

УДК 579.22:579.862.1+579.852.1

ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА РОСТ ДИССОЦИАНТОВ НЕКОТОРЫХ
ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Е. С. Милько. Н. С. Егоров

Сравнивали рост R-, S- и M(g)-диссоциантов *Streptococcus lactis*, *Bacillus coagulans*, *Rhodococcus rubroperlincius* при действии ряда физико-химических факторов: температуры, pH, ультрафиолетовых (УФ) лучей, повышенных концентраций NaCl и хранения. Установлено, что R-варианты имеют селективное преимущество при УФ-облучении, высокой температуре и хранении; S-варианты - при понижении активной кислотности среды; M (g)-варианты - при понижении температуры культивирования, высоком pH, повышенной концентрации NaCl. Сделано заключение, что диссоциация расширяет границы выживаемости вида.

The growth of R-, S- and M (g)-dissociants of *Streptococcus lactis*, *Bacillus coagulans*, *Rhodococcus rubroperlincius* under the action of some physico-chemical factors: temperature, pH, ultraviolet (UV) rays, high concentration of NaCl and storage have been compared. R-variants gain selective advantage under the influence of UV-irradiation, high temperature and storage; S-variants - at decreasing of active pH of medium; M(g)-variants-at decreasing of growth temperature, high values of pH, increased NaCl concentration. The dissociation has been concluded to enlarge the limits of the species survival

Диссоциация бактерий складывается из двух процессов: возникновения диссоциантов в результате изменения генетических детерминант клетки и селекции возникших вариантов при росте и хранении культуры.

В литературе мало сведений о влиянии физико-химических факторов среды на величину биомассы диссоциантов; имеющиеся работы в основном посвящены изучению влияния состава среды на рост вариантов. Это вполне понятно, поскольку большинство исследований процесса диссоциации выполнено на патогенных и условно патогенных бактериях, для которых условия внешней среды постоянны - макроорганизм [3, 8].

В предыдущей работе [3] сравнивали рост и изменения состава популяции R-, S- и M-диссоциантов *Rhodococcus rubroperlincius* 104 под действием ряда физико-химических факторов: температуры, pH, ультрафиолетовых (УФ) лучей, повышенных концентраций NaCl, процесса высушивания. Диссоцианты родококка значительно отличаются по способности к синтезу биологически активных веществ и обладают различной устойчивостью к меняющимся условиям среды. Целью дальнейших исследований было изучить влияние перс-численных физико-химических факторов на рост диссоциантов двух других видов грамположительных бактерий.

89

В качестве объектов исследований были взяты выделенные нами ранее [4] R-, S- и g-диссоцианты производственного штамма *Streptococcus lactis* 25 из коллекции культур Всесоюзного научно-исследовательского и конструкторского молочного института. Установлено, что эти диссоцианты отличаются по ряду производственно ценных свойств; урожай g-клеток в три раза ниже, чем R- и S-вариантов. Представителем термофильных грамположительных бактерий, в отличие от мезофильных родо-кокков и молочно-кислых бактерий, был выбран штамм *Bacillus coagulans*, используемый в качестве тест-культуры при количественном определении низина и любезно предоставленный И. П. Барановой [1]. Культура этой бактерии диссоциирует на R- и S-варианты.

Для получения посевного материала молочно-кислые бактерии выращивали в пробирках на гидролизованном обезжиренном молоке при 28 °C в течение суток; бациллы выращивали в пробирках на агаризованной глюкозо-пентозной среде при 52 °C в течение суток, затем клетки смывали физиологическим раствором, устанавливая по нефелометру общее число клеток около 10⁸ в 1 мл.

Для выяснения влияния осмотического давления на рост диссоциантов использовали мясо.пептонный агар (МПА) + сусло (1:1) с добавлением NaCl от 1 до 8 %. Зависимость роста бактерий от значения pH определяли на той же среде, приготовленной в 0,05 М буфере. Использовали следующие буферные растворы: NaOPC^X X2H3O - лимонная кислота (pH 4,0-6,0), фосфатный (pH 5,3-7,7), борная кислота - бора (pH 7,4-9,0). Влияние температуры, УФ-облучения и хранения на косяках на выживаемость диссоциантов также определяли на МПЛ + сусло. Источником УФ-лучей служила установка с двумя лампами БУФ-15, смонтированными параллельно. Использовали следующие дозы облучения: 0,4, 0,75, 1,5, 3,75. 7,5 тыс. эрг/мм, что соответствует экспозициям по времени 3, 6, 12, 30, 60 с при расстоянии 5 см от ламп. Число жизнеспособных клеток и соотношение диссоциантов определяли подсчетом колоний на чашках Петри с МПА+сусло у молочно-кислых бактерий через 3-4 суток роста, у бацилл - через 4 суток роста. Для каждого варианта опыта использовали по 12-15 чашек, на каждую из которых наносили по 0,1 мл суточной суспензии соответствующего диссоцианта, разведенной в 10, 10 или 105 раз. Каждый опыт повторяли 3-4 раза.

УФ-лучи.

Рост R-, S- и g-вариантов *S. lactis* подавляется на 50 /о при интенсивности облучения 2,0, 1,0 и 0,5 тыс. эрг/мм² соответственно. Число выживших R- и S-клеток *B. coagulans* снижается в два раза при дозах облучения, 3,0 и 1,5 тыс. эрг/мм (рис. 1). Таким образом, чувствительность к УФ-лучам у R-диссоциантов в два раза выше по сравнению с S-диссоциантами у трех изученных видов бактерий (табл. 1). Ранее было установлено [3], что ДНК трех диссоциантов *R. rubropertinctus* имеют сходные нуклеотидные последовательности, поскольку степень гомологии при ДНК-ДНК гибридизации составляет 98-99%. Можно предположить, что изменение чувствительности диссоциантов к УФ-облучению связано с различиями в толщине их клеточных стенок. R-клетки имеют более толстую клеточную стенку по сравнению с S-клетками исследованных нами *R. rubropertinctus* и *S. lactis* [2], а также *S. pneumoniae* [5], *Bacillus mucilaginosus* [6], *Thiobacillus versutus* 171 у M-диссоциантов родококков, обладающих минимальной толщиной клеточной стенки [3], обнаружена наибольшая чувствительность к УФ-облучению, так же как у g-диссоциантов *S. lactis* (табл. 1).

Хранение. После хранения при 4°C родококков к бацилл, выросших на скошенном МПА + сусло, выживаемость R-варианта, обладающего более толстой клеточной стенкой, оказалась на порядок выше выживаемости S-варианта и на два порядка - M-диссоцианта (табл. 1). Гибель *B. coagulans* при хранении происходит быстрее, чем мезофильных бактерий. Необходимо особо подчеркнуть, что следствием различий в скорости отмирания диссоциантов при хранении является изменение состава популяции продуцента, а это и свою очередь может привести к снижению выхода целевого продукта (3).

90

91

Температура.

R-диссоцианты трех изученных нами бактерии имеют селективное преимущество при высоких температурах культивирования, а M- и g-диссоцианты - при низких температурах (рис. 2, табл. 1). У родококков R-диссоциант обладает наибольшей насыщенностью жирных кислот в липидах (следовательно, и минимальной текучестью мембран), а M-диссоциант - наименьшей [3]. Температура, неблагоприятная для роста одинаковых диссоциантов, значительно отличается у разных видов бактерий. Так, у термофильного вида *B. coagulans* при снижении температуры культивирования прекращение размножения R-клеток происходит при 25 °C, S-клеток - при 15 °C. При 62 °C, наоборот, выше урожай R-клеток, чем S-клеток, при 65 °C размножается только R-диссоциант. Аналогично этому потеря мукоидного роста выявлена при повышении температуры роста до 43 °C у *Escherichia coli* и до 37 °C у *Pseudomonas aeruginosa* [3].

92

У мезофильного *S. lactis* критической является температура 41 °C, при которой g-диссоциант не растет, число клеток S-варианта составляет только 102 в 1 мл, а R-

варианта - более половины максимального урожая. При 12 °С, наоборот, R-диссоциант не размножается, биомасса g-варианта составляет более половины от максимальной. Близкие результаты получены для трех диссоциантов R. rubropertinctus (табл. 1).

Влияние NaCl. Изучение устойчивости диссоциантов к повышенному осмотическому давлению показало (рис. 3, табл. 1), что наиболее чувствительны R-клетки, а наиболее устойчивы M- и g-клетки: R-клетки R. rubropertinctus, S. lactis и B. coagulans погибают при концентрации NaCl в среде 6 %, S-клетки - 7 %, M- и g-клетки - 8 %. У других видов споровых бактерий также обнаружена лучшая выживаемость M-диссоциантов по сравнению с S- и R- [3] при высоких концентрациях солей в среде.

Значение pH. Сравнение чувствительности диссоциантов B. coagulans и R. rubropertinctus к активной кислотности среды (рис. 4, табл. 1) показало, что у S-клеток зона оптимального роста смещена в сторону более низких значений pH. В щелочных условиях селективное преимущество имеют R- и особенно M-диссоциант. На основе приведенных выше данных можно рекомендовать селективные условия для каждого из диссоциантов: R-клетки лучше растут при повышенной температуре, более устойчивы к повреждающему действию УФ-лучей и хранению, S-вариант имеет селективное преимущество при более низких значениях pH, M- и g-варианты - при снижении температуры культивирования, подщелачивании среды, увеличении концентрации NaCl.

Влияние физико-химических факторов среды на диссоцианты выражается в изменении не только урожая бактерии, но и состава популяции, особенно когда в посевном материале индекс диссоциации снижен с 98-100 до 85-90 %. В качестве примера можно привести изменения в популяции диссоциантов B. coagulans при различных значениях pH (табл. 2) и разных концентрациях NaCl (табл. 3).

Итак, у одинаковых диссоциантов трех исследованных видов грамположительных бактерий наблюдается сходная устойчивость к действию испытанных физико-химических факторов среды. Можно предположить одинаковый характер физиолого-биохимических различий между R-, S- и M-диссоциантами у этих бактерий.

Закономерности, выявленные ранее для диссоциантов родококков [3], вероятно, могут быть распространены и на другие виды бактерий. Различия у диссоциантов в устойчивости к повреждающему действию ряда факторов следует учитывать при идентификации бактерий.

Биологическое значение процесса диссоциации заключается, по-видимому, в создании гетерогенности бактериальной популяции и расширении границ выживаемости вида.

Литература

1. I: г о] о ii II. С., Ii ,1 р а ii и и а И. Гл., Х о д ж а е в М. Н. Изучение антибиотика-иолинеитнда IIN:)I][I;I, образуемого Streptococcus lactis, штамм МГУ.- Антибиотики и химиотерапия, 1990, т. 35. № 11, с. 8--10.
2. М а р т ы и к и ii а Л. II.. М и л ь к о Е. С. Ультраструктурные особенности диссо-ииянтон Rliodoeoecils riibropertinctiis и Streptococcus lactis.- .Микробиология, 1991, т. 60, иьш. 2, с. 334-338.
3. М и л ь к о V.. С. Нестабильность синтеза практически ценных веществ бактериями и процесс диссоциации.- Прикл. биохимия и микробиология, 1990, № 6, с. 732-742.
4. М и л ь к о К. С., ,i а д ч я и а С. В., Г а н и н а В. И., В г о р о в 1-1. С. Диссоциация мелочно-кислых бактерии. - Биол. науки, 1991, № 4, с. 103-108.
5. ll йен л ен и ч 13. Ф. Фпзиолого-биохимичесские и ультраструктурные особенности S- и K-форм Streptococcus pncumoniae. Автореф. канд. дне. М., 1987. (i. С i е н а н ю к И. В., Г р о м о з о и а Е. ll., Подгорский В. С. и др. Ультра-структура клеток R- и S-колоний Bacillus Hliicilaginosus.-- Микробиол. журнал, 1990, т. ,52, № 6, с. 3-7.
7. С I ;i <i s s е н Р. А. М.. Kortsllcc G. ,1. .1. et al. Colonial hcterogencty of Tllioliacillllis versiiliis. Jolini. Bacl., li)H(>, v. 1(i8, № 2, p. 791-794.
8. М ;i k e l а Г. ll., R Ii e ll М. Anti^enic variation in enteric bacteria.-In: Knterohacterial surface aaitigcnes. Amsterdam с. а., 1985, p. 75-92.

Таблица 1.

Влияние физико-химических факторов среды на рост диссоциантов граммположительных бактерий.

Вид бактерий	Факторы	Значение фактора	Диссоцианты		
			R	S	M(g)
Rhodococcus					
	УФ-лучи. тыс. эрг/мм ² (интенсивность, при которой выживает половина клеток)		1,7	0,8	0,4
	Хранение на косяках, % выживших клеток		20	9	1
	Температура, С°				
		Минимальное	16	14	14
		Оптимальное	20-38	18-38	18-38
		Максимально	41	39	39
	Концентрация NaCl, %				
		Оптимальное	1,0-3,5	1,0-5,5	1,0-7,0
		Максимально	5,5	6,5	7,5
	Значение pH				
		Минимальное	5,0	4,0	5,5
		Оптимальное	6,5-8,0	5,0-8,0	5,5-9,5
Максимально		9,0	9,0	11,5	
Sfреptococcus lactis					
	УФ-лучи. тыс. эрг/мм ² (интенсивность, при которой выживает половина клеток)		2,0	1,0	0,5
	Температура, С°				
		Оптимальное	18—42	15—39	12—35
		Максимально	45	42	39
	Концентрация NaCl, %				
		Оптимальное	1-5,0	1-5,0	1-7,0
Максимально		5,5	6,5	7,5	
Bacillus coagulans					
	УФ-лучи. тыс. эрг/мм ² (интенсивность, при которой выживает половина клеток)		3,0	1,5	
	Хранение на косяках, % выживших клеток		1,0	0,1	
	Температура, С°				
		Минимальное	27	22	
		Оптимальное	37—62	37—58	
		Максимально	65	62	
	Концентрация NaCl, %				
		Оптимальное	1—4,0	1—5,0	
		Максимально	5,5	6,5	
	Значение pH				
Минимальное		4.5	4,0		
Оптимальное		5,0-8,5	4,5-7,5		
Максимально		9,0	8,0		

Примечания: 1. За оптимальные принимали значения факторов, при которых рост составляет половину и более от контроли: за минимальные и максимальные - значения факторов, при которых рост составляет менее 100 клеток в 1 мл. Контроль -- число клеток, образующееся при оптимальной температуре, в среде с 1 % NaCl, при pH 7,0, без облучения. Срок хранения родококков - 5 месяцев, бацилл - 25 дней. 2. Для сравнения приведены данные, полученные нами ранее для диссоциантов *R. rubroperiinctus*.

Таблица 2.

Изменение соотношения диссоциантов в популяции *Bacillus coagulans* при различных исходных значениях pH среды.

Исходный диссоциант	Значение pH	Соотношение диссоциантов, %	
		R	S
R			
	4,6	67	33
	5,0	85	15
	5,9	98	2
	7,1	100	0
	7,7	100	0
S			
	4,6	5	95
	5,0	10	90
	5,9	14	86
	7,1	27	73
	7,7	80	20

Таблица 3.

Изменение соотношения диссоциантов в популяции *Bacillus coagulans* при различных концентрациях NaCl в среде

Исходный диссоциант	Концентрация NaCl, %	Соотношение диссоциантов, %	
		R	S
R			
	1	90	10
	2	88	12
	3	70	30
	4	20	80
S			
	1	15	85
	2	10	90
	3	5	95
	4	0	100

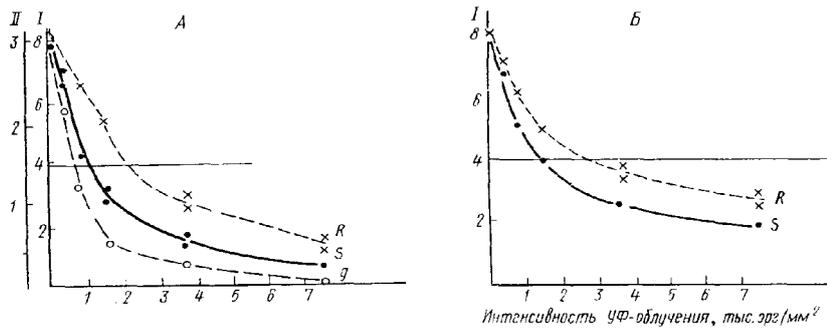


Рис. 1. Влияние УФ-облучения на рост диссоциантов *Streptococcus lactis* (А) и *Bacillus coagulans* (Б). На этом и следующих рисунках I – lg числа клеток R- и S-диссоциантов, II – lg числа клеток g-диссоциантов.

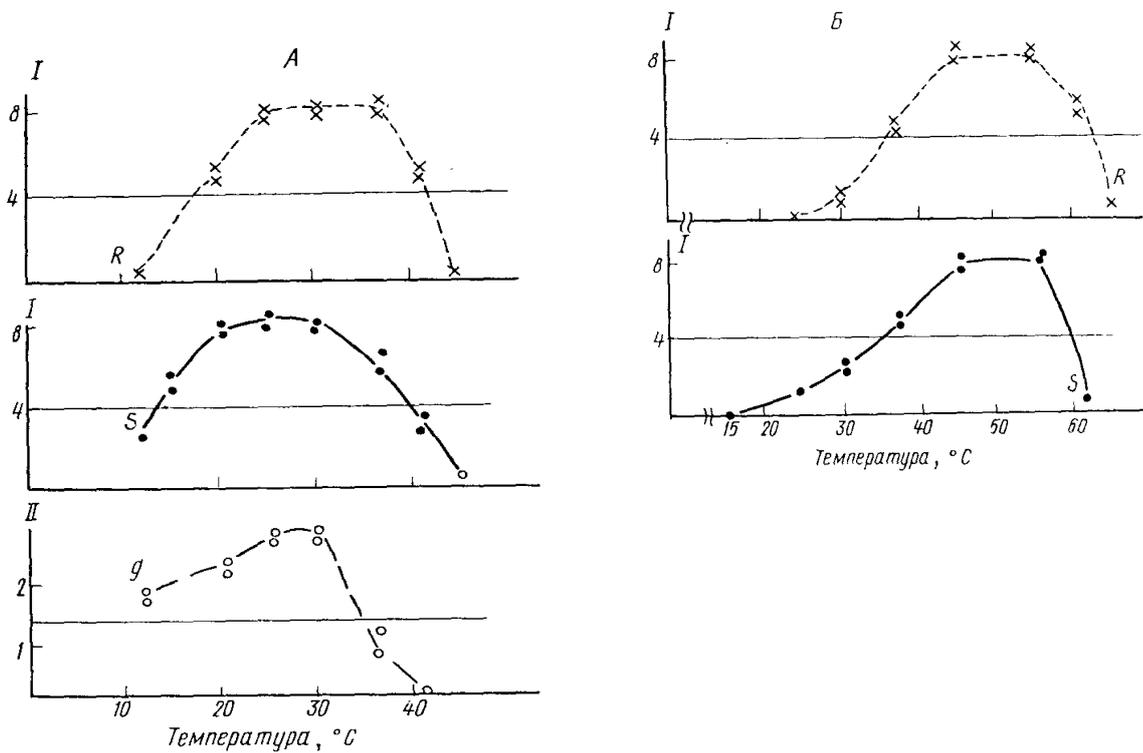


Рис. 2. Влияние температуры на рост диссоциантов *Streptococcus lactis* (А) и *Bacillus coagulans* (Б).

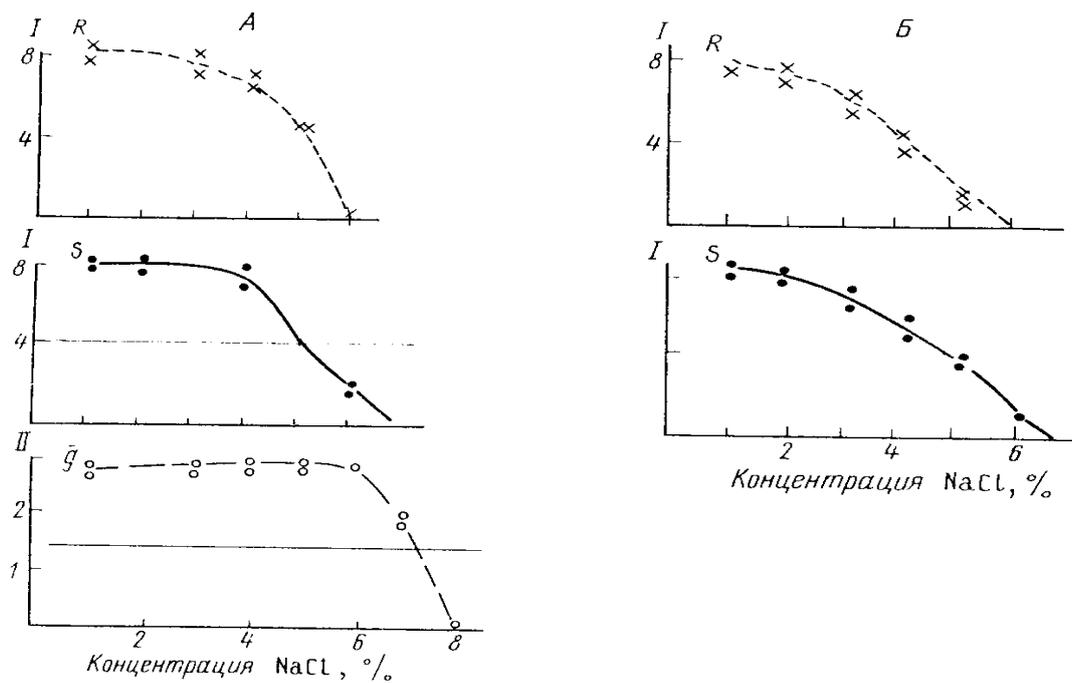


Рис. 3. Влияние концентрации NaCl на рост *Streptococcus laetis* (Л) и *Bacillus coagulans* (fi)

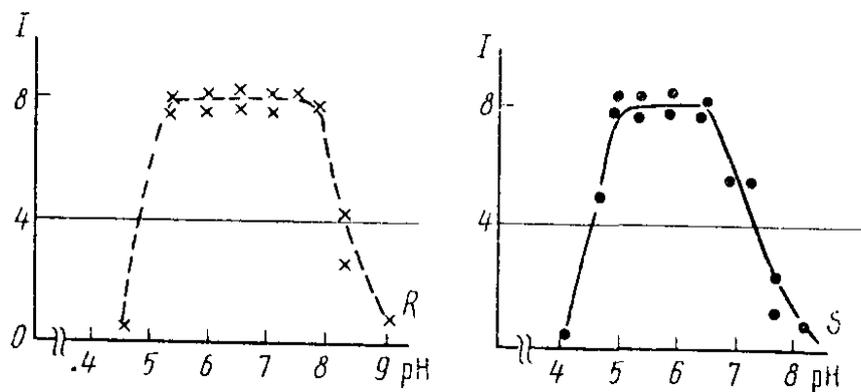


Рис. 4. Влияние pH на рост диссоциантов *Bacillus coagulans*