

УДК 579.841.11.017.6
(с) 1999 г.

Максимов В.Н., Милько Е.С., Ильиных И.А.
Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

ВЛИЯНИЕ УГЛЕРОДНОГО, АЗОТНОГО И ФОСФОРНОГО ПИТАНИЯ НА РОСТ R-, S- И M-ДИССОЦИАНТОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

МИКРОБИОЛОГИЯ, 1999, том 68, №2, с.206-210
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ
Поступила в редакцию 04.06.98 г.

Исследовали влияние глюкозы, нитрата и фосфата на рост R-, S- и M-диссоциантов углеводородокисляющего штамма *Pseudomonas aeruginosa* K-2 в стационарной фазе роста. Для описания изучаемой зависимости использовали уравнение Митчерлиха. Показано, что S-диссоциант менее требователен к содержанию глюкозы, а M-диссоциант характеризуется более низкими потребностями в азоте и фосфоре. Это подтвердилось также при изучении совместного действия глюкозы, нитрата и фосфата по плану полного факторного эксперимента 3х3х3. Установлено, что при недостатке в среде азота и фосфора следует ожидать преобладание роста M-диссоцианта, а при оптимальных соотношениях биогенных элементов селективное преимущество получит S-диссоциант.

Ключевые слова: состав популяции, диссоциация, состав среды, факторный эксперимент, уравнение Митчерлиха, коэффициент действия, *Pseudomonas aeruginosa*.

Представители рода *Pseudomonas* широко используются в различных биотехнологических процессах: в химических производствах, в биогидрометаллургии, в производстве химических препаратов для сельского хозяйства, при получении полимеров, для повышения нефтеотдачи пластов, при переработке и удалении отходов и веществ, загрязняющих среду, в том числе нефтяных загрязнений [1, 2].

Однако эффективность применения бактерий, в том числе псевдомонад, в производстве может снижаться за счет появления в популяции неактивных диссоциантов. Диссоциативные переходы бактерий обуславливаются геномными перестройками, которые происходят с высокой частотой (10^{-2} - 10^{-4} на одно клеточное деление) и оказывают плеiotропным действием. Это определяет постоянные и обратимые изменения многих морфологических и физиолого-биохимических свойств клеток: таких как способность к деградации и синтезу практически ценных веществ, устойчивость к внешнему воздействию, потребность в питательных веществах [3].

В монографиях, посвященных псевдомонадам, вопрос о диссоциации или не рассматривается [4], или нет данных о влиянии состава среды на рост диссоциантов [1, 5, 6].

Цель настоящей работы - изучение влияния основных биогенных элементов (C, N, P) на рост R-, S-, M-диссоциантов углеводородокисляющего

штамма *Pseudomonas aeruginosa* К-2. Ранее нами было показано, что эти диссоцианты различаются морфологией колоний, ультратонким строением клеток, скоростью роста: на средах с углеводородом наибольшее количество клеток образует S-диссоциант, а на богатой органической среде МПБ + сусло - R-диссоциант [7]. Селективные преимущества R-клетки имеют при УФ-облучении, высокой аэрации и температуре, при различных способах хранения, S-клетки - при понижении активной кислотности среды, M-клетки - при снижении аэрации и температуры культивирования, повышенном осмотическом давлении [8, 9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для выращивания псевдомонад использовали среды, содержащие следующие компоненты:

глюкозу, NaNO_3 , NaH_2PO_4
 $2\text{H}_2\text{O}$, KCl , MgSO_4

$7\text{H}_2\text{O}$. Варьировали концентрацию глюкозы от 0.1 до 7%, нитратов от 0.01 до 2%, фосфатов от 0.001 до 0.5%. Количество остальных веществ было постоянно: KCl - 0.06%, MgSO_4

$7\text{H}_2\text{O}$ -
 0.02%.

Бактерии культивировали в пробирках на 50 мл с 10 мл среды на качалке (180 об/мин) при температуре 30°C до стационарной фазы роста. В качестве посевного материала использовали односточные культуры диссоциантов псевдомонад, выращенных на плотной среде МПБ + сусло (1 : 1).

Рост бактерий оценивали нефелометрически по плотности культуры. Плотности инокулята выравнивали по нефелометру. Показания нефелометра для удобства расчетов умножали на 100. Соотношение диссоциантов в популяции определяли по морфологии колоний рассеиваем на плотную среду МПБ + сусло.

В работе использовали уравнение Митчерлиха в форме так называемого 2-го приближения [10,11]:

$$y = A[1 - e^{-bx}]e^{-kx},$$

где y - плотность культуры в стационарную фазу роста, x - концентрация питательного компонента. Значения эмпирических коэффициентов A , b и k определяли с помощью стандартной программы нелинейной регрессии. В этом уравнении коэффициент h (названный Митчерлихом "коэффициентом действия") характеризует удельный прирост биомассы при возрастании x в лимитирую-

щей области концентраций, а коэффициент k - ингибирование роста при избытке компонента x .

Для описания зависимости роста культуры от совместного действия трех факторов использовали так называемую мультипликативную модель, известную также, как формула Бауле (уравнение 2) [10]:

$$y = A[1 - \exp(-G)]x \\ x[1 - \exp(-W)][1 - \exp(-P)]L$$

где G , N , P - концентрации в среде глюкозы, нитрата и фосфата соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были выяснены особенности отклика R -, S - и M -диссоциантов на изменение содержания в среде трех основных компонентов - глюкозы, нитрата ($NaNO_3$) и фосфата (NaH_2PO_4). При

этом, естественно, наибольший интерес представляла область лимитирования роста каждым из этих компонентов, так как именно в этой области можно было обнаружить различия в питательных потребностях каждого из диссоциантов.

На первом этапе исследования были изучены зависимости роста диссоциантов в стационарной фазе роста от каждого из трех выбранных компонентов среды при раздельном культивировании. Ранее было установлено [7], что на богатой органической среде (МПБ + сусло) стационарная фаза роста диссоциантов исследуемого штамма достигается ко вторым суткам. Поэтому в опытах определяли плотность культуры на 1-е, 2-е и 3-и сут роста бактерий. Соотношение количества клеток псевдомонад в 1 мл и показаний нефелометра следующее: $lgO = 140$; $lg8.5 = 100$. Было поставлено несколько серий опытов, в которых содержание изучаемого компонента варьировали в достаточно широких пределах, с тем чтобы определить не только область лимитирования роста, но и по возможности оценить область избыточных концентраций, ингибирующих рост культуры. Результаты опытов представлены в виде экспериментальных точек на рис. 1. На этом же рисунке изображены кривые, рассчитанные по уравнению Митчерлиха(1).

В табл. 1 приведены значения коэффициентов L , B и k для каждого из трех диссоциантов.

Таблица 1. Значения коэффициентов уравнения Митчерлиха для R -, S - и M -диссоциантов *P. aeruginosa*

Компоненты среды	Коэффициент	Диссоцианты		
		R	S	M
Глюкоза	L	185.3	133.8	126.6
	h	0.568	1.289	0.698
	k	0.0133	0.0066	0.0061

Нитрат	<i>A</i>	144.0	130.3	83.7
	<i>h</i>	5.885	6.361	15.606
	<i>k</i>	0.0385	0.0614	0.0688
Фосфат	<i>A</i>	131.9	124.9	81.0
	<i>h</i>	118.4	133.2	271.2
	<i>k</i>	-	-	-

Значение коэффициента действия *h* для глюкозы в два раза выше у S-диссоцианта по сравнению с двумя другими. Коэффициенты ингибирования *k* для глюкозы статистически мало отличаются у всех трех диссоциантов *P. aeruginosa*, а их уровень значимости гораздо ниже, чем у коэффициентов *h*.

Коэффициент действия для нитрата наиболее высокий у M-диссоцианта, для R- и S- в 2.5 раза ниже. Коэффициенты ингибирования для нитрата, как и для глюкозы, статистически мало отличаются у всех трех диссоциантов.

Наибольшие значения имеют коэффициенты действия фосфата, причем коэффициент для M-диссоцианта в два раза превышает соответствующие значения для R-, S-диссоциантов, вследствие этого M-клетки достигают максимального уровня роста при более низком содержании в среде фосфата, чем R- и S-. У всех трех диссоциантов оказались незначимы коэффициенты ингибирования для фосфата. Иначе говоря, даже самые большие концентрации фосфата, испытанные в наших экспериментах, не подавляли рост культур. Вероятно, это связано с тем, что в средах некоторое количество фосфатов выпадает в осадок.

Таким образом, наибольшие различия в коэффициентах *h* и *k*, отражающие разницу в индивидуальной реакции R-, S- и M-клеток *P. aeruginosa* на изменение состава среды, обнаруживаются для M-диссоцианта по сравнению с двумя остальными в их отношении к нитрату и фосфату. Различия между R- и S-клетками в их отношении к фосфату и нитрату практически несущественны.

Рассевы культур на плотную среду показали, что исходные диссоцианты составляют 98-100% популяции.

Для уточнения величин коэффициентов действия и выяснения их возможной зависимости от взаимных соотношений в среде глюкозы, нитрата и фосфата была поставлена серия опытов, в которых концентрации каждого из компонентов варьировали на трех уровнях в лимитирующей области, выявленной в описанных выше однофакторных экспериментах. Схема эксперимента и результаты опытов представлены в табл. 2.

Таблица 2. Зависимость роста R-, S- и M-диссоциантов *P. aeruginosa* от соотношения в среде глюкозы, нитрата и фосфата

Номер опыта	Концентрация компонентов среды, %			Оптическая плотность(х100)		
	Глюкоза	Нитрат	Фосфат	R	S	M
1	0.2	0.05	0.005	20.8	21.0	22.7
2	2.0	0.05	0.005	23.5	23.5	55.3
3	3.8	0.05	0.005	23.3	22.0	49.3
4	0.2	0.50	0.005	19.3	20.0	24.0
5	2.0	0.50	0.005	65.5	65.5	56.3
6	3.8	0.50	0.005	49.5	56.0	69.0
7	0.2	0.95	0.005	21.5	22.0	24.7
8	2.0	0.95	0.005	71.0	55.0	59.3
9	3.8	0.95	0.005	59.5	69.0	79.7
10	0.2	0.05	0.030	24.5	24.0	18.3
11	2.0	0.05	0.030	33.0	31.0	55.7
12	3.8	0.05	0.030	29.5	27.5	57.0
13	0.2	0.50	0.030	23.5	25.5	16.7
14	2.0	0.50	0.030	132.5	138.0	58.7
15	3.8	0.50	0.030	137.5	131.5	94.0
16	0.2	0.95	0.030	24.5	26.0	16.0
17	2.0	0.95	0.030	139.5	133.5	73.0
18	3.8	0.95	0.030	138.0	140.5	90.0
19	0.2	0.05	0.055	24.0	23.3	16.3
20	2.0	0.05	0.055	32.5	32.8	53.7
21	3.8	0.05	0.055	27.0	29.0	51.7
22	0.2	0.50	0.055	24.5	23.5	16.0
23	2.0	0.50	0.055	134.0	136.5	88.0
24	3.8	0.50	0.055	141.5	131.5	79.3
25	0.2	0.95	0.055	22.0	23.0	18.3
26	2.0	0.95	0.055	130.0	131.0	58.0
27	3.8	0.95	0.055	141.0	136.5	99.3

Методом нелинейной регрессии были определены значения коэффициентов в уравнении (2) для R-, S- и M-диссоциантов.

Величины дисперсии адекватности, представленные в табл. 3, незначимо отличаются от величины дисперсии воспроизводимости (62.3), определенной по результатам параллельных определений во всех вариантах опытов. Дополнительно был проведен дисперсионный анализ "остатков", т.е. разностей между экспериментальными и рассчитанными значениями биомасс в опытах из табл. 2. Так как комбинации уровней трех факторов в этих опытах соответствуют плану ПФЭ 33, для такого анализа был использован алгоритм Иейтса [12]. Было установлено отсутствие значимых эффектов исследованных факторов для всех трех диссоциантов *P. aeruginosa*, что также указывает на то, что уравнение Бауле удовлетворительно описывает результаты опытов в табл. 2.

Коэффициенты действия B_i в табл. 3 естественно несколько отличаются от значений, полученных в однофакторных опытах (сравнить с данными табл. 1).

Таблица 3. Значения коэффициентов уравнения Бауле для R-, S-, M-диссоциантов *P. aeruginosa*

Коэффициенты	Диссоцианты		
	R	S	M
<i>A</i>	146.5	143.5	85.8
<i>h</i>	1.290	1.342	1.053
<i>h</i> ²	5.987	6.022	24.856
<i>h</i> ³	124.6	128.2	398.6
Дисперсия адекватности	85.6	77.7	83.0

Тем не менее их различия для каждого из диссоциантов в общем сохраняются: наибольшее расхождение наблюдается в отклике М-клеток на изменение содержания нитрата и фосфата по сравнению с откликом R- и S-диссоциантов. Аналогично из трех диссоциантов *Rhodococcii.4 rubropertinctus* наименьшей потребностью в фосфате обладал М-диссоциант [3]. Для *Pseudomonas aeruginosa* можно ожидать, что в условиях более выраженного недостатка в среде нитрата и фосфата при достижении стационарного азота в смеси трех диссоциантов будет наблюдаться преобладание М-клеток. В то же время при содержании этих компонентов в среде, близком к оптимальному, преимущество должно переходить к R- и S-клеткам, причем некоторое, менее выраженное, преимущество может проявиться у S-диссоцианта, так как у него все 3 коэффициента действия чуть выше, чем у R-диссоцианта. Для проверки этих предположений необходимы дальнейшие исследования.

По уравнениям вида (2) можно рассчитать ожидаемые разности биомасс при различных сочетаниях содержания, в среде глюкозы, нитрата и фосфата и определить области концентраций, в пределах которых можно рассчитывать на преимущественный рост того или иного диссоцианта. На рис. 2 приведены для примера рассчитанные таким образом "области преобладания" М-клеток над S- на факторной плоскости для нитрата и фосфата при разных концентрациях глюкозы. На этих диаграммах хорошо видно, что, несмотря на сходство коэффициентов действия глюкозы у всех трех диссоциантов *P. aeruginosa*, ее содержание в среде может оказывать косвенное влияние на взаимоотношения М-, R- и S-диссоциантов, определяемые соотношением в среде нитрата и фосфата.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГНТП "Биологическое разнообразие" и Российского фонда фундаментальных исследований (грант №96-15-97946).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рубин Е.Л. Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas*. М.: Наука, 1986. 200 с.
2. Калакуцкий Л.В., Озерский С.М., Евтушенко Л.И. Российская коллекция микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология. 1996. Т. 32. Вып. 1. С.144-154.
3. Милько Е.С., Егоров Н.С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации. М.: Изд-во МГУ, 1991. 142с.
4. Смирнов В.В., Киприанов Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев: Наук. думка, 1990. 263 с.
5. Сковрцов И.П. Методы идентификации и выделения почвенных бактерий рода *Pseudomonas*. М.: Изд-во МГУ, 1981. 77с.
6. Беляков В.Д., Ряпис Л.А., Илюхин В.И. Псевдомонады и псевдомоназы. М.: Медицина, 1990. 224 с.
7. Милько Е.С., Мартынкина Л.П. Морфологические и физиолого-биохимические особенности диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. 1996. Т. 65. №5. С. 352-356.
8. Милько Е.С. Выживаемость диссоциантов углеводородокисляющего штамма *Pseudomonas aeruginosa* при хранении // Микробиология. 1998. Т.67. № 1. С.102-105.
9. Милько Е.С., Никитенко Л.А. Влияние физических и химических факторов среды на рост диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Прикл. биохимия и микробиология. 1998. Т. 34. № 2. С. 171-174.
10. Кирсанов А.Т. Теория Митчерлиха, ее анализ и практическое применение. М.,Л.: Изд-во Сельхоз-гиз, 1930. 200с.
11. Федоров В.Д., Гильманов Т.Г. Экология. М.: Изд-во МГУ, 1980. 464с.
12. Максимов В.Н. Многофакторный эксперимент в биологии. М.: Изд-во МГУ, 1980. 279 с.

Effect of Carbon, Nitrogen, and Phosphorus Sources
on the Growth of R, S, and M Dissociants of *Pseudomonas aeruginosa*

V. N. Maksimov, E. S. Mil'ko, and I. A. Ifinykh

Moscow State University, Voroh'evy gory, Moscow, 119899 Russia

Abstract—The effect of glucose, nitrate, and phosphate on the stationary-phase growth parameters of the R, S, and M dissociants of the hydrocarbon-oxidizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* K-2 was studied. The data obtained were analyzed in terms of the Mitscherlich equation. S dissociant required less glucose than other dissociants, whereas M dissociant required less nitrogen and phosphorus. These findings were confirmed by the results of investigation of the combined action of glucose, nitrate, and phosphate in a 3 x 3 x 3 factor experiment. It is anticipated that M dissociant must prevail under conditions of nitrogen and phosphorus deficiency, and S dissociant must be dominant in the case of optimally chosen proportions between the biogenic elements studied.

Key words: population composition, dissociation, medium composition, factor experiment, Mitscherlich equation, action coefficient, *Pseudomonas aeruginosa*.

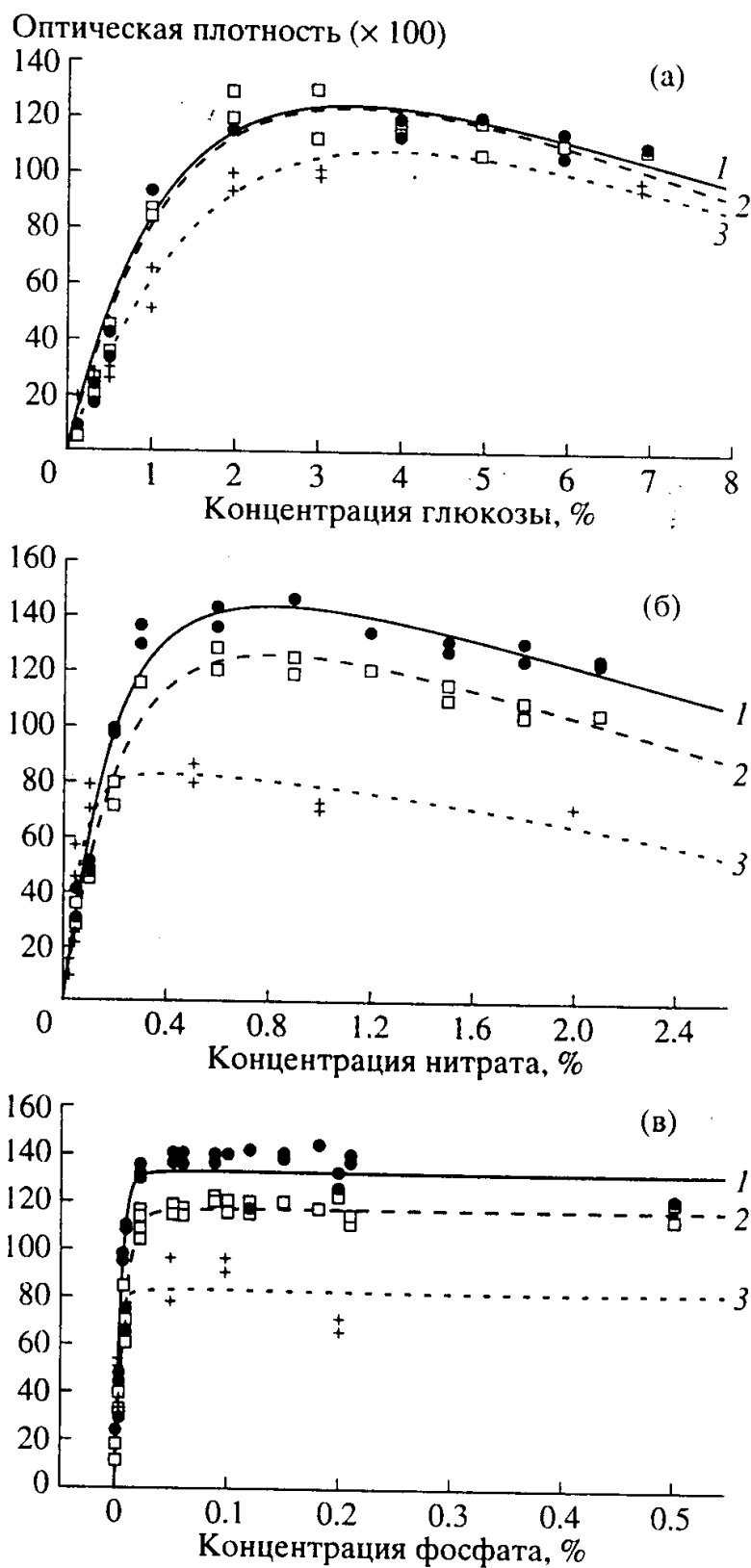


Рис. 1. Зависимость роста R-, S-, M-диссоциантов *P. aeruginosa* от содержания в среде глюкозы (а), нитрата (б) и фосфата (в): 1 – R-диссоциант, 2 – S-диссоциант, 3 – M-диссоциант.

