

Микробиология. М., 1993. С.776-779.
УДК 579.873.03
(с) 1993 г.

МИЛЬКО Е.С., ЕГОРОВ Н.С.
ВОЗНИКНОВЕНИЕ ДИССОЦИАНТОВ В КОЛОНИЯХ РОДОКОККА

В настоящее время гетерогенность популяции микроорганизмов привлекает пристальное внимание исследователей в связи с развитием биотехнологии, многими проблемами экологии и почвенной микробиологии-. Один из важных процессов, создающих гетерогенность - диссоциация, т.е. расщепление популяции бактерий на варианты, различающиеся по генетическим, физиолого-био-химическим и морфологическим свойствам, в том числе по способности к синтезу практически ценных веществ и скорости роста. Обратимые диссоциативные переходы происходят с высокой частотой порядка 10^{-2} - 10^{-1} на одно клеточное деление. Различия диссоциантов носят постоянный характер [2, 5].

Вопросу возникновения диссоциантов в колониях не уделяется достаточного внимания. Однако он имеет важное значение при селективном отборе высокопродуктивного варианта.

776

Цель настоящего исследования - определение количества возникающих диссоциантов в колониях разного возраста на примере R-, S- и M-вариантов *Rhodococcus rubropertinctus*, штамм 104 (*Mycobacterium laticolorum*, штамм 104) -продуцента ряда практически ценных веществ [2].

Морфология колоний и клеток трех диссоциантов родококка описана ранее [1, 3]. Частота диссоциативных переходов изучаемого штамма, определенная методом Лурия и Дельбрюка, составляет [2]:

	$5 \cdot 10^{-3}$		$1 \cdot 10^{-3}$	
	←---		---→	
R		S		M
	---→		←---	
	$3 \cdot 10^{-3}$		$10 \cdot 10^{-3}$	

Единичные колонии родококка получали рассевом на агаризованную среду МПА + сусло (1:1). Для определения общего числа клеток и соотношения диссоциантов в одной колонии ее вырезали скальпелем вместе с агаром и переносили в стерильную пробирку с двумя шариками и 2 мл физиологического раствора, энергично встряхивали в течение 5-8 мин и затем делали рассев на чашки Петри после серии десятикратных разведений в физиологическом растворе. На последние два разведения брали по 5-10 чашек. Медленно растущие родококки инкубировали при 30° в течение 5-22 сут. В каждом варианте опыта подсчитывали 2000-10 000 колоний. Для одного диссоцианта одновременно определяли число клеток в трех-четырех типичных колониях одинакового диаметра, удаленных от остальных колоний на чашке не менее чем на 2 см. Опыт повторяли 2-3 раза. В табл. 1 и 2 представлены средние данные. 5-6-Суточные колонии трех диссоциантов мало отличаются по диаметру и общему числу клеток (табл. 1). К 10-12-м сут роста диаметр S-колоний изменяется незначительно, а R- и M-колоний увеличивается в 2-3 раза. Однако количество клеток в колониях всех диссоциантов остается одинаковым и составляет 5-108-7-108 клеток. К 20-22-м сут диаметр R-, S- и M-колоний и количество клеток в них меняются мало. Увеличение размера колоний у M-варианта по сравнению с S-вариантом связано с повышенным синтезом экзополисахарида [2]. Можно предположить, что крупный размер R-колоний связан с более рыхлым расположением в них клеток по сравнению с S-вариантом. Именно популяция R-клеток является наиболее гетерогенной из диссоциантов по электроповерх-

777

ностным свойствам (дзета-потенциалу) [4]. Это предположение требует дальнейших исследований.

Данные табл. 2 показывают, что R-, S- и M-колонии родококков всех исследуемых возрастов содержат диссоцианты, составляющие в популяции от сотых до десятых

долей процента. При продолжительном культивировании количество возникших диссоциантов в колониях возрастает.

При старении S-диссоцианта на чашках встречаются нетипичные по морфологии колонии. У "лопастных" колоний радиус одного сектора длиннее, чем всей остальной колонии, поверхность колонии остается блестящей. При рассеве таких колоний в популяции выявляется 5-7% M-диссоциантов. Встречаются S-колонии с вторичным ростом, при этом поверхность колонии становится бугристой, особенно в центре. При рассеве таких колоний в популяции обнаруживается до 7,5% R-клеток.

Таким образом, при селективном отборе активных вариантов продуцента необходимо учитывать наличие в единичных колониях диссоциантов. Появление диссоциантов в колонии можно было предположить заранее, исходя из частоты их возникновения. Если колония попадет в такие условия роста, где возникшие варианты будут иметь селективные преимущества перед исходным вариантом, то способность продуцента к диссоциации быстро обнаружится и выход целевого продукта может измениться.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мартынкина Л.П., Милько Е.С. // Микробиология. 1991. Т. 60. Вып. 2. С. 334.
2. Милько Е.С. I/ Прикл. биохимия и микробиология. 1990. Т. 26. Вып. 6. С. 732.
3. Милько Е.С., Егоров Н.С. // Вест. Моск. ун-та. Сер. биол. 1975. № 4. С. 71.
4. Смирнов К.К., Милько Е.С., Егоров Н.С. // Микробиология. 1990. Т. 59. Вып. 6. С. 1015.
5. Сташишина Г.Н., Могильная О.А., Калачева Г.С. и др. // Исследование гетерогенности в культуре водородных бактерий *Alcaligenes eutrophus* Z-1: Препринт № 103Б. Красноярск, 1989. Ин-т биофизики СО РАН.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Поступила в редакцию: 13.03.1992

Рецензент А.А. Прозоров

MILKO E.S., EGOROV N.S.

APPEARANCE OF DISSOCIANTS IN COLONIES OF RHODOCOCCUS

The cell number in R-, S- and M-colonies of *Rhodococcus rubropertinctus* 104 of the same age was found to be only insignificantly different, but the diameter of the S-colonies was two times less, than that of R and M. The 5-6-day-old colonies of different variants contained 108 cells, and the 10-12 and 20-22-day-old ones about 109 cells. The dissociants appearing in typical and atypical colonies account for less than 1 per cent and 7 per cent of the population, respectively.

Таблица 1.

Число клеток в колониях разного возраста R-, S- и M-диссоциантов R.
Rubropertinctus

Возраст колоний, сут.	Диссоциант	Число рассеянных колоний	Количество клеток в 1 колонии, $\cdot 10^7$	Диаметр колоний, мм
5-6				
	R	6	10	2,0-2,5
	S	6	8	2,0
	M	6	8	2,0-2,5
10-12				
	R	10	65	5,0-6,0
	S	11	55	2,5-3,0
	M	9	66	6,0-7,0
20-22				
	R	8	50	6,0-7,0
	S	8	60	3,5-4,0
	M	8	74	8,0-9,0

Таблица 2

Соотношение диссоциантов в колониях разного возраста R-, S- и M-диссоциантов R.
Rubropertinctus

Возраст колоний, сут.	Диссоциант	Соотношение диссоциантов, %		
		R	S	M
5-6				
	R	99,89	0,11	0
	S	0,06	99,90	0,04
	M	0	0,12	99,88
10-12				
	R	99,9	0,1	0
	S	0,1	99,8	0,1
	M	0	0,3	99,7
20-22				
	R	99,8	0,2	0
	S	0,1	99,3	0,6
	M	0	0,3	99,7