены алкилоксибензолами (АОБ) класса алкилрезорцинов [15]. У исследуемого штамма *P. aeruginosa* наибольшее количество внеклеточных АОБ синтезировал М-вариант [4]. Для анализа результатов настоящего исследования важно, что АОБ обладают адаптогенной активностью, повышая стрессоустойчивость клеток про- и эукариот [16, 17], а также индуцируя внутригенные перестройки, ассоциированные с диссоциативными переходами (фазовыми вариациями), т.е. индуцируют выщепления диссоциантов [8]. Эти свойства АОБ следует принимать во внимание при объяснении доминирования М-диссоцианта в популяции к концу культивирования – к 375 ч – в обеих сериях опытов.

Результаты, аналогичные данным настоящего исследования, были получены при изучении популяционного состава *Escherichia coli* при ее длительном периодическом культивировании без добавления питательных веществ [18, 19]. В одних из вариантов опытов после лаг-фазы (6 ч), фазы логарифмического роста (6 ч), стационарной фазы (36 ч) и фазы интенсивного отмирания (2 сут) отмечался период, названный поздней стационарной фазой (10 сут), когда наблюдались достоверные колебания численности бактерий – периодическое увеличение числа жизнеспособных клеток (на порядок) за счет гибели другой части популяции [19]. При дальнейших наблюдениях (в течение 4 лет) количество жизнеспособных клеток изменялось мало, составляя около 10^6 кл/мл, вероятно, бактерии находились в состоянии анабиоза. В других параллельных вариантах опытов отмирание клеток происходило однонаправлено, обуславливая стабильное снижение их численности. Отмечены изменения морфологии клеток и колоний при рассевах бактерий, обеспечивающих вторичный рост. Эти клетки предложено выделить в специальный фенотип, преобладающий при вторичном росте в поздней стационарной фазе длительно растущей культуры (growth advantage in stationary phase – GASP) [19]. Клетки GASP фенотипа невосприимчивы к сигналам, удерживающим

остальную популяцию в неделящемся состоянии [18]. Полагают, что в GASP клетках экспрессируется широкий набор “стрессовых” генов, обеспечивающих альтернативные метаболические пути улучшения аминокислотного обмена, за счет чего происходит рост на автолизатах. Хотя в работе не анализируется возможная роль процесса диссоциации (фазовой вариации) в осцилляции численности клеток в поздней стационарной фазе, но он мог иметь место при длительном развитии *E. coli*, так как в экспериментах наблюдались закономерности, аналогичные описанным в данной работе (II путь). Возможно, что GASP фенотип является подтипом М-диссоцианта и может реализоваться только через выщепление М-фенотипа. Этому предположению не противоречит тот факт, что GASP фенотип в ряде штаммов *E. coli* не экспрессировался [18, 19]. Продолжение работ в этом направлении крайне интересно, особенно для микробной экологии и клинической медицины.

Таким образом, в результате проведенных исследований обнаружено, что в поздней стационарной фазе роста периодической культуры бактерий *P. aeruginosa* возможны два варианта развития событий: интенсивный автолиз клеток, с защелачиванием среды или осциллирующий вторичный рост культуры, сопровождающийся закислением среды. Обнаружено, что выбор программы развития сопряжен с диссоциативными переходами внутри популяции. На примере смешанной культуры S + M диссоциантов *P. aeruginosa* показано, что различия в сценариях развития культур *P. aeruginosa* в поздней стационарной фазе, по-видимому, обусловлены физиолого-биохимическими особенностями S- и М-диссоциантов: различиями в путях использования глюкозы (дыхание или брожение), устойчивостью к закислению среды и их синтетической активностью: протеолитической и продуктивностью АОБ – ауторегуляторов, контролирующих стрессоустойчивость клеток, индукцию диссоциативных переходов (фазовых вариаций) в бактериальных популяциях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 05-04-49238 и № 07-04-01011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М.: Изд-во МГУ, 1987. 256 с.
2. Van-Bruggen A.H.C., Semenov A.M., Van-Diepeningen A.D., de Vos O.J., Blok W.J. Relation between soil health, wave-like fluctuations in microbial population, end soil-borne plant disease management // Eur. Plant Pathol. 2006. № 115. С. 105–122.
3. Полянская Л.М., Гейдебрехт В.В., Чернов И.Ю., Початкова Т.Н., Звягинцев Д.Г. Репрезентативность данных о структуре микробных сообществ // Почвоведение. 2005. № 1. С. 92–97.

4. Милько Е.С., Хабибуллин С.С., Николаев Ю.А., Козлова А.Н., Эль-Регистан Г.И. Динамика роста и состава популяций смешанных культур R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. 2005. Т. 74. № 4. С. 475–482.
5. Фурсова П.В., Милько Е.С., Ильиных И.А., Максимов В.Н., Левич А.П. Определение потребностей диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* в углероде, азоте и фосфоре // Микробиология. 2004. Т. 73. № 1. С. 45–50.
6. Милько Е.С., Егоров Н.С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации. М.: Изд-во МГУ, 1991. 142 с.
7. Милько Е.С., Никитенко Л.А. Влияние физических и химических факторов среды на рост диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. 1998. Т. 34. № 2. С. 171–174.
8. Хабибуллин С.С., Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Голод Н.А., Милько Е.С., Воейкова Т.А., Эль-Регистан Г.И. Ауторегуляция фенотипической диссоциации у *Bacillus licheniformis* // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2006. Т. 75. № 6. С. 9–13.
9. Максимов В.Н. Основные понятия общей экологии // Экология микроорганизмов. М.: Изд-во АСАДЕМА, 2004. С. 12–28.
10. Милько Е.С., Ильиных И.А. Влияние концентраций основных биогенных элементов на динамику роста и состав популяций R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* и пути использования ими глюкозы: окисление и брожение // Микробиология. 2004. Т. 73. № 1. С. 37–44.
11. Фурсова П.В., Милько Е.С., Ильиных И.А., Левич А.П. Подходы к управлению составом сообщества диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa*: экспериментальные данные и модельные расчеты // Биотехнология. 2005. № 1. С. 73–82.
12. Hagihara B., Matsubara H., Nakai M., Okunuki K. Crystalline bacterial proteinase. I. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis* // J. Biochem. 1958. V. 45. P. 185–194.
13. Дорошенко Е.В., Лойко Н.Г., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Горнова И.Б., Климова Е.В., Эль-Регистан Г.И. Характеристика диссоциантов *Bacillus cereus* // Микробиология. 2001. Т. 70. № 6. С. 811–819.
14. Ross N.W., Levitan R., Labelle J., Schneider H. Protein and other compositional differences of the extracellular material from slimy nonslimy colonies of non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* // FEMS Microbiol. Lett. 1991. V. 81. № 3. P. 257–260.
15. Светличный В.А., Романова А.К., Эль-Регистан Г.И. Изучение содержания мембраноактивных ауторегуляторов при литотрофном росте *Pseudomonas carboxydoflava* // Микробиология. 1986. Т. 55. Вып. 1. С. 55–59.
16. Степаненко И.Ю., Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Эль-Регистан Г.И. Роль алкилксибензолов в адаптации *Micrococcus luteus* к температурному шоку // Микробиология. 2005. Т. 74. № 1. С. 26–33.
17. El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Stepanenko I.Yu., Kozlova A.N., Martirosova E.I., Shanenko E.F., Strakhovskaya M.G., Revina A.A. The role of microbial low-molecular-weight autoregulatory factors (alkylhydroxybenzenes) in resistance of microorganisms to radiation and heat shock // J. Adv. Space Res. 2005. V. 36. P. 1718–1728.
18. Vulic M., Kolter R. Evolutionary cheating in *Escherichia coli* stationary phase cultures // Genetics. 2001. № 158. P. 519–526.
19. Finkel S.E. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP-phenotype // Nat. Rev. Microbiol. 2006. № 4. P. 113–120.

Development and Population Structure of Mixed (S + M) *Pseudomonas aeruginosa* Cultures in the Late Stationary Growth Phase

E. S. Mil'ko^a, V. G. Kreier^a, N. S. Egorov^a, N. G. Loiko^{b,1}, and N. A. Golod^c

^a Moscow State University, Department of Microbiology, Vorob'evy Gory, Moscow, 119992, Russia

^b Winogradsky Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, pr. 60-letiya Oktyabrya 7, k. 2, Moscow, 117312 Russia

^c Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Miusskaya pl., 9, Moscow, 125047 Russia

¹E-mail: loikonat@mail.ru

Abstract—Population growth, the ratio between dissociants, pH, and levels of reducing sugars in the medium were monitored during prolonged (375 h) batch cultivation of *Pseudomonas aeruginosa* S and M dissociants on mineral medium with glucose. During the stationary growth phase (100–375 h), two scenarios were possible. The first one included extensive cell autolysis coupled to alkalization of the medium and an increased ratio of the M dissociant. In the second case, acidification of the medium was coupled to the oscillating secondary growth, mostly of the M dissociant; the dynamics of cell numbers of this dissociant correlated with the dynamics of the culture optical density. In this scenario, periodical appearance of reducing sugars in the medium was detected; it was in the opposite phase with the changes of the M dissociant cell numbers. The differences between scenarios of *P. aeruginosa* growth in the late stationary phase were probably due to the physiological and biochemical characteristics of the S and M dissociants, including different pathways of glucose utilization (respiration or fermentation), resistance to acidification, synthetic (proteolytic) activity, and productivity of autoinducers.

Key words: late stationary phase, secondary growth, *Pseudomonas aeruginosa*, S and M dissociants, population structure of the culture.