

УДК 579.22 : 579.253

(©) 1990 г.

Е.С. МИЛЬКО

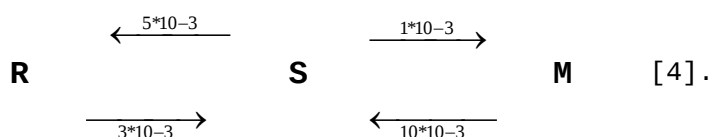
НЕСТАБИЛЬНОСТЬ СИНТЕЗА ПРАКТИЧЕСКИ ЦЕННЫХ ВЕЩЕСТВ БАКТЕРИЯМИ И ПРОЦЕСС ДИССОЦИИИ

В обзоре процесс диссоциации рассматривается как один из важных факторов, создающих гетерогенность популяции бактерий. Частота диссоциативных переходов составляет 10^{-2} - 10^{-4} на одно клеточное деление. Подчеркивается, что существуют строгие коррелятивные зависимости между генетическими, физиолого-биохимическими и морфологическими различиями диссоциантов, причем первичные фенотипические изменения происходят в их клеточных оболочках (в размере и химическом строении капсулы, клеточной стенки и цитоплазматической мембраны), что определяет различия в морфологии клеток и колоний, скорости роста, устойчивости к внешнему воздействию, способности к синтезу биологически активных веществ. Даны некоторые практические советы для прогнозирования и управления гетерогенным составом популяции, создаваемым процессом диссоциации, для стабилизации выхода синтезируемых клетками практически ценных веществ.

Диссоциация-это расщепление однородной популяции бактерий на варианты, обладающие стойкими различиями по ряду признаков: генетических, физиолого-биохимических и морфологических, в том числе по способности к синтезу практически ценных веществ. Основные диссоцианты, различающиеся по морфологии колоний, следующие: R(rough) имеют шероховатый тип колоний, S (smooth)-гладкий тип колоний, M (mucoid) - слизистый, а также промежуточные варианты - I (inter-rnedius). Иногда используют и другие обозначения: Т, Р, С, О и др. [1,2].

Диссоциация широко распространена в мире бактерий. Изменения при диссоциативных переходах носят постоянный, обратимый характер и происходят с высокой частотой порядка 10^{-2} - 10^{-4} на одно [клеточное деление [3].

В качестве примера представлена частота диссоциативных переходов у *Rhodococcus rubropertinctus*:



Диссоциация была открыта еще в 20-е годы текущего столетия медицинскими микробиологами, которые внесли основной вклад в изучение этого процесса. Ими было установлено, что диссоцианты патогенных бактерий различаются по важнейшему для человека признаку-вирулентности [5-7].

Интерес микробиологов к процессу диссоциации значительно возрос в последние годы в связи с бурным развитием биотехнологии. Было показано, что при диссоциации промышленных продуцентов могут изменяться количество и качество синтезируемых практически ценных веществ, что приводит к снижению выхода целевого продукта.

Однако до сих пор не решены такие вопросы, как: 1) генетические основы диссоциативных переходов; 2) причины одновременного изменения многих физиолого-биохимических свойств у вариантов; 3) возможность прогнозирования и управления гетерогенным составом популяции бактерий, создаваемым процессом диссоциации. Настоящий обзор посвящен в основном второму и третьему из перечисленных выше вопросов.

1. Генетические основы диссоциативных переходов. Как известно, диссоциация складывается из двух процессов: 1) возникновения диссо-

732

циантов в результате изменения генетических свойств клетки, 2) селекции возникших вариантов при развитии культуры.

Возникновение новых генотипов происходит на основе случайных мутаций, переноса генетического материала и перестройки генома внутри одной клетки.

Вероятно, у любых бактерий возможны самые различные случайные ненаправленные мутации, в результате которых изменяются определенные стадии синтеза компонентов клеточной оболочки и в конечном счете – морфология колоний. С помощью таких биохимических мутантов, стойко сохраняющих свой фенотип; изучают пути биосинтеза компонентов клеточной оболочки. Однако частота мутаций на несколько порядков ниже частоты возникновения диссоциантов.

Перенос генетического материала (конъюгация, трансформация, трансдукция) и фаговая конверсия могут вызывать появление диссоциантов у многих видов бактерий, но это тоже достаточно редкие события. Следует подчеркнуть, что в вышеуказанных процессах помимо акцепторной клетки обязательно наличие или клетки-донора, или ДНК другой клетки, или фага; это легко может происходить в открытых системах, с которыми имеют дело медицинские или почвенные микробиологи.

В самое последнее время важную роль в диссоциативных переходах отводят мигрирующим генетическим элементам. Например, S⁻ → R-переход у сальмонелл (вариацию фаз) связывают с инверсией определенного сегмента ДНК [7, 8], у других энтеробактерий – с наличием плазмид [6]. У *R. rubropertinctus* диссоциативные переходы R, S- и M-вариантов обусловлены перестройкой генетического материала одной клетки, в которой активное участие принимает ДНК умеренного фага, присутствующего во всех трех вариантах; при потере профага или его части клетки теряют способность к расщеплению на варианты [4], при лизо-генизации способность к диссоциации у клеток восстанавливается. На этой основе предложен метод получения недиссоциирующих клонов S-варианта для стабилизации выхода синтезируемых клетками, практически ценных веществ [9]. Метод состоит в том, что клетки M-варианта родококков (сапротрофных микобактерий) обрабатывают элиминирующими плазмиды веществами (акридиновым оранжевым, бромистым этидием). При этом половина возникших S-диссоциантов не расщепляется на варианты, приобретенное свойство у мутантов сохраняется в течение двух лет. Способность мутантов к синтезу практически важных веществ не меняется по сравнению с исходными диссоциирующими клетками S-варианта, но, к сожалению, мутанты становятся чувствительными к фагу.

В стерильных условиях производства у промышленных продуцентов ведущая роль в диссоциативных переходах принадлежит, вероятно, именно мигрирующим генетическим элементам, которые участвуют в регуляции экспрессии генов и индуцировании геномных перестроек.

2. Клеточные оболочки диссоциантов. Основным вклад в колониальную вариабельность вносят изменения в компонентах клеточных оболочек, определяющих тип деления клеток и характер их расхождения после деления. В клеточные оболочки входят: капсула, клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана.

Многочисленными биохимическими и иммунологическими методами установлено, что у грамотрицательных патогенных бактерий R-вариант отличается от S отсутствием 0-специфических полисахаридных цепей в липополисахариде клеточной стенки, т. е. отсутствием 0-антигена. Уменьшение длины полисахарида в липополисахариде приводит к образованию промежуточных вариантов [5, 10]. У различных морфологических вариантов *Neisseria gonorrhoeae* имеются отличия и в составе белков наружной мембраны, а также в количестве самих белков [II].

Изменение одного только признака (0-антигена) приводит к коррелятивному изменению ряда других свойств, многие из которых характерны только для патогенных бактерий: вирулентных, антигенных, ад-

733

гезивных и инвазивных свойств, устойчивости к фагоцитозу и бактериофагам [3, 5, 6].

У диссоциантов грамотрицательных фитопатогенных бактерий различаются количество и качество синтезируемых экзополисахаридов. Так, у *Pseudomonas aeruginosa* [12, 13] и *Xanthomonas campestris* [14] M-вариант образует больше экзогликана, чем S. В свою очередь S-вариант псевдомонасов синтезирует больше экзополисахаридов, чем

R, что показано на примере *Pseudomonas tolaasii* и *P. gingeri* [15], обнаружены и качественные различия в экзогликанах диссоциантов: у псевдомонасы вместо альгината синтезируется ДНК-подобный экзо-полисахарид [12, 13], при M-^{*}-S-переходе в экзогликане *Xanthomonas campestris* NRRL [14] наблюдается уменьшение остатков пировиноградной и уксусной кислот, а у *X. campestris* pv. *gustaviae* - снижение процента арабита и глюкозы [16]. Липополисахарид, изолированный из S-варианта *Pseudomonas syringae*, характеризуется меньшим содержанием глюкозы и маннозы и 'большим (в 7 раз) - рамнозы, а также глюкозамина и галактозамина (в 2 раза) по сравнению с R-формой [17].

У диссоциантов грамположительных бактерий, как и у грамотрицательных, различаются размер и состав клеточных оболочек. Так, для *Streptococcus salivarius* показано, что R- и S-варианты различаются по способности к образованию декстрана и левана [18]. Установлено, что клеточная стенка R-варианта *Streptococcus pneumoniae* в 1,5 раза толще, чем у S-варианта [19]. У *Bacillus thuringiensis* var. *dendrolimus* R-и S-варианты различаются между собой по составу клеточных стенок. Количество некоторых аминокислот, в частности глютаминовой, а также глюкозамина, галактозамина в гидролизатах клеточных стенок вегетативных клеток S-вариантов в 1,5 раза больше, чем в гидролизатах клеточных стенок R-вариантов, а углеводов в 4 раза больше [20]. Исследование химической природы антигена, общего для R-, S-, P¹'- и P~-вариантов *B. brevis* var. *G.-B.*, показало, что в его состав входят 16 аминокислот и рибит. При одинаковом наборе аминокислот в полимерах, выделенных из разных вариантов, между ними имеются различия в количестве некоторых аминокислотных остатков [21]. Показано, что количество липидов у R-варианта туберкулезных микобактерий больше, чем у S-варианта [1].

Таким образом, у диссоциантов бактерий сравнивают или только капсулы, или только клеточные стенки, или только липиды. У трех диссоциантов *Rhodococcus rubropertinctus* (табл. 1) исследованы одновременно химическое строение и размер капсул, клеточных стенок и липидов; последние у корине- и нокардиоподобных бактерий входят в состав не только цитоплазматической мембраны, но и клеточной стенки. В отличие от грамотрицательных бактерий у диссоциантов родококков химическое строение клеточных стенок одинаково, но их толщина различается в 2 раза. Принципиальные изменения происходят в химическом строении капсул: экзогликан R-клеток - нейтральный полимер, содержащий четыре сахара, а капсульный полисахарид S- и M-клеток является кислым полимером, содержащим три сахара; эти различия приводят к изменению электрокинетического потенциала диссоциантов. Обнаружены различия у диссоциантов по количеству липидов и по насыщенности входящих в их состав жирных кислот, что приводит к изменению текучести клеточных оболочек.

Значительные различия у диссоциантов в размере и строении клеточных оболочек могут обусловить ряд их других физиолого-биохимических и морфологических особенностей: 1) изменить скорость выделения из клеток различных веществ, в том числе промышленно ценных; 2) изменить устойчивость клеток к внешнему воздействию; 3) изменить скорость поступления веществ в клетку и, следовательно, скорость роста; 4) различия в текучести мембран могут изменить активность ряда ферментов, связанных с ними; 5) изменить морфологию клеток, характер их расхождения после деления и, следовательно, морфологию колоний. Разберем последовательно эти особенности.

734

3. Синтез и трансформация практически ценных веществ диссоциантами. В табл. 2 сравнена способность диссоциантов сапротрофных микобактерий к синтезу и трансформации ряда биологически активных веществ, некоторые из которых имеют промышленное значение. У одного продуцента в качестве высокоактивных могут выступать R-, S- и M-клетки. Различия в биосинтетических способностях у диссоциантов наблюдаются 1,5-4-кратные. В некоторых случаях они, вероятно, обусловлены особенностями строения их клеточных оболочек. Так, у M-вариантов, обладающих минимальной толщиной клеточной стенки, повышено образование экзоферментов и веществ, выделяемых в среду.

Изучение отдельных клонов диссоциантов показало, что существует постоянная корреляция между изменением морфологии их колоний, с одной стороны, и биохимическими свойствами - с другой [1, 27].

Следует особенно подчеркнуть, что у диссоциантов бактерий, используемых в промышленных условиях, может различаться не только количество, но и качественный

состав синтезируемых веществ (табл. 3). Приведенные примеры показывают, что важно следить за составом популяции бактерий, образующих практически ценные вещества.

4. Устойчивость диссоциантов к действию внешних факторов. Устойчивость диссоциантов к действию физико-химических факторов мало изучена. Это вполне понятно, так как основные закономерности диссоциации получены на патогенных бактериях, для которых условия внешней среды постоянны (макроорганизм). Есть много работ, в которых исследовано влияние состава среды на рост диссоциантов. Состав среды. Наличие различных источников углерода, азота, некоторых солей в составе питательной среды, изменение их концентрации способствуют преимущественному росту того или иного варианта бактерий, т. е. могут усилить процесс диссоциации культуры или, наоборот, стабилизировать ее. Углеводы, органические кислоты, спирты мало влияют на рост и изменчивость R-, S- и M-вариантов *Rhodococcus rubropertinctus*, но изменяют диссоциацию четырех вариантов *Bacillus brevis* var. G.-B. [1]. Аминокислоты оказывают более значительное воздействие на процесс диссоциации *B. brevis* var. G.-B. [42, 43], *Rhodococcus rubropertinctus* II]. Сильным селективирующим фактором является фосфор. Избыток фосфора в среде с углеводами способствует увеличению в популяции S-варианта по сравнению с R-вариантами у *E. coli*, *Staphylococcus albus*, микобактерий. *Bacillus mesentericus*. Влияние концентрации фосфора в среде на селекцию диссоциантов *Rhodococcus rubropertinctus* зависит от состава самой среды и продолжительности культивирования [1]. Важная роль в процессе селекции диссоциантов принадлежит продуктам их метаболизма. Например, накопление в среде D-аланина лимитирует увеличение числа жизнеспособных клонированных S-варианта *Brucella*-

736

la abortus и в то же время создает благоприятные условия для устойчивых к этому метаболиту клеток R-варианта [44].

Иногда состав и факторы внешней среды маскируют процесс диссоциации. Например, у *Mycobacterium tuberculosis* и *M. lacticolum* на среде МПА с твином-80 колонии R-диссоцианта имеют форму колоний S-клеток [1].

Действие физико-химических факторов. В табл. 4 сравнена устойчивость трех диссоциантов *R. rubropertinctus* к действию различных физико-химических факторов. При высокой температуре культивирования селективное преимущество имеют R-клетки, у которых максимальна насыщенность жирных кислот в липидах. Аналогично, при повышении температуры до 43° для *E. coli* [47] и до 37° для *Pseudomonas aeruginosa* [48] наблюдается утрата мукоидного роста.

При УФ-облучении лучше выживают R-клетки родококка. Установлено, что диссоцианты этих бактерий имеют не только одинаковый процент содержания ГЦ-пар в ДНК, но и сходные нуклеотидные последовательности, что было доказано методом молекулярной гибридизации ДНК (гомология 98-99%) [1], т. е. высокая устойчивость R-клеток определяется, вероятно, их более толстой клеточной стенкой. R-диссоцианты *R. fluorescens* [49] и *Bacillus thuringiensis* [50] также более устойчивы к действию УФ-лучей, чем S.

R-клетки обладают большей устойчивостью и к антибиотикам, чем S, у *B. dendrolimus* [51], *B. thuringiensis* [27], у клубеньковых бактерий [52]. R-клетки родококков поглощают меньше хлортетрациклина по сравнению с S- и особенно M-клетками [53]. У фитопатогенных бактерий чувствительность диссоциантов к антибиотикам мало различается [54].

Таким образом, диссоциация расширяет границы выживаемости вида при неблагоприятных внешних воздействиях; в этом, вероятно, за-

737

ключается биологический смысл расщепления популяции бактерий на варианты. В производственных условиях диссоциация - нежелательный процесс. При отклонениях в технологическом режиме (Т°, pH, аэрации) значительно меняется состав популяции у диссоциирующих продуцентов, что в свою очередь может привести к изменению выхода целевого продукта. На основе представленных выше данных можно рекомендовать селективные условия для каждого из диссоциантов: R-клетки лучше растут при повышенных концентрациях в среде питательных веществ, O₂, высокой температуре; S-клетки - при низких значениях pH; M-клетки - при снижении питательных веществ в среде, аэрации, температуры, подщелачивании среды, повышенном содержании NaCl.

Выживаемость диссоциантов бактерии при хранении. Таких исследований мало. Было изучено влияние шести способов хранения на выживаемость и соотношение диссоциантов *Rhodococcus rubropertinctus* [55]:

- лиофилизация в защитной среде, содержащей 10% сахарозы и 1% желатины,
- лиофилизация в среде с глутаматом натрия, под маслом, в растворе NaCl, в дистиллированной воде, на косяках МПА+сусло. Наибольшей жизнеспособностью клетки всех трех диссоциантов обладают после лиофилизации с сахарозой и желатиной, а также под маслом, при этом состав популяции не меняется. При хранении бактерий после лиофилизации с глутаматом натрия R-клетки не погибают, а у S- и M-диссоциантов происходит постепенное снижение числа жизнеспособных клеток почти на три порядка. Если в начале хранения R-колонии среди S-варианта составляют 0,1%, то потом эта величина возрастает до 10%. Это происходит не за счет увеличения диссоциации, так как абсолютное число R-колоний не возрастает, а за счет преимущественного отмирания S-клеток. После 3 мес хранения M-диссоцианта выявляются не только S-, но и R-колонии. При хранении в дистиллированной воде и на косяках также наблюдается преимущественное отмирание S- и особенно M-клеток по сравнению с R-клетками. Таким образом, при неодинаковой скорости отмирания диссоциантов происходит изменение состава популяции после хранения, и если высокопродуктивными являются слизистые варианты (табл. 2), то активность культуры снизится. Так, при периодических пересевах диссоциантов *Bacillus thuringiensis* [56] наблюдается постепенный переход S-варианта в R и уменьшение продуцирования Δ -экзотоксина.

5. Скорость роста диссоциантов и непрерывное культивирование. Диссоцианты различаются по таким интегральным показателям обмена, как скорость роста, интенсивность дыхания. Так, у односуточной культуры *Rhodococcus rubropertinctus*, являющейся активным разрушителем нефтяных загрязнений, на среде с м-гексадеканом из трех диссоциантов наибольшей скоростью роста и интенсивностью дыхания обладают R-клетки, в них содержатся наибольшие количества ФАД и цито-хромов. Именно этот вариант потребляет из среды максимальное количество кислорода и фосфора. Наименьшей скоростью роста и интенсивностью дыхания характеризуются клетки M-диссоцианта, они потребляют из среды минимальное количество фосфора и кислорода. В суспензии M-клеток медленнее протекает самая первая реакция окисления гексадекана до цетилового спирта [I]. Известно, что микобактерии поглощают углеводороды путем пассивной диффузии [57], поэтому у M-клеток, содержащих мало липидов в оболочке, субстрат медленнее поступает в клетку. Это приводит к низкому содержанию ферментов цепи транспорта электронов, уменьшению дыхания и в конечном счете - к минимальной скорости роста. Следует подчеркнуть, что при длительном культивировании родококков, когда исчерпываются питательные вещества в среде, максимальная скорость роста наблюдается у S-клеток. На среде с глюкозой максимальная скорость роста (Лшах) R-, S- и M-клеток родококка составляет соответственно 0,063; 0,06 и 0,04 ч⁻¹. Различия в скорости роста диссоциантов отмечены и у других бактерий:

Bacillus thuringiensis [20, 27], *Streptococcus pneumoniae* [19], *Pseudo-monas aeruginosa* [4'8].

738

Высокая частота диссоциативных переходов и различия в скоростях роста обуславливают важный вклад процесса расщепления популяции на варианты в создание гетерогенности бактериальной популяции не только при периодическом, но и при непрерывном культивировании. Отмечено значительное увеличение количества диссоциантов в проточной культуре по сравнению с периодической у *Bacillus thuringiensis* [58], *Escherichia coli* [59].

Проведена количественная оценка влияния процесса диссоциации на формирование гетерогенности популяции *Rhodococcus rubropertinctus* в хемостате на основе построения и исследования математической модели этого процесса [60]. Три уравнения, описывающие изменение во времени биомассы соответственно R-, S- и M-диссоциантов, учитывают:

- 1) размножение клеток с удельной скоростью, различной для каждого диссоцианта и зависящей от концентрации субстрата в среде по уравнению Моно;
- 2) вынос клеток протоком;
- 3) частоты диссоциативных переходов. Четвертое уравнение описывает изменение концентрации субстрата во времени. В начальный момент популяция представлена только высокопродуктивным S-вариантом. Исследование модели показало, что состав популяции определяется соотношением у диссоциантов Цпдд,

субстратных констант ($1/K_s$) и в меньшей степени частотами взаимных переходов. При равных $1/K_s$, преобладающим в популяции является диссоциант, имеющий даже незначительно выше μ . Так, при $Z=0,03$ ч⁻¹ стационарное состояние по суммарной биомассе устанавливается через ~10 генераций и далее не изменяется. Однако соотношение диссоциантов сильно меняется во времени: быстрорастущий, но малопродуктивный R-вариант постепенно вытесняет исходный S-вариант и через ~35 генераций составляет уже 50% популяции, что приведет к снижению выхода целевого продукта. Чем больше μ , тем быстрее меняется состав популяции. Доминирующим в популяции может стать и медленно растущий M-вариант, если он имеет ниже K_s . Уменьшение K_s , даже на 2% приводит к увеличению соответствующего диссоцианта в популяции на 20%.

Возможно, что более высокое значение μ (в 2 раза), полученное при непрерывном культивировании по сравнению с периодическим у *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* [61] и не интерпретированное автором, связано с увеличением в популяции доли быстрорастущего диссоцианта. Анализ данных 'по продуцированию α -амилазы *Bacillus subtilis* в условиях непрерывного и периодического культивирования [62] привел авторов к выводу, что нестабильность синтеза фермента зависит не от стадии дифференцировки клеток, а от генетической неоднородности, которая в свою очередь определяется условиями культивирования.

6. Заключение и некоторые практические рекомендации. Диссоциация - важный фактор, создающий гетерогенность микробной популяции, однако забытый многими современными микробиологами. Диссоциация включает два процесса: возникновение вариантов с высокой частотой порядка 10^{-2} - 10^{-4} на одно клеточное деление в результате изменений в геноме клетки и селекцию возникших вариантов под действием внешних факторов. У диссоциантов большинство различий носят количественный характер и, вероятно, являются вторичными, а первичные фенотипические изменения происходят в оболочке клетки.

В производственных условиях диссоциация - нежелательный процесс, однако существование строгих коррелятивных зависимостей между генетическими, физиолого-биохимическими и морфологическими изменениями у диссоциантов позволяет управлять этим процессом и прогнозировать состав популяции продуцента, создаваемый процессом диссоциации.

Чтобы обнаружить у продуцента способность к расщеплению на варианты, 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

739

выявления морфологических различий колонии. Одновременно просматривать не менее 1000 колоний для каждого клона. У диссоциантов, выделенных из разных клонов исходной культуры, определяют: 1) способность к синтезу исследуемого практически ценного вещества или скорости роста, 2) способность давать ревертанты при длительном культивировании, так как диссоциация - это обратимый процесс. Если обнаружены статистически достоверные различия по биосинтетической активности у диссоцианта по сравнению с исходной культурой, то в дальнейшем необходимо строго контролировать состав популяции продуцента, периодически делать селективный отбор; создавать условия культивирования, благоприятные для высокопродуктивного или быстрорастущего диссоцианта; попытаться получить недиссоциирующий мутант продуцента.

Способность продуцента к диссоциации быстрее обнаруживается:

1) после хранения культуры; 2) при длительном непрерывном культивировании; 3) после действия повреждающего фактора, когда состав популяции может измениться за счет преимущественного роста более устойчивого диссоцианта, при этом обычно наблюдается удлинение лаг-фазы. Например, добавление литического фермента в определенной концентрации вызывает увеличение роста дрожжей и споровых бактерий в 1,5-2 раза, и при этом удлиняется лаг-фаза [63]. 4) При микроскопических исследованиях диссоцианты выявляются по изменению размера капсул, клеточных стенок или, например, электрокинетического потенциала клеток [64]. В биохимических исследованиях, прежде чем получать гомогенный препарат биологически активного вещества, следует убедиться в гомогенности популяции продуцента.

L

Итак, если урожай диссоциирующего продуцента достиг миллиардов клеток в мл, то миллионы клеток в мл составляют диссоцианты, обладающие иными скоростями роста, биосинтетическими способностями, устойчивостью к внешнему

воздействию, это необходимо учитывать в научных исследованиях и в производстве. Вычленив высокоактивный диссоциант из популяции продуцента и создавая оптимальные условия для его хранения, культивирования, синтеза практически ценных веществ, можно интенсифицировать микробиологическое производство.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Милько Е. С., Егоров Н. С., Обухова Н. А. Цытл. науки. 1980. № 3. С. 5-19.
 2. Бахматова И. В., Чюрлис Т. К.; Жарикова Г. Г. Естественная изменчивость бактерий. 40 с.-Деп. в ВИНТИ. № 1593-81.
 3. Воскресенский А. М. Генетическая и биологическая характеристика S-R-диссоциации у энтеропатогенных кишечных палочек серогруппы 0124 : К.72. 17с.-Деп. в ВИНТИ № 3276-.81.
 4. Милько Е. С., Егоров Н. С. //Биол. науки. 1986. № 4. С. 6-19.
 5. Тимаков В. Д., Петровская В. Г., Бондаренко В. М. Биологические и генетические характеристики бактерий рода *Shigella*. М.: Медицина, 1980. 293 с.
 6. Беляков В. Д., Каминский Г. Д., Каминская С. Г. //Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1985. № 1. С. 93-100.
 7. Sounders !. R. Antigenic variation in infectious diseases. Oxford. Washington, D. C. 1986. P. 57-76.
 8. Хесин Р. Б. Непостоянство генома. М.: Наука, 1985. 472 с.
 9. Милько Е. С., Егоров Н. С.; Обухова Н. А. и др. //Прикл. биохимия и микробиология. 1983. Т. 19. Вып. 1. С. 111-115.
 10. Lindberg A. ^././Surface carbohydrate of the prokaryotic cell. L.-N. Y.: Acad. Press. 1977. P. 289-356.
 11. Norlander L., Norqvist A., Davies S. et al. //Scand. Journ. Infec. Diseases. 1980. V. 12. № 24. P. 158-161.
 12. Ботвинко И. 5. //Успехи микробиологии. 1985. Т. 20. С. 79-122.
 13. Mian F. A., Jarinan T. R., Righelato R. C. //J. Bact. 1978^ V. 134. № 2. P. 418-422.
 14. Cadmus M. C., Rogovin S. P., Barton K. A. et al. //Can. J. Microbiol. 1976. V- 22. № 7. P. 942-948.
 15. Cutri S. S., Macauley B. J., Roberts W. j P. ! I!. Appl. Bacteriol. 1984. V. 57. № 2. P. 291-298.
 16. Choi E., Matsuyama N., Wakimoto S. //Ann. Phytopathol. Soc. Jap. 1982. V. 48. № 1. P. 1-8.
 17. Мурас В. А., Варбанец Л. Д., Житкевич Н. й. //Микробиол. журн. 1987. Т. 49. №4. С. 8-11.
- 740
18. Nerlander L., Norqvist A., Davies J. et al. //Scand. J. Infec Diseases 1980 V 12 N 24. P. 158-161.
 19. Нисилевич В. Ф. Физиолого-биохимические и ультраструктурные особенности S- и R-форм *Streptococcus pneumoniae*: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1987.
 20. Левин. А. С., Завезенова Т. В., Федорова Е. Ф. и. (^././Использование микроорганизмов для борьбы с вредными насекомыми в сельском и лесном хозяйстве Иркутск: Изд-во ИГУ, 1979. С. 23-32.
 21. Сысуева Е. Г., Катруха Г. С., Наумова И. Б. и (Зр. //Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 3. С. 347-351.
 22. Милько Е. С., Ботвинко И. В., Степанова Р. А. и (Зр. //Микробиология 1983 Т 52 Вып. 3. С. 388-391.
 23. Степанова Р. А., Ившина И. Б., Шкаруба В. В. и <Зр. //Вестн МГУ Сер 16 Биология. 1986. № 2. С. 63-67.
 24. Степанова Р. А., Милько Е. С., Егоров Н. С. и (Зр. //Вестн. МГУ. Сер. 16, Биология 1987. № 1. С. 56-60.
 25. Милько Е. С., Степанова Р. А., Таптыкова С. Д. и <9р. //Микробиология 1987 Т 26 Вып. 3. С. 508-509.
 26. Егоров Н. С., Коронелли Т. В., Милько Е. С. и ^././Микробиология. 1986. Т.55. Вып.2. С.227-230.
 27. Азизбеян Р. Р. Энтомопатогенные бактерии *Bacillus thuringiensis* и их фаги: генетическая и физиологическая характеристика: Автореф. дис ... д-ра биол наук М., 1980.
 28. Шуст С. М., Северина О. Л., Рубан Е. Л. //Микробиология. 1975. Т. 44. Вып. 1. С. 81-85.

29. Милько Е. С., Коробова Ю. Н., Габинская К. Н. и ^././Микробиология. 1982. Т.51. Вып. 1. С. 166-167.
30. Звягинцева И. С., Скрябин Г. КУ/Микробиология. 1965. Т. 34. Вып. 3. С. 461-464.
31. Дараселия Г. ^././Микробные метаболиты и их использование в сельском хозяйстве. Л.: Изд. ВНИИ с/х микробиологии, 1973. С. 46-49.
32. Милько Е. С., Егоров Н. С., Угарова Н. Н. и <Эр././Микробиология. 1976. Т. 45. Вып. 5. С. 808-811.
33. Ботвинко И. В., Егоров Н. С., Ландау Н. С. и ^././Микробиология. 1979. Т. 48. Вып. 3. С. 439-442.
34. Jones W., White A././Canad. J. Microbiol. 1968. V. 14. № 5. P. 551-555.
35. Grange J. M., Redmond W. ^././Tubercle. 1978. V. 59. № 3. P. 203-225.
36. Егоров Н. С., Смирнова И. ^././Микробиология. 1970. Т. 39. Вып. 4. С. 671-674.
37. Жарикова Г. Г., Катруха Г. С.; Силаев А. Б. и др. //Биология *Bacillus brevis* var. G.-B./Отв. ред. В. Н. Столетов. М.: Изд-во МГУ, 1968."С. 45-61.
38. Изаксон И. С., Звенигородский В. И., Капитонова О. Н. и Др././Микробиол. пром-сть. 1976. Вып. 6. С. 28-31.
39. Бахматова И. В., Глемжа А. А., Жарикова Г. Г././Прикл. биохимия и микробиология. 1981. Т. 17. № 3. С. 415-421.
40. Кандыбин Н. В., Соболева Г. В., Кузнецова О. С. и др././Тр. ВНИИ с.-х. микробиологии. 1976. Т. 45. С. 21-26.
41. Федоров С. Н., Бутвина О. Ю., Симаров Б. В././4-й Всесоюз. симпози. "Молекулярные механизмы генетических процессов". М., 1979. С. 136.
42. Жарикова Г. Г., Маркелова С. ///././Антибиотики. 1971. Т. 16. № 3. С. 265-267.
43. Жарикова Г. Г., Маркелова С. ^././Антибиотики. 1971. Т. 16. № 4. С. 408-410.
44. Браун В. Генетика бактерий. М.: Наука, 1968. 445 с.
45. Милько Е. С., Егоров Н. С., Максимов В. Н. и (Зр././Микробиология. 1977. Т. 46. Вып. 3. С. 490-495.
46. Егоров Н. С., Милько Е. С.; Степанова Р. А. и (Зр././Биол. науки. 1986. № 8. С. 87- 92
47. Данилевич В. Н., Степаншин Ю. Г., Троицкий А. В. и (Эр././Генетика. 1982. Т. 18. № 6. С. 896-905.
48. Govan I. R., Fyfe J. A., McMillan C././J. Gen. Microbiol. 1979. V. 110. № 1. P. 229- 232.
49. El-Sabek A., Greppin H, Chodat F././Experientia.. 1967. V. 23. № 10. P. 875-876.
50. Азизбеян Р. Р., Белых Р. А., Нетыхса Е, М. и (Зр././Генетика. 1978. Т. 14. № 3. С. 510-515.
51. Бильтрикова А. А., Завезенова Т. В., Галузо Л. Я././Энтомопатогенные микроорганизмы и их применение в сельском и лесном хозяйстве. Иркутск: Изд-во ИГУ, 1982.
(^ 07__чя
52. Sinclair M. !, Eaglesham A. R./f&oi\ Biol. and Biochem. 1984. V. 16. № 3. P. 247- 251.
53. Милько Е. С., Егоров Н. С., Вуйчик ^././Антибиотики и мед. биотехнология. 1987. Т. 32. № 8. С. 576-578.
54. Мурас В. А., Гвоздяк Р. И., Житкевич Н. В. и <Зр././Микробиол. журн. 1985. Т. 47. № 5. С. 53-57.
- 55 Милько Е С., Аркадьева З. А.. Пименова М. Н. и (^././Микробиология. 1984. Т. 53. Вып. 1. С. 113-116.
56. Неудачина Э. И., Сретенская М. В././Энтомопатоген. микроорганизмы и их применение в сельском и лесном хозяйстве. Иркутск: Изд-во ИГУ, 1982. С. 39-50.
- 57 Коронелли Т. В Липиды микобактерий и родственных микроорганизмов. М.: Изд-во МГУ, 1984. 158 с.
- 58 Блохина Т. П., Раутенштейн Я. И; Сахарова З. В. и (Зр././Микробиология. 1985. Т. 54. Вып. 4. С. 683-684.
741
59. Марченкова Т. В. Исследование влияния условий развития на гетерогенность микробной популяции: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Алма-Ата. 1987.
60. Drozdov-Tikhomirov L. N., Grizhebovskaya A. T., Milko E. S././Acta biotechnol. 1989. V. 9. № 5. P. 471-478.

61. Аминов Р. И. Кинетика роста микроорганизмов с разными экологическими характеристиками: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пушино, 1986.
62. Fend Z., Pozlarovd /./Folia microbiol. 1982. V. 27. № 5. P. 340-349.
63. Гнило/ледова Л. Е. Биологические свойства препарата литических ферментов из *Actinomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 и аспекты его применения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1987.
64. Смирнов К. /^./Физико-химические исследования патогенных энтеробактерии. Ива-ново. 1978. С. 81-98.

Московский государственный университет.
Поступила в редакцию 28.06.1988.

E.S. MILKO

INSTABILITY OF THE SYNTHESIS OF VALUABLE SUBSTANCES BY BACTERIA AND THE PROCESS
OF DISSOCIATION

Moscow State University

The process of dissociation is considered as an important factor contributing to heterogeneity of a bacterial population. The frequency of dissociative transitions averages 10^{-2} per one cell division. There exist strict correlations between genetic, physiological-biochemical, and morphological differences of dissociants. Primary phenotypic changes occur in the cell envelope (in the size and chemical structure of the capsule, cell wall, and cytoplasmic membrane), and they determine difference in the morphology of cells and colonies, growth rate, resistance to external influence, and ability to synthesize various biologically active substances. A practical advice is given for prognostication and control of population heterogeneity, resulted from dissociation, to stabilize the yield of valuable substances producing by the cells.

Таблица I

Сравнение клеточных оболочек диссоциантов *Rhodococcus rubropertinctus* (*Mycobacterium lacticolum*)

Клеточные оболочки		Диссоцианты			Литературная ссылка
		R	S	M	
Капсула:					
	размер, мкм	0,9	1,1	1,9	[22]
	состав полисахарида:				
	галактоза	1	1	1	[22]
	глюкоза	0,9	1,9	1,4	[22]
	манноза	0,7	1,4	1,1	[22]
	арабиноза	1,2	0	0	[22]
	наличие анионных групп	-	+	+	[22]
	угол вращения полисахарида, $[\alpha^{20}]_D$ (вода, pH=7,0)	+44	+140	+200	[22]
Клеточная стенка	серологические свойства, наличие общих полос преципитации к типовому штамму	++	+-	+-	[23]
	время 50%-ной адсорбции фага, мин	Нет	130	70	[24]
	размер, нм	40	30	20	[24]
	строение полисахарида		Одинаковое		[24]
	строение пептидогликана		Одинаковое		[25]
Липиды клеток	строение миколовых кислот (основных)		Одинаковое		[26]
	скорость адсорбции фага		Одинаковое		[24]
	количество свободных липидов, %	22	14	16	[26]
	количество ненасыщенных жирных кислот в свободных липидах (после их гидролиза)	11	15	25	[26]

Таблица 2.

Синтез и трансформация биологически активных веществ диссоциантами микобактерии.

Вещества	Диссоцианты			Продуцент	Ссылки
	R	S	M		
Трансформация холиевой кислоты, мкг на 1 мг белка	288	487	Не опр.	M. mucosum	[28]
Трансформация ситостерина с образованием андрост-1,4-диен-3,17-диона	54,5	62,0	Не опр.	M. flavum B ₂	[29]
Дегидрирование кортизона и дигидрокортизона, продолжительность процесса, ч	32	24	Не опр.	M. globiforme 193	[30]
Каротиноиды, мкг./г	88	251	Не опр.	M. phlei 171	[31]
Экзополисахариды, г/л	0,8	2,0	3,5	M. lacticolum 121	[32]
(ед. глюкозы)	1,5	2,3	4,0	M. lacticolum 104	[32]
Экзопротеазы, каз. ед/мл	0,47	0,62	0,93	M. lacticolum	[33]

Вещества	Диссоцианты			Продуцент	Ссылки
	R	S	M		
				104	
Экзолипазы	min	max	Не опр.	M. phlei ATCC607	[34]
Эксонуклеазы	min		max	M. fortuitum M. sp. 69	[35]
Фибринолитическая активность, усл. ед/мл	0	320	max	Не опр.	[36]
Количество свободных липидов, %	22	14	16	M. lacticolum 104	[26]
Витамин B ₂ , мг/л	1,7	2,4	1,4	M. lacticolum 104	[1]

Примечание: По современной систематике переопределены: M. lacticolum. 104 как Rhodococcus rubro pertinctus 104, M. globiforme 193 как Arthrobacter globiforme 193.

Таблица 3

Влияние диссоциации на качественный состав синтезируемых биологически активных веществ

Вещества	Диссоцианты			Продуцент	Ссылки
	R	S	M		
Трансформация холевой кислоты, мкг на 1 мг белка	288	487	Не опр.	M. mucosum	[28]
Трансформация ситостерина с образованием андрост- 1,4-диен-3,17-диона	54,5	62,0	Не опр.	M. flavum B ₂	[29]
Дегидрирование кортизона и дигидрокортизона, продолжительность процесса, ч	32	24	Не опр.	M. globiforme 193	[30]
Каротиноиды, мкг./г	88	251	Не опр.	M. phlei 171	[31]
Экзополисахариды, г/л	0,8	2,0	3,5	M. lacticolum 121	[32]
(ед. глюкозы)	1,5	2,3	4,0	M. lacticolum 104	[32]
Экзопротеазы, каз. ед/мл	0,47	0,62	0,93	M. lacticolum 104	[33]
Экзолипазы	min	max	Не опр.	M. phlei ATCC607	[34]
Эксонуклеазы	min		max	M. fortuitum M. sp. 69	[35]
Фибринолитическая активность, усл. ед/мл	0	320	max	Не опр.	[36]
Количество свободных липидов, %	22	14	16	M. lacticolum 104	[26]
Витамин B ₂ , мг/л	1,7	2,4	1,4	M. lacticolum 104	[1]
Грамицидин S	+	-	+	Bacillus brevis var. G.-B.	[37]
Эсеин, бресеин	-	+	-	Bacillus brevis var. G.-B.	[37]
Энтобактерин	+	-	Не опр.	B. ihuringiensis v. galleriae	[38]
α-Амилаза	+	+	-	B. subtilis	[39]
Металлопротеаза	+	+	-	B. subtilis	[39]
Сериновая протеаза	-	+	+	B. subtilis	[39]

Вещества	Диссоцианты			Продуцент	Ссылки
	R	S	M		
Прегненкарбоновая кислота	+	+	+	Mycobacterium perrugosum	[29]
Андрост-1,4-диен-3,17-дион	-	+	+	Mycobacterium perrugosum	[29]
Бактороденцид	-	+	Не опр.	Salmonella enteritidis	[40]
Ферменты фиксации азота	-	-	+	Клубеньковые бактерии	[41]

Таблица 4

Влияние некоторых физико-химических факторов среды на рост диссоциантов
Rhodococcus rubropertinctas

Фактор	Значения фактора	Диссоцианты			Ссылка
		R	S	M	
Аэрация, г O ₂ /л/ч	opt	0,33	0,15	0,05	[45]
Температура, град. °C	min	16	14	14	[46]
Температура, град. °C	opt	20-38	18-38	18-38	[46]
Температура, град. °C	max	41	39	39	[46]
УФ-лучи, тыс. эрг/мм ² (интенсивность, при которой выживает 50% клеток)		1,7	0,8	0,4	[46]
Чувствительность к антибиотикам, мкг. (количество антибиотика в мкг., дающее зону подавления роста D=18мм)		1,75	2,25	3,50	[53]
pH	min	5,0	4,0	5,5	[46]
pH	opt	6,5-8,0	5,0-8,0	5,5-9,5	[46]
pH	max	9,0	9,0	11,5	[46]
NaCl, %	opt	1,0-3,5	1,0-5,5	1,0-7,0	[46]
NaCl, %	max	5,5	6,5	7,5	[46]
Процесс высыхания (% выживших клеток после 5 мес. хранения на косяках при 4°)		20	9	1	

Примечание. За оптимальные принимали значения, при которых рост составляет 50% и более от контроля; за минимальные и максимальные - значения, при которых рост составляет менее 10% от контроля. Контроль - число клеток, образующихся при 30°, в среде с 1% NaCl, при pH 7,0 и аэрации 0,67 г O₂/л/ч 6е:1 облучения и антибиотиков.