

ОБЗОР ПО ОСОБЕННОСТЯМ ДИССОЦИАНТОВ БАКТЕРИЙ

Введение

Диссоциация – это расщепление однородной популяции бактерий на варианты, различающиеся генетическими, физиолого-биохимическими и морфологическими свойствами. От случайных мутаций обратимые диссоциативные переходы отличаются высокой частотой и постоянным характером этих изменений. Диссоциация состоит из двух процессов: изменений в геноме клетки и селекции возникших вариантов. Выделяют три основных диссоцианта, различающихся по морфологии колоний: R (rough) – шероховатые колонии, S (smooth) – гладкие колонии, M (mucoid) – слизистые колонии (Милько, Егоров, 1991; Милько с соавт., 2007)

Диссоциация открыта и изучается в основном медицинскими микробиологами на патогенных грамотрицательных бактериях, у которых сравниваются два диссоцианта – вирулентный и авирулентный; процесс чаще называется «вариация фаз» (Saunders, 1986; Беляков с соавт., 1987; Беляков, Ряпис, 1990; Ряпис, 1995; Бухарин с соавт., 2000).

В настоящее время пристальное внимание к диссоциативным переходам связано с бурным развитием биотехнологии, т.к. диссоцианты могут различаться по количеству и качеству синтезируемых практически ценных веществ, а процесс диссоциации снижает выход целевого продукта и приносит производству большие потери. Гетерогенность популяции бактерий может осложнять и исследовательскую работу.

1.1. Частота и направление диссоциативных переходов

Частота диссоциативных переходов у бактерий составляет 10^{-2} - 10^{-4} на одно клеточное деление. Именно высокая частота возникновения диссоциатов определяет важнейший вклад этого процесса в создание гетерогенности бактериальной популяции.

Взаимный переход возможен у *Bacillus brevis* всех четырех диссоциантов (Биология *Bacillus brevis*, 1968), у *Pseudomonas aeruginosa* – каждого из трех диссоциантов (Милько, Мартынкина, 1996; Милько, 1998) однако, у *Rhodococcus rubropertinctus* и сапротрофных микобактерий RM переход происходит только через S-диссоциант (Милько, Егоров, 1991).

При высокой частоте диссоциативных переходов возможно возникновение диссоциантов в старых колониях, полученных из одной клетки. Например, у *Rhodococcus rubropertinctus* возникшие диссоцианты составляют в популяции бактериальной колонии доли процента, но это миллионы клеток. Размер колоний R-, S- и M-диссоциантов значительно отличается, однако количество клеток в них одинаково: 10^9 . Это объясняется раз-

личной плотностью расположения клеток внутри колонии: наиболее плотно клетки лежат в R-колонии, а в слизистой M-колонии единичные клетки расположены далеко друг от друга (Могильная с соавт., 1994).

1.2. Морфология колоний и клеток

Морфология колоний одинаковых диссоциантов у различных видов бактерий различается. Обычно R-колонии – плоские, шероховатые, матовые, с изрезанным краем; S-колонии – гладкие, выпуклые, блестящие, с ровным краем; M-колонии – слизистые, блестящие, крупные, с ровным или волнистым краем. По морфологии колоний при расщепе бактерий на плотную среду можно определить соотношение диссоциантов в популяции. Следует подчеркнуть, что состав среды и условия культивирования бактерий могут маскировать процесс диссоциации (например, твин-80, pH среды). Наиболее четкие различия в морфологии колоний диссоциантов обнаруживаются на среде МПА+сусло или других средах с углеводами.

Диссоцианты могут различаться по морфологии клеток, что лучше выявляется при электронном микрокопировании (Могильная с соавт., 1994; Мартынкина, Милько, 1991), но чаще они отличаются в способах расхождения дочерних клеток после деления. Так, у S- и M-диссоциантов родококков обычно клетки лежат под углом друг к другу (снеппинг-деление), образуя V-образные структуры, а R-клетки лежат на одной прямой. Для S-типа колоний *Bacillus thuringiensis* характерно расположение разделившихся дочерних клеток ”бок о бок”, клетки R-типа колоний объединяются в цепочки. Способность у диссоциантов формировать тот или иной тип колоний связана с морфологией клеток, типом деления клеток, их взаимным расположением, а также с особенностями строения клеточной оболочки и прежде всего – капсулы.

1.3. Клеточные оболочки диссоциантов бактерий

В клеточные оболочки входят: капсула, клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана.

В таблицах 1.1 и 1.2 представлены содержание и химический состав капсул и клеточных стенок у диссоциантов некоторых грамотрицательных и грамположительных бактерий. Наибольшее количество экзополисахаридов синтезируют клетки слизистых M-диссоциантов, R-клетки синтезируют наименьшее количество экзогликанов. Химический состав экзополисахаридов может различаться не только у разных видов бактерий, но даже у разных штаммов одного вида.

Таблица 1.1. Капсулы диссоциантов бактерий

Бактерии	Толщина	Химический состав
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	M > S	$\begin{array}{ccc} \text{М} & \xrightarrow{\hspace{1cm}} & \text{S} \\ \text{альгинат} & & \text{ДНК-подобный полисахарид} \end{array}$
<i>Xanthomonas campestris</i>	M > S	$\begin{array}{ccc} \text{М} & \xrightarrow{\hspace{1cm}} & \text{S} \\ & & \text{уменьшение остатков кислот (пировиноградной, уксусной)} \end{array}$
<i>Pseudomonas gingivae</i>	M > S	
<i>Pseudomonas coronafaciens</i>		Степень вирулентности: M > S > R
Сапротрофные микобактерии (7 видов)		Все виды бактерий различаются по химическому составу экзополисахарида

Таблица 1.2. Клеточные стенки диссоциантов бактерий

Бактерии	Толщина	Химический состав
<i>Brucella abortus</i>	R > S	
<i>Klebsiella aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella sonnei</i> , <i>Escherichia coli</i>		$\begin{array}{ccc} \text{S} & \xrightarrow{\hspace{1cm}} & \text{R} \\ & & \text{потеря О-антигена} \end{array}$
<i>Streptococcus lactis</i>	R > S в 2 раза	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R > S в 1.5 раза	
<i>Thiobacillus versutus</i>	R > S в 1.5 раза	
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>dendrolimatus</i>	R > S	$\begin{array}{ccc} \text{S} & \xrightarrow{\hspace{1cm}} & \text{R} \\ & & \text{уменьшение глутаминовой к-ты} \end{array}$

Толщина клеточных стенок больше у R-клеток, чем у S; может различаться и химический состав клеточных стенок. Так, многочисленными биохимическими и иммунологическими методами установлено, что у патогенных грамотрицательных бактерий R-вариант отличается от S отсутствием О-специфических полисахаридных боковых цепей в липополисахариде клеточной стенки, т.е. отсутствием О-антигена и являются авирулентными. У *Azospirillum brasilens* RS диссоциация связана с перераспределением вкладов двух О-специфических полисахаридов в архитектуру клеточной поверхности (Матора с соавт., 2003). Исследование липополисахаридов *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* показало, что авирулентный диссоциант отличается степенью полимеризации О-цепи (Здоровенко с соавт., 2004).

Как видно из таблиц, у диссоциантов чаще изучают или капсулу, или клеточную стенку или липиды. В табл. 1.3 у трех диссоциантов *Rhodococcus rubropertinctus* сравниваются одновременно размер и химический состав капсулы, клеточной стенки, а также липидов, которые входят у этих бактерий в цитоплазматическую мембрану и клеточную стенку. Количество липидов максимально, как и у других бактерий (Коронелли с соавт., 1995), у R-

клеток. Диссоцианты различаются по количеству ненасыщенных жирных кислот в липидах, т.е. текучестью мембран.

Таблица 1.3. Сравнение клеточных оболочек диссоциантов *Rhodococcus rubropertinctus*

	R	S	M	
Капсула				Различия между диссоциантами
Размер	Min		Max	В 2 раза
Химический состав				
Количество сахаров	4	3	3	
Анионные группы	-	+	+	
Антигенный состав	++	+-	+-	
Клеточная стенка				
Размер	Max		Min	В 2 раза
Химический состав	Одинаковый			
Липиды				
Количество	Max			
Ненасыщенные жирные кислоты	Min		Max	В 2 раза

Особенности клеточных оболочек диссоциантов определяют их многие физиолого-биохимические и морфологические различия. Так, R-клетки ряда бацилл и стрептококков, оболочки которых содержат больше липидов по сравнению с углеводами, обладают более гидрофобными свойствами, чем S- и особенно M-клетки (Стабникова с соавт., 1991). В жидкой среде с гексадеканом у углеводородоокисляющего штамма *Rhodococcus rubropertinctus* R-клетки почти полностью переходят из водной суспензии в гексадекан, а слизистые M-клетки практически все остаются в водной фазе. Установлена корреляция между гидрофобностью клеток и их способностью к адгезии: наибольшими адгезивными свойствами обладают M-клетки (Милюко, Егоров, 1994). У грамотрицательных бактерий *Pseudomonas fluorescens* (Николаев, Милюко, 2000), *Salmonella minnesota* (Воскун с соавт., 1992) адгезивные свойства, наоборот, выше у R-клеток, чем у S. Эти особенности диссоциантов расширяют адаптационные возможности вида в естественных местах обитания; их надо учитывать в биотехнологических процессах при флотационном разделении клеток или при взаимодействии клеток с сорбентами. Различия во взаимодействии клеток с сорбентами могут быть использованы для разделения популяции бактерий на диссоцианты.

Одной из важных задач биотехнологии является разработка методов контроля за составом популяции продуцентов, особенно экспресс-методов. Различия в химическом составе клеточных оболочек диссоциантов являются основой для методов контроля за соотношением диссоциантов в популяции продуцентов, для выявления возбудителей заболевания. Серологические методы, основанные на антигенной специфичности, широко используются в медицинской практике (Милюко, Егоров, 1991).

Измерение дзета-потенциала каждой отдельной клетки по ее подвижности в электрическом поле на препаратах под микроскопом позволяет проводить быстрое количественное исследование структуры популяции (Смирнов с соавт., 1990; Van der Mei, Busscher, 2001).

Поверхностный заряд клеток определяет характер их расхождения после деления. Так, кислый капсульный полисахарид S- и M-диссоциантов родококка (табл. 1.3) создает высокий поверхностный заряд клеток, поэтому при делении дочерние клетки отталкиваются и образуют характерные V-образные структуры, а R- диссоциант не содержит кислоты в составе капсульного полисахарида, он имеет минимальный поверхностный заряд, и поэтому делящиеся клетки лежат на одной прямой.

1.4. Физиолого-биохимические особенности диссоциантов бактерий

На коррелятивный характер изменчивости бактерий при диссоциативных переходах указывают большинство авторов. Так, утрата одного только признака (О-антигена) грамотрицательными патогенными бактериями приводит к одновременному изменению ряда признаков: вирулентных, антигенных, адгезивных и инвазивных свойств, устойчивости к фагоцитозу и бактериофагам, повышению способности к агглютинации в солевых растворах. S-вариант вирулентен у большинства грамотрицательных патогенных бактерий (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Neisseria*, *Haemophilus* и др.), а R-диссоциант авирулентен.

У грамположительных бактерий *Mycobacterium tuberculosis* вирулентен R-диссоциант. Для R-диссоцианта *Streptococcus pneumoniae* по сравнению с S-диссоциантом характерна укороченная фаза экспоненциального роста, быстрое достижение максимальной удельной скорости роста и быстрое наступление фазы отмирания, более высокий экономический коэффициент (Милько, Егоров, 1991; Милько с соавт., 2007). Выявлены особенности хемотаксиса у R- и S- диссоциантов *Bacillus thuringiensis* (Лебенко с соавт., 2005).

У ряда сапротрофных бактерий (*Bacillus thuringiensis*, *Rhodococcus rubropeertinctus*) выявлены различия в скоростях роста диссоциантов, в ряде случаев это может определяться особенностями строения клеточных оболочек их диссоциантов, а также составом среды. Так, у грамположительной углеводородокисляющей бактерии *R. rubropeertinctus* на среде с гексадеканом наибольшей скоростью роста обладают R-клетки, содержащие максимальное количество липидов в клеточной оболочке. У грамотрицательной бактерии *Pseudomonas aeruginosa* на среде с гексадеканом выше скорость роста у S-клеток, которые выделяют наибольшее количество ПАВ, что ускоряет поступление углеводорода в клетки, однако на среде с углеводами наибольшей скоростью роста обладают R-клетки (Милько, Егоров, 1991). У *P. fluorescens* на глюкозо-минеральной среде также максимальная скорость роста выше у R-клеток, чем у S (Николаев, Милько, 2000).

Еще в шестидесятые годы сравнение обмена фосфорсодержащих соединений у диссоциантов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* позволило предположить, что у R-диссоциантов преобладает окислительный путь использования углеводов, а у S – гликолитический. У *Pseudomonas aeruginosa* на среде с глюкозой в культуральной жидкости M-диссоцианта обнаружена муравьиная кислота, и активность дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата на два порядка ниже, чем у R- и S-диссоциантов (Милько, Красильникова, 1999). На стационарной стадии роста этих бактерий у R-клеток наблюдается максимальный среди диссоциантов рост, pH среды меняется мало, соотношение потребленных клетками углерода к фосфору (C/P) минимальное; у M-диссоцианта среда быстро подкисляется до 3.4, что приводит к остановке роста, соотношение C/P максимально; у S-клеток наблюдается изменение pH и C/P в динамике роста. Можно предположить, что у R-клеток преобладает окисление глюкозы до CO₂ и воды, у M-клеток – брожение, у S - возможно переключение с одного пути использования глюкозы на другой (Милько, Ильиных, 2004). Эти физиолого-биохимические различия диссоциантов могут обуславливать изменения их потребностей в основных биогенных элементах.

Для другого штамма *P. aeruginosa* установлено существование нескольких электрон транспортных систем, одна из которых заканчивается нечувствительной к цианиду оксидазой (Comolli et al., 2002).

Гетерогенность популяции бактерий, связанная с процессом диссоциации, может возникать не только при периодическом культивировании бактерий, но и при непрерывном. Была построена математическая модель изменения соотношения биомасс R-, S- и M- диссоциантов *Rhodococcus rubropertinctus* в условиях непрерывного культивирования на среде с глюкозой. Показано, что соотношение биомасс диссоциантов в популяции, достигшей стационарного состояния, определяется соотношением их удельных скоростей роста: резко преобладает диссоциант, имеющий даже незначительное преимущество по удельной скорости роста. Частота возникновения диссоциантов мало влияет на изменение состава популяции. Выявленные закономерности подтверждены экспериментально при непрерывном культивировании продуцента экзополисахарида: исходный медленно растущий M-диссоциант *Mycobacterium lacticolum*, образующий максимальное количество экзогликана, постепенно вытесняется из популяции S-клетками, и синтез полисахарида снижается в 5 раз (Милько, Егоров, 1991).

1.5. Синтез практически ценных веществ диссоциантами бактерий

Диссоциация, внося важнейший вклад в создание гетерогенности популяции бактерий, приводит к нестабильности синтеза целевых продуктов в биотехнологических процес-

сах. Биологическая активность диссоциантов может отличаться в 1.5-3 раза. М-клетки, обладающие среди диссоциантов минимальной толщиной клеточной стенкой, синтезируют наибольшее количество веществ, выделяемых в среду: протеаз (*Bacillus mesentericus*, *Rhodococcus rubropertinctus*), экзополисахаридов (*R.rubropertinctus*, *Mycobacterium lacticolum*), липаз (*M.phle*) (Милько с соавт., 2007), нейромедиаторных аминов (*Bacillus subtilis*) (Цавкелова с соавт., 2000). S-клетки наиболее активны при трансформации стероидов (*Rhodococcus sp.*) (Войшвилло с соавт., 1993), синтезе витамина B₂ (*Rhodococcus rubropertinctus*), антибиотика низина (*Streptococcus lactis*) (Баранова с соавт., 1995), молочной кислоты (*S.lactis*) (Милько с соавт., 1991), получении сорбозы из сорбита (*Gluconobacter oxydans*) (Шмалько, 1999). R-клетки, обладающие максимальной толщиной клеточной стенки, доминируют в популяциях бактерий, которые разрушают токсичные вещества: пиридин (*Rhodococcus aquosus*), малеиновую кислоту (*Alcaligenes xylosoxidans*) (Семенова, Сафронова, 2000), ПАВ (*Pseudomonas aeruginosa*) (Настоящая, 1992). Соотношение диссоциантов в популяции является показателем загрязнения почв. Так, в образцах почв, взятых около бензоколонок, количество R-клеток в популяции *Bacillus megaterium* в несколько раз выше, чем в образцах газонной почвы города, составляя около 90% популяции (Скворцова, 1997).

У диссоциантов промышленных продуцентов могут различаться не только количество, но и качество синтезируемых практически ценных веществ. Антибиотик грамицидин S образуют примерно в равных количествах клетки R- и M-диссоциантов *Bacillus brevis*, S-диссоциант синтезирует два других антибиотика – эсеин и бресеин – и не образует грамицидин S. У продуцента инсектицида *B. thuringiensis* активными являются только R-клетки. Вирулентный для грызунов бактороденцид синтезирует только S-диссоциант *Salmonella enteritidis*. Диссоцианты производственных штаммов *Bacillus subtilis* образуют различные гидролитические ферменты: R – амилазу и металлпротеазу, S – амилазу, металлпротеазу и сериновую протеазу, M – сериновую протеазу. У клубеньковых бактерий азот фиксируют только M-клетки. Диссоцианты *Pseudomonas stutzeri* синтезируют различные цитокинины (Милько с соавт., 2007). В автотрофных условиях на водороде растут только R-клетки *Alcaligenes eutrophus* (Сташишина с соавт., 1999).

1.6. Влияние внешних факторов среды на рост и изменчивость диссоциантов бактерий

Диссоцианты у бактерий возникают с высокой частотой в результате изменения генетических детерминант клетки. Затем под действием различных физико-химических факторов и состава среды они подвергаются процессу селекции. Так как диссоциация лучше изу-

чена у грамотрицательных патогенных бактерий, для которых внешняя среда (макроорганизм) постоянна, то процесс селекции под действием внешних факторов исследован мало. Однако именно такие работы помогают понять биологический смысл процесса расщепления популяции бактерий на варианты, создать научную основу для оптимизации микробиологических производств, в которых используются диссоциирующие продуценты.

1.6.1. Состав питательной среды

Наличие различных источников углерода, азота, фосфора, некоторых солей в составе питательной среды, изменение их концентрации способствует преимущественному росту того или иного диссоцианта бактерий. Иными словами, состав среды может усилить процесс диссоциации культуры или, наоборот, стабилизировать ее.

Важная роль в процессе селекции вариантов бактерий принадлежит продуктам метаболизма исходной культуры. Например, накопление в среде D-аланина лимитирует увеличение числа жизнеспособных клеток S-диссоцианта *Brucella abortus* и в то же время создает благоприятные условия для устойчивых к этому метаболиту клеток R-варианта. Сильным селектирующим фактором является фосфор. Избыток фосфора (0.5% KH_2PO_4) в среде с углеводами способствует увеличению в популяции S-варианта по сравнению с R у *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Bacillus mesentericus* (Милюк, Егоров, 1991). Возможно, это объясняется различными путями использования углеводов у S- и R-диссоциантов этих бактерий: у S-диссоциантов преобладает гликолитический путь превращения углеводов, у R-диссоцианта – прямое окисление до углекислого газа и воды, а избыток фосфора в среде ингибирует дегидрогеназу глюкозо-6-фосфата – первую реакцию прямого окисления углеводов.

Было изучено влияние различных концентраций фосфора и кислорода в среде с гексадеканом на динамику роста и изменчивость трех диссоциантов *Rhodococcus rubropertinctus* в монокультурах, в попарных смесях и в смеси трех диссоциантов. Для этого был использован план полного факторного эксперимента 2^2 . Показано, что при недостатке в среде фосфора или кислорода во всех вариантах опыта вытесняются из популяции R-клетки. При достаточном их содержании быстрорастущие R-клетки имеют селективное преимущество (Милюк, Егоров, 1991).

1.6.2. Температура

У клеток *Escherichia coli* при повышении температуры роста до 43°C наблюдается утрата мукоидного роста. Аналогично показано для *Pseudomonas aeruginosa*: немуконидный вариант вытесняет мукоидный при повышении температуры культивирования до 37°C. Низкая температура культивирования (5-14°) препятствует переходу *Yersinia enterocolitica* в R-форму (Милько, Егоров, 1991). Однако морфология колоний в популяции диссоциантов *Bacillus thuringiensis* не изменяется при повышении температуры до 40°C (Секерина, Чемерилова, 2003).

Сравнивали влияние температуры и ряда других физических и химических факторов на рост диссоциантов четырех видов бактерий с различными физиологическими особенностями (Милько, Егоров, 1992; Милько, Никитенко, 1998): три мезофильных вида, среди которых один факультативный анаэроб (производственный штамм *Streptococcus lactis*), и один термофильный (*Bacillus coagulans*). У всех видов при максимальной температуре выживают только R-клетки (табл. 1.4), при этом абсолютные значения температур различаются. При минимальной температуре лучше выживают M-клетки.

Сравнение количества ненасыщенных жирных кислот у диссоциантов исследуемого родококка при разных температурах роста (Милько с соавтр., 2007) показало, что при одной и той же температуре культивирования 30°C наибольшее количество ненасыщенных жирных кислот содержат M-клетки, наименьшее – R, разница между ними в два раза. Снижение температуры роста до 20°C приводит к еще большему увеличению ненасыщенных жирных кислот в M-клетках, а увеличение температуры до 40°C – к снижению их содержания в R-клетках, и различие между диссоциантами становится уже в 4 раза. Следовательно, диссоциация расширяет границы изменения состава липидов, т.е. текучести мембран, и тем самым увеличивает адаптационные возможности вида.

Таблица 1.4. Влияние внешних факторов среды на рост диссоциантов бактерий. Жирным шрифтом выделено максимальное/минимальное значение фактора среди трех диссоциантов

Фактор	Вид бактерий	Значение фактора	Диссоцианты		
			R	S	M
Температура, °C	<i>Rhodococcus rubropertinctus</i>	min	16	14	14
		max	41	39	39
	<i>Streptococcus lactis</i>	min			
		max	45	42	39
	<i>Bacillus coagulans</i>	min	27	22	
		max	65	62	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	min	18	16	14
		max	45	43	41
УФ-лучи, тыс.эрг/мм (интенсивность, при которой выживает половина клеток)	<i>Rhodococcus rubropertinctus</i>		1.7	0.8	0.4
	<i>Streptococcus lactis</i>		2.0	1.0	0.5

	<i>Bacillus coagulans</i>		3.0	1.5	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		3.0	1.5	0.5
Концентрация NaCl, %	<i>Rhodococcus rubropertinctus</i>	max	5.5	6.5	7.5
	<i>Streptococcus lactis</i>	max	5.5	6.5	7.5
	<i>Bacillus coagulans</i>	max	5.5	6.5	7.5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	max	8.0	7.0	8.5
РН	<i>Rhodococcus rubropertinctus</i>	min	5.0	4.0	5.5
		max	9.0	9.0	11.5
	<i>Bacillus coagulans</i>	min	4.5	4.0	
		max	9.0	8.0	
Хранение на косяках с МПА+сусло, % выживших клеток	<i>Rhodococcus rubropertinctus</i>		20	9	1
	<i>Bacillus coagulans</i>		1	0.5	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		10	3	1
Чувствительность к лизоциму, % лизированных клеток	<i>Rhodococcus rubropertinctus</i>		46	64	81

1.6.3. Ультрафиолетовые лучи

Известно, что устойчивость бактерий к облучению зависит от содержания ДНК в клетках и наличия в них репарационной системы; важную роль играет также строение клеточной стенки. Показано, что клетки, обработанные лизоцимом, разрушающим клеточную стенку, становятся более чувствительными к облучению, чем исходные. У четырех исследуемых видов бактерий (табл. 1.4) М-клетки в 4-5 раз чувствительнее к УФ-лучам, чем R, и в 2 раза чувствительнее, чем S-клетки. Для двух из этих культур (*Rhodococcus rubropertinctus* и *Pseudomonas aeruginosa*) установлено, что их диссоцианты имеют очень близкий процент содержания ГЦ-пар в ДНК и сходные нуклеотидные последовательности. Поэтому можно предположить, что различия в чувствительности вариантов к действию УФ-лучей определяются особенностями строения их клеточных стенок. R-клетки *Bacillus thuringiensis* и *Pseudomonas fluorescens* также более устойчивы к облучению, чем S-клетки (Милюк,Егоров, 1991).

1.6.4. Осмотическое давление

В настоящее время есть много работ, в которых повышенные концентрации NaCl используются как фактор стресса с коротким сроком воздействия на бактерии, при этом происходит быстрое изменение и модификация компонентов клетки. В клетках существует специальная система регуляторных белков (EnvZ/OmpR), образуются протекторные вещества (трегалоза, пролин, глицин-бетаин, глутамат и др.). Эти фенотипические изменения происходят в каждой или большинстве клеток популяции.

При длительном воздействии повышенных концентраций NaCl в среде, т.е. при неблагоприятных условиях роста, различается количество выросших клеток бактерий (табл. 1.4): у грамположительных бактерий наиболее устойчивы M-клетки, наиболее чувствительны – R-клетки. R-диссоциант *Pseudomonas aeruginosa* более устойчив к высоким концентрациям NaCl. Повышение концентрации NaCl в среде вызывает слизистый фенотип также у *P. aeruginosa* штамм PAO (Deretic et al., 1990). Различия в чувствительности диссоциантов к осмотическому давлению приводят к изменению состава популяции бактерий. Так, если в исходной популяции R-диссоцианта *Bacillus coagulans* S-клетки составляют 10%, то при увеличении концентрации NaCl в среде до 4% на стационарной стадии роста доля S-клеток в популяции возрастает до 80%. Если в исходной популяции S-диссоцианта R-клетки составляют 10%, то к концу культивирования они не выявляются при рассеивании на плотную среду (Милько, Егоров, 1991).

Исследовали влияние повышенных концентраций NaCl и в качестве стрессового фактора и компонента питательной среды на рост и синтез диссоциантами *Rhodococcus erythropolis* протекторного вещества трегалозы, которая входит в состав клеточной стенки этого организма (Комарова с соавт., 1998). При оптимальных условиях культивирования в более тонкостенных S-клетках обнаруживается в три раза больше трегалозы, чем в R, что и определяет большую устойчивость S-клеток к повышенным концентрациям NaCl. Кратковременное воздействие соли (осмотический шок) приводит к увеличению синтеза трегалозы, особенно S-клетками, однако при культивировании бактерий в течение двух суток на среде с той же концентрацией соли количество трегалозы у S-диссоцианта снижается, почти достигая значения в контроле, т.е. у бактерий существуют различные механизмы адаптации к кратким или длительным неблагоприятным воздействиям.

1.6.5. Активная кислотность среды (pH)

Связь диссоциации бактерий и pH среды исследована мало. Установлено, что при сдвиге pH усиливается диссоциация S-варианта *Bacillus thuringiensis* и мало изменяется у R-диссоцианта (Милько, Егоров, 1991). У *B.coagulans* и *Rhodococcus rubropertinctus* при

низком значениях pH = 4.0 селективное преимущество имеют S-клетки, а при высоком значении pH = 9.0 выживают R-клетки, еще более устойчивы к щелочным условиям M-диссоциант (табл. 1.4).

1.6.6. Антибиотики

Во многих работах показано, что S-клетки более чувствительны к действию антибиотиков, чем R-клетки. Это показано для *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus dendrolimus*, *B.thuringiensis*, клубеньковых бактерий, однако к некоторым антибиотикам чувствительность диссоциантов одинаковая.

Было испытано действие шести антибиотиков с разным механизмом действия на рост трех диссоциантов *Rhodococcus rubroperitinctus*: пенициллина, оказывающего первичное действие на биосинтез пептидогликана клеточной стенки; стрептомицина, тетрациклина и эритромицина, являющихся ингибиторами синтеза белка, но с разным механизмом действия; рифампицина, ингибирующего РНК-полимеразу; актиномицина, подавляющего синтез нуклеиновых кислот, взаимодействуя с ДНК. Выделили из единичных колоний по 3 клона R-, S- и M-диссоциантов и затем по 7 субклонов каждого клона, т.е. 63 субклона. Для каждого субклона определяли методом диффузии в агар концентрацию антибиотиков, дающую одинаковую зону подавления роста. Показано, что только к эритромицину чувствительность диссоциантов родококка одинаковая. Для остальных антибиотиков сохраняется общая закономерность: наиболее чувствительные – M-клетки, а самые резистентные – R-клетки, различия между ними в 1.5-2 раза, и только к пенициллину – в 3-4 раза. Сравнение способности диссоциантов *R. rubroperitinctus* к поглощению хлортетрациклина флуоресцентным методом показало, что толстостенные R-клетки поглощают наименьшее количество антибиотика и в 2.5 раза с меньшей скоростью, чем тонкостенные M-клетки (Милько, Егоров, 1991).

R-диссоциант *Micrococcus luteus* в два раза более устойчив к действию сигма-эндотоксинов из *Bacillus thuringiensis*, обладающих антибактериальным действием, чем S- и M-диссоцианты (Юдина с соавт., 1996).

Хотя различия в чувствительности диссоциантов к антибиотикам невелики, но их необходимо учитывать. Например, при борьбе с инфекционными заболеваниями, вызываемыми грамотрицательными бактериями: подбираются концентрации антибиотика, подавляющие не только вирулентные диссоцианты, но и более устойчивые авирулентные R-формы для предотвращения повторного заболевания.

1.6.7. Выживаемость диссоциантов бактерий при различных условиях хранения

Хранение можно рассматривать как один из факторов воздействия внешней среды на клетку – высыхание. Микроорганизмы разных систематических групп и даже штаммы одного вида отличаются по чувствительности к действию на них различных способов хранения. Наиболее простыми являются: хранение в физиологическом растворе, на косяках, под минеральным маслом. Одним из основных способов длительного хранения микроорганизмов является лиофильное высушивание из замороженного состояния под вакуумом, при этом важно изыскание оптимальных условий лиофилизации с учетом подбора суспензионных защитных сред, возраста культуры и т.д. Перспективными способами хранения является криоконсервация и хранение в глицерине. Известно, что во время хранения микроорганизмов происходит снижение их антибиотической, ферментативной активности и т.д. Так, при периодических пересевах R- и S-диссоциантов *Bacillus thuringiensis* var. *dendrolimus* наблюдается постепенное замещение продуктивного S-диссоцианта R-диссоциантом и уменьшение продуцирования экзотоксина.

Изучено влияние шести способов хранения на выживаемость в течение двух лет R- S- и М-диссоциантов *Rhodococcus rubropertinctus*: после лиофилизации в защитной среде с 10% сахарозы и 1% желатины, после лиофилизации в защитной среде с 1% глутамата натрия, под минеральным маслом, в физиологическом растворе, в дистиллированной воде, на косяках с МПА+сусло. После лиофилизации в защитной среде с сахарозой и желатиной выживаемость клеток всех трех диссоциантов снижается незначительно. Состав популяции также не меняется: диссоцианты среди исходных R-, S- и М-клеток составляют доли процента, которые однако представляют большие абсолютные величины – миллионы клеток в мл. Такие количества клеток вполне достаточны для посевного материала. Аналогичные закономерности выявлены после хранения диссоциантов под минеральным маслом или 6 месяцев хранения в физиологическом растворе. При хранении бактерий после лиофилизации в защитной среде с глутаматом натрия выживаемость S-клеток снижается на три порядка уже через три месяца хранения, в то время как количество R-клеток уменьшается незначительно, поэтому если в исходной популяции S- диссоцианта R-клетки составляют 0.1%, то после хранения их содержание возрастает до 10%. Скорость отмирания М-клеток также очень высокая, и после хранения в их популяции выявляются не только S-, но и R-клетки. Такая же картина наблюдается при хранении родококков в дистиллированной воде или на плотной среде в пробирках (Милько, Егоров, 1991). Сравнивали выживаемость диссоциантов трех видов бактерий после хранения в течение 4 месяцев на косяках в холодильнике (табл. 1.4). У всех видов бактерий R-клетки на порядок устойчивее, чем S- и М-клетки. Еще раз следует подчеркнуть, что изменение состава популяции высокопродуктивных тон-

костенных S- и М-диссоциантов после хранения происходит из-за их более быстрого отмирания по сравнению с толстостенным, но мало активным R-диссоциантом, что приводит к снижению выхода целевого продукта.

Итак, преимущественный рост того или иного диссоцианта в меняющихся условиях внешней среды в большой степени определяется особенностями строения их клеточных оболочек. Селективные преимущества имеют: R-диссоциант – при высокой температуре культивирования, действии УФ-облучения, антибиотиков, литических ферментов, повышенной аэрации, при высыхании; S-диссоциант – при кислой реакции среды, повышенной концентрации фосфатов; М-диссоциант – при низкой температуре культивирования, повышенном осмотическом давлении, щелочном значении pH.

Приведенные выше данные используются для практических целей. Приведем несколько примеров.

У фитопатогенных псевдомонад наиболее вирулентен М-диссоциант. Если в начале лета погода влажная, пасмурная, прохладная, т.е. благоприятная для М-диссоцианта, то во второй половине лета будет вспышка бактериозов растений. Поэтому надо заранее проводить профилактические работы, например, на посадках томатов.

Сравнивали состав микрофлоры полости рта у больных парадантозом и здоровых людей (Мельников, 1989). От обеих исследуемых групп выделены одинаковые виды грамположительных микроорганизмов, однако у здоровых людей они находятся в авирулентной S-форме, а у больных – в вирулентной R-форме. Чтобы перевести R-диссоциант в S следует полоскать рот раствором соды и соли, что раньше и рекомендовали делать стоматологи.

При длительной работе под водой у водолазов часто возникают заболевания носоглотки и кожи, которые вызывают М-диссоцианты патогенных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Микробиологи установили, что в гипербарических условиях селективное преимущество имеют М-клетки. Поэтому были рекомендованы способы обеззараживания водолазного оборудования, подавляющие не только М-диссоциант, но и более устойчивый, авирулентный S-диссоциант, который в гипербарических условиях вытесняется из популяции более приспособленным М-вариантом (Андреева, 2000).

В заключении этого раздела следует сказать следующие. Имеется обширная литература, где указывается, что бактерии снабжены системами, передающими извне сигналы (стрессовое воздействие) и регулирующие экспрессию ряда генов, с тем, чтобы приспособиться к возникшим воздействиям (Cozzone, 1994; Головлев, 1999; Huang-Mo, Yasbin, 2002). Такие изменения протекают быстро, (в течение минут) в каждой или большинстве клеток популяции и происходят только под действием внешнего фактора, т.е. это адаптация на уровне клетки.

Физиолого-биохимические различия в диссоциативных клетках, описанные в настоящем разделе, существуют до изменения внешнего воздействия. При длительном росте в неблагоприятных условиях селективные преимущества имеет диссоциант, обладающий в данных условиях большей скоростью роста, но для этого культура должна размножаться (в течение часов или суток), поэтому обычно наблюдается лаг-фаза, т.е. происходит адаптация на уровне популяции, которая еще мало изучена. Вероятно, вариабельный фенотип может возникнуть и в результате воздействия обоих способов регуляции: селективного и сигнального (Варвашевич с соавт., 1991). Преадаптация к неблагоприятным воздействиям сокращает лаг-фазу и/или увеличивает максимальную скорость роста бактерий (Матыс с соавт., 1998), вероятно, за счет изменения состава популяции бактерий.

1.7. Молекулярные и генетические основы диссоциации бактерий

В настоящее время считают, что диссоциация бактерий складывается из двух процессов: возникновения диссоциантов в результате изменения генетических свойств клетки и селекции возникших вариантов под действием внешних факторов. Возникновение новых генотипов происходит на основе случайных мутаций, переноса генетического материала и перестройки генома внутри одной клетки.

Вероятно, у любых бактерий возможны случайные ненаправленные мутации, в результате которых изменяются определенные стадии синтеза компонентов клеточной оболочки и, в конечном счете, морфология колоний. Однако частота мутаций на несколько порядков ниже частоты возникновения диссоциантов. Перенос генетического материала (конъюгация, трансформация, трансдукция) могут вызвать появление диссоциантов, но это достаточно редкие события. Фаговая конверсия лучше объясняет постоянный характер изменения клетки и высокую частоту возникновения диссоциантов. Однако при переносе генетического материала помимо акцепторной клетки обязательно наличие или клетки-донора, или ДНК другой клетки, или фага, что может происходить в открытых системах, с которыми имеют дело медицинские и почвенные микробиологи. Однако хорошо известно, что в исследовательской работе или в стерильных микробиологических производствах бактерии, полученные из одной клетки, легко подвергаются диссоциации. Поэтому основная роль в диссоциативных переходах принадлежит мигрирующим генетическим элементам: транспозонам, плазмидам (эписомам) и умеренным бактериофагам, которые участвуют в регуляции экспрессии генов и индуцировании геномных перестроек.

В таблицах 1.5 и 1.6 представлены только некоторые данные литературы о генетических основах диссоциативных переходов у грамотрицательных и грамположительных бактерий.

Таблица 1.5. Генетические основы диссоциативных переходов грамотрицательных бактерий

Вид бактерий	Фаг	Плазмида	Инвертируемый сегмент	Расположение на хромосоме
<i>Salmonella typhimurium</i>	Фаг			
<i>S.typhimurium</i>			995 п.н.	
<i>S.dublin</i>		80 т.п.н.		
<i>Shigella sonnei</i>		120 МД		
<i>Escherichia coli</i>		54 МД		
<i>E.coli</i>				89 мин
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		2.6 МД		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Фаг			
<i>P. aeruginosa</i>				89-94 мин
<i>P.atlantica</i>			1200 п.н.	
<i>P.syringae</i>		90 МД		

Таблица 1.6. Генетические основы диссоциативных переходов грамположительных бактерий

Вид бактерий	Фаг	Плазмида	Минорные различия в ДНК	
			(Генный зонд)	(DIR-ПЦР)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Фаг	плазмида		
<i>B.thuringiensis</i>		62 МД		
<i>B.antraces</i>		60 МД		
<i>B.mesentericus</i>			Фаг M13	
<i>B.cereus</i>				+
<i>B.subtilis</i>				+
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Фаг			
<i>M.phlei</i>	Фаг			
<i>M.fortuitum</i>	Фаг			
<i>Clostridium botulinum</i>	Фаг			
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Фаг			
<i>Rhodococcus rubropertinctus</i>	Фаг	17 МД		

Так, для ряда видов псевдомонад показано, что причиной расщепления популяции на варианты является фаговая конверсия. У *Pseudomonas aeruginosa* под действием фага образуются слизистые колонии. Свойства природных слизистых вариантов, выделенных из различных источников, и индуцированных фагом, одинаковы. Ген, ответственный за синтез экзополисахарида *P. aeruginosa* PAO расположен на хромосоме между 89 и 94 мин генетической карты (MacGeorge et al.,1986). *P. atlantica*, являющийся продуцентом внеклеточного

полисахарида, с высокой частотой образует немуккоидные варианты. Выключение экспрессии локуса, ответственного за синтез экзополисахарида, происходит за счет встраивания в его состав сегмента ДНК длиной 1200 п.н., удаление этого сегмента приводит к восстановлению мукоидного фенотипа. У *P. syringae* спонтанная потеря плазмиды 90 МД приводит к потере вирулентности и изменению колоний. RS-переход у *Azospirillum brasilense* сопровождается потерей плазмиды 115 МД (Матора с соавт., 2003). Ген, участвующий в RS переключении у *Escherichia coli*, картирован на 89 мин генетической карты (Warne et al., 1990).

В ряде работ исследовалась роль микобактериофагов, выделенных из различных источников, в диссоциации *Mycobacterium smegmatis*. После обработки R-вариантов рядом микобактериофагов количество гладких колоний составляет 1-10 % популяции, тогда как спонтанно появляется одна S-колония на 1000. Выжившие S-колонии оказались лизогенными и устойчивыми к фагам, которыми их инфицировали. Потеря фага приводит к превращению S-клеток в R. Под действием фага наблюдается переход R-диссоциантов в S также у *M. phlei* и *M. fortuitum*. У *M. avium* SR переход обусловлен делецией около 28 Килобаз (Belisle et al., 1993).

Из S-диссоцианта *Rhodococcus rubropertinctus* (*Mycobacterium lacticolum*) выделены плазида размером 14 МД, умеренный фаг 104S и изучена их роль во взаимных переходах трех диссоциантов этой культуры (рис. 1.1). Сравнение лизогенных свойств диссоциантов (спонтанного выделения фага в культуральную жидкость, индукции фага, чувствительности к фагу, адсорбции фага на клетках и клеточных стенках, влияния фага на диссоциацию при его добавлении к клеткам или элиминации) показало, что R-, S- и M-диссоцианты устойчивы к выделенному фагу. Если бы один из вариантов лизировался, то фаг не мог бы играть существенную роль в расщеплении культуры на три варианта.

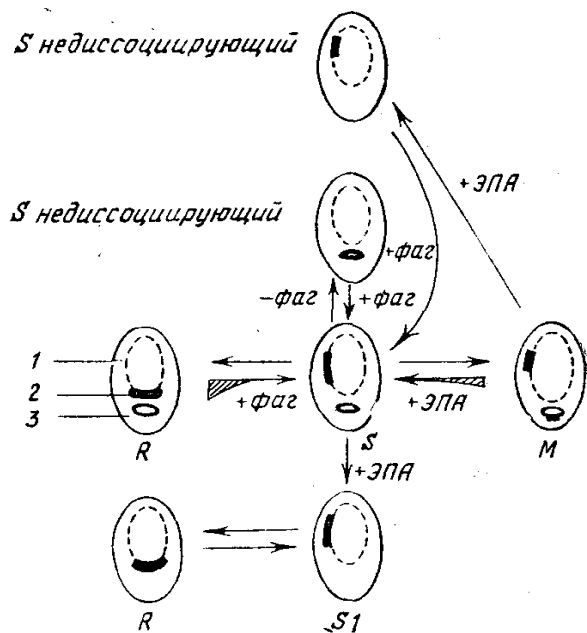


Рис. 1.1. Схема взаимных переходов клонов диссоциантов *Rhodococcus rubropertinctus*. 1 – ДНК хромосомы, 2 – ДНК профага, 3 – ДНК плазмиды, ЭПА – элиминирующие плазмиды агенты

становивается. Добавление фага усиливает диссоциацию только у R-диссоцианта (в 100 раз), т.е. вероятно, клетки содержат модифицированный профаг, а добавленный фаг восстанавливает исходную нуклеотидную последовательность. Добавление элиминирующих плазмиды агентов (ЭПА) усиливает диссоциацию только M-диссоцианта (в 40 раз). При этом возникают недиссоциирующие S-диссоцианты в 10 раз чаще, чем спонтанно, и у них набор фрагментов ДНК, гибридизующихся с ДНК фага, содержат на две полосы меньше, чем диссоциирующий S-вариант. Можно предположить, что в M-клетках часть профаговой ДНК содержится в плазмиде. При действии ЭПА на S-диссоциант часто возникают колонии более шероховатые, чем обычно. При диссоциации такие варианты могут образовывать только R-колонии. Итак, расщепление *R. rubropertinctus* на варианты обусловлено наличием в клетках умеренного фага 104S, а также плазмиды, т.е. взаимные переходы диссоциантов связаны с перестройкой генетического материала внутри одной клетки, в которой активное участие принимают перемещающиеся генетические элементы. При потере профага или его части клетка теряет способность к диссоциации. У одного штамма бактерии могут быть клоны, расщепляющиеся на три, два варианта или недиссоциирующие.

У *Thiobacillus ferrooxidans* причина вариации фаз – транспозиция IS-элемента (Schradler, Holmes, 1988).

Таким образом, механизмами, контролирующими диссоциативные переходы, являются: фаговая конверсия и различные перестройки генома внутри одной клетки, где активную роль играют профаг и плазмиды, а также инверсии сегментов ДНК и делеции. Часто выводы авторов определяются теми методами, которые используются ими в работе. Если обра-

При молекулярной гибридизации рестрикционных фрагментов ДНК диссоциантов с ДНК фага, меченной по фосфору, оказалось, что геном всех диссоциантов содержат последовательности, гомологичные ДНК фага, при этом набор гибридизующихся фрагментов у диссоциантов различается. Следовательно, фаговая ДНК (профаг) может принимать активное участие в диссоциации изучаемой бактерии, а R-, S- и M-диссоцианты различаются по характерустройки профага в геном клетки. При потере фага S-клетки теряют способность к диссоциации, при их лизогенизации способность к расщеплению на три варианта вос-

тимые переходы диссоциантов зависят от плазмид или умеренных фагов, то в большинстве случаев экспериментально доказана только необратимая потеря внехромосомных генетических элементов и сопровождающие ее фенотипические изменения. Надежность такого генетического явления в естественных условиях проблематична. Крупная плазида, определяющая взаимные переходы вариантов бактерий, может представлять собой профаговую ДНК, как это было показано для *Bacillus thuringiensis*.

В обзорах последних лет в качестве механизмов изменчивости вирулентных свойств *Corynebacterium diphtheriae* (Ряпис с соавт., 1998) и *Vibrio cholerae* (Лобанов, Марченков, 1999) также указываются: лизогенизация клеток бактериофагами, плазмиды, транспозоны, инверсии фрагментов ДНК.

Недавно проведена оценка внутригеномных различий диссоциантов *Bacillus cereus* и *B. subtilis* с помощью полимеразной цепной реакции с использованием системы праймеров, разработанных на основе полных геномов прокатиот, представленных в базе данных GenBank (DIR-ПЦР). Выявлены минорные отличия в структуре геномов диссоциантов (Цыганкова с соавт., 2004).

Связаны ли обратимые изменения морфологии колонии при диссоциативных переходах (вариациях фаз) и антигенные вариации? По мнению ряда авторов (Милько, Егоров, 1991) у грамположительных и грамотрицательных бактерий это два отдельных, но генетически родственных процесса. Гены, обуславливающие их, локализованы в гипермутабельном локусе (локусах), т.к. у одного штамма происходят независимо и с разной скоростью, однако регуляция экспрессии сопряжена. Поэтому клетки с одинаковой морфологией колоний могут содержать разные антигены, что особенно характерно для патогенных бактерий, при этом в изменении поверхностных структур клеток патогенных бактерий важную роль играют жгутики, ворсинки, белки, липопротеины и липополисахариды клеточных стенок, капсулы (Прозоров, 2001).

Таким образом, сапротрофным бактериям для адаптации к меняющимся физическим и химическим воздействиям внешней среды необходим процесс диссоциации, а патогенным бактериям для адаптации к изменяющимся антителам макроорганизма важнее антигенные вариации.

Минорные изменения в ДНК бактерий при диссоциативных переходах мало изменяют процент гомологии при ДНК-ДНК гибридизации, который составляет, например, у трех диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* 97-99%, у трех диссоциантов *Rhodococcus rubroperitinctus* 98-99%.

Физиолого-биохимические свойства диссоциантов различаются в основном по принципу «больше-меньше», а при идентификации бактерий их свойства сравнивают по принципу «есть-нет», поэтому диссоцианты одного штамма определяются как один вид.

1.8. Некоторые практические рекомендации

Если увеличение гетерогенности популяции бактерий в процессе диссоциации благоприятно для микроорганизмов, то в производственных условиях и исследовательской работе – это нежелательное явление. Чтобы обнаружить у продуцента способность к диссоциации следует провести длительное выращивание ряда клонов исходной культуры (лучше на богатой жидкой среде) и затем рассеять их на агаризованную среду, обязательно содержащую углеводы для лучшего выявления морфологических различий колоний. Диссоциацию легче обнаружить при расщепе спор, чем вегетативных клеток (Дорошенко с соавт., 2001). У диссоциантов, выделенных из разных клонов исходной культуры, определяют: 1) способность к синтезу исследуемого вещества или скорость роста; 2) способность давать ревертанты, т.к. диссоциация это обратимый процесс. Если обнаружены статистически достоверные различия по биосинтетической активности или скорости роста у диссоциантов по сравнению с исходной культурой, то в дальнейшем необходимо: 1) строго контролировать состав популяции продуцента, периодически делая селективный отбор; 2) создавать условия культивирования, благоприятные для высокопродуктивного или быстро растущего варианта; 3) можно получить недиссоциирующий мутант, который выделяется при потере клеткой умеренного фага, однако в этом случае продуцент становится фагочувствительным. Недиссоциирующий S-диссоциант чаще выделяется после обработки M-диссоцианта элиминирующими плазмиды агентами. Для стабилизации диссоциантов разработан также способ, основанный на создании дисбаланса аутоиндукторов анабиоза (алкилоксибензолов) и автолиза (смесь ненасыщенных жирных кислот) (Эль-Регистан с соавт., 2003).

С процессом диссоциации сталкиваются чаще всего в следующих случаях.

1. После хранения продуцента, когда скорость отмирания клеток выше у высокопродуктивного диссоцианта, при этом значительно изменяется состав популяции микроорганизма, хотя роста культуры не происходит.
2. При длительном непрерывном культивировании.
3. При несоблюдении технологического режима в производственных условиях, когда изменение аэрации, температуры культивирования, pH и т.д. создает селективные преимущества малоактивному или неактивному диссоцианту. Изменение состава популяции диссоциирующего продуцента может не только снизить выход целевого продукта, но менять его состав.
4. После действия низкой концентрации повреждающего клетки фактора, когда состав популяции может измениться за счет преимущественного роста более устойчивого варианта, при этом обычно наблюдается удлинение лаг-фазы.

5. Часто изменение активности фермента под влиянием того или иного вещества среды, физико-химического фактора связывают только с его действием непосредственно на фермент, не учитывая возможность изменения состава популяции.

1.9. Заключение

Диссоциация – важнейший фактор, создающий гетерогенность микробной популяции, однако его часто не учитывают в работе. Возрастающий интерес к диссоциации связан с бурным развитием биотехнологии. Именно генетическая нестабильность штаммов-продуцентов является одной из главных причин снижения эффективности биотехнологических процессов.

При обратимых диссоциативных переходах у диссоциантов одновременно изменяются многие физиолого-биохимические и морфологические признаки, что настораживало исследователей. Первичные изменения при диссоциации происходят в геноме клетки. Представленный выше материал показывает, что одни из первичных фенотипических изменений происходят в размере и химическом составе клеточных оболочек бактерий (капсулы, клеточной стенки и цитоплазматической мембраны), что определяет другие физиолого-биохимические и морфологические особенности диссоциантов: изменение скорости выделения веществ из клетки, в том числе промышленно ценных, изменение устойчивости клеток к внешнему воздействию, изменение скорости поступления веществ в клетку и, следовательно, скорости роста, отличия в текучести мембран могут изменить активность ряда мембраносвязанных ферментов, изменение характера расхождения клеток после деления и, следовательно, морфологии колоний.

Известно, что чем более гетерогенна система, тем более она устойчива. Расщепление популяции бактерий на варианты приводит к расширению границ выживаемости вида, это адаптация на уровне популяции, процесс направленной самоперестройки популяции. При неблагоприятных условиях роста вид выживает в форме одного из вариантов. В этом заключается биологический смысл процесса диссоциации.

В производстве и исследовательской работе диссоциация – нежелательный процесс. Существование строгих коррелятивных зависимостей между генетическими, физиолого-биохимическими и морфологическими различиями у диссоциантов позволяет управлять и прогнозировать изменение состава популяции, создаваемое процессом диссоциации, и в производстве и в естественных местах обитания бактерий (Rosso, 2003).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Belisle J.T., Klaczekiewicz K., Brennan P.J., Jacobs W.R., Inamine J.M. Rough morphological variants of *Mycobacterium avium* // J. Biol.Chemistry. 1993. V. 268. № 14. Pp. 10517-10523.

Comolli C.J., Donohue C., Timothy J. *Pseudomonas aeruginosa* RoxR, a response regulator related to *Rhodobacter sphaeroides* PrrA, activates expression of the cyanide- insensitive terminal oxidase. // Mol. Microbiol. 2002. V. 45. № 3. P. 755-768.

Cozzone A.J. Bacterial protein phosphorylation and adaptive responses an overview. // 9-th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. Theses. M., 1994. P. 69.

Deretic V., Govan J.R.W., Konyecsni W.M., Martin D.W. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: mutation in the muc loci affect transcription of the algR and algD genes in response to environmental stimuli // Mol. Microbiol. 1990. V. 4. № 2. C. 189-196.

Huang-Mo Sung, Yasbin R.E. Adaptive, or stationary-phase, mutagenesis, a component of bacterial differentiation in *Bacillus subtilis* // J. Bact. 2002. V. 184. № 20. Pp. 5641-5653.

Mac George J., Korolik V., Morgan A.F., Asche V., Holloway B.W. Transer of a chromosomal locus responsible for mucoid colony morphology in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients to *P. aeruginosa* PAO // J. Med. Microbiol. 1986. V. 21. № 4. P. 331-336.

Rosso L. Les fondements scientifique de la microbiologie previsionnelle // C.r. Acad. agr. Fr. 2003. V. 89. № 2. C. 28-35.

Saunders J.R. The genetic basis of phase and antigenic variation in bacteria //Antigenic Var. Infec. Diseases. Oxford. 1986. Pp. 57-76.

Schrader J.A., Holmes D.S. Phenotypic switching of *Thiobacillus ferrooxidans* // J. Bact. 1988. V. 170. № 9. Pp. 3915-3925.

Van der Mei H.C., Busscher J. Electrophoretic mobility distribution of single-stran microbiol populations // Appl. and Environ Micobiol. 2001. V. 67. № 2. Pp. 491-494.

Warne S.R., Varley J.M., Boulnois G.J., Norton M.G. Identification and characterization of a gene that controls colony morphology and auto- aggregation in *Escherichia coli* K12 // J.Gen.Microbiol. 1990. V. 136. № 3. Pp. 455-462.

Андреева Е.А. Микрофлора внутренних поверхностей гипербарических комплексов и сравнительная оценка эффективности дезинфицирующих средств. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2000. 24 с.

Баранова И.П., Заславская П.Л., Егоров Н.С. Некоторые данные о культурально-морфологических особенностях форм диссоциации низинобразующего стрептококка // Антибиотики и химиотерапия. 1995. Т. 40. № 4. С. 3-7.

Беляков В.Д., Голубев Д.Б., Каминский Г.Д., Тец В.В. // Саморегуляция паразитарных систем. Л. 1987. 239 с.

Беляков В.Д., Ряпис Л.А., Илюхин В.И. Псевдомонады и псевдомонозы. М.: Медицина, 1990. 224 с.

Биология *Bacillus brevis* var. G.B. М.: Изд-во МГУ, 1968. 191 с.

Бухарин О.В., Гриценко В.А. Экологическая детерминированность внутривидового разнообразия патогенных бактерий // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2000. № 1. С. 103-106.

Варвашевич Т.Н., Ковтун Г.Ю., Никифорова Л.С., Сидорова В.Е., Богомазова Т.В. Возможные механизмы адаптации микробных популяций к низким положительным температурам // Микробиол. журн. 1991. Т. 53. № 1. С. 22-27.

Войшвилло Н.Е., Турута А.М., Камерницкий А.В., Милько Е.С., Джлантишвили Н.В., Стрелкова О.Г. Стероидтрансформирующая активность диссоциативных вариантов *Rhodococcus* sp. // Прикл. биох. и микробиол. 1993. Т. 29. № 3. С. 424-430.

Воскун С.Е., Новикова А.Ф., Голубев О.А. Адгезивные свойства R- и S-мутантов *Salmonella minnesota* в процессе периодического культивирования // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1992. № 1. С. 5-7.

Головлев Е.Л. Введение в биологию стационарной фазы бактерий: механизм общего ответа на стресс // Микробиология. 1999. Т. 68. № 5. С. 623-631.

Дорошенко Е.В., Лойко Н.Т., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Горнова И.В., Эль-Регистан Г.И. Характеристика диссоциантов *Bacillus cereus*, штамм 504 // Микробиология. 2001. Т. 70. № 6. С. 811-819.

Здоровенко Г.М., Варбанец Л.Д., Здоровенко Э.Л., Винарская Н.В., Яковлева Л.М. Химико-биологическая характеристика липополисахаридов из коллекционной культуры *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ИМВ 381 // Микробиология. 2004. Т. 73. № 6. С. 790-801.

Комарова Т.И., Поршнева О.В., Коронелли Т.В. Образование трегалозы клетками R- и S- вариантов *Rhodococcus erythropolis* в условиях стресса // Микробиология. 1998. Т. 67. № 3. С. 443-446.

Коронелли Т.В., Комарова Т.И., Поршнева О.В. Липиды R и S-вариантов *Rhodococcus erythropolis* // Микробиология. 1995. Т. 64. № 6. С. 769-777.

Лебенко Е.В., Секерина О.А., Чемерилов В.И. Особенности хемотаксиса у диссоциативных S- и R-вариантов *Bacillus thuringiensis* // Микробиология. 2005. Т. 74. № 1. С. 87-91.

Лобанов В.В., Марченков В.И. Современное состояние проблемы изменчивости *Vibrio cholerae* // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1999. № 4. С. 103-106.

Мартынкина Л.П., Милько Е.С. Ультраструктурные особенности диссоциантов *Rhodococcus rubropertinctus* и *Streptococcus lactis* // Микробиология. 1991. Т. 60. № 2. С. 334-338.

Матора Л.Ю., Серебренникова О.Б., Петрова Л.П., Бурьгин Г.Л., Щеглов С.Ю. Нетипичный характер R-S диссоциации *Azospirillum brasilens* // Микробиология. 2003. Т. 72. № 1. Р. 60-63.

Матыс В.Ю., Барышникова Л.М., Головлев Е.Л. Адаптация к стрессовым условиям у представителей родов *Rhodococcus* и *Gordona* // Микробиология. 1998. Т. 67. № 6. С. 743-747.

Мельников В.Г. Изучение роли *Actinomyces spp.* в развитии воспалительных заболеваний пародантоз // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1989. 23 с.

Милько Е.С. Выживаемость диссоциантов углеводородокисляющего штамма *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. 1998. Т. 67. № 3. С. 102-105.

Милько Е.С., Егоров Н. С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации. М.: Изд-во МГУ, 1991. 142 с.

Милько Е.С., Егоров Н.С. Влияние физико-химических факторов среды на рост диссоциантов некоторых грамположительных бактерий // Биол. науки. 1992. № 5. С. 89-96.

Милько Е.С., Егоров Н.С. Гидрофильно- гидрофобные и адгезивные свойства диссоциантов *Rhodococcus rubropertinctus* // Микробиология. 1994. Т. 63. № 2. С. 382-384.

Милько Е.С., Ильиных И.А. Влияние концентраций основных биогенных элементов в среде на динамику роста и состав популяции R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* и пути использования ими глюкозы: окисление и брожение // Микробиология. 2004. Т. 73. № 1. С. 37-44.

Милько Е.С., Котова И.Б., Нетрусов А.И. Процесс диссоциации у бактерий: Учебное пособие. М.: МАКС Пресс, 2007. 68 с.

Милько Е.С., Красильникова Е.Н. Особенности углеводного метаболизма R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. 1999. Т. 68. № 2. С. 211-214.

Милько Е.С., Мартынкина Л.П. Морфологические и физиолого-биохимические особенности диссоциантов *Pseudomonas aeruginos* // Микробиология. 1996. Т. 65. № 3. С. 352-356.

Милько Е.С., Никитенко Л.А. Влияние физико-химических факторов среды на рост диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Прикл. биохим. и микробиол. 1998. Т. 34. № 2. С. 171-174.

Могильная О.А., Милько Е.С., Медведева С.Е. Сравнительное электронно-микроскопическое изучение колоний и клеток диссоциантов родококка // Прикл. биохим. и микробиол. 1994. Т. 30. № 6. С. 877-883.

Настоящая Н.И. Морфолого-биохимические изменения культуры *Pseudomonas aeruginosa* – деструктора АПАВ // Автореф. дис ...канд. биол. наук. Минск, 1992. 19 с.

Николаев Ю.А., Милько Е.С. Адгезивные и ростовые свойства R- и S- диссоциантов *Pseudomonas fluorescens* // Микробиология. 2000. Т. 69. № 2. С. 293-294.

Прозоров А.А. Рекомбиногенные перестройки генома бактерий, и адаптация к среде обитания // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 581-594.

Ряпис Л.А., Беляков В.Д. Молекулярная эпидемиология дифтерии // Журн. микробиол., эпидемиол и иммунобиол. 1998. № 4. С. 101-106.

Ряпис Л.А. Клоновая, фазовая изменчивость бактериальных видов и их связь с проявлениями эпидемического процесса // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1995. № 1. С. 109-111.

Секерина О.А., Чемерилов В.И. Об адаптивности процесса диссоциации у *Bacillus thuringiensis* // Микробиология. 2003. Т. 72. № 5. С. 689-694.

Семенова Е.В., Сафронова И.Ю. Использование малеиновой кислоты диссоциантами *Alcaligenes xylosoxidans* sybsp. *xylosoxidans*. 260 // Вестн. МГУ. 2000. № 3. С. 25-28.

Скворцова И.Н. Микробиологические и санитарно-гигиенические свойства городских почв. // Почва, город, экология. М. 1997. С. 125-146.

Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев: Наукова думка, 1990. 264 с.

Стабникова Е.В., Милько Е.С., Грегирчак Н.Н. Флотационное фракционирование клеток R- и S-вариантов некоторых бактерий // Микробиол. журн. 1991. Т. 53. № 4. С. 52-54.

Сташишина Г.Н., Могильная О.А., Волова Т.Г., Гусейнов О.А., Калачева Г.С., Медведева С.Е., Плотников В.Ф., Франк Л.А. Исследование гетерогенности водородных бактерий *Alcaligenes eutrophus* // Микробиология. 1999. Т. 68. № 2. С. 198-205.

Цавкелова Е.А., Ботвинко И.В., Кудрин В.С., Олескин А.В. Детекция нейромедиаторных аминов у микроорганизмов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // ДАН Клеточная биология. 2000. Т. 172. № 6. С. 840-842.

Цыганкова С.В., Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Хабибулин С.С., Дорошенко Е.В., Коротков Е.В., Эль-Регистан Г.И. Получение внутривидовых диссоциантов некоторых бацилл и применение метода DIR-ПЦР для их идентификации // Микробиология. 2004. Т. 73. № 3. С. 398-405.

Шмалько Т.А. Совершенствование технологии получения сорбозы культурой *Gluconobacter oxydans* // Автореф. дисс. ... канд. биотехнолог. наук. М., 1999. 26 с.

Эль-Регистан Г.И., Крылов И.А., Николаев Ю.А., Шаненко Е.Ф., Воейкова Т.А., Ревина А.А., Мулюкин А.А. Роль алкилоксибензолов в стрессоустойчивости микроорганиз-

мов и перспективы их использования для биотехнологии // Второй Московский Международный Конгресс. Биотехнология: состояние и перспективы развития. Часть I. С. 266.

Юдина Т.Г., Милько Е.С., Егоров Н.С. Чувствительность диссоциантов *Micrococcus luteus* к действию сигма-эндотоксинов *Bacillus thuringiensis* // Микробиология. 1996. Т. 65. № 3. С. 305-309.