

*Биологический факультет
Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова*

На правах рукописи

Ильиных Ирина Алексеевна

**Внутрипопуляционные взаимодействия в
культуре бактерий *Pseudomonas aeruginosa***

Специальность "Экология"

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва – 2002

Работа выполнена на кафедре общей экологии биологического
факультета МГУ им. М.В.Ломоносова

Научный руководитель

доктор биологических наук,
профессор В.Н. Максимов

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор Т.В.Коронелли

доктор биологических наук,
профессор Г.Н.Эль-Регистан

Ведущая организация:

Защита состоится «___»_____2002 года в ___ часов на заседании
Специализированного диссертационного совета.....в Московском
государственном университете им. М.В.Ломоносова по адресу: 119899, Москва,
Воробьевы горы, МГУ, Биологический факультет, аудитория.....

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета
МГУ.

Автореферат разослан «___»_____2002 года.

Ученый секретарь

Специализированного диссертационного
Совета,

Актуальность проблемы. Одним из механизмов поддержания гетерогенности микробной популяции является диссоциация. Диссоциация это расщепление однородной популяции на варианты или диссоцианты с реверсией в исходный вариант. Диссоциативные переходы обуславливаются геномными перестройками, которые приводят к изменениям физиолого-биохимических и морфологических свойств, в отличие от мутаций происходящих с частотой 10^{-2} – 10^{-4} на одно клеточное деление. Различия между диссоциантами проявляются в особенностях: пищевых потребностей, скорости роста, способности к синтезу и трансформации практически ценных веществ, деградации ксенобиотиков и углеводов (Dubos, 1976; Беляков и др., 1987; Милько, Егоров, 1991; Иванов и др., 1990, Ряпис, Беляков, 1998).

Диссоциация широко распространена среди бактерий. Поэтому ее необходимо учитывать при решении проблем различного рода, в частности охраны окружающей среды, и прежде всего таких, как очистка от промышленных загрязнений почв, водоемов (Калакуцкий и др, 1996; Аношкин и др., 1997; Мордухова и др, 2000) и определение степени этих загрязнений (Сафронова и др., 1995; Скворцова, 1997). Изучение физиолого-биохимических особенностей диссоциантов, их потребностей в основных биогенных элементах среды, устойчивости к внешним воздействиям позволит управлять структурой популяции бактерий и эффективностью микробиологического процесса, а также прогнозировать поведение бактериальной популяции в зависимости от условий окружающей среды.

В настоящее время существует несколько определений понятия «потребности». Например, количество субстрата, необходимое для наращивания единицы клеточной биомассы (экономический коэффициент) (Левич и др., 1997). Левич А.П. (2000) предлагает потребностями клеток микроводорослей в ресурсах среды считать количество ресурса, поглощенное из среды одной клеткой. Для определения потребности необходимо установить минимальную концентрацию ресурса, при которой происходит остановка роста культуры.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы было изучение влияния исходных концентраций основных биогенных элементов в среде на рост R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* и определение потребностей клеток в биогенных элементах для управления сообществом бактерий.

Поэтому в настоящем исследовании стояли следующие задачи. Для культур трех диссоциантов *P. aeruginosa* К-2:

- 1) выявить влияние основных биогенных элементов в широком диапазоне их концентраций на рост диссоциантов;
- 2) исследовать в динамике рост и потребление углерода, азота и фосфора культурами диссоциантов, pH среды и состав популяции на стационарной фазе роста;

- 3) определить лимитирующие рост концентрации биогенных элементов;
- 4) рассчитать потребности диссоциантов в углероде, азоте и фосфоре;
- 5) исследовать возможности регулирования состава поликультуры диссоциантов на стационарной стадии роста с помощью начального содержания в среде основных биогенных элементов;
- 6) определить различия в соотношении двух путей использования глюкозы (окисление и брожение) у каждого диссоцианта:

Научная новизна работы. Обнаружено, что при периодическом культивировании бактерий *P.aeruginosa* различные начальные концентрации ресурсов влияют на изменение состава популяции на стационарной стадии роста. Также количество клеток и соотношение диссоциантов в посевном материале предопределяют состав популяции на стационарной стадии роста. Обнаружено изменение соотношения диссоциантов, что происходит благодаря различиям в пищевых потребностях: по мере уменьшения концентрации основных биогенных элементов происходит смена доминирующего варианта. Определено, что потребности R-, S- и M- диссоциантов *P.aeruginosa* в глюкозе, нитратах и фосфатах увеличиваются в ряду R, S, M. Выявлено, что диссоцианты различаются по степени смещения обмена веществ в сторону брожения или окисления при использовании глюкозы в качестве источника углерода.

Практическая значимость работы. Полученные результаты могут быть использованы для прогнозирования поведения популяций бактерий в различных экологических условиях, в частности в зависимости от различных количеств основных биогенных элементов в среде. Результаты могут иметь практическое значение при использовании диссоциирующих видов бактерий в различных биотехнологических процессах.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертации были представлены: на VI Международной конференции аспирантов и студентов «Ломоносов 99» (Москва, апрель 1999), на международной конференции «Проблемы экологии и физиологии микроорганизмов (к 100-летию со дня рождения профессора Е.Е.Успенского (Москва, декабрь 1999) и на заседании кафедры общей экологии Биологического факультета МГУ (Москва, октябрь 2001).

По результатам исследования опубликовано 3 статьи в рецензируемом научном журнале и 2 тезисов в сборниках.

Структура работы. Диссертация состоит из введения 6 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на ... страницах, содержит ... рисунка и таблиц. Список литературы насчитывает ... источников (... русских и ... иностранных). Приложение состоит из ... таблиц.

Представленное исследование было выполнено при поддержке РФФИ (грант 99-04-48338) и ФЦНТП «Биоразнообразие».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы (главы 1-2)

Во **введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цели и задачи, научная новизна и практическая значимость работы. В **первой главе** представлен обзор литературы по диссоциации бактерий — процессу адаптации к условиям среды. Рассмотрены физиолого-биохимические и морфологические особенности диссоциантов и связанные с ними способности к синтезу практически ценных веществ, генетические основы диссоциативных переходов, влияния состава среды и физико-химических факторов среды на рост диссоциантов. Во **второй главе** представлен обзор литературы по управлению экологическими сообществами микроорганизмов с помощью выявления лимитирующих факторов и определения потребностей клеток в ресурсах среды.

Глава 3. Объект и методы исследования

Объектом исследования служили R-, S- и M-диссоцианты углеводородокисляющего штамма *P.aeruginosa* K-2, выделенного из пластовых вод сибирского нефтяного месторождения Ван-Еган. **Методы культивирования.** Для выращивания исследуемых псевдомонад использовали среды, содержащие следующие компоненты: азотнокислый натрий, натрий фосфорнокислый однозамещенный, хлористый калий, сернокислый магний. Варьировали концентрацию глюкозы от 0.03 до 7%, нитратов от 0.01 до 2%, фосфатов от 0.001 до 0.5%. Количество остальных веществ оставалось постоянным: хлористый калий — 0.06%, сернокислый магний — 0.02%. Бактерии культивировали в пробирках на 50 мл с 10 мл среды на качалке (180 об/мин) при температуре 30⁰С.

В качестве посевного материала использовали односуточные культуры диссоциантов псевдомонад, выращенных на плотной среде мясо-пептонный бульон + сусло (1:1) + агар (БСА). Плотность инокулятов каждого из диссоциантов выравнивали по нефелометру или по стандарту мутности до содержания клеток 10⁹ в 1 мл. Посевной материал вносили в количестве 3%. **Рост бактерий оценивали** нефелометрически по плотности культуры, для этого использовали ФЭК К-77 и ФЭК 56 М. Для удобства расчетов все полученные данные умножали на 100. Для каждого диссоцианта строили график зависимости показаний ФЭКа от количества колоний образующих единиц (КОЕ) и числа клеток, которые определяли на постоянных препаратах с помощью люминесцентной микроскопии (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991). Соотношение диссоциантов в популяции бактерий определяли по морфологии колоний при расसेве на БСА. Для каждого варианта опыта подсчитывали около 100 колоний. Соотношение диссоциантов выражали в процентах от подсчитанного числа колоний. Для **определения концентрации глюкозы в среде** использовали 2,3,5-трифенилтетразолийхлорид (ТТХ), (Химия углеводов, 1967). **Концентрацию фосфора в среде** определяли методом Пануша (Малый практикум по биохимии, 1979). **Концентрацию азота в среде** определяли

с сульфифеноловым (Поляков, 1950). Для определения **потребностей клеток диссоциантов в основных биогенных элементах** (Левич и др., 1997) использовали данные о количестве потребленного ресурса, полученного двумя способами. Первый способ основан на химическом определении убыли биогенного элемента из среды, второй – на предположении о том, что остановка роста культуры на стационарной стадии роста произошла из-за полного исчерпания ресурса, что подтверждается возобновлением роста при добавке этого биогенного элемента. Для **феноменологического количественного анализа** результатов использовали уравнение Митчерлиха 2-го приближения, регрессионный анализ по схеме Йейтса и корреляционный анализ (Кирсанов, 1930; Федоров, Гильманов, 1980).

Статистическая обработка данных проводилась по стандартным методикам (Плохинский, 1970). Опыты проводились в двух-трех повторностях. Для полученных данных рассчитывались среднее, среднее квадратическое отклонение и доверительный интервал. Все расчеты производились с учетом уровня значимости $\alpha = 0.05$. Для **измерения pH среды** использовали pH-метр «Checker» (HANNA, Португалия).

Глава 4. Влияние различного количества углерода, азота и фосфора в среде на индивидуальную реакцию диссоциантов R-, S- и M-диссоциантов *P.aeruginosa*

На первом этапе исследования при раздельном культивировании были изучены зависимости роста диссоциантов на стационарной стадии роста от каждого из трёх выбранных питательных компонентов среды. Глюкозу, нитрат и фосфат варьировали в достаточно широких пределах, с тем чтобы определить область лимитирования роста и область толерантности для каждого диссоцианта. Для этого использовали план полного факторного эксперимента $3 \times 3 \times 3$. В результате проделанной работы подобраны среды для культивирования каждого из диссоциантов, где концентрации основных биогенных элементов взяты на среднем уровне. Состав исходной среды представлен в таблице 1. Концентрации глюкозы, нитрата и фосфата для R- и S-диссоциантов одинаковы, а для M – в 2 раза ниже.

Максимальная оптическая плотность в исходной среде наблюдается у R-диссоцианта, минимальная у M-диссоцианта (рис.1, А). Наибольшая скорость потребления углерода азота и фосфора у всех трех диссоциантов наблюдается между 16 и 24 ч в момент максимальной их скорости роста. Количество потребленных биогенных элементов в культуре R-диссоцианта (мг/мл): углерода — 1.05, азота — 0.73, фосфора — 0.086; S-диссоцианта соответственно 1.16, 0.73, 0.094; у M-диссоцианта — 0.32, 0.19, 0.007. Несмотря на то, что R- и S-диссоцианты практически не различаются в количестве потребленных биогенных элементов, рост R-диссоцианта был несколько выше, чем у S-диссоцианта.

Таблица 1. Состав сред в опытах с монокультурами диссоциантов *P. aeruginosa*

№ серии опытов	Предположительно лимитирующий рост биогенный элемент, № среды	Содержание питательных веществ в средах (%) для каждого из диссоциантов								
		Глюкоза			Нитрат			Фосфат		
		R	S	M	R	S	M	R	S	M
1	(исходная среда)	2	2	1	1.1	1.1	0.55	0.055	0.055	0.028
2	C, 1	1	1	0.4	0.55	0.55	0.55	0.028	0.028	0.028
	N, 2	2	2	2	0.44	0.44	0.122	-/-	-/-	-/-
	P, 3	-/-	-/-	-/-	0.55	0.55	0.55	-/-	-/-	0.005
3	C, 1	0.2	0.2	0.2	0.288	0.288	0.288	0.014	0.014	0.014
	N, 2	0.8	0.8	0.8	0.072	0.072	0.072	-/-	-/-	-/-
	P, 3	-/-	-/-	-/-	0.288	0.288	0.288	0.0035	0.0035	0.0035
4	C, 1	0.07	0.07	0.07	0.072	0.072	0.072	0.004	0.004	0.004
	N, 2	0.4	0.2	0.2	0.022	0.022	0.022	-/-	-/-	-/-
	P, 3	-/-	-/-	-/-	0.072	0.072	0.072	0.001	0.001	0.001

Быстрая остановка роста М-диссоцианта, вероятно, связана со способностью диссоциантов образовывать на среде с глюкозой муравьиную кислоту и высказано предположение о том, что у клеток псевдомонад есть два пути использования глюкозы: окисление до углекислого газа и воды и брожение (Милюк, Красильникова, 1999). Соотношение этих двух путей можно контролировать по изменению pH или по изменению соотношения количества поглощенных клетками глюкозы и фосфора. При добавлении мела рост М-диссоцианта увеличивается. Во всех дальнейших опытах определяли pH в динамике роста с целью установить возможного образования кислоты на среде с глюкозой двумя другими диссоциантами.

У всех трех диссоциантов в конце культивирования в среде остается значительное количество глюкозы, нитратов и фосфатов; состав популяции не меняется. На втором этапе составлены среды, в которых один из биогенных элементов стал бы лимитирующим.

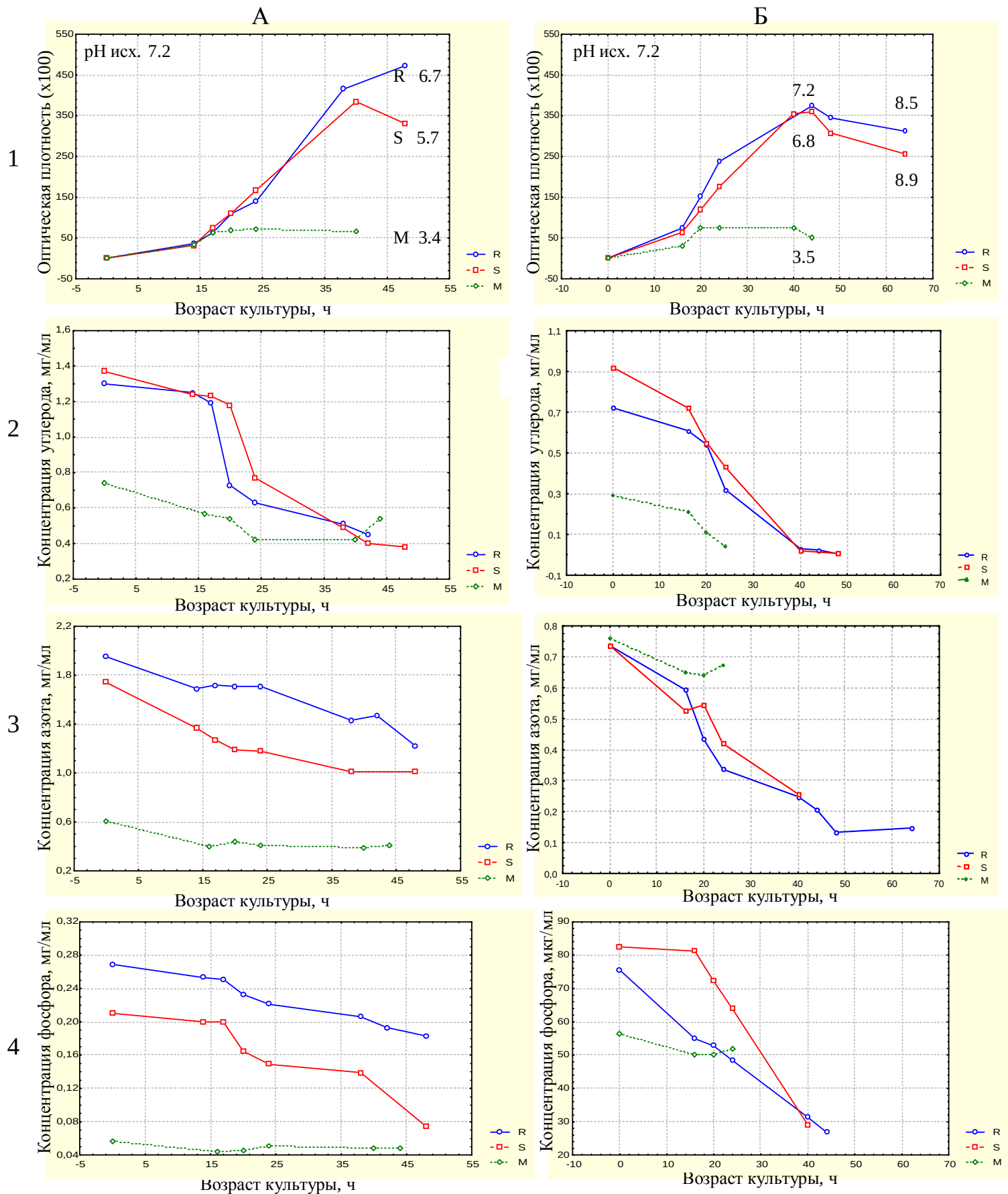


Рис.1. pH, рост диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* и остаточное содержание в среде углерода (1), азота (2) и фосфора (3): А – в исходной среде (серия опытов №1); Б – в среде с недостатком углерода (среда №1, серия опытов №2)

Рост на среде с недостатком углерода (рис. 1, Б). Содержание углерода в среде уменьшено в два раза по сравнению с исходной средой (таблица 1, серия опытов №2). Рост R- и S-диссоциантов становится одинаковым, при этом рост диссоцианта снижается по сравнению с исходной средой на 100 единиц. У М-диссоцианта рост не меняется. Все три диссоцианта достигают стационарного уровня, но углерод в среде остается во всех культурах. Потребление углерода S-диссоциантом выше, чем R. Максимальная скорость потребления углерода, азота и фосфора наблюдается между 16 и 24 ч, как и на исходной среде. Происходит постепенное потребление азота, однако потребление фосфора задерживается у клеток S-диссоцианта. До стационарной фазы (40ч) величина pH не меняется у R-диссоцианта. У S – в начале роста происходит подкисление среды и до стационарной фазы также не меняется. При снижении роста у этих диссоциантов происходит резкое подщелачивание среды, что, вероятно, связано с автолизом клеток. У М-диссоцианта pH постепенно снижается до 3.5.

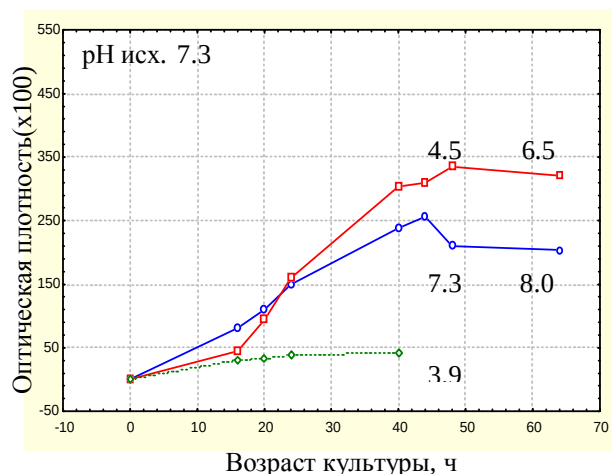


Рис.2. pH и рост диссоциантов на среде, ограниченной по азоту (серия опытов №2, среда №2)

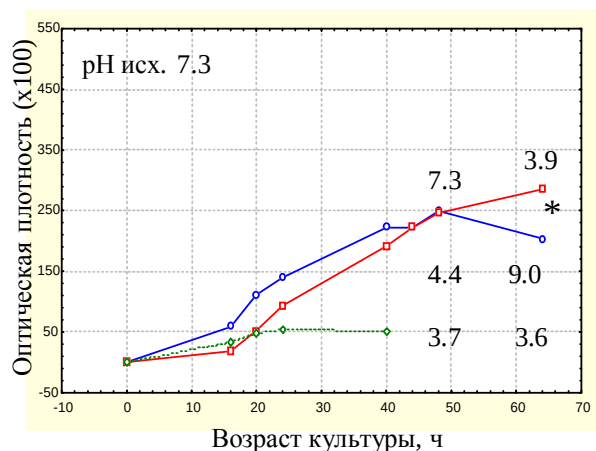


Рис.3. pH и рост диссоциантов на среде, ограниченной по фосфору (серия опытов №2, среда №3); * — изменение состава популяции

Рост диссоциантов в среде с недостатком азота (рис.2). Максимальный урожай R-становится ниже чем у S и на 200 единиц ниже, чем на исходной среде. У S- и М-рост не меняется по сравнению с исходной. У всех трех культур была достигнута стационарная фаза роста, но при этом азот исчерпан только у R-клеток, а при остановке роста происходит резкое подщелачивание среды.

Рост диссоциантов на среде с недостатком фосфора (рис.3). На среде с недостатком фосфора рост R- и S-диссоциантов такой же как и на среде с недостатком углерода, но абсолютные значения ниже на 100 единиц. У М-диссоцианта рост не меняется. В отличие от сред с недостатком углерода и азота на среде с недостатком фосфора состав популяции меняется: S-диссоциант в конце культивирования составляет только 55% популяции, а 45% — уже М-диссоциант. У всех диссоциантов в среде остается фосфор.

Можно предположить, что пороговая концентрация фосфора для S-диссоцианта выше, чем для М-диссоцианта. Поэтому оставшийся в среде после замедления роста клеток S-диссоцианта фосфор используется возникшими клетками М-диссоцианта, которые и подкисляют среду до pH 3.9.

Остановка роста из-за истощения ресурса наблюдается только у R-диссоцианта на среде с недостатком азота. Поэтому провели следующую серию экспериментов, где концентрации биогенных элементов были еще уменьшены (таблица 1, серия опытов №3).

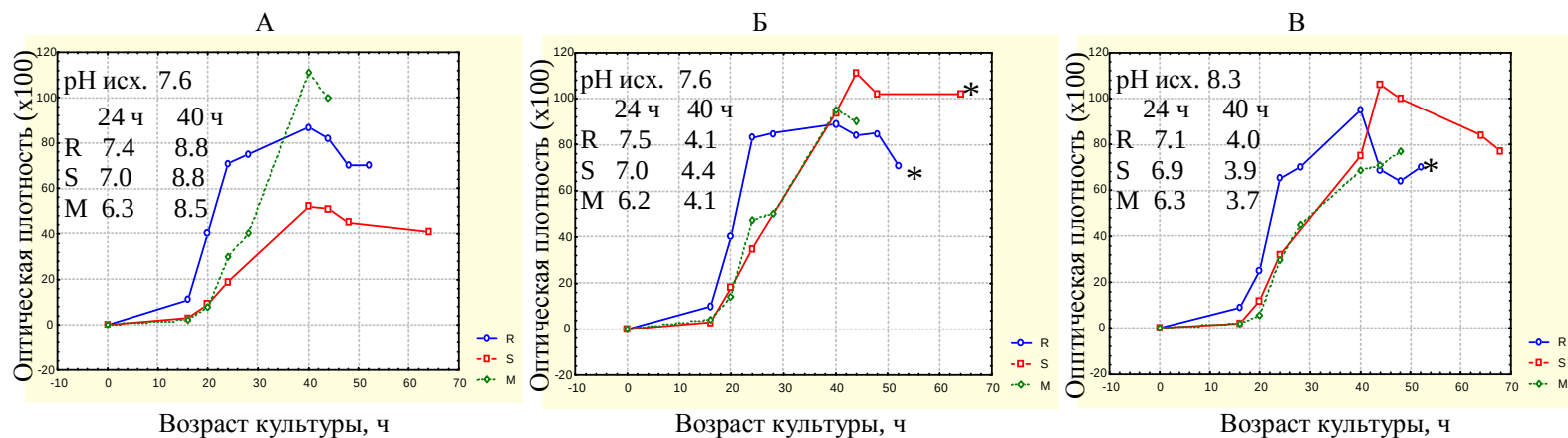


Рис.4. pH среды и рост диссоциантов в серии опытов №3 на средах ограниченных по: А – углероду (среда №1), Б – азоту (среда №2), В – фосфору (среда №3); * — изменение состава популяции (объяснение см. в тексте)

В данной серии опытов в конце культивирования состав первоначально однородной популяции изменился на средах с недостатком азота и фосфора: в культуре R-диссоцианта возникают клетки S-диссоцианта, а в культуре S-диссоцианта клетки М-диссоцианта. У М-диссоцианта изменения состава популяции не наблюдается и рост на среде с недостатком углерода (рис.4) увеличивается в 2 раза по сравнению с исходной средой, хотя концентрация глюкозы составляет всего 0.2 %, а реакция среды становится щелочной. Также на этой среде у всех трех диссоциантов наблюдалось наибольшее увеличение роста при добавке углерода, т.е. этот биогенный элемент лимитирует рост бактерий.

Изменение состава популяции монокультуры может происходить только в том случае, когда возникший вариант в данных условиях имеет селективные преимущества перед исходным диссоциантом, при этом среда должна содержать еще достаточное для его роста количество биогенных элементов.

Поэтому, чтобы избежать расщепления исходной популяции на варианты была проведена еще одна серия экспериментов, в которой содержание глюкозы, нитрата и фосфата в среде были еще уменьшены (табл. 1, серия 4).

Во всех опытах этой серии в конце культивирования исходные диссоцианты составляют 100% популяции, а рост достигает всего десятки единиц нефелометра. Рост М-диссоцианта соизмерим или даже выше, чем у двух других диссоциантов.

Заклячая четвертую главу можно обобщить результаты экспериментов относительно каждого диссоцианта. R-диссоциант. Состав популяции R-диссоцианта не меняется при достаточной для роста концентрации биогенных элементов (серии опытов №№ 1 и 2) и при очень низкой их концентрации (серия опытов № 4), когда количество генераций клеток мало, чтобы изменился состав популяции.

В серии опытов № 3 при недостатке в среде азота или фосфора в популяции R-диссоцианта появляются колонии S-диссоцианта, составляющие в конце процесса культивирования 30 – 40%, при этом pH среды снижается до 4. В опытах со смешанными популяциями диссоциантов в монокультуре R-диссоцианта также появляются колонии S-диссоцианта на 6 средах из 14.

Из трех диссоциантов R обладает максимальной скоростью роста: во всех вариантах сред, кроме серии опытов № 4, в первые часы рост R-диссоцианта наибольший.

Он самый требовательный к содержанию в среде глюкозы: в конце культивирования при уменьшении ее концентрации в среде с 2% до 1% рост уже снижается, а при 0.2% становится даже ниже, чем у M-диссоцианта.

Вероятно, из трех диссоциантов пороговая концентрация основных биогенных элементов в среде для R-диссоцианта наибольшая. Поэтому на средах, ограниченных азотом или фосфором, но содержащих достаточное количество углерода (серия № 3) S-диссоциант, у которого ниже пороговые концентрации основных биогенных элементов, постепенно вытесняет из популяции исходный R-диссоциант, и подкисление сред обусловлено уже ростом клеток S-диссоцианта.

Потребление основных биогенных элементов R-диссоциантом в серии опытов № 1 и более четко в серии опытов № 2 происходит приблизительно с одинаковой скоростью, т.е. отношение потребленного углерода к фосфору мало меняется в динамике роста, также как и pH сред.

Следовательно, у клеток R-диссоцианта преобладает окислительный путь использования глюкозы, хотя полное отсутствие брожения не доказано. Исключение составляют среды, ограниченные азотом и фосфором в серии опытов № 4, где происходит подкисление среды без изменения состава популяции. Возможно, в этом случае и появляются клетки S-диссоцианта, но из-за очень низкого роста бактерий они не выявляются.

S-диссоциант. В популяции S-диссоцианта возникают M-колонии на средах с недостатком фосфора в серии опытов № 2 и с недостатком азота в серии опытов № 3. Вероятно, для клеток M-диссоцианта пороговые концентрации основных биогенных элементов в среде являются минимальными и они растут при таких низких их концентрациях, при которых клетки S-диссоцианта расти не могут. Поэтому S-диссоциант постепенно вытесняется M-диссоциантом.

Только у S-диссоцианта в динамике роста наблюдается перегиб в кислотности среды в серии опытов № 2: pH снижается до 6.8, 4.5 и 4.4 при ограничении углеродом, азотом и фосфором соответственно. Одновременно на

средах со сниженной концентрацией углерода и азота в первые 16 ч роста наблюдается быстрое потребление углерода и очень медленное – фосфора, а затем снижение количества основных биогенных элементов в среде происходит приблизительно с одинаковой скоростью. Следовательно, у клеток S-диссоцианта происходит переключение с брожения на окислительный путь использования глюкозы. На среде с недостатком фосфора уже в первые 16 ч роста его концентрация резко снижается и только потом начинается потребление глюкозы. В сериях опытов № 3 и № 4, где концентрация глюкозы 0.2 % и кислоты может образоваться мало, подкисление среды S-диссоциантом не наблюдается.

М-диссоциант. Ни на одной из 10 испытанных сред не происходит вытеснения из популяции М-диссоцианта, что связано с тем, что для него пороговые концентрации основных биогенных элементов являются минимальными, т.е. клетки М-диссоцианта имеют селективное преимущество на средах с низкой концентрацией питательных веществ.

У М-диссоцианта преобладает брожение, образующаяся муравьиная кислота подкисляет среду в сериях опытов № 1 и № 2 уже к 24 ч до pH 3.3 – 3.9, что приводит к остановке роста бактерий. Поэтому из трех диссоциантов рост М самый маленький. Только при концентрации глюкозы 0.2 % (серия опытов № 3) рост М-клеток максимален и выше, чем R- и S-диссоциантов. Полностью исключить возможность дыхания клеток М-диссоцианта нельзя, т.к. бактерии растут в аэробных условиях на качалке. Таким образом, из трех диссоциантов *P.aeruginosa* K-2 наиболее аэробный тип обмена веществ у R-диссоцианта, а наименее аэробный – у М-диссоцианта, S-диссоциант занимает промежуточное положение и обладает самым лабильным метаболизмом. R-диссоциант имеет селективное преимущество при более высоком содержании в среде основных биогенных элементов, а М-диссоциант – при самых низких концентрациях.

Следует отметить, что ни у одного из диссоциантов не изменяется состав популяции при снижении в среде концентрации углерода, т.е. глюкоза наиболее быстро исчерпывается из среды.

При снижении роста R- и S-диссоциантов происходит резкое подщелачивание среды до pH 8.5 – 9.0, что связано, вероятно, с автолизом клеток. Этого не наблюдается при сильно кислых значениях pH. Может быть у исследуемого штамма *P.aeruginosa* мало количество или низкая активность кислых протеаз, поэтому при низких значениях pH автолиз клеток происходит очень медленно.

Глава 5. Влияние углеродного, азотного и фосфорного питания на рост R-, S- и М-диссоциантов *P.aeruginosa* в смешанных культурах

Изучение динамики роста смешанных культур в зависимости от отношения в среде азота к фосфору. Известно, что соотношение в среде азота и фосфора регулирует структуру сообщества одноклеточных водорослей (Левич и др., 1997), поэтому были проведены опыты со смешанной культурой трех диссоциантов пседомонад: концентрация глюкозы во всех средах оставалась на постоянном

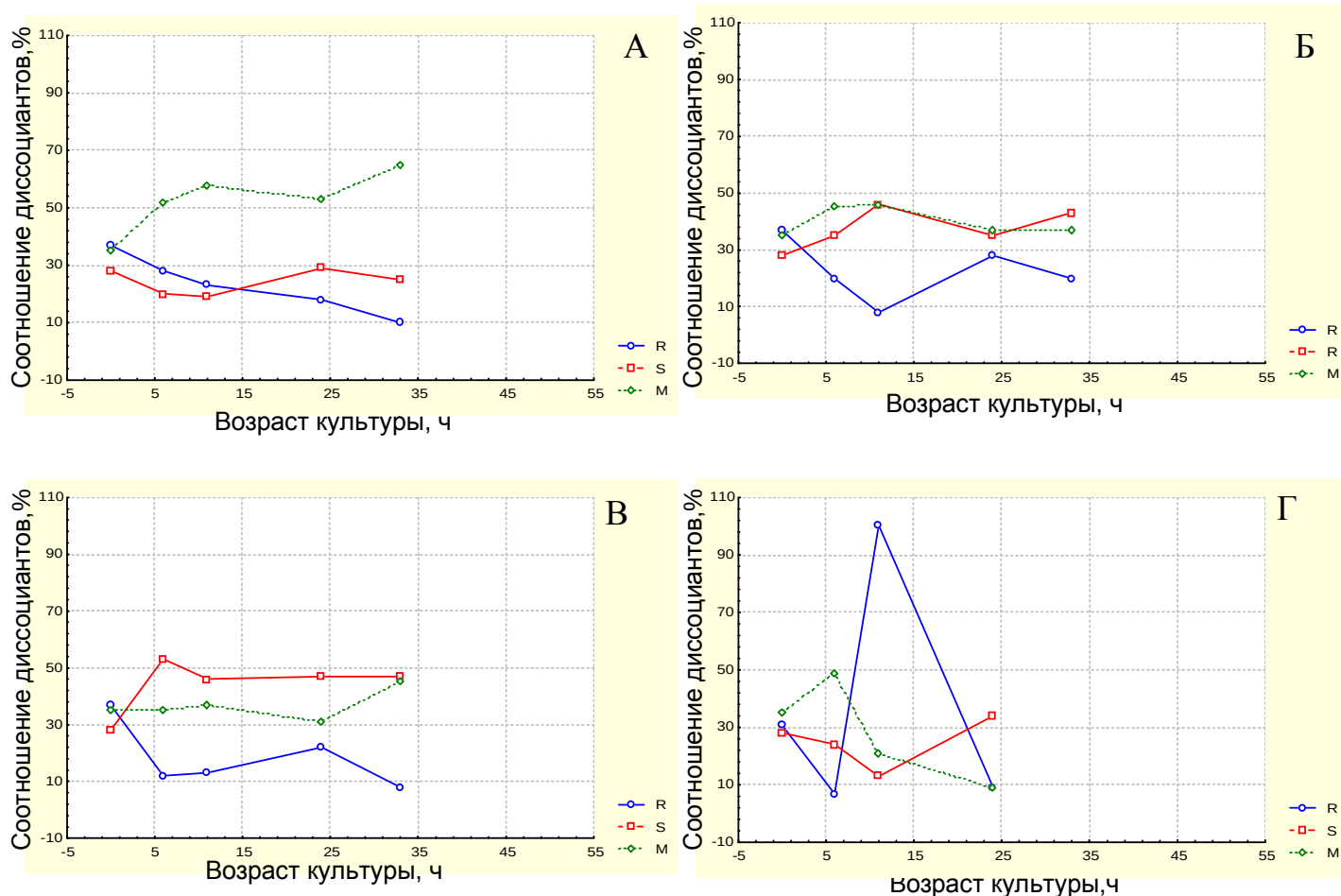


Рис 5 Динамика изменения соотношения диссоциантов в поликультуре при росте на средах с различным соотношением азота и фосфора .

уровне – 3.8%; концентрацию нитратов меняли от 0.05 до 0.5% и фосфатов от 0.005 до 0.03%.

В динамике роста изучали влияние соотношения азота к фосфору на рост диссоциантов в смешанной культуре. При постоянной концентрации глюкозы 3.8% меняли концентрацию нитратов от 0.05 до 0.5% и фосфатов от 0.005 до 0.03%.

Пробы отбирали через 6, 11, 24 и 33 часа культивирования.

В предыдущих опытах с поликультурами диссоцианты смешивали в посевном материале в равных количествах, однако оказалось, что в популяции доминировали М-клетки, поэтому в дальнейшем R-, S- и М-диссоцианты смешивали в соотношении 2:2:1 соответственно.

В первые 6 ч роста (рис.5) во всех четырех вариантах сред популяция изменяется в сторону увеличения доли М-диссоцианта. Хорошо известно, что в лаг-фазе многие клетки посевного материала отмирают. Как показано при исследовании

роста диссоциантов *P.aeruginosa* К-2 в монокультурах, отмирание бактерий сопровождается резким подщелачиванием среды, а М-диссоциант, который наиболее устойчив при высоких значениях рН, в таких условиях имеет селективное преимущество. Также возможно, что клетки М-диссоцианта могут использовать продукты автолиза.

При максимальной в опыте концентрации биогенных элементов (рис.5, Г) после 6 часов в популяции начинает доминировать R-диссоциант, а к концу культивирования, когда питательные вещества исчерпываются, преимущество получает S-диссоциант, как и в монокультурах.

При минимальной в опытах концентрации биогенных элементов в популяции преобладает М-диссоциант (рис.5, А), как и в монокультурах.

Сравнение роста диссоциантов при максимальном отношении в среде азота к фосфору ($N/P=80$, рис.5, Б) и минимальном ($N/P=1.3$, рис.5, В) показывает, что состав популяции при этом почти не различается.

Изучение динамики роста смешанных культур в зависимости от отношения в среде углерода к азоту Во всех трех средах фосфат оставался на постоянном уровне 0.005%. Варьировали глюкозу от 0.1% до 0.3%, нитрат от 0.022% до 0.036% на всех вариантах сред в популяции к концу культивирования доминирует М-диссоциант и составляет 80-90% популяции, хотя начальное соотношение диссоциантов в популяции было одинаковым.

В последней серии опытов с поликультурами среды составляли таким образом, чтобы два опыта имели различные реальные концентрации ресурса, но одинаковое соотношение углерода к азоту и азота к фосфору (табл.2).

В каждой паре опытов концентрация всех биогенных элементов отличалась в 4 раза. Условно их можно назвать «богатая» (четные номера) и «бедная» (нечетные номера) среды. Смеси составляли попарные и всех трех диссоциантов. Контролем служил рост монокультур на соответствующих средах. В отличие от всех предшествующих опытов с поликультурами количество клеток в посевном материале составляло не 10^9 кл/мл, а 10^7 кл/мл.

Пропорциональность роста и ресурсов. Рассчитали отношение глюкозы к азоту и фосфору (табл. 2). Концентрация фосфора принята за единицу. Различия урожая по азоту между «бедной» и «богатой» средой было 2 –2.5 раза, а не 3 – 4 раза как предполагалось. Поэтому для анализа было взято изменение оптической плотности в зависимости от количества глюкозы в среде.

Так как при росте на каждой из испытанных сред на стационарной стадии роста (если она была достигнута) или в момент достижения максимального роста урожай всех поликультур (RS, RM, SM и RSM) был приблизительно одинаковым, то для сравнения были взяты средние значения оптической плотности. Как видно из данных табл. 2 при увеличении концентрации глюкозы в 4 раза на большинстве сред урожай также возрастает в 4 раза.

Таблица 2. Состав сред, соотношения C/N и N/P и среднее значение оптической плотности в опытах с поликультурами в серии опытов № 6

№ среды	Состав среды, %			Соотношение		Среднее значение оптической плотности (x 100)
	Глюкоза	Нитрат	Фосфат	C/N	N/P	
1	0.10	0.025	0.005	1.90	3.5	30
2	0.40	0.100	0.020	1.90	3.5	120
3	0.10	0.010	0.005	4.40	1.5	30
4	0.40	0.043	0.020	4.40	1.5	120
5	0.03	0.025	0.005	0.57	3.5	10
6	0.12	0.100	0.020	0.57	3.5	30
7	0.03	0.011	0.005	1.33	1.5	15
8	0.12	0.043	0.020	1.33	1.5	55
9	0.20	0.072	0.005	1.30	10.0	60
10	0.80	0.288	0.020	1.30	10.0	200
11	0.40	0.144	0.005	1.30	20.0	120
12	1.60	0.577	0.020	1.30	20.0	225
13	0.30	0.025	0.005	5.70	3.5	60
14	1.20	0.100	0.020	5.70	3.5	130

Влияние добавок. Для второго способа анализа лимитирующих факторов — посредством действия добавок — были взяты опыты, в которых не наблюдалось диссоциации в конце процесса культивирования. Более четкие результаты получены для монокультур. Лимитирующими концентрациями глюкозы для роста R-, S- и M-диссоциантов являются соответственно 0.2, 0.4 и 0.8 %.

В поликультурах дополнительное внесение глюкозы также вызывает стимуляцию роста бактерий. Так на средах с 0.03% глюкозы (среды № 5 и № 7) усиливается рост всех смесей диссоциантов, на среде с 0.1% глюкозы (среда № 1) возобновляется рост RS смеси, на среде 0.2 % глюкоза стимулирует рост RM и RSM поликультур, на средах с 0.4% глюкозы возобновляется рост RS и SM смесей (среда № 4) и RM и RSM (среда № 11).

Дополнительное внесение нитрата стимулирует рост только SM смеси (среда № 3). Таким образом, метод добавок более эффективен на нечетных средах, т.е. более «бедных».

В данной серии опытов выявлена лимитирующая концентрация нитрата и глюкозы. Так, 0.01% нитрата ограничивает рост R- и S-диссоциантов, 0.043 % —

М-диссоцианта. Лимитирующими концентрациями глюкозы для роста R-, S- и М-диссоциантов являются соответственно 0.2, 0.4 и 0.8 %.

Состав популяции (табл.3). R-диссоциант становится доминирующим в смесях с S, М и в тройной смеси, что вероятно связано с минимальной потребностью R-клеток в глюкозе. В смесях S и М возможны оба варианта вытеснения. Вероятно, такие эффекты, а их большинство объясняются соотношением потребностей и ограничениями по углероду. В монокультурах наиболее сильные изменения наблюдаются в популяции R-диссоцианта: на 6 средах из 14 возникает S-диссоциант, а на более бедных средах количество М-диссоцианта выше. Пороговая концентрация биогенных элементов в среде для S-диссоцианта ниже, чем для R, поэтому он вытесняет из популяции исходный R-диссоциант. Аналогичные результаты получены в серии опытов № 3.

Таблица 3. Изменение количества каждого из диссоциантов в популяции на разных средах в конце культивирования по сравнению с начальным (%)

№ сред ы	Состав поликультур											
	RS			RM			SM			RSM		
	R	S	M	R	S	M	R	S	M	R	S	M
1	-4	+4	0	-7	+32	-25	0	-7	+7	+15	-1	-14
2	+15	-15	0	+18	0	-18	0	+15	-15	+29	-24	-5
3	+15	-15	0	+12	0	-12	0	-21	+21	+8	-1	-7
4	+12	-12	0	+12	0	-12	0	+10	-10	+21	-5	-16
5	+18	-18	0	+6	+11	-17	0	-13	+13	+21	-24	+3
6	+2	-2	0	+2	0	-2	0	-9	+9	+4	-2	-2
7	+14	-14	0	+3	0	-3	0	-21	+21	+27	-10	-17
8	0	0	0	+29	0	-29	0	+11	-11	+41	-17	-24
9	+36	-36	0	+38	0	-38	0	-2	+2	+46	-33	-13
10	+22	-22	0	+17	0	-17	0	+13	-13	+36	-23	-13
11	+18	-18	0	+27	0	-27	0	+8	-8	+17	-7	-10
12	+5	-5	0	+24	0	-24	0	+17	-17	+31	-20	-11
13	+27	-27	0	+31	0	-31	0	+22	-22	+36	-26	-10
14	+1	-1	0	+16	0	-16	0	+33	-33	+9	-7	-2

Глава 6. Потребности диссоциантов *P.aeruginosa* в углероде, азоте и фосфоре

Были рассчитаны потребности одной клетки диссоциантов *P.aeruginosa* в биогенных элементах (таблица 4). Потребности в углероде и азоте различаются и увеличиваются в ряду R-, S-, M-диссоциант. Аналогичная зависимость была описана и в работе (Максимов и др., 2001) для диссоциантов данного микроорганизма. Наше исследование показывает, что в популяции бактерий *P.aeruginosa* К-2 существует функциональная дифференциация, одним из аспектов которой является различие потребностей диссоциантов в ресурсах среды. Таким образом, уже на уровне популяции обнаруживаются механизмы тонкого регулирования соответствия конкретным условиям, что обеспечивает существование популяции как целого в меняющихся условиях природной среды.

Таблица 4. Потребности диссоциантов *P.aeruginosa* в углероде, азоте и фосфоре (усредненные значения по двум методам) (10^{-10} мг ресурса на клетку).

Диссоциант	Потребности					
	C	σ^*	N	σ	P	σ
R	0.29	0.13	0.2	0.11	0.032	0.023
S	1.08	0.51	0.77	0.53	0.11	0.11
M	2.0	1.37	1.39	0.52	0.16	0.09

* σ – среднее квадратичное отклонение

Мнение Г.А.Заварзина (1996) о том, что в природе бактериальное сообщество организуется таким образом, чтобы ресурс был потреблен полностью, согласуется с результатами настоящего исследования. В настоящей работе изучено влияние исходных концентраций в среде основных биогенных элементов на рост в моно- и поликультурах трех диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* К-2 и определены потребности клеток в углероде, азоте и фосфоре.

Заключение

Ранее подробное изучение сообществ микроводорослей показало (Левич и др., 1997), что процесс роста, обусловленный потребностями клеток в биогенных элементах, складывается из трех стадий: поглощение веществ клетками без увеличения их численности; деление клеток при одновременном потреблении веществ из среды; деление клеток за счет внутренних запасов питательных веществ.

В настоящей работе многократные опыты показали, что при отсутствии углерода в среде диссоцианты *P.aeruginosa*, в отличие от микроводорослей, не растут; при отсутствии азота и фосфора (незначительный рост составляет всего 4-7 единиц нефелометра, что соответствует нулю клеток в масштабе используемых калибровочных кривых). Поэтому в работе использовали косвенный метод

измерения потребностей клеток в субстратных ресурсах по убыли субстрата из среды.

В отличие от микроводорослей у псевдомонад в первоначально однородной культуре в результате геномных перестроек с высокой частотой возникают диссоцианты (Андреева, 2001). Если в данных условиях возникший диссоциант обладает более высокой скоростью роста, чем исходный, то происходит постепенное вытеснение из популяции исходного варианта, а культура становится смешанной.

Разница в скоростях роста диссоциантов определяется различиями их потребностей в основных биогенных элементах, которые в свою очередь в большей степени обусловлены особенностями энергетического обмена.

В отличие от микроводорослей, у которых только один тип обмена веществ на минеральной среде – фотосинтез, у исследуемого штамма псевдомонад обнаружено существование двух путей использования глюкозы: окисление и брожение. Соотношение этих двух процессов определяли по изменению рН и изменению соотношения потребленной глюкозы к потребленному фосфору. Показано, что наиболее аэробный тип обмена у R-диссоцианта, наиболее анаэробный – у M-диссоцианта. Впервые установлено, что у S-диссоцианта в динамике роста происходит переключение с брожения на окислительный путь использования глюкозы.

Основываясь на данных о количествах потребленного вещества, полученных с помощью химического анализа и метода добавок на стационарной фазе роста определены потребности диссоциантов в основных биогенных элементах, которые различаются и увеличиваются в ряду R, S, M.

Известно, что эффективность запасаения энергии при брожении ниже, чем при дыхании, возможно, поэтому потребность именно M-диссоцианта в глюкозе наибольшая из трех диссоциантов.

В работе впервые выявлены закономерности изменения состава популяции монокультур диссоциантов псевдомонад на стационарной фазе роста в зависимости от начального содержания питательных веществ в среде. Изменение состава популяции происходит в том случае, когда скорость роста исходного диссоцианта снижается из-за истощения одного из ресурсов, а возникший диссоциант, обладающий способностью достигать более низкой пороговой концентрацией этого ресурса, может продолжать расти на такой среде. Так, R-диссоциант вытесняется S-диссоциантом на средах, ограниченных азотом или фосфором (серия опытов № 3); S-диссоциант замещается M-диссоциантом также на средах, ограниченных азотом (серия опытов № 3) или фосфором (серия опытов № 2). Состав популяции M-диссоцианта, не изменяется ни в одном из опытов; вероятно, пороговые концентрации основных биогенных элементов для него минимальны. Состав популяции монокультур не изменяется на богатых средах, где остановка роста обусловлена не истощением питательных веществ (серия

опытов № 1 и 2), и на очень бедных средах, где у бактерий ограничено число поколений (серия опытов № 4).

Закономерности, полученные на монокультурах бактерий, сохраняются и в смешанных популяциях, содержащих как попарные комбинации R, S и M-диссоциантов, так и всех трех диссоциантов, при этом важную роль играют количество и соотношение диссоциантов в посевном материале. Из трех диссоциантов *P.aeruginosa* R-диссоциант имеет селективные преимущества на богатых питательных средах, а M-диссоциант – на бедных средах. Аналогичные закономерности получены для трех диссоциантов *Rhodococcus rubropertinctus* (Милюк, Егоров.1991). Вероятно, в гетерогенной популяции бактерий R-диссоциант можно рассматривать как г- стратег, а M- диссоциант – как к- стратег.

Таким образом, расщепление популяции бактерий на диссоцианты позволяет виду в целом с наибольшей полнотой использовать имеющиеся пищевые ресурсы. В естественных местах обитания диссоцианты одного вида бактерий играют роль разных физиологических групп в сложившихся сообществах бактерий. В лабораторных условиях способность бактерий к диссоциации легче обнаружить на стационарной фазе роста, когда происходит постепенное истощение ресурсов из среды. Возможно, что образование уксусной кислоты *Escherichia coli* именно на стационарной фазе (Головлев, 1999) обусловлено изменением состава популяции.

В целом в настоящей работе собран большой экспериментальный материал для дальнейшего изучения внутривидовых отношений в популяции *Pseudomonas aeruginosa* при помощи математических моделей.

Полученные результаты позволяют рекомендовать состав сред, дающих селективные преимущества каждому из диссоциантов, т.е. существует возможность управлять составом сообщества и предсказывать изменения соотношений диссоциантов в популяции в зависимости от начального количества биогенных элементов в среде.

ВЫВОДЫ

1. Различные начальные концентрации ресурсов в среде приводят к изменению соотношения диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* K-2 в моно- и смешанных культурах на стационарной фазе роста: на богатых средах доминирует R-диссоциант, на бедных – M-диссоциант.

2. У диссоциантов *P.aeruginosa* K-2 обнаружены различия в соотношении двух путей использования глюкозы: окисление и брожение; окисление доминирует у R-диссоцианта, брожение – у M-диссоцианта, S-диссоциант обладает наиболее лабильным энергетическим процессом.

3. Потребности R-, S- и M- диссоциантов *P.aeruginosa* в глюкозе, нитратах и фосфатах различаются и увеличиваются в ряду R, S, M; потребности в глюкозе зависят от пути ее использования.

4. Количество и соотношение диссоциантов в посевном материале изменяют состав популяции на стационарной фазе роста.

5. Расщепление популяции бактерий на диссоцианты позволяет виду в целом с наибольшей полнотой использовать пищевые ресурсы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Максимов В.Н., Милько Е.С., Ильиных И.А. Влияние углеродного, азотного и фосфорного питания на рост R-, S- и M- диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. 1999. Т. 68, № 2. С.206 – 210.

2. Максимов В.Н., Милько Е.С., Ильиных И.А. Влияние углеродного, азотного и фосфорного питания на рост R-, S- и M- диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* в смешанных культурах // Микробиология. 1999. Т. 68, № 4. С.485 – 490.

3. Ильиных И.А., Милько Е.С., Максимов В.Н. Влияние углеродного, азотного и фосфорного питания на рост диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // VI Междунар. конф. аспирантов и студентов “Ломоносов 99”, 20 – 23 апреля 1999 (в печати).

4. Ильиных И.А., Милько Е.С., Максимов В.Н. Влияние углеродного, азотного и фосфорного питания на рост диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Междунар. Конф. “Проблемы экологии и физиологии микроорганизмов (к 100-летию со дня рождения профессора Е.Е.Успенского), Биологический факультет МГУ, 21 декабря 1999. М., Диалог-МГУ, 2000, С.64.

5. Милько Е.С., Ильиных И.А. Влияние пониженных концентраций углерода, азота и фосфора в среде на динамику роста трех диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. 2001. Т. 70, № 5. С.607 – 610.