

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 579.841.11:575.21

СВОЙСТВА ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ДИССОЦИАНТОВ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS AURANTIACA* И *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

© 2008 г. А. Л. Мулюкин¹, А. Н. Козлова, Г. И. Эль-Регистан

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва

Поступила в редакцию 25.10.2007 г.

Показано, что одной из характеристик биоразнообразия форм покоя у бактерий *Pseudomonas aurantiaca* и *P. fluorescens* является различающаяся способность к фенотипической диссоциации в популяциях цистоподобных покоящихся клеток (ЦПК) этих бактерий при их прорастании на плотных средах. Биоразнообразие проявляется в качественных и количественных различиях диссоциативных спектров, полученных при рассееве ЦПК, и зависит от условий образования ЦПК и сроков их хранения. У *P. aurantiaca* диссоциация проявлялась в переходе исходного фенотипа, дающего S-колонии, в R-тип или более пигментированный P-тип и была наиболее выражена при рассееве ЦПК, полученных при азотном голодаании (двукратном лимите N), а также под воздействием химического аналога микробных аутоиндуktörов анабиоза – C₁₂-АОБ. В последнем случае частота переходов S → R (до 70%) и S → P (до 80%) зависела от концентрации C₁₂-АОБ (1.0×10^{-4} М и 2.5×10^{-4} М), сроков хранения суспензий ЦПК (от 3 сут до 1.3 мес). В популяциях ЦПК, полученных в условиях лимитации азота, выпращивание диссоциантов R-типа (до 45%) происходило не ранее, чем на 4 месяц хранения. У *P. fluorescens* проявление диссоциативных переходов S → R зависело не только от сроков хранения ЦПК и концентрации C₁₂-АОБ, но и состава плотной питательной среды, используемой для их посева. Показаны различия R-, P- и S-вариантов *P. aurantiaca* по морфологическим и физиологико-биохимическим признакам: скорости роста (μ_{\max}) на бедной среде и выходу биомассы (Y_{\max}); устойчивости к стрептомицину и тетрациклину (LD_{50}); а также продуктивности по внеклеточным протеазам. Диссоцианты R- и S-типа *P. fluorescens* различались ростовыми характеристиками, устойчивостью к повышенной солености и окислительному стрессу, а также чувствительностью к экзогенному внесению аналогов микробных аутоиндуktörов – C₁₂-АОБ и C₇-АОБ. Таким образом, стратегия переживания псевдомонадами неблагоприятных для роста условий обеспечена не только образованием покоящихся форм различных морфотипов [1], но и внутрипопуляционной фенотипической вариабельностью, проявляющейся при их прорастании.

Ключевые слова: фенотипическая вариабельность, S → R переход, биоразнообразие форм покоя, цистоподобные покоящиеся клетки, аутоиндуktörы анабиоза, алкилоксибензолы.

В предыдущей работе [1] было показано образование цистоподобных покоящихся клеток (ЦПК) в культурах псевдомонад *Pseudomonas aurantiaca* и *P. fluorescens*, также как и для ряда других неспособных образующих бактерий [2–5]. ЦПК обладают необходимыми характеристиками покоя: длительное время сохраняют жизнеспособность, отличаются экспериментально не выявляемым уровнем метаболической активности, обладают специфическими особенностями ультраструктурной организации, свидетельствующими о наличии процессов цитодифференцировки, и образуются в онтогенетических циклах развития культур бактерий [1–5]. Приобретение и поддержание клетками покоящегося состояния контролируется низкомолекулярными аутоиндуktörами анабиоза – факторами d₁, представленными у ряда бактерий алкилоксибензолами (АОБ) – алкилрезорцинами [4, 6–8]. При входении покоящихся форм в новый цикл развития на-

блаждается фенотипическая диссоциация (вариабельность) микробной популяции, что хорошо диагностируется по морфологическим признакам колоний, развивающихся на плотных средах, или по преимущественному развитию варианта, адаптивного к селективным условиям среды. Ранее это было продемонстрировано при прорастании разных типов покоящихся форм *Bacillus cereus* и *B. licheniformis* (эндоспор, ЦПК и анабиотических клеток, полученных при воздействии АОБ) [9, 10], а также анабиотических клеток *Staphylococcus aureus* [11] и *Pseudomonas aurantiaca* [12].

Особое внимание следует обратить на внутривидовой полиморфизм покоящихся форм бактерий, наиболее выраженный у бацилл (*B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*), когда цикл развития их культур завершается образованием эндоспор или, как альтернативы, образованием ЦПК, что зависит от условий роста, благоприятствующих спорообразование и регрессирующих его [2, 9, 10]. Важно, что покоящиеся формы разных морфотипов – эндо-

¹ Адресат для корреспонденции (e-mail: andlm@mail.ru).

споры, ЦПК и анабиотические покоящиеся клетки *B. cereus* – обладают различной способностью к фенотипической диссоциации. Так, у бацилл выщепление в первом пассаже наиболее широкого спектра диссоциантов наблюдалось при прорастании ЦПК, в отличие от эндоспор [9]. Для грамотрицательных спорообразующих бактерий рода *Pseudomonas* также было показано внутривидовое разнообразие форм покоя. Оно выражалось в различиях ЦПК, образуемых псевдомонадами, по физиологическим и морфологическим характеристикам: сохранению пролиферативного потенциала, термоустойчивости, внутрипопуляционной гетерогенности по реакции на флуоресцентные красители. Формирование различных морфотипов покоящихся клеток зависело от условий культивирования псевдомонад [1]. В настоящей работе акцент сделан на другом уровне биоизоформ покоящихся форм этих бактерий, проявляющемся в их различающейся способности к фенотипической вариабельности при прорастании на плотных средах.

Целью настоящего исследования было изучить различия в способности покоящихся клеток *P. aurantiaca* и *P. fluorescens*, образовавшихся в разных условиях, к фенотипической диссоциации, а также характеризовать выделенные диссоцианты по физиологико-биохимическим признакам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были грамотрицательные бактерии *Pseudomonas aurantiaca* B-1558 (БКМ) и *P. fluorescens* NCIMB 9046. Диссоцианты R- и P-типа выделяли при рассеве супензий ЦПК псевдомонад на плотных средах. Варианты полученных ЦПК подробно описаны в предыдущей работе [1]. Доминантным вариантом коллекционных штаммов псевдомонад, используемых для получения ЦПК и исследования внутрипопуляционной вариабельности, был S-вариант. Индекс диссоциации в популяциях псевдомонад определяли как процентную долю колоний S-, R- и P-типа к общему числу колоний. Отбор диссоциантов осуществляли на основании их колониально-морфологических признаков: формы, консистенции и пигментации колоний.

Среды и условия культивирования. Культуры диссоциантов *P. aurantiaca* и *P. fluorescens* выращивали на 50%-ном МПБ, сбалансированной синтетической среде M9, а также бедной синтетической среде со сниженным (по сравнению с M9) содержанием источника азота (в 2 раза) и фосфора (в 20 раз). Бактерии культивировали при 28°C в колбах объемом 250 мл (50 мл среды) на качалке (140–160 об/мин). Инокулятом были стационарные культуры S-, R- и P-вариантов, выращенные на 50% МПБ или МПБ с сусло (1 : 1), которые вносили в количествах, дающих начальную оптическую плотность (ОП) 0.03–0.08 (Spcord, $\lambda = 540$ нм, $l = 10$ мм).

Микробиологические методы. Рост культур бактерий оценивали по изменению ОП клеточных суспензий, максимальной удельной скорости роста (μ_{\max}) и выходу биомассы (Y_{\max}). Для определения колониеобразующей способности (КОЕ) клеточные суспензии в десятикратных разведениях высевали на чашки Петри с МПА или МПА-сусло (1 : 1), которые инкубировали при 28°C в течение стандартного срока – 3 сут. Массу сухих клеток (МСК) определяли после их высушивания в течение 24 ч при 105°C. Микроскопические наблюдения проводили с использованием светооптического микроскопа Reichert ("Zatopan", Австрия), снабженного фазово-контрастным устройством.

Стрессорные воздействия. **Окислительный стресс** создавали внесением в среду перекиси водорода в концентрациях от 170 до 2000 мкМ, а стресс повышенной солености – увеличением концентрации NaCl в среде M9 с 0.05% (8.5 мМ контроль) до 340 мМ – 1.7 М. Антибиотики – тетрациклин и стрептомицин, вносили вместе с инокулятом до конечных концентраций от 10 до 1000 мкг/мл. О состоянии культур после стрессорных воздействий судили по изменению ОП в сравнении с контрольной культурой. Устойчивость диссоциантов к антибиотикам определяли по показателю ингибирующего эффекта ($\Delta\text{OP}_{\text{опыт}}/\Delta\text{OP}_{\text{контр}}$), выводимому из отношения приращения ОП в опытном варианте к приращению ОП в контроле за 24 ч культивирования при 28°C. Величины LD₅₀ определяли как концентрации антибиотика, перекиси водорода или NaCl, вызывающие подавление роста культур на 50%.

В ряде экспериментов оценивали чувствительность диссоциантов к действию химических аналогов микробных ауторегуляторов роста и развития – C₇-АОБ и C₁₂-АОБ, вносимых вместе с инокулятом в концентрациях от 5 до 1000 мМ, с последующим определением диапазонов АОБ для проявления рост-стимулирующего или рост-ингибирующего эффекта. О влиянии C₇-АОБ и C₁₂-АОБ на рост культур судили по отношению $\Delta\text{OP}_{\text{опыт}}/\Delta\text{OP}_{\text{контр}}$ за интервал времени 8–24 ч в зависимости от особенностей развития бактерий.

Продуктивность культур диссоциантов по внеклеточным протеазам определяли модифицированным методом Ансона по скорости накопления продуктов гидролиза казеина (2% раствор), не осаждаемых ТХУ кислотой и дающих окраску с реагентом Фолина-Чокальтэу при $\lambda = 670$ нм. Протеолитическую активность выражали в единицах тирозинового эквивалента (МЕ), соответствующих образованию 1 мкмоля (0.181 мг) тирозина при гидролизе казеина в течение 1 мин при 30°C.

Повторность измерений в экспериментах трехкратная при постановке 3 независимых серий опытов. Представленные результаты отражают усредненные величины; статистический анализ данных

Таблица 1. Описание фенотипических диссоциантов *P. aurantiaca* и *P. fluorescens* и условия их появления

Тип	Описание диссоцианта	Вариант получения ЦПК	Условия проявления		Частота появления*
			Срок хранения	Среда	
<i>P. aurantiaca</i>					
R	Розовые колонии с шероховатой поверхностью и неровными краями	1 (двуократный лимит N) 2 (C_{12} -АОБ 1×10^{-4} М) 2 (C_{12} -АОБ 1×10^{-4} М),	4 мес. и более 3 сут 1.3 мес. и прогрев 60°C 5 мин	МПА МПА МПА	45–50% 67% 100%
P	Округлые сильно пигментированные розовые колонии с гладкой поверхностью и ровными краями	2 (C_{12} -АОБ 2.5×10^{-4} М)	1.3 мес.	МПА	78%
S домин.	Округлые розовые колонии с гладкой поверхностью и ровными краями	1 (двуократный лимит N) 3 (среда с окисью Si) 4 (почвенная вытяжка) и стационарные культуры	7 сут – 3 мес. 7 сут – 3 мес. 7 сут – 3 мес.	МПА МПА МПА МПА	93% 97% 98% 100%
<i>P. fluorescens</i>					
R	Прозрачные колонии с шероховатой или складчатой поверхностью	1 (двуократный лимит N) 2 (C_{12} -АОБ 1×10^{-4} М) 2 (C_{12} -АОБ 2.5×10^{-4} М)	3–5 мес. 20 сут 20 сут	МПА–сусло МПА–сусло МПА–сусло	52% 20% 22%
M	Кремовые колонии со слизистой поверхностью, выступающим центром и ровными краями	2 (C_{12} -АОБ 1×10^{-4} М) стационарные культуры	3 сут	МПА–сусло МПА–сусло	49% 31%
Sm	Мелкие округлые полупрозрачные или пигментированные колонии с гладкой поверхностью и ровными краями ($d = 1–1.5$ мм)	2 (C_{12} -АОБ 1×10^{-4} М)	1.3 мес.	МПА–сусло	59%
Mm	Округлые прозрачные колонии с гладкой поверхностью и ровными краями ($d = 6–8$ мм)	1, 2, 3, 4 стационарные культуры	до 3 мес.	МПА	97–99%

* В условиях и при сроках хранения, наиболее оптимальных для выщепления диссоциантов.

проводили с использованием теста Стьюдента, принимая критерий вероятности $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Способность к фенотипической диссоциации у *P. aurantiaca* и *P. fluorescens* оценивали по появлению и количеству колоний, различающихся колониально-морфологическими признаками в первом пасаже при рассеве на плотных питательных средах ЦПК, образующихся в циклах развития доминантного S-варианта каждого из штаммов. Диссоциативная активность зависела от способов получения ЦПК [1] и сроков их хранения (табл. 1). При посеве ЦПК *P. aurantiaca*, полученных в варианте 1 (двуократный лимит источника N, срок хранения более 4 мес.), было обнаружено появление диссоциантов R-типа, дающих колонии с шероховатой и складча-

той поверхностью (45–50% от общего числа колоний на МПА). При этом диссоциативные переходы S → R не наблюдались при рассеве ЦПК этого варианта более ранних сроков хранения (3 сут – 3 мес.). Появление колоний R-типа как минорного варианта с частотой 2% отмечено при посеве супензии ЦПК *P. aurantiaca*, полученных в варианте 4 (инкубирование в почвенной вытяжке, срок хранения 1.3 мес.).

Однако наибольшее проявление фенотипической диссоциации как в качественном, так и количественном отношении, наблюдалось при высеве ЦПК варианта 2, полученных под воздействием C_{12} -АОБ в концентрациях 1×10^{-4} М и 2.5×10^{-4} М [1]. В популяциях, выросших из ЦПК *P. aurantiaca* этого варианта, обнаружены сильно пигментированные колонии (P-вариант) и колонии R-типа. Частота появления диссоциантов P- и R-типа завис-

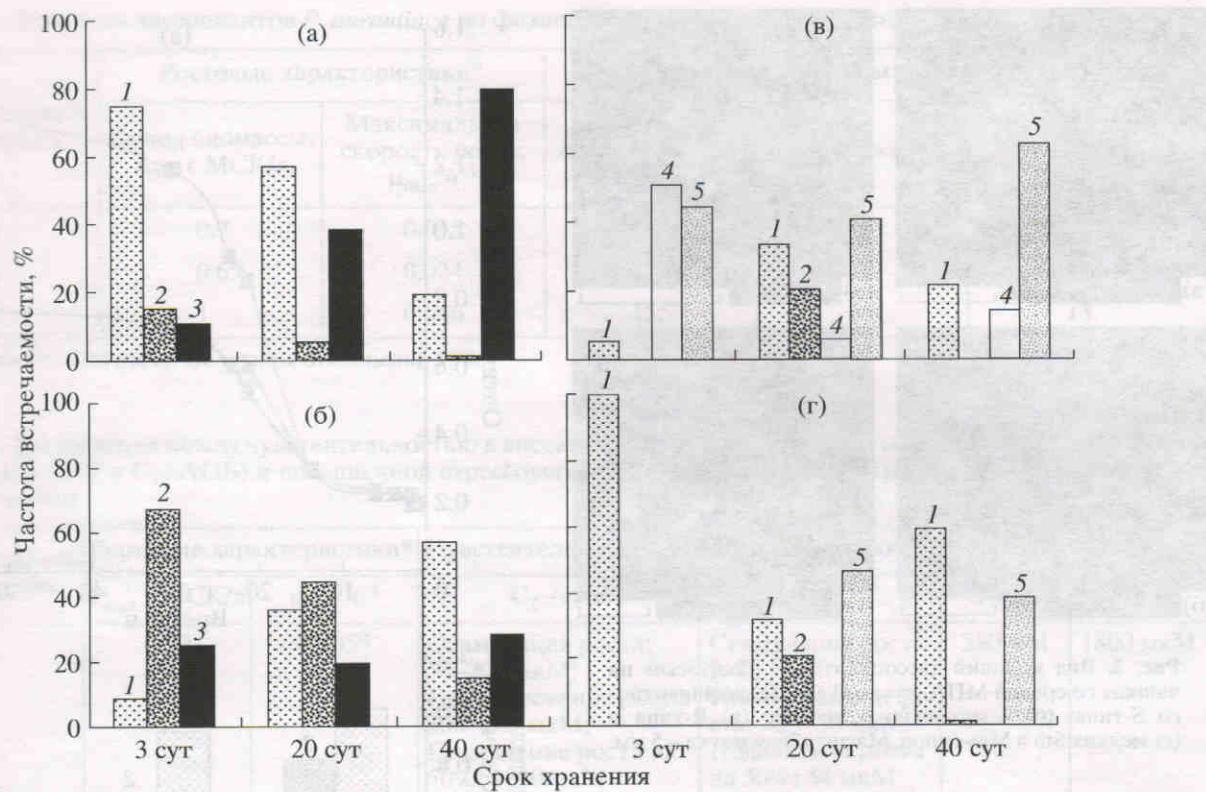


Рис. 1. Частота появления диссоциантов при прорастании анаэробических ЦПК (а, б) *P. aurantiaca* и (в, г) *P. fluorescens*, полученных при внесении С₁₂-АОБ в концентрациях (а, в) 1 × 10⁻⁴ М и (б, г) 2.5 × 10⁻⁴ М и хранившихся в течение 3–40 сут. Обозначения диссоциантов: 1 – S-тип; 2 – R- тип; 3 – P-тип (*P. aurantiaca*); 4 – мукоидный M-тип (*P. fluorescens*); 5 – мелкие колонии Sm и Mm-типов (*P. fluorescens*).

ла от концентрации С₁₂-АОБ и сроков хранения ЦПК. Так, доля колоний Р-варианта, выросших при посеве ЦПК, полученных при внесении С₁₂-АОБ (1 × 10⁻⁴ М), возрастала до 80% по мере хранения культур до 40 сут на фоне снижения числа колоний S-типа и относительно невысокой встречаемости (5–15%) R-варианта (рис. 1а). Иная картина выявлена при анализе популяционного спектра колоний, выросших при рассеве ЦПК, полученных под воздействием С₁₂-АОБ в большей концентрации (2.5 × 10⁻⁴ М) и хранившихся в течение 3–20 сут (рис. 1б). Наибольшая доля колоний R-типа (45–67%) наблюдалась при посеве ЦПК, хранившихся 3 сут. По мере дальнейшей инкубации этих ЦПК до 40 сут частота появления диссоциантов R-типа снижалась до 15% при увеличении числа колоний S-типа (до 60%) и постоянной доле диссоциантов Р-типа (~25%) (рис. 1б). В контрольных вариантах, при высе-ве аликовт стационарных культур, фенотипическая диссоциация S → R или S → P не выявлялась. Особо отметим, что при посеве суспензий ЦПК *P. aurantiaca*, полученных в варианте 2 (С₁₂-АОБ, 1 × 10⁻⁴ М; возраст 1.3 мес) и прогретых при 60°C (5 мин), все выросшие колонии (100%) были представлены R-типом (табл. 1). В этом эксперименте численность жизнеспособных клеток (КОЕ)

снизилась на 4 порядка [1]; по-видимому, термообработка обусловила элиминацию доминантного S-типа, и преимущественное развитие получил R-вариант.

Для другого вида псевдомонад *P. fluorescens* проявление фенотипической диссоциации зависело не только от условий образования ЦПК и сроков хранения, но и от состава плотной питательной среды для их рассева. Так, в популяциях, развивавшихся на МПА из ЦПК разных вариантов, колонии были представлены только доминантным S-типом, т.е. диссоциация не проявлялась (табл. 1). Однако использование плотной питательной среды – МПА с суслом как дополнительным источником углеводов, позволило выявить широкий спектр диссоциантов. При посевах ЦПК *P. fluorescens* варианта 2 (С₁₂-АОБ, 1 × 10⁻⁴ М) на этой среде в большом количестве (до 50%) развивались колонии мукоидного типа (M-типа) с кремовой пигментацией и слизистой консистенцией (рис. 2). Частота диссоциативных переходов S → M снижалась при “созревании” ЦПК и была наибольшей (49%) при посеве 3-суточных культур (табл. 1 и рис. 1в). В варианте рассева ЦПК, образующихся под влиянием более высоких концентраций концентраций С₁₂-АОБ (2.5 × 10⁻⁴ М), выплескиания M-варианта не происходило (рис. 1г). Для

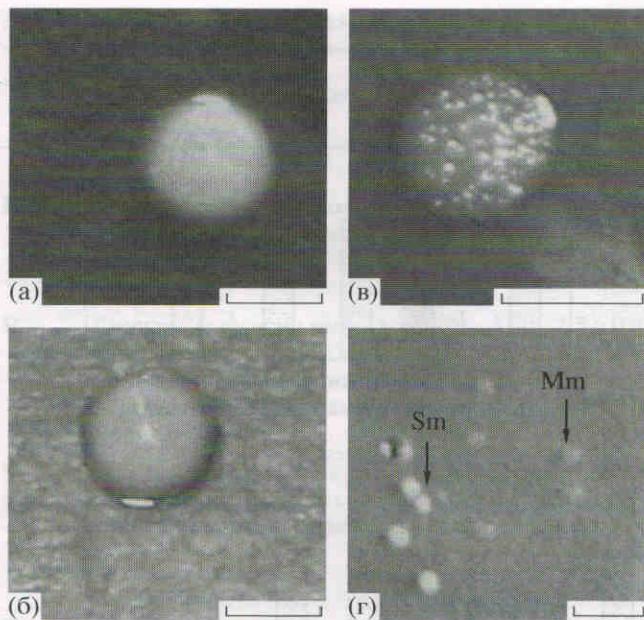


Рис. 2. Вид колоний диссоциантов *P. fluorescens* на чашках со средой МПА–сусло (1 : 1): (а) доминантного S-типа; (б) – мукоидного M-типа; (в) R-типа и (г) мелких Sm и Mm-типов. Масштабная метка – 5 мм.

популяций ЦПК варианта 2 также было характерно появление диссоциантов Sm- и Mm-типов, представленных соответственно полупрозрачными и мукоидными мелкими колониями диаметром около 1 мм в отличие от колоний остальных вариантов диаметром 6–8 мм (рис. 2).

Выщепление варианта R-типа выявлялось только на среде МПА–сусло (1 : 1) при пассаже суспензий длительно (3–5 мес.) хранящихся ЦПК *P. fluorescens*, выращенных на среде с лимитом по азоту (вариант 1), а также 20-суточных ЦПК варианта 2, образующихся при воздействии C_{12} -АОБ (1×10^{-4} М и 2.5×10^{-4} М). Отмечено, что диссоциативная способность анабиотических ЦПК *P. fluorescens*, полученных в варианте 2 при внесении C_{12} -АОБ в разных концентрациях, зависела от сроков последующего их хранения, аналогично показанному для *P. aurantiaca*. Так, диссоциант R-типа выщеплялся с частотой (20–22%) при посеве ЦПК *P. fluorescens*, образующихся при воздействии C_{12} -АОБ и инкубировавшихся в течение 20 сут, и практически полностью элиминировался и замещался другими диссоциантами – доминантным или Sm- и Mm-типами, к 1.3 мес. хранения (рис. 1в, 1г).

Таким образом, при прорастании ЦПК псевдомонад, образующихся в различных условиях культивирования бактерий, обнаружены изменения диссоциативного спектра. Фенотипическая вариабельность зависела от типа покоящихся форм и сроков их хранения. Подобная внутривидовая гетерогенность покоящихся форм бактерий может рассматриваться как один из механизмов приспособления

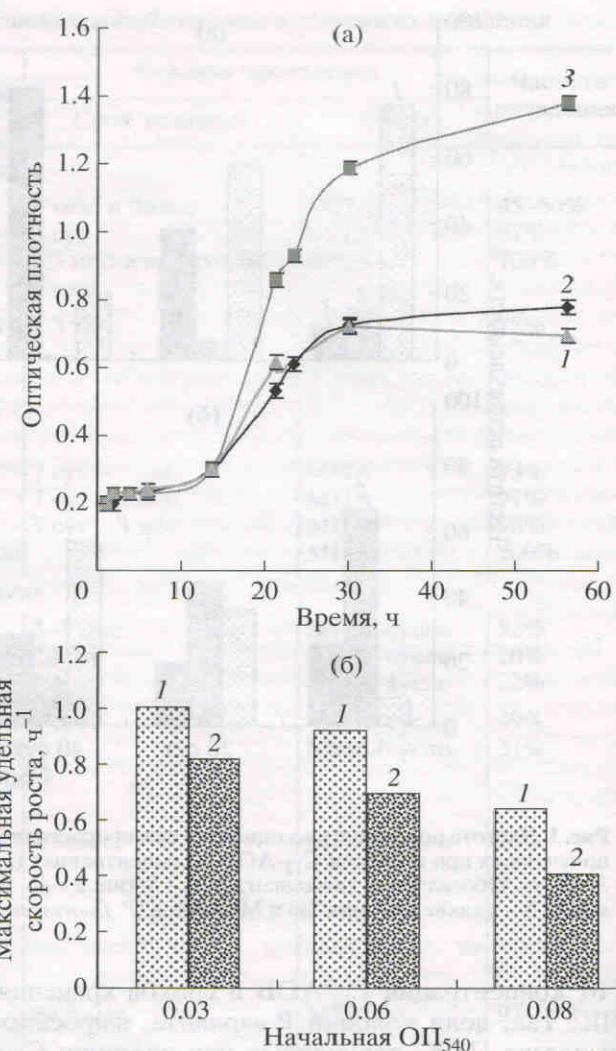


Рис. 3. Динамика роста диссоциантов (а) *P. aurantiaca* на синтетической среде с лимитом N и (б) зависимость максимальной удельной скорости роста диссоциантов *P. fluorescens* от количества вносимого инокулята (начальной О.П.). Обозначения: 1 – доминантный S-тип; 2 – R- тип; 3 – P-тип *P. aurantiaca*.

микроорганизмов к новым условиям окружения. Выявление различий в адаптационных возможностях у диссоциантов *P. aurantiaca* и *P. fluorescens*, выделенных при прорастании ЦПК, составило цель следующей части исследования.

Показано, что диссоцианты *P. aurantiaca* Р- и R-типа, не отличались от доминантного варианта S-типа ростовыми характеристиками при культивировании на богатой питательной среде – 50% МПБ. Однако существенные различия выявлены при росте на бедной среде с двукратным лимитом источника азота (рис. 3а). Так, наиболее быстро растущим был пигментированный вариант Р-типа, у которого максимальная удельная скорость роста (μ_{\max}) составила 0.046 ч^{-1} , а максимальный выход биомассы (Y_{\max}) – 1 г МСК/л, что отражает его

Таблица 2. Различия диссоциантов *P. aurantiaca* по физиолого-биохимическим признакам

Тип диссоцианта <i>P. aurantiaca</i>	Ростовые характеристики*		Устойчивость (LD_{50} мкг/мл) к		Активность внеклеточных протеаз, мЕ/мл
	Выход биомассы, Y_{max} г МСК/л	Максимальная скорость роста, μ_{max} ч ⁻¹	стрептомицину	тетрациклину	
R	0.7	0.035	180	40	5.3
S	0.65	0.024	235	25	14.8
P	1	0.046	155	65	13

* Рост на среде с лимитом по азоту. Величины отклонений ±5%.

Таблица 3. Корреляция между чувствительностью к внесению химических аналогов микробных аутоиндукторов *C*₆-АОБ и *C*₁₂-АОБ и повышенной стрессоустойчивости с ростовыми характеристиками диссоцианта *P. fluorescens*

Тип диссоцианта <i>P. fluorescens</i>	Ростовые характеристики*		Чувствительность к аналогам факторов d ₁		Устойчивость (LD_{50}) к	
	Y_{max} г МСК/л	μ_{max} ч ⁻¹	<i>C</i> ₇ -АОБ	<i>C</i> ₁₂ -АОБ	NaCl	H ₂ O ₂
R	0.50	0.4055	Стимуляция роста: 50–200 мкМ; Ингибирование роста: 300–700 мкМ; Подавление роста на 50%: 1220 мкМ	Стимуляция роста: 5–15 мкМ; Ингибирование роста: >30–50 мкМ. Подавление роста на 50%: 54 мкМ	380 мМ	1800 мкМ
S	0.64	0.6419	Отсутствие влияния на рост в концентрациях 50–1000 мкМ; Подавление роста на 50%: 2600 мкМ	Стимуляция роста: 70 мкМ; Ингибирование роста: >150–400 мкМ; Подавление роста на 50%: 370 мкМ	185 мМ	600 мкМ

* Рост на среде M9 при начальной ОП = 0.08; величины отклонений ±5%.

чувствительность к сниженному содержанию азота. Вариант R-типа рос на этой среде с меньшими $\mu_{max} = 0.035$ ч⁻¹ и выходом биомассы ($Y_{max} = 0.7$ г МСК/л); уже всего в этих условиях развивался доминантный S-вариант (табл. 2). Таким образом, проявление различий внутрипопуляционных диссоциантов (R-, R- и S-вариантов) в адаптивности к новым условиям роста определяется качеством среды, т.е. полноценностью по источникам питания (50% МПБ) или созданием дефицита по одному из них (азоту).

Другой уровень различий диссоциантов S-, R- и R-типа *P. aurantiaca* проявлялся в их способности расти в присутствии стрептомицина и тетрациклина на полноценной среде (50% МПБ), изначально не способствующей проявлению различий между вариантами по ростовым характеристикам. Исходя из зависимости ингибирования роста культур от концентрации антибиотика, были получены величины LD_{50} и LD_{70} . Анализ этих параметров не выявил резких отличий между диссоциантами по чувствительности к антибиотикам. Более чувствительными к действию стрептомицина оказались варианты R- и R-типа ($LD_{50} = 155$ и $LD_{50} = 180$ мкг/мл соответ-

ственно) по сравнению с доминантным S-вариантом ($LD_{50} = 235$ мкг/мл). Более чувствительным к тетрациклину был S-тип ($LD_{50} = 25$ мкг/мл) в отличие R- и R-вариантов ($LD_{50} = 65$ мкг/мл и $LD_{50} = 40$ мкг/мл соответственно) (табл. 2). Также диссоцианты *P. aurantiaca* различались по активности внеклеточных протеаз: в условиях роста на 50% МПА к началу стационарной фазы она была максимальной у доминантного S-варианта и минимальной – у R-варианта (табл. 2).

При анализе ростовых характеристик и стрессоустойчивости существенных отличий у диссоциантов *P. fluorescens* R- и S-типов не обнаружено (табл. 3). Так, R-диссоциант рос на синтетической сбалансированной среде M9 со скоростью роста (μ_{max}), на 20% меньшей, чем доминантный S-вариант, и несколько меньшим урожаем биомассы. При этом различия в μ_{max} зависели от начальной плотности инокулята (от 0.03 до 0.08) и были более выражены при возрастании его количества (рис. 3б). Более медленный рост R-варианта можно объяснить его повышенной продуктивностью по вне- и внутриклеточным метаболитам с функцией ингибиторов ро-

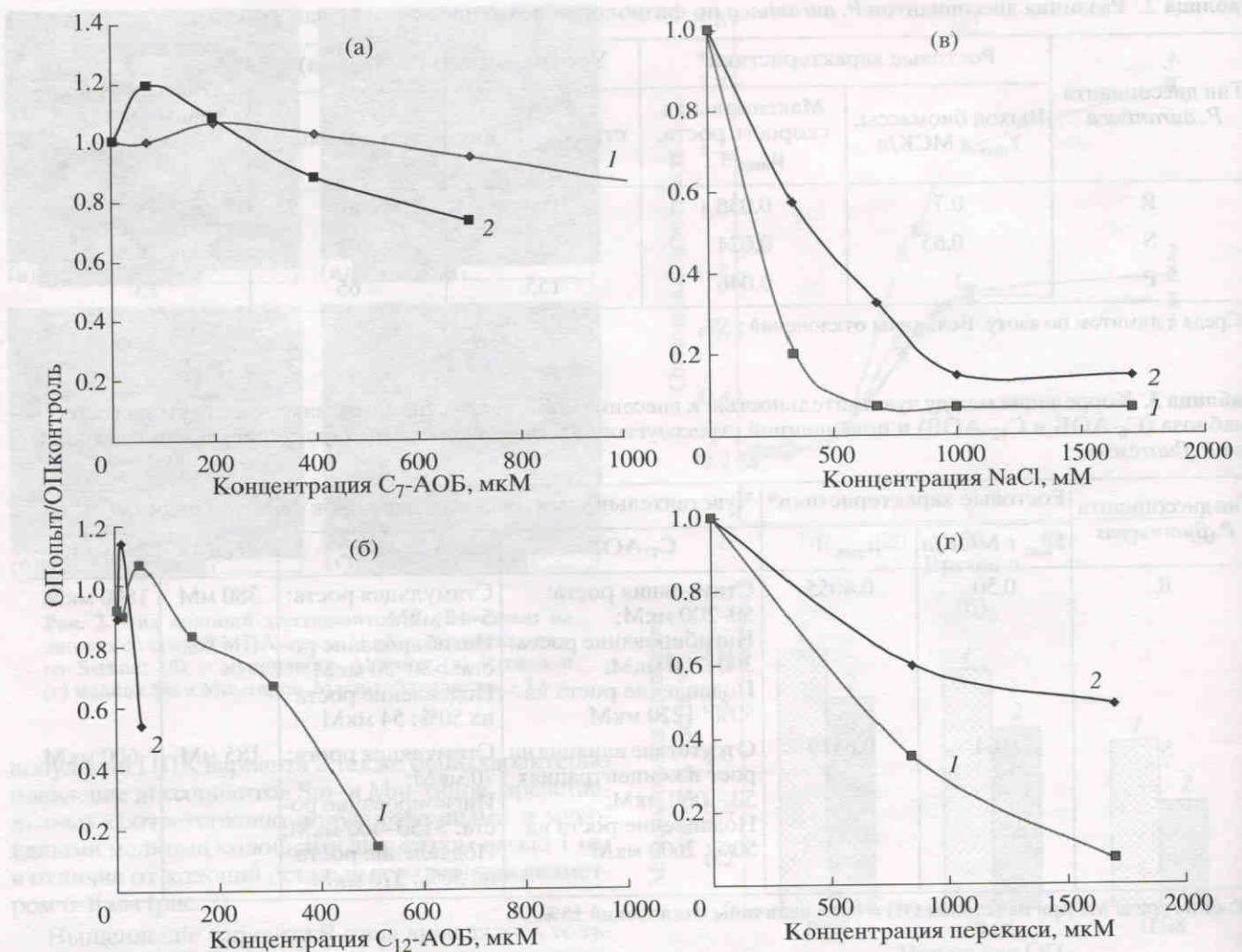


Рис. 4. Влияние (а) C₇-АОБ, (б) C₁₂-АОБ, (в) NaCl, (г) H₂O₂ на рост диссоциантов *P. fluorescens* (1) доминантного S-типа и (2) R-типа.

ста, аналогично показанной для *P. aeruginosa* [13]. Соответственно более высокий уровень аутоингибиторов был в большем объеме инокулята. Эта функция характерна для микробных аутоиндукторов анабиоза, представленных у некоторых псевдомонад изомерами и гомологами алкилоксибензолов (АОБ) [4, 6]. О различиях в продуктивности по АOB культур R- и S-вариантов *P. fluorescens* можно косвенно судить по их чувствительности к повышению внеклеточного пула этих метаболитов за счет их дополнительного внесения. Поэтому в следующих экспериментах оценивали влияние двух аналогов микробных АOB, а именно C₇-АОБ и C₁₂-АОБ с различной длиной алкильного радикала, вносимых в концентрациях 5 мкМ–1 мМ, на рост культур исследуемых диссоциантов по сравнению с контролем (без АOB). Было показано, что в диапазоне концентраций от 50 до 200 мкМ C₇-АОБ стимулировал (на 10–20%), а концентрациях от 300 до 700 мкМ ингибировал (на 10–30%) рост культур R-варианта *P. flu-*

orescens. При этом C₇-АОБ практически не влиял на рост доминантного S- в концентрационном диапазоне от 50 до 1000 мкМ (рис. 4а). Более контрастными были различия между этими диссоциантами по отклику на внесение C₁₂-АОБ. Так, его ростстимулирующий эффект в отношении R-варианта наблюдался в узком диапазоне концентраций 5–15 мкМ, а ингибирующий (на 15–50%) – в интервале от 30 до 50 мкМ, в отличие от S-варианта, рост которого подавляли концентрации 150 мкМ–500 мкМ (рис. 4б). Таким образом, R-вариант *P. fluorescens* был более чувствительным (по сравнению с доминантным S-типом) к повышению концентрации дополнительного вносимых алкилоксибензолов. Это предполагает наличие более высокого уровня собственных АOB-авторегуляторов роста и развития культур бактерий, что согласуется с данными о большей продуктивности по АOB у R-вариантов *P. aeruginosa* [13].

Более высокий уровень АОБ в культуре R-варианта *P. fluorescens*, являющийся причиной его более медленного роста, с другой стороны, мог обуславливать повышенную устойчивость клеток этого варианта к неблагоприятным для роста и повреждающим воздействиям, что верифицировано в наших экспериментах с созданием стрессовых условий. Установлено, что R-вариант был в большей степени толерантен к осмотическому стрессу (повышенной солености) по сравнению с S-диссоциантом, о чем судили по характеру зависимости их роста от концентрации NaCl в среде (рис. 4в) и величинам LD₅₀ (табл. 3). Также выявлена повышенная устойчивость диссоцианта R-типа к окислительному стрессу, создаваемому внесением в среду перекиси (70–2000 мкМ), по сравнению с доминантным S-типом (рис 4г), для которых соответствующие показатели LD₅₀ составили 1800 и 600 мкМ (табл. 3). Таким образом, для исследуемых в сравнительном аспекте колониально-морфологических вариантов R- и S-типов *P. fluorescens* прослеживается определенная корреляция между их ростовыми характеристиками, устойчивости к стрессовым факторам разной природы и различиями в продуктивности ауторегуляторов роста и развития микробных культур, косвенно подтвержденными в экспериментах по реакции на экзогенное внесение АОБ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основным результатом данной работы является выявление еще одного уровня биоразнообразия покоящихся форм бактерий, проявляющегося в различной способности цистоподобных клеток двух видов псевдомонад *P. aurantiaca* и *P. fluorescens* к фенотипической диссоциации. Диссоциативная способность зависела от условий образования ЦПК и сроков их хранения (возраста покоящихся форм). Повышение индекса внутривидовой вариабельности, учитываемого по появлению колониально-морфологических вариантов с различными физиологическими и биохимическими признаками, было также показано при прорастании ЦПК *B. cereus*, полученных в разных условиях при рецессии спорообразования [9], а также анабиотических клеток *S. aureus* [11], *Salmonella typhimurium* [14] и *P. aurantiaca* [12], образующихся под воздействием АОБ. Таким образом, результаты настоящей работы, совокупно с приведенными данными, позволяют заключить, что проявление повышенной фенотипической изменчивости правомочно рассматривать как характерный признак цистоподобных покоящихся форм бактерий. Так как цистоподобные клетки широко распространены в природных субстратах [4, 5], их свойство высокой фенотипической вариабельности составляет адаптивный потенциал популяции и способствует выживанию вида.

Важность связи покоя с фенотипической вариабельностью следует из анализа работ по изучению

развития бактерий *P. aeruginosa* в виде биопленок [15–19]. В биопленках были выявлены колониально-морфологические варианты, дающие отличные от доминантного типа колонии: 1) мелкие колонии S-типа с меньшей подвижностью и повышенной адгезивностью клеток у *P. aeruginosa* 57RP [15]; 2) колонии мини-типа и шероховатые колонии, отличающиеся по способности образовывать биопленки у разных штаммов *P. aeruginosa* [16]; 3) колонии ST-типа (small type) со складчатой поверхностью и неровными краями у *P. aeruginosa* PAO1 [17]. Согласно [18], в биопленках также присутствовали "абсолютно покоящиеся" клетки, хотя и отнесенные к этой категории только на основании данных о полном отсутствии активности щелочной фосфатазы у существенной части биопленочной популяции [19].

Образование RSCV-диссоциантов (rough small colony variant), дающих мелкие колонии R-типа и обладающих повышенной устойчивостью к широкому спектру антибиотиков, выявлено при посеве *P. aeruginosa* на плотные среды с канамицином [20]. Возможно, появление этих диссоциантов у *P. aeruginosa* связано с переходом части клеток популяции в покоящееся состояние, для которого характерна, в том числе, устойчивость к антимикробным агентам. Уместно отметить, что антибиотико-устойчивые клетки-персисторы *E. coli* отличаются от активно растущих и стационарных клеток по экспрессии ряда генов и транскриптомному профилю и находятся в особом физиологическом состоянии, ассоциируемом с пролиферативным покоя [21].

Наконец, диссоцианты F- и S-типов *P. fluorescens* F113, отличающиеся по морфологии колоний, подвижности, продуктивности по ряду биологически активных соединений, были выделены из ризосферы люцерны, инокулированной культурой исходного (дикого) варианта и инкубированной в течение 4 недель [22]. Исходя из данных, полученных при анализе популяций маркерного штамма *P. fluorescens*, интродуцированных в ризосферу, можно заключить, что часть клеток пребывает в состоянии покоя и гетерогенна по степени сохранности способности образовывать колонии и микроколонии [23].

В настоящей работе для *P. aurantiaca* и *P. fluorescens* показана принципиальная связь между фенотипической вариабельностью и состоянием покоя, а также ее зависимость от свойств и условий образования покоящихся клеток (ЦПК) – в цикле развития культур при создании лимита N, при повышении уровня аутоиндукторов анабиоза (аналога C₁₂-АОБ) и сроков их хранения (табл. 1, рис. 1). С этих позиций можно объяснить повышенную диссоциативную способность псевдомонад, развивающихся в биопленках, ризосфере и при воздействии антибиотиков. Также отметим показанное для *P. fluorescens* влияние состава плотной среды на рост колоний диссоциантов на среде МПА-сусло (но не на МПА), развивающихся при рассеве ЦПК (рис. 2). Зависи-

мость развития колониально-морфологических вариантов бактерий от состава среды (селективный отбор) известна. В частности, вариабельность появления диссоциантов RSCV-типа у *P. aeruginosa* была показана при изменениях состава плотной питательной среды (LB, LB с NaCl, минимальная среда) и температуры инкубации (25°C и 37°C) [20].

Причиной диссоциативных переходов на генетическом уровне являются обратимые внутригеномные перестройки. У представителей рода *Pseudomonas* фенотипическая вариабельность обусловлена несколькими механизмами: 1) сдвигом рамки считывания в коротком гомополимерном гуанидиновом участке гена *fhlB* у *P. putida* DOT-T1E (появление вариантов с различной подвижностью) [24]; 2) появлением дупликона размером 661 нп в регуляторном гене *pheN* у *P. tolasaki* (переход от патогенного для грибов S-типа в непатогенный R-тип) [25]; 3) экспрессией сайт-специфической рекомбиназы, кодируемой *sss*-геном, у *P. fluorescens* F113 (появление F- и S-вариантов) [22]; 4) непрограммируемым накоплением спонтанных обратимых "мутаций" в регуляторных генах *gacA/gacS* у *Pseudomonas* sp. штамма PCL 1171 (переход от типа I с мутными колониями к типу II полупрозрачных колоний) [26], что положительно регулируется геном *groS* (глобального регулона стационарной фазы) и особенно в отсутствие работы системы мисмэтч-репарации, кодируемой *tmrS*-геном [27]. Подчеркнем, что фенотипическая вариабельность связана с событиями в стационарной фазе и, в частности, с возникновением мутаций [28].

Таким образом, генетические механизмы, лежащие в основе фенотипической диссоциации у представителей псевдомонад, различные и затрагивают разные участки генома. В этой связи важно отметить видонеспецифичную регуляцию фенотипической вариабельности, опосредованную участием низкомолекулярных метаболитов – алкилоксибензолов (АОБ), с функциями аутоиндуktorов анабиоза. Как показано в данной работе для двух видов псевдомонад, а также в более ранних исследованиях, определенные гомологии АОБ (C_{12} -АОБ) индуцируют диссоциативные переходы у широкого круга грамположительных и грамотрицательных бактерий [9–12, 14]. Механизм действия АОБ в регуляции фенотипической диссоциации может быть обусловлен их способностью как химических шаперонов изменять конформацию и активность белков, в том числе, возможно, участвующих в генной экспрессии на уровне образования транскриптов [4]; а также непосредственно взаимодействием с ДНК разного происхождения [12, 29, 30]. Второй вариант представляется более вероятным, так как он подтверждается: 1) наличием слабой мутагенной активности у некоторых гомологов АОБ (C_{12} -АОБ), выявленной в тесте Эймса с ауксотрофным *trp*-мутантом *S. typhimurium* (мутация сдвига рамки считывания) [14]; 2) способностью АОБ индуцировать SOS-от-

вет [31] 3) накоплением в стационарных и покоящихся клетках псевдомонад (и других микроорганизмов) аутоиндуktorов анабиоза, представленных АОБ класса алкилрезорцинов [4, 6, 7]. Показано, что взаимодействие АОБ с индивидуальной ДНК, приводящее к изменениям ее физико-химических характеристик и топологии (переход из формы $B \rightarrow A$), развивается во времени [30]. Это может объяснить зависимость различий диссоциативных спектров в популяциях прорастающих ЦПК *P. aurantiaca* и *P. fluorescens* (табл. 1, рис. 1) от сроков их хранения (20 сут–4 мес.). Отмеченную закономерность подтверждают данные об изменении спектра мутаций, ассоциированных с фенотипической вариабельностью, при увеличении возраста голодающих культур *P. putida* [32].

Выявленные вариации по ростовым характеристикам, устойчивости к антибиотикам, повышенной солености и окислительному стрессу (рис. 3, 4, табл. 2, 3) у диссоциантов *P. fluorescens* и *P. aurantiaca*, образующихся при прорастании разных типов ЦПК, отражают их различную потенцию приспособливаться к изменяющимся условиям окружающей среды, что согласуется с литературными данными. Так, повышенная устойчивость R-варианта *P. fluorescens*, по сравнению с доминантным к действию перекиси (рис. 4), также характерна для варианта *P. aeruginosa* со схожей морфологией колоний, развивающегося в виде биопленок, но не в планктонной культуре [16]. Также активно растущие клетки S-диссоцианта *P. aeruginosa* 57RP, дающего мелкие колонии, были более чувствительны к H_2O_2 , чем исходного L-типа [15], а RSCV- и исходный типы *P. aeruginosa* различались устойчивостью к канамицину [20].

Способность *P. aurantiaca* и *P. fluorescens* к образованию разных морфотипов цистоподобных покоящихся форм, различающихся по сохранности жизнеспособности и термоустойчивости [1] и потенции к фенотипической диссоциации с выщеплением колониально-морфологических вариантов с разной способностью адаптироваться к новым (в том числе, стрессовым) условиям среды расширяет представления о механизмах выживания этих неспоробразующих бактерий.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты 07-04-01011 и офи_07-04-12121).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Структурное и физиологическое разнообразие цистоподобных покоящихся клеток бактерий рода *Pseudomonas* // Микробиология. 2008. Т. 77. № 4. С. 512–523.
2. Мулюкин А.Л., Луста К.А., Грязнова М.Н., Козлова А.Н., Дужа М.В., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Образование покоящихся форм *Bacillus cereus* и *Micromonospora* // Микробиология. 2008. Т. 77. № 4. С. 524–533.

- croccus luteus* // Микробиология. 1996. Т. 65. № 6. С. 782–789.
3. Демкина Е.В., Соина В.С., Эль-Регистан Г.И. Образование покоящихся форм *Arthrobacter globiformis* в автолизирующихся суспензиях // Микробиология. 2000. Т. 69. № 3. С. 383–388.
 4. Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 446–456.
 5. Сузина Н.Е., Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Шорхова А.П., Дмитриев В.В., Баринова Е.С., Мохова О.Н., Эль-Регистан Г.И., Дуда В.И. Тонкое строение покоящихся клеток некоторых неспорообразующих бактерий // Микробиология. 2004. Т. 73. № 4. С. 516–529.
 6. Светличный В.А., Романова А.К., Эль-Регистан Г.И. Изучение количественного содержания мембраноактивных ауторегуляторов при литоавтотрофном росте *Pseudomonas carboxydoflava* // Микробиология. 1986. Т. 55. № 1. С. 55–59.
 7. Осипов Г.А., Эль-Регистан Г.И., Светличный В.А., Козлова А.Н., Дуда В.И., Капрельянц А.С., Помазанов В.В. О химической природе ауторегуляторного фактора d *Pseudomonas carboxydoflava* // Микробиология. 1985. Т. 54. № 2. С. 186–190.
 8. Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Капрельянц А.С., Эль-Регистан Г.И. Обнаружение и изучение динамики накопления ауторегуляторного фактора d₁ в культуральной жидкости и клетках *Micrococcus luteus* // Микробиология. 1996. Т. 65. № 1. С. 20–25.
 9. Дорошенко Е.В., Лойко Н.Г., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Горнова И.В., Эль-Регистан Г.И. Характеристика диссоциантов *Bacillus cereus* шт. 504 // Микробиология. 2001. Т. 70. № 6. С. 811–819.
 10. Хабибуллин С.С., Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Годол Н.А., Милько Е.С., Войкова Т.А., Эль-Регистан Г.И. Ауторегуляция фенотипической диссоциации у *Bacillus licheniformis* // Ж. микробиол., эпидемиол. иммунобиол. 2006. № 6. С. 9–13.
 11. Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Шмидт М.А., Дорошенко Е.В., Мулюкин А.Л., Эль-Регистан Г.И. Роль бактериальных ауторегуляторов роста группы алкилоксибензолов в ответе стафилококков на стрессовые воздействия // Микробиология. 2002. Т. 71. № 1. С. 23–29.
 12. Мулюкин А.Л., Вахрушев М.А., Стражевская Н.Б., Шмырина А.С., Жданов Р.И., Сузина Н.Е., Дуда В.И., Козлова А.Н., Эль-Регистан Г.И. Влияние микробных аутоиндуktorов анабиоза – алкилоксибензолов – на структурную организацию ДНК *Pseudomonas aeruginosa* и индукцию фенотипической диссоциации // Микробиология. 2005. Т. 74. № 2. С. 157–165.
 13. Милько Е.С., Хабибуллин С.С., Николаев Ю.А., Козлова А.Н., Эль-Регистан Г.И. Динамика роста и состава популяций смешанных культур R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. 2005. Т. 74. № 4. С. 475–482.
 14. Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Зеленин П.В., Круглова З.Д., Чойдаш Б., Дорошенко Е.В., Мулюкин А.Л., Эль-Регистан Г.И. Влияние аутоиндуktorов анабиоза на геном микробных клеток // Микробиология. 2002. Т. 71. № 2. С. 194–199.
 15. Déziel E., Comeau Y., Villemur R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities // J. Bacteriol. 2001. V. 183. P. 1195–1204.
 16. Boles B.R., Thoendel M., Singh P.K. Self-generated diversity produces ‘insurance effects’ in biofilm communities // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101 № 47. P. 16630–16635.
 17. Kirisits M.J., Prost L., Starkey M., Parsek M.R. Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 4809–4821.
 18. Costerton J.W., Camper A.K., Stewart P.S., Zelver N., Dirckx M.E. The problem: Not just bacteria–bacterial biofilms // The Analyst. 1999. V. 6. № 3. P. 18–25.
 19. Xu K.D., Stewart P.S., Xia F., Huang C.T., McFeters G.A. Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 10. P. 4035–4039.
 20. Drenkard E., Ausubel F.M. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation // Nature. 2002. V. 416. P. 740–743.
 21. Shah D.V., Zhang Z., Kurg K., Kaldalu N., Khodursky A., Lewis K. Persisters: A distinct physiological state of *Escherichia coli* // BMC Microbiol. 2006. V. 6. P. 53.
 22. Sanchez-Contreras M., Martin M., Villacíeros M., O’Gara F., Bonilla I., Rivilla R. Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113 // J. Bacteriol. 2002. V. 184. P. 1587–1596.
 23. Normander B., Hendriksen N.B., Nybroe O. Green fluorescent protein-marked *Pseudomonas fluorescens*: localization, viability, and activity in the natural barley rhizosphere // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 4646–4651.
 24. Segura A., Hurtado A., Duque E., Ramos J.L. Transcriptional phase variation at the *fhlB* gene of *Pseudomonas putida* DOT-T1E is involved in response to environmental changes and suggests the participation of the flagellar export system in solvent tolerance // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 1905–1909.
 25. Han B., Pain A., Johnstone K. Spontaneous duplication of a 661 bp element within a two-component sensor regulator gene causes phenotypic switching in colonies of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of mushrooms // Mol. Microbiol. 1997. V. 25. P. 211–218.
 26. van den Broek D., Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J. Molecular nature of spontaneous modifications in *gacS* which cause colony phase variation in *Pseudomonas* sp. PCL1171 // J. Bacteriol. 2005. V. 187. P. 593–600.
 27. van den Broek D., Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J. Role of *RpoS* and *MutS* in phase variation of *Pseudomonas* sp. PCL1171 // Microbiology (UK). 2005. V. 151. P. 1403–1408.
 28. Kivisaar M. Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress // Environ. Microbiol. 2003. V. 5. P. 814–827.

29. Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Никиян А.Н., Эль-Регистан Г.И. О механизмах взаимодействия ДНК с химическими аналогами микробных аутоиндукторов анабиоза // Микробиология. 2005. Т. 74. № 5. С. 616–625.
30. Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Эль-Регистан Г.И. Исследование влияния химических аналогов ауторегуляторных d_1 факторов микроорганизмов на структурные переходы ДНК методом ИК-спектроскопии // Микробиология. 2007. Т. 76. № 3. С. 306–312.
31. Маргулис А.Б., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Эль-Регистан Г.И. Индуциция SOS-ответа клетки под действием ауторегуляторных факторов микроорганизмов // Генетика. 2003. Т. 39. № 9. С. 1180–1186.
32. Saumaai S., Tover A., Kasak L., Kivisaar M. Different spectra of stationary-phase mutations in early-arising versus late-arising mutants of *Pseudomonas putida*: involvement of the DNA repair enzyme MutY and the stationary-phase sigma factor RpoS // J. Bacteriol. 2002. V. 184. P. 6957–6965.

Properties of the Phenotypic Variants of *Pseudomonas aurantiaca* and *P. fluorescens*

A. L. Mulyukin, A. N. Kozlova, and G. I. El'-Registan

Winogradsky Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences,
pr. 60-letiya Oktyabrya 7, k. 2, Moscow, 117312 Russia

Abstract—Different capacity for phenotypic variation of *Pseudomonas aurantiaca* and *P. fluorescens*, in populations of cyst-like resting cells (CRC), during their germination on solid media, was shown to be a characteristic trait of biodiversity for the dormant forms of these bacteria. This biodiversity manifests itself as qualitative and quantitative differences in the spectra and emergence frequency of phenotype variants, obtained by plating of CRC, and depends on the conditions of CRC formation and storage time. In *P. aurantiaca*, the variation was associated with transition of the wild-type S-colonial phenotype into the R-type or the more pigmented P-type. These transitions were most pronounced for the CRC obtained under nitrogen depletion (a twofold N limitation), as well as under the influence of a chemical analogue of microbial anaerobiosis autoinducers, C₁₂-AHB. In the latter case, the frequency of S → R and S → P transitions (up to 70% and 80%, respectively) depended on the C₁₂-AHB concentration (1.0×10^{-4} M and 2.5×10^{-4} M) and on the storage time of CRC suspensions (from 3 days to 1.3 months). In the CRC populations grown in nitrogen-deficient media, R-type appeared with a frequency of up to 45% after at least four months of storage. In the case of *P. fluorescens*, S → R transitions depended not only on the storage time of CRC and C₁₂-AHB concentrations, but also on the composition of the solid medium used for plating. Differences were shown between the R-, P-, and S-variants of *P. aurantiaca* in such morphological, physiological, and biochemical characteristics as the growth rate (μ_{\max}) in a poor medium, biomass yield (Y_{\max}), resistance to streptomycin and tetracycline (LD_{50}), and the productivity in extracellular proteases. The R- and S-variants of *P. fluorescens* differed in their growth characteristics, resistance to high salinity and oxidative stress, as well as in their sensitivity to exogenous introduction of chemical analogues of microbial autoregulators (C₁₂-AHB and C₇-AHB). Hence, both the formation of dormant forms of the various morphological types and intrapopulation phenotypic variability observed during their germination are important for the survival strategy of pseudomonads under unfavorable environmental conditions.

Key words: phenotypic variability, S → R transition, biodiversity of resting forms, cystlike resting cells, anaerobiosis autoinducers, alkylhydroxybenzenes.