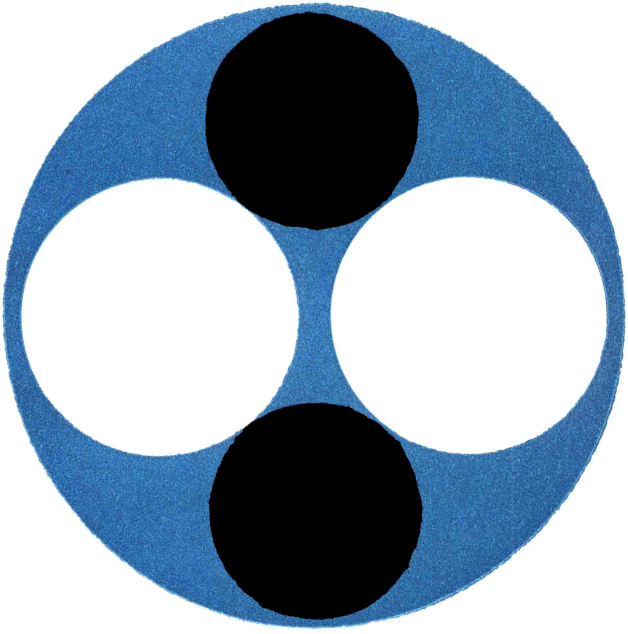
АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ



СВЕРДЛОВСК · 1980

АКАДЕМИЯ НАУК СССР·УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

СВЕРДЛОВСК, 1980

УДК 576.809.5

Факторы развития бактериальных популяций: [Сб. статей]. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.— 120 с.

В сборнике представлены материалы по изучению факторов, определяющих развитие и гетерогенность бактериальных популяций как в экспериментальных, так и природных условиях. Рассмотрены вопросы неспецифической регуляции роста и развития микроорганизмов при непрерывном культивировании в режимах турбидо- и хемостата. Показаны особенности метаболизма при периодическом выращивании с динамикой спектра отдельных ферментов, биологически активных полиаминов и нуклеиновых кислот.

Особый интерес представляют данные об изменении структуры исходно-гетерогенных внутривидовых популяций на примере *E. coli* с характерными фазовыми колебаниями быстро- и медленнореплицирующихся вариантов, формированием определенного аминокислотного фона среды и появлением в ней белковых соединений, отличающихся от внутриклеточных белков по антигенным свойствам.

Обсуждаются вопросы математического анализа смешанных бактериальных популяций, динамики фаголизиса, образования Л-форм.

Материалы сборника представляют интерес для микробиологов, биохимиков, экологов, специалистов широкого круга микробиологического производства.

Ответственные редакторы

В. Н. Большаков, В. П. Коробов

© УНЦ АН СССР, 1980.

$Ф\frac{21008—1024}{055(02)7}21—1980.$

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ · 1980

А. Н. ШКИДЧЕНКО

ЛИМИТИРОВАНИЕ И ИНГИБИРОВАНИЕ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ НЕПРЕРЫВНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Современные подходы к проблеме управления ростом и развитием микробных популяций на основе математических моделей [1] и создание аппаратуры класса АНКУМ [2], предоставляющей возможность программируемого дозирования различных компонентов питательной среды при условии поддержания постоянной скорости протока при культивировании микроорганизмов в режиме хемостата, требуют от исследователя достаточно полного представления возможных последствий изменения любого параметра процесса культивирования.

Один из наиболее распространенных методов непрерывного культивирования микроорганизмов — хемостатный, когда скорость роста микробной популяции ограничивается концентрацией одного из компонентов питательной среды [3—5]. Часто такими лимитирующими факторами являются источники углерода, азота и фосфора. При ограничении скорости роста культуры различными компонентами питательной среды можно получить близкие (по скорости роста и концентрации биомассы в потоке) микробные популяции.

Насколько же сопоставимы и сопоставимы ли культуры, выращиваемые при равных скоростях роста, ограниченных различными лимитирующими факторами?

Рассмотрим некоторые показатели физиологического состояния микробной популяции, лимитированной различными компонентами среды, на примере дрожжей *Candida utilis*.

Ввиду того, что скорость протока питательной среды, а следовательно и скорость роста во всех вариантах опытов была постоянной ($Д=0{,}25$ $ч^{-1}$), то целесообразно рассматривать все изменения физиологических и биохимических показателей роста дрожжей при близких концентрациях биомассы в протоке. В качестве исходного состояния микробной популяции избран режим, когда рост дрожжей ингибировался концентрацией продуктов метаболизма в среде, и культуры по ряду показателей были максимально близки.

Уменьшение содержания азота в подававшейся среде сопро-

вождалось уменьшением концентрации биомассы в протоке, снижением экономического коэффициента процесса и некоторым увеличением накопления продуктов метаболизма. При жестком (на грани вымывания культуры) лимитировании роста азотом наблюдалось накопление в клетках липидных гранул и усиленная вакуолизация, а также изменения в ультраструктурной организации внутриклеточных мембран [6].

Переходные процессы при изменении концентрации азота в среде продолжались от 8 до 35 ч в зависимости от величины рассогласования по концентрации. Содержание клеточного белка при лимитировании роста азотом постепенно уменьшалось и при жестком лимитировании падало с 33 до 26,2 %. Аминокислотный состав гидролизата белка при этом изменялся: снижалось содержание лизина, аланина, глутаминовой кислоты и серина. Величина пула свободных внутриклеточных аминокислот падала на 50 % при уменьшении концентрации источника азота с 0,75 до 0,188 г/л и достигала 2,0 % от сухого веса биомассы. Содержание фракции подвижной воды в лиофилизированной биомассе повышалось с уменьшением степени обеспеченности культуры азотом.

Изменение содержания в лиофилизированной биомассе дрожжей фракции подвижной воды связано со степенью завершенности мембранных структур. Количество подвижной воды возрастает при неблагоприятных для роста условиях [7]. При лимитировании роста дрожжей азотом, последний из питательной среды утилизировался не полностью и, независимо от его концентрации на входе в ферментер, обнаруживался в культуральной жидкости в количестве 0,014—0,016 г/л. По-видимому, эта концентрация является пороговой для исследованной культуры и физиологически ей недоступна.

Некоторые экспериментаторы ранее отмечали, что лимитирование роста наблюдается не при полном исчерпании одного из компонентов среды, а при его определенных, достаточно низких концентрациях. Так, Шульц [8] отмечал, что при культивировании дрожжей рода *Candida* в режиме хемостата с лимитированием скорости роста фосфатами, фосфор становился недоступным для клеток, если его концентрация составляла меньше восьми миллионных долей от веса среды. При культивировании *Az. vinelandii* в режиме хемостата с лимитированием сахарозой концентрация последней в культуральной жидкости, вытекающей из ферментера, составляла 70 мг/л [9]. При непрерывном культивировании бактериальных культур с лимитированием роста метанолом, являвшимся единственным источником углерода, концентрация неутилизированного метанола составляла 45—50 мг/л [10].

Как правило, эти наблюдения носили случайный характер. Экспериментаторы называли определенные ими концентрации лимитирующих рост компонентов «неутилизируемыми» или «ос-

таточными». С нашей точки зрения, концентраций компонентов, остающихся в питательной среде при лимитировании ими скорости роста микроорганизмов, следует называть пороговыми концентрациями согласно терминологии, применяемой при описании физиологических исследований [11]. При таком подходе пороговые концентрации лимитирующих рост компонентов среды можно рассматривать в качестве показателей физиологической активности микробной популяции и использовать для характеристики физиологического состояния микроорганизмов.

Автоселекции дрожжевой популяции при длительном (более 450 ч) непрерывном культивировании с лимитированием роста источником азота не наблюдалось.

При лимитировании роста дрожжей фосфором сначала уменьшалось содержание внутриклеточных фосфатов, и лишь после этого изменялась концентрация биомассы в протоке. При жестком лимитировании роста фосфором содержание внутриклеточных фосфатов снижалось в четыре раза, падал экономический коэффициент и скорость накопления в среде продуктов метаболизма [12].

Переходные процессы при изменении концентрации фосфора в среде длились 5—38 ч. Популяции с разной обеспеченностью фосфором отличались по дыхательной активности. Содержание клеточного белка возрастало при снижении степени обеспеченности популяции фосфором и достигало при жестком лимитировании 39,8 % без существенных изменений в аминокислотном составе. Содержание свободных внутриклеточных аминокислот также возрастало и достигало 5,02 %, от сухого веса. Содержание фракции подвижной воды в лиофилизированной биомассе резко увеличивалось с уменьшением степени обеспеченности дрожжей фосфором [13].

Пороговая концентрация фосфора, лимитировавшего рост дрожжей *C. utilis*, составляла 0,0007 г/л. Она не зависела от концентрации фосфора в поступавшей питательной среде и от содержания внутриклеточных фосфатов. Прекращение подачи фосфатов в ферментер на 30 мин при постоянной скорости протока вызывало снижение концентрации биомассы в протоке, т. е. сопровождалось вымыванием культуры. Величина пороговой концентрации фосфора при этом, однако, не менялась. При лимитировании роста дрожжей фосфором, когда содержание внутриклеточного фосфора снижалось с 1,9 до 0,55 % от веса биомассы, проявлялась пороговая концентрация растворенного в среде кислорода. Отключение аэрации ферментера в этих условиях сопровождалось снижением концентрации растворенного кислорода лишь до определенного уровня. Пороговая концентрация растворенного в среде кислорода составляла 22—23 % насыщения и исчезла при обогащении питательной среды фосфатами.

Длительное непрерывное культивирование дрожжей *Candida*

utilis в режиме хемостата с лимитированием роста фосфатами сопровождалось автоселекцией. Селективная культура обладала более высокой скоростью роста, отличалась от исходной скоростью потребления субстрата и накопления продуктов метаболизма, содержанием внутриклеточного белка. Процесс автоселекции обусловлен, по-видимому, отбором популяции, обладающей более низкой константой Михаэлиса, ибо эта константа в режиме хемостата определяет величину действующей удельной скорости роста микроорганизмов. На возможность и условия возникновения автоселекционных процессов при длительном непрерывном культивировании микроорганизмов указывали и другие исследователи [14—16]. По-видимому, на интенсивность автоселекционных процессов оказывает влияние не только длительность процесса и скорость протока, но также характер лимитирующего фактора и уровень лимитирования.

При непрерывном культивировании дрожжей с постоянной скоростью протока уменьшение содержания глюкозы в подававшейся питательной среде приводило к пропорциональному снижению концентрации биомассы и продуктов метаболизма в протоке. Экономический коэффициент при этом не менялся, переходные процессы при изменении концентрации глюкозы были короткими (2—3 ч). Содержание клеточного белка по мере снижения концентрации биомассы возрастало с 33 до 41 % по сухому весу. В составе гидролизата белка существенно увеличивалось содержание лизина, валина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. Пул свободных внутриклеточных аминокислот также несколько возрастал. Содержание фракции подвижной воды в лиофилизированной биомассе при лимитировании роста дрожжей глюкозой резко снижалось. При длительном непрерывном культивировании дрожжей с ограничением роста глюкозой автоселекционных процессов в микробной популяции не наблюдалось. Пороговая концентрация глюкозы, лимитировавшей рост дрожжей, составляла 80—83 мг/мл. Она не зависела от концентрации глюкозы в поступавшей свежей питательной среде.

Сопоставительный анализ хемостатных культур дрожжей при лимитировании роста азотом, углеродом и фосфором показал, что при равной скорости роста, но разных лимитирующих факторах культуры различаются по многим показателям. Более того, основные показатели роста и развития микробной популяции при одинаковой скорости роста, но при разной степени обеспеченности одним из компонентов среды, существенно различаются.

Увеличение содержания клеточного белка при лимитировании роста дрожжей углеродом и фосфором можно рассматривать как подготовку клеток к «консервации». Подобные явления были отмечены нами ранее при действии на культуру неблагоприятного внешнего фактора [17]. В случае недостатка азота

клетки накапливали запасные вещества. Увеличение содержания в лиофилизированной биомассе фракции подвижной воды также связано (по крайней мере при периодическом культивировании) со снижением метаболической активности и переходом культуры к состоянию покоя. Приведенные экспериментальные данные показывают, что сопоставление культур по скорости роста очень условно, так как их физиологическое состояние может быть различным при равных скоростях роста.

Следует особо выделить эффект аутостабилизации пороговых концентраций, лимитирующих рост факторов. Его можно выразить количественно, введя коэффициент аутостабилизации K_{ac} как отношение изменения величины фактора в подающейся среде к соответствующему изменению его равновесной величины в культуре. Для лимитирующего рост субстрата коэффициент имеет вид

$$K_{ac}=\frac{S_{a\,max}-S_{o\,min}}{S_{max}-S_{min}},$$

где S и S_0 — концентрация лимитирующего субстрата в среде, окружающей клетки, и в подающейся среде, соответственно.

В приведенных примерах величины K_{ac} по глюкозе превышают 10^{-3}, а по фосфору и азоту — 10^{-2}. Следовательно, эффект аутостабилизации выражен достаточно сильно, и его нельзя не учитывать при применении проточного культивирования как в лабораторных, так и в промышленных условиях. Для природных популяций явление аутостабилизации также существенно, так как эти биологические системы в своей основе являются открытыми [18].

До настоящего момента мы рассматривали хемостатные культуры дрожжей лишь с позиций ограничения роста недостатком одного из компонентов питательной среды. В действительности же микробная популяция в проточной хемостатной культуре подвергается еще и воздействию продуктов клеточного метаболизма, постоянно присутствующих в культуральной жидкости.

В культуральной среде обнаруживали продукты неполного окисления субстрата [19, 20], аминокислоты [21], белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты [22] и другие вещества. Накапливающиеся в среде продукты энзиматических реакций тормозят ход этих же или каких-либо ранних звеньев цепи реакций по принципу отрицательной обратной связи. В литературе описано лишь несколько процессов выращивания микроорганизмов, не сопровождавшихся накоплением продуктов клеточного метаболизма в среде, но это сопряжено с применением специфических приемов культивирования [23—25].

Количественная зависимость между концентрацией продуктов обмена и скоростью роста микроорганизмов была получена при культивировании *Propioniobacterium shermanii* на средах

с лактатом [26]. Наличие высокой концентрации продуктов метаболизма в среде способно изменить направленность процесса и возможно нарушить управление ростом популяции с помощью первоначально избранного лимитирующего компонента среды.

С подобным явлением мы столкнулись при лимитировании роста дрожжей *C. utilis* глюкозой при постоянной скорости протока. Увеличение содержания глюкозы с 2,5 до 10 г/л сопровождалось пропорциональным повышением концентрации биомассы в протоке. Однако эта зависимость нарушалась при содержании глюкозы в подаваемой среде от 15 г/л и более. Повышение концентрации питательных веществ в этих условиях не оказывало влияния на рост микробной популяции. Контактное ингибирование роста, наблюдавшееся при концентрации клеток дрожжей *C. utilis* в количестве 10^6 в 1 мм^3 [27], исключалось, так как в наших опытах концентрация клеток достигала лишь $3{,}2 \cdot 10^5$ в 1 мм^3.

Выделенные из культуральной жидкости продукты метаболизма (при разных плотностях популяции) сконцентрировали и ввели в турбидостатную культуру дрожжей. Зависимость удельной скорости роста дрожжей *C. utilis* от концентрации продуктов метаболизма удовлетворительно описывалась уравнением Моно — Иерусалимского. Следовательно, во всех исследованных режимах лимитирования роста дрожжей глюкозой культура подвергалась ингибированию продуктами метаболизма. После фракционирования продуктов метаболизма и исследования влияния каждой фракции на дыхательную активность дрожжей было установлено, что ингибирующим действием обладала фракция, содержащая низкомолекулярные продукты обмена.

Углекислый газ (CO_2), составляющий основную часть газообразных продуктов клеточного метаболизма, может оказывать существенное влияние на рост и развитие микробных популяций. При отсутствии углекислого газа удлиняется лаг-фаза роста микроорганизмов, уменьшается прирост биомассы и скорость утилизации источников углерода [28, 29]. Концентрация углекислого газа может быть использована в качестве фактора регулирования скорости роста. Так, максимальная скорость роста *Streptomyces sanguis* наблюдалась при содержании в газовой фазе не менее 2,4 % CO_2. При более низких концентрациях скорость роста зависела от концентрации углекислого газа [30].

В ряде случаев отмечалась гетеротрофная фиксация CO_2 микроорганизмами. При выращивании дрожжей *C. tropicalis* (штамм Н-30) и *C. guilliermondii* (штамм НП-4) на средах с октадеканом и глюкозой аэрирующий воздух содержал от 15 до 30 % углекислого газа. На среде с октадеканом выход биомассы возрастал на 20 %, (усваивалось 14 % поданного углекислого газа), а на среде с глюкозой только на 2,7 % [31].

В литературе имеются данные по угнетению развития микробных популяций углекислым газом. Отмечалось, например, полное подавление развития грибов при увеличении содержания CO_2 в подававшемся воздухе [32]; наблюдалось подавление циркадного конидиеобразования у *Neurospora crassa* при содержании CO_2 в воздухе выше критического уровня [33]; указывалось на влияние концентрации углекислого газа на целлюлолитическую активность некоторых грибов [34].

Одним из приемов, применяемых при непрерывном культивировании микроорганизмов для стабилизации концентрации растворенного в среде кислорода на определенном уровне, является управляемая дискретная подача аэрирующего воздуха в ферментер [35, 36]. Само по себе варьирование концентрации растворенного в среде кислорода (в диапазоне 10—90% насыщения) не оказывает ощутимого влияния на рост микроорганизмов при проточном культивировании, так как действие кислорода маскируется лимитирующими и ингибирующими факторами.

Применение оксистата с прерыванием аэрации и включением ее при снижении pO_2 ниже заданного уровня целесообразно в тех случаях, когда происходит интенсивное пенообразование, а применение химического пеногашения нежелательно. Это позволяет существенно сократить расход воздуха при аэрации, стабилизировать концентрацию растворенного в среде кислорода в узком диапазоне (5—8 % насыщения) и при проточном культивировании поддерживать уровень культуральной жидкости на одном уровне. Кроме того, при интенсивном пенообразовании часть биомассы находится в пенном слое, что затрудняет управление скоростью протока по датчику оптической плотности. Концентрация углекислого газа в ферментере при его оксистатировании изменяется в широком диапазоне. Частые прерывания аэрации при изучении дыхательной активности микробной популяции приводили к снижению скорости роста и активности дыхания [37].

При культивировании дрожжей *C. utilis* в режиме хемостата с лимитированием роста источником азота накопление в среде углекислого газа, возникающее при оксистатировании ферментера, ингибирует рост микробной популяции. При этом происходит переключение с лимитирования роста источником азота на ингибирование одной из форм углекислого газа, а именно гидрокарбонатной. Эффект ингибирования роста обратим. Он снижается с повышением интенсивности вентиляции аппарата или варьированием величины pH среды (в зоне оптимальной для роста дрожжей), изменяющим соотношение свободной и гидрокарбонатной форм углекислого газа в культуральной среде [38].

Известны данные, иллюстрирующие ингибирующее действие растворенного CO_2 (а не гидрокарбонатной его формы) на

образование и накопление инозита [39, 40]. Возможно, что свободный CO_2 и его гидрокарбонатная форма оказывают различное действие на скорость роста и на процесс накопления продуктов микробного синтеза. Не исключено, что разница в характере действия различных форм CO_2 связана с индивидуальными особенностями изучавшихся культур микроорганизмов. Ингибирующим рост микроорганизмов действием могут обладать и исходные субстраты. Даже такие нетоксичные субстраты как сахара́ в невысоких концентрациях могут угнетать рост микроорганизмов. Указывалось, например, на снижение скорости роста *Bacillus megaterium* и экономического коэффициента при повышении концентрации глюкозы в питательной среде до 0,25 % [41].

В ряде случаев приходится учитывать не индивидуальное действие лимитирующей или ингибирующей концентрации определенного компонента среды, а возможность одновременного действия двух или нескольких факторов. Браун и Джонсон [42] наблюдали ингибирование роста дрожжей в хемостатной культуре углеводами на фоне лимитирования недостатком азота. В данном случае речь шла не о переключении с лимитирования на ингибирование роста, а об одновременном действии на культуру двух внешних факторов.

В наших опытах при проточном культивировании дрожжей *C. utilis* в режиме хемостата с лимитированием роста фосфатами избыточная концентрация глюкозы ингибировала рост культуры. Лимитирующий и ингибирующий факторы оказывали одновременное, кооперативное, действие. Концентрация биомассы при постоянной скорости протока среды снижалась за счет ингибирования роста дрожжей остаточной глюкозой в концентрациях 0,96 и 1,36 % соответственно на 5,5 и 15,6 % абсолютной величины. Экономический коэффициент процесса уменьшался при этом с 40 до 28%. При жестком лимитировании роста дрожжей проявлялась пороговая концентрация растворенного в среде кислорода, составляющая от 5 до 25 % насыщения. При одновременном действии лимитирующего и ингибирующего факторов пороговая концентрация кислорода возрастала, а фосфора — оставалась постоянной. Ингибирование роста дрожжей избытком глюкозы на фоне лимитирования фосфором сопровождалось снижением содержания внутриклеточных фосфатов.

При выборе фактора управления ростом микробной популяции экспериментатор должен учитывать возможные последствия длительного действия на культуру данного фактора и дифференцировать его действие от суммы других факторов. В заключение отметим, что возможности управляемого непрерывного культивирования микроорганизмов в настоящее время исследованы недостаточно и развитие работ в этом направлении представляется перспективным.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Амбросов В. А., Складнев А. А., Васильев Н. Н.* Модель роста популяции в непрерывной культуре.— В кн.: Управляемый биосинтез и биофизика популяции: [Тезисы докладов к II Всесоюзному совещанию]. Красноярск, 1969, с. 173—174.

2. *Нестеров Б. Ф., Вершков Д. С., Литвиненко Л. А., Сидоров Е. А.* Воздействие на скорость роста микроорганизмов в режиме проточного культивирования на аппаратах АНКУМ-2.— В кн.: Тезисы докладов к III Всесоюзному совещанию «Управление биосинтезом микроорганизмов». Красноярск, 1973, с. 288—289.

3. *Monod I.* La technique de culture continue. Theorie et applications.— Ann. Inst. Pasteur, 1950, vol. 79, N 2, p. 390—404.

4. *Иерусалимский Н. Д.* Основы физиологии микробов. М.: Изд-во АН СССР, 1963. 238 с.

5. *Печуркин Н. С., Терсков И. А.* Анализ кинетики роста и эволюции микробных популяций. Новосибирск: Наука, 1975.

6. *Никитин В. А., Шкидченко А. Н.* Исследование ядерно-магнитным резонансом спинового эха фракций подвижной воды как одной из физиологических характеристик роста дрожжей.— В кн.: 5-й съезд Всесоюзного микробиологического общества: [Тезисы докладов]. Ереван, 1975, с. 51—52.

7. *Аксенов С. И., Никитин В. А., Шкидченко А. Н., Кудрявцев А. А.* Исследование лиофилизированной биомассы дрожжей *Candida utilis*, взятых на разных стадиях культивирования, методом спинового эха ЯМР.— Микробиология, 1975, т. 44, вып. 3, с. 546—551.

8. *Schulze K. L.* The effect of phosphate supply on the rate of growth and fat formation in yeasts.— Appl. Microbiol., 1956, vol. 4, N 4, p. 207—210.

9. *Хмель И. А., Иерусалимский Н. Д.* Влияние аэрации на рост *Az. vinelandii* в проточной культуре.— Микробиология, 1967, т. 34, вып. 4, с. 632—636.

10. *Mateles R. I., Battat E.* Continuons culture used for media optimization.— Appl. Microbiol., 1974, vol. 28, N 6, p. 901—905.

11. *Ueda Tetsuo, Terayama Kaznyuki, Kurichara Kenzo, Kobatake Yonosuke.* Threshold phenomena in chemoreception and taxis in slime mold Physarum polycephalum.— J. Gen. Physiol., 1975, vol. 65, N 2, p. 223—230.

12. *Шкидченко А. Н., Никитин В. А.* Автоселекция дрожжей *Candida utilis* в хемостатной культуре.— Микробиология, 1975, т. 44, вып. 4, с. 676—681.

13. *Никитин В. А., Шкидченко А. Н.* Исследование зависимости величины фракции подвижной воды дрожжей *Candida utilis* от содержания фосфора в клетках.— Прикладная биохимия и микробиология, 1975, т. 11, вып. 4, с. 495—499.

14. *Tempest D. W.* The place of continuous culture in microbial research.— In: Advances in microbial Physiology, 1970, vol. 4, p. 223—251.

15. *Эгамбердиев Н. Б., Золотилина Г. Д., Умарова Р. К.* Автоселекция промышленно-ценных мутанов пивоваренных дрожжей.— В кн.: Теория и практика непрерывного культивирования микроорганизмов: [Тезисы докладов на II Всесоюзном совещании]. М., 1978, с. 70—71.

16. *Печуркин Н. С., Терсков И. А.* Автоселекционные процессы в непрерывной культуре микроорганизмов. Новосибирск, Наука, 1973. 64 с.

17. *Шкидченко А. Н., Гурина Л. В., Чибисова Л. С.* и др. Физиолого-биохимические изменения дрожжей *Candida tropicalis* при культивировании в режиме аутотермостата.— Микробиология, 1974, т. 43, вып. 2, с. 276—281.

18. *Печуркин Н. С., Шкидченко А. Н.* Явление аутостабилизации факторов, ограничивающих рост микробных популяций в открытых системах.— Докл. АН СССР, 1976, т. 227, № 3, с. 719—721.

19. *Иерусалимский Н. Д.* Основы физиологии микробов. М.: Изд-во АН СССР, 1963. 238 с.

20. *Ellwood D. C., Hunter I. K., Longyear V. M. C.* Growth of strepto-

coccus mutans in a chemostat.— Arch. Oral. Biol., 1974, vol. 19, N 8, p. 659—663.

21. *Lepidi A. A., Anelle G., Nuti M. P.* Amino acid release in the medium by two morfologically different strains ot the same microfungus.— Agrochimia, 1973, vol. 17, N 6, p. 554—560.

22. *Saltarelli C. G.* Growth stimulation and inhibition of Candida abbicans by metabolic by-products.— Mycopathol. Mycol. Appl., 1973, vol. 51, N 1, p. 53—57.

23. *Hospodka I.* Oxygen-absorption rate-controlled feeding of substrate into aerobic microbial cultures.— Biotechn. Bioeng., 1966, vol. 8, N 1, p. 117—134.

24. *Oura Erkki.* Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast, I. Factore affecting the type of metabolism.— Ibid, 1974, vol. 16, N 9, p. 1197—1212.

25. *Шкидченко А. Н.* Динамика потребления и пороговая концентрация глюкозы при культивировании дрожжей *Candida utilis*.— Микробиология, 1975, т. 44, вып. 2, с. 228—232.

26. *Иерусалимский Н. Д., Неронова Н. М.* Количественная зависимость между концентрацией продуктов обмена и скоростью роста микроорганизмов.— Докл. АН СССР, 1965, т. 161, № 6, с. 1437—1440.

27. *Мажуль В. М., Конев С. В., Проконова Ж. В.* К вопросу о роли межклеточных контактов в регуляции функциональной активности дрожжевых клеток в суспензионной культуре.— Цитология, 1974, т. 16, вып. 8, с. 1016—1022.

28. *Trinci A. P. I., Whittaker C.* Self-inhibition of spore germination in Aspergillus nidulans.— Trans. Brit. Mycol. Soc., 1968, vol. 51, N 3—4, p. 594—596.

29. *Hodgkiss I. I., Harvey R.* Effect of carbon dioxide on the growth and sporulation of certain. Coprophilous pyrenomices.— Trans. Brit. Mycol. Soc., 1972, vol. 59, N 3, p. 409—416.

30. *Repacke R., Renashe A. C., Mayer R. D.* Regulation carbon dioxide on the growth of Streptomyces sanguis.— J. Bacteriol., 1974, vol. 117, N 2, p. 652—661.

31. *Уваров И. П., Веселов И. А., Давидов Е. П., Гололобов А. Д.* Влияние гетеротрофной фиксации CO_2 на термогенез при развитии *Candida guilliermondii* штамм НП-4 на октадекане.— Прикладная биохимия и микробиология, 1971, т. 7, вып. 1, с. 8—11.

32. *Smith M., Noble D.* Effect of oxygen and carbon dioxide on the growth of two varieties of Gaeumannomyces graminis.— Trans. Brit. Mycol. Soc., 1972, vol. 58, N 3, p. 499—506.

33. *Sargent M. L., Kaltenborn S. H.* Effect of medium composition and carbon dioxide on circadian conidiation in Neurospora.— Plant Physiol., 1972, vol. 50, N 1, p. 171—174.

34. *Walch I. H., Steward C. S.* Effect of carbon dioxide on cellulolyting activity.— Trans. Brit. Mycol. Soc., 1971, vol. 57, N 1, p. 75—80.

35. *Maclennan D. I., Pirt S. I.* Automatic control of dissolved oxygen concentration in stirred microbial cultures.— J. Gen. Microbiol., 1966, vol. 45, N 2, p. 289—302.

36. *Bandijopadhyay B., Humfrey A. E., Taguchi H.* Dinamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems.— Biotechn. Bioeng., 1967, vol. 9, N 3, p. 533—544.

37. *Шкидченко А. Н., Литвиненко Л. А.* Влияние кратковременных прекращений аэрации на рост и дыхательную активность *Torulopsis* sp.-7.— В кн.: Микробиологическая промышленность. Сб. рефер. матер., 1974, № 4, с. 5—7.

38. *Шкидченко А. Н.* Влияние углекислого газа на рост дрожжей *Candida utilis* при непрерывном культивировании в режиме хемостата.— Микробиология, 1976, т. 45, с. 67—72.

39. *Shibai Hiroshiro, Ishizaki Ayaaki, Kobayashi Kaetsu, Hirose Joshio.* Simultaneous measurement of dissolved oxygen and oxidationreduction po-

tentials in the aerobic culture.— Agr. Biol. Chim., 1974, vol. 38, N 12, p. 2407—2412.

40. *Ayaaki Ishizaki, Hirochiro Shibay, Joshio Hirose, Teruo Shiro.* Analysis of the carbon dioxide in procesis cultivation of microorganisms.— Ibid, 1973, vol. 37, N 1, p. 99—103.

41. *Шафоростова Л. Д., Иванова И. И., Иерусалимский Н. Д.* Влияние условий культивирования на рост *Bacillus megaterium* в хемостате.— Прикладная биохимия и микробиология, 1969, т. 5, вып. 5, с. 532—536.

42. *Brown C. M., Johnson B.* Influence of the concentration of glucose and galactose on the physiology of Saccharomyces cerevisiae in continuons culture.— J. Gen. Microbiol., 1970, vol. 64, N 3, p. 279—287.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ · 1980

О. Н. ОКТЯБРЬСКИЙ, Р. А. ПШЕНИЧНОВ

ИЗМЕНЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРИ ОСТАНОВКЕ РОСТА КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*

Один из важнейших физико-химических параметров, характеризующих состояние микробных культур,— окислительно-восстановительный потенциал ОВП или E_h. Показано, что главными факторами, определяющими значение ОВП, являются материал измерительного электрода, pH, содержание кислорода, концентрация химических веществ, обладающих окислительно-восстановительными свойствами [1, 2]. Считается, что в аэрируемых культурах при измерении E_h платиновым электродом его значение при неизменном pH контролируется кислородом [3].

Авторами настоящей статьи обнаружены скачки редокспотенциала в аэрируемых бактериальных культурах при остановке роста клеток *E. coli*, не зависящие от парциального давления кислорода pO_2.

В экспериментах использован прототрофный штамм *Escherichia coli*, выделенный из гетерогенной производственной популяции М-17. Бактерии выращивали на синтетической среде М-9 [4] следующего состава, г/л дистиллированной воды: $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ — 15,13; KH_2PO_4 — 3; NaCl — 0,5, содержащей 10^{-3} М $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и 10^{-4} М $CaCl_2$. Глюкоза (исходная концентрация 100 г/л) и хлористый аммоний (исходная концентрация 40 г/л) вводили в среду импульсами по 0,25 мл до достижения необходимой концентрации.

Периодическое и непрерывное культивирование производили в аппаратах непрерывного культивирования микроорганизмов АНКУМ-2 (СКБ БП АН СССР, г. Пущино-на-Оке). Скорость оборотов мешалки составляла 500 об/мин, аэрация — 0,5 л/мин, объем культуры — 1 л, температура — 37 °С; pH, равный 7,0, поддерживали автоматически титрованием 2N NaOH. Оптическую плотность суспензии измеряли непрерывно при помощи датчика оптической плотности ДОП 1М (СКБ БП) и в периодически отбираемых из ферментера пробах на приборе ФЭК-56 ПМ (светофильтр № 9). Парциальное давление кислорода измеряли полярографическим способом при помощи мем-

бранного платинового электрода. Оптическую плотность, pH, pO_2, регистрировали при помощи многоканального электронного самописца КСП-4. Непрерывное измерение и регистрацию E_h в ферментере производили при помощи измерительного платинового гладкого электрода ЭПВ-1, вспомогательного хлорсеребряного электрода ЭВЛ-1М3, прибора pH-121 и электронного самописца EZ 7 (ЧССР).

Результаты культивирования бактерий в периодическом режиме показаны на рис. 1. Лимитирующим компонентом среды в этих опытах была глюкоза, которую добавляли в среду ступенчато, после каждой остановки роста, регистрируемой ДОП 1М. Каждый раз при остановке роста наблюдали скачок редокспотенциала (см. рис. 1). Скачки E_h происходили на фоне общего снижения редокспотенциала от +65 до —7 мв. Величина падения потенциала в момент остановки роста при данных условиях эксперимента не зависела от плотности культуры и составляла 20,8±0,8 мв.

Подробные профили скачков потенциала, записанные на высокочувствительном потенциометре EZ7 (рис. 2), показывают, что падение редокспотенциала культуры начинается сразу после остановки роста и доходит до максимума через 10—12 мин. Если в среду не подается лимитирующий субстрат (см. рис. 2, *в*), то фаза крутого падения E_h сменяется фазой постепенного возвращения его к первоначальному значению. Продолжительность этой фазы составляет около 60 мин.

Если лимитирующий субстрат (в данном случае глюкоза) подается в среду, то начинается быстрое выравнивание E_h, совпадающее с возобновлением роста бактерий (см. рис. 2, *б*). Культура быстро реагирует на добавление субстрата: среднее время, проходящее от момента импульсного добавления раствора глюкозы до начала восстановления E_h, составляет 52 сек. Если глюкоза добавляется в среду после восстановления E_h, то культура возобновляет рост, однако заметного изменения редокспотенциала при этом не наблюдается (см. рис. 2, *в*).

Профиль скачка ОПВ меняется не только в зависимости от времени подачи субстрата, но и от состава среды. Например, увеличение концентрации магния и кальция приводит к выявлению дополнительных деталей на профиле (см. рис. 2, *а*).

Аналогичные изменения E_h в растущей периодической культуре *E. coli* наблюдали в случае лимитирования роста по азоту. Остановка роста бактериальной культуры при этом также сопровождалась скачком редокспотенциала по величине и профилю, не отличающимся от приведенных выше.

Результаты опытов с выращиванием бактерий в проточной культуре представлены на рис. 3. В этих экспериментах среда М-9 с глюкозой подавалась в ферментер непрерывно со скоростью протока 0,5. Азот (как лимитирующий компонент) в виде раствора NH_4Cl подавался в ферментер автоматически импуль-

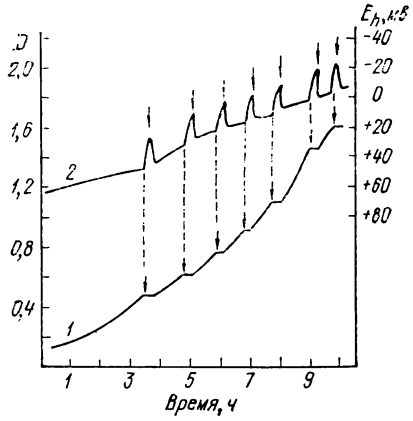


Рис. 1. Изменение ОВП среды в периодической культуре *E. coli*.

1 — оптическая плотность, *2* — окислительно-восстановительный потенциал. Стрелки на кривой *1* указывают на момент остановки роста, на кривой *2* — момент добавления субстрата.

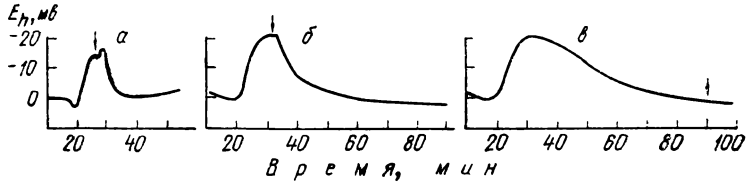


Рис. 2. Профили скачка ОВП среды при остановке роста бактериальных клеток.

а — питательная среда М-9, содержащая двойное количество Mg^{++} и Ca^{++}; *б*, *в* — стандартная среда М-9. Стрелки указывают на момент добавления глюкозы в среду.

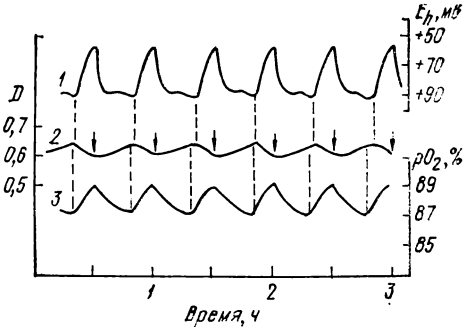


Рис. 3. Изменения ОВП в проточной культуре *E. coli*.

1 — окислительно-восстановительный потенциал, *2* — оптическая плотность культуры, *3* — парциальное давление кислорода.

сами в ответ на снижение плотности культуры ниже заданного уровня (в данном случае 0,6 единицы оптической плотности).

При культивировании в таком режиме наблюдали периодические колебания плотности бактериальной культуры в ферментере, сопровождающиеся скачкообразными колебаниями редокспотенциала с той же частотой, что и колебания плотности. Падение E_h начиналось сразу после исчерпания лимитирующего субстрата. Этот момент фиксировался по снижению плотности культуры вследствие вымывания ее из ферментера глюкозосолевым раствором, а также по падению редокспотенциала. Это падение продолжалось до момента достижения популяцией заданного уровня плотности. При этом, как указывалось, в среду автоматически поступал раствор NH_4Cl, культура возобновляла рост, плотность ее росла, одновременно E_h начинал возвращаться к исходному уровню.

Непрерывное измерение парциального давления кислорода показало, что в момент остановки роста происходило небольшое повышение pO_2. После добавления лимитирующего субстрата его значение возвращалось к исходному уровню.

Если рост останавливался вследствие исчерпания в среде магния или кальция, то в этом случае скачок E_h не наблюдался.

Таким образом, непрерывная регистрация E_h в периодической и проточной культуре *E. coli,* растущей на синтетической среде, позволила выявить скачки окислительно-восстановительного потенциала, возникавшие всякий раз при остановке роста бактерий вследствие исчерпания глюкозы или азота. Явление в данных условиях обладает абсолютной воспроизводимостью. Максимальная величина скачка ОВП, зарегистрированная нами, достигала 180 мв.

Обширный материал по изменению E_h при культивировании различных видов микробов собрала И. Л. Работнова [1]. Литературные и собственные данные автора показывают, что рост микробных культур, как правило, сопровождается изменением E_h. В основном эти изменения могут быть объяснены уменьшением парциального давления кислорода (вследствие повышения плотности биомассы в неаэрируемых средах) и колебанием pH.

Наблюдавшиеся нами скачки потенциала происходили при неизменном pH и не зависели от pO_2. Так, известно, что ОВП, измеряемый платиновым электродом, при повышении pO_2 также повышается. Другими словами, E_h приобретает положительное значение. В наших опытах (см. рис. 3) увеличение pO_2 при остановке роста бактерий сопровождалось резким снижением ОВП в область отрицательных значений. Другое важное отличие наблюдавшихся нами изменений ОВП от описанных ранее заключается в различии временны́х масштабов явления. Наиболее близкое к описанному нами изменение E_h в виде скачка обнаружил Хьювитт в культуре *Z. Cysodeikticus* при воздейст-

вии на растущую культуру лизоцимом, но в большинстве описанных ранее случаев [1] изменение ОВП происходило плавно в течение нескольких часов и даже дней. Зарегистрированное нами снижение потенциала длилось в течение 10 мин., общая длительность обратимого изменения ОВП около 1 ч.

Обнаруженное явление представляет интерес для специалистов в области физиологии и биофизики бактерий как при исследовании причин, его вызывающих, так и при практическом использовании. Применение сравнительно простого оборудования для непрерывной регистрации E_h позволяет с высокой точностью определить момент окончания роста и перехода культуры в стационарную фазу.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Работнова И. Л.* Роль физико-химических условий (pH и rH_2) в жизнедеятельности микроорганизмов. М.: Изд-во АН СССР, 1957. 275 с.
2. *Перт Д. С.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. 332 с.
3. *Балакирева Л. М., Кантере В. М., Работнова И. Л.* Определение окислительно-восстановительного потенциала в культуре *C. utilis*.— Микробиология, 1971, т. 30, с. 740—745.
4. Сборник методик по генетике микроорганизмов/Под ред. Р. Клауса и У. Хейса. М.: Медицина, 1970. 248 с.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ · 1980

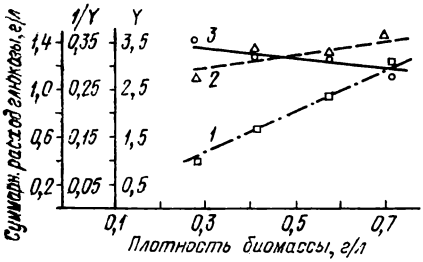
А. Г. ТКАЧЕНКО, О. Н. ОКТЯБРЬСКИЙ

ЭКОНОМИЧЕСКИЙ КОЭФФИЦИЕНТ УТИЛИЗАЦИИ СУБСТРАТА (ГЛЮКОЗЫ) В БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ РАЗНОЙ ПЛОТНОСТИ

Дальнейшее развитие микробиологической промышленности во многом определяется достижением сверхскоростей роста и воспроизведением популяций высокой плотности. Однако еще далеко не все условия и особенности этих сложных и филигранных процессов достаточно исследованы и описаны в литературе. Несмотря на отдельные успешные эксперименты, стабильное воспроизведение сверхплотных популяций бактерий в условиях производства остается пока трудно достижимой целью.

По общему мнению, достаточный, но не избыточный поток субстрата с полной его утилизацией — обязательное условие такого процесса. Вместе с тем до сих пор нет единого мнения об экономическом коэффициенте (расходе субстрата на единицу веса синтезируемой биомассы) на разных фазах роста культур и при различных ее плотностях.

Нами в модифицированных аппаратах АНКУМ-2 были воспроизведены опыты с выращиванием *E. coli* производственного штамма М-17 в минимальной синтетической среде М-9 [1], состав и основные физико-химические параметры которой контролировались и коррегировались в процессе культивирования бактерий. На протяжении трех суток в ферментере с полезным объемом 1 л, циклами по 8—12 ч воспроизводились популяции со стабильной плотностью, равной 0,28; 0,42; 0,56; 0,72 г сухой биомассы в одном литре среды. При этом температурный режим, pH среды были автоматически стабилизированы на уровне 37 °С и 7,0. Окислительно-восстановительный потенциал среды оставался неизменным при каждом режиме, скорость продувки воздуха составляла 0,5 л/мин и равномерный массообмен поддерживался одинаковой скоростью вращения мешалки, равной 500 об/мин. Плотность биомассы контролировалась по датчику оптической плотности, в регулярных выемках на ФЭК-56 с пересчетом по предварительно построенному для этого вида бактерий калибровочному графику. Однородность культур контролировалась периодическими высевами проб на среду Эндо. Куль-



Зависимость суммарного расхода субстрата, коэффициента расхода глюкозы и экономического коэффициента по глюкозе у бактериальных популяций от их плотности.

1 — суммарный расход субстрата (глюкозы), г/ч; *2* — коэффициент расхода глюкозы на рост, г глюкозы/г сухой биомассы; *3* — экономический коэффициент, г сухой биомассы/г глюкозы.

тура росла при скорости протока $\simeq 0{,}5$, вне лимита по калию, натрию, фосфору и азоту; остаточные концентрации последнего в сбрасываемой среде колебались в пределах 0,04—0,14 г NH_4 на 1 л среды. Подачу 1 %-го раствора глюкозы осуществляли в лимитирующем режиме, до отсутствия ее в вытекающей из ферментера среде. Расход глюкозы автоматически регистрировали.

При такой постановке опыта определение экономического коэффициента сводилось к ряду простых арифметических расчетов.

Пример. Первый этап охватывал первые 11 ч опыта. В этот период плотность культуры по ФЭКу колебалась в пределах 1,01—1,05 при $M=1{,}03$. При коэффициенте перевода в сухую биомассу, равном 0,7, концентрация биомассы составляла $1{,}03\times0{,}7=0{,}72$ г сухого веса на 1 л культуры. Суммарный расход глюкозы на поддержание и рост культуры составил 8054 имп, что при разовой дозе 0,25 мл равнялось 1233 мл. Исходя из 1 %-й концентрации раствора глюкозы, ее суммарный расход за 10 ч составил 12,33 г или 1,23 г/ч. Учитывая высокую физиологическую активность культуры, умеренную ее концентрацию и $\mu=0{,}474$ ч$^{-1}$, можно полагать, что основной расход субстрата должен быть отнесен на рост, а не на поддержание культуры. Общий прирост биомассы составил 0,474 ч$^{-1}$, что при плотности ее 0,72 г/л равно 0,341 г. Отсюда коэффициент утилизации глюкозы на рост $У$* равен 3,407 г на 1 г сухой биомассы, а экономический коэффициент $\left(\frac{1}{У}\right)$ составил 0,277 г сухой биомассы на 1 г глюкозы. Таким же образом рассчитывались эти показатели и для других стационарных режимов с плотностями биомассы 0,56; 0,42 и 0,28 г сухой биомассы в 1 л среды (см. рисунок).

Анализ результатов, отраженных на рисунке, убеждает в том, что суммарный расход глюкозы на рост и поддержание культуры находится в прямой зависимости от плотности бакте-

* Условные обозначения коэффициентов приняты по монографии Н. С. Печуркина, И. А. Терскова [2].

риальных популяций. Аналогичным образом меняется расход глюкозы на синтез единицы биомассы. Естественно, что в обратно пропорциональной зависимости к расходу глюкозы находится показатель экономического коэффициента, отражающий синтез сухого белка на 1 г субстрата (глюкозы).

Два последних показателя ($У$ и $\frac{1}{У}$) заставляют высказать обоснованное заключение о том, что расход субстрата на синтез единицы биомассы в популяциях разной плотности неодинаков; он ниже при малой концентрации бактерий и значительно выше для популяций с высокой плотностью. Наблюдаемая разница может быть объяснена реализацией клетками различных, более и менее экономичных, путей метаболизма, что, в частности, может определяться неодинаковой концентрацией растворенного кислорода и накоплением в среде аутометаболитов, вызывающих кооперативные сдвиги в ферментных системах клеток [3—5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Сборник методик по генетике микроорганизмов/Под ред. Р. Клауса и У. Хейса. Перев. с англ. М.: Медицина, 1970, с. 248.

2. *Печуркин Н. С., Терсков И. А.* Автоселекционные процессы в непрерывной культуре микроорганизмов. Новосибирск: Наука, 1973. 190 с.

3. *Сысоев О. В., Раев А. Б., Коробов В. П.* Об активности некоторых ферментов энергетического обмена при развитии *E. coli* в различных условиях роста.— В кн.: Экология и популяционная генетика микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1975, с. 116—121.

4. *Пшеничнов Р. А., Колотов В. М., Коробов В. П. и др.* О существовании специфических факторов, контролирующих развитие микробной популяции: Первые наблюдения по выявлению фактора, лимитирующего накопление биомассы в культурах *E. coli* штамма М-17.— Экология, 1973, № 3, с. 5—13.

5. *Пшеничнов Р. А., Колотов В. М., Барихин С. Я.* и др. О существовании системы специфической аутометаболической регуляции развития микробных популяций: Первые наблюдения по выявлению аутофактора, стимулирующего развитие культур.— Экология, 1975, № 3, с. 42—50.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ · 1980

Р. А. ПШЕНИЧНОВ, В. М. КОЛОТОВ, О. В. СЫСОЕВ

ВЛИЯНИЕ КОРРЕКЦИИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РАЗВИТИЕ ПОПУЛЯЦИИ *ESCHERICHIA COLI* М-17 И ПЕРЕСТРОЙКУ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ЭНЕРГООБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПРОЦЕССОВ

Известно, что рост микробной популяции при периодическом культивировании сопровождается изменением среды обитания: исчерпанием питательных и энергетических источников, накоплением в среде продуктов метаболизма и аутолиза клеток, сдвигом окислительно-восстановительного потенциала и величины pH [1]. Влияние таких неспецифических факторов среды обитания ведет к снижению скорости роста бактериальных культур и существенным метаболическим перестройкам.

Однако регуляция развития бактериальных популяций перечисленными общими факторами существует, по-видимому, одновременно со специальной системой контроля роста [2, 3]. Продуцируемые клетками на определенных фазах развития экстрацеллюлярные метаболические «сигналы» оказывают выраженное действие на скорость размножения и физиологическое состояние клеток. Это проявляется, в частности, в определенных фазовых перестройках внутриклеточных ферментных систем, связанных с генерацией энергии [4, 5].

Существенный интерес представляет изучение скорости развития и биохимических перестроек бактериальной культуры, определяемых действием специфических регуляторных аутометаболитов, без влияния изменений общих факторов среды. С этой целью нами были проведены предварительные эксперименты по изучению развития и активности ферментативных систем, ответственных за образование энергии, на разных этапах роста культуры *E. coli* М-17 в условиях некоррегируемой и коррегируемой по основным параметрам среды обитания.

Культуру *E. coli* штамм М-17 выращивали в периодическом режиме в аппарате культивирования микроорганизмов «АНКУМ-2» (СКБ БП АН СССР, г. Пущино-на-Оке). Для культивирования использовали глюкозо-солевую среду М-9 [6]. Простота состава среды позволяла легко контролировать и коррегировать ее отдельные компоненты.

Опыт проводили в двух вариантах: в первом культивирование проводили без коррекции среды, но с регистрацией динамики следующих параметров: а) уровня глюкозы в среде, б) pH, в) доли растворенного в среде кислорода, г) eH, д) оптической плотности культуры, е) концентрации клеток; во втором проводили оперативную коррекцию среды по указанным параметрам (за исключением eH и оптической плотности). При этом концентрацию глюкозы поддерживали на исходном уровне; pH — на уровне 7,0; уровень насыщения кислородом среды — 90 %. Этот вариант позволил в основном исключить влияние неспецифических факторов среды на развитие культуры.

Концентрацию глюкозы в среде определяли по методу Райциса и Устиновой с о-толуидиновым реактивом [7]. Концентрацию клеток определяли через каждый час подсчетом в камере Горяева по общепринятой методике. Начальная концентрация клеток во всех опытах составляла 100 млн/мл, объем среды в ферментере — 2,0 л.

При каждом способе культивирования на экспоненциальной, стационарной фазах и фазе отмирания проводили выемки культуральной жидкости объемом 500 мл для последующего биохимического изучения. Клетки осаждали центрифугированием при 2500 *g* в течение 30 мин, промывали 0,85 %-м раствором NaCl и разрушали растиранием с кварцевым песком. Экстракцию белков проводили на холоде 0,85 %-м раствором NaCl, содержащим 0,1 %-ный раствор тритона *X*-100. Экстракты отделяли от остатков клеток центрифугированием при 4500 *g* на ЦЛР-1 в течение 30 мин. В надосадочной жидкости спектрофотометрическим методом на приборе UV VIS Specord определяли активность гексокиназы (Гк) [8], лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [9], малатдегидрогеназы (МДГ) [10] и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [11]. В качестве контроля во всех случаях использовали реакционную смесь без соответствующего субстрата. Активность ферментов рассчитывали на 1 мг белка экстрактов. Белок в экстрактах определяли по Лоури [12].

Динамика роста культуры *E. coli* M-17 и изменения параметров среды в каждом варианте опыта представлены на рис. 1.

Рост культуры на некоррегируемой среде (см. рис. 1, *а*) совпадал с обычной *S*-образной кривой. Максимум численности достигался к шести часам и не превышал 1,9 млрд/мл. Наступление стационарной фазы совпадало с падением содержания глюкозы в среде до нулевого уровня.

Рост *E. coli* M-17 в условиях коррекции среды в целом также описывался *S*-образной кривой (см. рис. 1, *б*). Однако кинетика роста культуры имела другой характер. Максимальная удельная скорость роста (расчет по оптической плотности культуральной жидкости) возрастала в три раза, максимальная концентрация клеток равнялась 4 млрд/мл, т. е. увеличивалась в 2,1 раза. Интересно отметить, что сдвиги eH были гораздо

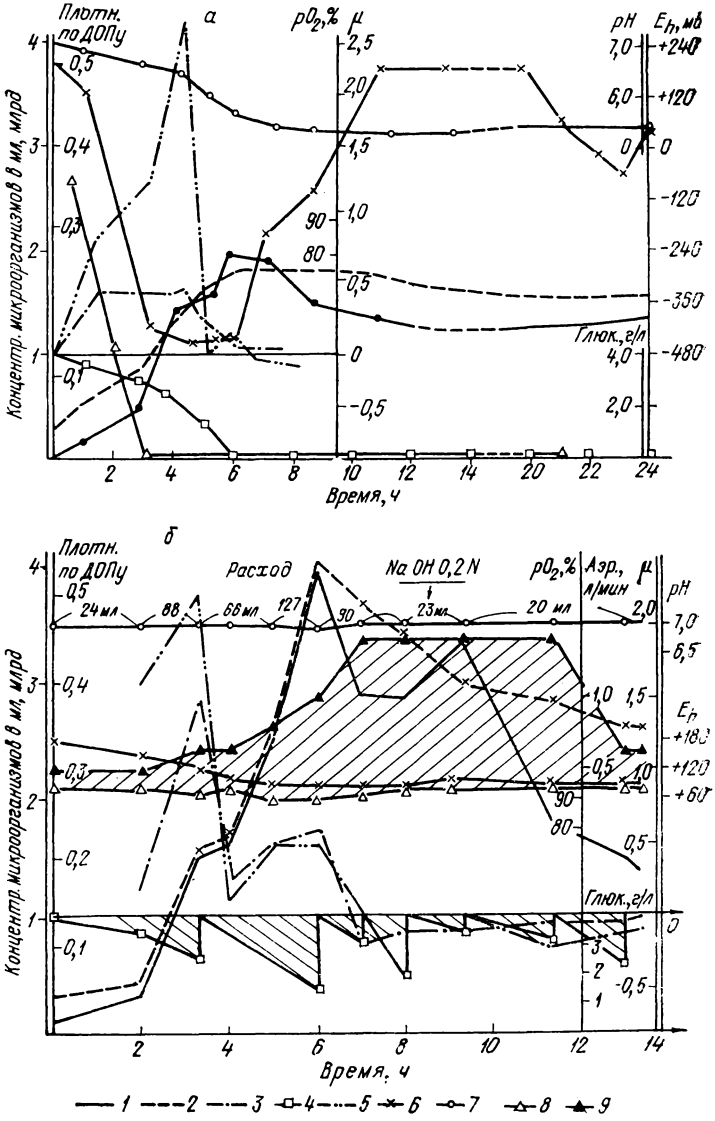


Рис. 1. Динамика развития *E. coli* М-17 в контролируемой среде М-9: в некоррегируемой (*а*) и коррегируемой (*б*).

1 — концентрация микроорганизмов, *2* — плотность по ДОПу, *3* — μ по ДОПу, *4* — глюкоза, *5* — μ по численности, *6* — E_h, *7* — pH, *8* — pO_2, *9* — аэрация.

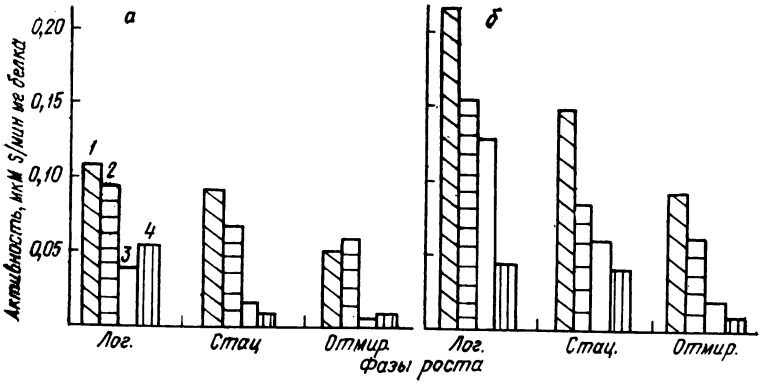


Рис. 2. Активность Гк, ЛДГ, МДГ и СДГ в клеточных экстрактах культуры *E. coli* М-17, развивавшейся на среде М-9 без коррекции (*а*) и с коррекцией (*б*) среды.

1 — Гк, *2* — ЛДГ, *3* — МДГ, *4* — СДГ.
Активность СДГ выражали в мкМ · 10^{-2} *S*/мин · мг белка.

менее значительны, что связано, по-видимому, с поддержанием кислорода на постоянном уровне. Закисление среды было пропорционально скорости роста культуры, на что указывал объем щелочи, расходуемой на коррекцию pH.

Результаты определения ферментативной активности представлены на рис. 2.

При анализе результатов, полученных в каждом варианте опыта, обращают на себя внимание различия в активности ферментов в зависимости от фазы роста культуры. Активность всех изученных ферментов снижалась при переходе к последующей фазе развития. Так, по сравнению с лог-фазой в фазе отмирания активность Гк и ЛДГ при некоррегируемом росте культуры падала в 2,1 и 1,5 раза соответственно, а в случае коррекции среды — в 2,5 и в 2,3 раза.

Аналогично этому активность МДГ и СДГ в первом случае уменьшалась в 10,1 и в 2,6 раза; в 5,7 и в 2,9 раза — во втором. В последнем случае выявлена также более высокая активность всех изученных ферментов, особенно МДГ и СДГ, что, вероятно, связано с усилением окислительного превращения пирувата. Такое повышение активности ферментов совпадает с резким увеличением удельной скорости роста при коррекции среды и в определенной степени зависит от повышенного уровня глюкозы и растворенного в среде кислорода.

Изучение динамики активности систем, связанных с генерацией энергии, показало, что в каждом из опытов обнаруживается тенденция к снижению роли дыхательных ферментов (МДГ и СДГ) и соответственно к возрастанию вклада гликолиза в энергетику клетки по мере развития культуры. Об этом,

Динамика соотношений активности ферментов в экстрактах культуры *E. coli* М-17

Условия культивирования	Лог-фаза	Стационарная фаза	Фаза отмирания
Активность ЛДГ/активность Гк			
Без коррекции	0,85	0,89	1,17
С коррекцией	0,66	0,65	0,72
Активность ЛДГ/активность МДГ			
Без коррекции	2,68	5,33	17,62
С коррекцией	1,29	1,46	3,20

в частности, свидетельствует динамика соотношений: активность ЛДГ/активность Гк и активность ЛДГ/активность МДГ (см. таблицу). В каждом из вариантов к фазе отмирания возрастала степень завершенности гликолиза.

Анализ представленных материалов показывает, что фазовость развития микробной популяции в условиях периодического культивирования не является следствием влияния только общих факторов среды обитания. Изменения этих факторов или их коррекция могут внести лишь количественные поправки в динамику роста микробов. Отсюда вытекает вывод о наличии иных причин, определяющих этот процесс. Ими могут быть, с одной стороны, продукты метаболизма и клеточного распада, а с другой,— существование специфической аутометаболической системы регуляции развития микробной популяции.

Характерным свойством развивающихся бактериальных культур является, по-видимому, фазовая смена активности некоторых ферментных систем. При этом (независимо от условий культивирования) на поздних этапах роста культуры возрастает вклад гликолиза в энергообеспечение микробных клеток. Естественно допустить, что такая перестройка энергетических процессов может быть связана с действием аутометаболической системы регуляции развития культуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Работнова И. Л.* Роль физико-химических условий (pH и rH_2) в жизнедеятельности микроорганизмов. М.: Изд-во АН СССР, 1957. 275 с.

2. *Пшеничнов Р. А., Колотов В. М., Коробов В. П.* и др. О существовании специфических факторов, контролирующих развитие микробной популяции: Первые наблюдения по выявлению фактора, лимитирующего накопление биомассы в культурах *E. coli* штамма М-17.— Экология, 1973, № 3, с. 5—13.

3. *Пшеничнов Р. А., Колотов В. М., Барихин С. Я.* и др. О существовании системы специфической аутометаболической регуляции развития микробных популяций.— Экология, 1975, № 3, с. 42—50.

4. *Polakis E. S., Bartley W., Meek G. A.* Changes in the activities of respiratory enzymes during the aerobic growth of yeast on different carbon sources.— Biochem. J., 1965, vol. 97, N 1, p. 298—302.

5. *Сысоев О. В., Раев А. Б., Коробов В. П.* Об активности некоторых ферментов энергетического обмена при развитии *Escherichia coli* M-17 в различных условиях роста.— В кн.: Экология и популяционная генетика микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1975, с. 116—121.

6. Сборник методик по генетике микроорганизмов/Под ред. Р. Клауса, У. Хейса. Перев. с англ. М.: Медицина, 1970. 248 с.

7. *Райцис А. Б., Устинова А. О.* Ускоренное определение сахара в крови и спинно-мозговой жидкости толуидиновым методом.— Лабор. дело, 1965, № 1, с. 33—35.

8. *Алексахина Ю. В., Ситнина Н. Ю.* Изозимный состав гексокиназы гиалоплазмы скелетных мышц крысы.— Биол. науки, 1972, № 10, с. 28—33.

9. *Асатиани В. С.* Ферментные методы анализа. М.: Наука, 1969. 588 с.

10. *Murphey W. H., Kitto G. B.* Malate dehydrogenase from *Escherichia coli*.— In: Methods in enzymology, 1969, vol. 13, p. 145—147.

11. *Veeger C., Dervartanian D. V., Zeylemaker W. P.* Succinate dehydrogenase.— Ibid, 1969, vol. 13, p. 81—90.

12. *Lowry O. H., Rosebrough N. T., Farr A. L., Randall R. I.* Protein measurement with the Folin phenol reagent.— J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, N 1, p. 265—275.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ · 1980

Ю. Ф. МАСЛОВ, Н. Н. КУЗНЕЦОВА, В. П. КОРОБОВ

ФОРМИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО ФОНА СРЕДЫ ПРИ РАЗВИТИИ ПОПУЛЯЦИИ *ESCHERICHIA COLI* М-17 НА ПОЛНОЦЕННОЙ И СИНТЕТИЧЕСКОЙ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Рассмотрение усредненных кривых роста микробных культур в периодических условиях позволяет характеризовать отдельные этапы развития бактериальных популяций как кооперативные процессы, охватывающие в определенные периоды времени бóльшую часть клеток. Следствие таких кооперативных сдвигов — резкое увеличение скорости развития культуры при переходе от стадии скрытого развития к логарифмическому росту и значительное снижение количества микроорганизмов в стадии отмирания.

Развитие кооперативных процессов в биологических системах обусловлено появлением в среде каких-то информативных сигналов, индуцирующих тот или иной фазовый переход [1]. Сигналами, выполняющими подобную функцию в бактериальной культуре, могут быть продуцируемые в среду метаболиты, обладающие, по данным Р. А. Пшеничнова с соавторами [2, 3], специфическим регуляторным действием. Первые наблюдения указывают на пептидную природу этих соединений [4]. В то же время имеются данные о том, что некоторые аминокислоты и низкомолекулярные пептиды [5] среды обитания бактерий также могут обладать действием, контролирующим развитие популяции микроорганизмов.

Формирование определенного аминокислотного фона среды обитания, возможно, является одним из звеньев системы регуляции развития популяции микроорганизмов. Отсюда изучение внеклеточного пула аминокислот на разных фазах развития бактериальной культуры представляет интерес как для выяснения механизмов функционирования регуляторных систем, так и для разработки подходов к направленному воздействию на развитие бактериальных популяций путем соответствующей коррекции питательных сред.

Нами проведено изучение аминокислотного фона среды обитания при выращивании микроорганизмов на разных средах — полноценной (МПБ) и синтетической (М-9) — и предпринята

экспериментальная оценка влияния искусственно создаваемого фона аминокислот на интенсивность развития микробной популяции.

Исследования проводили на прототрофном штамме *E. coli* М-17, используемом в Пермском НИИ вакцин и сывороток для производства колибактерина. Для засева на МПБ использовали суточную культуру в дозе 25 млн/мл; для засева на М-9 [6] использовали культуру, дважды пассированную через эту среду; засевная доза 100 млн/мн. Объем среды 0,5 л. Бактерии выращивали в конических колбах без аэрации при температуре 37 °С.

Рост бактерий контролировали путем подсчета числа клеток в фазовом контрасте в камере Горяева. При выходе культуры на определенные фазы развития (лаг-, лог-, стационарную, отмирания) отбирали пробы и фильтровали через мембранные фильтры «Synpor» фирмы «Chamapol» с диаметром пор 0,17 мк. Белки фильтратов осаждали 70 %-м этанолом.

Содержание аминокислот в безбелковых фильтратах определяли двумя методами. Использовали ионообменную тонкослойную хроматографию в фиксированном слое катионита «Фиксион» (ВНР). На предварительно уравновешенную в цитратном буфере (pH 3,28) ионообменную пластину наносили пробы и смесь свидетелей аминокислот. Разгонку проводили в 0,4 М Na-цитратном буфере (pH 3,3). Пятна аминокислот проявляли нингидриновым реактивом с последующим выдерживанием пластин в темноте при комнатной температуре в течение суток. Для количественной оценки хроматограммы переснимали на сверхконтрастные фотопластинки (светочувствительность 5,5 ед.) и сканировали на микрофотометре У—II (Карл Цейс; ГДР).

Кроме того, содержание аминокислот изучали на автоматическом анализаторе ААА-881 «Mikrotechna» (ЧССР). Образцы проб в этом случае концентрировали на вакуумном испарителе «Rotadest» (ВНР).

Разделение кислых и нейтральных аминокислот проводили на колонке 8×620 мм в 0,38N Li-цитратном буфере (pH 2,8 и 4,15) при температуре 50 °С. Основные аминокислоты разделяли в колонке 8×270 мм в 0,38N Na-цитратном буфере (pH 4,26 и 5,28) при температуре 30 °С.

Концентрацию отдельных аминокислот рассчитывали по площадям пиков хроматоденситограмм соответствующих аминокислот контрольной смеси известной концентрации и образца [7].

Развитие культуры *E. coli* М-17 на МПБ сопровождается характерным изменением содержания свободных аминокислот в среде (табл. 1). На первых этапах роста в культуральной жидкости обнаруживается до 13 аминокислот, концентрация которых, однако, значительно варьирует. По мере развития популяции бóльшая часть аминокислот интенсивно поглощается клетками вплоть до полного исчезновения метионина, серина

Таблица 1

Содержание аминокислот в фильтратах МПБ по фазам роста популяции *E. coli* М-17*, мкМ/мл

Аминокислота	Фаза развития бактериальной культуры		
	Начало лог-фазы	Лог-фаза	Стационарная
Аспарагиновая	6,20	3,10	0,35
Лейцин	30,90	19,68	10,60
Пролин	0,95	0,85	0,44
Тирозин	2,28	1,80	1,23
α-аминомасляная	2,79	1,92	1,50
Триптофан	0,33	0,11	0,09
Аланин	12,48	21,48	13,20
Гистидин	63,76	83,90	94,24
Орнитин	0,81	1,10	17,90
Лизин	60,81	58,20	64,40
Серин	0,13	—	—
Аргинин	9,70	8,11	—
Метионин	2,05	—	—

* Содержания аминокислот изучали на приборе ААА-881.

Таблица 2

Содержание аминокислот в культуральной жидкости *E. coli* М-17 при развитии на среде М-9*, мкМ/мл

Аминокислота	Фаза развития бактериальной культуры**			
	Начало лог-фазы	Лог-фаза	Стационарная	Отмирания
Аргинин	0,63	0,56	0,44	—
Лизин	0,74	0,42	0,25	0,18
Гистидин	0,75	0,56	0,49	0,49
Фенилаланин	0,74	0,60	0,48	0,43
Тирозин	0,66	0,54	0,46	0,39
Лейцин	0,84	0,48	0,45	0,45
Изолейцин	1,17	0,60	0,47	0,42
Метионин	0,84	0,52	0,44	0,38
Валин	0,76	0,50	0,48	0,40
α-аминомасляная	0,76	0,49	0,39	0,32
Аланин	0,78	0,60	0,52	0,52
Цистин	0,62	0,26	0,19	—
Глутаминовая	0,44	0,17	0,13	—
Серин	0,51	—	—	—
Аспарагиновая	0,60	0,30	0,28	0,26

* Содержание аминокислот изучали путем тонкослойной хроматографии на «ФИКСИОН-50×8».

** Концентрация всех аминокислот в начале лог-фазы составляла 1,25 мкМ/мл.

Таблица 3

Аминокислоты культуральной жидкости при развитии популяции *E. coli* на синтетической среде М-9

Аминокислота	Фаза развития бактериальной культуры			
	Начало лог-фазы	Лог-фаза	Стационарная	Отмирания
Гистидин	+*	+	+	+
Лейцин	+	+	+	+
Аланин	—	+	+	+
Треонин	—	+	+	+

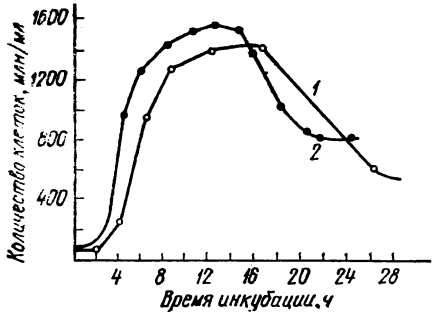
* Знак (+) означает наличие, а знак (—) — отсутствие аминокислоты.

и аргинина. Вместе с тем, концентрация некоторых аминокислот (гистидина, лизина, лейцина, аланина) на всех фазах развития культуры сохраняется на относительно высоком и достаточно постоянном (лизин) уровне, а содержание гистидина непрерывно возрастает.

Учитывая прототрофность штамма, можно предположить, что развитие популяции в условиях полноценной среды сопровождается формированием определенного аминокислотного окружения клеток, необходимого, по-видимому, для интенсивного развития бактериальной культуры. Это подтверждают результаты изучения поглощения клетками аминокислот при внесении последних в среду М-9 одновременно с инокулятом бактерий (табл. 2).

Сопоставление данных табл. 2 и табл. 1 позволяет провести аналогичное разделение аминокислот на группы по картине изменения их концентрации в среде. Важно отметить, что в данном случае выделяется группа аминокислот (гистидин, лейцин, аланин), уровень которых после частичного поглощения в течение длительного периода развития популяции остается практически постоянным. Возможно, этим аминокислотам принадлежит какая-то особая роль в поддержании развития бактериальной культуры.

В связи с этим весьма интересны результаты следующего эксперимента, в ходе которого изучено выделение клетками аминокислот в среду при культивировании *E. coli* М-17 на синтетической среде М-9 с глюкозой как единственным источником углерода. Как следует из данных табл. 3, бактерии продуцируют в среду четыре аминокислоты. Очень низкая концентрация этих соединений позволила провести лишь качественную характеристику спектра внеклеточных аминокислот. При этом обнаружено, что при переходе в фазу логарифмического роста в среде появляются гистидин и лейцин, а к концу лог-



Динамика развития культуры *E. coli* М-17 на синтетической среде М-9 (средние значения по трем опытам).
1 — контроль; *2* — среда М-9, обогащенная гистидином, лейцином, аланином и треонином.

фазы и на стационарной стадии в среде обнаруживаются также аланин и треонин.

Так как развитие культуры происходит в синтетической «голодной» среде, маловероятно предполагать в этих условиях проявление феномена «сверхсинтеза» аминокислот. Выделение в среду этих соединений, по-видимому, отражает наличие каких-то внутрипопуляционных механизмов, обеспечивающих оптимальное развитие бактериальной популяции на соответствующем этапе роста.

Результатами описанных опытов является выделение группы аминокислот, наличие которых вне клеток как в условиях полноценной, так и «голодной» среды, по-видимому, необходимо для развития популяции *E. coli* М-17.

В связи с этим казалось целесообразным использовать именно эти аминокислоты для интенсификации роста *E. coli* М-17 на синтетической среде. Действительно, одновременное внесение в среду М-9 гистидина, аланина и треонина в концентрациях, близких к обнаруженным в приведенных опытах, значительно сокращает время адаптации культуры и выход ее в фазу экспоненциального роста (см рисунок).

Таким образом, значение аминокислотного фона внеклеточной среды для развития *E. coli* М-17 наглядно демонстрируется результатами проведенных экспериментов. Возможно, наличие определенного спектра аминокислот среды необходимо для оптимального развития сообщества микроорганизмов. Однако это требует дальнейшего изучения проблемы с целью выявления уровня специфичности спектра и его роли в реализации механизмов саморегуляции развития бактериальной популяции.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Конев С. В., Аксенцев С. Д., Черницкий Е. А.* Кооперативные переходы белков в клетке. Минск: Наука и техника, 1970. 109 с.

2. *Пшеничнов Р. А., Колотов В. М., Коробов В. П.* и др. О существовании специфических факторов, контролирующих развитие микробных популяций. Сообщение I. Первые наблюдения по выявлению фактора, лимитирующего накопление биомассы в культурах *E. coli* М-17.— Экология, 1973, № 3, с. 5—13.

3. *Пшеничнов Р. А., Колотов В. М., Барихин С. Я.* и др. Микробная популяция — саморегулируемая система.— В кн.: Экология и популяционная генетика микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1975, с. 3—13.

4. *Пшеничнов Р. А., Колотов В. М., Барихин С. Я.* и др. О существовании системы специфической аутометаболической регуляции развития микробных популяций.— Экология, 1975, № 3, с. 42—50.

5. *McAnelly I. K., Speck M. L.* Amino acid content of a peptide stimulatory for Lactobacillus casei.— J. Bacteriol., 1957, vol. 73, N 5, p. 676—681.

6. Сборник методик по генетике микроорганизмов/Под ред. Р. Клауса и У. Хейса. Перев. с англ. М.: Медицина, 1970. 248 с.

7. *Козаренко Т. В.* Ионообменная хроматография аминокислот. Новосибирск: Наука, 1975. 134 с.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР • УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ · 1980

А. А. ШЕСТАКОВА

ВЗАИМОСВЯЗЬ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА МАКРОЭРГИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ С ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМ УРОВНЕМ ДНК И РНК ПРИ РАЗВИТИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Проблема регуляции развития популяций высших организмов широко освещена в трудах С. С. Шварца [1]. Особое значение в регуляции численности популяций отводится в этих работах специфическим метаболитам. Для микроорганизмов наличие таких систем регуляции показано в работах ряда авторов [2—4], которые рассматривают микробную популяцию как систему, обладающую элементами функциональной организации. Саморегуляция численности такой системы осуществляется, по-видимому, соединениями, экскретируемыми в среду обитания.

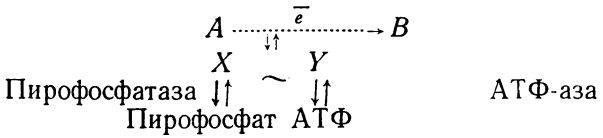
В связи с этим возникает вопрос о путях реализации действия этих регуляторных факторов. Можно предположить, что их влияние направлено на контроль жизненно важных реакций, обеспечивающих энергией основные биосинтетические процессы — синтез нуклеиновых кислот, белков и других биополимеров бактериальной клетки. Энергообеспеченность этих процессов зависит от уровня внутриклеточных макроэргических соединений.

В последнее время в микробных клетках наряду с АТФ важная роль отводится полифосфатам как источнику легкоутилизируемой энергии, в частности пирофосфату, необратимый гидролиз которого сопровождается выделением энергии, эквивалентной запасу энергии макроэргической связи АТФ.

В 1957 г. Гофман-Остенгоф, а затем в 1962 г. Корнберг (цит. по И. С. Кулаеву [5]) выдвинули гипотезу с том, что пирофосфат является побочным продуктом реакций пирофосфоролиза, протекающих при биосинтезе нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов, липидов и т. д. Эти реакции в клетке сдвинуты в сторону синтеза указанных соединений благодаря гидролизу выделяющегося пирофосфата — неорганической пирофосфатазой. Энергия связи пирофосфата — простейшего энергетического донора — трансформируется в электрический потенциал мембран и может быть использована в метаболических процессах [5, 6].

В ряде организмов открыт синтез пирофосфата, специфически связанный с системой переноса электронов в дыхательной цепи. Пирофосфатаза в этих условиях, по-видимому, играет роль одного из ключевых ферментов в синтезе АТФ [6].

И. С. Кулаев [7] предложил следующую схему утилизации энергии пирофосфата при синтезе АТФ:



На схеме показан процесс переноса запаса энергии фосфоангидридной связи пирофосфата, но не остатка фосфорной кислоты. Включение неорганического фосфата среды идет в присутствии АДФ и АТФ-азы, что приводит к синтезу АТФ. Такое образование АТФ (за счет пирофосфатазы) не зависит от электронтранспортной цепи.

Предлагаются [8] следующие два способа выведения из реакции образовавшегося пирофосфата: 1) гидролиз пирофосфата; 2) использование пирофосфата для синтеза высокомолекулярных полифосфатов. Как вероятность второго из названных способов, И. С. Кулаевым с сотрудниками [9] предложена схема сопряжения биосинтеза РНК, ДНК и полифосфатов через промежуточное образование пирофосфата. Авторы не исключают, что синтез полифосфатов из пирофосфата может происходить за счет фосфотрансферазной реакции, осуществляемой пирофосфатазой.

В связи со всем сказанным представлялось целесообразным проследить взаимосвязь содержания ДНК и РНК с активностью функционально связанных с синтезом этих соединений ферментов — пирофосфатазы и аденозинтрифосфатазы на разных фазах развития популяции *E. coli*.

Для работы использовали суточную культуру *E. coli* М-17, которую выращивали на мясо-пептонном бульоне (МПБ) и глюкозо-минимальной среде (М-9) в колбах емкостью 800 мл при 37 °С. Засевная доза на МПБ составляла 25 млн/мл, на среде М-9 — 100 млн/мл. Культуру исследовали на фазах скрытого развития (лаг-фаза), экспоненциального роста (лог-фаза), стационарной и фазе отмирания.

Для определения активности ферментов культуру, взятую на определенной стадии развития, центрифугировали, клетки промывали 0,85 %-м раствором NaCl и растирали с кварцевым песком. Полученный белковый экстракт (содержание белка определяли по Лоури [10]) добавляли к соответствующей инкубационной среде. Состав среды для определения активно-

Динамика активности пирофосфатазы и аденозинтрифосфатазы в клетках *E. coli* при различных условиях роста, мкг фосфора/мг белка

Фермент	Среда	Фаза развития бактериальной культуры			
		лаг-фаза	лог-фаза	стационарная	отмирания
ПФ-аза	Бульон	12,0±1,4	47,6±5,4	12,6±3,8	9,8±0,6
	М-9	4,4±0,3	13,1±0,7	54,1±2,6	10,5±3,0
АТФ-аза	Бульон	10,6±0,8	15,5±3,3	10,0±3,7	9,4±1,2
	М-9	15,6±3,5	13,2±0,3	32,2±2,0	15,5±3,1

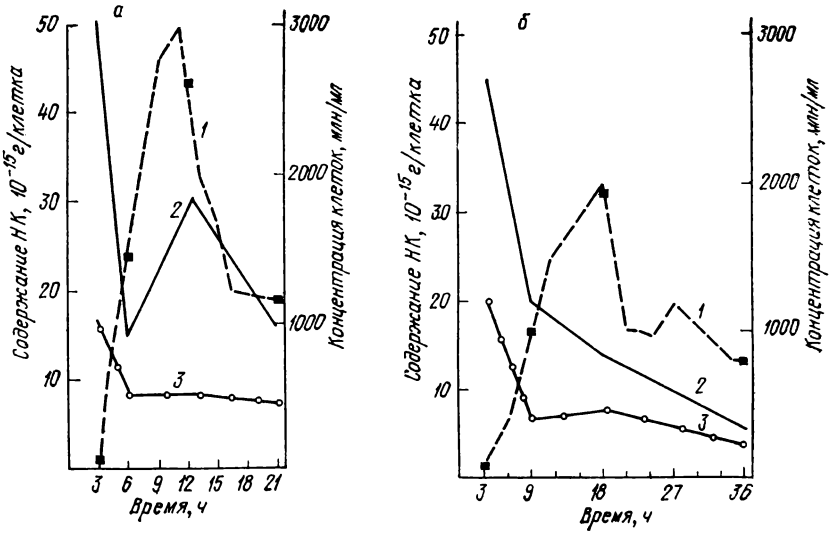
сти ПФ-азы и АТФ-азы был в основном одинаковым [9]: 0,5 М трис-буфер, pH 7,2; 0,05 М $MgCl_2$; только в первом случае среда содержала $2{,}2\times10^{-6}$ М натрий пирофосфорнокислый, а во втором — 8×10^{-6} М АТФ. Пробы выдерживали в течение 30 мин при 37 °С. Активность ферментов определяли по нарастанию содержания неорганического фосфора в пробах, количество которого определяли по методу Скулачева [11].

Для количественного определения ДНК и РНК культуру центрифугировали, клетки промывали 0,85 %-м раствором NaCl. Содержание ДНК и РНК изучали методом Шмидта — Тангаузера в модификации А. И. Коротяева и Т. П. Кроличенко [12].

В результате опытов установлено, что активность ПФ-азы и АТФ-азы меняется в зависимости от стадий развития культуры (см. таблицу и рисунок). Активность увеличивается от лаг-фазы и достигает максимума на лог-фазе при росте *E. coli* на бульоне, а на среде М-9 максимум активности ферментов приходится на стационарную фазу. Опережение максимума активности ферментов на бульоне объясняется, по-видимому, интенсификацией всех клеточных процессов на богатой питательной среде, позволяющей удвоить биомассу клетки за более короткий срок по сравнению со средой М-9. После достижения максимума активность ферментов снижается и на стадии отмирания достигает значения, которое было отмечено на лаг-фазе.

При культивировании *E. coli* на бульоне минимальное значение ПФ-азы на лаг-фазе и максимальное на лог-фазе соответствует литературным данным [5], согласно которым интенсивному синтезу биомассы *E. coli* предшествует накопление полифосфатов; с началом же активного роста культуры наблюдается потребление этих макроэргических фосфорных соединений с участием ПФ-азы. Максимальная активность ПФ-азы во всех случаях сопоставима с активностью АТФ-азы. Это свидетельствует о важной биологической роли ПФ-азы, которая у микроорганизмов участвует в широком круге реакций.

Содержание ДНК независимо от среды культивирования снижается по мере развития культуры (см. рисунок). Содер-



Динамика содержания ДНК и РНК в клетках, выращенных на бульоне (*а*) и на среде М-9 (*б*).

1 — рост культуры (квадратами показано время взятия проб), *2* — РНК, *3* — ДНК.

жание РНК более динамично меняется при росте *E. coli* на бульоне, когда от лаг-фазы к лог-фазе оно стремительно падает (клетки начинают интенсивно делиться), затем к стационарной фазе быстро растет и к фазе отмирания снижается до уровня РНК на лог-фазе. На среде М-9 содержание РНК резко снижается от стадии к стадии и на фазе отмирания достигает минимального значения. При сравнении активности ПФ-азы с содержанием РНК можно отметить, что при достижении максимума ПФ-азой на бульоне содержание РНК падает, а когда активность ПФ-азы снижается, то содержание РНК повышается. На среде М-9 максимум активности ПФ-азы также соответствует снижению содержания РНК.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод о взаимосвязи содержания нуклеиновых кислот с активностью ПФ-азы и АТФ-азы. Наличие такой взаимосвязи, по-видимому, жизненно важно для существования микроорганизмов, поскольку она проявляется в различных условиях развития бактериальной популяции.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Шварц С. С.* Метаболическая регуляция роста и развития животных на популяционном и организационном уровнях.— Изв. АН СССР, серия биол., 1972, № 6, с. 822—835.

2. *Пшеничнов Р. А., Колотов В. М., Коробов В. П.* и др. О существовании специфических факторов, контролирующих развитие микробной попу-

ляции: Первые наблюдения по выявлению фактора, лимитирующего накопление биомассы в культурах *E. coli* штамма М-17.— Экология, 1973, № 3, с. 4—13.

3. *Пшеничнов Р. А., Колотов В. М., Коробов В. П.* и др. Специфическая аутометаболическая система регуляции развития микробных сообществ.— В кн.: Управление биосинтезом микроорганизмов: [Тезисы III Всесоюзного совещания по управляемому биосинтезу и биофизике популяций]. Красноярск, 1973, с. 240—241.

4. *Пшеничнов Р. А., Колотов В. М., Барихин С. Я.* и др. Микробная популяция — саморегулируемая система.— В кн.: Экология и популяционная генетика микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1974, с. 3—13.

5. *Кулаев И. С.* Биохимия высокомолекулярных полифосфатов. М.: Изд-во МГУ, 1975. 245 с.

6. *Мансурова С. Э.* Роль неорганического пирофосфата в энергетическом обмене клетки.— В кн.: Проблемы регуляции обмена веществ у микроорганизмов. Пущино-на-Оке: Научный центр биологических исследований; Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, 1973, с. 231—243.

7. *Мансурова С. Э., Белякова Т. Н., Кулаев И. С.* Роль неорганического пирофосфата в энергетическом обмене митохондрий.— Биохимия, 1973, т. 38, вып. 1, с. 223—226.

8. *Кулаев И. С., Скрябин К. Г., Вертелецкая Н. Л.* Неорганическая пирофосфатаза субклеточных структур гриба *Endomyces magnusii*.— В кн.: Проблемы регуляции обмена веществ у микроорганизмов. Пущино-на-Оке: Научный центр биологических исследований; Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, 1973, с. 134—142.

9. *Кулаев И. С., Крашенинников А. А., Тырсин Ю. А.* Нуклеиновые кислоты, высокомолекулярные полифосфаты и некоторые ферменты полифосфатного обмена в синхронизированной культуре дрожжей *Schizosaccharmyces pombe*.— Микробиология, 1973, т. 42, вып. 4, с. 613—619.

10. *Loury O. H., Rosebrough N. F., Farr A. Z., Randall R. I.* Protein measurement with the Folin phenol reagent.- J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, N 1, p. 265—275.

11. *Скулачев В. П.* Аккумуляция энергии в клетке. М.: Наука, 1969. 440 с.

12. *Коротяев А. И., Кроличенко Т. П.* Объем генома и действительное содержание ДНК у кишечной палочки.— В кн.: Механизмы регуляции развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1977, с. 99—103.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР • УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ · 1980

В. П. КОРОБОВ, А. А. ЧУДИНОВ

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ПОЛИАМИНОВ ПРИ ФАЗОВОМ РАЗВИТИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ *ESCHERICHIA COLI* М-17

Полиамины — продукты превращений аминокислот — присутствуют во всех клетках животных, растений и микроорганизмов. В бактериях наиболее часто обнаруживаются путресцин (ПТ), спермин (СМ), спермидин (СД) и кадаверин (КД).

Биологическая роль этих соединений была впервые показана Хербстом и Суэллом [1], которые обнаружили зависимость роста *Hemophillus parainfluenzae* от уровня полиаминов, в частности путресцина. Участие полиаминов в регуляции роста показано и для других бактерий [2]. Однако, несмотря на широкое распространение и довольно высокую внутриклеточную концентрацию, достигающую 15 мкмоль на 1 г сырого веса у *E. coli* [3], физиологическая роль этих соединений полностью не выяснена.

Имеющиеся в литературе данные позволяют предполагать регуляторное действие полиаминов на уровнях транскрипции и трансляции, по-видимому, за счет изменения заряда и конформации нуклеиновых кислот, что отражается на стабильности и биологических функциях ДНК и РНК [4—7]. Содержание нуклеиновых кислот в клетках определяется фазой клеточного цикла, уровнем репаративных процессов и характером функциональной деятельности [8]. Известны значительные изменения внутриклеточного уровня ДНК и РНК при фазовом развитии бактериальных популяций [9, 10].

В этой связи представляет интерес изучение содержания в клетках биологически активных полиаминов в динамике развития бактериальной культуры.

Работа проведена на культуре *Escherichia coli* М-17, развивающейся на синтетической среде М-9. Инокулят бактерий логарифмической стадии роста вносили во флаконы с 400 мл среды и инкубировали при 37 °С. Засевная доза составляла 100 млн/мл. Для определения внутриклеточного содержания полиаминов аликвоты культуры отбирали на стадии экспоненциального роста и фазах стабилизации и снижения численно-

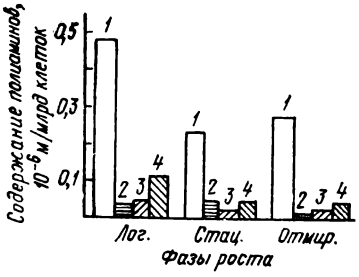


Рис. 1. Динамика внутриклеточного содержания полиаминов бактериальной культуры *E. coli*.

1 — путресцин; *2* — кадаверин; *3* — спермидин; *4* — спермин.

сти клеток. Полученную бактериальную массу дважды отмывали физиологическим раствором от питательной среды при 6000 *g* в течение 45 мин. Клетки суспендировали в 0,3 мл 0,4 N хлорной кислоты и разрушали ультразвуком при температуре 0 °С в течение 30 мин при частоте 22 кГц и мощности 0,5 кВт на дезинтеграторе УЗДН-2.

Полученную суспензию прогревали в водяной бане при 80 °С для осаждения белков. Экстракт отделяли центрифугированием при 8000 *g* в течение 30 мин и доводили до щелочной реакции среды (pH-9) бикарбонатом натрия. Диапазон pH 8,5—9,5 является оптимальным для реакции дансилирования [11, с. 75—84]. К 01, мл экстракта добавляли 0,1 мл дансилхлорида (10,63 мкмоль/мл). Реакцию проводили в темноте в течение 2 ч при 37 °С, т. е. условиях максимального выхода продуктов дансилирования. Дансилпроизводные полиаминов экстрагировали бензолом (0,2 мл) при встряхивании на шюттель-аппарате в течение 2 ч. Бензольный экстракт (4 мкл) наносили на стеклянную пластину размером 20×10 см с тонким слоем кизельгеля фирмы «Merck» (3 г носителя на пластину). Одновременно на пластину наносили образцы и смесь стандартных препаратов полиаминов. В качестве метчиков использовали спермин·4HCl, путресцин·2HCl, спермидин·3HCl, кадаверин·2HCl, предоставленные нам В. З. Горкиным.

Разделение полиаминов проводили троекратно в системе бензол — триэтиламин (100 : 20 *v*/*v*). Пластинки сушили на воздухе при комнатной температуре, дансилпроизводные полиаминов обнаруживали в ультрафиолетовом свете в хроматоскопе по флуоресценции пятен. Идентификацию полиаминов в пробе проводили по свидетелям полиаминов. Хроматограммы фотографировали в ультрафиолете на пленку «Микрат-200» через зеленый светофильтр.

Содержание полиаминов рассчитывали после денситометрирования негативов на микрофотометре Y-II (фирма «Карл Цейсс», ГДР) и оценки площадей пиков по калибровочным графикам, построенным для каждого препарата полиамина после проводки по всей экспериментальной процедуре.

В клетках *E. coli* М-17, растущей на синтетической среде М-9, обнаружено несколько соединений, дансилпроизводные

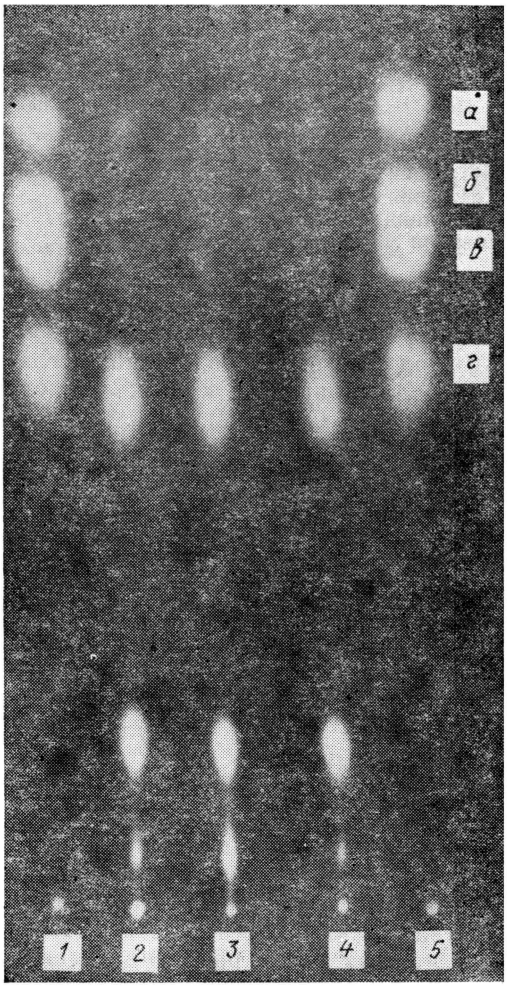


Рис. 2. Идентификация полиаминов в клетках *E. coli* М-17 тонкослойной хроматографией на кизельгеле.

Полиамины: *а* — спермин, *б* — спермидин, *в* — кадаверин, *г* — путресцин. Цифрами обозначены: *1, 5* — смесь стандартных препаратов полиаминов; *2—4* — фазы роста культуры: *2* — логарифмическая, *3* — стационарная, *4* — отмирания.

которых обнаруживаются по флуоресценции в ультрафиолете (рис. 1). Использование стандартных препаратов позволило идентифицировать ПТ, КД, СД, СМ. Однако кроме этих полиаминов на хроматограммах обнаруживается еще два-три пятна соединений, обладающих более медленной, по сравнению с полиаминами, подвижностью. Предварительные исследования характера этих соединений показали, что они не являются дансилпроизводными треонина, метионина, цистеиновой кислоты, изолейцина, пролина, аланина, глутамина, тирозина, серина, аспарагиновой кислоты, валина, цистина и тирамина.

В процессе развития бактериальной культуры отмечаются значительные количественные колебания полиаминов (рис. 2). Необходимо отметить, что максимальное количество полиаминов приходится на логарифмическую стадию развития бактериальной культуры. Так, суммарное количество полиаминов в этой фазе составляет $0{,}67 \cdot 10^{-6}$ М/млрд клеток, а торможение роста и отмирание клеток сопровождается снижнием их уровня соответственно до 0,32 и $0{,}35 \cdot 10^{-6}$ М/млрд клеток, т. е. практически в два раза. Содержание ПТ в логарифмической фазе достигает 0,48; КД — 0,03; СД — 0,03; а СМ — $0{,}12 \cdot 10^{-6}$ М/млрд клеток. При остановке роста культуры наблюдается снижение

Соотношение полиаминов в развивающейся популяции *E. coli*, %

Полиамин	Фаза развития популяции		
	экспоненциальная	стационарная	отмирания
Путресцин	74,6	71,9	83,1
Кадаверин	4,4	9,4	1,7
Спермицин	5,2	2,4	6,7
Спермин	18,6	15,6	8,5

уровня ПТ, СД и СМ соответственно до 0,23; 0,01 и $0{,}05 \cdot 10^{-6}$ М/млрд клеток, а содержание КД остается без изменения. В фазе отмирания клеток происходит дальнейшее снижение содержания СМ до $0{,}02 \cdot 10^{-6}$ М и резкое — в пять раз — понижение уровня КД ($0{,}006 \cdot 10^{-6}$ М/млрд клеток). В то же время происходит незначительное повышение содержания ПТ и двукратное — СД до $0{,}02 \cdot 10^{-6}$ М/млрд клеток.

Обнаруженное нами максимальное содержание полиаминов в фазе экспоненциального роста бактериальной культуры соответствует имеющимся в литературе данным о стимуляции полиаминами клеточного деления Так, добавление ПТ к штамму *E. coli*, мутантному по синтезу путресцина, приводило к стимуляции синтеза ДНК, РНК и белка, немедленному ускорению клеточного деления [12]. На бактериальных препаратах показана также прямая стимуляция белоксинтезирующей системы полиаминами [13].

Интересно отметить, что на всех фазах развития бактериальной культуры основная часть полиаминов представлена путресцином, по-видимому, обладающим наибольшим эффектом в регуляции синтеза белка и нуклеиновых кислот. Содержание этого соединения составляет 75—80 % от общего количества полиаминов в клетке. Процентное отношение полиаминов на всех фазах развития изменяется незначительно (см. таблицу), однако отмечается двукратное снижение доли спермина и незначительный рост относительного содержания путресцина при торможении развития бактериальной культуры.

Таким образом, результаты работы указывают на взаимосвязь колебаний внутриклеточного уровня полиаминов со скоростью развития бактериальной популяции, что, по-видимому, является отражением регуляторных функций этих соединений у микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Herbst E. I., Suell E. E.* Putrescine as a growth factor for *Hemophilus parainfluenzae*.— J. Biol. Chem., 1948, vol. 176, p. 989—990.

2. *Mager I.* Influence of osmotic pressure on the polyamine requirement

of *Neisseria perflava* and *Pasteurella tularensis* for growth in defined media.— Nature (London), 1955, vol. 76, p. 933—934.

3. *Dubin D. T., Rosenthal S. M.* The acetylation of polyamines in *E. coli*.— J. Biol. Chem., 1960, vol. 235, p. 776—782.

4. *Zhurkin V. B., Zysov J. P., Ivanov V. I.* Conformational study of spermine-DNA interaction with different forms of DNA.— Stud. biophys., 1978, vol. 67, p. 91—92.

5. *Karpetsky T. P., Hieter P. A., Frank I. I., Levy C. C.* Polyamines, ribonucleases and the stability of RNA.— Mol. and Cell. Biochem., 1977, vol. 17, p. 89—99.

6. *Rubin R. Z.* Spermidine-deoxyribonucleic acid interaction in vitro and in *E. coli*.— J. Bacteriol., 1977, vol. 4, N 3, p. 685—695.

7. *Osland A., Kleppe K.* Polyamine induced aggregation of DNA.— Nucl. Acids Res., 1977, vol. 4, N 3, p. 685—695.

8. *Коротяев А. И.* Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина, 1973. 272 с.

9. *Шестакова А. А.* Взаимосвязь ферментов обмена макроэргических соединений с внутриклеточным уровнем ДНК и РНК при развитии бактериальной популяции.— Статья в наст. сборнике.

10. *Коробов В. П., Сысоев О. В., Иванюк А. А.* и др. Контроль численности популяций лактобактерий внутриклеточным уровнем рибонуклеиновых кислот.— В кн.: Управление биосинтезом микроорганизмов. Тезисы III Всесоюзного совещания по управляемому биосинтезу и биофизике популяций. Красноярск, 1973, с. 212—213.

11. *Осборн Н. Н.* Микрохимический анализ нервной ткани. М.: Медицина, 1978. 261 с.

12. *Delano V. J., Srinivasan P. R.* Regulation of macromolecular synthesis by putrescine in a conditional *E. coli* putrescine auxotroph.— J. Bact., 1972, vol. 112, N 1 (I), p. 30—39.

13. *Goldemberg S. H., Algranati I. D.* Polyamines and protein synthesis: studies in varions polyamine-requiring mutants of *E. coli*.— Mol. Cell. Biochem., 1977, vol. 16, N 2—3, p. 71—77.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ · 1980

А. И. КОРОТЯЕВ, Т. П. КРОЛИЧЕНКО

ХРОМОСОМЫ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА У БАКТЕРИЙ

Время генерации (продолжительность клеточного цикла) сильно варьирует не только у разных видов, но и у одного и того же штамма бактерий в зависимости от условий его роста [1]. В известных моделях контроля клеточного деления [2, 3] предприняты попытки объяснить лишь механизмы регуляции собственно инициации репликации, сегрегации хромосомы и формирования межклеточной перегородки. Однако эти модели не дают ответа на вопрос, чем определяется продолжительность клеточного цикла, т. е. время между началом репликации, которое является его пусковым моментом, и формированием межклеточной перегородки, завершающимся разделением двух дочерних клеток.

В литературе мы не нашли сведений относительно механизмов, позволяющих клетке регулировать время выражения своего генома, необходимое для осуществления клеточного цикла в одних случаях в течение 20 мин, а в других — 220 мин и более. Время клеточного цикла (скорость роста бактерий) всегда адекватно условиям среды. Его продолжительность должна регулироваться, по-видимому, не механизмами, контролирующими инициацию репликации, сегрегацию хромосомы и формирование перегородки, остающиеся неизменными при разных условиях роста, а интенсивностью биосинтетических процессов и прежде всего интенсивностью репликации, транскрипции и трансляции. Такое предположение логически вытекает из выявленных нами ранее закономерностей, свидетельствующих о том, что содержание рибосом у бактерий является функцией условий их роста [4], а выражение генома у бактерий носит равновероятностный по отношению к оперонам характер [5]. Вместе с тем в [4, 6] было показано, что при благоприятных условиях роста клетка стремится к сверхизбыточному синтезу ДНК (полигеномности, или полиплоидности).

В настоящей работе с целью подтверждения гипотезы о механизмах регуляции времени генерации бактерий, сформулированной нами выше, были изучены динамика содержания и ско-

рость биосинтеза ДНК, рибосом, рибосомальной РНК, а также соотношение между числом молекул мРНК и числом хромосом у четырех штаммов кишечной палочки *E. coli*: К12 met⁻, В, М и О-111. Для выращивания культур использовали минимальную среду М-9 с 0,4 %, глюкозы и обогащенную среду L-бульон.

Культуры инкубировали при температуре 37 °С, пробы отбирали через определенные интервалы времени, клетки отмывали от питательной среды. Подсчет клеток в пробе производили в камере Горяева. Нуклеиновые кислоты фракционировали по методу Шмидта-Таннхаузера [7] в собственной модификации. Содержание нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически по методу А. С. Спирина [8]. Скорость биосинтеза ДНК, рРНК и число молекул мРНК и рибосом на клетку рассчитывали по формулам [4, 6, 9].

Установлено существование четкой корреляции между числом хромосом и интенсивностью биосинтетических процессов, с одной стороны, и временем генерации — с другой (табл. 1). Время генерации у *E. coli* на L-бульоне во всех случаях в несколько раз короче, чем при росте на глюкозо-минеральной среде. Соответственно и содержание ДНК в клетках, растущих на L-бульоне, в 2—3 раза больше, чем при росте на среде М-9. В большинстве случаев при росте на глюкозо-минеральной среде бактерии содержат около двух хромосом, а репликация идет со средней скоростью, соответствующей включению в одну секунду $2{,}0 \cdot 10^3$ — $4{,}7 \cdot 10^3$ нуклеотидов, т. е. по-видимому, в этих условиях реплицируется одна хромосома [9]. При более благоприятных условиях роста (L-бульон) клетки содержат от трех до пяти хромосом. Поскольку продвижение репликативной вилки при одинаковой температуре происходит с одной и той же скоростью, можно заключить, что увеличение средней суммарной скорости биосинтеза ДНК в 2—15 раз на L-бульоне по сравнению со средой М-9 есть следствие одновременной репликации нескольких хромосом и образования множественных репликативных вилок.

Таким образом, выявляется четкая тенденция клеток при благоприятных условиях роста к сверхизбыточному синтезу ДНК и накоплению ее в количестве, соответствующем нескольким геномам, т. е. тенденция к полигеномности (полиплоидности), природа которой до последнего времени остается неясной.

Основной показатель интенсивности биосинтеза белка у бактерий — содержание рибосом в клетке [7]. Из табл. 1 видно, что это содержание является функцией условий роста. Увеличение содержания рибосом при росте на обогащенной среде осуществляется за счет значительного возрастания средней суммарной скорости биосинтеза рРНК, которое обеспечивается, очевидно, не только за счет одновременной транскрипции шести рРНК-оперонов одной хромосомы, но и рРНК-оперонов нескольких (всех) имеющихся в клетке хромосом. Благодаря

Таблица 1

Содержание ДНК, рибосом и скорость биосинтеза ДНК и рРНК в клетках разных штаммов кишечной палочки в зависимости от условий роста

Штамм *E. coli*	Среда	Количество хромосом до и после деления	Средняя суммарная скорость биосинтеза, нукл/сек		Колич. рибосом до и после деления, $\times 10^3$
			ДНК, $\times 10^3$	рРНК, $\times 10^3$	
M	L-бульон	3,9—3,7	33,0	78,0	41,6—29,7
	M-9	2,5—1,8	2,4	15,4	11,3—10,9
K12	L-бульон	7,8—6,3	30,0	226,0	75,6—68,1
	M-9	2,6—1,8	4,7	3,6	22,3—12,5
0111	L-бульон	5,0—3,0	7,5	120,0	38,0—27,6
	M-9	2,0—1,5	2,0	5,7	13,9—11,7
B	L-бульон	3,4—5,0	20,0	164,0	38,1—64,2
	M-9	2,2—1,6	2,6	13,0	18,4—13,9

Таблица 2

Соотношение между числом хромосом (цистронов) и молекул мРНК в клетках кишечной палочки в экспоненциальной фазе роста на разных средах

Штамм *E. coli*	Среда	ДНК, 10^{-15} г	Количество				
			хромосом	молекул мРНК	молекул мРНК на одну хромосому	транскрибируемых цистронов* в хромосоме, %	рибосом в клетке, 10^3
M	L-бульон	15,8	3,5	4200	1500	50	31,6
	M-9	7,4	1,6	1400	900	28	10,6
K12	L-бульон	27,2	6,0	8200	1400	46	63,5
	M-9	8,9	2,7	1600	890	27	12,5
B	L-бульон	25,5	5,6	8000	1600	53	61,6
	M-9	8,1	1,8	1700	900	30	12,0
0-111	L-бульон	13,3	3,0	3600	1200	42	25,9
	M-9	6,7	1,5	1200	800	27	9,6

* Колич. цистронов в хромосоме кишечной палочки принимали равным 3000, исходя из молекулярного веса гаплоидной хромосомы ($2,8 \cdot 10^9$).

Таблица 3

Клеточное деление при отсутствии синтеза ДНК у *E. coli* K12*

Содержание ДНК в клетке, $\times 10^{-15}$ г	Колич. молекул мРНК до и после деления	Средняя суммарная скорость биосинтеза рРНК нукл/сек, $\times 10^3$	Колич. рибосом до и после деления, $\times 10^3$
до и после деления			
24,6—10,1	1700—1800	8,8	13,1—12,5
13,2—7,2	2100—1400	7,2	16,4—10,7
22,4—10,6	2000—1900	20,5	15,8—14,9

* Среда культивирования — М-9 с 0,4% глюкозы; фаза роста — экспоненциальная; время генерации 60 мин.

включению многих рРНК-оперонов клетка быстро накапливает такое количество рибосом, которое позволяет ей удвоить биомассу в значительно более короткий срок и сократить продолжительность клеточного цикла.

Пропорционально увеличению числа рибосом в клетке возрастает и количество функционирующих в ней в данный момент молекул мРНК (табл. 2). Вместе с тем проведенные расчеты свидетельствуют о том, что в данных условиях количество молекул мРНК на одну хромосому варьирует незначительно. Следовательно, общее увеличение количества молекул мРНК (особенно при росте на L-бульоне, когда клетки содержат несколько хромосом, а общее число молекул мРНК значительно превышает число цистронов в гаплоидной хромосоме) является результатом одновременной транскрипции соответствующих оперонов в нескольких (во всех) хромосомах.

Из данных табл. 2 следует также, что в любой данный момент клеточного цикла в клетке транскрибируется значительное число (27—50 %) цистронов, т. е. выражение генома носит равновероятностный в отношении оперонов характер [5]. Благодаря такому характеру регуляции выражения генома обеспечивается возможность транскрипции оперонов нескольких (всех) имеющихся в клетке хромосом.

Таким образом, основной биологический смысл сверхизбыточного накопления ДНК (полигеномности) заключается в создании необходимых предпосылок для осуществления клеточного цикла за наиболее короткий срок. Благодаря этому обеспечивается поддержание максимального для данных условий роста числа особей в популяции, что является одним из важнейших условий сохранения вида (принцип стабилизации вида у микробов).

При росте на обогащенных питательных средах эта возможность реализуется прежде всего посредством механизмов, обеспечивающих одновременную транскрипцию аналогичных оперонов в нескольких (во всех) хромосомах. Одновременная транс-

крипция рРНК-оперонов в нескольких хромосомах обеспечивает синтез такого количества рибосом, которое необходимо для трансляции увеличивающегося по мере репликации хромосом и интенсивности транскрипции числа молекул мРНК. Такое координирование процессов репликации, транскрипции и трансляции и лежит в основе механизма регуляции времени клеточной генерации, адекватного условиям роста.

Хотя между процессами репликации, с одной стороны, транскрипции и трансляции — с другой, у бактерий существует определенная зависимость, но каждый из них регулируется при помощи собственных контрольных механизмов. Отсюда даже в тех случаях, когда содержание ДНК у *E. coli* при росте на глюкозо-минеральной среде достигает такого количества, которое соответствует трем-пяти хромосомам, т. е. значительно большего, чем это требуется для удвоения биомассы при данных условиях роста, это не приводит к сокращению времени генерации. Судя по числу молекул мРНК и рибосом, при росте на глюкозо-минеральной среде одновременная транскрипция оперонов происходит не более, чем с двух хромосом, а время генерации остается постоянным независимо от того, сколько хромосом содержит клетка — две или пять. При этом обнаруживается чрезвычайно интересный факт: деление клеток происходит при почти полном отсутствии синтеза ДНК, и имеющиеся хромосомы поровну распределяются между дочерними клетками (табл. 3).

Данные наблюдения находятся в противоречии с гипотезой [3] и подтверждают, что продолжительность клеточного цикла определяется не столько частотой инициации репликации хромосом и их количеством, сколько интенсивностью выражения бактериального генома. Последняя является функцией числа одновременно транскрибируемых в нескольких хромосомах аналогичных оперонов, необходимых для осуществления клеточного цикла.

Синтез сверхизбыточного количества ДНК (полигеномность, или полиплоидность) — необходимое условие для сокращения времени генерации. Одновременная транскрипция аналогичных цистронов (оперонов) нескольких (всех) хромосом, протекающая по типу равновероятностного в отношении оперонов характера выражения бактериального генома, является основным механизмом регулирования интенсивности биосинтетических процессов бактерий, поскольку у них транскрипция и трансляция протекают одновременно, а следовательно, и времени генерации (скорости роста).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Коротяев А. И.* Механизмы саморегуляции бактериальной клетки. М.: Медицина, 1973. 272 с.

2. *Helmstetter G.* Initiation of chromosome replication in E. coli. I. Re-

quirement for RNA and protein synthesis at different growth rates.— J. Molecular Biology, 1974, vol. 84, N 1, p. 1—19.

3. *Helmstetter G.* Initiation of chromosome replication in E. coli. II. Analysis of the control mechanisms.— Ibid, p. 21—36.

4. *Коротяев А. И., Максимов В. Ф., Ширяева И. Н.* Кинетика основных биосинтетических процессов и содержание рибосом у *E. coli* K12 на различных этапах синхронного роста.— Докл. АН СССР, 1968, т. 178, № 6, с. 1410—1413.

5. *Коротяев А. И.* О неравновероятностной и равновероятностной транскрипции хромосомы *E. coli.*— В кн.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций: II Всесоюзное совещание 26 июня — 7 июля 1969. Красноярск, 1969, с. 302—303.

6. *Коротяев А. И., Максимов В. Ф., Ширяева И. Н.* Кинетика биосинтеза ДНК у *E. coli* K12 в условиях синхронного роста.— Микробиология, 1968, т. 37, вып. 3, с. 395—400.

7. *Schmidt G., Thannhauser J.* A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues.— J. Biol. Chem., 1945, vol. 161, N 1, p. 83—89.

8. *Спирин А. С.* Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот.— Биохимия, 1958, т. 23, вып. 5, с. 656—662.

9. *Коротяев А. И., Орлов В. Г.* Эффективность биосинтеза рибосомами белка у E. *coli.*— Микробиология, 1969, т. 38, вып. 2, с. 205—210.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ · 1980

А. Е. ЭССЕЛЬ, И. А. ЮДИЛЕВИЧ, Т. Е. ТКАЧЕНКО

ВОПРОСЫ МАТЕМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА СМЕШАННЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Проблема контроля и прогноза развития бактериальных популяций представляет существенный интерес в теоретическом и прикладном аспектах. Разработанные формулы анализа одновидовых бактериальных популяций для условий стационарного [3] и проточного [3, 7, 11] культивирования не могут быть использованы в приложении к смешанным популяциям, а последние не могут быть полноценно интерпретированы в системе общепринятых «кривых роста бактериальной популяции».

Цель настоящей работы — математический и логический анализ количественного и качественного поведения смешанных бактериальных популяций, в частности выявление таких характеристик, с помощью которых можно было бы описывать процесс их развития.

Термин «модель» [5] применим к общим экологическим закономерностям; математические описания развития конкретных биологических популяций называются имитациями. Под смешанной мы будем понимать бактериальную популяцию, представленную бактериями различных видов (или штаммов). Нам предстоит рассматривать такие смешанные популяции, для которых факторы эмиграции и иммиграции особей отсутствуют, а также (условно) не имеют места внешние воздействия, которые могли бы повлиять на развитие популяции. Смешанная популяция с такими ограничениями соответствует замкнутой экосистеме. Мы полагаем, что даже такая ограниченная имитация позволяет анализировать некоторые общие закономерности, присущие смешанным бактериальным популяциям [2, 4, 11].

Фазовый характер развития бактериальных популяций [2, 4, 11] общеизвестен. Мы будем рассматривать только те фазы роста популяции, при которых ее общая численность не уменьшается. К таким фазам [11] относятся: начальная стационарная; фаза задержки или покоя; логарифмическая фаза; отрицательного ускорения; максимальная стационарная фаза.

Максимальное количество живых клеток, способных одновременно находиться в одном определенном объеме питательной среды, называется М-концентрацией, которая является

величиной, характерной для данного вида бактерий. Было высказано [8, 9, 10] предположение, что если в культурах, не достигших М-концентрации, каждая клетка делится на две дочерние жизнеспособные бактерии, то по достижении М-концентрации деление клеток продолжается, но при этом каждый раз образуется только одна жизнеспособная дочерняя клетка, а другая, не достигая полноценности, гибнет.

Наблюдения при помощи различных методов (кинематографического, прижизненной окраски и других) процессов деления у *E. coli* и *B. pumilus* позволили установить, что число поколений каждой из двух клеток, полученных при делении первичной клетки, оказывается различным. Исследования [6] популяции *B. subtilis* в агаровых культурах показали, что в процессе развития клеток отмечался однополюсный рост. Таким образом, попытки объяснения качественных особенностей максимальной стационарной фазы приводят к пересмотру взглядов на процесс развития и деления бактерий вообще.

Приводимые исследователями градации фаз созданы для одновидовой бактериальной популяции. Возникают вопросы, как и по какому признаку выделять фазы роста в смешанной популяции? Будут ли эти фазы совпадать по своему качественному содержанию с фазами одновидовой бактериальной популяции? Сохранят ли свою актуальность понятия, введенные для одновидовой популяции в случае смешанной и наоборот?

И далее. Что называть М-концентрацией для смешанной популяции, представленной хотя бы двумя видами? Если определить М-концентрацию смешанной популяции как максимальное количество клеток в данном определенном объеме, то каким образом это определение будет соотноситься с определением М-концентрации для каждого из видов?

Без воссоздания точной качественной картины процесса развития смешанной популяции ответить на этот вопрос нельзя. Между тем разрешение подобных вопросов на качественном уровне нужно для создания математических моделей, адекватно описывающих процесс развития смешанных популяций.

Процесс развития биологической популяции одного вида может быть описан [1] уравнением

$$\frac{d(\ln N)}{dt} = \omega(N, \Theta), \tag{1}$$

где $N = N(t)$ — функция, характеризующая изменение общей численности популяции в зависимости от времени;

Θ — формальный параметр среды обитания популяции;

$\omega(N, \Theta)$ — непрерывная функция приспособленности, характеризующая среднее число потомков, произведенных одним родителем в единицу времени.

Авторами [1] введена следующая классификация зависимости приспособленности популяции от ее численности.

Определение I. Если для $\forall N$ и любого числа $c>1$

а) $\omega(cN, \Theta)=\omega(N, \Theta)$ — популяция нейтральная;

б) $\omega(cN, \Theta)\leqslant\omega(N, \Theta)$ — популяция лимитированная;

в) $\omega(cN, \Theta)\geqslant\omega(N, \Theta)$ — популяция стимулированная.

Покажем, к какому классу относится бактериальная одновидовая популяция в рассматриваемых фазах роста.

В лаг-фазе, логарифмической и стационарной фазах бактериальная одновидовая популяция является нейтральной, так как в этих фазах $\omega(N, \Theta)=\text{const}$; значит, выполняется условие а).

При стационарном культивировании фазу отрицательного ускорения будем рассматривать как обусловленную влиянием концентрации продуктов метаболизма в среде на скорость роста одновидовой бактериальной популяции. Тогда, согласно [2, 3], она может быть описана уравнением

$$\frac{d(\ln x)}{dt}=\mu_{\max}\cdot\frac{K_p}{K_p+p(t)}, \tag{2}$$

где $x(t)$ — вес микроорганизмов в культуре;

$\mu_{\max}$ — максимальная скорость роста популяции при данных условиях;

$p(t)$ — концентрация продукта, ингибирующего рост;

K_p — константа ингибирования, численно равная концентрации продукта, при которой скорость роста достигает половины максимальной.

Будем считать, что общая численность популяции $N(t)$ и вес особей $x(t)$ связаны отношением $x(t)=N(t)\cdot B$, где $B>0$ — константа, учитывающая процентное отношение веса живых особей к общему весу микроорганизмов. Тогда уравнение (2) эквивалентно

$$\frac{d(\ln N)}{dt}=\frac{\mu_{\max}}{B}\cdot\frac{K_p}{K_p+p(t)}. \tag{3}$$

Здесь $p(t)$ — монотонно возрастающая функция, т. е. если $t_1\leqslant t_2$ то $p(t_1)\leqslant p(t_2)$.

Согласно определению I, популяция лимитированная, когда для $\forall N$ $\forall c>1$, $\omega(cN, \Theta)\leqslant\omega(N, \Theta)$.

Выберем произвольные $c_0>1$ и N_0. Так как общая численность популяции — непрерывная функция от времени, то справедливы следующие утверждения: $N_0=N(t_0)$; $c_0N_0=N(t_1)$. Поскольку в рассматриваемых фазах роста бактериальной одновидовой популяции общая численность является монотонно возрастающей функцией, то из выражения $N_0<c_0N_0$ следует, что $t_0<t_1$.

Тогда рассмотрим разность

$$\omega(N_0, \Theta)-\omega(c_0N_0, \Theta)=\frac{\mu_{\max}}{B}\cdot\frac{K_p}{K_p+p(t_0)}-\frac{\mu_{\max}}{B}\cdot\frac{K_p}{K_p+p(t_1)}=$$

$$=\frac{\mu_{\max}K_p}{B}\cdot\frac{p(t_1)-p(t_0)}{[K_p+p(t_0)][K_p+p(t_1)]}\geqslant 0,$$

так как $\mu_{max}>0$, $B>0$, $K_p>0$, $p(t)\geqslant 0$ и функция $p(t)$ монотонно возрастает.

Следовательно, выполняется условие б) определения I, т. е. в фазе отрицательного ускорения популяция лимитирована и согласно [1] может быть описана уравнением

$$\frac{d(\ln N)}{dt}=\varepsilon(\Theta)-\varphi(N), \tag{4}$$

где $\varepsilon(\Theta)$ — скорость размножения популяции в логарифмической фазе роста, именуемая функцией приспособленности;
$\varphi(N)$ — лимитирующая функция.

Уравнение (4) является моделью развития одновидовой бактериальной популяции. Будем считать, что для этой фазы справедливо предположение о стационарности (т. е. независимости от времени) среды. Тогда в этой фазе общая численность популяции изменяется по закону

$$N(t)=N_0e^{\varepsilon(\Theta)t}, \tag{5}$$

где $N_0=N(0)$ — начальная численность популяции.

Тогда из уравнения (5) следует, что

$$\varepsilon(\Theta)=\frac{1}{t}\ln\frac{Nt}{N_0}=\text{const}. \tag{6}$$

Зафиксируем $t=a$, тогда

$$\varepsilon(\Theta)=\frac{1}{a}\ln\frac{N(a)}{N_0}. \tag{7}$$

С другой стороны, $\varepsilon(\Theta)=\mu_{max}$, так как максимальная скорость роста популяции присуща только логарифмической фазе роста.

В фазе отрицательного ускорения среда обитания популяции не будет стационарной вследствие истощения питательных веществ в среде и накопления продуктов отходов, которые будут лимитировать развитие популяции.

В общем случае указать более конкретный вид лимитирующей функции $\varphi(N)$ для одновидовой бактериальной популяции в уравнении (4), по-видимому, не представляется возможным. Укажем метод, с помощью которого можно находить вид этой функции для каждой конкретной имитации, имея минимум данных о развитии популяции.

С помощью экспериментальных данных можно найти значения функции $N(t)$ в точках t_k, где $1\leqslant k\leqslant n$, что дает множество $\{N(t_k)\}_{n=1}$. Это самые простые данные, которые можно получить при развитии конкретной бактериальной популяции. Согласно [1], под дискретной функцией приспособленности — $g(k)$ — будем понимать

$$g(k)=\frac{N(t_{k+1})}{N(t_k)}=\frac{N(k+1)}{N(k)}.$$

Между непрерывной $\omega(N, \Theta)$ и дискретной функцией приспособленности существует следующее уравнение связи:

$$\frac{1}{T}\int_{t_k}^{t_{k+1}} \omega(N, \Theta)\, dt = \frac{1}{T}\ln g(k), \tag{8}$$

где $T = t_{k+1} - t_k$.

Из уравнения (4), которое является моделью развития одновидовой бактериальной популяции, $\omega(N, \Theta) = \varepsilon(\Theta) - \varphi(N)$. Тогда

$$\frac{1}{T}\int_{t_k}^{t_{k+1}} [\varepsilon(\Theta) - \varphi(N)]\, dt = \frac{1}{T}\ln g(k).$$

Учитывая предположения о стационарности среды в логарифмической фазе роста, т. е. $\varepsilon(\Theta) = \text{const}$, $\Theta = \text{const}$,

$$\frac{1}{T}\int_{t_k}^{t_{k+1}} \varphi(N)\, dt = \varepsilon(\Theta) - \frac{1}{T}\ln g(k)$$

и подставляя значение $\varepsilon(\Theta)$ из уравнения (7), имеем

$$\frac{1}{T}\int_{t_k}^{t_{k+1}} \varphi(N)\, dt = \frac{1}{d}\ln\frac{N(a)}{N_0} - \frac{1}{T}\ln g(k). \tag{9}$$

Для каждого интервала $[t_к, t_{к+1}]$ значение функции $\varphi(N)$ определяется как решение интегрального уравнения (9). Это уравнение является критерием применимости функции $\varphi(N)$ для описания развития одновидовой бактериальной популяции на интервале $[t_к, t_{к+1}]$. Из уравнения (9) можно найти и вид функции $\varphi(N)$ на данном интервале $[t_к, t_{к+1}]$. Зная конкретный вид функции $\varphi(N)$, можно разрешить основное уравнение (4).

В случае одновидовой бактериальной популяции вид лимитирующей функции $\varphi(N)$ может быть получен, исходя и из других рассуждений. Ранее было показано, что бактериальная популяция в фазе отрицательного ускорения, описываемая уравнением (3), является лимитированной. Для уравнения (3) функция приспособленности имеет вид

$$\omega(N, \Theta) = \frac{\mu_{max}}{B}\cdot\frac{K_p}{K_p + p(t)}. \tag{10}$$

Также было сказано, что уравнение (4) является моделью развития одновидовой бактериальной популяции, для которого функция приспособленности имеет вид

$$\omega(N, \Theta) = \varepsilon(\Theta) - \varphi(N).$$

Учитывая, что уравнения (11) и (10) описывают один и тот же качественный процесс, можно записать

$$\varepsilon(\Theta) - \varphi(N) = \frac{\mu_{max}}{B} \cdot \frac{K_p}{K_p + p(t)}.$$

Поскольку $\varepsilon(\Theta) = \mu_{max}$, то

$$\varphi(N) = \varepsilon(\Theta)\left[1 - \frac{1}{B}\frac{K_p}{K_p + p(t)}\right]. \qquad (12)$$

Справедливость применения функции φN в виде (12) можно проверить с помощью критерия (9), т. е.

$$\frac{1}{T}\int_{t_k}^{t_{k+1}} \varepsilon(\Theta)\left[1 - \frac{1}{B}\frac{K_p}{K_p + p(t)}\right] dt = \frac{1}{a}\ln\frac{N(a)}{N_0} - \frac{1}{T}\ln g(k);$$

$$\frac{1}{T}\int_{t_k}^{t_{k+1}} \frac{\varepsilon(\Theta)}{B}\frac{K_p}{K_p + p(t)}\, dt = \frac{1}{T}\ln g(k). \qquad (13)$$

Если условие (13) выполняется с достаточной степенью точности, то тогда уравнение (4) имеет своим решением функцию

$$N(t) = N_0 e^{\frac{1}{B}\int_{t_0}^{t} \varepsilon(\Theta)\frac{K_p}{K_p + p(t)}\, dt}, \qquad (14)$$

которая описывает изменение численности популяции в фазе отрицательного ускорения.

Уравнение (14) можно рассматривать как имитацию развития абстрактной одновидовой бактериальной популяции, удовлетворяющую сделанным предположениям. Естественно, что при построении имитации смешанной бактериальной популяции картина резко изменится в худшую сторону, так как построение математической модели развития бактериальной популяции «вообще» и их имитаций в каждом конкретном случае существенно опирается на качественные особенности развития бактериальной популяции.

Ранее уже отмечалось, что для случая (на современном уровне знаний) смешанной бактериальной популяции хорошо разработанной качественной картины процесса не существует. Нам хотелось бы обратить внимание на некоторые параметры смешанных бактериальных популяций, с помощью которых, на наш взгляд, можно оценивать прогресс их развития, не прибегая к кибернетическим методам построения модели.

Рассмотрим совместное выращивание *E. coli* и *Staph. aureus*. Избранные для исследования штаммы не являлись антагонистами и имели примерно равное время генерации. Совместное

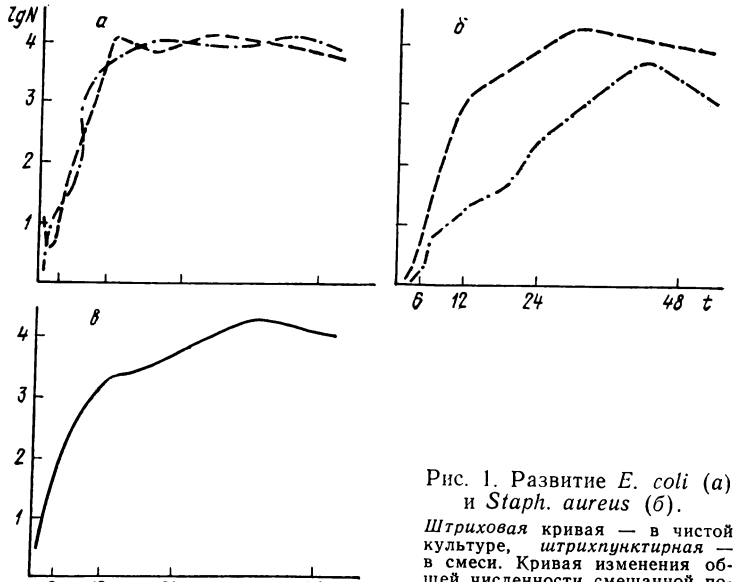


Рис. 1. Развитие *E. coli* (*а*) и *Staph. aureus* (*б*).

Штриховая кривая — в чистой культуре, *штрихпунктирная* — в смеси. Кривая изменения общей численности смешанной популяции *Staph. aureus* и *E. coli* (*в*).

выращивание проводилось на МПБ при температуре 37 °С. Контроль за ростом численности популяции проводился систематическими высевами бактерий на чашки Петри со средой МПА. При подсчетах принималось, что одна колония происходит из одной клетки. Параллельно с совместным проводилось раздельное выращивание тех же штаммов.

Полученные результаты послужили эмпирическим материалом для построения графиков развития обеих популяций в условиях раздельного и смешанного культивирования (рис. 1). На графиках представлены кривые развития *E. coli* и *Staph. aureus* раздельно (см. рис. 1, *а, б*) и в смешанной популяции (см. рис. 1, *в*). С их помощью определялись периоды существования той или иной фазы роста в смешанной популяции.

Проведенные эксперименты позволяют сделать следующие выводы относительно фаз роста *E. coli* и *Staph. aureus* в смешанной популяции.

1. Количественный рост и наличие фаз роста *E. coli* в смешанной и раздельной популяциях совпадают. В количественном аспекте наблюдается более интенсивный прирост численности в смеси во время логарифмической фазы.

2. Количественный рост *Staph. aureus* в смешанной популяции резко отличается от такового при раздельном выращивании, так как несмотря на неизменный качественный характер фаз, их соотношение во времени изменилось. Таким образом, *E. coli* ингибировала развитие популяции *Staph. aureus* в смеси.

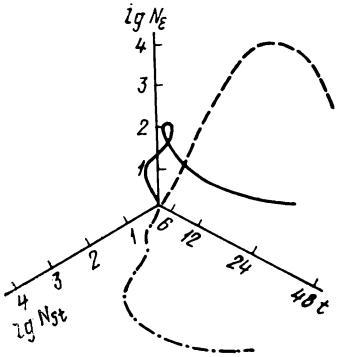


Рис. 2. Пространственная кривая развития смешанной бактериальной популяции *Staph. aureus* и *E. coli*.

Сплошная кривая — пространственная кривая; *штриховая* — проекция на главную координатную плоскость $N_S\,0t$, характеризующая развитие *E. coli* в смеси; *штрихпунктирная* — проекция на главную координатную плоскость $N_{St}\,0t$, характеризующая развитие *Staph. aureus* в смеси.

Конечно, по рис. 1, *а* и *б* судить о развитии всей смешанной популяции не представляется возможным, так как параметр изменения общей численности смешанной популяции $N_{об}(t)$ не дает дифференциации развития каждого из видов в смеси. В то же время, если известны результаты, аналогичные изображенным на рис. 1, *а* и *б*, то построение кривой, изображенной на рис. 1, *в*, не составляет трудности. Обратная же задача, т. е. построение кривых, описывающих развитие каждого из видов, по известной кривой изменения общей численности, по-видимому, неразрешима.

Предлагаем следующий способ построения кривой численности смешанной популяции, с помощью которого разрешается поставленная двуединая задача (рис. 2).

Поставим рис. 1, *а* перпендикулярно рис. 1, *б* так, чтобы совпали начало координат и ось времени. Из каждой точки кривой на рис. 1, *а* проведем прямые параллельно плоскости рис. 1, *б*, а из каждой точки кривой на рис. 1, *б* — прямые, параллельные плоскости рис. 1, *а*. Геометрическим местом точек пересечения прямых, параллельных плоскости рис. 1, *а*, с прямыми, параллельными плоскости рис. 1, *б*, будет некоторая пространственная кривая. Проекции этой кривой на плоскости рис. 1, *а* и *б* будут давать соответственно кривые развития либо *Staph. aureus*, либо *E. coli*, указанным способом дают пространственную кривую развития смешанной популяции.

Координатные плоскости $N_E\,0t$, $N_{St}0t$ будем называть главными координатными плоскостями.

Пусть кривая изменения численности *Staph. aureus* задается с помощью неявного уравнения $f_1(N_{St},\ t)=0$, где N_{St} — функция, характеризующая изменение численности *Staph. aureus* в смеси. Кривая изменения численности *E. coli* задается с помощью неявного уравнения $f_2(N_E,\ t)=0$, где $N_E(t)$ — функция, характеризующая изменение численности в смеси. Тогда пространственная кривая задается системой уравнений

$$(*)\begin{cases} f_1(N_{St},\ t)=0; \\ f_2(N_E,\ t)=0. \end{cases}$$

Пусть функция $N_{об}(N_{St}, N_E)$ соответствует пространственной кривой и задается неявным уравнением $f(N_{об}, N_{St}, N_E)=0$, где $N_{об}(N_{St}, N_E)$ — функция, характеризующая зависимость между *Staph. aureus* и *E. coli* в смешанной популяции, графиком которой является пространственная кривая. Причем $N_{об}(N_{St}, N_E)$ обладает свойством

$$(**)\begin{cases} f(N_{об}, N_{St}, 0)=f_1(N_{St}, t); \\ f(N_{об}, 0, N_E)=f_2(N_E, t). \end{cases}$$

Если $\bar{N}_{об}(t)$ — функция, характеризующая изменение общей численности смешанной популяции, то $\bar{N}_{об}(t) \neq N_{об}(N_{St}, N_E)$.

График функции $N_{об}(N_{St}, N_E)$ дает наглядное представление о количественном развитии смешанной популяции и делает возможным нахождение функций, описывающих развитие отдельных видов в смешанной популяции, в случае если известно уравнение $f(N_{об}, N_{St}, N_E)=0$ или вид функции $N_{об}(N_{St}, N_E)$.

Если число видов, составляющих смешанную популяцию, больше двух, то нарисовать график пространственной кривой нельзя (так как она будет находиться в k-мерном пространстве), но все приведенные выше рассуждения остаются в силе.

Пусть смешанную популяцию составляют виды $N_1, \ldots, N_k$, причем для каждой функции N_i, описывающей динамику численности i-го вида, существует соответствующая неявная функция $f_i(N_i, t)=0$. Тогда уравнение примет вид

$$(\Delta)\begin{cases} f_1(N_1, t)=0; \\ \cdot\ \cdot\ \cdot\ \cdot\ \cdot\ \cdot \\ f_k(N_k, t)=0. \end{cases}$$

Условие (Δ) задает k-мерную кривую, аналогичную пространственной кривой в двумерном случае. Аналогично вводится функция $N_{об}(N_1, \ldots, N_k)$, графиком которой является k-мерная кривая, описанная условием (Δ), и существует неявное уравнение $f(N_{об}, N_1, N_2, \ldots, N_k)=0$, соответствующее функции $N_{об}(N_1, N_2, \ldots, N_k)$.

Можно рассмотреть условия, аналогичные ($**$),

$$\begin{cases} f(N_{об}, N_1, 0 \ldots 0)=f_1(N_1, t); \\ \cdot\ \cdot\ \cdot\ \cdot\ \cdot\ \cdot\ \cdot\ \cdot\ \cdot\ \cdot\ \cdot\ \cdot\ \cdot\ \cdot\ \cdot \\ f(N_{об}, 0 \ldots 0, N_k)=f_k(N_k, t). \end{cases}$$

А также можно рассматривать проекции уравнения (Δ) не только на координатные плоскости, но и на любые гиперплоскости κ-мерного пространства, например, $f(N_{об}, N_1, N_2, 0 \ldots 0)=0$. Это уравнение неявно описывает динамику развития видов в смешанной популяции по отношению к другим видам. На наш взгляд, такое рассмотрение развития смешанной бактериальной популяции, а также подобных уравнений имеет широкие возможности

для создания имитаций развития конкретных смешанных популяций.

Таким образом, развитие смешанной двухвидовой бактериальной популяции может быть графически интерпретировано некоторой кривой в трехмерном пространстве, а проекции пространственной кривой на главные координатные плоскости позволяют получить раздельные кривые развития одновидовых популяций при совместном культивировании двух видов бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гиммельфарб А. А., Гинзбург Л. Р., Полуэктов Р. А.* и др. Динамическая теория биологических популяций. М.: Наука, 1974. 456 с.

2. *Иерусалимский Н. Д.* Основы физиологии микробов. М.: Изд-во АН СССР, 1963. 241 с.

3. *Печуркин Н. С., Терсков И. А.* Анализ кинетики роста и эволюции микробных популяций. Новосибирск: Наука, 1975. 215 с.

4. *Работнова И. Л., Иванова И. И.* Рост и развитие микробных культур.— В кн.: Успехи микробиологии. М.: Наука, 1971, № 7, с. 67—108.

5. *Смит Д. М.* Модели в экологии. М.: Мир, 1976. 184 с.

6. *Стрешинский М. О.* Некоторые закономерности роста клетки аэробных споровых бактерий.— Ж. общ. биол., 1955, т. XVI, № 1, с. 17—22.

7. *Уильямсон И.* Анализ биологических популяций. М.: Мир, 1975. 268 с.

8. *Bail O.* Untersuchungen uber die M-konzentration von Bakterien und Bakteriophagen.— Arch. f. Hyg., 1924, Bd 94, N 1, S. 54—72.

9. *Bail O.* Entstehung und Gesetze von Bakterienpopulationen, soziologische Studien an Disenteriebazillen.— Arch. f. Hyg., 1925, Bd 95, N 1, S. 1—46.

10. *Bail O.* Bakterienkultur als Hilfsmittel experimenteller Populationsforschung.— Arch. f. Hyg. und Bakteriol., 1929, Bd 102, N 2, S. 71—104.

11. *Monod J.* The growth of bacterial cultures.— Ann. Rev. Microbiol., 1949, N 3, p. 371—394.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ · 1980

Л. Е. ГЛАЗАЧЕВА, В. С. ЛЕВАШЕВ, Л. Н. КАЦ

СУБМИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВУЛЬГАРНОГО ПРОТЕЯ В ПРОЦЕССЕ Л-ТРАНСФОРМАЦИИ И РЕВЕРСИИ

Субмикроскопическая организация Л-форм, полученных из грам-отрицательных бактерий, описана многими авторами [1—3]. Однако последовательные этапы Л-трансформации изучены лишь для некоторых видов [4]. И только в одной из известных нам работ описаны последовательные стадии как Л-трансформации, так и реверсии [5].

Задача настоящей работы — изучение субмикроскопической организации и биологических свойств сферопластов, нестабильных и стабильных Л-форм, а также реверсировавших из нестабильных Л-форм культур.

Объектом исследования была культура *Proteus vulgaris* штамм 3156 и 4636, из которой получены стабильные Л-формы [6]. В качестве Л-трансформирующего агента использовали пенициллин. Сферопласты получали на бульоне из триптического перевара сердечной мышцы крупного рогатого скота с добавлением 10 % сахарозы и 0,02 % хлористого магния. Концентрация пенициллина составляла 1000 ед/мл среды. Культуру протея для получения сферопластов брали в логарифмической фазе роста в концентрации 10^8 клеток/мл.

Л-формы протея культивировали на средах разной консистенции: на бульоне с осмотическими стабилизаторами, как и сферопласты; на полужидкой среде с 0,3 % агара и на полутвердой среде с 1,3 % агара. В среды добавляли 10 % нормальной лошадиной сыворотки. Концентрация пенициллина в среде составляла от 500 до 1000 ед/мл. Стабильные Л-формы получали в результате многочисленных пассажей в тех же условиях, реверсировавшие культуры — на вышеуказанных средах без пенициллина.

Динамику образования сферопластов изучали в световом микроскопе МБИ-3 с помощью фазово-контрастного устройства КФ-4.

Для электронно-микроскопических исследований были взяты сферопласты, образовавшиеся через два часа после введения

в среду пенициллина, четырехсуточные культуры нестабильных и стабильных Л-форм, выращенные на полутвердой среде, и культура ревертантов протея, полученных из нестабильных Л-форм на третьем пассаже на среде без пенициллина.

Фиксацию объектов проводили сначала 2,5 %-м глютаральдегидом на фосфатном буфере pH, равном 6,5 с добавлением 0,5 М сахарозы и 0,01 М хлористого магния в течение 3 мин, затем дофиксировали 0,1 %-м OsO_4 на том же буфере в течение 18 ч. Фиксированную культуру обезвоживали и заключали в аралдит по общепринятой методике. Электронно-микроскопические исследования ультратонких срезов проводили на японском микроскопе JEM-7 при инструментальном увеличении 30 000x.

Через 15—20 мин после добавления к культуре пенициллина у палочковидных клеток наблюдали образование шаровидного выпячивания цитоплазмы в средней части клетки или на одном из ее концов (рис. 1). Было видно, как цитоплазма постепенно переходила в расширенный участок клеток, образуя шар, от поверхности которого отходили один или два расположенных под углом друг к другу конца бывшей палочковидной особи. Процесс заканчивался образованием сферических тел. Через 1,5—2 ч основная масса бактерий переходила в сферопласты, которые быстро увеличивались в размерах. У большинства сферопластов образовывались вакуоли на периферии клеток в виде полумесяца или круглые в центральной зоне цитоплазмы.

При электронно-микроскопических исследованиях ультратонких срезов сферопластов протея на поверхности их были обнаружены две периферические мембраны. На поверхности сферопласта (рис. 2, *а*) были хорошо видны наружная мебрана (нм), относящаяся к клеточной стенке, и внутренняя, являющаяся цитоплазматической мембраной (ЦПМ). Обе мембраны связаны перемычками (пр). При формировании сферопластов происходил разрыв материала перемычек. Наружная мембрана отходила от цитоплазмы (ц), образуя большую плазмолизированную вакуоль [7]. Часть материала перемычек хлопьями располагалась на наружной стороне цитоплазматической, а часть — на внутренней стороне наружной мембраны. На поверхности сферопластов были видны структуры в виде пузырьков (п), окруженные трехслойной мембраной и нередко образующие цепочки. Во внеклеточном пространстве находилось большое количество трубчато-везикулярных мембран (твм). Структура цитоплазмы не отличалась от таковой родительских особей. По периферии цитоплазмы располагались небольшие овальные структуры типа вакуоли (ств), окруженные трехслойной мембраной. Нуклеоид (н) в сферопластах часто располагался многочисленными участками по всей цитоплазме, занимая бо́льшую часть ее.

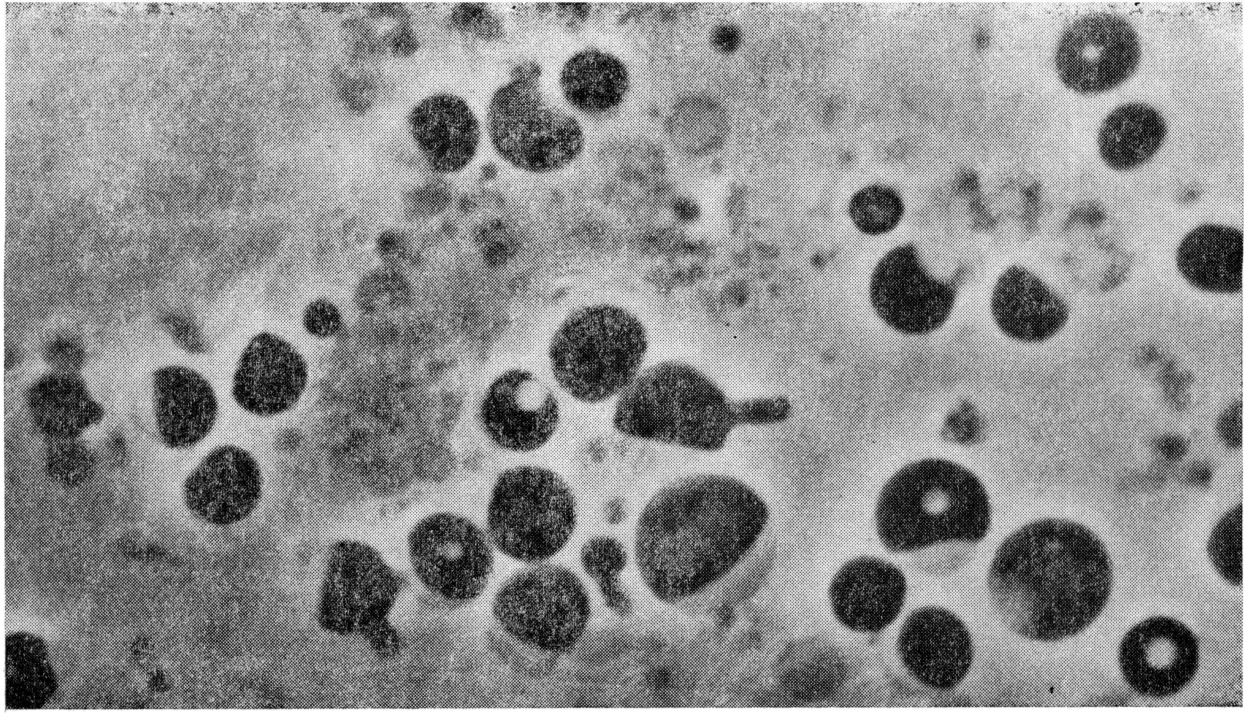


Рис. 1. Сферопласты в фазовом контрасте. ×2000.

Л-формы протея росли на полутвердых средах в виде типичных круглых Л-колоний диаметром до 3 мм, легко реверсирующих к исходным бактериям, и в виде мелких (диаметром от 0,5 до 1 мм) Л-колоний, дающих реверсию на среде без пенициллина через много пассажей или совсем нереверсирующие. Л-колонии развивались в течение 7—12 дней, их центр часто имел коричневую окраску.

На полужидкой среде Л-формы протея росли в виде взвешенных в среде пушистых колоний с коричневатым центром. Л-колонии вырастали в течение 5—8 дней. Диаметр их составлял от 0,2 до 1 мм. На поверхности среды образовывалась пленка, которая на 10—12-й день культивирования приобретала желтовато-коричневую окраску.

При росте на жидкой среде Л-формы также образовывали на поверхности пленку желтовато-коричневого цвета.

При исследовании Л-колоний протея с фазовым контрастом было обнаружено, что они состоят из шаровидных и вакуолизированных тел разной величины и субмикроскопических форм. В культурах, выросших на жидкой среде, наблюдалось кроме того значительное количество нитевидных структур. Размножение Л-форм происходило путем бинарного деления, обычно неравновеликого, и образования элементарных телец.

Более точную морфологическую характеристику нестабильных и стабильных Л-форм протея дало изучение их методом ультратонких срезов.

Популяцию нестабильных Л-форм составляют в основном крупные шаровидные или овальные клетки и в меньшем количестве — мелкие зернистые элементы. Диаметр особей варьировал от 1 до 50 мкм. Типичная клетка нестабильных Л-форм (см. рис. 3) по своей ультраструктуре во многом сходна с ультраструктурой сферопластов. В строении наружных покровов тех и других различий не выявлено. На поверхности и вокруг Л-форм также наблюдалось большое количество трубчато-везикулярных мембран (твм). В цитоплазме (ц) клеток имелись вакуоли разных размеров, внутри которых часто были видны элементарные тельца. По периферии цитоплазмы сохранялись описанные выше у сферопластов структуры типа вакуолей (ств). ДНК занимала центральную часть цитоплазмы и довольно четко отграничивалась от остальной ее части. Однако нередки случаи, когда ДНК располагалась сетью по всей цитоплазме среди ее гранулярного компонента.

Следует отметить, что в колониях нестабильных Л-форм от пассажа к пассажу увеличивалось число клеток протопластного типа, полностью утративших клеточную стенку и имевших на поверхности только цитоплазматическую мембрану (цпм).

Стабильные Л-формы *Proteus vulgaris* характеризовались ярко выраженным полиморфизмом. Наряду с округлыми и овальными особями встречалось значительное число клеток,

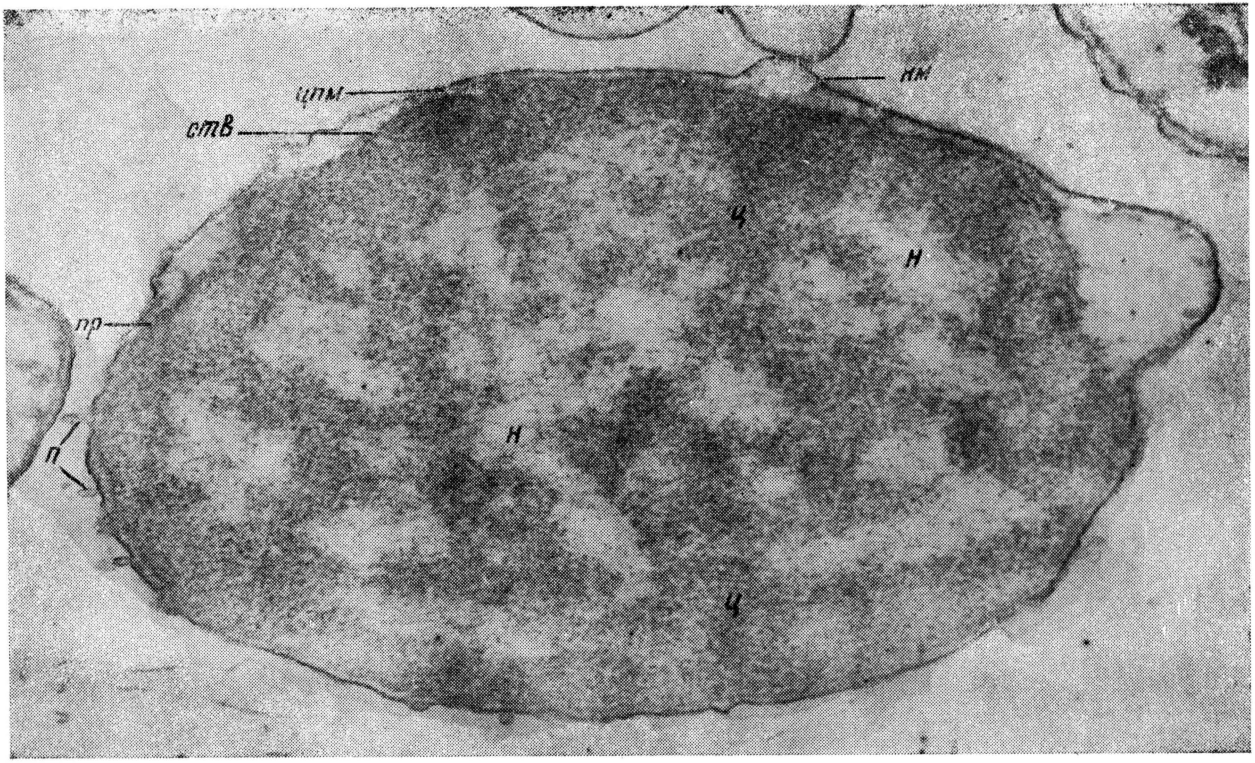


Рис. 2. Ультратонкий срез сферопласта. ×90000.

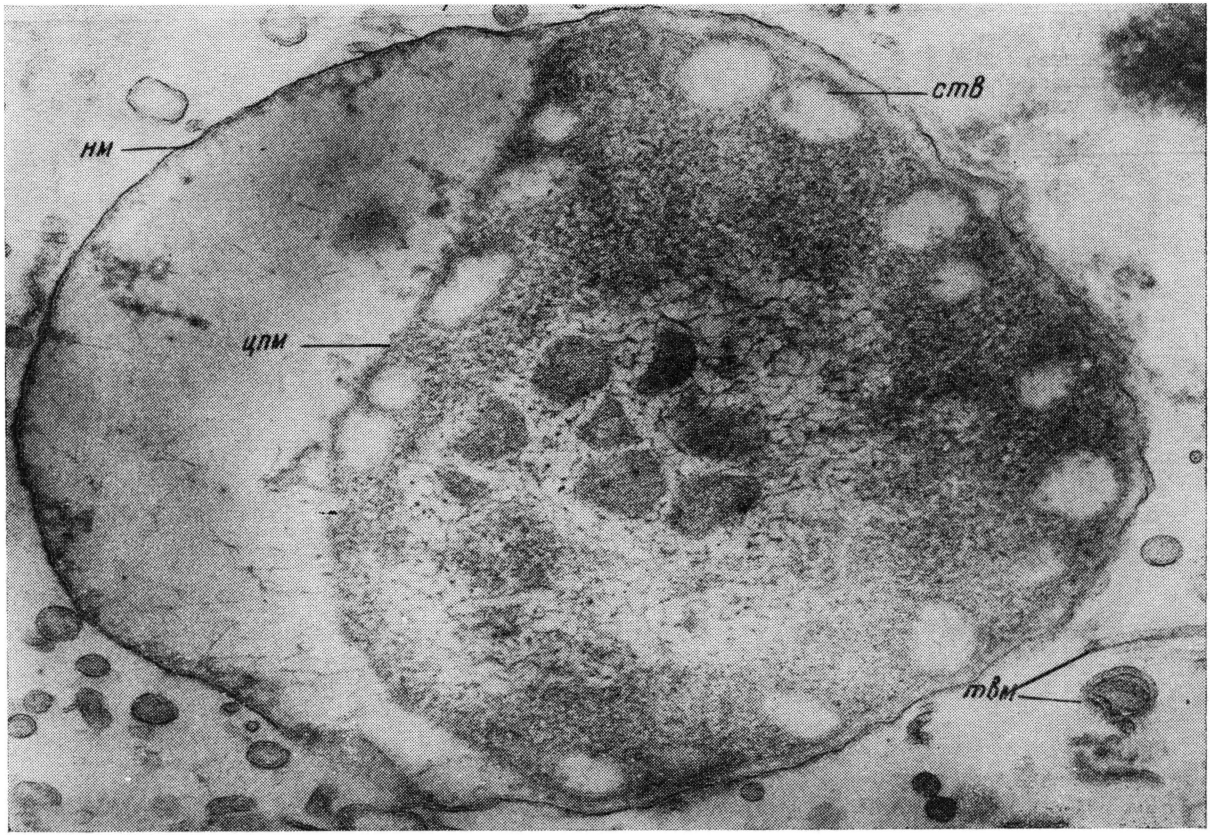


Рис. 3. Ультратонкий срез типичной клетки нестабильных Л-форм. ×90000.

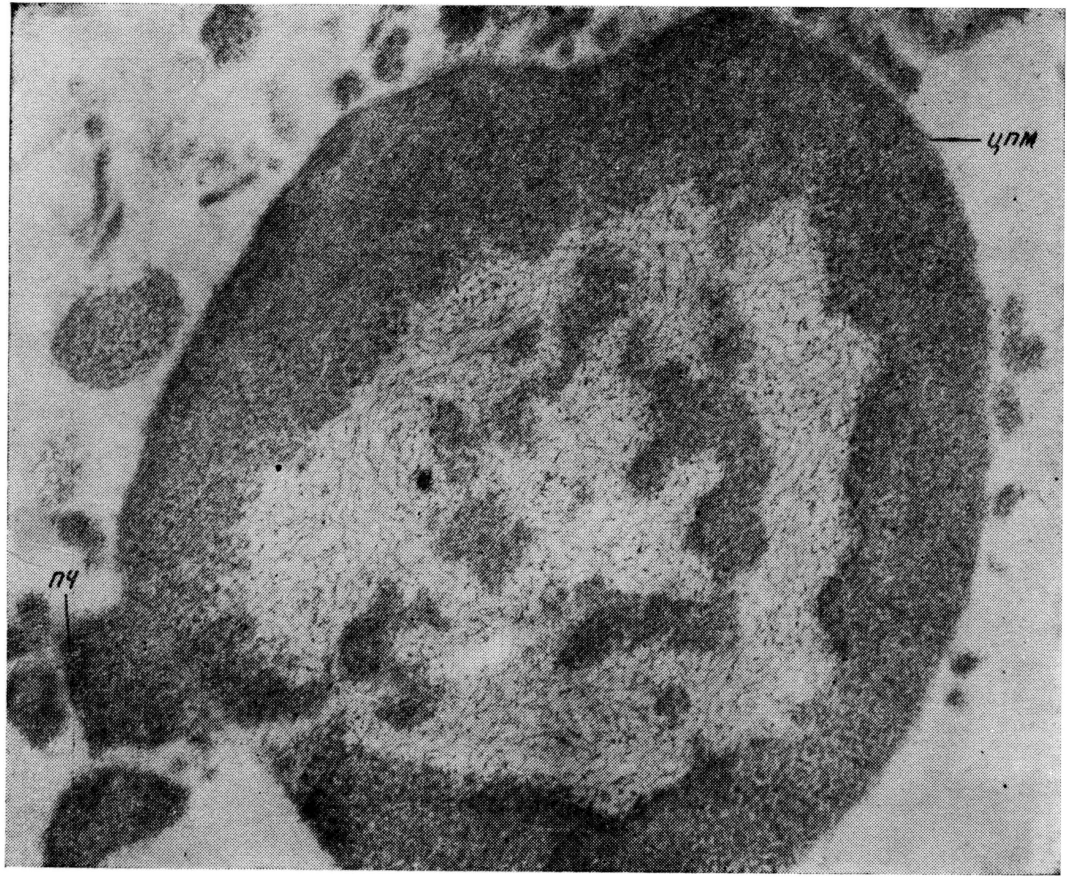


Рис. 4. Ультратонкий срез типичной клетки стабильных Л-форм. ×90000.

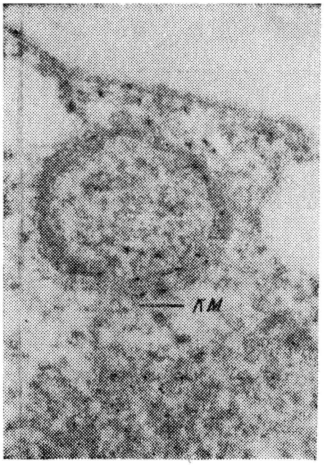
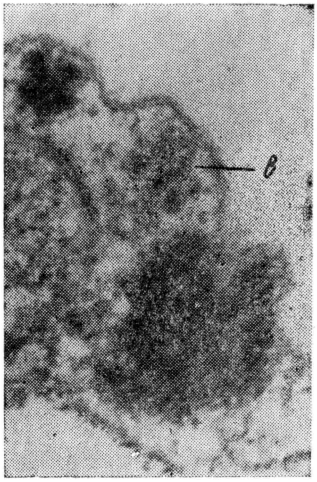


Рис. 5, *а*. Кольцевидные мембраны. ×90 000.

Рис. 5, *б*. Везикулы. ×90 000.



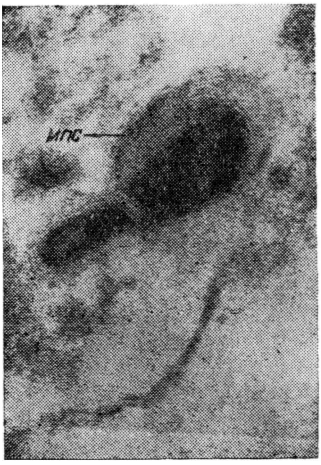


Рис. 5, *в*. Миэлиноподобные мембранные структуры. ×100 000.

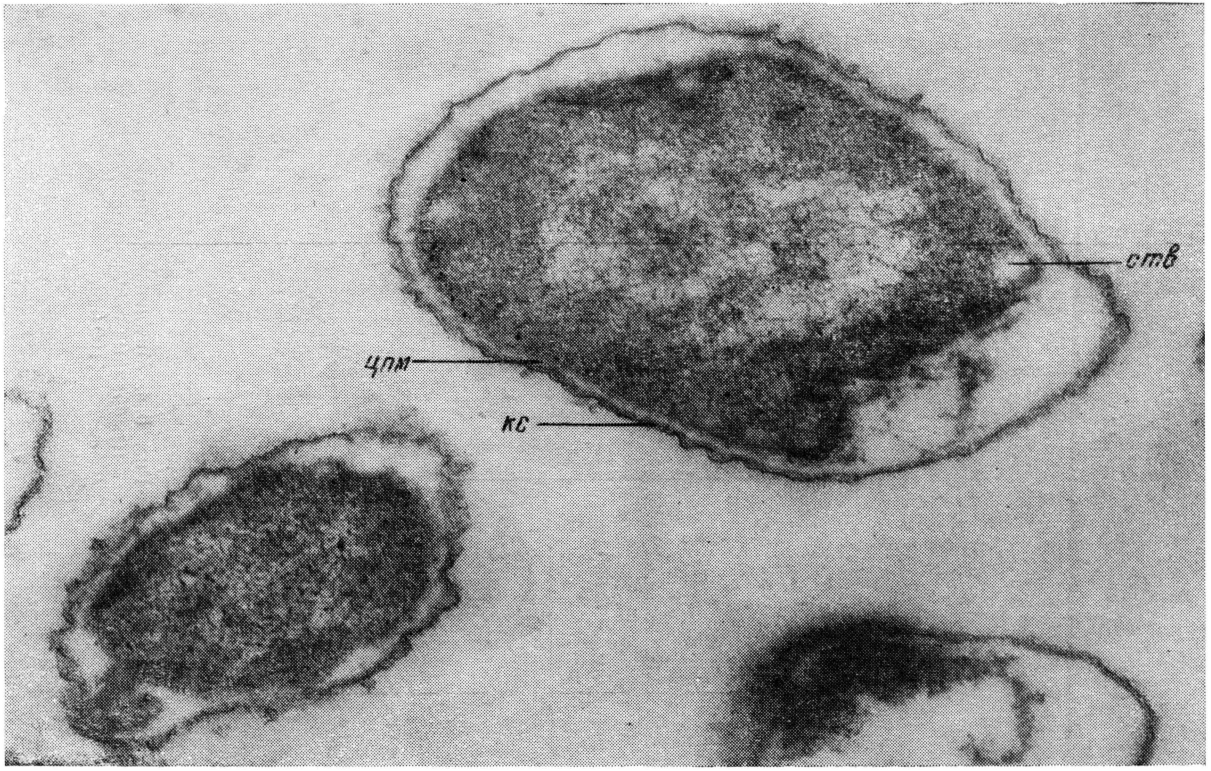


Рис. 6. Ультратонкий срез ревертантов. ×90 000.
Объяснения см. в тексте.

имевших неправильную угловатую форму и большое количество субмикроскопических элементов. На рис. 4 показана клетка протопластного типа стабильных Л-форм, от которой отпочковывались элементарные тельца разной формы (пч). Диаметр их колебался от 0,6 до 1,0 мкм. Наружным покровом клетки служила цитоплазматическая мембрана (цпм), которая часто выявлялась не на всей поверхности. В цитоплазме (ц) стабильных Л-форм располагались разнообразные мембранные структуры: кольцевидные мезосомы (км, рис. 5, *а*), везикулы (в, рис. 5, *б*), миелиноподобные мембранные структуры (мпс, рис. 5, *в*). Последние могут окружать субмикроскопические элементы, как показано на рис. 5, *в*. Нуклеоид (н) стабильных Л-форм хорошо выражен и отграничен от цитоплазмы (ц).

В ходе превращения бактерий в Л-формы кроме морфологических изменений происходила значительная трансформация биологических свойств, в основном выражавшаяся в изменении ферментирования углеводов. Бактериальная форма протея ферментировала из сахаров глюкозу и левулезу с образованием кислоты и газа. Л-форма протея 3156 ферментировала глюкозу, мальтозу и слабо — сахарозу с образованием только кислоты.

Значительно повышалась устойчивость Л-форм к пенициллину. Бактериальная культура была чувствительна к его концентрации равной 5 ед/мл. Л-формы давали хороший рост культуры при концентрации пенициллина 20 000 ед/мл.

Нестабильные Л-формы протея при пересеве на среду без пенициллина давали реверсию, т. е. образовывали бактериальные клетки. Ревертанты (рис. 6) имели клеточную стенку (кс), типичную для грамотрицательных бактерий, а также цитоплазму, идентичную цитоплазме исходных бактерий, в средней части которой располагался четко отграниченный от нее нуклеоид. По периферии цитоплазмы встречаются структуры типа вакуолей (ств). Клеточная стенка на концах клетки часто отходила от цитоплазматической мембраны (цпм), образуя пространство, в котором видны хлопья бесструктурного материала. Полное восстановление морфологии ревертантов наблюдали на 3—4-м пассаже на среде без пенициллина, что по времени совпадало с восстановлением биологических свойств ревертантов, типичных для исходной культуры протея.

Выводы

1. Под действием пенициллина у *Proteus vulgaris* образуются сначала сферопласты, затем нестабильные и стабильные Л-формы. В отсутствии пенициллина нестабильные Л-формы реверсируют уже на первом пассаже. Напротив, стабильные Л-формы не дают реверсии, либо реверсируют через большое число пассажей на среде без пенициллина.

2. При образовании сферопластов возникает вздутие на конце или посередине клетки, наружная мембрана во многих участках значительно отходит от цитоплазматической мембраны. В культуре нестабильных Л-форм большинство клеток имеет две мембраны, а также имеется значительное число лизированных клеток и обрывков мембран. У стабильных Л-форм клетки ограничены одной мембраной. При реверсии клетки приобретают палочковидную форму, но клеточная стенка местами значительно отходит от цитоплазматической мембраны, образуя довольно широкое периплазматическое пространство.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кац Л. Н., Константинова Н. Д., Раскова Т. М.* Ультраструктура Л-форм. Сообщение 3. Л-формы *Salmonella typhi* и *Proteus vulgaris*.— ЖМЭИ[1], 1975, № 3, с. 19—21.

2. *Шульга М. А., Кац Л. Н., Полковникова Л. Н., Прозоровский С. В.* Ультраструктура Л-форм. Сообщение 4. Л-формы неагглютинирующих вибрионов.— ЖМЭИ, 1975, № 6, с. 78—80.

3. *Weibull C.* The Morphology of Protoplasts, Spheroplasts, and L-Forms.— In: Microbial protoplasts, spheroplasts and L-Forms. Baltimore, 1968, p. 62—73.

4. *Taubeneck U., Gampert J.* Some notes on gramnegative bacteria with experimentally altered surface structure.— Folia Microb., 1967, vol. 12, N 3, p. 258—263.

5. *Толмачева Т. А., Кац Л. Н.* Биологические свойства и ультраструктура бруцелл в процессе Л-трансформации и реверсии.— ЖМЭИ, 1977, № 1, с. 90—93.

6. *Левашев В. С.* Биологические свойства Л-форм вибриона Мечникова и вульгарного протея.— Антибиотики, 1975, № 2, с. 12—15.

7. *Birdsell D. C., Cota-Robles E. H.* Production and Ultrastructure of Lysozyme and Ethylenediaminetetraacetate — Lysozyme Spheroplasts of *E. coli*.— J. Bacteriol., 1967, vol. 93, N 1, p. 427—437.

---

[1] Здесь и далее ЖМЭИ — Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ · 1980

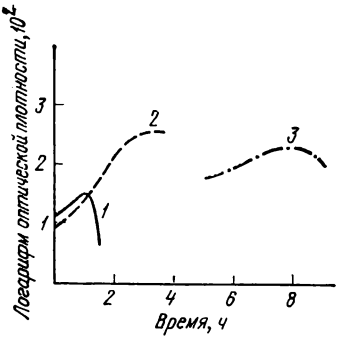
Н. А. БОБЫКИНА, О. Е. НАЗАРЬЕВ, Г. А. УГОДЧИКОВ

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ПРОЦЕССА ФАГОЛИЗИСА *ESCHERICHIA COLI* С УЧЕТОМ ВТОРИЧНОГО РОСТА БАКТЕРИЙ

В настоящее время в микробиологической промышленности все большее значение приобретает процесс непрерывного культивирования микроорганизмов. Однако в производстве фагов переход от периодического к непрерывному культивированию сопряжен со значительными трудностями, связанными с тем, что через некоторое время после полного фаголизиса начинается вторичный рост устойчивых к бактериофагу микробных клеток. Возможно, что подбором определенных скоростей протока при непрерывном культивировании удастся достичь такого состояния, при котором устойчивые к фагу бактерии будут вымываться, однако для этого необходимо изучить соотношение удельных скоростей роста чувствительных и устойчивых форм микроорганизмов.

Цель настоящей работы — исследование динамики процесса фаголизиса с учетом вторичного роста бактерий. Для исследований использовали кишечную палочку *E. coli* (штамм 0-44 № 97) и ДНК-содержащей фаг. *E. coli* инкубировали в реакторе на разведенном МПБ № 10 при температуре 37 °С. Культуру смывали с фляжки, используя 4,5 мл стерильного бульона. Посев бактерий производили с таким расчетом, чтобы исходная концентрация их составляла около 20 млн/мл. Начальная концентрация фагов была 0,1 %. Концентрацию биомассы бактерий измеряли по величине оптической плотности на ФЭК-56М при длине волны 540±30 нм. Концентрацию РНК измеряли орциновым методом в модификации Мейбаум [1]. Активность бактериофага определяли по методу Аппельмана [2]. Статистическую обработку данных производили на ЭЦВМ Hewlett-Packard 9830 A.

Нарастание биомассы кишечной палочки в контрольном опыте соответствовало классической кривой роста популяции микроорганизмов (рис. 1). В часовой культуре при фаголизисе скорость лизиса начинала превышать скорость роста биомассы бактерий. Полный лизис чувствительных клеток наблюдался в полуторачасовой пробе. Оптическая плотность здесь практи-



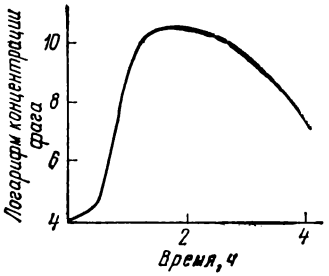
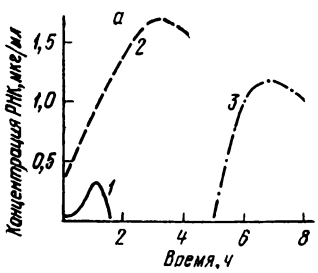


Рис. 1. Динамика биомассы клеток *E. coli*.

1 — кривая фаголизиса (первичный рост); *2* — контрольная проба; *3* — вторичный рост.

Рис. 2. Динамика биомассы фагов.



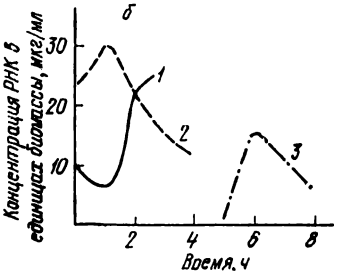
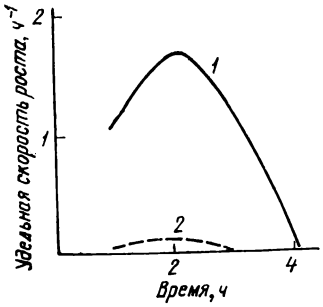


Рис. 3. Динамика концентрации тотальной РНК (*а*) и концентрации РНК в единице биомассы (*б*).

1 — при фаголизисе; *2* — в контрольной пробе; *3* — при вторичном росте бактерий.



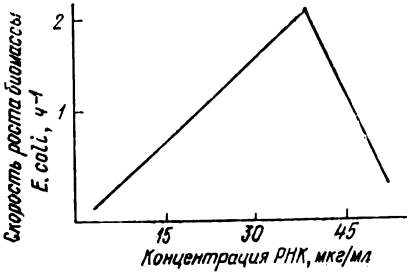


Рис. 4. Удельная скорость роста бактерий чувствительных (*1*) и устойчивых (*2*) к фагу.

Рис. 5. Зависимость скорости роста биомассы бактерий от концентрации РНК.

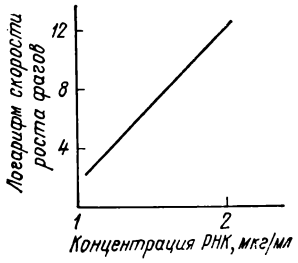


Рис. 6. Зависимость логарифмической скорости роста фагов от концентраций РНК.

чески равнялась нулю. В то же время концентрация фага достигала максимальной величины порядка 10^{10} частиц в 1 мл (рис. 2). В течение последующих 3,5 ч оптическая плотность была близка к нулю. После пяти часов инкубации начинался вторичный рост бактерийных клеток, связанный, вероятно, с мутациями, либо с приспособлением бактерий к новым условиям без изменения наследственной структуры.

На различных стадиях процесса фаголизиса определяли концентрацию тотальной РНК (рис. 3, *а*). При этом исходили из предположения, что синтез биомассы фагов зависит от количества рибосом в клетке-хозяине. А поскольку на рибосомальную РНК приходится около 85 % суммарной РНК клетки [3], то, определяя содержание последней, можно с достаточной точностью оценить количество рибосом.

Динамика изменения концентрации РНК в единице биомассы в контрольной и опытной пробе (см. рис. 3, *б*) показывает, что максимальная концентрация РНК в единице биомассы у устойчивых к фагу бактерий почти вдвое меньше, чем у чувствительных.

Были вычислены также удельные скорости роста чувствительных и устойчивых к фагу бактерий (рис. 4). В результате проведенных исследований выяснено, что удельная скорость роста чуствительных к бактериофагу клеток значительно превышает удельную скорость роста устойчивых форм, что, очевидно, может иметь важное значение для непрерывного культивирования фагов.

Между концентрацией бактериальной РНК и скоростями синтеза фагов и бактерий существует корреляция. Зависимость между концентрацией РНК и скоростью синтеза клеток *E. coli* носит характер, близкий к линейному (рис. 5). Излом на прямой, вероятно, не связан с содержанием рибонуклеиновой кислоты, а объясняется другими факторами, природа которых пока не ясна. Возможно, что лимитующим фактором процесса роста биомассы бактерий на этой стадии является концентрация одного из субстратов, содержащихся в культуральной жидкости. Что касается зависимости между содержанием РНК и скоростью синтеза фагов, то, исходя из данных, приведенных на рис. 6, можно сделать вывод, что связь между этими двумя переменными носит монотонный характер.

На основе полученных результатов представляется возмож-

ным оценить критическую скорость разбавления для устойчивых бактерий при непрерывном культивировании. По-видимому, экспериментальные исследования динамики процесса фаголизиса в проточных условиях позволят дать окончательный ответ о возможности получения биомассы фагов без вторичнорастущих бактерий в условиях непрерывного культивирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Мейбаум В. Б.* Определение пентоз в нуклеотидах посредством реакции Биаля.— Биохимия, 1945, т. 10, вып. 4, с. 353—359.
2. *Гольдфарб Д. М.* Бактериофагия. М.: Медгиз, 1961. 298 с.
3. *Лёви А., Сикевиц Ф.* Структура и функция клетки. М.: Мир, 1971. 579 с.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ · 1980

А. Г. ТКАЧЕНКО

О СООТНОШЕНИИ СЕЛЕКТИВНОГО И АУТОМЕТАБОЛИЧЕСКОГО ТИПОВ РЕГУЛЯЦИИ ЧИСЛЕННОСТИ И СТРУКТУРЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Развитие исходно гетерогенных внутривидовых бактериальных популяций в сложных органических и минимальных синтетических питательных средах — многоступенчатый филигранный процесс. Во-первых, ряд сред (например, минимальных), казалось бы, не может обеспечить развитие всех, в том числе ауксотрофных вариантов, входящих в состав засеваемых неоднородных внутривидовых популяций. Во-вторых, при росте микроорганизмов ряд свойств среды — уровень отдельных питательных компонентов, источников энергии, физико-химические и другие параметры — направленно меняется, и измененная среда может в дальнейшем выступать как селективный фактор в развитии культуры. В-третьих, входящие в состав неоднородной по генотипу популяции особи в разной форме и степени подвержены регуляторному влиянию экскретируемых в среду аутофакторов, составляющих ранее описанную нами систему специфической аутометаболической регуляции развития микробных популяций [1—3].

Поэтому можно предположить, что в меняющихся условиях и даже на разных фазах развития культур в исходно однотипной среде отдельные варианты — прототрофы и зависимые, быстро и медленно реплицирующиеся формы, кислотоустойчивые и иные особи, которые более устойчивы, чьи запросы наиболее полно удовлетворяются измененной средой развития или варианты, более подверженные регуляторным влияниям аутометаболитов — могут временно получать селективные преимущества. Лучшее выживание и преимущественное накопление таких форм может не только в значительной мере изменить структуру, темп развития культур, но и определить судьбу популяции в целом.

Ранее нами [1—3] была описана динамика структуры исходно гетерогенной внутривидовой популяции *E. coli*, периодически культивируемой в селективной для прототрофов минимальной среде М-9 со своеобразным соотношением прототрофов и зависимых, быстро и медленно реплицирующихся форм

на разных фазах развития культур. Накопленная информация оказалась столь своеобразной, что программа опытов была расширена и исследования продолжены. В настоящей работе описанные опыты использованы как контрольные в сопоставлении с наблюдениями за развитием однотипных популяций в фильтратах изогенных культур, где микроорганизмы кроме «алиментарных» селективных воздействий подвергались влиянию специфических стимулирующих аутометаболитов, входящих в систему аутометаболической регуляции развития.

Материалы и методы исследования

В эксперименте использовали неколициногенный производственный штамм *E. coli* М-17[1]. Для засева на синтетическую среду М-9 применяли 18-часовую бульонную культуру, которую отмывали в физиологическом растворе и доводили до концентрации 10 и 100 млн/мл. Культивирование проводили с постоянным перемешиванием при температуре 37 °С. Периодически (с интервалом 3 ч) в культуре исследовали: 1) концентрацию микроорганизмов — прямым подсчетом в камере Горяева с помощью фазово-контрастной микроскопии; 2) процент живых особей — стандартным методом высева серийных разведений образцов на мясо-пептонный агар; 3) уровень глюкозы в среде по методу А. Б. Райцис, А. О. Устиновой [4], экстрацеллюлярного белка по методу Лоури [5], pH среды на потенциометре pH-340; в отдельных опытах определяли концентрацию в среде ионов K^+ и Na^+ на пламенном фотометре ФПФ-58; соотношение прототрофной и зависимой фракций популяции определяли параллельными высевами образцов на МПА и агаризованную среду М-9; 4) структуру прототрофной фракции популяции по скорости роста составляющих ее особей в условиях синтетической агаризованной среды М-9 во всех характерных фазах роста культуры; 5) потребность составляющих популяции вариантов в 36 ростовых веществах — методом Холлидея [6].

Основное внимание было уделено исследованию динамики структуры популяции по скорости роста составляющих ее особей. Поэтому подробнее остановимся на методе, который был использован для определения данного показателя. В намеченные сроки из развивающейся популяции делали выемки, которые засевали на чашки Петри с агаризованной средой М-9 в концентрации, обеспечивающей появление на чашках числа колоний, оптимально поддающегося учету и не превышающего 50—80 колоний, при приблизительно равномерном их распределении на чашке Петри диаметром 11 см. Чашки с посевами термостатировали 48 ч при температуре 37 °С.

---

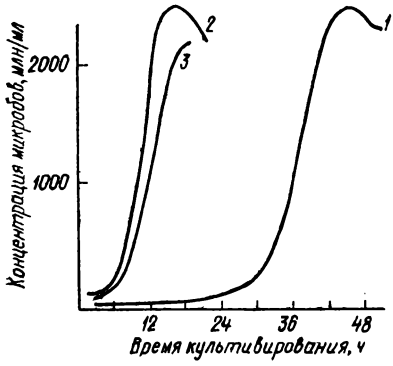
[1] Автор благодарит сотрудников ПНИИВС Н. И. Подчас и Е. Л. Красик за предоставленный штамм.

Учет результатов проводили следующим образом. Чашку Петри с выросшими на ней колониями помещали на предметный столик бинокулярного микроскопа МБИ-3 и с помощью окулярмикрометра измеряли диаметры всех входящих в поле зрения колоний. Поля зрения меняли до тех пор, пока число всех измеренных колоний не составляло 100—150. Диаметр колонии, выросшей через 48 ч инкубирования, служил условной мерой скорости размножения посеянной на среду клетки. Полученные таким образом значения группировали в вариационный ряд. Этот ряд разбирали на классы, размер которых определяли по формуле Стерджеса [7]. Затем подсчитывали среднее количество колоний каждого класса. Зная процент живых микроорганизмов в популяции и среди этих живых число колоний каждого класса, приходящееся на чашку, определяли частоту клеток в популяции, дающих на среде М-9 колонии определенного диаметра, т. е. обладающих характерной для них скоростью роста на минимальной селективной среде.

Результаты и их обсуждение

Как уже упоминалось, основная цель настоящей работы — исследование возможных приспособительных реакций бактериальной популяции на относительно селективные воздействия, возникающие в условиях прерывистого культивирования в синтетической среде М-9. Ранее [1—3] указывалось на существование в популяциях *E. coli* М-17, развивающихся в минимальных синтетических (контролируемых и частично коррегируемых) средах, метаболической системы регуляции, способствующей поддержанию оптимальной численности популяции в меняющихся условиях среды. Однако регулирующее влияние не исключало одновременно протекающие селективные приспособительные процессы, регулирующие численность популяции посредством преимущественного накопления в ней наиболее приспособленных к среде обитания прототрофных или зависимых вариантов, составляющих популяцию.

Для того, чтобы по возможности изолированно проследить эти два типа регуляторных реакций популяции, необходимо было подобрать такие условия, в которых бы преобладал один из них. По нашему предположению, такие условия можно создать, изменяя засевную концентрацию микроорганизмов. Используя малые засевные концентрации бактерий, мы на определенное время как бы сводим к минимуму возможность накопления в среде метаболитов до концентрации, способной оказать регулирующий эффект. В таких условиях на первый план должны выступать процессы селективного приспособления популяции к условиям минимальной среды, рассчитанной на развитие прототрофной фракции популяции. Наоборот, бóльшие засевные концентрации микроорганизмов благоприятствуют быстрому накоплению в сре-



Динамика численности *E. coli* М-17 при различной засевной концентрации, млн/мл:

1 — 10; *2* — 100; *3* — 10 (развитие в фильтрате изологичной культуры).

де аутометаболитов до уровня, способного оказать влияние, регулирующее рост популяции [1—3]. Поэтому в настоящих исследованиях, как и в предыдущих опытах, были использованы дозы инокулята, обеспечивающие концентрацию микроорганизмов в среде развития, равную 10 и 100 млн/мл.

Каждый вариант опыта проводился троекратно. На рисунке приведено графическое изображение динамики численности популяций при засевной концентрации 10 и 100 млн/мл. Кривые построены на основе средних значений концентрации микроорганизмов, определенной в трех экспериментах.

При сравнении динамики численности этих популяций прежде всего обращает на себя внимание отличие в длительности лаг-фазы. Если в первом случае она достигала 24 ч, то во втором — практически отсутствовала или слабо выражена. Этот факт является частным выражением общих закономерностей развития микробных культур, где длительность лаг-фазы выступает функцией засеваемой дозы. Длительность экспоненциальной фазы роста и максимальный уровень накопления биомассы в обеих популяциях приближались, если не копировали друг друга. Изменения основных показателей среды происходили пропорционально накоплению биомассы. Результаты их в виде средних величин по трем опытам приведены в табл. 1.

Весьма интересна динамика внутрипопуляционных сдвигов в культуре по скорости роста составляющих ее вариантов, выявленная засевами в среду малых и больших доз *E. coli*.

Средние (по трем опытам) данные, характеризующие динамику структуры популяции при засеве 10 млн клеток на 1 мл среды М-9 (табл. 2) показали, что частота клеток, способных давать потомство на агаризованной среде М-9, в инокуляте была мала и составляла $7{,}9 \times 10^{-6}$. При этом наблюдалась значительная гетерогенность составляющих по скорости роста. Методом Холлидея установлена зависимость основной части популяции по глютаминовой и никотиновой кислотам. Такая картина сохранялась, по крайней мере, в течение первой половины лаг-фазы. Дальнейший период, очевидно, можно связать с селективными процессами, протекающими в популяции, в результате которых произошел отбор вариантов, способных расти на синтетической

среде со сравнительно высокой скоростью. Об этом свидетельствует тот факт, что к 29-му часу развития произошла перестройка популяции, все особи которой были способны с относительно высокой скоростью размножаться в условиях минимальной среды. Этот период совпадал во времени с переходом культуры в экспоненциальную фазу роста и продолжался до 38-го часа наблюдения. Дальнейшая стабилизация и уменьшение численности популяции происходили на фоне появления и увеличения зависимой фракции: частота клеток, не способных образовывать колонии на минимальной агаризованной среде М-9, в культуре возрастала до 30 % к 44-му и 88 % к 115-му часу наблюдения. При этом методом Холлидея установлена их двойная зависимость по глютаминовой и никотиновой кислотам.

Как уже указывалось, именно этот период развития культуры характеризовался максимальным накоплением в среде внеклеточного белка, являющегося, по-видимому, следствием распада клеток популяции и накоплением продуктов обмена. В таких условиях, очевидно, зависимые варианты, способные утилизировать экстрацеллюлярный белок и продукты его распада, приобретают равную, а впоследствии бо́льшую селективную ценность. Следствием этого процесса можно объяснить факт преобладания в культуре в этот период зависимых вариантов.

Совершенно иная картина сопровождала развитие популяций, формируемых большими засевными дозами (табл. 3). Обобщенные результаты трех аналогичных опытов показали, что исходная частота клеток, способных образовывать колонии на среде М-9 в инокуляте, была в данном случае приблизительно той же, что и в предыдущей серии опытов с малыми засевными концентрациями. Неизменной оставалась и структура этих форм по скорости роста. Однако в дальнейшем структура популяции не претерпевала существенных изменений на всех этапах ее развития, и первоначальное соотношение быстро и медленно растущих, способных к развитию на минимальной и обогащенной средах, форм оставалось приблизительно однотипным.

Таким образом, фактически рост численности популяции осуществляется в основном за счет зависимой фракции клеток. Такое явление, очевидно, может наблюдаться лишь в случае присутствия в среде достаточных количеств биоорганических веществ, поступление которых возможно за счет экскретирования прототрофами аутометаболитов, либо за счет гибели и распада части клеток. Накопление этих веществ до необходимой концентрации, естественно, будет происходить тем быстрее, чем больше исходная численность популяции. По-видимому, именно с такой ситуацией мы сталкивались при засеве больших доз бактерий.

Высказанное предположение подтверждается и тем, что подобная картина при засеве малых доз складывалась лишь на поздних этапах развития.

Динамика физико-химических

Продолжительность культивирования, ч	pH среды			Концентрация
	I*	II	III	I
0	7,00±0,000	7,00±0,000	7,05±0,025	400,00±0,000
3	7,00±0,000	6,87±0,034	6,64±0,085	400,00±0,000
6	7,00±0,000	6,57±0,103	6,25±0,073	400,00±0,000
9	7,00±0,000	6,10±0,103	5,80±0,049	400,00±0,000
12	7,00±0,000	5,65±0,034	5,47±0,097	400,00±0,000
15	6,98±0,017	5,27±0,103	×	391,67±5,125
18	Не опр.	5,20±0,137	×	Не опр.
21	Не опр.	5,17±0,103	×	Не опр.
22	6,98±0,17	×**	×	391,67±5,125
25	6,92±0,017	×	×	376,67±10,249
28	6,87±0,034	×	×	368,33±17,082
31	6,82±0,068	×	×	366,67±17,082
34	6,75±0,137	×	×	325,00±10,249
37	6,03±0,017	×	×	323,33±22,207
40	5,65±0,137	×	×	162,33±11,274
43	5,30±0,000	×	×	79,33±4,441
46	5,25±0,188	×	×	0

* Засев, млн/мл: I—10, II—100; III — развитие в фильтрате при засеве 10 млн/мл.
** Знак «×» означает, что опыт прекращен.

Динамика структуры популяции *E. coli* М-17 по скорости роста

Диаметр колоний, мм	Продолжительность		
	0	9	29
0,05—0,25	0,39±0,013*	0,43±0,033	—
0,30—0,55	0,39±0,018	0,43±0,027	—
0,60—0,85	0,11±0,004	0,04±0,004	—
0,90—1,15	0,06±0,009	0,06±0,003	0,92±0,085
1,20—1,45	0,05±0,014	0,04±0,003	0,12±0,022
1,50—1,75	—	—	—
1,80—2,05	—	—	—
Частота клеток, образующих колонии на среде М-9	$(7,87\pm 0.759)\times 10^{-6}$	$(5,68\pm 0,69)\times 10^{-6}$	1,0

* Здесь и далее — частота клеток, образующих колонии указанного размера.

Таблица 1

показателей среды

глюкозы в среде, мг %		Концентрация белка в среде, мкг/мл		
II	III	I	II	III
406,66±6,833	400,00±0,000	0	0	65,00±2,427
340,00±10,249	333,00±9,224	0	71,00±3,416	63,50±3,641
148,00±11,957	245,00±12,136	25,00±3,416	78,33±3,416	62,25±2,427
78,33±5,125	84,00±1,942	29,00±3,416	90,00±3,758	68,25±2,913
29,00±2,391	23,75±2,427	30,00±4,100	123,33±3,416	67,00±3,156
0	×	31,67±3,416	133,33±1,708	×
0	×	Не опр.	138,33±1,708	×
0	×	Не опр.	140,33±0,342	×
×	×	33,33±5,125	×	×
×	×	41,00±3,416	×	×
×	×	51,67±5,125	×	×
×	×	54,67±5,125	×	×
×	×	60,00±4,441	×	×
×	×	63,33±3,416	×	×
×	×	71,00±2,391	×	×
×	×	80,67±2,050	×	×
×	×	95,00±5,125	×	×

Таблица 2

при засевной концентрации 10 млн/мл

культивирования, ч			
35	38	44	115
—	—	—	—
—	—	—	—
—	—	—	0,02±0,0006
0,85±0,085	0,92±0,510	—	0,02±0,002
0,22±0,022	0,12±0,022	—	0,52±0,034
—	—	0,65±0,034	0,37±0,036
—	—	0,20±0,034	0,07±0,001
1,0	1,0	0,78±0,034	0,12±0,016

Таблица 3

Динамика структуры популяции *E. coli* М-17 по скорости роста при засевной концентрации 100 млн/мл

Диаметр колоний, мм	Продолжительность культивирования, ч			
	0	3	10	21
0,05—0,25	0,23±0,003*	0,18±0,006	0,23±0,023	0,20±0,003
0,30—0,55	0,27±0,009	0,25±0,025	0,26±0,012	0,25±0,005
0,60—0,85	0,24±0,023	0,26±0,027	0,23±0,017	0,28±0,014
0,90—1,15	0,14±0,034	0,19±0,023	0,17±0,009	0,18±0,014
1,20—1,45	0,11±0,005	0,11±0,009	0,11±0,012	0,12±0,016
Частота клеток, образующих колонии на среде М-9, $\times 10^{-6}$	11,97±1,298	11,93±0,718	10,60±0,584	12,53±0,991

* Здесь и далее — частота клеток, образующих колонии указанного размера.

Один из возможных подходов к выяснению данного предположения был использован нами в следующей серии опытов. В первых четырех аналогичных экспериментах с помощью описанных выше тестов мы проследили развитие популяций, формируемых малыми засевными концентрациями в фильтратах изологичных культур.

Для этого предварительно в среду М-9 засевали 10 млн/мл клеток исследуемого штамма и культивировали, как это описано выше. Периодически контролировали концентрацию микроорганизмов. Через 37 ч инкубирования, т. е. в экспоненциальной фазе роста, при содержании в исходно небелковой среде 63 мг/л экстрацеллюлярного белка, культуральную жидкость освобождали от клеток путем фильтрации через бактериальные свечи Ф-7. В полученном фильтрате доводили уровень глюкозы и pH до исходных значений интактной среды. После этого в откорректированный по данным показателям фильтрат вновь засевали 10 млн/мл клеток того же штамма. Численность этой популяции изображена на рисунке (кривая *3*). При анализе ее прежде всего обращает на себя внимание почти полное отсутствие лаг-фазы. По этому признаку рост популяций, формируемых малыми засевными концентрациями в фильтрате, напоминал таковой при засеве больших доз в интактную среду М-9.

Таким образом, засев малых доз в фильтрат изологичной культуры способствовал укорочению лаг-фазы и быстрому накоплению биомассы до максимальных значений. При этом контролируемые параметры среды изменялись в соответствии с на-

Таблица 4

Динамика структуры популяции *E. coli* М-17 по скорости роста
(развитие в фильтрате изологичной культуры при засеве 10 млн/мл)

Диаметр колоний, мм	Продолжительность культивирования, ч			
	0	3	10	21
0,05—0,25	0,33±0,18*	0,29±0,021	0,35±0,013	0,29±0,029
0,30—0,55	0,35±0,015	0,33±0,009	0,29±0,008	0,34±0,030
0,60—0,85	0,12±0,006	0,17±0,025	0,16±0,017	0,20±0,011
0,90—1,15	0,10±0,004	0,11+0,004	0,13±0,016	0,10±0,012
1,20—1,45	0,10±0,008	0,10±0,006	0,08±0,008	0,08±0,009
Частота клеток, образующих колонии на среде М-9, $\times 10^{-6}$	8,90±0,238	9,00±486	9,20+0,631	8,90±0,255

* Здесь и далее — частота клеток, образующих колонии указанного размера.

коплением биомассы (см. табл. 1). Исключение составляла концентрация белка. Она оставалась приблизительно на первоначальном уровне в фильтрате и колебалась в пределах 65—68 мкг/мл.

Особого внимания заслуживают данные, отражающие в таких опытах динамику структуры популяции по скорости роста в фильтратах (табл. 4). Полную оценку этих исследований можно дать в сравнении с результатами аналогичных исследований, проведенных с засевами тех же доз бактерий в интактную среду.

Если структура инокулята в обоих случаях приблизительно совпадала, то при развитии популяции в фильтратах она не изменялась. В интактной же среде структура популяции претерпевала глубокие внутрипопуляционные сдвиги (см. табл. 2).

В этом смысле популяции, развивающиеся в фильтрате, аналогичны популяциям, формируемым большими засевными дозами в интактной среде. Сходство их в отношении динамики численности уже отмечалось выше. Хотя все еще остается невыясненным, что направляет развитие этих, отличных друг от друга, популяций по единому пути, мы предполагаем, что ведущая роль здесь принадлежит факторам аутометаболической природы. Присутствие их в среде, по-видимому, делает возможным развитие популяции без предварительной селективнои перестройки ее структуры. Такой своеобразный механизм приспособления к относительно селективным условиям среды дает большое преимущество в виде быстрого накопления численности

микроорганизмов до оптимального уровня, позволяющего популяции длительное время выживать в относительно обедненных и меняющихся условиях среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Пшеничнов Р. А., Колотов В. М., Коробов В. П.* и др. О существовании специфических факторов, контролирующих развитие микробной популяции: Первые наблюдения по выявлению фактора, лимитирующего накопление биомассы в культурах *E. coli* штамма М-17.— Экология, 1973, № 3, с. 5—13.

2. *Пшеничнов Р. А., Колотов В. М., Барихин С. Я.* и др. О существовании системы специфической аутометаболической регуляции развития микробных популяций: Первые наблюдения по выявлению аутофактора, стимулирующего развитие культур.— Экология, 1975, № 3, с. 42—50.

3. А. с. 491691 (СССР). Стимулирующая добавка к синтетической питательной среде для культивирования микроорганизмов/*Барихин С. Я., Ткаченко А. Г., Пшеничнов Р. А., Колотов В. М.* Опубл. Б. И., 1975, № 42.

4. *Райцис А. Б., Устинова А. О.* Ускоренное определение сахара в крови и спинномозговой жидкости толуидиновым методом.— Лабораторное дело, 1965, № 1, с. 33—35.

5. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent.— J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.

6. *Holliday R.* A new method for the identification of biochemical mutants of microorganism.— Nature, 1956, vol. 178, p. 987—990.

7. *Лакин Г. Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1973. 343 с.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ · 1980

Л. Е. КАЙГОРОДОВА

МЕТОД ПЕРВИЧНОГО КЛОНАЛЬНО-КОЛОНИАЛЬНОГО АНАЛИЗА КИСЛОТОУСТОЙЧИВОСТИ И ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ *ESCHERICHIA COLI* ПО ЭТОМУ ПРИЗНАКУ

Среди факторов, определяющих возможность, быстроту роста и размножения бактерий в лабораторных и природных условиях, концентрация свободных ионов H^+ и OH^- — один из основных. Можно полагать, что возможность поглощения и утилизации различных веществ, как и реализация тех или иных путей обмена веществ и энергии во многом определяется pH среды.

Успешный опыт выделения из природных биогеоценозов видов и штаммов, способных к развитию в средах с pH от 1 до 12, позволил сформулировать обоснованный вывод о возможном формировании характерных для этих условий и видов метаболических путей, отражающих этапы макроэволюционного приспособительного процесса и обеспечивающих занятие экологических ниш с резко отличной по pH средой обитания. При этом возможность развития микроорганизмов при крайних значениях pH — достаточно стабильный генетический признак, так как изменение pH в кислую или щелочную сторону вызывает выраженное угнетение процессов их роста и размножения [1—8].

Для большинства патогенных и части сапрофитических бактерий нейтральная или слабощелочная среда является оптимальной. Поэтому искусственное закисление среды или накопление в ней кислых микробных аутометаболитов в значительной мере замедляет, хотя и не всегда полностью прекращает, развитие популяций. Для объяснения этого явления привлекались сведения о возможной экскреции в среду обитания щелочных хелатов, изменении регуляции внутриклеточного транспорта кислых или щелочных веществ, значении буферности внутренней среды клетки, синтезе изоферментов с иным оптимумом pH или направленной фазовой смене путей обмена под влиянием регуляторных аутометаболитов [9].

Важное значение указанных факторов в процессах опосредованной регуляции микробного синтеза при колеблющихся значениях pH среды бесспорно, а поэтому перечисленные механизмы следует отнести к адаптивным — фенотипическим. Однако

это, видимо, не исключает возможность возникновения в составе популяции вариантов с измененными генотипами, которые оптимально реализуются в средах с соответствующими pH. Существование таких преадаптивных форм и селективное их накопление при изменении pH среды может явиться еще одним, ранее неизвестным, типом приспособительных процессов, реализуемых на популяционном уровне.

Для обоснования выдвинутой гипотезы представлялось необходимым, во-первых, разработать способ достаточного массового первичного клонально-колониального анализа внутривидовых бактериальных популяций на забуференных плотных питательных средах с градиентом pH от 4 до 8, во-вторых, установить наличие (или отсутствие) гетерогенности внутривидовых популяций по этому признаку, в-третьих, по возможности проследить в динамике протекание селективных процессов в исходно гетерогенных по этому маркеру популяций при развитии их в закисляемых питательных средах.

В работе использовали эталонную производственную культуру *E. coli* М-17, являющуюся основой лечебного и профилактического препарата колибактерина. Штамм предварительно пассировали на минимальной синтетической среде М-9 с pH равным 7—7,1 [10].

Из культуры, которая развивалась в некоррегируемой по pH среде, делали выемки в латентной фазе, в фазах логарифмического роста и отмирания. Взятые пробы центрифугировали и клетки дважды отмывали, после чего делали десятикратные разведения для высева на чашки Петри.

Плотные индикаторные среды готовились на основе единого цитратного буфера [12], кроме которого в состав сред включались компоненты среды М-9. Учитывая входящий в состав буфера Na_2HPO_4, из солевого концентрата стандартной среды М-9 были изъяты Na_2HPO_4 и KH_2PO_4, введены NaCl и KCl в эквивалентном количестве. В результате солевой концентрат для буферных сред имел следующий состав, г: KCl — 17,3, NaCl — 5, NH_4Cl — 10 в 1000 мл. Отсюда полный состав сред: лимонная кислота $+Na_2HPO_4$ (в соотношении, необходимом для создания нужного pH) + солевой концентрат (в модификации для кислых сред) + 20 мл глюкозы (20 %-й раствор) + 10 мл 0,1 М $MgSO_4$ + 10 мл 0,01 М $CaCl_2 + H_2O$ (до 1000 мл) + агар Дифко (от 1,5 до 3 % концентрации). В экспериментах были использованы индикаторные питательные среды с pH от 4,4 до 8. Получить плотные среды с более низким pH не удалось из-за разжижения агара. Проверка соответствия заданной и полученной концентраций водородных ионов в среде проводилась с помощью pH-метра 340 после сведения всех ее компонентов.

По числу колоний, выросших на чашках с той или иной индикаторной средой, определялся удельный вес вариантов, способных к росту при определенном pH среды. Диаметры расту-

щих колоний измеряли ежедневно, в течение 8—9 суток. Статистическую обработку результатов проводили по общепринятой методике с помощью критерия Стьюдента [1].

Анализ результатов экспериментов, которые мы рассматриваем как предварительные, показал следующее.

Предлагаемая методика первичного клонально-колониального анализа на градиенте плотных минимальных синтетических сред в целом оказалась приемлемой. Во всех случаях pH плотных индикаторных сред, изготовленных по описанной выше прописи, соответствовал расчетному. В диапазоне pH 4,4—8 они имели достаточно плотную консистенцию и не деформировались при засевах и дальнейшем термостатировании. Высокая прозрачность сред позволяла легко и достоверно проводить измерения и макроскопию выросших колоний в проходящем свете, не вскрывая чашек и не нарушая стерильности засевов.

Совпадающие результаты изучения одинакового посевного материала на разных сериях однотипной среды позволяют расценивать получаемую информацию как достоверную. Можно полагать, что среды, построенные на основе буферных растворов, сохраняли исходное селективное значение pH по крайней мере на первых этапах развития колоний.

Относительно высокая стандартность и демонстративность использованной методики уже в первых опытах позволила выявить неоднородность производственного штамма М-17 *E. coli* по способности роста составляющих его вариантов на питательных средах с разным pH. В инокуляте, взятом на логарифмической фазе роста, как и на соответствующем этапе развития культуры, из каждых 100 засеянных живых клеток на плотных индикаторных средах с pH 7,0 вырастало 98—100 %, с pH 6; 5; 4; 8; 4,6; 4,4 соответственно — 80; 60; 52; 48; 28 %. Неоднородность популяции по избранному маркеру сохранялась и на других этапах развития опытной культуры (фазах адаптации и старения), хотя распределение в популяции особей, способных расти на средах с pH 4,4—7, уже было несколько иным. Очевидно, предлагаемые среды могут быть использованы как индикаторные, позволяющие устанавливать и изучать гетерогенность бактериальных популяций по избранному признаку, а также, возможно, и как селективные — для отбора клонов, способных к росту при необычных для данного вида значениях pH.

Можно предположить, что гетерогенность проявляется и на средах с щелочным значением pH. Во всяком случае, при засеве тех же опытных образцов на аналогичную среду с pH 8 доля выросших колоний снижалась до 70—60 и 30 % при анализе внутривидовых популяций, взятых на этапах логарифмического роста, отмирания и адаптации.

---

[1] Большую помощь в статистической обработке материала оказал О. Н. Октябрьский.

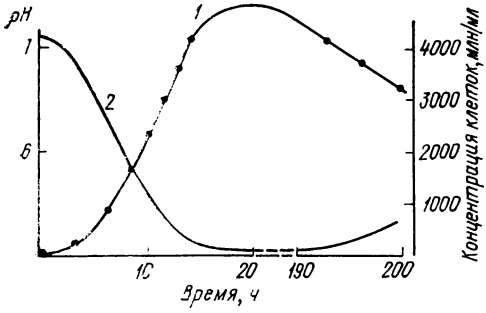


Рис. 1. Изменение pH при длительном периодическом культивировании *E. coli* M-17 на среде M-9.

1 — динамика численности микроорганизмов; *2* — pH среды.

Длительное (до 192 ч) культивирование в среде M-9 сопровождалось закономерным изменением ее pH от 7 до 5,3 (рис. 1). В этих условиях процент клеток, способных развиваться на среде с pH 5 возрастал с 41 до 70—80 %, на среде с pH 4,8 — от 38 до 70 %, на плотных средах с pH 4,6—4,4, соответственно — от 32—24 до 60—50 % (рис. 2).

Такие большие изменения процента особей в популяции, способных к росту на индикаторных средах с низким значением pH вряд ли случайны. Скорее они отражают либо физиологическую перестройку обменных процессов, либо являются следствием селекции генотипов, способных к преимущественному росту в меняющихся условиях среды. Неспособность части популяции осуществлять свой метаболизм на средах с pH 4,4—4,8 (при выраженном размножении других) скорее свидетельствует о наличии качественных, чем количественных различий, а наблюдаемая динамика структуры популяции — о гено-, а не фенотипической ее перестройке при изучаемом селективном воздействии.

Подтверждение высказанной гипотезы мы находим и в результате определений быстроты размножения вариантов, растущих на индикаторных средах. Ранее [11] была описана прямая зависимость между накоплением биомассы и диаметром бактериальных колоний при развитии *E. coli* штамма 17 на средах типа МПА, Эндо и M-9. Нами этот тест был применен для оценки скорости роста вариантов с различной кислотоустойчивостью. Как уже указыва-

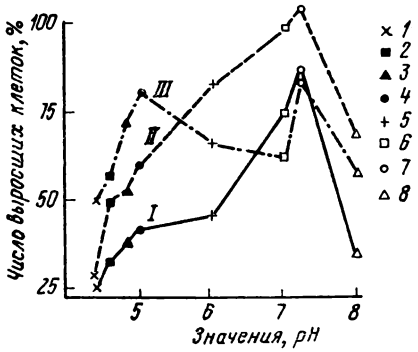


Рис. 2. Для клеток *E. coli*, способных к росту на средах с разными значениями pH по фазам развития культуры.

I — фаза адаптации; *II* — экспоненциальная фаза; *III* — фаза отмирания. 1—2 — значения pH: *1* — 4, *2* — 4,6; *3* — 4,8; *4* — 5; *5* — 6; *6* — 7; *7* — 7,2; *8* — 8.

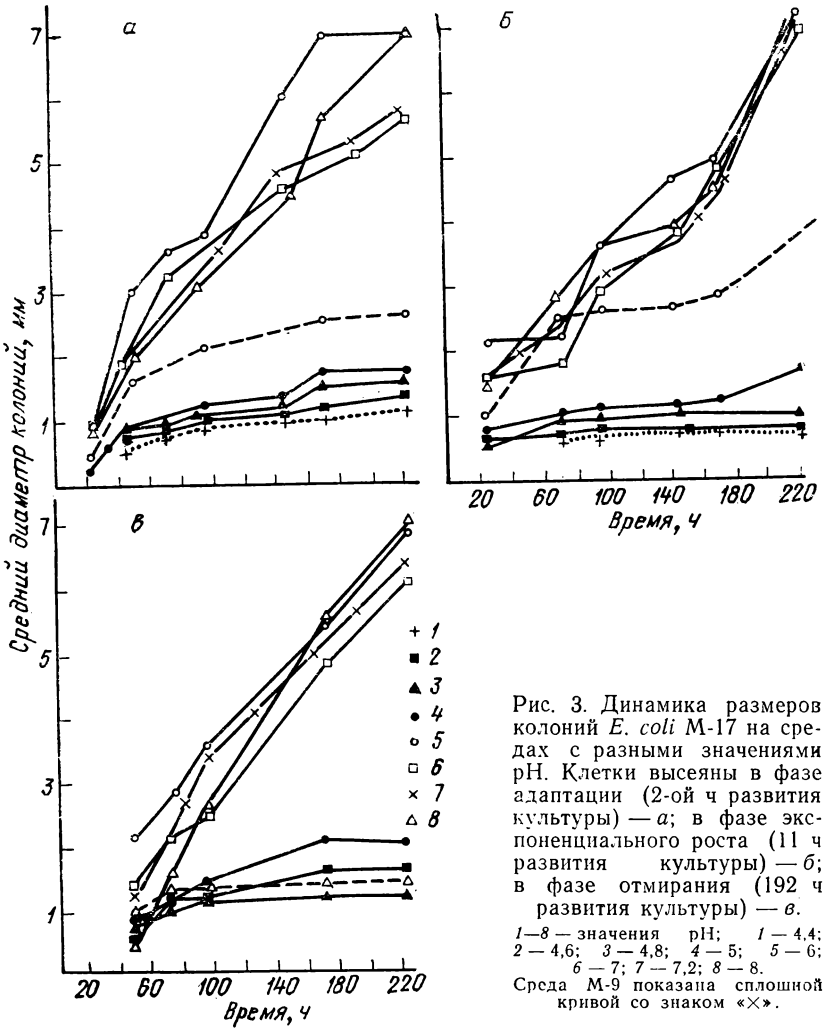


Рис. 3. Динамика размеров колоний *E. coli* М-17 на средах с разными значениями pH. Клетки высеяны в фазе адаптации (2-ой ч развития культуры) — *а*; в фазе экспоненциального роста (11 ч развития культуры) — *б*; в фазе отмирания (192 ч развития культуры) — *в*.

1—8 — значения pH; *1* — 4,4; *2* — 4,6; *3* — 4,8; *4* — 5; *5* — 6; *6* — 7; *7* — 7,2; *8* — 8. Среда М-9 показана сплошной кривой со знаком «×».

лось, инокулят с выемки из культур на фазах адаптации, логарифмического роста и отмирания засевали на индикаторные плотные среды с pH 4,4—8, и диаметры развивающихся колоний замеряли ежедневно. Средние результаты по каждому из восьми дней наблюдений приведены на рис. 3.

Сравнение рис. 3 *а*, *б* и *в* убеждает в значительном сходстве этих результатов. Популяции разного «возраста» на плотных средах с одним и тем же значением pH с 24 по 192-й ч, т. е. на протяжении восьми суток наблюдений, формировали колонии если не одинакового, то примерно такого же диаметра. Более интересно другое. Динамика увеличения размеров колоний,

растущих на плотных средах с разным pH, была резко различной. При анализе результатов, отраженных на рис. 3, возникает мысль о существовании в популяции на всех этапах ее развития двух качественно отличных вариантов, одни из которых дают характерный рост на плотных средах с pH 7—8, другие — в диапазоне pH 4,4—6. Последние отличаются тем, что на всех этапах роста колоний их диаметр, как правило, и особенно на поздних этапах развития, был в 2—3 раза меньше, чем на средах с pH, близким к нейтральному.

Данные рис. 3 отражают результаты ежедневного, в течение восьми суток, измерения сотен колоний. Описанная разница не только весьма наглядна, но и статистически достоверна. Вместе с тем, представленные данные еще не раскрывают природы наблюдаемых явлений. И если возможность и целесообразность применения плотных синтетических сред с градиентом pH для исследования указанных явлений представляется несомненной, а гетерогенность изучаемых популяций по возможности роста на таких средах — очевидной, то существо наблюдаемого селективного процесса и механизмов, лежащих в его основе, требует более глубокого изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Работнова И. Л.* Роль физико-химических условий pH и H_2 в жизнедеятельности микроорганизмов. М.: Изд-во АН СССР, 1957. 223 с.

2. *Вербина Н. М.* Приучение дрожжей к повышенной щелочности среды.— Микробиология, 1955, т. 24, с. 681—683.

3. *Kushner D. I., Lisson T. A.* Alkali resistance in a strain of Bacillus cereus pathogenic for the larch sowfly Pristifora etiehonii.— J. Gen. Microbiol., 1959, N 21, p. 96—101.

4. *Работнова И. Л.* Об активном изменении микроорганизмами условий среды в соответствии со своими потребностями.— Труды Института микробиологии, 1958, вып. 5, с. 80—85.

5. *Chislett M., Kushner D. I.* A strain of Bacillus circulans capable of growing under higly alhaline conditions.— J. Gen. Microbiol. 1961, N 24.

6. *Ибрагимова С. И., Неронова Н. М., Работнова И. Л.* Кинетика торможения скорости роста *Propionibacterium shermanii* водородными и гидроксильными ионами.— Микробиология, 1969, № 38, с. 933—941.

7. *Андреева Е. А., Шульговская Е. М., Работнова И. Л.* Торможение роста *Candida utilis* H^+ и OH^- ионами.— Микробиология, 1970, № 39.

8. *Карасевич Ю. Н.* Экспериментальная адаптация микроорганизмов. М.: Наука, 1975. 350 с.

9. *Сысоев О. В., Раев А. Б., Коробов В. П.* Об активности некоторых ферментов энергетического обмена при развитии *E. coli* M-17 в различных условиях роста.— В кн.: Экология и популяционная генетика микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1975, с. 116—121.

10. Сборник методик по генетике микроорганизмов/Под ред. Р. Клауса и У. Хейса. Перев. с англ. М.: Медицина, 1970. 282 с.

11. *Соколова Н. А.* Сравнительное изучение развития популяции *Escherichia coli* M-17 на агаризированных полных и минимальных питательных средах.— В кн.: Механизмы регуляции развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1977, с. 77—79.

12. *Калинин Ф. Л., Лобов В. П., Жидков В. А.* Справочник по биохимии. Киев: Наукова думка, 1971. 882 с.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ · 1980

Г. И. СТАРОДУБЦЕВА, В. М. МИНАЕВА, Л. Ф. КОРЗУХИНА,
Л. И. КОКШАРОВА, Р. В. ШИТОВА, Т. Г. ПАРХОМЕНКО

К СТРУКТУРЕ ПОПУЛЯЦИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАЦИИ ОБИТАНИЯ КЛЕЩЕЙ В РАЗЛИЧНЫХ ЛАНДШАФТНО-КЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОНАХ

Циркуляция вируса клещевого энцефалита в составе биоценозов с участием широкого круга прокормителей предопределяет пассирование его через организм различных животных и при определенных условиях способствует формированию различного популяционного состава возбудителя в природных очагах. Ряд исследователей [1—4], изучая штаммы вируса клещевого энцефалита, выделенные в природных очагах различных типов, указывают на определенные качественные различия, а также на значительные количественные колебания вирофорности клещей. Согласно их наблюдениям, активность природных очагов на обжитых участках бывает наиболее интенсивной.

Большинство исследователей при изучении вирофорности клещей используют метод интрацеребрального заражения белых мышей, хотя он в ряде случаев не дает истинного представления о широте диссеминации вируса в клещах. Поэтому некоторые исследователи [5—7] наряду с биопробой пытаются применить другие методы (интерференцию в культуре ткани, иммунизацию белых мышей, выявление вируса в культуре ткани методом иммунофлуоресценции и т. д.).

В настоящей статье представлены материалы десятилетних результатов изучения зараженности клещей вирусом клещевого энцефалита, собранные на различных стациях, условно обозначенных цифрами I, II, III. Стация I располагалась в непосредственной близости от населенного пункта и обозначалась как антропургический очаг; стация II находилась в тайге, неизмененной хозяйственной деятельностью человека (первичный или «дикий» очаг); стация III соответствовала пастбищу, в ряде случаев она территориально совпадала со стацией I.

Исследование клещей проводили двумя методами: общепринятой биопробой на белых мышах и реакцией гемагглютинации, методика которой разработана нами [8, 9]. Всего исследовали 6300 клещей, разделенных на партии по 10 особей. При исследовании 630 партий клещей 122 (17,3 %) дали положитель-

Таблица 1

Характеристика вирофорности клещей в различных стациях обитания

Стация	Колич. партий	РГА положительная	Биопроба положительная	Частота выделения вируса из образцов		Вирофорность клещей по данным, полученным двумя методами
				РГА+	РГА—	
I	216	41 (17,3)*	18 (7,3%)	1:14	1:13,6	56 (22,8)
II	217	35 (16)	11 (5)	1:8,7	1:26,5	42 (19,3)
III	98	31 (22,5)	15 (15,3)	1:4,4	1:9	39 (39,7)
I, II	69	15 (21,8)	10 (14,5)	1:3	1:10,8	20 (28,9)

* В скобках — доля партий с положительными РГА, биопробой и вирофорность клещей, %.

ную реакцию гемагглютинации. Частота выделения вируса из этих образцов равнялась 1 : 5,7. Из 508 клещевых взвесей с отрицательными результатами РГА выделено 35 штаммов вируса клещевого энцефалита. Частота выделения вируса из этих партий клещей составляла 1 : 14,3, т. е. в этом случае вирус выделялся в 2,5 раза реже, чем из РГА-положительных образцов. Вирофорность клещей по результатам биопробы составляла только 8,5 %, комплексное же исследование повышало долю вирофорности до 25 %.

Широта диссеминации вируса в очагах и качественные различия штаммов могут зависеть от природных условий в месте расположения очага. В доступной литературе мы не встретили

Таблица 2

Характеристика вирофорности клещей в различных стациях обитания некоторых ландшафтно-климатических подзон

Ландшафтно-климатическая подзона	Стация	Колич. партий	РГА положительная	Биопроба положительная	Частота выделения вируса из образцов		Вирофорность клещей по данным, полученным двумя методами
					РГА+	РГА—	
Горной тайги	I	89	20 (22,4)*	4 (4)	1:20	1:22	25,7
	II	89	7 (20,6)	4 (13,9)	1:6	1:7,3	31
	III	33	11 (33)	6 (18)	1:11	1:4,4	48,2
Южной тайги	I	95	12 (12,5)	13 (13,5)	1:12	1:7	25,2
	II	67	12 (17,9)	2 (3)	1:2	1:55	20,8
	III	5	1 (20)	—	—	—	20,0
Широколиственно-хвойных лесов	I	62	10 (16,1)	—	—	—	16,1
	II	121	18 (14,8)	6 (5)	1:6	1:34	17,3
	III	60	18 (31,6)	9 (15)	1:2,1	1:15,6	35
	I, III	69	15 (21,7)	10 (14,4)	1:3	1:10,8	28,9

* В скобках — доля партий с положительными РГА и биопробой, %.

характеристики свойств вируса и вирофорности клещей в зависимости от стации обитания, поэтому, на наш взгляд, представляют интерес полученные нами в ходе исследований данные о вирофорности клещей в упомянутых трех стациях (табл. 1).

Как видно из табл. 1, зараженность клещей вирусом клещевого энцефалита по данным РГА была наивысшей в стации III и составляла 22,5 %. Близкие результаты (21,8 %) дало исследование смешанных партий стаций I—III. Зараженность клещей, собранных в стациях I и II, составляла соответственно 17,3 и 16 %. Результаты биопробы оказались аналогичными, хотя в целом процент вирофорности был в 2—3 раза ниже. Использование комплекса методов повышало результативность исследования, при этом соотношения между стациями оставались примерно такими же (22,8; 9,3; 39,7; 28,9 % соответственно в I—II—III и в I, III стациях).

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что эпидемическая опасность наиболее высока в районах антропургических и пастбищных очагов.

Следующим этапом работы было выявление зараженности клещей в различных стациях некоторых ландшафтно-климатических зон (табл. 2).

Анализ материалов табл. 2 показывает, что данные РГА и биопробы в значительной мере близки у клещей стаций II и III подзоны горной тайги и широколиственно-хвойных лесов. Вирофорность клещей стации I подзоны горной тайги и стации II подзоны южной тайги была сходной в том отношении, что при высокой гемагглютинирующей активности вирус систематически выделялся на мышах, хотя это выделение было значительно меньшим, чем РГА. В стации I подзоны южной тайги вирофорность клещей по данным биопробы оказалась несколько выше, чем по данным РГА (соответственно 13,5 и 12,5 %). Наконец, в стации III подзоны южной тайги и стации I в подзоне широколиственно-хвойных лесов при значительной гемагглютинирующей активности вирус на белых мышах не выделялся совсем. Эти данные демонстрируют неоднородность популяции вируса клещевого энцефалита.

Соотношение гемагглютинирующей активности вируса и вирулентности его для мышей было различным в разных стациях обитания исследованных нами ландшафтно-климатических зон.

Выводы

1. Для выявления вируса клещевого энцефалита в клещах целесообразно пользоваться комплексом методов, что повышает результативность исследований до 25 %.

2. Свойства вируса клещевого энцефалита в определенной степени зависят от мест обитания клещей. Наиболее выражен-

ными гемагглютинирующими и патогенными свойствами обладали штаммы, выделенные из клещей, собранных на пастбищных стациях.

3. Выявлены различия гемагглютинирующей активности и вирулентности вируса для белых мышей в зависимости как от стации обитания, так и ландшафтно-климатической зоны расположения последней, что свидетельствует о неоднородности вирусной популяции.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бутенко А. М.* Об экологических факторах типизации природных очагов клещевого энцефалита.— В кн.: Клещевой энцефалит, кемеровская клещевая лихорадка, геморрагические лихорадки и другие арбовирусные инфекции. М., 1964, с. 221—224.

2. *Феоктистов А. З., Чипалина В. М.* Вирулентность вируса клещевого энцефалита как отражение его экологической адаптации.— В кн.: Материалы XV итоговой конференции Института полиомиелита и вирусных энцефалитов. М., 1975 М., с. 366.

3. *Шилова С. А.* Природные очаги клещевого энцефалита южной тайги Среднего Урала. Автореф. докт. дисс. М., 1966. 26 с.

4. *Волков В. И.* Распространение иксодовых клещей на территории Хабаровского края.— В кн.: Вопросы медицинской географии и курортологии: Труды Забайкальского филиала Географического общества СССР, 1967, вып. 1, с. 95—98.

5. *Андронников В. А., Тюльдина А. С., Семушкина Т. В.* и др. Клещевой энцефалит и геморрагические лихорадки с почечным синдромом в Европейской части РСФСР: Материалы межобластной научно-практической конференции. Ижевск, 1968, с. 20—23.

6. *Гольдфарб Л. Г., Заклинская В. А.* Отдельные результаты массовой вакцинации населения против клещевого энцефалита в районах с высоким распространением вируса.— В кн.: Материалы XVI научной сессии Института полиомиелита и вирусных энцефалитов. М., 1968, вып. 3, с. 12.

7. *Кошкина Т. В., Земская А. А., Баннова Г. Г.* и др. Некоторые особенности очага клещевого энцефалита в Хабаровском районе Вологодской области.— В кн.: Материалы XV итоговой конференции Института полиомиелита и вирусных энцефалитов. М., 1975, с. 304—305.

8. *Стародубцева Г. И.* Применение реакции гемагглютинации для выявления вируса клещевого энцефалита в экспериментально зараженных иксодовых клещах.— В кн.: Клещевой энцефалит: Труды Перм. мед. ин-та, 1967, с. 72.

9. *Стародубцева Г. И., Касатова О. А.* Изучение вирофорности спонтанно зараженных клещей при помощи реакции гемагглютинации.— Там же, с. 77.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР • УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ • 1980

Э. С. ГОРОВИЦ, О. А. ТИМАШЕВА, В. П. ВТЮРИН

ОРНИТОФАУНА ПЕРМСКОЙ ОБЛАСТИ КАК РЕЗЕРВУАР ОРНИТОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Природные биоценозы возбудителя орнитоза, сложившиеся в процессе эволюции, характеризуются сравнительно незначительным видовым разнообразием «хозяев». В этом заключается одна из основных экологических особенностей орнитоза. Циркуляция возбудителя в естественных и вторичных хозяйственных очагах связана главным образом с птицами.

В Пермской области встречается 216 видов и подвидов птиц, в том числе 48 оседлых, 23 пролетных, гнездится и улетает 140 видов и пять видов прилетает на зимовку [1]. Из них, по литературным данным [2], 16 видов могут быть носителем возбудителя орнитоза, в том числе коршун черный, куропатка серая, сорока, щегол, грач, иволга, черная крачка, болотная сова, чиж, гусь-гуменник, дрозд, гусь серый, кроншнеп большой, чернеть морская и чернеть хохлатая, полудикие сизые голуби. По характеру участия в эпидемическом процессе все птицы, известные как источники возбудителя орнитоза, могут быть распределены на три группы: первая — птицы, содержащиеся с декоративной целью (попугаи, голуби и другие); вторая — птицы домашние (куры, утки, гуси, индейки); третья — дикие перелетные птицы [2].

Настоящая статья содержит материалы, касающиеся изучения роли различных видов птиц в распространении орнитозной инфекции в условиях Прикамья. На протяжении 1965—1976 гг. нами проведены обследования на орнитоз некоторых видов птиц, отловленных и отстрелянных в различных населенных пунктах Западного Урала. Для выявления орнитоза применялись не только общепринятые серологические тесты — реакция связывания комплемента и ее ингибиторный вариант, но и разработанные нами реакции непрямой гемагглютинации с орнитозным эритроцитарным диагностикумом [3] и иммунофлуоресцентная реакция микроагглютинации [4]. Для подтверждения орнитозной природы заболеваний в ряде случаев использовались вирусологические методики, на основе которых осуществлялось выделение возбудителя орнитоза из паренхиматозных органов птиц.

Различен удельный вес ряда видов синантропных птиц в циркуляции возбудителя орнитоза в условиях Прикамья. С нашей точки зрения основными критериями оценки их роли в этом процессе, очевидно, могут служить такие показатели, как процент инфицирования популяции и ее численность. В этом плане такие виды пернатых, как вороны, сороки и некоторые другие, не играют большой роли в распространении возбудителя орнитоза. Доля их зараженности оказалась сравнительно невысокой и, по нашим данным, колебалась от 3 до 7 %. Следует учесть, что это практически суммарный показатель положительных результатов, полученный при использовании комплекса взаимодополняющих серологических методик. В эту же группу могут быть отнесены и такие виды, как болотная сова, черная крачка, чиж, иволга, дрозд-белобровик, постоянно обитающие в «дикой» природе и не представляющие ценности для населения. Фактически они тоже не принимают участия в распространении инфекции.

Иные результаты были получены при обследовании полудиких сизых голубей, отловленных и отстрелянных в различных городах Прикамья. От 50 до 70 % из 368 обследованных нами птиц были инфицированы возбудителем орнитоза. Изучение удельного веса серопозитивных птиц в зависимости от времени года позволило выявить определенную закономерность, свидетельствующую о более значительной пораженности голубей в зимне-весенний период. В эти же сроки в сыворотках больных птиц преобладали комплементфиксирующие и гемагглютинирующие антитела. Согласно данным литературы и нашим наблюдениям, наличие таких видов антител можно расценивать как показатель активности инфекционного процесса [5, 6]. Высокая доля пораженности полудиких сизых голубей, значительная численность их популяции и наличие во всех населенных пунктах области дают основание утверждать, что и в условиях Прикамья они являются основным резервуаром возбудителя в городах.

Однако этим не исчерпывается эпидемическое значение данной категории птиц. Наряду с дикими перелетными птицами они играют определенную роль в заносе инфекции в «культурные» хозяйства, что ведет к формированию вторичных хозяйственных очагов орнитозной инфекции на территории области. Этому способствует тесный контакт диких видов птиц с домашними во время выгула последних. Такого рода хозяйственные антропургические очаги орнитозной инфекции выявлены нами в ряде районов. Например, на птицеферме колхоза «Россия» более 30 % кур оказались пораженными орнитозной инфекцией, что послужило причиной ликвидации фермы. Выявлены вспышки эпизоотии и среди домашних птиц, причем в большинстве случаев не удавалось установить ее связь с заносом инфекции в хозяйства «дикими» птицами. В таких случаях причинами вспы-

шек, очевидно, служило инфицированное маточное поголовье, чему способствуют особенности течения заболевания у птиц. Особи, переболевшие латентной формой заболевания, в течение длительного времени остаются вирусоносителями и при неблагоприятных внешних условиях могут служить причиной вспышки заболевания среди всего поголовья птиц.

Основным и практически единственным видом домашних птиц в Пермской области являются куры. Они встречаются почти в каждом личном хозяйстве в сельской местности. На Западном Урале имеется развитая сеть птицеферм и птицефабрик. По нашим данным, инфицированность кур в различных хозяйствах колеблется от 5 до 9 %, поэтому они могут служить источником орнитозной инфекции как на птицеводческих предприятиях, так и в личных хозяйствах.

Из водоплавающих птиц в Прикамье встречаются кряква, серая утка, гусь-гуменник, чернеть. Однако доля их пораженности орнитозом сравнительно невысока (4—6 %), к тому же на территории области не ведется промыслового отстрела диких уток, гусей, а гусиные фермы встречаются крайне редко. Это позволяет утверждать, что в условиях области водоплавающие птицы не имеют большого значения в распространении орнитозной инфекции.

Что касается других видов диких перелетных птиц, встречающихся на территории области, то по аналогии с другими климато-географическими зонами страны можно предполагать, что они принимают участие в формировании главным образом природных очагов орнитозной инфекции. Кроме того, в период валовых пролетов не исключается возможность заноса ими инфекции и в «культурные» хозяйства.

Таким образом, различные виды птиц участвуют в циркуляции возбудителя орнитоза в условиях Прикамья. Однако неравнозначна их роль в эпидемическом процессе, если дикие перелетные птицы обусловливают формирование природных, а в ряде случаев и хозяйственных очагов орнитозной инфекции, то наибольшую опасность для населения как резервуар возбудителя представляют полудикие сизые голуби, особенно в городах, и домашние птицы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Воронцов Е. М.* Птицы Камского Приуралья (Молотовской области). Горький: Горьковский гос. ун-т, 1949. 200 с.

2. *Терских И. И.* Группа орнитоза — лимфогранулемы — трахомы.— В кн.: Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. М.: Медицина, 1966, т. 8, с. 503—542.

3. *Горовиц Э. С., Тимашева О. А., Палкина П. Н.* Динамика специфических гемагглютининов при экспериментальной орнитозной инфекции.— В кн.: Вопросы экспериментальной и клинической иммунологии: Труды Пермского медицинского института, 1976, т. 135, с. 60—62.

4. *Тимашева О. А., Горовиц Э. С., Мирский В. Я., Ильина М. И.* Иммунофлуоресцентная реакция микроагглютинации в диагностике орнитоза у птиц.— Там же, с. 58—60.

5. *Вишнякова Л. А.* Голуби как основной источник возбудителя орнитоза в условиях крупного города.— В кн.: Труды Ленинградского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 1966, т. 29, с. 110—117.

6. *Горовиц Э. С.* Орнитоз на Западном Урале. Автореф. канд. дисс. Пермь, 1967. 17 с.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ · 1980

О. В. СЫСОЕВ

ДИНАМИКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ ГЕКСОКИНАЗЫ, ЛАКТАТ- И МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗ НА РАЗНЫХ ФАЗАХ РАЗВИТИЯ ПОПУЛЯЦИИ *ESCHERICHIA COLI* М-17

Различные физиологические состояния, через которые проходят клетки развивающейся микробной культуры, характеризуются определенным ферментативным профилем. Поэтому фенотип микробной клетки может быть описан на уровне его совокупного энзиматического спектра. Перестройки последнего могут, в частности, достигаться путем дерепрессии синтеза «новых» или репрессии «старых» молекулярных форм ферментов.

Ранее нами было показано [1, 2], что активность ферментов энергетического и пластического обменов характерным образом изменяется на отдельных фазах роста культуры *E. coli* в различных средах. Конкретные механизмы, определяющие эти изменения, не ясны. Они, в частности, могут быть опосредованы сменой отдельных молекулярных форм ферментов, отличающихся по своим физико-химическим и кинетическим характеристикам. Эти соображения послужили основанием для изучения на разных фазах роста *E. coli* молекулярной гетерогенности и кинетических характеристик (констант Михаэлиса) функционально важных ферментов энергетического обмена: гексокиназы (Гк), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и малатдегидрогеназы (МДГ).

Эксперименты проводили на культуре *Escherichia coli* штамм М-17. В качестве питательных сред использовали полноценную — мясо-пептонный бульон (МПБ) — и минимальную — глюкозо-солевую среду М-9 [3]. Концентрация клеток в момент засева составляла для первой 25 млн/мл, для второй 100 млн/мл. Культивирование проводили в конических колбах емкостью 800 мл, содержащих по 400 мл питательной среды. Отборы культуры для получения биомассы осуществляли на экспоненциальной, стационарной фазах и фазе отмирания, как основных фазах роста культуры, резко отличающихся по физиологическому состоянию клеток.

Клетки осаждали центрифугированием при 2500 *g*, промывали холодным 0,85 %-ным раствором NaCl и растирали при по-

Значения кажущейся константы Михаэлиса молекулярных лактат- и малатдегидрогеназ на разных фазах развития

Фермент, субстрат	R_f изоформы	Фаза		
		экспоненциальная	стационарная	p*
		K_M		
Гк по глюкозе	0,46	—	—	—
	0,54	0,65±0,050	0,59±0,018	<0,05
	0,58	0,78±0,043	0,86±0,055	<0,05
ЛДГ по лактату	0,19	1,59±0,170	1,53±0,161	<0,05
	0,70	—	4,06±0,265	—
МДГ по малату	0,38	2,31±0,286	2,26±0,269	<0,05
МДГ по оксалоацетату	0,38	7,69±0,372	8,08±0,904	<0,05

* Показатель вероятности различий (p) рассчитан по отношению к тому же изофермен

стоянном добавлении жидкого азота. Экстракцию белков проводили 0,01 М калий-фосфатным буфером pH 7,5 или 0,85 %-ным раствором NaCl, содержащим 0,1 %-й раствор тритона *X*-100. Экстракты отделяли от остатков клеток центрифугированием при 4500 *g* на ЦЛР-1 в течение 30 мин при 4 °С, супернатант осторожно декантировали. Белок в экстрактах определяли по методу Лоури [4].

Разделение белков проводили методом диск-электрофореза в 7 %-ном полиакриламидном геле [5] в аппарате фирмы «Реанал» (ВНР), модель 69. Разгонку вели в 0,05 М трис-глициновом буфере pH 8,3 при силе тока 5 мА на трубку; время электрофореза 90 мин. В качестве индикатора подвижности использовали 0,001 %-й раствор бромфенолового синего. Для обнаружения изоформ применяли тетразолиевый метод с использованием феназинметосульфата [6]. Инкубационные среды для проявления Гк готовили по [7], ЛГД — по [8], МДГ — по той же прописи, что и для ЛДГ, но с заменой лактата Li на малат Na.

Для определения кажущейся константы Михаэлиса (K_M^1), которое проводили при росте *E. coli* на среде М-9, отдельные молекулярные формы ферментов сразу после их проявления экстрагировали на холоде из соответствующих участков геля 0,001 М трис-HCl буфером pH 7,5. Определение K_M^1 (для Гк — по глюкозе, ЛДГ — по лактату, МДГ — по малату и оксалоацетату) проводили при оптимальных концентрациях коферментов и величинах pH. Расчет K_M^1 вели графически по методу двойных обратных величин [9].

Проведенные эксперименты показали наличие у *E. coli* множественных молекулярных форм (изоферментов) Гк и ЛДГ,

форм гексокиназы, культуры на среде М-9

роста		Среднее значение $K_м$ по фазам, размерность
отмирания $K_м$	p*	
0,41±0,049	—	—
—	—	$0,62 \cdot 10^{-3}$ М
—	—	$0,82 \cdot 10^{-3}$ М
1,63±0,109	<0,05	$1,58 \cdot 10^{-2}$ М
4,16±0,352	<0,05	$4,11 \cdot 10^{-2}$ М
2,16±0,159	<0,05	$2,24 \cdot 10^{-3}$ М
7,74±0,807	<0,05	$7,84 \cdot 10^{-5}$ М

ту на предыдущей фазе развития культуры

позволили выявить динамику их смены в процессе роста культуры (см. таблицу).

Гексокиназа. На МПБ на всех фазах роста обнаружена одна ее молекулярная форма с R_f 0,46. Фракция с той же электрофоретической подвижностью при росте *E. coli* на среде М-9 обнаружена только на фазе отмирания; на экспоненциальной и стационарной фазах выявлены две изоформы Гк с R_f 0,54 и 0,58.

Лактатдегидрогеназа. На всех фазах роста для каждой из сред обнаружена молекулярная форма ЛДГ с R_f 0,19. На поздних фазах появляется дополнительная изоформа с R_f 0,70, причем на бульоне ее удалось выявить только на фазе отмирания.

Интересно, что изоформа с R_f 0,70 обнаруживается в период, когда в среде роста происходит значительное накопление лактата. Очевидно, что уровень лактата каким-то образом регулирует активность или синтез данной молекулярной формы ЛДГ. Для выяснения этого вопроса было изучено действие лактата, а также ингибиторов транскрипции — актиномицина Д (АкД) и трансляции — хлорамфеникола (Хф) на ее появление в клетках молодой культуры, растущей на среде М-9. Засев производили четырехчасовой культурой, находившейся в фазе положительного ускорения развития. Для более четкого разделения изоферментов электрофорез проводили в 9,5 %-ном полиакриламидном геле при прочих равных условиях, описанных выше; время электрофореза 150 мин. Установлено, что замена в среде глюкозы на dl-лактат Li (100 мкг/мл) вызывает появление в клетках культуры, растущей 2,5—3 ч, помимо конститутивного изофермента (R_f 0,16) [1], также изофермента, характерного для поздних фаз роста (R_f 0,55). При добавлении в среду с индуктором АкД (2 мкг/мл) и Хф (20 мкг/мл) изоформа с R_f 0,55 не обнаруживается. Добавление в среду с лактатом одного АкД приводит к некоторому снижению ее содержания, а при замене этого антибиотика на Хф она вообще не выявляется. Следовательно, появление молекулярной формы ЛДГ с R_f 0,55 связано с индукцией ее синтеза de novo. Вместе с тем, блокада транскрипции не приводит к полному подавлению ее синтеза. Это может свидетельствовать о том, что имеющаяся в клетке соответствующая матричная РНК индуктора не транслируется.

[1] Понижение R_f обоих изоферментов связано с изменением условий электрофореза.

Малатдегидрогеназа. На всех фазах роста *E. coli* как на МПБ, так и на среде М-9 обнаружена только одна молекулярная форма МДГ$_м$ с R_f 0,38. Известно, что активность фермента в зависимости от условий выращивания и фазы роста культуры значительно меняется: от максимальной в экспоненциальной фазе до значительно снизившейся к фазе отмирания [1]. Следовательно, перестройки активности МДП определяются ее регуляцией или различной интенсивностью синтеза фермента, но не сменой изоферментов.

Результаты определения K_M^1 показали, что для каждой индивидуальной молекулярной формы ферментов значение константы на разных фазах не изменяется, поскольку различия в ее величине не являются достоверными. Сказанное справедливо для форм Гк с R_f 0,54 и 0,58; ЛДГ с R_f 0,19 и 0,70; МДГ с R_f 0,38 (для данной формы — по обоим субстратам).

Вместе с тем, существуют различия в величине K_M^1 у изоформ одного фермента. Так, фракция Гк с R_f 0,46 имеет повышенное сродство к глюкозе ($K_M^1 = 0{,}41 \pm 0{,}049 \cdot 10^{-3}$ М) по сравнению с двумя другими изоформами с R_f 0,54 и 0,58. Быстромигрирующая изоформа ЛДГ$_л$ с R_f 0,70 обладает пониженным сродством к лактату, что определяется более высоким, чем у формы с R_f 0,19 ($K_M^1 = 1{,}58 \cdot 10^{-2}$ М), значением K_M^1 ($4{,}11 \cdot 10^{-2}$ М).

Полученные данные свидетельствуют об определенной связи между фазой роста микробной культуры и спектром молекулярных форм некоторых ферментов энергетического обмена. Изменения изоферментного состава, приводящие к перестройке метаболических процессов, должны способствовать формированию у клеток оптимальных для данных условий развития фенотипических признаков, определяемых интегративным действием всех факторов среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Сысоев О. В., Раев А. Б., Коробов В. П.* Об активности некоторых ферментов энергетического обмена при развитии *Escherichia coli* М-17 в различных условиях роста.— В кн.: Экология и популяционная генетика микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1975, с. 116—121.
2. *Сысоев О. В., Коробов В. П.* Действие фильтратов культуры *Escherichia coli* на характер энергообеспечения и активность пластических реакций в клетках развивающихся изологичных культур.— Экология, 1977, № 6, с. 93—95.
3. Сборник методик по генетике микроорганизмов/Под ред. Р. Клауса и У. Хейса. Перев. с англ. М.: Медицина, 1970. 248 с.
4. *Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. Z., Randall R. I.* Protein measurement with the Folin phenol reagent.— J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, N 1, p. 265—275.
5. *Маурер Г.* Диск-электрофорез. М.: Мир, 1971. 247 с.

6. *Brewer G. J.* An introduction to isozyme techniques. N.-Y.; L. Acad. press, 1970, 275 p.
7. *Алексахина Н. В., Ситнина Н. Ю.* Изозимный состав гексокиназы гиалоплазмы скелетных мышц крысы.— Биол. науки, 1972, № 10, с. 28—33.
8. *Сафонов В. И., Сафонова М. П.* Анализ белков и ферментов методом электрофореза в полиакриламидном геле.— Труды Всесоюзного семинара «Электрофорез в полиакриламидном геле и его применение в сельском хозяйстве, медицине и пищевой промышленности». М., 1971, с. 7—29.
9. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты. М.: Мир, 1966. 816 с.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ · 1980

Н. Н. КЕВОРКОВ, Г. И. СПЕКТОР, В. М. КАЛЮЖНАЯ

АНТИГЕННЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ, НАКАПЛИВАЮЩИХСЯ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ ВЫРАЩИВАНИЯ ВНУТРИВИДОВОЙ ПОПУЛЯЦИИ *ESCHERICHIA COLI*

В последние годы накоплен значительный фактический материал о возможном влиянии микробных метаболитов на динамику развития, численность бактериальных популяций, уровень мутационной изменчивости и репаративные внутриклеточные процессы, на выраженность основных форм внутрипопуляционного генетического обмена [1—4]. Однако материальная основа информационных сигналов в большинстве случаев остается нераспознанной.

В настоящем исследовании предпринята попытка иммунохимического выявления накапливающихся в среде обитания — культуральной жидкости — экстрацеллюлярных белков бактериальной природы, сопутствующих фазам подъема численности и стационарного развития внутривидовых популяций *E. coli*.

Культуру *E. coli*, штамм М-17, выращивали на мясо-пептонном бульоне или на минимальной синтетической среде М-9. Биомассу, полученную на логарифмической (подъем численности) и стационарной фазах развития популяции, дважды промывали изотоническим раствором хлористого натрия. Суспензию клеток в физиологическом растворе разрушали с охлаждением на диспергаторе УЗДН-1 (22 кГц, 10 мин). Разрушенные клетки осаждали центрифугированием, а супернатант (лизат) концентрировали испарением под током воздуха в рефрижераторе до конечной концентрации белка — 4,5 г% (по методу Лоури). Па-

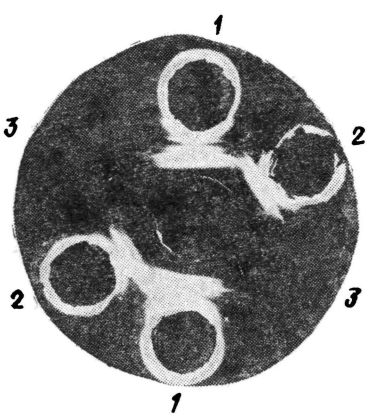
Сравнительный антигенный анализ бактериальных белков.

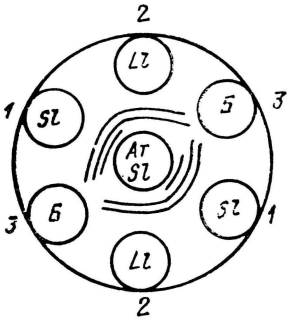
А — *S*- и *L*-лизаты. В центральной лунке — антисыворотка против *S*-лизата; в периферических лунках: *1* — *S*-лизат; *2* — *L*-лизат, *3* — мясо-пептонный бульон; *Б* — *L*-фильтраты и *L*-лизаты. В периферических лунках: *1* — *L*-лизат; *2* — *L*-фильтрат; *3* — мясо-пептонный бульон; *В* — *S*-фильтраты и *S*-лизаты. В периферических лунках: *1* — *S*-лизат; *2* — *S*-фильтрат; *3* — мясо-пептонный бульон.

Слева — фотография агаровой пластинки, *справа* — схематичное изображение дуг преципитации.

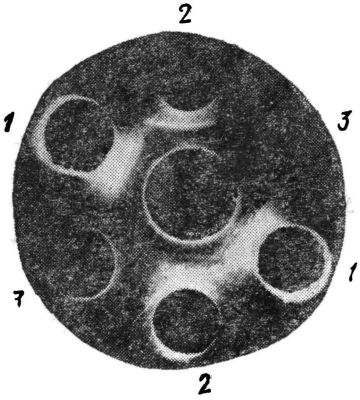
АтSl — антисыворотка против *S*-лизата; *Sl* — *S*-лизат; *Sf* — *S*-фильтрат; *Ll* — *L*-лизат; *Lf* — *L*-фильтрат; *Б* — мясо-пептонный бульон.

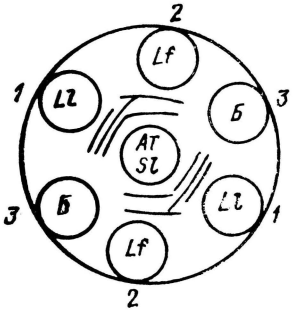
А


1
2
3
2
3
1

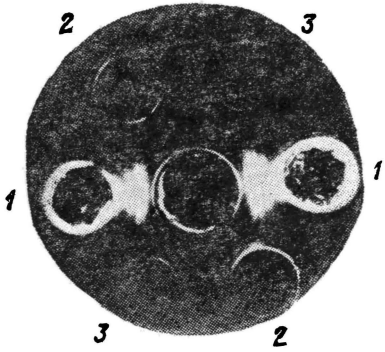

2
Lz
1
Sl
Б
3
AT
Sl
3
Б
Sl
1
Lz
2

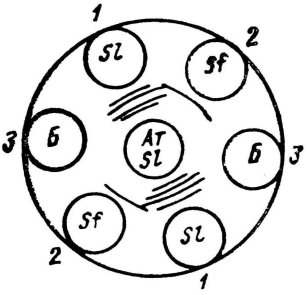
Б


2
1
3
1
3
2


2
Lf
1
Lz
Б
3
AT
Sl
3
Б
Lz
1
Lf
2

В


2
3
1
1
3
2


1
Sl
2
Sf
3
Б
AT
Sl
Б
3
Sf
Sl
2
1

раллельно с биомассой на различных фазах роста популяции отбирали и культуральную жидкость, которая после фильтрования служила объектом исследования.

Животных (кроликов) трижды, с десятидневным интервалом, подкожно иммунизировали бактериальным лизатом, полученным из биомассы на стационарной фазе развития популяции, с полным адъювантом Фройнда из расчета 20 мг белка на 1 кг веса на одну инъекцию. Напряженность иммунитета оценивали с помощью реакций пассивной гемагглютинации в модификации Оловникова [3] и кольцепреципитации. Донорами иммунной сыворотки служили кролики, у которых титр антител определялся не ниже 1 : 1280. Иммунную сыворотку консервировали мертиолатом (конечное разведение 1 : 10 000) и хранили в замороженном состоянии.

Антигенный анализ бактериальных белков проводили методом двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони (цит. по А. И. Гусеву [5]) в классическом варианте. Центральную лунку всегда заполняли антисывороткой, а в периферические вносили лизат микробных клеток в стационарной фазе развития популяции (*S*-лизат) и в фазе логарифмического роста (*L*-лизат), бесклеточный фильтрат культуральной среды стационарной (*S*-фильтрат) и логарифмической фазы (*L*-фильтрат), культуральную среду (мясо-пептонный бульон).

Анализ возникающих в агаре дуг преципитации показывает, что лизаты бактериальных клеток, выделенных на фазах логарифмического роста и стационарного развития, содержат совершенно идентичные в антигенном отношении белки (см. рисунок, А). Дуги преципитации, возникающие между антисывороткой *S*- и *L*-лизатами, сливаются между собой, не давая никаких видимых перекрестков. Попутно следует отметить отсутствие дуг преципитации между антисывороткой и мясо-петтонным бульоном, что свидетельствует о высокой чистоте отмывания микробных клеток от примесей белков культуральной среды перед диспергированием.

Наличие дуг преципитации между антисывороткой к *S*-лизату и фильтратами среды культивирования бактерий на логарифмической и стационарной фазах развития популяции *E. coli*, видимо, свидетельствует о секреции белков из клеток в окружающую среду (см. рисунок, *Б* и *В*). В одном случае эти белки полностью идентичны внутренним антигенам микробных клеток (слияние одной из дуг преципитации *L*-лизата и *L*-фильтрата), в другом — антигенная идентичность лишь частична (появление частичного перекреста дуг — так называемой «шпоры» — между белками *L*-лизата и *L*-фильтрата). На фазе логарифмического роста популяции в культуральной среде выделяется больше различных в антигенном отношении белков (две дуги преципитации), чем на фазе стационарного развития (одна дуга). В последнем случае фильтрат содержит единственный белок,

который определяется как частично идентичный белкам бактериальной клетки (наличие «шпоры»).

Таким образом, в процессе культивирования бактерии выделяют в окружающую среду экстрацеллюлярные белки не полностью идентичные по антигенным свойствам внутриклеточным белкам изучаемых микроорганизмов. Вопрос об отношении фактора регулирования числа клеток бактериальной популяции к выявленному антигенспецифичному белку остается открытым и требует дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бакунина Э. В., Олейник И. И.* Теория парацитонозов и генетический обмен у бактерий. М.: Медгиз, 1970.
2. *Браун В. В.* Генетика бактерий. М.: Наука, 1968.
3. *Оловников А. М.* Определение содержания антигенов. Метод агглютинации ПБИС-эритроцитов и метод агглютинации.— В кн.: Иммунохимический анализ. М.: Медицина, 1968, с. 68—78.
4. *Пшеничнов Р. А., Колотов В. М., Барихин С. Я.* и др. Микробная популяция — саморегулируемая система.— В кн.: Экология и популяционная генетика микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1975, с. 3—13.
5. *Гусев А. И.* Микрометод преципитации в агаре.— В кн.: Иммунохимический анализ. М.: Медицина, 1968, с. 99—119.

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

А. Н. Шкидченко. Лимитирование и ингибирование роста микроорганизмов при непрерывном культивировании . 3

О. Н. Октябрьский, Р. А. Пшеничнов. Изменение окислительно-восстановительного потенциала при остановке роста клеток *Escherichia coli* 14

А. Г. Ткаченко, О. Н. Октябрьский. Экономический коэффициент утилизации субстрата (глюкозы) в бактериальных популяциях разной плотности 19

Р. А. Пшеничнов, В. М. Колотов, О. В. Сысоев. Влияние коррекции питательной среды на развитие популяции *Escherichia coli* М-17 и перестройку внутриклеточных энергообеспечивающих процессов 22

Ю. Ф. Маслов, Н. Н. Кузнецова, В. П. Коробов. Формирование аминокислотного фона среды при развитии популяции *Escherichia coli* М-17 на полноценной и синтетической питательных средах 28

А. А. Шестакова. Взаимосвязь ферментов обмена макроэргических соединений с внутриклеточным уровнем ДНК и РНК при развитии бактериальной популяции . . . 34

В. П. Коробов, А. А. Чудинов. Динамика содержания полиаминов при фазовом развитии бактериальной культуры *Escherichia coli* М-17 39

А. И. Коротяев, Т. П. Кроливенко. Хромосомы и продолжительность клеточного цикла у бактерий 44

А. Е. Эссель, И. А. Юдилевич, Т. Е. Ткаченко. Вопросы математического анализа смешанных бактериальных популяций 50

Л. Е. Глазачева, В. С. Левашов, Л. Н. Кац. Субмикроскопическая организация вульгарного протея в процессе Л-трансформации и реверсии 60

Н. А. Бобыкина, О. Е. Назарьев, Г. А. Угодчиков. Исследование динамики процесса фаголизиса *Escherichia coli* с учетом вторичного роста бактерий 71

А. Г. Ткаченко. О соотношении селективного и аутометаболического типов регуляции численности и структуры бактериальных популяций 75

Л. Е. Кайгородова. Метод первичного клонально-колониального анализа кислотоустойчивости и исследование гетерогенности популяции *Escherichia coli* по этому признаку 85

Г. И. Стародубцева, В. М. Минаева, Л. Ф. Корзухина, Л. И. Кокшарова, Р. В. Шитова, Т. Г. Пархоменко. К структуре популяции вируса клещевого энцефалита в зависимости от станции обитания клещей в различных ландшафтно-климатических зонах 91

Э. С. Горовиц, О. А. Тимашева, В. П. Втюрин. Орнитофауна Пермской области как резервуар орнитозной инфекции 95

О. В. Сысоев. Динамика молекулярных форм гексокиназы, лактат- и малатдегидрогеназ на разных фазах развития популяции *Escherichia coli* М-17 99

Н. Н. Кеворков, Г. И. Спектор, В. М. Калюжная. Антигенный анализ белков, накапливающихся в культуральной среде выращивания внутривидовой популяции *Escherichia coli* 104

УДК 576.8

Лимитирование и ингибирование роста микроорганизмов при непрерывном культивировании. Шкидченко А. Н.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

На примере *Candida utilis* дается обзор действия лимитирующих и ингибирующих факторов на рост микроорганизмов при непрерывном культивировании в современных аппаратах типа АНКУМ-2. В качестве лимитирующих факторов исследовались фосфаты, азот, кислород и глюкоза. Выявлены лимитирующие и ингибирующие концентрации этих компонентов.

Библиогр. 42 назв.

УДК 576.8.099

Изменение окислительно-восстановительного потенциала при остановке роста клеток Escherichia coli. Октябрьский О. Н., Пшеничнов Р. А.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

В процессе культивирования прототрофного штамма *Escherichia coli*, выделенного из гетерогенной популяции М-17, на глюкозо-солевой среде М-9 обнаружено резкое падение окислительно-восстановительного потенциала среды (E_h) при остановке роста бактерий вследствие исчерпания глюкозы или азота. Показано, что падение потенциала не зависит от колебаний кислорода и наблюдается как в периодическом, так и в проточном режиме культивирования.

Илл. 3. Библиогр. 6 назв.

УДК 576.8.095.6

Экономический коэффициент утилизации субстрата (глюкозы) в бактериальных популяциях разной плотности. Ткаченко А. Г., Октябрьский О. Н.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

В опытах проточного культивирования *E. coli* штамм М-17 на модифицированных аппаратах АНКУМ показана обратная зависимость экономического коэффициента от плотности популяции. Выявленная закономерность объясняется возможным влиянием уровня растворенного в среде кислорода и накоплением аутометаболитов, определяющих выбор культурой более или менее эффективных путей метаболизма.

Илл. 1. Библиогр. 14 назв.

УДК 576.8.095.3; 576.8.095.4

Влияние коррекции питательной среды на развитие популяции Escherichia coli М-17 и перестройку внутриклеточных энергообеспечивающих процессов. Пшеничнов Р. А., Колотов В. М., Сысоев О. В.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

Исследована динамика развития популяции *E. coli* М-17 на среде М-9, а также активность внутриклеточных ферментных систем при периодическом культивировании с коррекцией и без коррекции параметров среды. Культивирование проводили в аппарате непрерывного культивирования АНКУМ-2.

По мере развития культуры проводили коррекцию по глюкозе, pH, проценту растворенного кислорода. В белковых клеточных экстрактах, полученных с экспоненциальной и стационарной фаз и фазы отмирания, определяли активность гексокиназы, лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы.

Показано, что при каждом способе культивирования рост культуры описывался S-образной кривой, однако кинетические характеристики роста были различными. При коррегируемом росте максимальная удельная скорость роста возрастала в три раза, а максимальная концентрация бактерий была выше в 2,1 раза.

При любом способе культивирования наблюдалась фазовая смена активности ферментов. Эта активность снижалась при переходе к последующей фазе развития. При этом на поздних этапах роста возрастал вклад гликолиза в энергообеспечение клеток.

Полученные данные свидетельствуют о том, что фазовость развития микробной популяции определяется как общими факторами среды, так и действием специфических регуляторных факторов. Действие их, по-видимому, затрагивает энергодающие системы клеток.

Табл. 1. Илл. 2. Библиогр. 13 назв.

УДК 576.809.518

Формирование аминокислотного фона среды при развитии популяции Escherichia coli M-17 на полноценной и синтетической питательных средах. Маслов Ю. Ф., Кузнецова Н. Н., Коробов В. П.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

Предпринято изучение роли экскреции в среду обитания аминокислот микроорганизмами. Проведено сопоставление аминокислотного фона среды с интенсивностью развития популяции *E. coli* на синтетической (М-9) и полноценной (МПБ) питательных средах. Прослежена динамика усвоения аминокислот. Различие в скоростях поглощения отдельных аминокислот, вероятно, лежит в основе формирования оптимального для развития культуры внеклеточного спектра аминокислот. Создание искусственного аминокислотного фона в синтетической среде приводит к уменьшению лаг-периода и увеличению скорости роста на фазе экспоненциального развития.

Табл. 3. Илл. 1. Библиогр. 9 назв.

УДК 576.809.518

Взаимосвязь ферментов обмена макроэргических соединений с внутриклеточным уровнем ДНК и РНК при развитии бактериальной популяции. Шестакова А. А.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

Определены активность пирофосфатазы и аденозинтрифосфатазы, содержание ДНК и РНК в клетках *E. coli*, выращенных на разных питательных средах — мясо-пептонном бульоне и глюкозо-минимальной среде М-9. Показано, что активность пирофосфатазы и аденозинтрифосфатазы меняется в зависимости от стадий развития культуры. При этом отмечается опережение максимума активности данных ферментов при росте *E. coli* на бульоне, что, по-видимому, объясняется интенсификацией всех процессов на богатой питательной

среде, позволяющей удвоить биомассу клетки за более короткий срок, чем на среде М-9. Показана взаимосвязь содержания нуклеиновых кислот с активностью функционально связанных с синтезом этих соединений ферментов — пирофосфатазы и аденозинтрифосфатазы.

Табл. 1. Илл. 1. Библиогр. 14 назв.

УДК 576.809.518

Динамика содержания полиаминов при фазовом развитии бактериальной культуры Escherichia coli М-17. Коробов В. П., Чудинов А. А.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

Методом тонкослойной хроматографии на кизельгеле исследован спектр биологически активных полиаминов в клетках *E. coli* М-17 при развитии на синтетической среде М-9. Среди дансилированных соединений обнаружены производные путресцина, кадаверина, спермина и спермидина. Наиболее высокое содержание полиаминов выявлено на лог-стадии развития. Показано, что при снижении скорости роста и в фазе отмирания внутриклеточный уровень полиаминов резко уменьшается.

Основная часть спектра (75—83 %) на всех стадиях развития культуры приходится на долю путресцина. Относительное содержание спермина снижается с 19 % на лог-стадии до 8 % на стадии отмирания. Установлены обратные по фазе колебания содержания кадаверина и спермидина, доля которых в зависимости от фазы развития колеблется от 2 до 9 %.

Табл. 1. Илл. 2. Библиогр. 13.

УДК 576.809.5

Хромосомы и продолжительность клеточного цикла у бактерий. Коротяев А. И., Кроличенко Т. П.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

Установлено, что при благоприятных условиях роста бактериальные клетки синтезируют сверхизбыточное количество ДНК, соответствующее по весу нескольким геномам, что создает предпосылки для сокращения времени генерации. Основным механизмом регулирования интенсивности биосинтетических процессов, а следовательно и времени генерации, является одновременная транскрипция аналогичных цистронов нескольких или даже всех хромосом, протекающая по типу равновероятностного в отношении оперонов характера выражения бактериального генома.

Табл. 3. Библиогр. 9 назв.

УДК 576.8.577.4

Вопросы математического анализа смешанных бактериальных популяций. Эссель А. Е., Юдилевич И. А., Ткаченко Т. Е.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

Сделан математический и логический анализ количественного и качественного поведения смешанных бактериальных популяций с целью выявления характеристик, описывающих процесс их развития. Предлагается интерпретировать развитие смешанной двухвидовой популяции как некоторую

кривую в трехмерном пространстве. Проекции пространственной кривой на главные координационные плоскости позволяют получить раздельные кривые развития одновидовых популяций при совместном культивировании.

Предлагаемая авторами математическая модель проверялась на экспериментальном материале по раздельному и смешанному культивированию популяций *E. coli* и *Staph. aureus*.

Илл. 2. Библиогр. 12 назв.

УДК 03.00.07

Субмикроскопическая организация вульгарного протея в процессе Л-трансформации и реверсии. Глазачева Л. Е., Левашов В. С., Кац Л. Н.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

Изучалась ультраструктура *Proteus vulgaris* на разных этапах Л-трансформации. Для исследования были взяты сферопласты, нестабильные и стабильные Л-формы, а также ревертанты. Под действием пенициллина исходные бактерии образуют сферопласты, имеющие на поверхности две мембраны: наружную, принадлежащую клеточной стенке, и цитоплазматическую. При образовании сферопластов наблюдался выход в окружающую среду большого количества трубчато-везикулярных мембран. Строение наружных покровов нестабильных Л-форм такое же, как у сферопластов. У нестабильных Л-форм первых пассажей также наблюдался выход мембран. Интересно, что от пассажа к пассажу в популяции нестабильных Л-форм возрастало число клеток протопластного типа. Эти клетки, характерные для стабильных Л-форм протея, имеют на поверхности только цитоплазматическую мембрану. У стабильных Л-форм протея обнаружен хорошо развитый мембранный аппарат — везикулы, миэлиноподобные структуры, кольцевидные мембраны. Размножение Л-форм происходило бинарным делением, почкованием.

Илл. 6. Библиогр. 7 назв.

УДК 576.858.9.6

Исследование динамики процесса фаголизиса Escherichia coli с учетом вторичного роста бактерий. Бобыкина Н. А., Назарьев О. Е., Угодчиков Г. А.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

Предпринято исследование динамики роста биомассы фагов и бактерий, удельных скоростей роста чувствительных и устойчивых к бактериофагу клеток, динамики концентрации РНК в процессе фаголизиса, зависимости между концентрацией РНК и скоростью синтеза фагов и бактерий.

В результате исследований получены экспериментальные данные по динамике нарастания биомассы клеток и бактериофага. Показано, что удельная скорость роста чувствительных к фагу бактерий значительно превышает удельную скорость роста устойчивых бактерий, что максимальная концентрация РНК в единице биомассы у устойчивых к фагу бактерий почти вдвое меньше, чем у чувствительных. Высказано предположение, что между концентрацией РНК и скоростью синтеза бактерий существует линейная зависимость, а между концентрацией РНК и скоростью синтеза фагов — монотонная.

Илл. 6. Библиогр. 3 назв.

УДК 576.8.095.58—576.8.095

О соотношении селективного и аутометаболического типов регуляции численности и структуры бактериальных популяций. Ткаченко А. Г.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

Описано изменение структуры исходно гетерогенных внутривидовых популяций *E. coli*, развивающихся в минимальной синтетической среде М-9. Исходная среда являлась селективной для прототрофной фракции инокулята, ее состав и физико-химические параметры выраженно менялись на отдельных фазах развития культуры, а развивающаяся популяция находилась под воздействием аутофакторов, входящих в систему специфической аутометаболической регуляции. В некоторых опытах засев проводился в фильтраты культур, содержащих стимулирующие аутометаболиты.

Выявлены фазовые колебания в составе развивающейся популяции прототрофной и ауксотрофной фракции, характерные соотношения быстро- и медленно реплицирующих вариантов. Обосновывается возможность роста и сохранения исходной гетерогенности культур при засеве в исходно селективную минимальную среду больших доз инокулята и посеве малых доз в фильтраты изогенных культур, содержащих стимулирующие рост аутометаболиты.

Табл. 1. Илл. 1. Библиогр. 7 назв.

УДК 576.8.095

Метод первичного клонально-колониального анализа кислотоустойчивости и исследование гетерогенности популяций Escherichia coli по этому признаку. Кайгородова Л. Е.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

Разработаны индикаторные плотные буферные минимальные синтетические питательные среды с градиентом pH от 4,4 до 8, пригодные для первичного клонально-колониального анализа бактериальных популяций по способности роста при разных pH. Описана структура популяции производственного штамма *E. coli* М-17 по этому признаку, исследована ее динамика по кислотоустойчивости при развитии *E. coli* в закисляемых при росте культур жидких питательных средах.

Илл. 3. Библиогр. 12 назв.

УДК 576.8.095.1

К структуре популяции вируса клещевого энцефалита в зависимости от станции обитания клещей в различных ландшафтно-климатических зонах. Стародубцева Г. И., Минаева В. М., Корзухина Л. Ф., Кокшарова Л. И., Шитова Р. В., Пархоменко Т. Г.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

Представлены материалы десятилетнего изучения зараженности клещей вирусом клещевого энцефалита, собранные в различных стациях обитания некоторых ландшафтно-климатических подзонах Пермской области. Исследовано 6300 клещей.

Установлено, что для выявления вируса в клещах целесообразно пользоваться комплексом методов, значительно повышающим результативность исследования. Показано, что

свойства вируса в определенной степени зависят от мест обитания клещей. Наиболее гемагглютинирующими и патогенными свойствами обладали штаммы, выделенные из клещей, собранных на пастбищных стациях. Выявлены различия гемагглютинирующей активности и вирулентности вируса для белых мышей в зависимости как от стации обитания, так и от ландшафтно-климатической зоны расположения последней, что свидетельствует о неоднородности вирусной популяции.

Табл. 2. Библиогр. 9 назв.

УДК 356.9.095.1

Орнитофауна Пермской области как резервуар орнитозной инфекции. Горовиц Э. С., Тимашева О. А., Втюрин В. П.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

С помощью ряда общепринятых и оригинальных серологических методик изучена естественная пораженность орнитозом различных видов птиц, встречающихся на территории Пермской области. Обсуждаются роль и значение некоторых категорий птиц в циркуляции возбудителя орнитоза в условиях Прикамья. Показано наличие природных и вторичных хозяйственных очагов орнитозной инфекции в области. Установлено, что на Западном Урале (как и в других климатогеографических зонах страны) основной резервуар возбудителя орнитоза — полудикие сизые голуби и домашние птицы.

Библиогр. 6 назв.

УДК

Динамика молекулярных форм гексокиназы, лактат- и малатдегидрогеназ на разных фазах развития популяции Escherichia coli М-17. Сысоев О. В.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

Изучена молекулярная гетерогенность ряда ферментов энергетического обмена в клетках культур *Escherichia coli* М-17, развивающейся на мясо-пептонном бульоне и глюкозо-солевой среде М-9. Показано наличие трех молекулярных форм гексокиназы с R_f 0,46; 0,54; 0,58 и двух — лактатдегидрогеназы с R_f 0,19 и 0,70; выявлена динамика их спектра при росте *E. coli* на обеих средах. Для малатдегидрогеназы обнаружена только одна молекулярная форма с R_f 0,38.

Установлено, что синтез быстромигрирующей формы лактатдегидрогеназы индуцируется лактатом. Определена кажущаяся константа Михаэлиса отдельных молекулярных форм ферментов по соответствующим субстратам.

Табл. 1. Библиогр. 9 назв.

УДК 576.8.004.14 : 553.982

Антигенный анализ белков, накапливающихся в культуральной среде выращивания внутривидовой популяции Esherichia coli. Кеворков Н. Н., Спектор Г. И., Калюжная В. М.— В кн.: Факторы развития бактериальных популяций. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1980.

В процессе исследований, проведенных при помощи реакции двойной иммунодиффузии в агаре, выявлено накопление в среде культивирования популяции *E. coli* белков, отличных по антигенным свойствам от внутриклеточных белков микроорганизмов.

Илл. 1. Библиогр. 5 назв.

ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Рекомендовано к изданию
Ученым советом Института
экологии растений и животных
и РИСО Уральского научного центра
Академии наук СССР

Редакторы **Н. И. Гладких, Т. П. Бондарович**
Технический редактор **Н. Р. Рабинович**
Обложка художника **М. Н. Гарипова**
Корректоры **О. П. Естишина, Е. М. Бородулина**

РИСО УНЦ № 1024—21(80). Сдано в набор 14.04.80
НС 19496. Подписано к печати 16.12.80.
Формат $60 \times 90^1/_{16}$. Усл. печ. л. 7,5. Уч.-изд. л. 8,0.
Тираж 700 экз. Цена 80 коп. Заказ 173. Бумага
типографская № 1.

РИСО УНЦ АН СССР, Свердловск, ГСП-169,
Первомайская, 91.
Типография изд-ва «Уральский рабочий».
Свердловск, проспект Ленина, 49.