

УДК 579.84J.J1.069

ВЫЖИВАЕМОСТЬ ДИССОЦИАНТОВ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩЕГО  
ШТАММА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ПРИ ХРАНЕНИИ

©1998г. Е.С.Милько

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
Поступила в редакцию 16.01.97 г.

Сравнивали выживаемость и изменение состава популяции R-, S- и M-диссоциантов углеводородоокисляющего штамма *Pseudomonas aeruginosa* K-2 при хранении в течение 18 мес. четырьмя простыми способами. Наилучший способ хранения - на скошенном агаре с синтетической средой и гексадеканом под минеральным маслом, при этом количество клеток всех диссоциантов снижается мало и состав их популяции не меняется. При хранении остальными способами самой высокой выживаемостью обладают R-клетки, а наиболее чувствительными являются M-клетки; это приводит к изменению состава популяции диссоциантов. Появление после хранения в популяции S-диссоцианта, наиболее интенсивно окисляющего углеводороды, малоактивных, но более устойчивых R-клеток может привести к снижению способности культуры к деструкции углеводородов.

Ключевые слова: хранение культур, состав популяции, диссоцианты, *Pseudomonas aeruginosa*.

Представители рода *Pseudomonas* широко используются в различных биотехнологических процессах: в химических производствах, в биогидрометаллургии, в производстве химических препаратов для сельского хозяйства, при получении полимеров, для повышения нефтеотдачи пластов, при переработке и удалении отходов и веществ, загрязняющих среду, в том числе нефтяных загрязнений, что зарегистрировано в почти 200 патентах [1].

Однако эффективность применения бактерий, в том числе псевдомонад, в производстве может снижаться в результате появления в популяции неактивных диссоциантов. Диссоциативные переходы бактерий обуславливаются геномными перестройками, которые происходят с высокой частотой ( $10^{-10}$ - $10^{-4}$  на одно клеточное деление) и обладают плеiotропным действием. Это определяет постоянные и обратимые изменения многих морфологических и физиолого-биохимических свойств клеток: таких как устойчивость к внешнему воздействию, способность к деградации и синтезу практически ценных веществ [2]. Свойство бактерии, имеющее практическое значение, обычно не входит в перечень ее таксономических характеристик [3].

При хранении культур высокой выживаемостью может обладать менее активный диссоциант, что изменяет состав популяции и снижает эффек-

тивность микробиологического производства [2]. Следует отметить, что в литературе мало работ, в которых сравнивалась устойчивость диссоциантов бактерий-продуцентов при хранении, особенно трех диссоциантов. Так, S-диссоциант *Pseudomonas fluorescens*, обладающий высокой липолитической активностью, был лиофилизирован, однако через несколько месяцев хранения в популяции стал преобладать R-диссоциант, и культура потеряла липолитическую активность [4]. У *Bacillus thuringiensis* var. *galleria* - продуцента энтобактерина, используемого для борьбы с вредными насекомыми в сельском и лесном хозяйстве, высокоактивным является S-диссоциант; при хранении он полностью вытесняется более устойчивыми, но малоактивными R-клетками [5]. У *Rhodococcus rubropertinctus* при хранении из трех диссоциантов более устойчивы R-клетки, наиболее чувствительны - M, которые образуют максимальное количество экзопротеаз и экзополисахарида. При хранении в популяции M-диссоцианта количество R-клеток увеличивалось в результате более быстрого отмирания чувствительных M-клеток [2].

Цель настоящей работы - сравнение выживаемости при хранении в течение 18 мес. R-, S- и M-диссоциантов углеводородокисляющего штамма *Pseudomonas aeruginosa* K-2, выделенного из нефтяного месторождения. Ранее было показано, что эти диссоцианты отличаются морфологией колоний, ультратонким строением клеток и скоростью роста. На синтетической среде с углеводородом наибольшее количество клеток образует S-диссоциант, на богатой органической среде - R-диссоциант [6].

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы следующие способы хранения, которые не требуют специальной аппаратуры и приспособлений: на жидкой синтетической среде Раймонда с гексадеканом (С 15), на которой был выделен штамм K-2, на скошенном агаре с той же средой и С<sup>Λ</sup>, на скошенном агаре со средой Раймонда и С к, под минеральным маслом, на скошенном агаре с МПБ под минеральным маслом. Состав среды Раймонда (г/л):  $\text{Nb}^{\wedge}\text{Cl}$  - 2,  $\text{NaCl}$  - 5,  $\text{Na}_2\text{HP04}$  - 3,  $\text{Na}_2\text{CO}^{\wedge}$  - 0.1,  $\text{KH}_2\text{P04}$  - 2,  $\text{MgSC}^{>4}$   $\square$  7н; 0 - 0.2,  $\text{CaCL}_2$   $\square$  6н, 0 - 0.01,  $\text{MnSO}_4$   $\square$  5н20 - 0.02,  $\text{FeSO}_4$   $\square$   $\text{PH}_3\text{O}$  - 0.01, рН 6.7-7.0. Гексадекан вносили в количестве 1%. Культуры выращивали на синтетической среде 7 сут, а на М<sup>?</sup>IA - 1 сут. Хранили культуры в холодильнике при +4°C.

Определение числа жизнеспособных клеток до и после хранения в течение 5, 10 и 18 мес. проводили общепринятой методикой по числу выросших колоний [7]. Для определения соотноше-

ния диссоциантов в популяции делали серию десятикратных разведений в физиологическом растворе с 0.1% Твин-80 и затем рассеивали на чашки Петри с МПА + сусло (1 : 1). На каждое разведение использовали 3-5 чашек, которые выдерживали в термостате 2-3 сут при 30°C. Рассчитывали процент колоний каждого диссоцианта от общего числа просмотренных колоний (не менее 1000). В таблицах представлены средние данные  $\bar{x} \pm m$ ;  $x$  — независимых опытов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для всех диссоциантов *P. aeruginosa* из испытанных способов хранения наилучшим является хранение на скошенном агаре с синтетической средой и Си, под минеральным маслом: за 18 мес. количество жизнеспособных клеток снижается мало (табл. 1) и состав популяции практически не меняется (табл. 2). Наиболее быстро клетки отмирают после хранения в жидкой среде Раймонда с С [й: клетки М-диссоцианта погибают через 5 мес., S-диссоцианта — через 10, а клетки R-диссоцианта остаются жизнеспособными после 18 мес. хранения. Выживаемость каждого из диссоциантов при хранении на скошенном агаре с МПБ под минеральным маслом и на скошенном агаре с синтетической средой и С к, отличается незначительно и снижается у R-диссоцианта на два порядка, а у S- и М-диссоциантов даже на пять-шесть порядков.

По одним литературным данным при хранении псевдомонад под минеральным маслом их выживаемость изменяется мало [8], по другим — количество жизнеспособных клеток уменьшается на два-три и даже шесть порядков [9]. Возможно, что такая разница в результатах получена потому, что при хранении псевдомонад в качестве исходных были взяты разные диссоцианты.

Хотя при выращивании псевдомонад для дальнейшего их хранения брали посевной материал из нескольких характерных для каждого диссоцианта колоний, только у S-диссоцианта популяция остается однородной (табл. 2). У R- и М-диссоциантов вновь возникшие диссоцианты составляют 0.2-0.3% популяции, т.е.  $10^8$  кл/мл.

При хранении у R-диссоцианта состав популяции меняется мало: в исходной популяции R-клетки составляют 99.8%, а через 18 мес. хранения — 100%. У S- и особенно М-диссоцианта состав популяции меняется значительно. Так, после 18 мес. хранения М-диссоцианта на скошенном агаре с синтетической средой и С к, количество жизнеспособных М-клеток составляет только половину популяции, при этом увеличивается число R-клеток.

Связано ли изменение состава популяции дис-

социантов псевдомонад после хранения с разной скоростью их отмирания? Был сделан следующий расчет. При хранении на скошенном агаре с синтетической средой и С к, в исходной популяции М-диссоцианта, составляющей 109 кл/мл, обнаружено 0.1% R-клеток и 0.2% S-клеток, т.е. 106 кл/мл. После 18 мес. хранения в данных условиях количество жизнеспособных клеток снижается: у R-диссоцианта с 109 до 107 кл/мл, что составляет 1% от исходной популяции, у S-диссоцианта - с 1010 до 105 кл/мл, что составляет 0.001% от исходной популяции, у М-диссоцианта - с 109 до 104 кл/мл. Следовательно, после хранения количество жизнеспособных R- и S-клеток в популяции М-диссоцианта должно составить соответственно 104 и 10 кл/мл. Действительно, при рассеве псевдомонад обнаружено, что R-клетки составляют половину популяции М-диссоцианта, а S-клетки не выявлены.

Таким образом, изменение состава популяции диссоциантов *P. aeruginosa* K-2 при хранении происходит вследствие различной скорости их отмирания, при этом наиболее устойчивы R-клетки, а наиболее чувствительны - М. Аналогичные результаты получены для диссоциантов других видов бактерий [2, 4, 5].

В исходной популяции S-диссоцианта, а иногда и М-диссоцианта отсутствуют R-клетки, однако они выявляются после хранения. Это можно объяснить тем, что в этих случаях в исходной популяции R-клетки составляют менее 0.1%

Ранее нами было установлено [6], что из трех диссоциантов *P. aeruginosa* K-2 наиболее интенсивно окисляют углеводород S-клетки. По?т?т-ние после хранения в популяции S-диссоцианта менее активных, но более устойчивых R-клеток может привести к снижению способности к деструкции углеводородов.

Таким образом, причиной снижения активности культур после хранения может быть процесс диссоциации бактерий-продуцентов. При появлении после хранения в популяции продуцента неактивных или мало активных вариантов следует при его культивировании создать условия, селективные для высокопродуктивного диссоцианта [2].

Работа выполнена при финансовой поддержке ГНТП "Биологическое разнообразие".

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калакуцкий Л. В., Озерская СМ., Евтушенко Л.И'. Российская коллекция микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология. 1996. Т. 32. Вып. 1. С. 144-154.
2. Милько Е.Г., Егоров Н.С. Гетерогенность популя-

ции бактерий и процесс диссоциации. М.: Изд-во МГУ, 1991. 142с.

3. Green P.N., Bousfield /../. Standarts in culture collections // ICCV-VII: 7th Int. Congr. Culture Collections, Beijing, Oct. 12-16 1992, Beijing. 1993. P. 35.

4. Рубан ЕЛ. Хранение культур микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология. 1989. Т. 25. Вып. 3. С. 291-301.

5. Талалаев Е.В., Кашкова Г.Г., Гутман О.И., Барайшук Г.В. О вирулентности штаммов *var. dendrolimus* и *var. galleriae*, относящихся к группе бацилл *Thuringiensis* // Использование микроорганизмов для борьбы с вредными насекомыми в сельском и лесном хозяйстве. Иркутск, 1980. С. 5-17.

6. Милько Е.Г., Мартынкина Л.П. Морфологические и физиолого-биохимические особенности диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* II Микробиология. 1996. Т. 65. Вып. 3. С. 365-369.

7. Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов. М.: Изд-во МГУ, 1967. 150 с.

8. Die Langzeiterhaltung von Mikroorganismen. Workshop im Rahmen des Graduiertenkollegs "Chemische Aktivitäten von Mikroorganismen": Gottingen: Institute für Mikrobiologie der Georg-August-Universität Gottingen, 1996. S. 1-^3.

9. Козлова Е.И., Аркадьева З.А. Хранение микроорганизмов под слоем вазелинового масла // Вестн. МГУ. Сер. 16, Биология. Сер. 17, Почвоведение. 1976. №2. С. 58-61.

Рецензент Л.В. Калакуцкий

Survival of Dissociants of a Hydrocarbon-oxidizing *Pseudomonas aeruginosa* Strain during Storage

E. S. Mil'ko

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

Abstract-The survival of R-, S-, and M-dissociants of the hydrocarbon-oxidizing strain *Pseudomonas aeruginosa* K-2 was compared after the storage of the cultures by four simple methods for 18 months. The best method was storage on slanted synthetic medium with hexadecane under mineral oil; under these conditions, the amount of viable cells of all dissociants showed the smallest decrease, and the composition of the stored populations underwent the least changes. During storage by other methods, the highest survival rate was demonstrated by R-cells, and M-cells were the most sensitive; this difference resulted in changes in the composition of

stored populations. In stored populations of S-cells, which are the most active hydrocarbon oxidizers, the relative content of poorly active but more stable R-cells increased, which could result in a decrease in the hydrocarbon-degrading ability of the culture.

Key words: culture storage, composition of population, dissociants, *Pseudomonas aeruginosa*.

Таблица 1. Количество жизнеспособных клеток диссоциантов *P.aeruginosa* в 1 мл.

| Способ хранения                                                                | Срок хранения,<br>мес. | Диссоцианты<br>R | S                | M               |
|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------|------------------|-----------------|
| Синтетическая среда с C <sub>16</sub>                                          |                        |                  |                  |                 |
|                                                                                | 0                      | 10 <sup>9</sup>  | 10 <sup>10</sup> | 10 <sup>8</sup> |
|                                                                                | 5                      | 10 <sup>7</sup>  | 10 <sup>6</sup>  | 10 <sup>5</sup> |
|                                                                                | 10                     | 10 <sup>4</sup>  | 10 <sup>2</sup>  | 0               |
|                                                                                | 18                     | 10 <sup>2</sup>  | 0                |                 |
| Скошенный агар с синтетической средой и C <sub>16</sub>                        |                        |                  |                  |                 |
|                                                                                | 0                      | 10 <sup>9</sup>  | 10 <sup>10</sup> | 10 <sup>9</sup> |
|                                                                                | 5                      | 10 <sup>9</sup>  | 10 <sup>8</sup>  | 10 <sup>7</sup> |
|                                                                                | 10                     | 10 <sup>8</sup>  | 10 <sup>7</sup>  | 10 <sup>6</sup> |
|                                                                                | 18                     | 10 <sup>7</sup>  | 10 <sup>5</sup>  | 10 <sup>4</sup> |
| Скошенный агар с синтетической средой и C <sub>16</sub> под минеральным маслом |                        |                  |                  |                 |
|                                                                                | 0                      | 10 <sup>9</sup>  | 10 <sup>10</sup> | 10 <sup>9</sup> |
|                                                                                | 5                      | 10 <sup>9</sup>  | 10 <sup>9</sup>  | 10 <sup>8</sup> |
|                                                                                | 10                     | 10 <sup>9</sup>  | 10 <sup>9</sup>  | 10 <sup>8</sup> |
|                                                                                | 18                     | 10 <sup>9</sup>  | 10 <sup>8</sup>  | 10 <sup>7</sup> |
| Скошенный агар с МПА под минеральным маслом                                    |                        |                  |                  |                 |
|                                                                                | 0                      | 10 <sup>10</sup> | 10 <sup>10</sup> | 10 <sup>9</sup> |
|                                                                                | 5                      | 10 <sup>9</sup>  | 10 <sup>9</sup>  | 10 <sup>8</sup> |
|                                                                                | 10                     | 10 <sup>9</sup>  | 10 <sup>7</sup>  | 10 <sup>7</sup> |
|                                                                                | 18                     | 10 <sup>8</sup>  | 10 <sup>5</sup>  | 10 <sup>3</sup> |

Таблица 2. Соотношение диссоциантов в популяции *P. aeruginosa*, %

| Способ хранения                                                                | Исходный диссоциант | Срок хранения, мес. | Диссоцианты |       |      |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|-------------|-------|------|
|                                                                                |                     |                     | R           | S     | M    |
| Скошенный агар с синтетической средой и C <sub>16</sub>                        |                     |                     |             |       |      |
|                                                                                | R                   |                     |             |       |      |
|                                                                                |                     | 0                   | 99.8        | 0.2   | 0    |
|                                                                                |                     | 18                  | 100.0       | 0     | 0    |
|                                                                                | S                   |                     |             |       |      |
|                                                                                |                     | 0                   | 0           | 100.0 | 0    |
|                                                                                |                     | 18                  | 4.1         | 95.9  | 0    |
|                                                                                | M                   |                     |             |       |      |
|                                                                                |                     | 0                   | 0.1         | 0.2   | 99.7 |
|                                                                                |                     | 18                  | 51.5        | 0     | 48.5 |
| Скошенный агар с синтетической средой и C <sub>16</sub> под минеральным маслом |                     |                     |             |       |      |
|                                                                                | R                   |                     |             |       |      |
|                                                                                |                     | 0                   | 99.8        | 0.2   | 0    |
|                                                                                |                     | 18                  | 100.0       | 0     | 0    |
|                                                                                | S                   |                     |             |       |      |
|                                                                                |                     | 0                   | 0           | 100.0 | 0    |
|                                                                                |                     | 18                  | 0.7         | 99.3  | 0    |
|                                                                                | M                   |                     |             |       |      |
|                                                                                |                     | 0                   | 0           | 0.2   | 99.8 |
|                                                                                |                     | 18                  | 0.2         | 4.0   | 95.8 |
| Скошенный агар с МПА под минеральным маслом                                    |                     |                     |             |       |      |
|                                                                                | R                   |                     |             |       |      |
|                                                                                |                     | 0                   | 99.8        | 0.2   | 0    |
|                                                                                |                     | 18                  | 100.0       | 0     | 0    |
|                                                                                | S                   |                     |             |       |      |
|                                                                                |                     | 0                   | 0           | 100.0 | 0    |
|                                                                                |                     | 18                  | 15.1        | 84.9  | 0    |
|                                                                                | M                   |                     |             |       |      |
|                                                                                |                     | 0                   | 0           | 0.2   | 99.8 |
|                                                                                |                     | 18                  | 27.6        | 0     | 72.4 |



