

УДК 579 841.110]7.8

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

© 1999 г. В. Н. Максимов, Е. С. Милько, И. А. Ильиных
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Поступила в редакцию 10.11.98 г.

Исследовали влияние глюкозы, нитрата и фосфата на рост в стационарной фазе R-, S- и M-диссоциантов углеводородоокисляющего штамма *Pseudomonas aeruginosa* K-2 в смешанных культурах. Оптимальное соотношение концентраций, которые обеспечивают получение плотности культуры не менее чем 90% от максимальной, составляет от 2 до 7% глюкозы и от 0.02 до 0.12% фосфата. Основным фактором, определяющим соотношение трех диссоциантов в популяции, является исходная концентрация фосфата. Доля R-диссоцианта в популяции линейно возрастает с увеличением содержания в среде глюкозы и нелинейно зависит от концентрации фосфата. Доля M-диссоцианта зависит только от концентрации фосфата и характер этой зависимости противоположен таковой для R-диссоцианта. При отсутствии дефицита по фосфору S-диссоциант получает преимущество перед R на средах с недостатком глюкозы.

Ключевые слова: состав популяции, смесь диссоциантов, состав среды, *Pseudomonas aeruginosa*. Диссоциация - это расщепление однородной популяции бактерий на варианты, различающиеся генетическими, физиолого-биохимическими и морфологическими особенностями. Возникновение и реверсия диссоциантов происходят с высокой частотой ($K^{-1} \cdot 10^4$ на одно клеточное деление), при этом изменения в клетке носят постоянный характер. Диссоциация широко распространена среди бактерий, в том числе псевдомонад [1, 2]. Одни из первичных фенотипических изменений при обратимых диссоциативных переходах происходят в клеточных оболочках: капсуле, клеточной стенке, мембране. Они определяют многие особенности диссоциантов, в том числе: потребности в питательных веществах, скорость роста, устойчивость к внешнему воздействию, способность к синтезу и трансформации практически ценных веществ, деградации ксенобиотиков, углеводов. Так, R-диссоциант *Pseudomonas aeruginosa* 1C является активным разрушителем додецилсульфата натрия, а S такой способностью не обладает [3]. R- и S-диссоцианты *P. stutzeri* различаются по количеству и качеству синтезируемых ими цитокининов [4]. S-диссоциант *P. fluorescens* обладает липолитической активностью, у R-клеток она отсутствует [5]. M-диссоциант *P. aeruginosa* по сравнению с другими диссоциантами образует наибольшее количество альгината [1]. В монографиях, посвященных псевдомонадам, нет данных о влиянии состава среды на рост диссоциантов [1,6]. В предыдущей нашей работе исследовали влияние глюкозы, нитрата, фосфата на рост трех диссоциантов непатогенного углеводородоокисляющего штамма *P. aeruginosa* K-2 в стационарной фазе роста в однофакторных экспериментах, а также при совместном действии этих веществ по плану полного факторного эксперимента $3 \times 3 \times 3$ [7]. Показано, что при оптимальных соотношениях биогенных элементов в среде преимущественный рост наблюдается у R- и S-клеток, причем различия в их отношении к фосфату и нитрату практически незначительны, а к глюкозе менее требователен S-диссоциант. При недостатке азота и фосфора в среде селективное преимущество имеет M-диссоциант. Рассевы культур на плотную среду показали, что исходные диссоцианты составляют 98-100% популяции. На синтетической среде с глюкозой только M-диссоциант *P. aeruginosa* K-2 в конце экспоненциальной фазы роста подкисляет среду до pH 4.7, при этом в культуральной жидкости обнаруживается формиат [8]. Установлено, что все три диссоцианта содержат ключевые ферменты окисления глюкозы по пути Энтнера-Дудорова; наиболее низкие активности ферментов, особенно де-гидрогеназы глюкозо-6-фосфата, наблюдаются у M-клеток. В экстрактах клеток всех трех диссоциантов появляется активность формиатдегидрогеназы, которая выше у M-диссоцианта [8]. Эти особенности углеводного метаболизма M-клеток, возможно, определяют их более слабый рост на среде с глюкозой и более выраженный анаэробный тип обмена. Эти же различия могут проявиться, например, при совместном культивиро-

вании диссоциантов или при определении устойчивости дыхания диссоциантов к ингибиторам. Целью настоящей работы является изучение влияния углеводного, азотного и фосфорного питания на рост R-, S- и M-диссоциантов *P. aeruginosa* K-2 в смешанных культурах. Для этого определяли плотность культуры в стационарную фазу роста и соотношение диссоциантов в популяции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для выращивания псевдомонад использовали среды, содержащие следующие компоненты: глюкозу, NaNO_3 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Варьировали концентрации глюкозы от 0.5 до 7.5%, нитратов от 0.2 до 2%, фосфатов от 0.005 до 0.105%. Количество остальных веществ было постоянным: KCl - 0.06%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.02%.

Бактерии культивировали в пробирках на 50 мл с 10 мл среды на качалке (180 об/мин) при температуре 30°C в течение двух суток до стационарной фазы роста. В качестве посевного материала использовали односуточные культуры диссоциантов псевдомонад, выращенных на плотной среде МПБ + сусло (1 : 1). Бактерии со скошенного агара осторожно переносили петлей в пробирку с физиологическим раствором. Плотности инокулятов каждого из диссоциантов во всех опытах выравнивали по нефелометру. Суспензии бактерий смешивали в нужном соотношении, и в опытные пробирки вносили 3% такой смеси.

Рост бактерий оценивали нефелометрически по плотности культуры. Показания нефелометра для удобства расчетов умножали на 100. Соотношение диссоциантов в популяции определяли по морфологии колоний расеевом на плотную среду МПБ + сусло. В каждом варианте опыта просматривали около 100 колоний. Соотношение количества клеток псевдомонад в 1 мл и показаний нефелометра следующее: $I_{g10} = 140$, $I_{g5} = 100$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Опыты ставили по плану полного факторного эксперимента U , в котором варьировали концентрации глюкозы, азота и фосфора. Пределы изменения этих концентраций были выбраны с учетом результатов, полученных в экспериментах с каждым из диссоциантов [7]. При этом в качестве верхнего уровня факторов были взяты концентрации, которые оказывали слабое ингибирующее действие на рост изолированных культур диссоциантов, а нижний уровень соответствовал концентрациям, обеспечивавшим рост бактерий примерно на 50% от максимального. Условия опытов и их результаты приведены в таблице. Для статистической оценки воспроизводимости результатов эксперимент повторяли трижды, каждый раз используя новый посевной материал и заново составляя питательные среды. При расчетах эффектов факторов вычисляли средние арифметические значения оптической плотности смешанной культуры и средние взвешенные значения процентов каждого из диссоциантов в культуре в конце опыта.

Регрессионный анализ, проведенный по схеме Йейтса, показал, что в изученных пределах изменений на рост смешанной культуры влияли только глюкоза и фосфат и при этом статистически значимы были как линейные, так и квадратичные эффекты этих факторов, так что адекватное описание зависимости конечной биомассы культуры может быть получено в виде полинома 2-й степени:

$$y = 21.0 + 21.4G + 864P + 68.6GP - 2.42G^2 - 7156P^2,$$

где G - концентрация глюкозы, а P - концентрация фосфата в среде в начале опыта.

Проекция поверхности отклика, описываемой этим уравнением, изображена на рис. 1. Видно, что оптимальные соотношения концентраций, которые обеспечивают получение биомассы не менее чем 90% от максимальной, составляют от 2 до 7% глюкозы и от 0.02 до 0.12% фосфата натрия. Эти значения практически совпадают с уровнями этих же факторов, оптимальными для каждого из 3 диссоциантов, которые были найдены в опытах с их отдельным культивированием [7].

Отсутствие значимого влияния нитрата на биомассу указывает на то, что для роста смешанной культуры его нижний уровень (0.2%) не является лимитирующим, как это было при отдельном культивировании диссоциантов.

Аналогичные расчеты, произведенные для долей каждого из диссоциантов, показали, что в конце эксперимента доля R-диссоцианта линейно возрастает с увеличением содержания в среде глюкозы и нелинейно зависит от концентрации фосфата таким образом, что при возрастании последней с 0.005% до 0.055% доля R-диссоцианта возрастает, а при дальнейшем увеличении содер-

жания фосфата до 0.105% эта доля остается практически постоянной, с некоторой тенденцией к снижению (рис. 2). Для доли M-диссоцианта статистически значимой оказалась только ее зависимость от концентрации фосфата. Характер этой зависимости противоположен таковой для R-диссоцианта. Наибольшая доля M-диссоцианта наблюдалась при выращивании на средах с минимальной концентрацией фосфата. Следствием такой противоположной зависимости является отчетливая обратная корреляция (коэффициент корреляции $r_{MR} = -0.86$) между изменением процентного содержания R- и M-диссоциантов в культурах, выращенных на 27 исследованных средах (рис. 3). На этой корреляционной диаграмме хорошо видно, что в 6 вариантах опытов с минимальным содержанием фосфата (опыты 1, 2, 3, 6, 7, 9) в конце опыта доля M-диссоцианта увеличилась даже по сравнению с относительно высоким значением 57% в исходной смеси диссоциантов за счет снижения и без того малой доли R-диссоцианта. В остальных 3 опытах (4, 5 и 8) небольшое снижение содержания M-диссоцианта было связано с увеличением доли S-диссоцианта.

По-видимому, основным фактором, определяющим соотношение 3 диссоциантов в стационарной фазе роста в наших опытах, является исходная концентрация фосфата. Ранее в экспериментах с индивидуальными диссоциантами было обнаружено, что M-диссоциант менее чувствителен к низким концентрациям фосфата, чем R- и

В отсутствие дефицита фосфата в среде R- и S-диссоцианты испытывают меньшее влияние со стороны M-диссоцианта и поэтому к концу роста в опытах 10-27 (где содержание фосфата было равно 0.055% и 0.105%) их доля существенно возрастает по сравнению с исходной. Это хорошо видно на треугольных диаграммах (рис. 4), которые использовались нами ранее [9]. Каждая точка на такой диаграмме соответствует определенному соотношению долей 3 диссоциантов. Например, вершины треугольника обозначают изолированные (100%-ные) культуры, а точка в центре треугольника - смесь равных долей (т.е. по 1/3 или 33.3%) диссоциантов. Нетрудно убедить-

ся, что при исходном содержании в среде 0.055% и 0.105% фосфата соотношение диссоциантов в конце опыта становится примерно одинаковым: все точки на соответствующих диаграммах "собираются" ближе к центру треугольника.

При низких концентрациях фосфата рост культуры, как и ожидалось, не превышает 50% от максимального, поэтому в большинстве случаев преобладание в смешанной культуре M-диссоцианта наблюдается в опытах с относительно малой конечной биомассой, что хорошо видно на рис. 5.

По отношению к процентному содержанию S-диссоцианта в смешанной культуре не было обнаружено значимых эффектов влияния всех трех компонентов среды. Характерно, что и корреляция между изменениями долей S-диссоцианта и остальных двух диссоциантов выражена слабее, если учитывать результаты всех 27 опытов (коэффициенты корреляции $r_{SR} = -0.42$, $r_{SR} = -0.10$).

Рассмотрим, однако, корреляционную диаграмму для долей R- и S-диссоциантов (рис. 6). Если исключить из этого графика точки, соответствующие опытам с нижним уровнем фосфата, то нетрудно заметить отчетливую обратную корреляцию между долями R- и S-диссоциантов в остальных опытах (в этом случае $r_{SR} = -0.81$). Создается впечатление, что антагонизм между этими диссоциантами проявляется только при ослаблении

влияния M-диссоцианта. Некоторое представление о связи соотношения R- и S-диссоциантов с концентрациями глюкозы и нитрата (при отсутствии дефицита по фосфору) можно получить, рассчитав разницу их долей и построив график, изображенный на рис. 7. По-видимому, S-диссоциант получает преимущество над R-диссоциантом на средах с недостатком глюкозы. Однако для более определенных выводов необходимы дополнительные исследования.

Можно лишь заключить, что соотношения всех 3 диссоциантов в смешанной культуре были связаны исключительно с лимитированием роста концентрациями глюкозы и фосфата, поскольку нам не удалось обнаружить какую-либо связь этих соотношений с концентрациями нитрата, влияние которого на рост культуры было статистически незначимым. Поэтому есть все основания считать, что наблюдаемые изменения в составе смешанной культуры определяются

конкуренцией диссоциантов за основные источники питания, а особенности их углеводного метаболизме не имеют существенного значения.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГНТП "Биологическое разнообразие" и РФФИ (проект № 99-04-48338).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляков В.Д., Ряпис Л.А., Илюхин В.И. Псевдомонады и псевдомонозы. М.: Медицина, 1990. 224 с.
2. Милько Е.С., Егоров Н.С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации. М.: Изд-во МГУ, 1991. 142с.
3. Настоящая Н.И. Морфолого-биохимические изменения культуры *Pseudomonas aeruginosa*-цест-руктора АПАВ: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Минск, 1992. 19с.
4. Гривиня П., Озолина Р.К., Тевелева М.К., Мишке И.В. Бактериологические свойства диссоциантов *Pseudomonas stutzeri* // Микроорганизмы в сельском хозяйстве: Тез. докл. 4 Всес. науч. конф., Пу-щино, 20-24 янв. 1992. Пущино, 1992. С. 44.
5. Рубан Е.Л. Хранение культур микроорганизмов /£ Прикл. биохимия и микробиология. 1989. Т.25. Вып. 3. С. 291-301.
6. Рубан Е.Л. Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas*. М.: Наука, 1986. 200 с.
7. Максимов В.Н., Милько Е.С., Ильиных И.А. Влияние углеродного, азотного и фосфорного питания на рост R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* II Микробиология. 1999. Т. 68. № 2. С. 206-210.
8. Милько Е.С., Красильникова Е.Н. Особенности углеводного метаболизма R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. 1999. Т. 68. №2. С. 211-214.
9. Милько Е.С., Егоров Н.С., Максимов В.Н., Нед-байло А.И. Влияние аэрации и концентрации фосфора в среде на рост R-, S- и M-форм *Mycobacter^ urn lacticolum* в смешанных культурах // Микробиология. 1977. Т. 46. № 3. С. 490-495.

Effect of Carbon, Nitrogen, and Phosphorus Nutrition on the R, S, and M Dissociants of *Pseudomonas aeruginosa* Grown in Mixed Cultures

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

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

Abstract — The effect of glucose, nitrate, and phosphate on the stationary-phase growth characteristics of R, S, and M dissociants of the hydrocarbon-oxidizing strain *P. aeruginosa* K-2 was studied. The optimal concentrations of glucose and phosphate providing for at least 90% of the maximal culture density were found to be 2-7% glucose and 0.02-0.12% phosphate. The main factor that determined the proportion of dissociants in bacterial populations was the initial concentration of phosphate. The fraction of R dissociant in populations increased linearly with the concentration of glucose and varied nonlinearly with the concentration of phosphate in the growth medium. The fraction of M dissociant depended solely on the concentration of phosphate in a manner inverse to that typical of R dissociant. In glucose-deficient media containing sufficient amounts of phosphorus, S dissociant prevailed over R dissociant.

Key words: population composition, mixture of dissociants, medium composition, *Pseudomonas aeruginosa*.

Таблица

Условия и результаты опытов

Номер опыта	Концентрация, %			Оптическая плотность	Доля диссоциантов, %		
	глюкоза	нитрат	фосфат		М	S	R
1	0.5	0.2	0.005	44.5	70.3	25.9	4.4
2	4	0.2	0.005	67.0	71.8	26.7	1.5
3	7.5	0.2	0.005	57.3	73.1	19.8	7.2
4	0.5	1.1	0.005	40.0	46.3	52.2	1.6
5	4	1.1	0.005	61.0	52.3	33.6	14.1
6	7.5	1.1	0.005	46.5	70.6	19.3	10.1
7	0.5	2	0.005	47.0	75.0	20.5	4.5
8	4	2	0.005	66.3	35.8	51.4	12.8
9	7.5	2	0.005	55.3	64.2	31.7	3.3
10	0.5	0.2	0.055	41.0	36.3	36.3	27.5
11	4	0.2	0.055	107.7	37.1	40.5	22.0
12	7.5	0.2	0.055	88.7	29.2	34.9	36.4
13	0.5	1.1	0.055	52.3	43.9	34.7	21.4
14	4	1.1	0.055	119.3	25.7	31.5	42.8
15	7.5	1.1	0.055	121.7	28.5	22.3	49.2
16	0.5	2	0.055	52.7	42.5	39.7	17.9
17	4	2	0.055	113.3	34.3	26.3	39.4
18	7.5	2	0.055	107.3	25.0	29.9	44.6
19	0.5	0.2	0.105	41.7	35.0	41.8	23.2
20	4	0.2	0.105	108.0	35.1	31.1	33.4
21	7.5	0.2	0.105	88.7	24.7	26.3	48.5 ."
22	0.5	1.1	0.105	47.7	44.9	33.6	21.5
23	4	1.1	0.105	117.3	35.7	27.6	36.7
24	7.5	1.1	0.105	122.0	27.1	41.0	31.4
25	0.5	2	0.105	55.7	41.1	42.5	16.4
26	4	2	0.105	114.0	32.8	34.0	32.8
27	7.5	2	0.105	106.0	24.8	34.2	41.9

Исходные соотношения диссоциантов					56.9	23.9	19.1

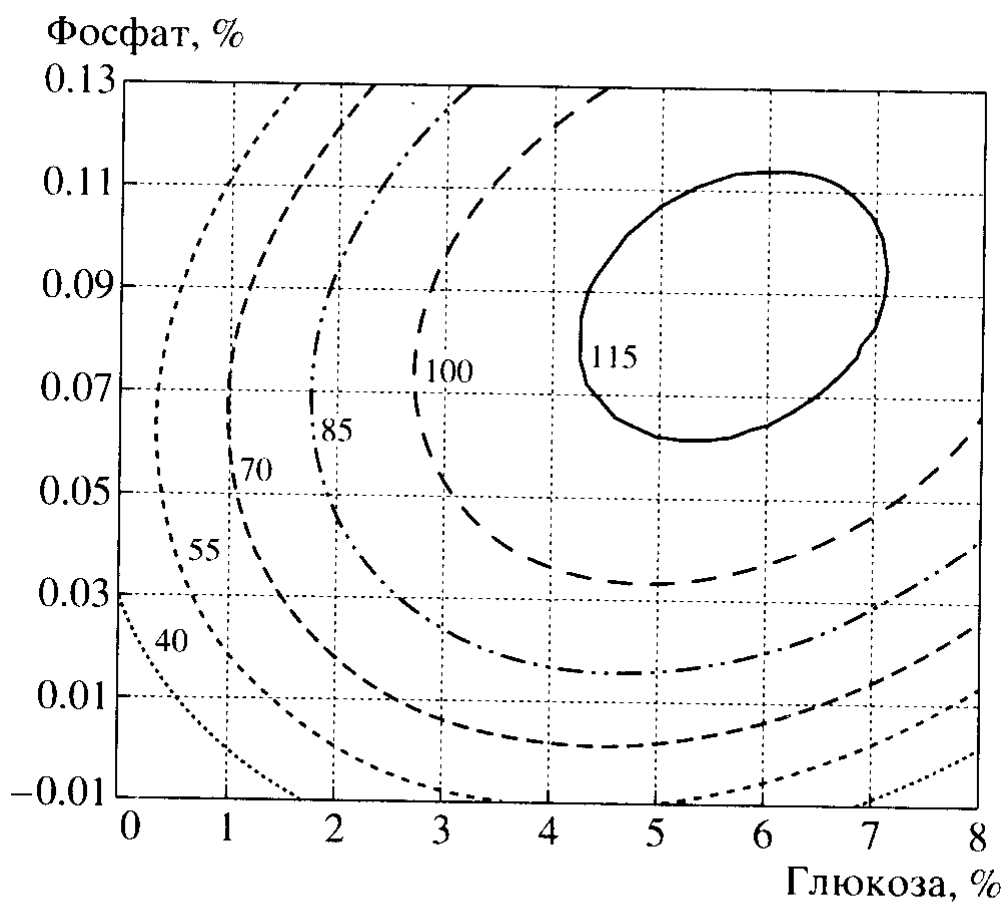


Рис. 1. Зависимость оптической плотности культуры от концентраций глюкозы и фосфата. Цифры около изолиний – показания нефелометра ($\times 100$).

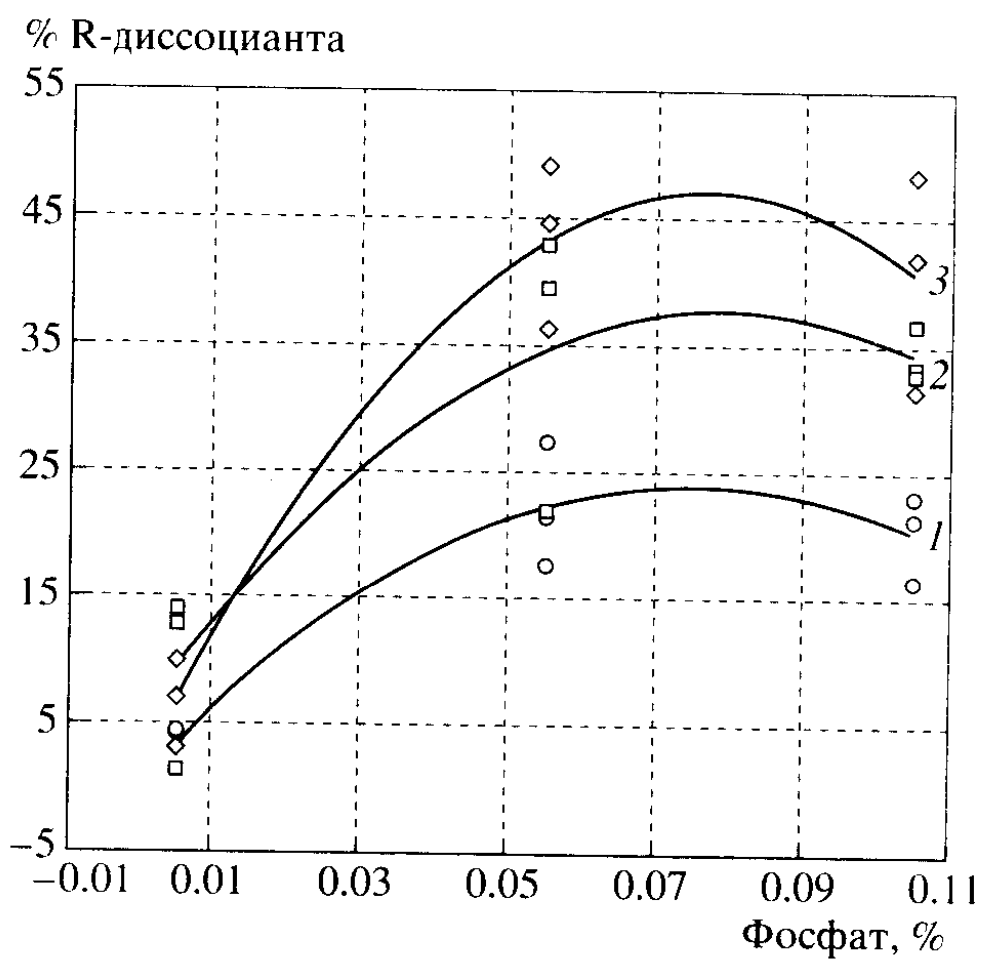


Рис. 2. Зависимость процентного содержания R-диссоцианта от исходной концентрации фосфата в среде при разных концентрациях глюкозы: 1 – 0.5%; 2 – 4.0%; 3 – 7.5%.

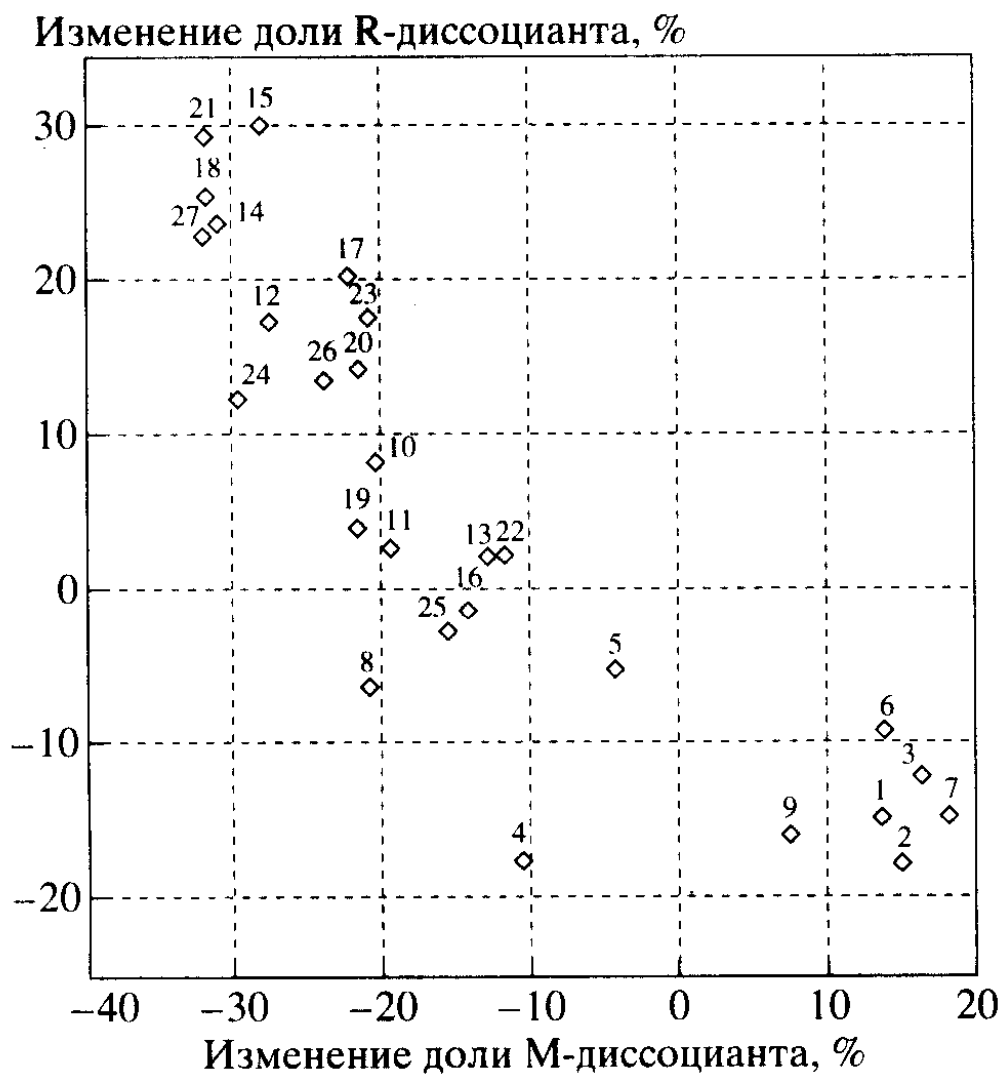


Рис. 3. Сопряженность изменений процентного содержания М- и R-диссоциантов. Метки точек – номера опытов в таблице.

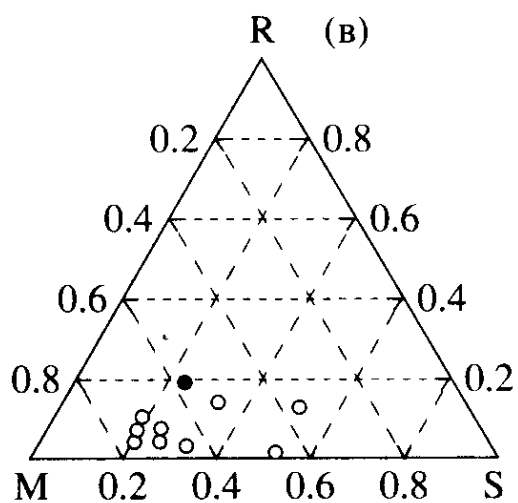
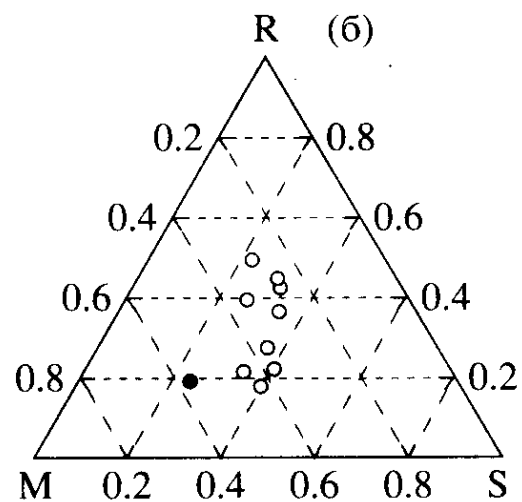
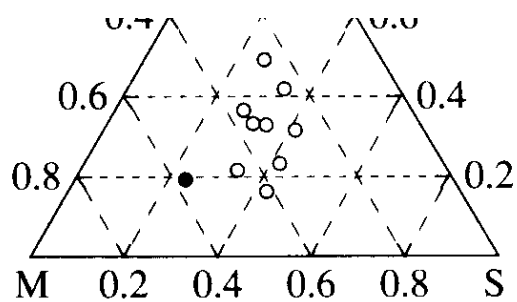


Рис. 4. Конечные соотношения долей диссоциантов в популяции *P. aeruginosa* при различном исходном содержании фосфата в среде: а – 0.105%; б – 0.055%; в – 0.005%; ● – исходное соотношение диссоциантов в популяции.

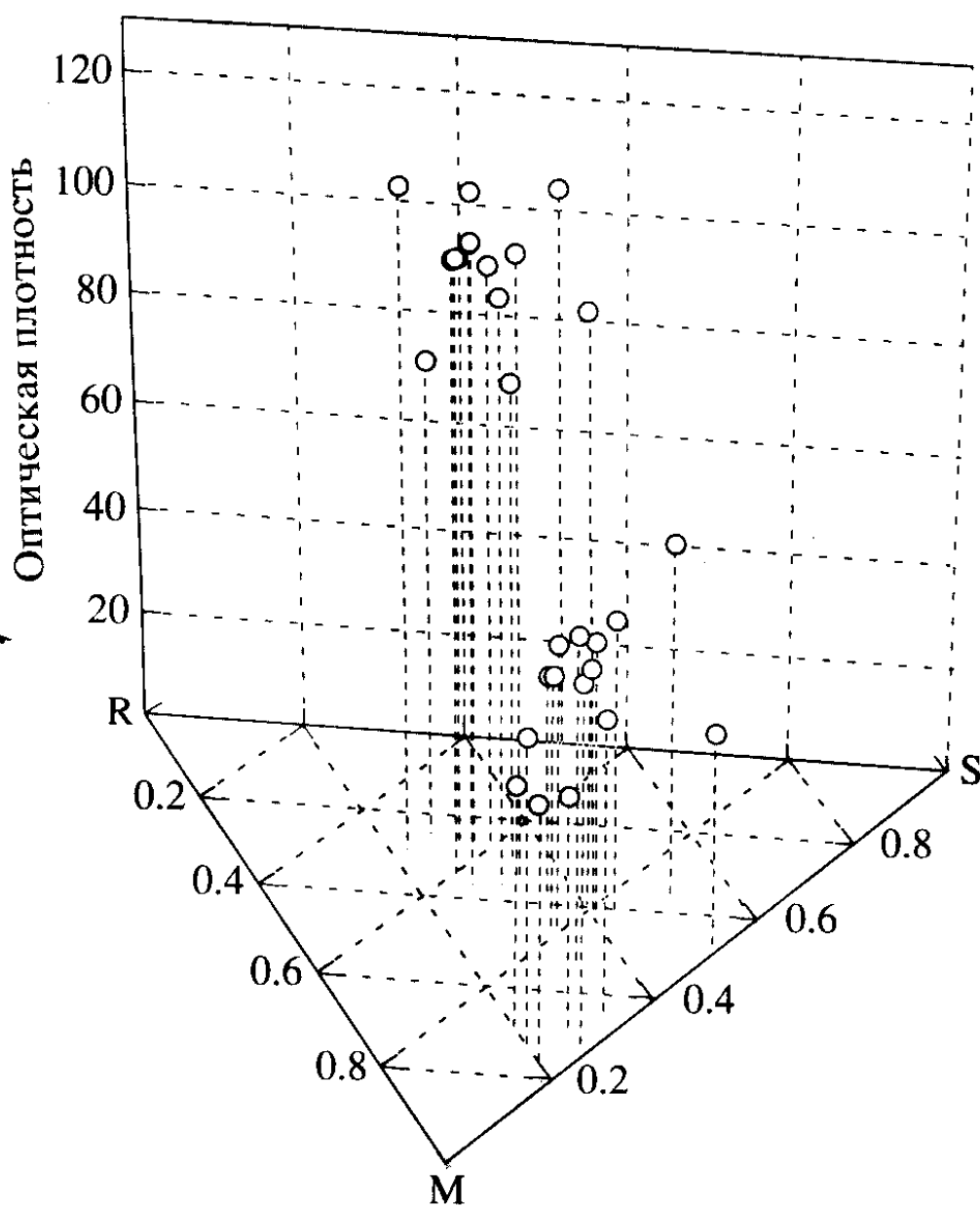


Рис. 5. Соотношение R-, S-, M-диссоциантов и оптическая плотность культур, выращенных на 27 исследованных средах.

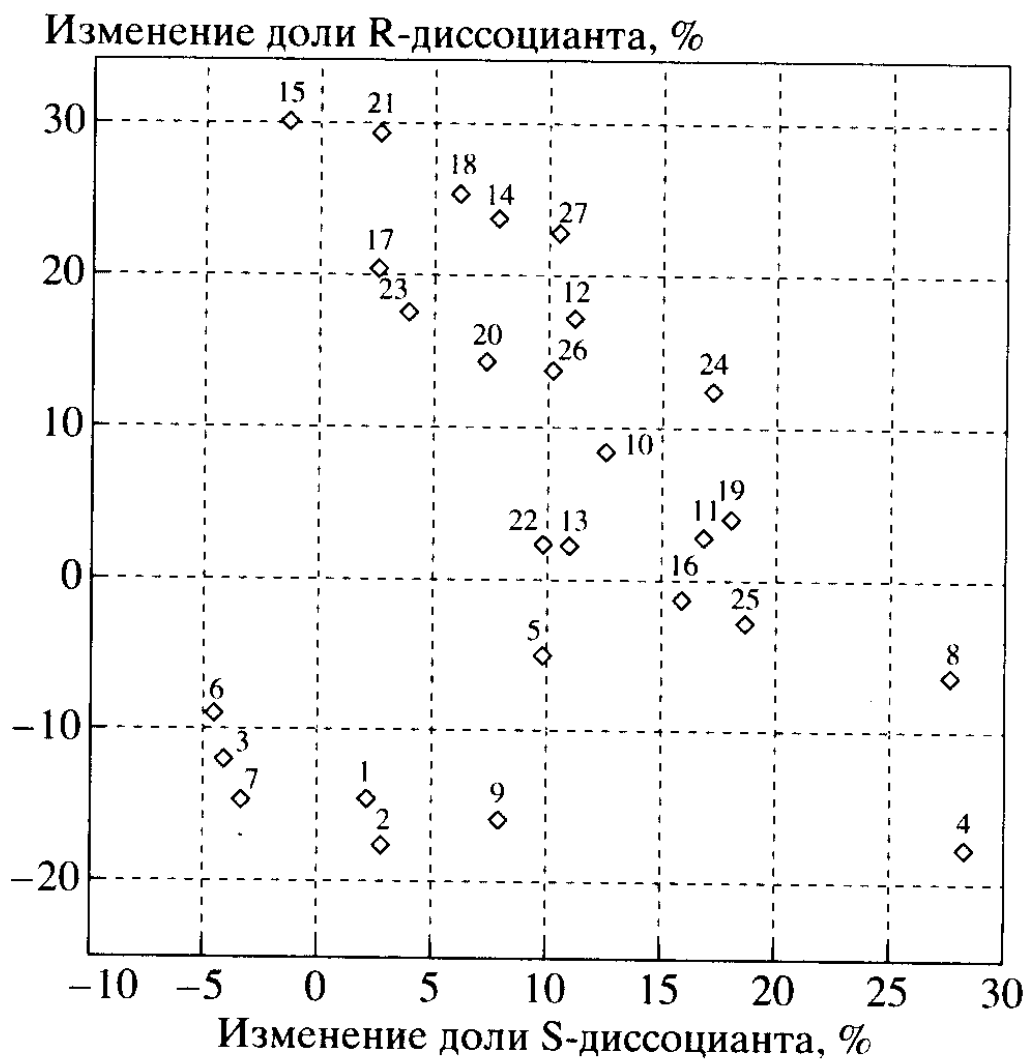


Рис. 6. Сопряженность изменений процентного содержания R- и S-диссоциантов. Метки точек – номера опытов в таблице.

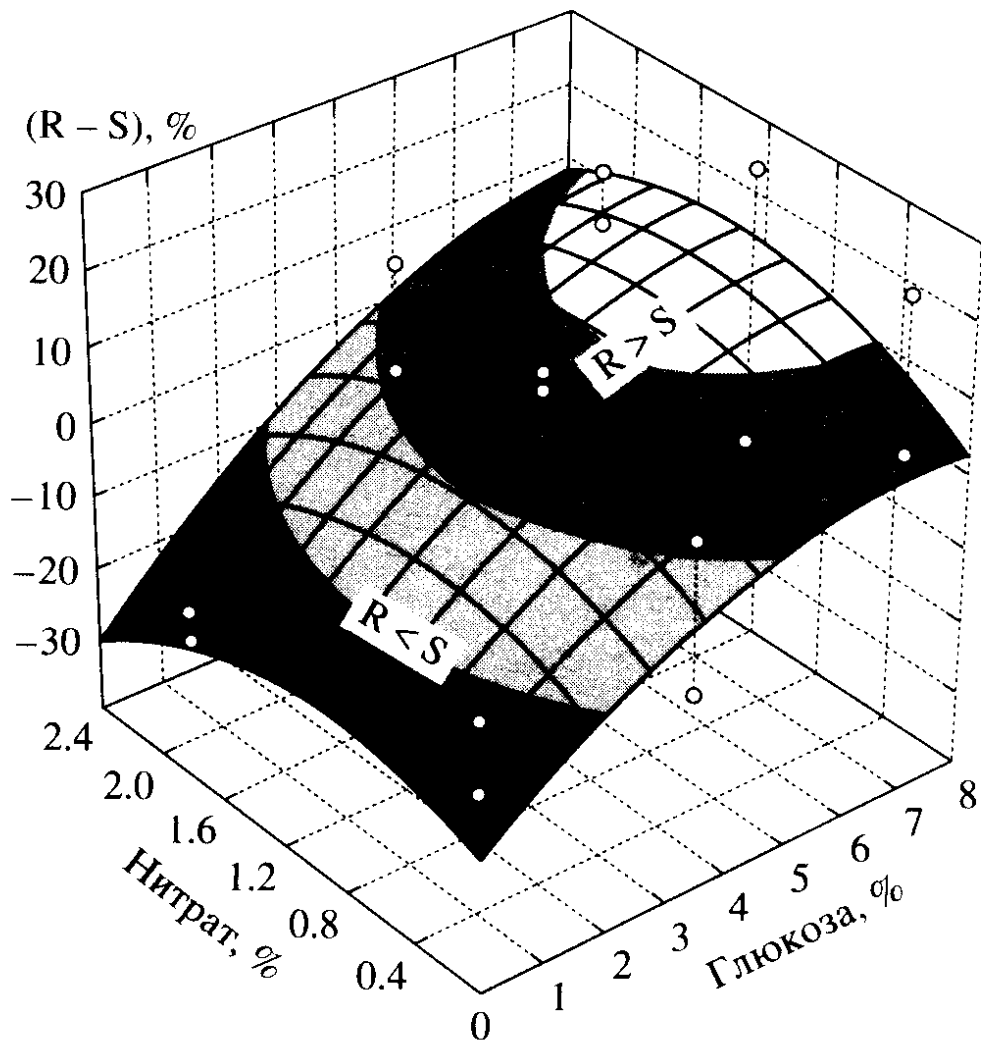


Рис. 7. Зависимость разности долей R- и S-диссоциантов от исходных концентраций глюкозы и нитрата при отсутствии дефицита по фосфору.