АКАДЕМИЯ НАУК СССР
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

СВЕРДЛОВСК • 1977

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ВЫП. 104 ТРУДЫ ИНСТИТУТА ЭКОЛОГИИ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ 1977

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

СВЕРДЛОВСК

УДК 576.809.5

Механизмы регуляции развития бактериальных популяций. Сб. статей. Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

В сборнике систематизированы материалы о наличии в бактериальных популяциях своеобразных и малоизученных элементов саморегуляции, действие которых проявляется в продукции и опосредованном специфическом влиянии микробных метаболитов на темпы репликации, скорость роста, выход биомассы и другие факторы микроэволюционного процесса. Рассмотрены особенности такой регуляции на жидких и плотных питательных средах. Представлены данные о фазовом характере изменения метаболических процессов при развитии микробных популяций. Часть исследований посвящена разработке клонально-селекционного анализа структуры бактериальных сообществ и экологическому моделированию популяционных сдвигов при относительно стабильных и меняющихся условиях развития.

Показана возможность воздействия на развитие бактериальных культур циклического АМФ и некоторых гормонов. Предложены новые методы объективной оценки характера микробиоценозов с сопоставлением показателей подобия на ЭВМ, создания математической модели динамики роста биомассы фагов, оригинальные способы культивирования на пленках, оптической регистрации и фотометрического анализа развития колоний на плотных питательных средах.

Материалы сборника представляют интерес для биологов, микробиологов, экологов, генетиков и специалистов микробиологического производства.

Ответственные редакторы
С. С. Шварц, В. П. Коробов

© УНЦ АН СССР, 1977 М $\frac{21007—729/815}{055(02)7}$ 21—1977

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ 1977

Р. А. ПШЕНИЧНОВ, В. М. КОЛОТОВ,
С. Я. БАРИХИН, А. Г. ТКАЧЕНКО

РЕАЛИЗАЦИЯ ПРИНЦИПА ОБРАТНЫХ СВЯЗЕЙ В СИСТЕМЕ АУТОМЕТАБОЛИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ РОСТА КЛОНОВ ВНУТРИВИДОВЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *ESCHERICHIA COLI*

«Популяция — это элементарная группировка организмов определенного вида, обладающая всеми необходимыми условиями для поддержания численности необозримо длительное время в постоянно меняющихся условиях среды, это форма существования вида, первая надорганизменная система интеграции жизни, делающая любой вид организмов потенциально (но, конечно, не реально) бессмертным...» [1]. Это определение популяции признано многими отечественными и зарубежными биологами. Исходя из него, можно утверждать, что популяционный подход к пониманию жизни и эволюции организмов на всех ступенях их организации является современным, перспективным и единственно верным. Использование этого подхода к исследованию микроорганизмов предполагает наличие у них своеобразных форм связей и элементов организации популяционных систем.

Применительно к саморегуляции численности микробной популяции «это такое ее качество, которое способствует оптимальному типу самовоспроизведения, минимизируя его при опасности перенаселения и увеличивая при угрозе резкого падения численности» [2]. В достаточно адекватных опытах Р. А. Пшеничнова и др. [3] была сделана попытка распространить общие положения аутометаболической регуляции численности популяций, сформулированные С. С. Шварцем [1], на мир одноклеточных микроорганизмов. Было установлено, что развитие внутривидовых популяций *E. coli* в контролируемой и коррегируемой синтетической среде М-9 сопровождается продукцией, экскрецией и накоплением в среде обитания двух последовательно меняющихся типов аутометаболитов, специфически стимулирующих и ограничивающих развитие микроорганизмов и накопление биомассы в культурах [4, 5]. Высказано предположение, что наличие системной регуляции темпов роста и репликации должно предполагать достаточно широкую гетерогенность популяций

по анализируемому признаку, а также реализацию эффекта продуцируемых регулятóров роста по принципу обратных связей для популяции в целом и у отдельных составляющих ее вариантов. В настоящей статье приводятся экспериментальные данные, подтверждающие выдвинутое нами общее положение.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использовали прототрофные и смешанные по генофонду производственные культуры *E. coli* штамма М-17, культивируемые соответственно в жидкой среде М-9 и мясо-пептонном бульоне путем ежедневных пересевов. Учитывая выраженную стадийность развития микробных культур, возможное влияние фазы роста на физиологию популяции и темп ее репликации при пересевах на свежие среды, были проведены предварительные опыты с засевом культур разного «возраста» в стандартную синтетическую среду М-9 и культуральные фильтраты, содержащие стимулирующие аутометаболиты в одинаковой концентрации.

Опытные культуры разного «возраста» готовили следующим образом. Производственную культуру *E. coli* эталонного штамма М-17 засевали в концентрации 25 *млн/мл* в мясо-пептонный бульон и инкубировали при 37° С, периодически помешивая. Через каждые три часа в течение суток, или на всех основных этапах роста (адаптации, фазах положительного ускорения, логарифмической, отрицательного ускорения, стационарной и постепенного отмирания) проводили выемки образцов. Микробные клетки отделяли центрифугированием и засевали в свежую среду М-9 и в ранее полученные «стимулирующие» безмикробные фильтраты, доводя до концентрации 15 *млн/мл*. Все пробы инкубировали при 37° С. Быстроту развития и степень накопления биомассы контролировали прямым подсчетом клеток к восьмому часу культивирования. Степень стимуляции выражали через индекс стимуляции (ИС), представляющий частное от деления количества клеток, выросших к восьмому часу в «стимулирующих» фильтратах, на их количество в контроле (среда М-9). Результаты наблюдений были следующими:

Возраст засеянной культуры, *ч*	Накопление биомассы к 8 *ч* роста, *млн/мл*	ИС
3	348	2,2
6	325	1,73
9	239	2,28
12	525	1,25
15	382	1,2
18	575	1,25
21	315	1,6
24	319	1,5
27	307	1,2

Из анализа полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. Как правило, «возраст» засеваемой культуры больше влиял на темп репликации в первые периоды развития и в меньшей мере определял степень ее конечного максимального накопления. Тем не менее бóльшее накопление биомассы давали засеваемые культуры 12—18-часового «возраста».

2. Зарегистрированная бóльшая степень стимуляции аутометаболитами «молодых» (3—9-часовых) культур, очевидно, связана со значительной их гетерогенностью и последующим снижением ее за счет превалирующего развития прототрофов, наиболее приспособленных к росту на минимальных глюкозосолевых средах.

Для дальнейшего клонального анализа структуры популяции ее засевали на плотные варианты питательных сред. Колонии (потомки изолированных клеток) выращивали при 37° С в течение двух суток, изолированно лежащие колонии снимали с поверхности среды и ресуспендировали в физиологическом солевом растворе. После подсчета клеток методом фазового контраста материал засевали всегда в равной концентрации (15 *млн/мл*) в свежую среду М-9 и инкубировали при одинаковой температуре (37° С). Накопление биомассы во всех опытах определяли на восьмом часу культивирования (в части наблюдений — прямым подсчетом клеток с помощью фазово-контрастной микроскопии, в остальных — нефелометрическим методом, с последующим расчетом концентрации клеток по калибровочному графику).

При исследовании влияния экстрацеллюлярных аутометаболитов на параметры развития популяции содержащие их культуральные жидкости получали путем фильтрации 3-, 8- и 24-часовых культур исходного штамма *E. coli* в среде М-9 через бактериальные свечи Ф-7 с величиной пор 1,2μ при отрицательном давлении, равном 100—150 *мм* рт. ст. Для получения сопоставимых результатов клоновые варианты засевали в фильтраты и свежую среду М-9 одновременно и инкубировали по идентичной методике.

Дальнейшее наблюдение за опытными и контрольными культурами проводили параллельно.

У части клонов с различным темпом репликации исследовали выраженность экскреции в среду обитания экстрацеллюлярных метаболитов — регуляторов роста. Для этого их одновременно засевали в свежую среду М-9 и в сравниваемых опытах изучали влияние фильтратов 3-часовых культур на развитие в них единой индикаторной культуры *E. coli* исходного штамма М-17. У части клонов, изменивших в процессе пассажей темп репликации, такие исследования проводили повторно по идентичной методике и полученные результаты сопоставляли с их первоначальной характеристикой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Темп репликации и чувствительность клоновых вариантов к воздействию накапливающихся в среде регуляторных аутометаболитов были исследованы на 153 клонах семи внутривидовых популяций *E. coli* штамма М-17. Результаты по всей группе приведены в табл. 1, а одного из характерных наблюдений — в табл. 2.

Таблица 1

Чувствительность клоновых вариантов к действию стимулирующих (ИС) и лимитирующих (ИЛ) метаболитов к восьмому часу развития

Группировка клонов по накоплению в среде М-9, *млн/мл*	Колич. исследованных клонов	ИС	ИЛ
0—50	63	+5,6	—0,99
50—100	50	+5,2	—2,3
100—150	3	Не опр.	—3,5
150—200	16	+2,3	—3,7
200—250	5	+2,1	—5,2
250—300	10	+1,5	—5,6
300—400	5	+1,2	—7,2

Отдельные наблюдения, как и все опыты в целом, позволили установить высокую степень гетерогенности сочленов внутривидовых популяций *E. coli* по темпам их репликаций в минимальной среде М-9. В исследованных популяциях при времени генерации в среде М-9 от 2 до 30 *ч* накопление биомассы к восьмому часу развития соответственно колебалось от 17,5 до 398 *млн/мл*. Составленный по формуле Стерджеса [6] вариационный ряд значений концентраций с интервалом в 50 *млн/мл* показал следующие численные распределения клонов по группам в пределах от 0—50 до 400 *млн/мл*: 63, 50, 3, 16, 10, 5. Приведенные цифры не укладываются в гармоничный ряд значений, равномерно распределяющихся вокруг средней величины, а являются рядом нисходящих величин с высокой степенью разброса.

Вместе с тем выявлена четко выраженная закономерность между темпами репликаций клонов и влиянием регулирующих рост метаболитов. Она заключается в том, что клоны с низкими исходными темпами репликации значительно (в 5,2—5,6 раза) увеличивали его под влиянием стимулирующих и ничтожно мало (в 0,99—2,3 раза) ограничивали скорость роста под влиянием видоспецифических лимитирующих метаболитов. И наоборот, высокие исходные темпы развития отдельных клонов всегда сопровождались очень слабой (1,2—1,5) реакцией на стимулирующие фильтраты и резко выраженной чувствительностью (5,6—7,2) к видоспецифическим лимитирующим субстратам.

Полярная направленность связи темпов репликации с чувствительностью к регулирующим аутометаболитам в общем сохранялась и при пассажах исследуемых клонов *E. coli*. В тех же случаях, когда темп репликации пассируемых клонов возрастал, они становились менее чувствительными к действию видоспецифических стимулирующих аутометаболитов и более

Таблица 2

Накопление клоновых вариантов *(млн/мл)* и их чувствительность к действию видоспецифических стимулирующих (ИС) и лимитирующих (ИЛ) метаболитов внутривидовой популяции *E. coli* к восьмому часу развития

№ клона	Рост в среде М-9	Рост в стимулирующем фильтрате	ИС*	Рост в лимитирующем фильтрате	ИЛ*
12	25,0	220,0	+8,8	18,7	—1,3
4	25,0	252,5	+10,1	20,0	—1,25
7	35,5	41,6	+1,2	15,6	—2,3
8	35,0	180,0	+5,1	25,0	—1,4
15	155,0	395,0	+2,5	40,0	—3,9
1	162,0	380,0	+2,3	40,0	—4,5
13	175,0	340,0	+1,9	59,0	—2,9
14	190,0	362,0	+1,9	37,5	—5,1
10	213,0	380,0	+1,8	46,5	—4,5
9	226,0	390,0	+1,7	38,7	—5,9
2	270,0	340,0	+1,2	51,4	—5,2
5	278,0	438,0	+1,6	44,2	—6,3
11	293,0	490,0	+1,4	57,5	—5,1
3	292,0	470,0	+1,6	50,7	—5,7
6	385,0	362,0	—1,1	37,5	—9,6

* ИС (ИЛ) — здесь и далее индексы стимуляции (лимитации) — частное от деления максимальной концентрации микроорганизмов в двух пробах (контрольной или опытной) на минимальную.

ограничивали свой рост под влиянием лимитирующих факторов (табл. 3).

Указанная тенденция в регуляции развития по принципу обратных связей подтверждена и опытами на 48 клонах, у которых исходный темп репликации сопоставлялся со степенью продукции ими стимулирующих аутометаболитов.

Таблица 3

Изменение роста клонов *(млн/мл)* и чувствительности их к действию стимулирующих факторов при повторных пассажах в среде М-9

№ клона	Рост клонов первого пассажа в среде М-9	Рост клонов первого пассажа в фильтрате	ИС*	Рост клонов последующих пассажей в среде М-9	Рост клонов последующих пассажей в фильтрате	ИС
1	48,0	180,5	+3,8	400,0	2800,0	+1,2
2	25,0	45,5	+1,8	1800,0	2450,0	+1,36
3	31,0	184,5	+5,95	2250,0	2245,0	+1,0
4	555,0	560,0	+1,0	200,0	1230,0	+6,1

* Значения ИС приведены со знаком плюс.

Зависимость продукции стимулирующих метаболитов от темпов накопления клонов-продуцентов *E. coli* штамма М-17 в среде М-9 была следующей:

Темпы накопления, *млн/мл*	ИС
До 300	+2,53
300—700	+1,4
700—1500	+1,0

Проведенные наблюдения позволяют сделать предварительные выводы.

Исходные производственные популяции *E. coli* штамма М-17 состояли из особей, в высокой мере неоднородных по быстроте развития, и содержали варианты, у которых время генерации в минимальной среде значительно колебалось. Выявлена обратная зависимость между исходной быстротой репликации клонов и экскрецией ими в среду обитания метаболитов, чувствительностью вариантов к видоспецифическим аутометаболитам — регуляторам роста. Так, развитие медленно растущих вариантов сопровождалось большим накоплением в среде специфических стимуляторов роста при относительно высокой чувствительности к ним этих клонов. Наоборот, быстро растущие варианты отличались меньшей экскрецией в среду обитания стимулирующих рост метаболитов и соответственно в меньшей мере усиливали свой рост под их влиянием. С этой точки зрения вполне логичным представляется тот факт, что накапливающиеся в среде обитания видоспецифические лимитирующие метаболиты больше ограничивали рост быстро растущих вариантов по сравнению с медленно растущими.

Таким образом, популяция микроорганизмов стремится к сохранению гетерогенности составляющих ее особей за счет большей стимуляции и меньшего ограничения медленно развивающихся и меньшей стимуляции и большего ограничения быстро реплицирующихся особей.

Выдвинутое предположение не входит в противоречие с опытами по автоселекции быстро растущих вариантов в условиях протока, где влияние системы аутометаболической регуляции численности на состав популяции бывает снижено (или исключено) за счет постоянного сброса части культуральной жидкости, содержащей регулирующие метаболиты.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. С. Шварц. Вестн. АН СССР, 1973, 9, 37.
2. Е. Н. Панов. Популяция и индивидуум: эволюция взаимоотношений. Природа, 1973, 3.
3. Р. А. Пшеничнов, В. М. Колотов, С. Я. Барихин, А. Г. Ткаченко, Н. А. Соколова, А. М. Ивакина. Экология, 1973, 3, 5.

4. Р. А. Пшеничнов, В. М. Колотов, С. Я. Барихин, А. Г. Ткаченко, Н. А. Соколова. Тезисы докл. конф. «Микробиологические основы дрожжевого производства». Пермь, 1973, с. 22.
5. Р. А. Пшеничнов, В. М. Колотов, С. Я. Барихин, А. Г. Ткаченко. Тезисы III Всесоюз. совещ. по управляемому биосинтезу и биофизике популяций. Красноярск, 1973, с. 56.
6. Г. Ф. Лакин. Биометрия. М., «Высшая школа», 1973, с. 19.

Р. А. ПШЕНИЧНОВ, А. Г. ТКАЧЕНКО

ПРИРОДА И НАПРАВЛЕННОСТЬ ВНУТРИПОПУЛЯЦИОННЫХ СДВИГОВ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУРАХ КАК ОТРАЖЕНИЕ МЕНЯЮЩИХСЯ УСЛОВИЙ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

Сейчас нет сомнений в том, что достаточно большие по численности внутривидовые популяции так называемых диких штаммов бактерий не идентичны по гено- и фенотипической структуре. Можно полагать, что в лабораторных условиях, как и в природных ситуациях не все составляющие их варианты получают равноценные условия для развития. Отсюда возникает мысль о том, что описание внутрипопуляционных сдвигов у бактерий может служить одним из наиболее чувствительных способов качественной и количественной оценки влияния тех или иных относительно или абсолютно селективных воздействий.

В поисках соответствующих обоснований нами исследовано суммарное влияние исходно стандартной, но постоянно меняющейся и не коррегируемой в процессе культивирования глюкозосолевой среды М-9 на структуру внутривидовых популяций *E. coli* дикого штамма М-17 при засеве в нее малых и больших доз бактерий.

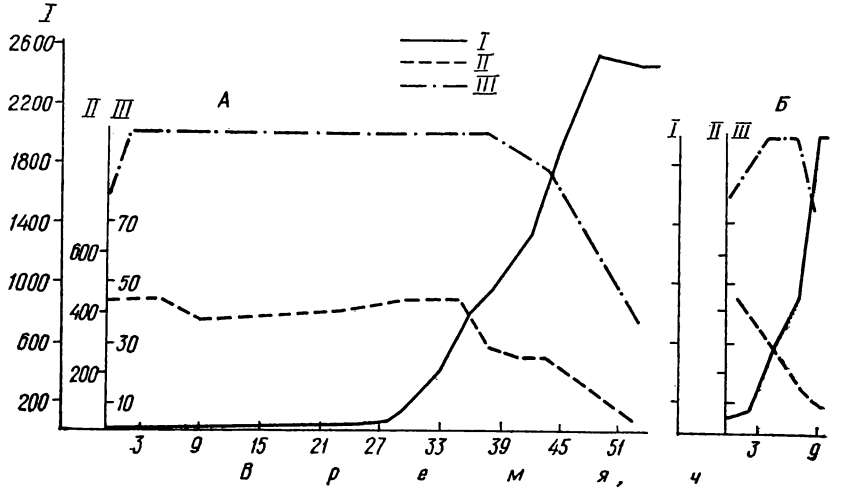
МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Неколициногенный дикий штамм *E. coli* М-17 пассировали на мясо-пептонном бульоне. Отмытую 18-часовую культуру засевали на среду М-9 [1] в конечной концентрации 10 и 100 *млн/мл*. Культивирование проводили с постоянным перемешиванием при 37° С. В течение всего роста через каждые один-два часа делали выемки образцов, в которых исследовали: 1) изменение состава среды — концентрацию глюкозы [2], pH среды, накопление экстрацеллюлярного белка по методу Лоури [3]; в отдельных опытах определяли концентрацию в среде ионов K^+ и Na^+ на пламенном фотометре ФПФ-58; 2) динамику накопления микроорганизмов в среде прямым подсчетом клеток с помощью метода фазового контраста и процент жизнеспособных форм в культуре высевами серийных разведений образцов на мясо-пептонный агар (МПА) [4].

Изменение структуры популяции оценивали в периоды адаптации, положительного ускорения, логарифмического роста, отрицательного ускорения или стабилизации численности, в фазе постепенного отмирания культуры. Определяли суммарную частоту прототрофов и зависимых форм, которые дифференцировали в отношении 30 аминокислот, витаминов, пуринов и пиримидинов по методу Холлидея [5].

Учитывая селективный тип среды, особое внимание уделяли определению в прототрофной фракции вариантов с различной скоростью роста на разных этапах культивирования. С этой целью производили посев образца на голодную агаризированную среду М-9. Скорость роста оценивали по величине диаметра колонии, выросшей через 48 *ч* инкубирования при 37° С. Чашку с выросшими на ней колониями помещали под бинокулярный микроскоп МБС-3 и путем вращения окулярмикрометра определяли размеры всех входящих в поле зрения колоний. Поля зрения меняли до тех пор, пока количество измеренных колоний не составило 150—200.

Обработку данных производили следующим образом: размеры колоний группировали в вариационный ряд, разбивали его на классы, размер которых вычисляли по формуле Стэрджеса [6]. Затем определяли среднее количество колоний каждого класса на одно поле зрения. Зная площади поля зрения и чашки, можно подсчитать количество колоний каждого класса, приходящихся на чашку, а зная количество живых клеток и колоний определенного класса на чашку, легко вычислить



Динамика развития *E.coli* (штамм М-17) при малой (*А*) и большой (*Б*) засевных дозах.

I — количество клеток, *млн/мл*; *II* — концентрация глюкозы, *мг* %; *III* — жизнеспособные особи, %.

Таблица 1

Динамика структуры популяции *E. coli* М-17 по скорости роста при засевной концентрации 10 *млн/мл*

Размер (диаметр) колоний к 48-му часу инкубации, *мм*	Класс	Сроки культивирования, ч						
		0	9	29	35	38	44	114
0,05—0,025	1-й	$0{,}25 \cdot 10^{-5}$*	$0{,}2 \cdot 10^{-5}$	—	—	—	—	—
0,3 —0,55	2-й	$0{,}27 \cdot 10^{-5}$	$0{,}2 \cdot 10^{-5}$	—	—	—	—	—
0,6 —0,85	3-й	$0{,}77 \cdot 10^{-6}$	$0{,}16 \cdot 10^{-6}$	—	—	—	—	0,002
0,9 —1,05	4-й	$0{,}3 \cdot 10^{-6}$	$0{,}25 \cdot 10^{-6}$	1,0	1,0	1,0	—	0,002
1,2 —1,4	5-й	$0{,}28 \cdot 10^{-6}$	$0{,}16 \cdot 10^{-6}$	—	—	—	0,7	0,053
1,5 —1,75	6-й	—	—	—	—	—	—	0,03
1,85—2,2	7-й	—	—	—	—	—	—	0,07
Общая частота клеток, дающих колонии на М-9		$0{,}6 \cdot 10^{-5}$	$0{,}46 \cdot 10^{-5}$	1,0	1,0	1,0	0,7	0,094

* Здесь и далее — частота клеток в популяции, дающих на М-9 колонии указанного размера.

частоту клеток в популяции, обладающих той или иной скоростью роста. Каждый вариант опыта проводили троекратно. Результаты двух характерных наблюдений приведены на рисунке и в табл. 1 и 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В параллельных опытах при засеве малых и больших доз развитие культуры в среде М-9 имело разный временной режим, хотя в целом кривые численности напоминали, если не

Таблица 2

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

Размер (диаметр) колоний к 48-му часу инкубации, *мм*	Класс	Сроки культивирования, ч			
		0	3	10	24
0,05—0,25	1-й	$1{,}1 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$0{,}9 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$
0,3 —0,55	2-й	$0{,}5 \cdot 10^{-5}$	$0{,}7 \cdot 10^{-5}$	$0{,}6 \cdot 10^{-5}$	$1{,}83 \cdot 10^{-5}$
0,6 —0,85	3-й	$0{,}4 \cdot 10^{-5}$	$0{,}5 \cdot 10^{-5}$	$0{,}3 \cdot 10^{-5}$	$0{,}5 \cdot 10^{-5}$
0,9 —1,05	4-й	$1{,}3 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
1,2 —1,4	5-й	$1{,}3 \cdot 10^{-6}$	—	$1{,}2 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
Общая частота клеток, дающих колонии на М-9		$2{,}3 \cdot 10^{-5}$	$3{,}4 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$7{,}7 \cdot 10^{-5}$

копировали друг друга. Можно полагать, что, избрав для любой из засеваемых доз иной временной масштаб, мы могли бы получить совпадающие по высоте и направленности кривые. На первый взгляд, это может явиться основанием для утверждения общих закономерностей развития бактериальных популяций, у которых динамика численности является функцией засеваемой дозы и времени культивирования.

Исследуемые показатели среды менялись соответственно накоплению биомассы. Изменение уровня глюкозы в среде было обратно пропорциональным накоплению клеток, а смещение pH в кислую сторону прямо зависело от степени утилизации глюкозы. Присутствие в среде ионов K^+ и Na^+ существенно не снижалось, что исключало выраженное лимитирующее влияние этих компонентов.

В культуре наблюдали накопление метаболитов и продуктов лизиса части клеток, о чем свидетельствует повышение концентрации белка в периоды стабилизации и постепенного снижения концентрации клеток в культурах (60—80 *мг/л* среды). В целом описанные изменения состава среды можно расценивать как достаточно типичные для отдельных фаз развития культуры и лишь сдвинутые во времени соответственно величине засевной дозы. По нашему мнению, наибольший интерес представляют данные по динамике внутрипопуляционных сдвигов в культурах, полученных засевами малых и больших доз *E. coli* в селективную среду М-9.

На первый взгляд, структура инокулята дикого штамма, в котором содержание прототрофов, способных к росту на селективной минимальной среде М-9, составляло 0,0005—0,0009%, должна была претерпеть значительные изменения, и только затем размножившиеся и вытеснившие ауксотрофов прототрофы могли обеспечить наблюдаемый рост культуры. Очевидно, так и происходило при засеве малых доз (10 *млн/мл*). Исходная частота прототрофов в этом случае была мала и составляла $0{,}6 \cdot 10^{-5}$, или 0,0006% клеток. При сохраняющейся или мало изменяемой численности популяции содержание прототрофной фракции в ней неуклонно возрастало, и к 29-му часу развития почти вся популяция состояла из прототрофов, способных к росту на минимальной среде. Затем перестроившаяся прототрофная культура вступала в фазу логарифмического роста, и к 38—45 *ч* ее численность увеличилась в 65 раз при содержании прототрофов около 100%. Дальнейшая стабилизация и уменьшение численности популяции происходили на фоне появления и увеличения зависимой фракции. К 114 *ч* наблюдения частота ауксотрофов в культуре возросла до 30—99%. Характерно, что как в начале, так и в конце развития культуры это были варианты, зависимые по глутаминовой и никотиновой кислотам.

Более своеобразен путь достижения максимальной численности популяции, формируемой большими засевными дозами.

Здесь исходная частота прототрофов в инокулятах была примерно той же ($1{,}1—2{,}3 \cdot 10^{-5}$), как и при засеве малыми дозами. В дальнейшем соотношение прототрофной и зависимой фракций существенно не изменилось, и частота прототрофов сохранялась на уровне $3{,}4—7{,}7 \cdot 10^{-5}$ (т. е. в пределах одного порядка) на всех этапах развития.

Увеличение численности популяции к шестому и девятому часам развития (соответственно в 9 и 20 раз) вряд ли можно объяснить только размножением прототрофной фракции культур. Это превышает их потенциальные возможности репликации и не соответствует результатам определений. Видимо, в данном случае мы сталкиваемся и с развитием зависимой фракции в первоначально селективной среде, состав которой изменяется при развитии популяции. Мы допускаем, что наблюдаемый феномен роста ауксотрофов может быть объяснен стимулирующим действием первичных метаболитов, выделяемых растущей прототрофной фракцией или продуктами лизиса части клеток, обеспечивающими накопление в среде минимальных пороговых количеств веществ, которые необходимы для развития зависимой фракции культуры.

Подобная ситуация при засеве малых доз создается лишь на поздних этапах развития, когда общая плотность популяции, степень экскреции метаболитов достаточно высоки, а лизис части клеток на фазах стабилизации численности или постепенного их отмирания обеспечивает поступление значительных количеств биоорганических веществ в среду.

Столь же своеобразные изменения наблюдались в соотношениях фракций быстро и медленно растущих вариантов клеток в популяциях. Развитие малых доз инокулята сопровождалось преимущественным накоплением быстро растущих и относительным снижением содержания медленно реплицирующихся вариантов. Эти выраженные сдвиги возвращались к первоначальному состоянию при стабилизации численности и постепенном отмирании клеток. Не исключено, что заключительный этап описанной картины является следствием лучшего выживания медленно реплицирующихся особей в среде, меняющейся в неблагоприятную сторону, где размножение энергично растущих вариантов тормозится в большей степени.

При засеве большой дозы инокулята не обнаружено подобного перераспределения медленно и быстро растущих вариантов в популяции. Их соотношение на протяжении всего культивирования изменялось несущественно и не могло быть объяснено с позиций установленных фактов и гипотез. Вместе с тем четко выраженные отличия в структуре популяций, формируемых большими и малыми дозами инокулята, по содержанию в них быстро и медленно растущих вариантов не вызывают сомнений и требуют объяснений. Этому вопросу посвящены работы Брауна [7], Ричмонда [8], Гудлоу [9] и наши предыдущие исследо-

вания [10, 11]. Однако природа наблюдаемых явлений еще до конца не изучена. Поэтому пока лишь можно констатировать, что один и тот же штамм микроорганизмов (*E. coli*), засеваемый в больших и малых дозах на среду М-9, реализует свои потенциальные возможности и достигает максимальной численности разными путями. При этом структура инокулята и растущей популяции претерпевает значительные изменения при малых и менее выраженные сдвиги при больших засевных дозах. Это касается как соотношения прототрофной и зависимой фракций, так и количественных соотношений быстро и медленно растущих вариантов в культурах.

Из сказанного можно сделать вывод, что метод структурно-популяционного анализа открывает новые возможности для изучения характера и природы влияний разнообразных селективных воздействий и типа приспособительных реакций бактериальных популяций при этих влияниях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сборник методик по генетике микроорганизмов. Под ред. Р. Клауса и У. Хейса. Перев. с англ. М., «Медицина», 1970, с. 76.
2. А. Б. Райцис, А. О. Устинова. Лабораторное дело, 1965, 1, 15.
3. O. H. Lowri, N. J. Rosenbroungh, A. L. Farr, R. J. Randall. J. Biol. Chem. 1951, **193**, 25.
4. Дж. Мейнелл, Э. Мейнелл. Экспериментальная микробиология. М., «Мир», 1967, с. 28.
5. R. Holliday. Nature, 1956, 178, 987.
6. Г. Ф. Лакин. Биометрия. М., «Высшая школа», 1973, с. 19.
7. В. Браун. Генетика бактерий. М., «Наука», 1968, с. 180.
8. Richmond. J. Gen. Mickrobiol., 1962, 27, 285.
9. R. J. Goodlou. Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 1951, 76, 786.
10. Р. А. Пшеничнов, В. М. Колотов, В. П. Коробов, С. Я. Барихин, Н. А. Соколова, А. М. Ивакина, А. Г. Ткаченко. Экология, 1973, 3, 5.
11. Р. А. Пшеничнов, В. М. Колотов, С. Я. Барихин, А. Г. Ткаченко, М. М. Дедюкина. Экология, 1975, 2, 21.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ 1977

А. И. КОРОТЯЕВ, О. А. ЗЕНЦОВА

СОДЕРЖАНИЕ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАБОТЫ РИБОСОМ У ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО АМИНОКИСЛОТНОМУ КОНТРОЛЮ СИНТЕЗА РНК, ПРИ ИЗМЕНЕНИИ СКОРОСТИ РОСТА

Удобной моделью для изучения регуляции синтеза РНК являются ауксотрофные бактерии, требующие для своего роста одну или несколько аминокислот. У большинства ауксотрофов при отсутствии в среде необходимой аминокислоты угнетается синтез белка и РНК. Однако среди них выделены мутанты, продолжающие синтез РНК и в отсутствие синтеза белка. Они были названы «ослабленными» (relaxed) в отличие от «строгих» (stringent), которые при отсутствии в среде необходимой аминокислоты прекращают синтез белка и РНК [1]. «Строгие» мутанты предложено обозначать символом rel^+, а «ослабленные» — символом rel^- [2]. Механизм функционирования rel-гена пока неизвестен. Критический анализ шести различных гипотез аминокислотной регуляции синтеза РНК привел к заключению, что ни одна из них не дает удовлетворительного объяснения [2]. Предполагается, что функция rel-гена заключается в уравнивании скорости синтеза стабильных РНК со скоростью работы белоксинтезирующей системы клетки.

Для выяснения возможной взаимосвязи функционирования rel-гена с эффективностью работы белоксинтезирующей системы нами проведено сравнительное изучение содержания и эффективности работы рибосом, а также динамики отношения тотальный белок/РНК у штаммов со «строгим» и «ослабленным» контролем синтеза РНК при росте на различных средах, а также при переносе из бедной питательной среды в обогащенную — «сдвиг вверх» («shift-up»).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали два изогенных штамма *E. coli*, различающихся по аминокислотному контролю синтеза РНК: *E. coli* CP78 Arg^-, Try^-, Leu^-, Hys^-, B_1^- (*E. coli* CP78 rel^+) — штамм со «строгим» контролем синтеза РНК и *E. coli* CP79 Arg^-, Try^-,

Leu⁻, Hys⁻, B$_1^-$ (*E. coli* CP79 rel⁻) — штамм с «ослабленным» контролем синтеза РНК. Методы получения синхронных культур описаны в работе [3]. Для выращивания культур использовали мясопептонный бульон (МПБ) и минимальную среду М-9 с глюкозой. При культивировании на минимальной среде *E. coli* CP78 и CP79 добавляли L-треонин, L-гистидин, L-лейцин, L-аргинин из расчета 20 *мг/л* и тиамин из расчета 2 *мг/л*. «Сдвига вверх» достигали добавлением к среде равного объема концентрированного МПБ. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева с помощью фазово-контрастного микроскопа. Белок определяли по методу Лоури [4], нуклеиновые кислоты фракционировали по методу Шмидта и Таннхаузера [5]. Количественное определение РНК проводили спектрофотометрически с помощью спектрофотометра СФ-16 по методу Спирина [6]. Количество рибосом в клетке и скорость биосинтеза рибосомами белка рассчитывали по предложенной нами формуле [3]

$$V = \frac{\frac{N_2}{N_1} \cdot m_2 - m_1}{\frac{N_2}{N_1} \cdot n \cdot t}, \qquad (1)$$

где V — количество белка, синтезируемого рибосомой в секунду *г* (эту величину затем выражали в аминокислотах, исходя из среднего молекулярного веса аминокислоты, равного 120); m_1 и m_2 — количество белка в клетке в соответствующие промежутки времени, *г*; n — число рибосом в клетке; N_1 и N_2 — количество клеток в соответствующие периоды роста; t — интервал времени, *сек*; а также по формуле [7]

$$V = \frac{\frac{\text{Protein}}{120} \cdot \mu \cdot \ln 2}{\frac{\text{r RNA}}{1{,}6 \cdot 10^6} \cdot 0{,}77}, \qquad (2)$$

где V — количество аминокислот, включаемых в полипептидную цепь рибосомой за 1 *сек*; Protein — прирост белка; μ — скорость роста культуры, определяемая количеством удвоений клеток за 1 *ч*; 120 — средний молекулярный вес одной аминокислоты; rRNA — содержание рРНК; $1{,}6 \cdot 10^6$ — молекулярный вес рРНК; 0,77 — коэффициент активных рибосом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Скорость роста культуры μ *E. coli* CP78 rel⁺ на МПБ и минимальной среде М-9 составляла 1,3 и 0,67, а *E. coli* CP79 rel⁻ — 1,0 и 0,67 удвоений за 1 *ч* соответственно. Как видно из табл. 1, со-

Таблица 1

Количество рибосом у *E. coli* CP78 и CP79 при росте на различных средах, $n \cdot 10^3$

Штамм	Среда	Колич. опытов	В начале лаг-фазы	В конце лаг-фазы	В первой генерации	Во второй генерации
E. coli CP78 rel+	МПБ	8	9±1,8	23±0,8	24±1,4	15±1,7
	М-9	11	7±1,2	12±1,0	12±1,0	12±0,9
E. coli CP79 rel−	МПБ	9	10±2,2	22±2,9	27±1,0	18±1,8
	М-9	11	10±1,0	18±1,5	12±0,9	10±0,4

держание рибосом у бактерий резко изменяется в зависимости от фазы роста. Максимальное количество рибосом наблюдается к концу лаг-фазы и в клетках первой генерации. Вместе с тем при росте на обогащенной питательной среде клетки содержат значительно больше рибосом, чем при росте на минимальной среде. Эти наблюдения подтверждают, что содержание рибосом у бактерий является функцией условий их роста [3].

Изучение динамики отношения тотальный белок/РНК показало, что в процессе роста культуры на одной и той же среде оно практически остается постоянным, т. е. не зависит от фазы роста. Поэтому в табл. 2 приведены усредненные значения этого отношения за весь изученный период роста. Видно, что у штамма со «строгим» контролем синтеза РНК существует обратная зависимость между μ и отношением тотальный белок/РНК: с уменьшением скорости роста культуры на единицу РНК в клетке приходится больше белка.

Одной из возможных причин уменьшения отношения тотальный белок/РНК при повышении скорости роста может быть предпочтительный синтез рибосомального белка (Р-белка), необходимого для формирования бóльшего количества рибосом, поскольку скорость его синтеза примерно в два раза ниже скорости синтеза нерибосомального белка [8].

Таблица 2

Зависимость отношения тотальный белок/РНК и относительного содержания рибосомального белка от μ

Штамм	Среда	μ	Колич. опытов	Тотальный белок/РНК	Р-белок/тотальный клеточный белок, %
E. coli CP78 rel+	МПБ	1,3	8	4,3±0,39	10,3
	М-9	0,67	11	5,6±0,29	7,7
E. coli CP79 rel−	МПБ	1,0	9	4,1±0,35	10,0
	М-9	0,67	11	3,9±0,47	9,9

Таблица 3

Зависимость эффективности биосинтеза белка рибосомами (количество аминокислот, включаемых рибосомой в полипептидную цепь в секунду) от μ

Штамм	Среда	μ	Колич. опытов	Эффективность биосинтеза белка, рассчитанная по формулам	
				(1)	(2)
E. coli CP78 rel+	МПБ	1,3	8	20±2,8	11±2,8
	М-9	0,67	11	17±2,1	10±2,2
E. coli CP79 rel⁻	МПБ	1,0	9	25±3,2	10±2,9
	М-9	0,67	11	15±2,3	5±2,5

С целью проверки правильности сделанного предположения нами проведено определение содержания рибосомального белка при различных скоростях роста. Количество Р-белка в клетке подсчитывали, используя литературные данные о процентном содержании Р-белка и рРНК в рибосомах [9]. Результаты, приведенные в табл. 2, подтверждают, что у штамма со «строгим» контролем синтеза РНК с увеличением скорости роста культуры увеличивается относительное содержание Р-белка. Поскольку синтез Р-белка и рРНК носит координированный характер, одновременное увеличение скорости синтеза рРНК также должно способствовать уменьшению отношения тотальный белок/РНК. У штамма же с «ослабленным» контролем при изменении скорости роста отношение Р-белок/тотальный клеточный белок существенно не изменяется (табл. 2). По-видимому, при всех скоростях роста культуры синтез рРНК у штамма rel⁻ идет с одинаковой скоростью, в связи с чем и отношение тотальный белок/РНК сохраняется постоянным.

В табл. 3 приведены результаты определения эффективности работы рибосом, рассчитанные по формулам (1) и (2). Хотя эти формулы, предложенные в разное время и независимо друг от друга, исходят из одних и тех же предпосылок, абсолютное значение эффективности, определяемое по ним, не совпадает, что, вероятно, связано с тем, что ни одна из них не позволяет достаточно точно учесть все особенности работы белоксинтезирующей системы клетки. Более предпочтительна формула (1), поскольку при расчетах по ней наблюдается лучшее совпадение результатов в стандартных условиях опыта.

Как видно из табл. 3, эффективность биосинтеза белка у штамма со «строгим» контролем при изменении μ от 1,3 до 0,67, независимо от того, по какой формуле она рассчитывалась, практически не изменяется. У штамма с «ослабленным» контролем синтеза РНК изменение μ от 1,0 до 0,67 влечет за собой значительное снижение скорости биосинтеза белка.

Сходные закономерности в изменении содержания рибосом, от-

ношения тотальный белок/РНК и эффективности биосинтеза белка были выявлены и при «shift-up»:

	E. coli CP78 rel+	*E. coli* CP79 rel−
Содержание рибосом в клетке, 10^8:		
М-9+глюкоза	12±0,9	10±0,4
МПБ	20±2,5	24±1,7
Отношение тотальный белок/РНК:		
М-9+глюкоза	5,6±0,29	3,4±0,41
МПБ	4,1±0,21	3,1±0,26
Эффективность биосинтеза белка, рассчитанная по формуле (1):		
М-9+глюкоза	17±2,1	12±2,3
МПБ	17±2,1	20±2,4

Из приведенных данных видно, что перенос клеток из бедной среды в богатую вызывает у обоих штаммов значительное увеличение содержания рибосом в соответствии с выявленной закономерностью: содержание рибосом у бактерий есть функция условий их роста. У штамма со «строгим» контролем синтеза РНК «сдвиг вверх» не сопровождается изменением эффективности работы рибосом, но вызывает выраженные изменения в отношении тотальный белок/РНК. У штамма с «ослабленным» контролем синтеза РНК отношение тотальный белок/РНК при «сдвиге вверх» меняется незначительно, но заметно повышается эффективность работы рибосом.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что мутация в области rel-гена, не нарушая регуляции общего содержания рибосом бактерий, зависящего от условий роста культуры, приводит к каким-то изменениям в механизме работы рибосомального аппарата, проявляющимся в том, что «сдвиг вверх» у rel-штамма при неизменном отношении тотальный белок/РНК значительно изменяет эффективность работы рибосом.

ЛИТЕРАТУРА

1. G. S. Stent, S. Brenner. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1961, **47**, 205.
2. G. Edlin, P. Broda. Bacteriol. Rev., 1968, **32**, 206.
3. А. И. Коротяев, В. Ф. Максимов, И. Н. Ширяева. Докл. АН СССР, 1968, **178**, 1410.
4. O. H. Lowry, H. I. Rosenbroungh, A. L. Farr, R. I. Randall. J. Biol. Chem., 1951, **193**, 265.
5. G. Schmidt, S. I. Tannhauser. J. Biol. Chem., 1945, **161**, 83.
6. А. С. Спирин. Биохимия, 1958, **23**, 656.
7. I. Forchamer, L. Lindahl. J. Mol. Biol., 1971, **55**, 563.
8. R. Harvey. J. Bacteriol., 1970, **2**, 574.

Н. С. ЧУРИЛОВА, В. П. КОРОБОВ

ДИНАМИКА ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ НА РАЗНЫХ ФАЗАХ РАЗВИТИЯ ПОПУЛЯЦИИ *ESCHERICHIA COLI*

Известно, что у бактерий не обнаружены изолированные структуры типа митохондрий, но методом электронной микроскопии выявлены структуры типа мезосом, ограниченные трехслойной мембраной и представляющие собой разнообразные по форме производные цитоплазматической мембраны — плазмалеммы [1—8]. Некоторые из этих структур содержат грибовидные образования, характерные для митохондриальных мембран [9—10]. Предполагают [11, 12], что такие структуры являются в бактериальных клетках центрами окислительной активности, поскольку они способны участвовать в реакциях, характерных для ферментов цепи переноса электронов, а также окрашиваться янусом зеленым [13]. При обработке солями тетразолия в них обнаруживается образование формазана [14]. Они способны избирательно накапливать антибиотик тетрациклин, вызывающий их люминесценцию при возбуждении лучами синефиолетового участка спектра, что характерно для мембран, содержащих ферменты цепи переноса электронов и аккумуляции энергии [15—18].

По-видимому, эти мембранные образования являются своеобразными дыхательными «центрами» бактериальной клетки. Люминесценция в присутствии тетрациклина в ультрафиолете позволяет исследовать их при различных физиологических состояниях и экспериментальных воздействиях. Мы учитываем, что интенсивность развития культуры во многом определяется характером активности различных систем энергообеспечения клетки.

Целью настоящей работы было исследование пространственной организации дыхательных ферментов на разных стадиях развития популяции *E. coli* в условиях, различающихся по источнику углерода.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на периодической культуре *E. coli* (штамм М-17) при развитии на оптимальной среде МПБ. Параллельно проводились опыты со штаммом М-17, адаптирован-

ным к минимальной синтетической среде М-9 [19] с глюкозой в качестве источника углерода путем троекратного пассажа культуры на агаризированной среде М-9 и последующего отбора наиболее активно растущих колоний.

Восемнадцатичасовую культуру *E. coli* отмывали физиологическим раствором, засевали на питательную среду и культивировали при 37° С. Пробы брали через каждый час с момента засева. Клетки обрабатывали раствором тетрациклина (конечная концентрация 1 : 10000), после чего готовили препараты, которые изучали последовательно методом люминесцентной и фазово-контрастной микроскопии. В работе использовали микроскоп МЛ-2Б. В каждом препарате подсчитывали распределение полностью люминесцирующих и нелюминесцирующих клеток, а также количество люминесцирующих гранул на 100 клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении характера люминесценции клеток удалось обнаружить следующие типы люминесцирующих структур на среде М-9 (рис. 1): тотальная люминесценция, клетки с двумя ярко люминесцирующими гранулами на полюсах, с гранулой на

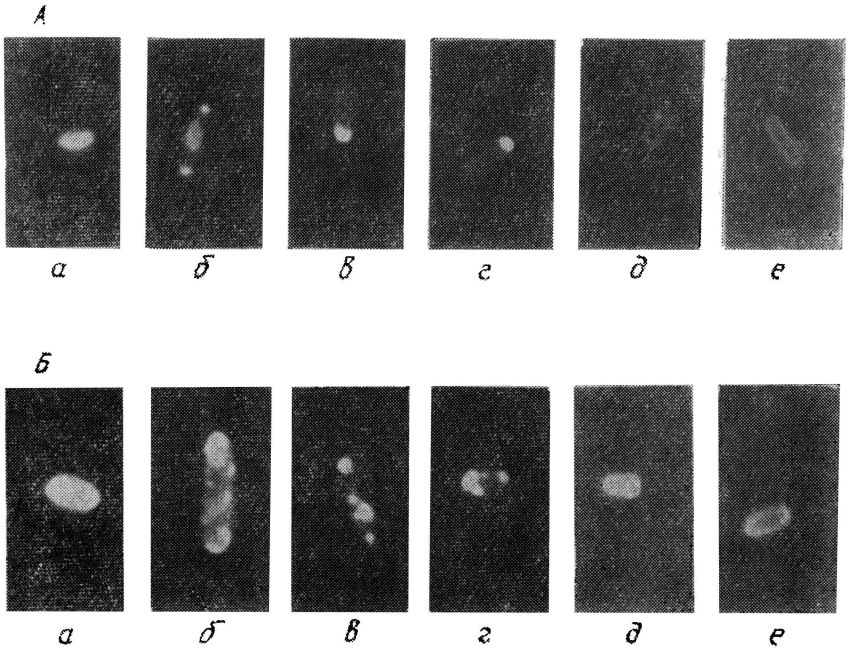


Рис. 1. Характер люминесценции клеток *E.coli* после обработки их тетрациклином на среде М-9 (*А*) и МПБ (*Б*).

одном из полюсов или на боковой стороне, с люминесцирующей цитоплазматической мембраной. На МПБ клетки имеют значительно больший размер, чем на среде М-9, более интенсивно и разнообразно люминесцируют. Встречаются клетки с количеством люминесцирующих гранул от 3 до 9 (рис. 1, *б, в, г*).

Нами сделана попытка дать количественную оценку интенсивности люминесценции культуры *E. coli* на разных фазах развития по количеству люминесцирующих и нелюминесцирующих клеток, а также по количеству светящихся гранул.

Для динамики развития *E. coli* на голодной среде характерна замедленная лаг-фаза. Исходная культура, отмытая физиологическим раствором, не люминесцирует, но в течение первых трех часов развития (лаг-фаза) количество тотально люминесцирующих клеток возрастает, достигая максимума к концу третьего часа. Имеются единичные клетки с локальной люминесценцией. К концу лаг-фазы их количество возрастает, а началу фазы экспоненциального роста предшествует формирование одной или двух гранул почти у всех клеток и полное исчезновение тотальной люминесценции (табл. 1). Следует отметить, что общее количество гранул в клетках, выращенных на среде М-9, по сравнению с культурой, выращенной в бульоне, невелико — 97 гранул на 100 клеток.

Стационарная фаза популяции, развивающейся на синтетической среде, характеризуется снижением числа люминесцирующих клеток, полным отсутствием тотальной люминесценции и резким увеличением количества нелюминесцирующих клеток. На 12—14-м часу развития культура *E. coli* не люминесцирует, либо люминесценция весьма слабая (см. рис. *1, д, е*), хотя культура в этот период сохраняет высокую жизнеспособность.

В условиях полноценной питательной среды МПБ (см. рис. 1, *б*) уже через 10 *мин* после засева исходной культуры, не люминесцирующей после отмывания ее физиологическим раствором, отмечается тотальная люминесценция почти всех клеток, которая исчезает к началу логарифмической фазы. В это же время в течение лаг-фазы происходит интенсивный рост клеток и формирование гранул (см. рис. 1, *б, в*). Наибольшее количество гранул отмечается к концу лаг-фазы (421 на 100 клеток), а количество нелюминесцирующих клеток в период лаг-фазы минимально (1—3 на 100 клеток, табл. 2).

В период экспоненциального роста гигантские клетки, содержащие от 4 до 9 гранул, исчезают, уступая место клеткам, содержащим 1—3 гранулы (рис. 1, *г, д*), возрастает количество нелюминесцирующих клеток и появляются клетки, у которых люминесцирует только цитоплазматическая мембрана (см. рис. *1, е*). Для стационарной фазы развития популяции характерно наибольшее количество клеток, содержащих одну или две гранулы, расположенные по полюсам, и лишенных гранул, у которых достаточно отчетливо проявляется люминесценция

Таблица 1

Динамика люминесценции клеток *E. coli* М-17 при развитии на среде М-9 (средние данные по результатам 9 опытов)

Фаза развития*	Рост культуры, ч	Количество клеток							Количество гранул на 100 клеток
		нелюминесцирующих	тотально люминесцирующих	с 1 гранулой	с 2 гранулами	с 3 гранулами	с 4 гранулами	с люминесцирующей мембраной	
Лаг-фаза	1	73	25	2	—	—	—	—	2
	2	41	59	—	—	—	—	—	—
	3	11	89	—	—	—	—	—	—
Лог-фаза	4	24	69	7	—	—	—	—	7
	5	19	2	52	4	2	2	19	64
	6	16	—	62	16	1	—	5	97
Стационарная	7	9	—	76	9	—	—	6	94
	8	20	—	65	9	—	—	6	83
	9	13	—	69	5	—	—	13	79
	10	21	—	61	—	—	—	18	61
	11	75	—	18	2	—	—	5	22

* Исходная культура — 100 нелюминесцирующих клеток.

Таблица 2

Динамика люминесценции клеток *E. coli* М-17 в среде МПБ (средние данные по результатам 6 опытов)

Фаза развития	Рост культуры, ч	Количество клеток							Количество гранул на 100 клеток
		нелюминесцирующих	тотально люминесцирующих	с 1 гранулой	с 2 гранулами	с 3 гранулами	с 4 гранулами и более	с люминесцирующей мембраной	
Исходная культура		96	—	3	1	—	—	—	5
	10 *мин*	3	89	3	2	1	2	—	18
Лаг-фаза	1	1	51	2	8	21	17	—	149
	2	3	2	4	9	15	65	2	421
Лог-фаза	3	5	—	13	31	37	11	3	230
	4	21	—	16	37	18	—	8	144
Стационарная	5	28	—	21	32	9	—	10	112
	6	30	—	24	31	2	—	13	92
	7	29	2	29	20	2	—	18	75
	8	27	6	31	19	—	—	17	69
	9	25	7	30	22	—	—	16	74
	10	23	6	39	19	—	—	13	77

цитоплазматической мембраны. Возрастает также количество нелюминесцирующих и появляются полностью люминесцирующие клетки. Это, как правило, предшествует второму подъему численности популяции.

Таким образом, по мере развития бактериальной популяции прослеживается отчетливая смена организации дыхательных ферментов. Эти перестройки наиболее ярко выражены при росте на полноценной среде (рис. 2, Б). Одновременно необходимо отметить, что динамика люминесценции отражает существенное влияние на формирование различных мембранных образований условий среды обитания бактерий.

Установлено, что мембраны не являются пассивными носителями ферментов и мультиферментных комплексов [20], а способны активно воздействовать на конформацию ферментной молекулы, переводя ее в активное состояние [21]. Степень модифицирующего воздействия мембраны зависит от фазы развития культуры [22].

При развитии *E. coli* на среде М-9, когда единственным источником углерода является глюкоза, происходит активация ферментов гликолитического расщепления глюкозы и ферментов цикла трикарбоновых кислот. В условиях полноценной среды культивирования функционирует целый ряд метаболических путей, продукты которых так же, как и продукты гликолиза, включаются в цикл трикарбоновых кислот, значительно повышая фонд субстратов терминального окисления и активность

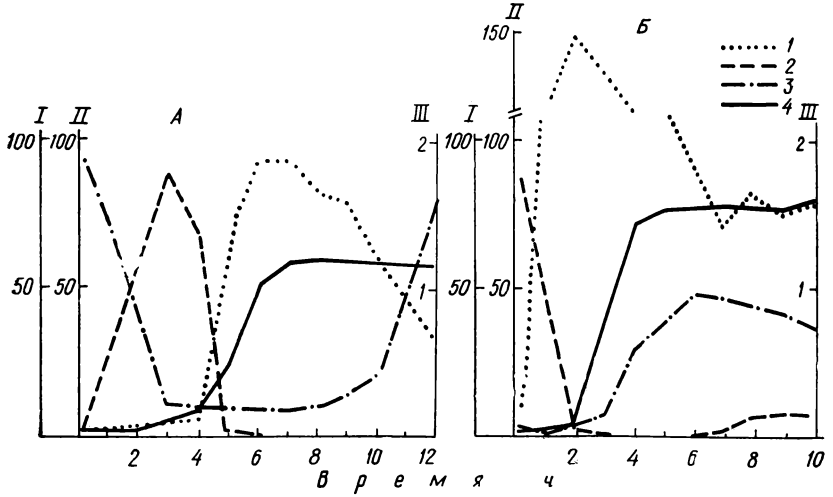


Рис. 2. Динамика люминесценции *E.coli* при культивировании на среде М-9 (*А*) и МПБ (*Б*).

1 — количество гранул (на 100 клеток); *2* — количество люминесцирующих клеток; *3* — количество нелюминесцирующих клеток; *4* — динамика численности популяции, *мард/мл*.

оксидаз. По-видимому, результатом этого является бóльшее количество люминесцирующих гранул в бульонной культуре. После засева культуры на свежую среду обитания начинается процесс синтеза или активации ферментов на всех участках цитоплазматической мембраны, который в условиях полноценной среды протекает очень быстро, а на голодной среде затягивается до трех часов (см. рис. 2). Возможно, что этими процессами объясняется тотальная люминесценция бактериальных клеток.

Экспоненциальная фаза — фаза наибольшей метаболической и энергетической активности, требует рациональной организации дыхательных ферментов, полностью обеспечивающей энергетические потребности клетки. Такой оптимально организованной структурой для бактериальных клеток, по-видимому, является образование гранул, люминесцирующих в присутствии тетрациклина. Наибольшее их количество обнаруживается именно на логарифмической фазе развития культуры как в условиях полноценной среды, так и при развитии на минимальной синтетической среде.

Специфические изменения люминесценции при переходе от одной фазы развития к другой, обнаруживающие четкий фазовый характер, вероятно, являются отражением действия в бактериальной популяции регуляторных механизмов, возможно, проявляющихся через выделение в среду соединений, служащих сигналом для быстрой модификации мембранной локализации и активности дыхательных ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. G. B. Charman. J. Biophys. Biochem. Cytol., 1959, **6**, 221.
2. G. B. Charman. J. Bacteriol., 1960, **79**, 132.
3. A. Glauert, D. Hopwood. J. Biophys. and Biochem., Cytol., 1959, **6**, 515
4. A. Glauert, D. Hopwood. Proc. Europ. Reg. Conf. Electron. Microsc., Delft., 1960, **2**, 757.
5. A. Ryter, F. Jacob. Ann. Inst. Pasteur, 1964, **207**, 384.
6. М. А. Лукоянова. Особенности организации дыхательных ферментов мембран. Автореф. канд. дисс. М., 1960.
7. В. И. Бирюзова, М. Н. Мейсель. Молекулярная биология (проблемы и перспективы). М., «Наука», 1964, с. 316.
8. Л. Н. Кац. Эволюция мембранных структур и ядерного аппарата у микроорганизмов. М., 1967, с. 24.
9. W. J. von Iterson. Cell. Biol., 1966, 28, 563.
10. Р. С. Головачева, В. И. Бирюзова, А. П. Калюжная. VII Всесоюз. конф. по электронной микроскопии. Киев, 1969, с. 183.
11. B. Ferrandes, P. Choix, A. Ryter. C.r. Acad. sci. Paris, 1966, **236**, 1632.
12. L. R. Otero-Vilardebo, N. Lane, G. C. Godman. J. Cell. Biol., 1963, **19**, 647.
13. A. Alexeyew. Arch. Protistenkunde, 1924, **49**, 394.
14. Э. Пирс. Гистохимия. М., Изд-во иностр. лит., 1962.
15. H. G. Du Buy, J. L. Showacre. Science, 1961, **133**, 196.
16. М. Н. Малатян. Докл. АН СССР, 1962, **143**, 955.

17. М. Н. Малатян. Микробиология, 1963, **32**, 806.
18. М. Н. Малатян, В. И. Бирюзова. Докл. АН СССР, 1965, **160**, 1182.
19. Сборник методик по генетике микроорганизмов. Под ред. Р. Клауса и У. Хейса. Перев. с англ. М., «Медицина», 1970, с. 203.
20. С. В. Конев, С. А. Аксенцев, Е. Н. Черницкий. Кооперативные переходы белка в клетке. Минск, «Наука и техника», 1970.
21. C. C. Cunningam, L. P. Hager. J. Biol. Chem., 1971, **246**, 1575.
22. D. R. Long, J. Felix, D. C. Lungren. J. Bacteriol., 1972, **110**, 968.

В. П. КОРОБОВ, Б. М. ЛЕМКИН

АКТИВНОСТЬ ОКСИДАЗ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ УСЛОВИЙ РАЗВИТИЯ ПОПУЛЯЦИИ *ESCHERICHIA COLI* М-17

Различные варианты оптимизации условий развития популяции *E. coli* неизменно приводят к однозначному результату — снижению ее скорости роста и численности при достижении плотности $2—5 \cdot 10^9$ клеток на 1 *мл* среды обитания [1]. Подобная динамика развития бактериальной популяции не может быть объяснена истощением питательных ресурсов среды, поскольку она сохраняется и в условиях поддержания постоянной концентрации источников питания [2] и удаления продуктов жизнедеятельности [3]. Это наводит на мысль о существовании особых механизмов контроля развития популяции, при участии которых достигается оптимальное соответствие скорости роста и численности сообщества каждому периоду его развития.

Согласно работам [2, 4], популяция микроорганизмов может быть рассмотрена как единое функциональное целое благодаря интегративному действию специфических метаболитов, продуцируемых в среду обитания. Показано [5—8] наличие подобных соединений и в популяциях высших организмов. Естественно допустить, что действие регуляторных соединений должно быть направлено на фундаментальные процессы жизнеобеспечения, в частности на реакции освобождения и утилизации энергии. Учитывая разнонаправленность действия этих веществ на отдельных этапах развития популяции [2, 4, 7, 9], можно считать, что их синтез и секреция в среду должны быть сигналом для фазовых переходов основных энергодающих процессов с быстрым установлением необходимого соотношения скоростей окисления субстратов и утилизации макроэргических соединений в процессах роста и развития.

Дыхательный аппарат *E.coli* достаточно хорошо изучен, но до сих пор нет единой точки зрения на строение основной цепи терминального окисления веществ у этих бактерий. На основании ряда исследований можно считать, что помимо двух основных ветвей (НАДН- и сукцинатоксидазной), у *E. coli* имеются дополнительные пути поступления восстановительных эквивалентов с лактата, α-глицерофосфата, жирных кислот и других

соединений, включающие группу особых флавопротеидов, менаи убихинонов, белков, содержащих негемовое железо, и цитохромов [10, 11].

Возможно, что на разных фазах развития бактерии используют различные пути извлечения энергии. У аэробных микроорганизмов наиболее важен процесс окислительного фосфорилирования, жестко сопряженный с работой дыхательной цепи.

В этой связи представлялось целесообразным исследовать способность популяции *E. coli* к окислению различных субстратов на разных фазах ее развития. Такой подход позволяет охарактеризовать интенсивность функционирования отдельных участков конечного окисления с выявлением наиболее активного на данном этапе развития пути извлечения энергии, а также сопоставить активность цепей окисления при выращивании *E. coli* в различных по источникам питания условиях. Это позволяет также выявить наиболее устойчивые, генетически жестко закрепленные и потому жизненно важные системы энергообеспечения и оценить лабильность энергетических систем в зависимости от условий среды обитания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на культуре *E. coli* (штамм М-17), полученной из Пермского НИИ вакцин и сывороток. В лабораторных условиях *E. coli* хранили при температуре 4° С на агаризированной среде М-9 и МПА. Выращивание культур проводили на мясо-пептонном бульоне с pH 7,6 и на синтетической среде М-9 [12].

Для засева использовали 18—20-часовую культуру, восстановленную с косячков в соответствующих средах. Культивирование вели в колбах объемом 500 *мл* в термостате при 37° С. За развитием культуры следили путем подсчета клеток в пробах, выемку которых проводили через каждый час после засева, используя метод прямого счета в камерах Горяева на микроскопе Биолам-70.

При выходе культуры на определенную фазу развития (лог-, стационарную и отмирания) биомассу отделяли на центрифуге ЦЛС-3 при 5 тыс. *об/мин* в течение 40 *мин*. Осадок бактерий отмывали физиологическим раствором и повторно центрифугировали при том же режиме. Полученную бактериальную массу суспендировали в физиологическом растворе до концентрации 80 *мг* сырой биомассы на 1 *мл*.

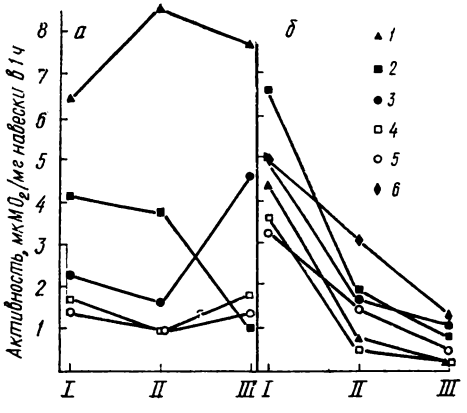
Определение дыхания бактериальных клеток производили манометрическим методом в аппарате Варбурга [13, 14]. Среда инкубации была следующей: KH_2PO_4 40 *мкМ* (pH 7,4); KCl 140 *мкМ*; $MgCl_2$ 10 *мкМ*; сукцинат калия 20 *мкМ*; пируват 20 *мкМ*+малат 5 *мкМ*; α-глицерофосфат 20 *мкМ*; α-кетоглутарат 20 *мкМ*; НАДН 14 *мкМ*; лактат 53 *мкМ*. К среде инку-

бации добавляли 0,5 *мл* взвеси бактерий *E. coli* в физиологическом растворе. Конечный объем пробы 2,0 *мл*. Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури [15]. Дыхание клеток рассчитывали в *мкМ* O_2/*мг* сырой биомассы и *мг* белка в пробах за 60 *мин* инкубации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При росте культуры на МПБ использование бактериями различных субстратов в процессе развития значительно менялось (см. рисунок). В фазе логарифмического роста наибольшая окислительная способность бактерий проявлялась в отношении α-глицерофосфата. В стационарной фазе окисление α-глицерофосфата возросло еще на 32,9% (здесь и далее приводятся достоверные изменения величин), несмотря на то что относительная активность α-глицерофосфатоксидазы практически не изменилась (табл. 1), а при переходе в фазу отмирания несколько снизилось. Высокое поглощение кислорода клетками *E. coli* наблюдалось также и при использовании в качестве субстратов пирувата и малата. Интересно, что в логарифмической и стационарной фазах оно практически одинаково, а в фазе отмирания снизилось на 71,7%.

Представляют интерес особенности использования популяцией сукцината. Скорость окисления этого субстрата при росте на МПБ примерно равна на лог- и стационарной фазах, но затем резко (на 182%) увеличивается в фазе отмирания.



Активность оксидаз дыхательной цепи *E. coli* при выращивании на питательной среде МПБ (*а*) и среде М-9 (*б*).

I—III — фазы: I — логарифмическая, II — стационарная, III — отмирания; *1* — α-глицерофосфат; *2* — пируват+малат; *3* — сукцинат; *4* — НАДН; *5* — кетоглутарат; *6* — лактат.

Использование *E. coli* α-кетоглутаровой кислоты в лог-фазе значительно меньше по сравнению с другими субстратами. При переходе в стационарную фазу роста окисление этого субстрата снизилось, но возросло в фазе отмирания до величин, характерных для периода логарифмического роста. Аналогичная картина наблюдалась, когда в качестве субстрата применялся НАДН, однако необходимо отметить, что дыхательная активность клеток в этом случае была несколько выше, чем при окислении α-кетоглутаровой кислоты.

Таблица 1

Поглощение кислорода клетками *E. coli* М-17 на разных фазах развития популяции на МПБ при окислении разных субстратов, *мкМ* O_2/*мг* белка в 1 *ч*

Фаза	Субстрат				
	Сукцинат	Пируват+малат	α-глицерофосфат	α-кетоглутаровая кислота	НАДН
Логарифмическая	2,15±0,78 (9)*	4,05±1,23 (9)	7,86±1,94 (7)	1,23±0,36 (9)	1,60±0,57 (11)
Стационарная	1,50±0,45 (7)	3,03±0,92 (8)	7,70±1,76 (11)	0,81±0,29 (9)	0,89±0,33 (10)
Уровень значимости по отношению к лог-фазе	>0,5	>0,5	>0,5	>0,5	<0,2
Отмирания	3,94±0,65 (6)	0,91±0,26 (6)	6,68±0,66 (6)	1,25±0,24 (6)	1,38±0,55 (6)
Уровень значимости по отношению к лог-фазе	<0,05	<0,01	>0,05	>0,05	<0,05
Уровень значимости по отношению к стационарной фазе	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05

* Цифры в скобках — количество опытов.

Таблица 2

Поглощение кислорода клетками *E. coli* М-17 на разных фазах развития популяции на среде М-9 при окислении различных субстратов, *мкМ* O_2/*мг* белка в 1 *ч* (количество опытов на всех фазах равно 6)

Фаза	Субстрат					
	Сукцинат	Пируват+малат	α-глицерофосфат	α-кетоглутаровая кислота	НАДН	Лактат
Логарифмическая	4,34±0,16	5,55±0,29	3,83±0,18	2,79±0,21	3,13±0,28	4,16±0,22
Стационарная	2,02±0,07	2,26±0,35	0,87±0,15	1,82±0,16	0,64±0,13	3,80±0,05
Уровень значимости по отношению к лог-фазе	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05
Отмирания	1,30±0,11	1,02±0,16	0,20±0,03	0,59±0,05	0,18±0,04	1,62±0,13
Уровень значимости по отношению к лог-фазе	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Уровень значимости по отношению к стационарной фазе	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Таким образом, активность отдельных участков дыхательной цепи *E. coli* меняется в зависимости от фазы развития популяции, причем характер окисления используемых субстратов на разных фазах значительно отличается.

Смена среды обитания вызывает отчетливые сдвиги в функционировании дыхательного аппарата бактерий. При выращивании *E. coli* на синтетической среде М-9 бактерии наиболее активно окисляют пируват и малат (см. рисунок, табл. 2). Интенсивность расщепления этих субстратов снижается по мере развития популяции — на 71% при переходе культуры в фазу стабилизации численности и на 56% — в фазу отмирания. Аналогичная картина наблюдалась и при окислении других субстратов. Отличие состояло лишь в относительных величинах снижения поглощения кислорода.

Анализ приведенных данных показывает, что активность функционирования отдельных участков дыхательной цепи *E. coli* при развитии популяции заметно изменяется. По-видимому, физиологические особенности отдельных фаз развития культуры определяют наиболее целесообразный путь извлечения энергии на каждом этапе. Так, при росте на среде МПБ в условиях оптимальной обеспеченности пластическими материалами основным источником образования макроэргических соединений может быть окисление α-глицерофосфата [16], которое приводит к быстрому освобождению энергии. Видимо, этим можно объяснить высокую активность глицерофосфатоксидазы в период интенсивного роста (см. рисунок). Ориентировочный расчет показал, что синтез около 50% макроэргических соединений в период экспоненциального развития может быть обеспечен окислением α-глицерофосфата. Функционирование основных ветвей цепи окисления, начинающихся с пиридиновых дегидрогеназ (окисление пирувата и малата, α-кетоглутарата и НАДН) и флавопротеидов (окисление сукцината), в этих условиях, вероятно, имело второстепенное значение, которое, однако, значительно возросло в стадии отмирания, когда культура находится в состоянии «переживания».

В условиях роста на минимальной среде клетки *E. coli* используют в основном главные пути расщепления веществ (табл. 2), причем активность окисления основных донаторов водорода (лактата, пирувата и малата, сукцината), несмотря на ее снижение по мере развития популяции, была максимальной, по сравнению с другими оксидазами, на всех этапах. Видимо, в этих условиях для популяции расточительно поддерживать в активном состоянии побочные пути окисления веществ; отражением этого является весьма низкая способность окисления α-глицерофосфата (приблизительно 15% от общей окислительной активности). Однако это не согласуется с уровнем окисления в подобных условиях экзогенного НАДН. Возможно, что вследствие значительных перестроек мембранного аппарата, на-

блюдаемых при смене фаз развития бактериальных культур [17, 18], снизилась мембранная проницаемость для НАДН, и окисление его клетками стало минимальным.

Таким образом, представленные данные позволяют считать, что динамика окисления субстратов дыхательным аппаратом *E. coli* является отражением существования в бактериальной популяции особых механизмов, «переключающих» окисление субстратов на наиболее целесообразный путь. Фазовость характера таких переключений допускает возможность его объяснения наличием в бактериальных популяциях кооперативных переходов мембран в ответ на появление во внешней среде каких-то регуляторных метаболитов [19].

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Стент. Молекулярная генетика. М., «Мир», 1974, с. 56.
2. Р. А. Пшеничнов, В. М. Колотов, В. П. Коробов, С. Я. Барихин, Н. А. Соколова, А. М. Ивакина, А. Г. Ткаченко. Экология, 1973, 3, 5.
3. Г. Шлегель. Общая микробиология. М., «Мир», 1972, с. 185.
4. Р. А. Пшеничнов, В. М. Колотов, С. Я. Барихин, А. Г. Ткаченко, Н. А. Соколова, А. М. Ивакина. Экология, 1975, 3, 42.
5. С. С. Шварц. Изв. АН СССР, серия биол., 1971, 4, 485.
6. С. С. Шварц, О. А. Пястолова. Материалы отчетной сессии лаборатории популяционной экологии позвоночных животных Ин-та экологии растений и животных УНЦ АН СССР, 1971, с. 4.
7. С. С. Шварц. Экология, 1972, 4, 87.
8. С. С. Шварц. Изв. АН СССР, серия биол., 1972, 6, 822.
9. Л. А. Сазонова, И. Ш. Вайсман. Докл. АН СССР, серия биол., 1973, 5, 1217.
10. Н. С. Гельман, М. А. Лукоянова, Д. Н. Островский. Мембраны бактерий и дыхательная цепь. М., «Наука», 1972, с. 179.
11. F. M. Harold. J. Bacteriol. Rev., 1972, 2, 193.
12. Сборник методик по генетике микроорганизмов. Под ред. Р. Клауса и У. Хейса. Перев. с англ. М., «Медицина», 1970, с. 203.
13. Н. П. Мешкова, С. Е. Северин. Практикум по биохимии животных. М., «Сов. наука», 1950.
14. В. В. Умбрейт, Р. Х. Буррис, Д. Ф. Штауффер. Манометрические методы изучения тканевого обмена. М., Изд. иностр. лит., 1950.
15. O. H. Lowry, N. I. Rosenbrough, A. L. Farr, R. I. Randall. J. Biol. Chem., 1951, **193**, 265.
16. А. Ленинджер. Митохондрия. М., «Мир», 1966.
17. М. А. Несмеянова. Проблемы регуляции обмена веществ у микроорганизмов. Пущино-на-Оке, 1973, с. 156 (Научн. центр биол. исследов. АН СССР).
18. D. R. Lang, D. C. Felix. J. Bacteriol., 1972, **110**, 968.
19. С. В. Конев, С. А. Аксенцев, Е. Н. Черницкий. Кооперативные переходы белков в клетке. Минск, «Наука и техника», 1970, с. 148.

Г. А. УГОДЧИКОВ

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДИНАМИКИ РОСТА БИОМАССЫ ФАГОВ

Существующие математические модели динамики роста биомассы фагов [1, 2] не описывают предэкспоненциальной фазы роста (рис. 1), а также не предсказывают изменения биохимического состава биомассы бактерий в течение одноразового (периодического) культивирования фагов совместно с бактериями. Создание новых математических моделей, адекватных микробиологическим процессам, способствует прогрессу в области теоретической микробиологии и промышленного биосинтеза.

В данной работе рассматривается математическая модель динамики роста биомассы фагов. В ее уравнениях фигурируют концентрации биомассы бактерий, рибосом, бактериального фермента РНК-полимеразы, лимитирующего субстрата и биомассы фагов, усредненные по объему ферментера, который рассматривается как культиватор полного перемешивания:

x_1 — концентрация биомассы бактерий, *мкг/мл*;
x_2 — концентрация биомассы фагов, *мкг/мл*;
y — концентрация рибосом, *мкг/мл*;
ф — концентрация бактериальной РНК-полимеразы, *мкг/мл*;
s — концентрация лимитирующего субстрата, *мкг/мл*;
$П_0$ — величина суммарного потока лимитирующего субстрата внутрь бактериальных клеток, *мкг/мл·час*;
$П_1$ — значение потока лимитирующего субстрата, идущего на синтез рибосом, *мкг/мл·час*;
$П_2$ — величина потока лимитирующего субстрата, который расходуется на синтез биомассы фагов, *мкг/мл·час*;
B (s) — величина удельной скорости транспорта лимитирующего субстрата (скорость транспорта лимитирующего субстрата через единицу поверхности бактериальной популяции);
B_M (s) — максимальное значение удельной скорости транспорта лимитирующего субстрата;
A_1 (s) — величина активности рибосом;
A_2 (s) — значение активности РНК-полимеразы;
$\varkappa$ — доля рибосом, на которых синтезируются бактериальные белки.

Математическая модель построена на следующих предположениях:

1. Синтез бактериальных и фаговых белков протекает на бактериальных рибосомах.

2. Скорость роста биомассы бактерий определяется либо концентрацией рибосом, на которых синтезируются бактериальные белки, либо величиной суммарного потока лимитирующего субстрата внутрь бактериальных клеток $П_0$.

3. Скорость изменения концентрации биомассы фагов определяется либо концентрацией рибосом, на которых синтезируются фаговые белки, либо величиной потока $П_2$ ($П_2 = К_2 \cdot П_0$).

4. Скорость биосинтеза рибосом определяется либо концентрацией РНК-полимеразы, либо значением потока лимитирующего субстрата $П_1$ ($П_1 = К_1 \cdot П_0$).

5. Концентрация рибосом, на которых синтезируются бактериальные белки, пропорциональна общей концентрации рибосом. Коэффициент пропорциональности

$$\varkappa = \frac{К_э}{К_э + x_2}.$$

6. Значение потока $П_0$ равно произведению удельной скорости транспорта B(s) на суммарную поверхность бактериальной популяции.

7. Удельная скорость транспорта B(s) имеет максимальное значение, когда скорость роста бактерий определяется величиной потока $П_0$.

8. Максимальная удельная скорость транспорта зависит от концентрации лимитирующего субстрата следующим образом:

$$B_M(s) = B_0 \cdot \frac{S}{S + K_{sx}}.$$

9. Отношение суммарной поверхности бактериальных клеток к их биомассе является постоянной величиной.

10. Скорость биосинтеза РНК-полимеразы определяется разностью между величиной потока $П_1$ и значением скорости синтеза рибосом.

11. Функциональная зависимость активности рибосом от концентрации лимитирующего субстрата имеет следующий вид:

$$A_1(s) = A_{01} \cdot \frac{S}{S + K_{sФ}}.$$

12. Величина активности РНК-полимеразы изменяется в зависимости от концентрации лимитирующего субстрата по следующему закону:

$$A_2(s) = A_{02} \cdot \frac{S}{S + K_{sФ}}.$$

13. Лимитирующий субстрат расходуется на синтез биомассы бактерий, фагов, рибосом, РНК-полимеразы и на поддержание жизнедеятельности бактерий.

14. Интенсивность использования лимитирующего субстрата на поддержание жизнедеятельности бактерий прямо пропорциональна концентрации биомассы бактерий. Коэффициент пропорциональности E является постоянной величиной ($E=E_0$) до тех пор, пока его значение не превышает максимальной удельной скорости транспорта лимитирующего субстрата $B_M(s)$. В противном случае $E=B_M(s)$.

15. Скорости лизиса биомассы бактерий, рибосом и РНК-полимеразы под действием фагов определяются частотой встреч перечисленных компонент с некоторым гипотетическим лизирующим агентом.

16. Концентрация лизирующего агента пропорциональна концентрации биомассы фагов.

17. Удельные скорости (логарифмические скорости) лизиса бактериальных компонент равны между собой.

18. Биомасса бактерий состоит в основном из белка и РНК.

19. Содержание ДНК, белка и липидов в единице биомассы бактерий постоянно.

20. Концентрации рибосом и РНК-полимеразы много меньше, чем концентрация суммарного белка.

Согласно изложенным предположениям, математическая модель динамики роста биомассы бактерий при одноразовом культивировании будет иметь следующий вид:

$$\left.\begin{aligned}
\frac{dx_1}{dt} &= \min\{\varkappa\cdot A_1(s)\cdot y,\ B(s)\cdot x_1\} - K_4\cdot x_2\cdot x_1,\\
\frac{dx_2}{dt} &= \min\{(1-\varkappa)\cdot A_1(s)\cdot y,\ K_2\cdot B(s)\cdot x_1\},\\
\frac{dy}{dt} &= \min\{A_2(s)\cdot \phi,\ K_1\cdot B(s)\cdot x_1\} - K_4\cdot x_2\cdot y,\\
\frac{d\Phi}{dt} &= K_5 F[K_1\cdot B(s)\cdot x_1 - A_2(s)\cdot \phi] - K_4\cdot x_2\cdot \phi,\\
-\frac{ds}{dt} &= E_{x1}\cdot U_{x1} + E_{x2}\cdot U_{x2} + E_y\cdot U_y + E_\Phi\cdot U_\Phi + E\cdot x_1,
\end{aligned}\right\} \qquad (1)$$

где $U_{x1}=\min\{\varkappa\cdot A_1(s)\cdot y,\ B(s)\cdot x_1\}$,
$U_{x2}=\min\{(1-\varkappa)\cdot A_1(s)\cdot y,\ K_2\cdot B(s)\cdot x_1\}$,
$U_y=\min\{A_2(s)\cdot \phi,\ K_1\cdot B(s)\cdot x_1\}$,
$U_\Phi=K_5\cdot F[K_1 B(s)\cdot x_1 - A_2(s)\cdot \phi]$,

$$F[K_1\cdot B(s)\cdot x_1 - A_2(s)\cdot \phi] =$$

$$= \begin{cases} K_1\cdot B(s)\cdot x_1 - A_2(s)\,\phi, & \text{если } K_1\cdot B(s)\cdot x_1 > A_2(s)\,\phi,\\ 0, & \text{если } K_1\cdot B(s)\cdot x_1 \leqslant A_2(s)\,\phi, \end{cases}$$

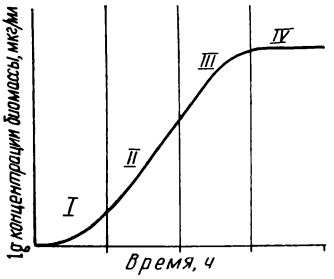
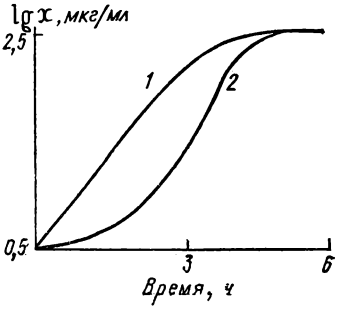


Рис. 1. Динамика изменения концентрации биомассы микроорганизмов при одноразовом культивировании.

I—IV — фазы: *I* — предэкспоненциальная; *II* — экспоненциальная; *III* — замедления роста биомассы; *IV* — стационарная.

Рис. 2. Динамика изменения концентрации биомассы бактерий при различных начальных значениях содержания рибосом в единице биомассы.

Кривые роста биомассы: *1* — общего вида: $\left(\frac{y}{x_1}\cdot\varkappa\right)_{01}$ — содержание рибосом при $t=0$; *2* — бактерий без предэкспоненциальной фазы: $\left(\frac{y}{x_1}\cdot\varkappa\right)_{02}$ — содержание рибосом при $t=0$; $\left(\frac{y}{x_1}\cdot\varkappa\right)_{02} > \left(\frac{y}{x_1}\cdot\varkappa\right)_{01}$.



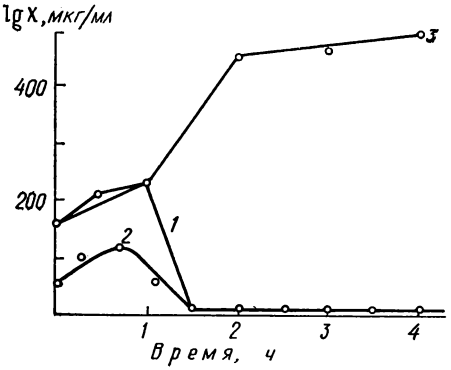


Рис. 3. Экспериментальные зависимости изменения концентраций биомассы бактерий, тотальной РНК и биомассы фагов от времени.

Концентрация, *мкг/мл*: *1* — биомассы бактерий (x_1); *2* — тотальной РНК ($10\cdot y$); *3* — биомассы фагов ($10^5\cdot x_2$).

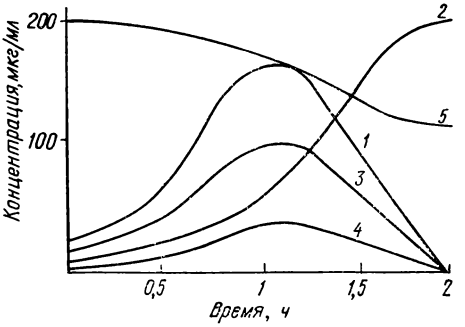


Рис. 4. Теоретические зависимости изменения концентраций биомассы бактерий, рибосом, РНК-полимеразы, лимитирующего субстрата и биомассы фагов от времени.

Концентрация, *мкг/мл*: *1* — биомассы бактерий (x_1); *2* — биомассы фагов ($10^5\cdot x_2$); *3* — рибосом ($10\cdot y$); *4* — РНК-полимеразы ($10^2\cdot ф$); *5* — лимитирующего субстрата (s).

$$E=\min\left\{B_0\cdot\frac{S}{S+K_{sx}}\cdot x_1E_0\right\},$$

K_1, K_2, K_3, K_4, K_5, K_{sx}, K_{sy}, $K_{s\Phi}$, E_{x1}, E_{x2}, E_y, E_Φ, E_0, A_{01}, A_{02}, B_0 — параметры математической модели.

Нетрудно показать, что для удельной скорости транспорта лимитирующего субстрата справедливо следующее соотношение:

$$B(s)=\frac{1}{E_{x1}+K_1\cdot E_y+K_2E_{x2}}\cdot\left(B_0\cdot\frac{s}{s+K_{sx}}-E_0\right).$$

Поскольку аналитическое исследование математической модели (1) затруднительно, то для проверки адекватности модели была составлена программа численного решения уравнений (1) на языке АЛГОЛ-60 (входном языке транслятора ТА-1М), реализованная на ЭЦВМ М-222. Интегрирование системы дифференциальных уравнений (1) проведено методом Рунге — Кутта в модификации Мерсона.

Из математического описания вытекает следующее следствие.

Наличие предэкспоненциальной фазы роста биомассы бактерий (см. рис. 1) определяется содержанием рибосом, на которых синтезируются бактериальные белки, в единице биомассы бактерий в начальный момент времени $\left(\varkappa\cdot\frac{y}{x_1}\right)_0$ (рис. 2). На рис. 3 и 4 приведены экспериментальные кривые, построенные на основе данных, полученных в нашей лаборатории Г. В. Коноваловой, и теоретические кривые, полученные путем интегрирования математической модели (1) на ЭЦВМ М-222. Сравнение этих кривых показало качественное совпадение теоретических значений переменных x_1, x_2, y с экспериментальными данными.

Дальнейшее детальное экспериментальное исследование динамики роста биомассы фагов позволит провести количественную проверку адекватности математической модели (1) в случае одноразового культивирования, а также исследовать стационарные режимы при проточном культивировании.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Э. Стеркин, В. А. Самойленко. Микробиология, 1973, **41**, 3.
2. О. Е. Назарьев, С. А. Семичева, Н. С. Козьминская. Физиология и биохимия микроорганизмов, вып. 2, серия биол. Горький, 1974 (Горьк. гос. ун-т).

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ 1977

А. М. БОСЕНКО, В. С. ЛОБУНОВ,
В. М. АНОШИН, Л. В. ПЕТРОЧЕНКО

МЕТАБОЛИТЫ В СРЕДЕ ОБИТАНИЯ НЕПРЕРЫВНОЙ КУЛЬТУРЫ АСПОРОГЕННЫХ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA SCOTTII*

Среди метаболитов, выделяемых микроорганизмами в среду обитания, содержатся комплексы компонентов, которые в значительной степени определяют развитие популяции. В частности, при изучении развития периодической бактериальной культуры на минимальной синтетической глюкозной питательной среде было показано, что в зависимости от стадии развития культуры в условиях коррекции питательной среды в культуральных средах имеются специфические стимуляторы и ингибиторы развития популяции [1].

При непрерывном культивировании дрожжей *Candida tropicalis* на глюкозной среде с добавлением культуральной жидкости дрожжей *C. guilliermondi* обнаружено снижение скорости роста *C. tropicalis* в два раза [2]. Здесь же отмечается, что продукты метаболизма углеводоокисляющих дрожжей *C. tropicalis* оказывали стимулирующее действие на развитие как штамма данного же вида, так и *C. guilliermondi.* Эти штаммы при непрерывном культивировании выделяют в среду обитания неодинаковые продукты кислого характера: одни (проходящие через полупроницаемую мембрану) стимулируют, а другие (не проходящие через полупроницаемую мембрану) ингибируют рост отдельных штаммов дрожжей рода *Candida.*

Стимулирующее действие продуктов метаболизма фильтратов дрожжей *Candida scottii* на другие виды дрожжеподобных грибов отмечается в работе [3], согласно которой основным стимулирующим соединением является биотин, выделяемый этой культурой при дефиците его у исследуемых культур.

Известно, что при жизнедеятельности микроорганизмов, и в частности дрожжей, в среду обитания поступают яблочная, фумаровая, глутаровая, пировиноградная кислоты [4—17], аминокислоты [18—26], ферменты [27] и другие соединения. Знание состава продуктов метаболизма необходимо при оценке развития микробной популяции дрожжей, а также для решения проблемы многократного возврата и использования сточ-

ных вод на предприятиях микробиологической промышленности.

Мы не встретили в литературе данных по составу культуральных сред дрожжей *Candida scottii*. Поэтому для правильных выводов о влиянии различных метаболитов на развитие этой культуры необходимо было проследить за химическим составом среды культивирования и ее изменением в процессе роста дрожжей. В частности, важно было выявить характер изменения состава метаболитов среды обитания дрожжей *C. scottii* в зависимости от углеводного состава питательных сред. Изучению этого вопроса и посвящена настоящая работа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ[1]

Опыты проводили с чистой культурой дрожжеподобных грибов *Candida scottii* расы Тулунская-6 (ТУЛ-6), описанной в работе [28], которая была получена из музея микроорганизмов ВНИИ гидролиза. Характерная особенность данной расы дрожжей состоит в том, что они не сбраживают углеводы и имеют высокую удельную скорость роста.

Дрожжи выращивали в лабораторном ферментере непрерывного действия конструкции ВНИИ гидролиза общим объемом 3 *л* и полезным 1 *л*. Посевные дрожжи составляли 4—6% к содержанию растворимых веществ (РВ) в среде. Получение активных засевных дрожжей и предварительное накопление биомассы для засева проводили по методике Монаховой и Семушиной [29] при следующих условиях: температура 38,5°, pH среды 4,6, расход распыленного воздуха 3 *л/мин*. В качестве питательной использовали среду Ридера, *г/л*: $(NH_4)_2SO_4$ 0,75; $MgSO_4$ 0,175; NaCl 0,125; $Ca(NO_3)_2$ 0,1; KH_2PO_4 0,25; K_2HPO_4 0,025. Источниками углеродного питания служили глюкоза, ксилоза, смесь глюкозы с ксилозой (1 : 1) с концентрацией 27 *г/л* и древесный гидролизат. Сахара́ и питательные соли стерилизовали раздельно, чтобы исключить образование в синтетических питательных средах продуктов деструкции сахаров. Кислый древесный гидролизат дополнительно подготавливали к выращиванию на нем дрожжей следующим образом: нейтрализовали его известковым молоком до pH 3,8, а затем аммиаком до pH 4,2; нейтрализат продували воздухом в течение двух часов при температуре 48—52° С; выпавшие коллоиды отфильтровывали. Гидролизат разбавляли водой до концентрации РВ в среде 25 *г/л* и для обеспечения минерального питания в разбавленное сусло добавляли соли, по составу и содержанию аналогичные среде Ридера.

В процессе культивирования дрожжей учитывали их концентрацию (на сухой вес) в ферментере по отношению к РВ.

[1] В работе принимала участие Л. А. Полякова.

Культуральную жидкость для исследований брали после стабилизации всех параметров непрерывной культуры (pH, РВ и др.). Выделение и анализ продуктов жизнедеятельности дрожжей осуществляли из одной пробы фильтрата с повторением опыта в аналогичных условиях.

В культуральной среде проводили качественное и количественное определение нелетучих органических кислот, свободных аминокислот и некоторых летучих соединений. Выделение и идентификацию свободных аминокислот на автоматическом анализаторе марки НД-1200Е проводили по описанию В. С. Лобунова [30] с некоторыми изменениями применительно к объекту.

Пробы сред после отделения аминокислот нейтрализовали 0,1н раствором $Ba(OH)_2$ по фенолфталеину, для удаления ионов серы и фосфора нейтрализат нагревали до кипения, отстаивали в течение 2 *ч* и осадок бариевых солей серной, фосфорной и щавелевой (которая, возможно, присутствует в культуральной жидкости) кислот отфильтровывали. Осадок на фильтре промывали дважды (по 15 *мл*) дистиллированной водой. Объединенный фильтрат с промывными водами пропускали через колонку с катионитом КУ-2 в Н-форме для удаления из раствора катионов бария. Полноту сорбирования бария контролировали реакцией на серную кислоту. Для осветления проб (культуральная жидкость при выращивании дрожжей на гидролизате и последрожжевой бражке Бобруйского завода) прошедшую через катионит КУ-2 пробу пропускали через катионит КУ-1 также в Н-форме и разделяли на две части.

В первой части (150 *мл*) путем титрования 50 *мл* среды в присутствии фенолфталеина 0,02 н NaOH определяли общую кислотность. Нелетучие органические кислоты во второй части отделяли от сахаров и других нейтральных соединений на колонке со смолой ЭДЭ-10П в ацетатной форме, которую готовили согласно работе [31]. Кислоты десорбировали 200 *мл* 6н HCOOH с последующей промывкой дистиллированной водой до исчезновения реакции на кислоту. Элюат и промывные воды объединяли и упаривали на роторном испарителе при 38—40° С досуха. Осадок промывали 10 *мл* этанолбензольной смеси (4 : 1) и вновь упаривали.

Качественный состав и количественное содержание нелетучих органических кислот устанавливали методом газожидкостной хроматографии, суть которой сводится к следующему. Кислоты взвешивали и растворяли в 40 *мл* смеси диэтилового эфира и метанола в отношении 9 : 1 [32]. Пробу объемом 20 *мл* метилировали в проточной установке газообразным диазометаном до появления устойчивого соломенного окрашивания [33]. Раствор метиловых эфиров упаривали при 40° С досуха в токе азота. После добавления к сухому остатку 1 *мл* диэтилового эфира с внутренним стандартом проба была го-

това к анализу. Пробу объемом 1—1,5 *мкл* вводили в испаритель хроматографа. Хроматографическое разделение кислот проводили на колонке из нержавеющей стали (100×0,3 *см*) с 7%-ным полиэтиленгликольсукцинатом на хромосорбе W (80—120 *меш*), силанизированном триметилхлорсиланом, при программированном повышении температуры колонки от 90 до 200° С со скоростью 8 *град/мин*. Расход газоносителя (N_2) 40 *мл/мин*, водорода 30 *мл/мин* и воздуха 300 *мл/мин*, температура испарителя 220°. Анализ проводили на хроматографе Цвет-102 с пламенно-ионизационным детектором.

Для количественного определения кислот использовали метод внутренней стандартизации. В качестве внутреннего стандарта применяли диметиловый эфир фталевой кислоты. Относительная ошибка определения кислот не превышала 5%. В выбранных условиях метилирования органических кислот перед хроматографическим анализом фумаровая кислота метилировалась недостаточно для количественного определения, поэтому ее содержание в фильтратах находили хроматографированием фракции органических кислот на бумаге FN-15 в нисходящем токе системы растворителей: *н*-бутанол-муравьиная кислота — вода в объемных отношениях 100 : 8 : 50. Проявитель — бромфеноловый синий [31].

Легколетучие компоненты в пробах определяли методом ГЖХ [34], общее РВ — эбулиостатическим методом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из показателей, характеризующих влияние источников углеродного питания на рост дрожжей в процессе их непрерывного культивирования, является выход биомассы и продуктивность культуры. Из табл. 1 видно, что наименьший выход биомассы (45,9%) наблюдается на среде с глюкозой, а наибольший — с ксилозой (56,3%). При выращивании дрож-

Таблица 1

Результаты выращивания дрожжей *Candida scottii* (ТУЛ-6) на различных углеводных средах

Питательная среда	Концентрация углеводов, %, в		Концентрация дрожжей в аппарате, *г/л* на сухой вес	Выход дрожжей, % к общему РВ	Коэффициент разбавления среды, $ч^{-1}$	Продуктивность, $г/л \cdot ч^{-1}$
	питательной среде	культуральной жидкости				
Глюкозная . . .	2,70	0,08	12,4	45,9	0,24	2,98
Ксилозная . . .	2,70	0,12	15,2	56,3	0,24	3,65
Глюкоза+ксилоза	2,70	0,08	13,7	50,7	0,24	3,29
Древесный гидролизат	2,50	0,11	12,8	51,2	0,24	3,07

Таблица 2

Содержание нелетучих органических кислот в среде обитания при культивировании дрожжей *C. scottii* на различных углеводных средах, *г/л*

Кислота	Глюкоза	Ксилоза	Глюкоза+ +ксилоза	Древесный гидролизат	Древесный гидролизат+ +послеспиртовая барда
Молочная	1,778	0,732	0,226	0,683	0,466
Янтарная	0,396	0,137	0,096	0,061	0,202
Щавелевоуксусная	0,335	0,135	0,059	0,057	0,123
Яблочная	0,136	0,063	0,043	0,033	—
α-кетоглутаровая	—	—	0,032	—	0,046
Лимонная	0,311	0,249	0,140	0,325	0,110
Фумаровая	0,178	0,264	0,288	0,332	0,271
Сумма	3,134	1,580	0,884	1,491	1,218

Таблица 3

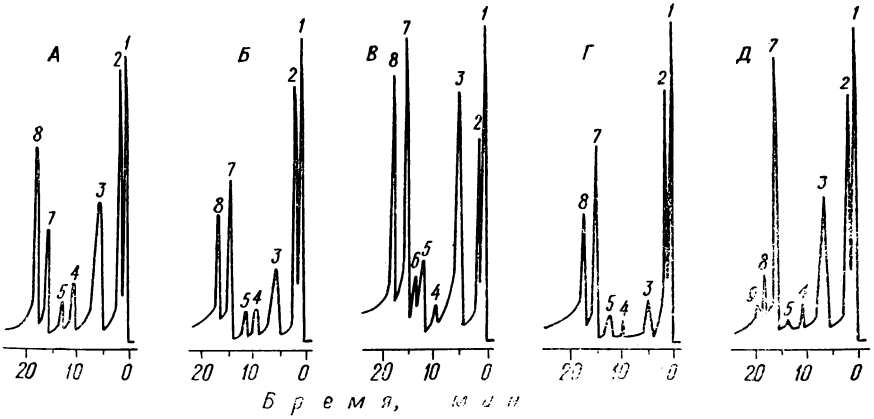
Содержание аминокислот в среде обитания при культивировании дрожжей *C. scottii* на различных углеводных средах, *мг/л*

Аминокислота	Глюкоза	Ксилоза	Глюкоза+ +ксилоза	Древесный гидролизат	Древесный гидролизат+ +послеспиртовая барда
Лизин	0,15	0,14	0,28	1,39	1,25
Гистидин	0,96	0,65	1,20	1,18	0,90
Аргинин	Следы	Следы	Следы	1,85	1,81
Аспарагиновая кислота	15,54	3,89	3,05	1,50	1,29
Треонин	7,28	0,95	1,92	0,87	0,79
Серин	3,91	0,73	0,98	1,25	1,02
Глутаминовая кислота	45,79	5,87	24,08	11,90	8,32
Пролин	Следы	0,87	0,70	3,27	3,04
Глицин	1,34	0,58	1,18	1,14	0,99
Аланин	2,79	0,94	1,03	0,80	0,85
Цистеин	0,23	0,17	0,21	Следы	Следы
Валин	5,61	1,32	2,63	1,84	1,81
Метионин	0,56	0,21	0,35	0,09	0,19
Изолейцин	1,15	0,14	0,71	1,08	0,96
Лейцин	1,07	0,60	0,19	1,92	1,13
Тирозин	0,66	0,14	2,93	1,04	0,76
Фенилаланин	0,84	0,36	2,90	1,16	0,72
γ-аминомасляная	0,31	0,30	0,51	0,14	Следы
Сумма	88,19	17,86	44,86	32,42	25,83

жей на смешанной среде (глюкоза+ксилоза) и древесном гидролизате выход биомассы уменьшается: 50,7 и 51,2% соответственно. Практически одинаковый выход дрожжей в этих вариантах связан, очевидно, с близким соотношением глюкозы и ксилозы в используемых средах. Так, в древесном гидролизате содержание глюкозы составляло 60—65% и ксилозы 25—30% от суммы всех моносахаридов. Аналогично изменялась и продуктивность дрожжей с минимальным значением в первом варианте (глюкозная среда).

В противоположность явной зависимости выхода биомассы дрожжей и продуктивности культуры от использованного субстрата, степень утилизации углеводов во всех случаях близка и колеблется в пределах 95—97%. Меньший выход биомассы дрожжей при культивировании на глюкозной среде не случаен. Эту закономерность мы наблюдали неоднократно, и она объясняется, очевидно, определенными свойствами данной культуры в выбранных условиях культивирования. Кроме того, эти выводы хорошо согласуются с нашими результатами, полученными при изучении продуктов, выделяемых дрожжами в среду обитания.

В первую очередь представляют интерес данные, характеризующие среду обитания по наличию в ней нелетучих органических кислот (см. табл. 2 и рисунок). Видно, что при культивировании на глюкозной среде дрожжи выделяют в 1,5—2 раза больше кислот, чем на ксилозной. Их концентрация резко уменьшается при выращивании дрожжей на смешанной



Хроматографическое определение органических кислот в среде обитания дрожжей *Candida scottii* при культивировании их на разных питательных средах: *А* — глюкоза; *Б* — ксилоза; *В* — глюкоза+ксилоза; *Г* — древесный гидролизат; *Д* — смесь гидролизата с послеспиртовой бардой.

Кислоты: *1* — растворитель; *2* — молочная; *3* — янтарная; *4* — щавелевоуксусная; *5* — яблочная; *6* — α-кетоглутаровая; *7* — внутренний стандарт (диметиловый эфир фталевой кислоты); *8* — лимонная; *9* — *x* (не идентифицировано).

среде. Концентрация фумаровой кислоты изменяется в обратном порядке.

Приведенные в табл. 2 кислоты были обнаружены и в фильтратах, полученных в процессе культивирования дрожжей на сложных углеводных средах — древесных гидролизатах и смеси гидролизата с послеспиртовой бардой. Некоторые кислоты в сравнительно небольших количествах найдены и в исходных гидролизатах [35]. Источником кислот является также послеспиртовая бражка, но, как видно из таблицы, значительная их часть образуется и выделяется в среду в результате дыхания дрожжей и активного функционирования цикла ди- и трикарбоновых кислот.

Наряду с кислотами этого цикла, в фильтратах в больших количествах содержится молочная кислота. Концентрация ее зависит от источника питания и составляет 1,778 и 0,226 *г/л* соответственно на глюкозе и на смеси сахаров. Большие концентрации молочной кислоты были обнаружены в культуральной жидкости и другими авторами [36] при исследовании на глюкозной среде других культур дрожжей. Образование молочной кислоты связано, очевидно, с определенными свойствами микроорганизма и условиями развития популяции, и в первую очередь с источником углеродного питания. Об этом свидетельствует сравнительно низкое содержание молочной кислоты в фильтратах, полученных при использовании в качестве субстратов смеси (1 : 1) глюкозы и ксилозы.

Поскольку усвоение микроорганизмами сахаров тесно связано с биосинтезом органических кислот и аминокислот, в задачу наших дальнейших исследований входило установление зависимости содержания аминокислот в культуральной жидкости от источников углеродного питания.

В культуральной жидкости обнаружено (табл. 3) значительное количество свободных аминокислот, но их содержание почти не зависит от питательной среды. Исключение составило содержание кислот в среде, полученной при питании культуры глюкозой: в этом случае их было в 2,5—5 раз больше, чем в других вариантах. Там, где содержится наибольшее количество аминокислот, отмечается наименьший выход биомассы. Идентификация суммы выделенных аминокислот свидетельствует о том, что источник питания влияет на количество отдельных кислот. Так, на глюкозной среде, по сравнению с ксилозной, значительно больше аспарагиновой и глутаминовой кислот, валина, изолейцина, тирозина, аланина, серина. При выращивании на гидролизате в культуральную среду выделяется больше лизина, аргинина, пролина и лейцина с одновременным снижением концентрации аспарагиновой кислоты, цистеина, метионина. Если принять во внимание только первые три варианта (глюкоза, ксилоза и их смесь), то можно заметить, что именно глюкоза способствует накоплению треонина, глутами-

Таблица 4

Содержание легколетучих соединений в среде обитания дрожжей, *мг/л*

Соединение	Глюкоза	Ксилоза
Ацетальдегид	5,5	5,2
Пропионовый альдегид .	4,9	4,7
Ацетон	6,5	1,9
Этилацетат	2,0	0,8
Этанол	16,0	2,5
Сумма	32,9	15,1

новой кислоты, валина и изолейцина. Резкое снижение во фракции свободных аминокислот глутаминовой кислоты в варианте с ксилозой можно, по всей вероятности, объяснить тем, что данная кислота в этих условиях более активно использовалась клетками дрожжей для синтеза белков.

Наряду с нелетучими органическими кислотами и аминокислотами в среде обитания дрожжей *C. scottii* были определены в небольших количествах этанол, ацетальдегид, ацетон и другие соединения (табл. 4). Содержание этих компонентов в фильтратах также зависит от используемого субстрата. В частности, в варианте с глюкозой этанола содержится в 7 раз, ацетона в 3 и этилацетата в 2,5 раза больше по сравнению с ксилозной средой, в которой накопление биомассы было минимальным. Следует отметить, что фактическое выделение летучих соединений микроорганизмами в окружающую среду значительно выше, чем приведено в таблице, так как часть их уносится воздухом из ферментера. Не исключено, что некоторые из них сами по себе или в различных сочетаниях могут выступать как относительно специфические ингибиторы роста.

Рассмотренные примеры культивирования дрожжей *C. scottii* (ТУЛ-6) на простых и сложных углеводных средах свидетельствуют о тесной взаимосвязи микроорганизмов с внешней средой и о зависимости их развития от этой среды.

Дальнейшее изучение комплекса продуктов метаболизма дрожжей и механизмов, регулирующих развитие микробной популяции, по-видимому, позволит значительно интенсифицировать процессы непрерывного культивирования микроорганизмов и сыграет решающую роль в решении проблемы возврата сточных вод в производство.

ЛИТЕРАТУРА

1. Р. А. Пшеничнов, В. М. Колотов, В. П. Коробов, С. Я. Барихин, Н. А. Соколова, А. М. Ивакина, А. Г. Ткаченко. Экология, 1973, 3, 5.

2. В. П. Третьякова, Н. Б. Градова, Е. Л. Рубан. Прикладная биохимия и микробиология, 1970, **6**, 3, 297.

3. Т. И. Семушина, В. В. Лукьянова, Г. Б. Болондзь. Гидролизная и лесохимическая промышленность, 1971, 38, 1.

4. Н. А. Кошелева, И. В. Конова, Л. А. Байкова. Микробиология, 1969, **38**, 5, 761.

5. И. Т. Ермакова. Прикладная биохимия и микробиология, 1970, **6**, 4, 388.

6. И. Т. Ермакова, С. М. Розенфельд, Н. С. Новаковская, Л. В. Неклюдова, Е. Н. Дислер. Прикладная биохимия и микробиология, 1969, 5, 3, 252.
7. Н. А. Кошелева, И. Г. Колесникова, Л. А. Байкова. Микробиология, 1965, **34**, 6, 960.
8. Н. А. Кошелева, И. Т. Нетте, Л. А. Байкова. Прикладная биохимия и микробиология, 1965, **1**, 8, 617.
9. K. Ogata, M. Osugi, T. Tochikura. Arg. and biolog. chem., 1966, 30, 1024.
10. Т. В. Финогенова, А. Б. Лозинов, Б. М. Беликов, И. Т. Ермакова, Л. Н. Мунтян, Э. Н. Сафонова. Микробиология, 1968, 37, 1, 38.
11. И. Г. Колесникова. Микробиология, 1967, **36**, 3, 427.
12. Т. В. Финогенова, Л. Н. Мунтян, А. Б. Лозинов. Микробиологический синтез, 1969, **7**, 26.
13. Р. И. Шпонько, Г. В. Карноз, И. Т. Нетте. Прикладная биохимия и микробиология, 1969, **5**, 5, 537.
14. C. Cantoni, M. A. Bianchi, P. Renon. Viterin. itol., 1968, **19**, 6, 388.
15. Е. А. Андреева, Е. М. Шульговская, Н. Д. Иерусалимский. Прикладная биохимия и микробиология, 1967, **3**, 5, 607.
16. Е. Я. Щербакова. Прикл. биохимия и микробиол., 1970, **6**, 1, 69.
17. J. Calles, M. Talieu-Rousseau, Ch. Montant. C.r. Acad. Sci., 1967, **265**, 17, 1183.
18. Ю. В. Каптерева, И. В. Асеева. Микробиология, 1967, **36**, 6, 970.
19. Т. Л. Бабаян, М. О. Рожанский, К. Л. Степчков. Прикладная биохимия и микробиология, 1969, **5**, 3, 256.
20. М. А. Тер-Карапетян, С. М. Инджикян, С. В. Чубарян. Биол. журнал Армении, 1968, **21**, 1, 3.
21. A. G. Moat, F. Ahmad, J. K. Alexander, I. J. Barnes. J. Bacteriol., 1969, **98**, 2, 573.
22. Ю. Н. Карасевич, Л. П. Волкова, С. А. Бутенко. Докл. АН СССР, 1965, **163**, 5, 1259.
23. А. С. Вечер, Г. Я. Корабава, А. М. Куликова. Изв. АН БССР, серия биол. наук, 1967, 3, 87.
24. R. Herrmann, C. White. Biochem. et Biophys. Acta, 1966, **124**, 2, 233.
25. A. Johnson, J. Stokes. J. Microbiol. and Serol., 1965, **31**, 2, 165.
26. А. А. Имшенецкий, Т. Ф. Кондратьева. Микробиология, 1969, **38**, 6, 989.
27. Т. А. Егорова. Уч. зап. Моск. гос. пед. ин-та им. В. И. Ленина, 1969, 64.
28. Н. И. Монахова, Т. И. Семушина. Авт. свид. № 338541. Бюлл. изобретений, 1972, № 16.
29. Т. И. Семушина, Н. И. Монахова. Гидролизная и лесохимическая промышленность, **1973, 4, 18.**
30. В. С. Лобунов. Изменение белков и аминокислот многолетних трав в зависимости от возраста и условий произрастания. Автореф. канд. дисс. Минск, 1973.
31. С. В. Солдатенков, Т. А. Мазурова. Методика количественной бумажной хроматографии сахаров, оргкислот и аминокислот у растений. М.— Л., «Наука», 1962, с. 27.
32. H. Schlemk, J. L. Gellerman. Analyt. Chem., 1960, 32, 1412.
33. W. Stoffel, C. Abrens. Analyt. Chem., 1959, 31, 307.
34. А. М. Босенко, Ю. И. Хольким, А. П. Силин, М. Д. Шуя, В. А. Лушин, М. А. Зинина, М. А. Шеенок. Гидролизная и лесохимическая промышленность, 1972, 5, 20.
35. И. И. Корольков, Р. И. Шаханова, Н. Д. Колодяжная. Сборник трудов ВНИИ гидролиза. М., 1972, с. 175.
36. А. М. Скородумова. Дрожжи молока и молочных продуктов и их производственное значение. М., «Пищевая промышленность», 1969, с. 117.

А. И. ЛЕБЕДИНСКИЙ, Л. Е. ГЛАЗАЧЕВА,
А. Г. ТКАЧЕНКО

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ФАКТОРА, СТИМУЛИРУЮЩЕГО РОСТ МИКРОБНОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Популяция в известных пределах является автономной саморегулируемой системой. Основной характеристикой состояния популяции служит ее численность, регуляция которой, очевидно, осуществляется специфическими факторами, выделяемыми бактериями и содержащимися в фильтратах микробных культур [1, 2]. Комплекс факторов, содержащийся в фильтрате растущей культуры, оказывает стимулирующее действие на развитие популяции, уменьшая длительность лаг-фазы, ускоряя рост и деление клеток, тем самым увеличивая численность популяции [3]. Стимулирующий эффект фильтрата растущей культуры, сказываясь на динамике численности, может найти свое отражение в морфологической картине микробной популяции, являющейся функцией времени роста культуры [4].

Целью наших исследований было изучение влияния стимулирующего фактора на морфологию популяции.

Для получения фильтрата, стимулирующего рост микробной популяции, бактерии *E. coli* (штамм М-17) засевали с косяка на мясо-пептонный бульон и выращивали 8—10 *ч* при 37° С. Бактериальную массу осаждали центрифугированием на центрифуге ЦЛС-3 в течение 20 *мин* при 4000 *об/мин* и дважды промывали физиологическим раствором. Отмытые бактерии высевали в дозе 25 *млн/мл* на минимальную солевую среду М-9 [5]. Культуру выращивали 3 *ч* при 37° С, после чего фильтровали через бактериальные свечи К-5. Фильтрат проверяли на стерильность путем посева на мясо-пептонный агар. Культуру для засева на фильтрат и контрольную среду М-9 готовили вышеуказанным способом. Через определенные промежутки времени из развивающихся культур брали пробы, в которых прямым счетом в камере Горяева учитывали количество микробных тел.

Число особей, вносимых в среду при засеве, учитывали таким же способом. Одновременно готовили мазки для окраски по методу Пешкова [4], в которых измеряли размеры бактерий

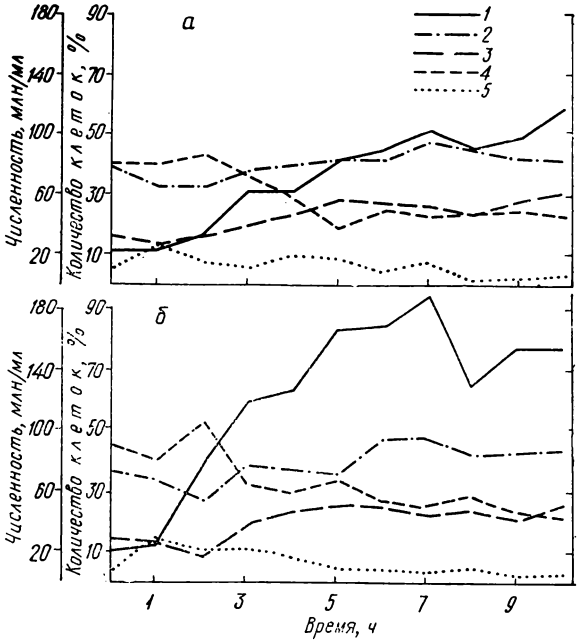


Рис. 1. Динамика численности отдельных форм клеток в контроле (*а*) и опыте (*б*):

1 — численность; *2—5* — клетки: *2* — палочковидные 0,9 *мкм*; *3* — шаровидные; *4* — палочковидные 2—2,5 *мкм*; *5*— делящиеся.

и подсчитывали количество различных форм клеток. Для изучения субмикроскопического строения бактериальные клетки фиксировали по методу Ритер-Келенбергера [6], затем их обезвоживали и заключали в аралдит по общепринятой методике [7]. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом. Микроскопирование проводили на электронном микроскопе Jem-6.

Обработка экспериментального материала показала, что кривая роста численности контрольной и опытной культур *E. coli* соответствует общепринятым представлениям о развитии микробной популяции в жидкой питательной среде. Максимальная численность контрольной культуры 120 *млн/мл*, опытной 190 *млн/мл*, время лаг-фазы соответственно равно 2 и 1 *ч*. Логарифмическая фаза в обеих культурах к пятому часу роста переходит в стационарную фазу. В соответствии с фазами развития изменяются и размеры бактерий: наибольшие — в лаг-фазе (в контроле 1,1 *мкм*, в опыте 1,3 *мкм*), наименьшие — в конце логарифмической — начале стационарной фаз (для обеих культур 0,9 *мкм*).

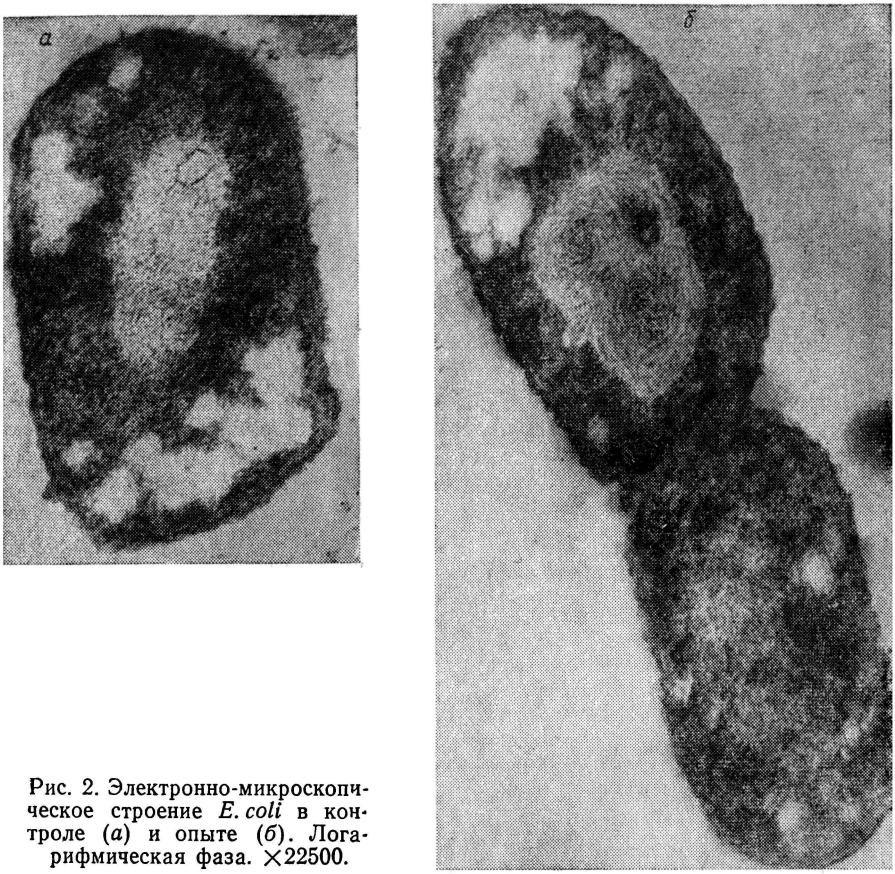


Рис. 2. Электронно-микроскопическое строение *E. coli* в контроле (*а*) и опыте (*б*). Логарифмическая фаза. ×22500.

Морфологическая картина контрольной и опытной культур представлена бактериями палочковидной формы, удлиненными (2—2,5 *мкм*) и средних размеров, шаровидной формы и делящимися клетками, расположенными парами. Перечисленные типы клеток присутствуют на всех фазах роста культуры (рис. 1). По мере развития популяции соотношение форм изменяется, но при этом в обеих культурах различные типы клеток имеют близкие количественные значения. В лаг-фазе основную массу составляют физиологически юные крупные клетки с 2—3 нуклеоидами. В логарифмической фазе происходит характерное для грамотрицательных бактерий деление путем перетяжки. Имеется большое количество клеток, находящихся на разных стадиях деления. В конце логарифмической и в стационарной фазе преобладающими становятся бактерии средних размеров.

Для субмикроскопического строения бактерий (рис. 2) обеих культур *E. coli* характерен извилистый профиль клеточной стенки, наружный слой ее представлен трехслойной мембраной. Цитоплазматическая мембрана плотно прилегает к цитоплазме, которая заполнена гранулярным компонентом. В цитоплазме находятся включения типа вакуолей. Нуклеоид отчетливо отграничен от цитоплазмы и заполнен фибриллами ДНК.

Как видно из приведенных данных, действие фильтрата выражается в изменении физиологического состояния популяции. Происходит укорочение лаг-фазы с параллельным увеличением размеров клеток. Ускоряются темпы деления клеток. Механизм репродукции бактерий в опытной культуре не изменяется. На субмикроскопическом строении клеток опытной культуры действие стимулирующего фактора не отражается.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. С. Шварц. Изв. АН СССР, серия биол., 1971, 4, 485.
2. Л. А. Сазонова, И. Ш. Вайсман. Докл. АН СССР, 1973, **208**, 5, 1221.
3. Р. А. Пшеничнов, В. М. Колотов, А. М. Ивакина, С. Я. Барихин, Н. А. Соколова, А. Г. Ткаченко. Экология, 1973, 3, 5.
4. М. А. Пешков. Цитология бактерий. М., Изд-во АН СССР, 1955.
5. Сборник методик по генетике микроорганизмов. Под ред. Р. Клауса и У. Хейса. Перев. с англ. М., «Медицина», 1970.
6. Д. Пиз. Гистологическая техника в электронной микроскопии. М., Изд-во иностр. лит., 1963.
7. Г. Гайер. Электронная гистохимия. М., «Мир», 1974.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ 1977

О. Д. ВЕРХОЛАНЦЕВА

О ПРИНЦИПИАЛЬНОЙ ВОЗМОЖНОСТИ РЕУТИЛИЗАЦИИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД С ПОЗИЦИЙ АУТОМЕТАБОЛИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ

В условиях прогрессивных замкнутых циклов микробиологического производства вопросы оптимизации развития бактериальных популяций и полного использования сред культивирования с возможной их реутилизацией приобретают все большее значение.

Большинство авторов связывает ограничение развития, возможность или невозможность реутилизации питательных сред с частичным их истощением или накоплением «токсических» продуктов [1—2]. Что касается истощения, то контроль и коррекция сред в какой-то мере применимы к синтетическим, но остаются мало реальными для сложных питательных сред. Природа накапливающихся в среде «токсических» продуктов не всегда ясна, хотя специфичность и суммарный эффект их лимитирующего воздействия вряд ли можно отрицать.

Исследования С. С. Шварца [3], наблюдения Р. А. Пшеничнова и др. [4, 5] дают основания предполагать наличие у микроорганизмов системы аутометаболической регуляции развития популяции, объясняемой накоплением в среде специфических аутометаболитов. В настоящей работе изучена их роль в возможной реутилизации питательных сред, взятых на различных этапах культивирования гомо- и гетерологических видов бактерий.

В основу работы была положена схема культивирования различных видов микробов на свежей среде с последующей реутилизацией безмикробных фильтратов для выращивания изо- и гетерологичных штаммов. Исходя из данных о преимущественном накоплении стимулирующих метаболитов на стадии логарифмического роста, а лимитирующих — в период стационарной фазы развития и постепенного отмирания микробов, безмикробные фильтраты были получены и испытывались перед пиком численности популяции и в начале ее снижения.

Были изучены четыре штамма лактобактерий: *Lactobacillus acidophilus* NCTB-4504 и 24R-A_1, *Lactobacillus fermenti* 87M-A_9

и 59Т-A_2 и производственный штамм *E. coli* М-17. Культивирование проводили в условиях относительного анаэробиоза при 37° С на жидких оптимальных средах — капустной и МРС-1, (кишечная палочка дополнительно на казеиновом бульоне) при засевной дозе 5—12 *млн/мл* каждого вида микробных клеток. После выращивания первичной культуры среду центрифугировали при 5000 *об/мин* в течение 10 *мин* и надосадочную жидкость пропускали через бактериальные свечи типа Ф-5 с диаметром пор 1,53 *мк* при отрицательном давлении 50—60 *мм* рт. ст. После коррекции pH 25%-ным раствором NH_4OH до 6,2—6,4 и контроля на стерильность фильтраты делились на две порции. В первую засевали изогенные, во вторую — гетерологичные виды (штаммы) микроорганизмов. Методика наблюдений была одинаковой и заключалась в подсчете числа клеток на отдельных фазах роста методом фазово-контрастной микроскопии. Количество живых особей в популяциях определяли методом серийных разведений в динамике развития. Результаты исследований приведены в табл. 1 и 2.

Отсутствие точного количественного совпадения при работе с разными видами микробов естественно. Наряду с этим нами выявлены общие тенденции.

Фильтраты, полученные в фазе подъема числа клеток, оказывают некоторую стимуляцию или незначительное лимитирующее влияние. Это совпадает с литературными данными о том, что в этот период стимулирующий фактор роста популяции исчезает и в среде появляются лимитирующие метаболиты.

Более четкие результаты получены при развитии тех же штаммов на фильтрате изо- и гетерологичных культур, взятых в стационарной фазе. Биомасса во всех вариантах опыта и количество живых особей были гораздо ниже, чем те же показатели у первичной культуры. Причем промежуток времени между взятием фильтратов на заключительных этапах подъема и снижения численности микробов был небольшим, поэтому можно предположить, что в этот период состав среды подвергался небольшим колебаниям. Отсюда можно сделать вывод, что, очевидно, в фазе стационарного роста популяции в среде накапливается значительное количество метаболитов, которые оказывают влияние на рост вновь внесенной культуры бактерий.

В случае реутилизации питательных сред для культивирования изологичных видов (штаммов) указанный эффект ингибирования более выражен (максимальный индекс самоингибирования — 8,74 у *L. fermenti*, штамм 87М-A_9). Менее проявляется он при последующем культивировании в средах разных видов (штаммов). Индекс гетероингибирования для культуры *E. coli* штамм М-17, выращиваемой после *L. fermenti* штамм 87М-A_9 на капустной среде, был меньше и составлял — 3,44, что свидетельствует о специфичности действия регулирующих рост метаболитов.

Таблица 1

Развитие изологичных штаммов на свежих и реутилизуемых средах

Штамм*	Питательная среда	Первичная культура					Вторичная культура				
		Время генераций, ч	Колич. генераций	Макс. конц. микробов**, млн/мл	Колич. живых особей, %	Фаза взятия фильтрата***	Время генераций, ч	Колич. генераций	Макс. конц. микробов** млн/мл	Колич. живых особей, %	Индекс угнетения или стимуляции****
Lactobacillus fermenti 87M-A_9, A^+	МРС-1	1,92	0,52	2533	—	1	1,95	0,51	2250	—	—1,13
		2,00	0,50	3037,5	72,4	2	3,6	0,28	347,5	19,6	—8,74
	Капустная	1,72	0,58	2700	—	1	1,56	0,64	1275	—	—2,12
		2,12	0,47	2275,5	33,0	2	1,33	0,75	1046,25	4,2	—2,17
Lactobacillus fermenti 59T-A_2, A^-	МРС-1	1,40	0,71	3433	—	1	1,47	0,68	2783,3	—	—1,23
	Капустная	1,50	0,67	2333	—	1	1,54	0,65	2100	—	—1,11
Lactobacillus acidophilus 24R-A_1, A^+	МРС-1	1,54	0,65	2433,3	—	1	1,45	0,69	2966	—	+1,22
	Капустная	1,47	0,68	2450	—	1	1,47	0,68	2200	—	—1,11
Lactobacillus acidophilus NCTB-4504, A^-	МРС-1	1,54	0,65	19667	—	1	1,56	0,64	2300	—	+1,17
		1,30	0,75	3325	—	2	1,64	0,61	968,8	—	—3,43
	Капустная	1,54	0,65	2133	—	1	1,5	0,67	2183	—	+1,02
		1,56	0,64	1462,5	—	2	1,64	0,61	912,5	—	—1,6
E. coli M-17	МРС-1	1,43	0,7	2725	—	1	1,51	0,66	2358	—	—1,16
		1,45	0,69	2112,5	—	2	1,56	0,64	1375	—	—1,54
	Капустная	1,49	0,67	1710	—	1	1,45	0,69	2666,7	—	+1,56
		1,59	0,63	1116,25	—	2	1,67	0,60	1017,5	—	—1,10
	Казеиновый бульон	1,49	0,67	2283,3	—	1	1,49	0,67	2000	—	—1,14
		1,59	0,63	3188	—	2	1,61	0,62	1166	—	—2,73

* A^- — штамм, не обладающий антагонистической активностью; A^+ — штамм, обладающий антагонистической активностью.
** Данные по четырем параллельным наблюдениям.
*** 1 — логарифмическая фаза, 2 — фаза стационарного роста.
**** Частное от деления максимального накопления микробов в свежей среде на максимальное накопление микробов в фильтрате.

Таблица 2

Развитие гетерологичных штаммов на свежих и утилизированных средах

Штамм*	Питательная среда	Первичная культура					Вторичная культура					
		Время генераций, ч	Колич. генераций	Макс. конц. микробов**, *млн/мл*	Колич. живых особей, %	Фаза взятия фильтрата***	Время генераций, ч	Колич. генераций	Макс. конц. микробов**, *млн/мл*	Колич. живых особей, %	Индекс угнетения или стимуляции****	Вид микробов
Lactobacillus acidophilus NCTB-4504, A−	МРС-1	1,43	0,7	2533	—	1	1,52	0,66	2083	—	—1,22	*E. coli* штамм М-17
	Капустная	1,45	0,69	2533	—	1	1,47	0,68	2233	—	—1,13	
Lactobacillus acidophilus 24R-A_1, A+	МРС-1	1,37	0,73	2667	—	1	1,47	0,68	2467	—	—1,08	*E. coli.* штамм М-17
	Капустная	1,43	0,7	2800	—	1	1,43	0,7	2367	—	—1,18	
Lactobacillus fermenti 87M-A_9, A+	МРС-1	1,85	0,54	4068,5	72,4	2	1,7	0,59	1890	30,2	—2,3	*E. coli* штамм М-17
	Капустная	1,69	0,59	1968,8	97,0	2	1,7	0,59	775	12,2	—3,44	
E. coli М-17 (контроль)	МРС-1	1,47	0,68	4337,5	41,5	—	—	—	—	—	—	—
	Капустная	1,39	0,72	2656,25	58,9	—	—	—	—	—	—	—

Примечание. Обозначения те же, что и в табл. 1.

Учитывая, что в ранних наблюдениях среду контролировали по одному показателю (глюкозе), мы не исключаем влияния колебаний питательных компонентов среды. Можно лишь полагать, что данные механизмы регуляции, очевидно, не являются единственными. В дальнейшем изучение вопроса представляет интерес при коррекции реутилизируемых питательных сред по некоторым другим питательным компонентам, в частности по их аминокислотному составу.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Н. Лебедева, А. А. Прозоров. Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. М., Медгиз, 1962, с. 67.
2. В. Н. Шапошников, А. Я. Мантейфель, Н. Д. Иерусалимский, М. Н. Бехтерева, К. И. Зыкова. Микробиология, 1939, 8, 38.
3. С. С. Шварц, О. А. Пястолова. Экология, 1970, 1, 10.
4. Р. А. Пшеничнов, В. М. Колотов, В. П. Коробов, С. Я. Барихин, Н. А. Соколова, А. М. Ивакина, А. Г. Ткаченко. Экология, 1973, 3, 5.
5. Р. А. Пшеничнов, В. М. Колотов, С. Я. Барихин, А. Г. Ткаченко, Н. А. Соколова. Микробиологические основы дрожжевого производства. Пермь, 1973, с. 22.

К. Я. СОКОЛОВА, И. Н. БЛОХИНА,
А. В. ПАНИЧЕВ

О КРИТЕРИЯХ ОЦЕНКИ МИКРОБИОЦЕНОЗОВ КИШЕЧНИКА В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

Несмотря на большое число работ, посвященных изучению микробиоценозов кишечника, до сих пор еще окончательно не разработаны методы оценки состояния кишечной флоры в норме и патологии [1—14].

Этот вопрос весьма актуален в связи с тем, что при лечении инфекционных и соматических заболеваний бактериостатическими и бактерицидными препаратами широкого спектра действия часто наблюдаются нарушения в составе и свойствах нормальной микрофлоры кишечника. Инфекционный процесс, обусловленный внедрением в организм патогенного микроба (особенно при кишечных инфекциях), также нередко сопровождается изменением нормального микробиоценоза. Дисбактериоз кишечника усугубляет нарушение функций желудочно-кишечного тракта, усиливает состояние токсикоза и сенсибилизации организма. Поэтому разработка критериев оценки степени патологии микрофлоры кишечника, способов сравнения данных, полученных в разное время, приемов, позволяющих унифицировать методы, сделать их сопоставимыми для разных лабораторий, обеспечить возможность хранения информации для последующего ее использования, представляет большой интерес.

На основе анализа литературы и исследований, проведенных в течение ряда лет в лаборатории бактериальных кишечных инфекций Горьковского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии, мы выбрали 32 теста для характеристики микробиоценоза кишечника (см. таблицу), в которых отражено наличие или отсутствие патогенной микрофлоры, количественная характеристика содержания нормальных кишечных палочек, соотношение аэробной и анаэробной флоры в целом и некоторых отдельных видов. Учтены выявленные условно-патогенные микроорганизмы, а также наличие их в сочетаниях.

Характеристика каждого микробиоценоза по 32 тестам использовалась далее для определения степени его сходства с

Тесты, взятые в основу характеристики микробиоценозов кишечника для последующей математической обработки

Имя, фамилия		№ теста	Тест	
Алеша Н.	Максим П.			
0	0	1	Наличие патогенных микробов кишечной группы	
1	1	2	Равное соотношение или преобладание анаэробов над аэробами	
1	1	3	0,002—10,0 млрд. микробных клеток	Количественное содержание кишечных палочек
0	0	4	Больше 10,0 млд. микробных клеток	
0	0	5	Меньше 0,002 млрд. микробных клеток	
1	1	6	Наличие энтерококка	
0	1	7	Примерно равное	Соотношение между кишечными палочками и энтерококком
0	0	8	Преобладание энтерококка	
1	0	9	Преобладание кишечной палочки	
0	0	10	Наличие гемолизирующего энтерококка	
0	1	11	Обнаружение вариантов кишечных палочек, характеризующих дисбактериоз кишечника*	
0	0	12	Сочетание двух или более вариантов кишечных палочек	
0	0	13	Обнаружение ассоциаций вариантов кишечных палочек с другими условно-патогенными микроорганизмами	
1	1	14	Наличие негемолизирующего стафилококка	
0	0	15	Обнаружение негемолизирующего стафилококка в количестве более 15% от общего числа аэробных микробов	
1	0	16	Наличие гемолизирующего стафилококка	
0	0	17	Обнаружение гемолизирующего стафилококка в количестве более 10% от общего числа аэробных микробов	
0	0	18	Наличие микробов рода протея и палочки Моргана	
0	0	19	Обнаружение микробов рода протея и палочки Моргана в количестве более 5% от общего числа аэробных микробов	

Окончание таблицы

Имя, фамилия		№ теста	Тест	
Алеша Н.	Максим П.			
0	0	20	Наличие дрожжеподобных грибов рода *Candida*	
0	0	21	Выявление дрожжеподобных грибов рода *Candida* в количестве более 1000 микробных клеток	
1	0	22	1	Число видов условно-патогенных микроорганизмов, характеризующих дисбиоценоз кишечника
0	0	23	2	
0	0	24	3	
0	0	25	Более 3	
1	1	26	Наличие бифидобактерий	
1	1	27	Преобладание бифидофлоры над молочнокислыми палочками и стрептобактериями	
1	1	28	Наличие лактобактерий и молочнокислых стрептобактерий	
0	0	29	Наличие молочнокислого стрептококка	
1	1	30	Преобладание в анаэробной флоре палочковидных форм микробов	
0	0	31	Преобладание в анаэробной флоре молочнокислого стрептококка	
1	0	32	Наличие спорообразующих анаэробов	

* Как варианты кишечных палочек, характеризующие состояние дисбиоценоза кишечника, учитывали гемолизирующие, слизистые и R-формы, а также кишечные палочки с измененными ферментативными свойствами (лактозонегативные и др.)

любым другим по показателю подобия, вычисленному с помощью ЭВМ, который применяется при сравнительных характеристиках для других целей, в частности в численной таксономии [15—20].

Исходные данные для машинной обработки материалов оформляли в виде таблицы (по типу представленной на примере обследованных Максима П. и Алеши Н.), в которой характеристику микрофлоры каждого обследуемого записывали в виде некоторого числа в двоичной системе счисления. Каждый разряд в этих числах соответствовал определенному тесту. Наличие теста обозначали цифрой *1*, отсутствие — *0*.

Для определения степени сходства микрофлоры двух обследованных проводили поразрядное перемножение чисел. Показатель подобия вычисляли по формуле

$$K = \frac{n}{S_1 + S_2} \cdot 100,$$

где K — показатель подобия; n — сумма совпадающих положительных тестов, получающихся в результате поразрядного перемножения сходных чисел; S_1 и S_2 — сумма положительных тестов первого и второго обследованного.

Расчет показателя по данным настоящего обследования приводит к величине:

$$K_{\text{под}} = \frac{8}{22} \cdot 100 = 36{,}3.$$

При полном сходстве двух сравниваемых микробиоценозов показатель подобия равен 50 — наивысшему его значению.

Для получения характеристики нормального микробиоценоза была подобрана группа здоровых детей в возрасте от 1 года до 5 лет. О состоянии здоровья детей судили по материалам истории развития ребенка (форма № 112), заключению участкового педиатра, а также по сведениям, полученным от родителей.

Здоровыми считались дети, не имеющие в анамнезе кишечных инфекций или других острых и хронических заболеваний (пневмония, отит, тонзиллит, частые катары верхних дыхательных путей, выраженная гипотрофия, рахит и др.), не принимавшие антибиотики, сульфаниламиды и другие химические препараты в течение шести месяцев, предшествовавших обследованию, не общавшиеся с больными острыми кишечными инфекциями дома или в детском коллективе в течение месяца перед обследованием.

Путем вычисления среднего показателя подобия по наивысшим его значениям из 30 здоровых детей были выделены 12, структура микробиоценоза кишечника которых могла быть принята за рабочий эталон, отражающий наиболее типичную нормальную микрофлору. Для микрофлоры их кишечника было характерно преобладание анаэробной флоры (главным образом, бифидобактерий) над аэробной или равное их соотношение, содержание кишечных палочек в пределах 30 млн — 2 млрд., отсутствие гемолизирующего энтерококка, патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, за исключением гемолизирующего стафилококка, который был обнаружен в небольших количествах (не превышающих 5% всей аэробной флоры) у 7 из 12 детей. Такая большая частота выявления гемолизирующего стафилококка в кишечнике здоровых детей, по-видимому, является отражением широкого применения в

последние годы антибиотиков и других химических препаратов.

Небольшие различия, отмеченные в кишечной флоре эталонной группы, сводились к наличию или отсутствию негемолизирующего или гемолизирующего стафилококка. У одного обследуемого энтерококк выделен не был, у трех его содержание было равным или преобладало над содержанием кишечных палочек, тогда как наиболее характерным для всей группы явилось преобладание кишечных палочек над энтерококками. В одном случае был найден молочнокислый стрептококк, спорообразующие анаэробы и нетипичные кишечные палочки.

Для суждения о наличии отклонений от нормы в структуре микробиоценоза кишечника больных по выбранным тестам вычисляли средний показатель подобия каждого конкретного случая с двенадцатью микробиоценозами, принятыми за эталон сравнения. По величине этого показателя судили о степени отклонения от нормы.

При обследовании больных острой дизентерией и реконвалесцентов у половины из них на разных этапах заболевания был выявлен дисбактериоз кишечника разной степени выраженности. Если среди здоровых детей колебания среднего показателя подобия составляли 44,6—38,4, то у больных при наличии изменений в структуре биоценоза они были ниже 30, а в случаях выраженного дисбактериоза снижались до 15—10, предельным был показатель 4,1.

В микрофлоре кишечника больных дизентерией с выраженным дисбактериозом были обнаружены не только шигеллы, но и изменения в анаэробной группе — уменьшение количества или исчезновение бифидобактерий, преобладание кокковых форм микробов. Дисбактериоз кишечника проявлялся также в уменьшении количества нормальных кишечных палочек и размножении условно-патогенных микробов, которых часто обнаруживали в ассоциациях по 2—3 вида одновременно. В частности, для больных острой дизентерией характерно наличие протея и дрожжеподобных грибов рода *Candida*.

Данные каждого бактериологического исследования по 32 тестам фиксировались на перфокартах, которые затем обрабатывали с помощью ЭЦВМ. Перфокарты, являясь удобной стандартной формой документации, могут долго храниться, а затем использоваться при комплексировании работы разных учреждений, что обеспечивает однотипность учета полученных данных и возможность их совместной обработки.

Проведенные нами исследования являются первым этапом усовершенствования методики учета и сравнения данных при обследовании на дисбактериоз кишечника по пути стандартизации методики и обеспечения хранения получаемой информации.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Nissle. J. Med. Klin., 1918, 2, 29.
2. H. Haenel. Zs. Kinderheilkunde, 1956, 78, 592.
3. H. Haenel. Zentrablatt f. Bakteriol., 1958, **169**, 383.
4. Л. Г. Перетц. Значение нормальной микрофлоры для организма человека. М., Медгиз, 1955.
5. Н. Ф. Голуб. Вторая Всесоюзная конференция по антибиотикам. Тезисы докл. М., 1957, с. 186.
6. Н. Ф. Голуб. Антибиотики, 1959, 4, 110.
7. Н. Ф. Голуб. Вопросы микробиологии и эпидемиологии кишечных инфекций. Киев, 1960, с. 157.
8. В. Н. Красноголовец. Труды Второго Московского гос. мед. ин-та им. Н. И. Пирогова. М., 1961, с. 96.
9. В. Н. Красноголовец. Дисбактериоз у больных кишечными заболеваниями, леченными антибиотиками. М., 1962, с. 112.
10. В. Н. Красноголовец. Антибиотики, 1964, 4, 368.
11. В. Н. Красноголовец. Клинические вопросы инфекционной патологии. Труды Второго Московского гос. мед. ин-та им. Н. И. Пирогова, вып. 2. М., 1966, с. 108.
12. Р. В. Эпштейн-Литвак. Материалы Второго Всероссийского съезда эпидемиологов, микробиологов и инфекционистов. М., 1966, с. 178.
13. Р. В. Эпштейн-Литвак. Некоторые вопросы специфической профилактики и клиники. Воронеж, 1970, с. 123.
14. Ф. Л. Вильшанская. Характеристика микрофлоры при дисбактериозе кишечника, патогенетическое значение дисбактериоза при кишечных расстройствах и эффективность применения с лечебной целью колибактерина. Автореф. докт. дисс. М., 1970.
15. P. H. A. Sneath. J. Gen. Microbiol., 1957, **17**, 201.
16. P. H. A. Sneath. The construction of taxonomic groups in microbiol. classifications. Cambridge, 1962, 283.
17. P. H. A. Sneath. Ann. Rev. Microbiol., 1964, 18, 335.
18. P. L. Seyeried. Canad. J. Microbiol., 1968, **14**, 4, 313.
19. И. Н. Блохина. Биохимия микробов и иммунохимия. Материалы к конференции. Горький, 1966, с. 7.
20. И. Н. Блохина. Сравнительная физиология микроорганизмов. Горький, 1970, с. 15.

В. М. КАЛЮЖНАЯ, А. А. ШЕСТАКОВА,
Н. С. ЧУРИЛОВА, В. П. КОРОБОВ

О ВОЗМОЖНОСТИ ГОРМОНАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РАЗВИТИЕ МИКРОБНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

В основе внутриклеточной регуляции обмена в живых системах лежит высокая чувствительность ферментов к различным эффекторам. Согласованное взаимодействие клеток в высших организмах достигается наложением на механизмы клеточной автоматии регуляторных воздействий высшего порядка, и в частности гормональных факторов.

Возникновение гормоноподобных соединений, по-видимому, было одной из первых стадий объединения отдельных клеток в динамические сообщества с формированием химических механизмов регуляции развития популяций. Сохранение у некоторых ферментов, выделенных из микроорганизмов, достаточно высокой чувствительности к различным гормональным препаратам является отражением развития подобных механизмов. Так, широко известна модификация структуры и активности дрожжевой гексокиназы пептидными гормонами инсулином и вазопрессином [1] с изменением чувствительности фермента к глюкокортикоидам [2], показана индукция гидрокортизоном и АКТГ β-галактозидазы *E. coli* [3], обусловленная активацией РНК-полимеразы бактерий [4].

Приведенные примеры проявления гормонального действия в бактериальных системах, очевидно, не беспрецедентны. Возможно, что действие гормонов на микроорганизмы опосредовано через контроль содержания циклического 3',5'-аденозинмонофосфата (ц-АМФ) — соединения, обладающего широким спектром регуляторного действия на различные метаболические процессы и являющегося вторичным индуктором гормонального эффекта [5, 6]. Особый интерес представляет участие ц-АМФ в контроле роста и развития различных микроорганизмов [7], зависимое от источников углеродного питания [8] и внутриклеточной концентрации нуклеотида [9]. Таким образом, сопоставление чувствительности ферментов микроорганизмов к гормональным факторам, контролирующим в клетках системы образования и деградации ц-АМФ, с влиянием этого циклического мононуклеотида на рост бактерий

открывает перспективы поиска новых путей направленной регуляции развития микробных популяций через контроль внутриклеточного уровня ц-АМФ.

Целью нашей работы было исследование развития культуры *E. coli* при внесении в среду обитания инсулина и тироксина — гормонов, внутриклеточным посредником действия которых является ц-АМФ [10, 11].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гормональный эффект исследовался при развитии бактерий на полноценной среде — мясо-пептонном бульоне (МПБ) и в условиях выраженной катаболитной репрессии при культивировании на среде М-9 [12]. На МПБ и среду М-9 засевали суточную культуру *E. coli* М-17 в количестве 5 и 25 млн. микробных клеток на 1 *мл* среды соответственно. В опытах с синтетической средой культура, восстановленная с косяков МПА, была троекратно пассирована на среде М-9. Одновременно с культурой в среды вносили стерильные препараты гормонов — инсулин (Ленинградский мясокомбинат) в концентрации 0,05 и 0,005 *ед/мл* и предварительно отнейтрализованный l-тироксин («Reanal») в концентрации 10^{-7} и 10^{-4} М.

За развитием культуры следили по изменению мутности проб, которые отбирали через каждые 30 *мин* после засева. Пробы просматривали на спектрофотометре СФ-16 при 590 *ммк*. В нескольких опытах из тех же проб для изучения морфологического состояния бактерий делали мазки, в которых просчитывали размеры клеток. Опыт заканчивали при переходе культуры в стационарную фазу развития. По данным изучения численности бактерий в пробах рассчитывали время фазы скрытого развития, скорость роста на каждом этапе развития и выход биомассы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ развития *E. coli* на МПБ при наличии в среде гормонов показал, что влияние тироксина и инсулина на исследуемые параметры во многом определяется их содержанием в среде. При

Константа скорости роста при развитии культуры *E. coli* М-17 на мясо- в присутствии тироксина

Время роста, *ч*	Контроль	Тироксин, 10^{-4}М	Контроль	Тироксин, 10^{-7}М	Инсу
					Контроль
2	0,88±0,16	0,63±0,19	0,89±0,04	0,62±0,07	1,55±0,04
3	1,16±0,11	1,01±0,14	1,12±0,02	0,96±0,08	1,75±0,04
4	1,30±0,06	1,03±0,02	1,08±0,05	1,29±0,05	2,15±0,03
5	1,18±0,05	1,14±0,07	1,10±0,01	1,13±0,08	2,35±0,02

концентрации тироксина 10^{-7} М в 1,5 раза по сравнению с контролем увеличивается фаза скрытого развития популяции. Задержка лаг-периода сменяется резким переходом культуры в фазу экспоненциального роста с возрастанием константы скорости роста (табл. 1). Более энергичный рост численности популяции в присутствии тироксина сопровождается увеличением выхода биомассы на 16% ($p<0,05$). Повышение концентрации гормонов до 10^{-4} М оказывает противоположный эффект: для культуры в этих условиях характерно снижение скорости роста на всех этапах развития, что в конечном итоге приводит к уменьшению на 14% ($p<0,05$) выхода биомассы (рис. 1).

Сравнение эффективных концентраций тироксина, вызывающих торможение (10^{-4} М) и активацию (10^{-7} М) развития *E. coli* с действием этого гормона в тканях млекопитающих, для которых отчетливо прослеживается зависимость эффекта от дозы [13], позволяет считать, что стимуляция развития бактерий низкими концентрациями гормона может быть связана с усилением окислительного фосфорилирования — основного пути аккумуляции энергии в аэробных условиях. Ускорение развития популяции в этом случае может быть определено возрастанием энергообеспеченности анаболических процессов роста. Повышение концентрации тироксина приводит к разобщению окисления и фосфорилирования, и следовательно, к развитию в клетках энергетического дефицита, обусловливающего торможение роста (см. табл. 1) и снижение выхода биомассы.

Необходимо отметить установленное недавно угнетение тироксином и трийодтиронином развития большой группы грамположительных бактерий [14]. Одновременно показано, что внесение тироксина в среду в концентрации 10^{-5} М не влияет на рост грамотрицательных микроорганизмов, в том числе и на *E. coli*. Наши наблюдения не противоречат этим данным, указывая на зависимость гормонального эффекта от концентрации тироксина.

Другим направлением ингибирующего действия может быть возрастание в этих условиях внутриклеточного содержания ц-АМФ за счет торможения тироксином циклофосфодиэстеразы, показанного для некоторых тканей [11].

Таблица 1

пептонном бульоне и инсулина

лин. *ед/мл*	
0,05	0,005
1,49±0,18	1,26±0,18
2,02±0,14	1,87±0,20
2,48±0,03	2,83±0,04
2,52±0,02	2,38±0,01

Внесение в среду инсулина также ускоряет развитие *E. coli* (рис. 2), причем наибольшее стимулирующее действие инсулина проявляется при концентрации 0,005 *ед/мл* в период экспоненциального развития, когда скорость роста культуры возрастает на 30% ($p<0,05$), затем она быстро снижается, приближаясь к контрольной (см. табл. 1).

Из существующих гипотез относи-

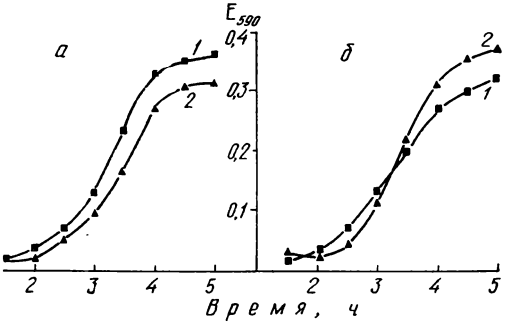


Рис. 1. Динамика развития культуры *E.coli* М-17 на МПБ в присутствии различных концентраций тироксина (*а*—10^{-4}М; *б* — 10^{-7} М):
1 —контроль; *2* — опыт.

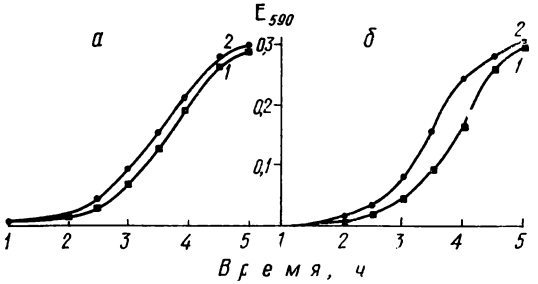


Рис. 2. Динамика развития культуры *E.coli* М-17 на МПБ в присутствии различных концентраций инсулина (*а* — 0,05; *б* — 0,005 *ед/мл*):
1 — контроль; *2* — опыт.

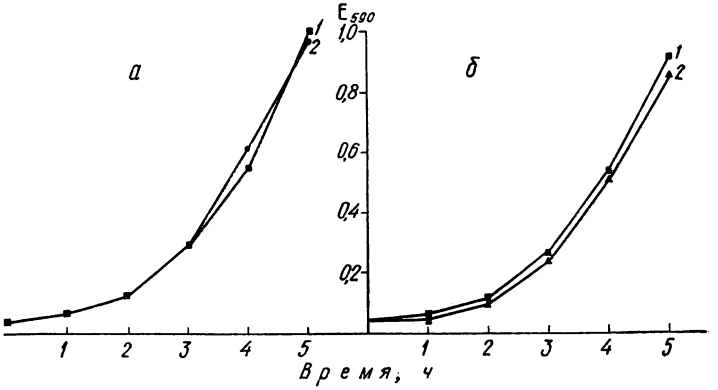


Рис. 3. Динамика развития культуры *E.coli* М-17 на среде М-9 в присутствии инсулина и тироксина:
а — инсулин 0,005 *ед/мл*; *б* — тироксин 10^{-7} М; *1* — контроль; *2* — опыт.

Таблица 2

Размеры клеток *E. coli* М-17 при развитии бактериальной культуры на синтетической среде М-9 в присутствии тироксина и инсулина, *мк*

Время исследования после засева, *ч*	Контроль	Тироксин (10^{-7}М)	Инсулин (0,05 *ед/мл*)
1	1,51±0,07	1,49±0,07	2,24±0,16
2	1,44±0,05	—	1,93±0,07
3	1,18±0,17	1,09±0,07	1,63±0,11
4	1,03±0,05	1,08±0,08	—
5	1,06±0,05	1,15±0,06	—

тельно действия инсулина наибольший интерес представляет точка зрения Родбелла [15], согласно которой инсулин влияет на асимметрию аденилатциклазы в мембранах клеток. В результате действия гормона происходит изменение структурной организации фермента, после чего аденилатциклаза теряет чувствительность к различным положительным эффекторам. Однако, как показали наши исследования, при достижении определенной плотности культура *E. coli* переходит в стадию отрицательного ускорения развития независимо от наличия гормона в среде. Торможение развития на этой стадии, по-видимому, связано с активацией аденилатциклазы, так как внутриклеточное содержание ц-АМФ в это время значительно возрастает [9].

Итак, стимулирующее действие инсулина отчетливо проявляется лишь на стадии логарифмического роста. Эффект гормона, возможно, обусловлен усилением проницаемости клеточной мембраны для пластического материала, как это характерно для действия инсулина в тканях животных организмов [16].

Дополнительные сведения о механизме действия гормонов получены в опытах при росте бактерий на синтетической среде М-9. Как известно, при наличии в среде глюкозы в качестве единственного источника углерода происходит снижение внутриклеточной концентрации ц-АМФ, сопровождающееся репрессией синтеза ферментов, не имеющих прямого отношения к утилизации глюкозы [17]. Внесение в такие культуры экзогенного ц-АМФ снимает ингибирование глюкозой и ее метаболитами нерационального в этих условиях синтеза β-галактозидазы и других белков [18, 19], отвлекая материальные ресурсы популяции на «второстепенные» нужды, тем самым снижая скорость роста. Добавление гормонов в среду в концентрациях, оказавших действие в опытах на МПБ, не отразилось на развитии культуры *E. coli* (рис. 3). Таким образом, можно считать, что действие гормонов обнаруживается лишь в случае отсутствия катаболитной репрессии при росте бактерий на безглюкозных средах, когда система ц-АМФ находится в функционально активном состоянии.

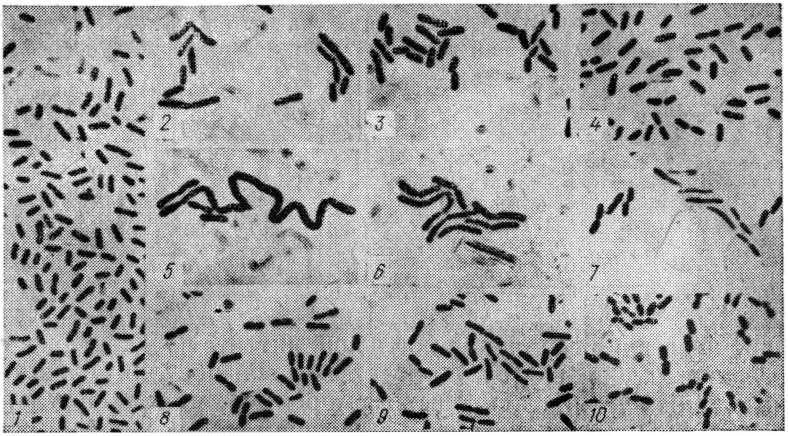


Рис. 4. Морфологическая картина развития популяции *E.coli* М-17 на среде М-9 в присутствии гормонов:

1 — исходная культура; *2*, *3*, *4* — без гормонов соответственно через 1, 2, 3 *ч* развития; *5*, *6*, *7* — то же в присутствии инсулина 0,005 *ед/мл*; *8*, *9*, *10* — то же в присутствии тироксина 10^{-7} М.

На фоне полной идентичности роста *E. coli* в контроле и в присутствии гормонов, установленной турбидиметрическим методом, были получены совершенно неожиданные результаты в тех же условиях при изучении морфологической картины отдельных стадий развития *E. coli*.

С помощью фазово-контрастной микроскопии уже через 20 *мин* после внесения в среду гормонов удается обнаружить отчетливую разницу в размерах клеток (табл. 2). К первому часу роста в присутствии инсулина происходит формирование значительно бóльших, нежели в контроле, клеток, часть из них — «гиганты» — по своей длине в 8—10 раз превосходят контрольный уровень (рис. 4, *5*). Увеличение размера клеток под влиянием инсулина сохраняется на всех стадиях роста (рис. 4, *6*, *7*).

В присутствии тироксина культура *E. coli* уже к первому часу развития имеет морфологию, специфичную для фазы экспоненциального роста,— крупные клетки, характерные для контрольного эксперимента (рис. 4, *2*), практически не обнаружены, зато найдено большое количество делящихся клеток (рис. 4, *8*), причем размеры клеток уменьшены. Снижение размера клеток еще более характерно для экспоненциальной фазы (рис. 4, *9, 10*).

Таким образом, исследование морфологической картины развивающейся популяции *E. coli* подтверждает высказанное ранее предположение относительно механизма гормонального эффекта в бактериальной системе. Низкие концентрации тироксина, ускоряя выработку макроэргических соединений, способствуют излишней «энергизации» бактериальных клеток и, как следствие, преждевременному делению клетки. В присутствии инсулина, по-

видимому, происходит значительное усиление анаболических процессов, что приводит к излишней трате энергетических ресурсов и задержке деления клеток.

Полученные данные, на наш взгляд, открывают возможность моделирования бактериальных внутрипопуляционных систем регуляции путем использования различных биологически активных соединений и подтверждают высокую чувствительность микроорганизмов к внеклеточным регуляторным соединениям.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. С. Ильин. Вестн. АМН СССР, 1969, 8, 3.
2. В. С. Ильин, Г. В. Титова. Химические факторы регуляции активности и синтеза ферментов. Под ред. В. Н. Ореховича. М., «Медицина», 1969, с. 360.
3. П. В. Сергеев, Р. Д. Сейфулла, А. И. Майский. Молекулярные аспекты действия стероидных гормонов. М., «Наука», 1971, с. 80.
4. A. Wacker, J. Drews, W. Pratt, P. Chandra. Angem. Chemie, 1965, 77, 172.
5. R. Perlman, J. Pastan. Science, 1970, 169, 339.
6. П. А. Кометиани. О механизмах действия циклической аденозинмонофосфорной кислоты. Тбилиси, «Мецниереба», 1974.
7. N. Judewicz, E. Robertis, H. Torres. Biochem. Biophys. Res. Communs, 1973, 52, 1257.
8. R. Makman, E. Sutherland. J. Biol. Chem., 1965, 240, 1309.
9. A. Peterkofsky, C. Gadzar. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 2794.
10. Л. К. Старосельцева. Современные вопросы эндокринологии. М., «Медицина», 1972, с. 123.
11. R. L. Mandel, F. A. Kuehl. Biochem. Biophys. Res. Communs, 1967, 28, 13.
12. Сборник методик по генетике микроорганизмов. Под ред. Р. Клауса и У. Хейса. М., «Медицина», 1970, с. 203.
13. F. Hoch. Physiol. Rev., 1962, 42, 605.
14. G. Nachman, L. Batia. Canad. J. Microbiol., 1973, 19, 1401.
15. M. Rodbell. Lancet, 1968, 1, 1353.
16. С. Р. Мардашев. Биохимические проблемы медицины. М., «Медицина», 1975, с. 140.
17. B. Magasanik. The Lactose Operon. Ed. J. R. Beckwith, Lipser, 1970, 189.
18. R. Perlman, J. Pastan. Biochem. Biophys. Res. Communs, 1968, 30, 656.
19. De Crombrugghe, B. Pchen, W. Anderson, P. Nissley, M. Gottesman, I. Pastan, R. Perlman. Nature New Biol., 1971, 231, 139.

М. М. ДЕДЮКИНА, С. Я. БАРИХИН

ИНГИБИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ЦИКЛИЧЕСКОГО АМФ НА РОСТ *ESCHERICHIA COLI*

Выявление регуляторных механизмов клетки и путей управления ими — задача чрезвычайной важности. Воздействие на регуляторные механизмы клетки возможно с помощью различных физических, химических и биологических факторов. Для этой цели широко применяются химические соединения, обладающие высокой биологической активностью.

Циклический аденозин-3'-5'-монофосфат (ц-АМФ) уже давно известен как биологически активное соединение. Установлено, что ц-АМФ действует как внутриклеточный регулятор многих физиологических процессов [1]. Ему приписывается различная роль: снимать неустановившуюся и длительную катаболическую репрессию синтеза индуцибельных ферментов [2—4], стимулировать фазу лизогении [5] и бактериальной трансформации [6].

С другой стороны известно, что уровень внутриклеточного ц-АМФ может варьировать в зависимости от различных физиологических условий. Он возрастает в поздней экспоненциальной и стационарной фазах [7], а также зависит от источника углерода [8]. Внутриклеточный уровень ц-АМФ у быстро растущих клеток ниже, чем у медленно делящихся или покоящихся [9—10]. Добавление N^6, O^2-дибутирил-ц-АМФ к среде культивирования клеток повышает уровень ц-АМФ и тормозит рост опухолевых клеток. Это вещество ингибирует внутриклеточную фосфодиэстеразу [11, 12]. Добавление в среду соединений, активирующих аденилатциклазную активность, повышает внутриклеточный уровень ц-АМФ и снижает скорость роста клеток [13]. Ряд авторов считает, что ц-АМФ может регулировать клеточный рост [14] и быть ингибитором роста ряда бактерий [15]. Очевидно, регуляция клеточных процессов связана с варьированием внутриклеточных уровней ц-АМФ.

Целью настоящей работы было выяснение влияния ц-АМФ на рост *E. coli* М-17.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Развитие микробных клеток изучали в условиях стандартной синтетической среды [16], содержащей в качестве источника питания глюкозу, галактозу, лактозу или глицерин. Микробной

культурой служил выделенный из производственного неколициногенного штамма *E. coli* М-17 субштамм. Засевная доза микробов в опытах была одинаковой и составляла 15 млн. клеток на 1 *мл*. Для получения сравнимых данных культивирование микробов проводили при 37° С в течение 8 *ч* в пробирках с шестью параллельными.

В опытах использовались следующие препараты: циклический аденозин-3, 5-монофосфат фирмы «Флюка АГ», аденозин-5-монофосфат, аденозин-5-трифосфат, гуанозин-5-монофосфат, гуанозин-5-трифосфат, уридин, урацил, рибозо-5-фосфат фирмы «Реанал»; аденозин, аденин, гипоксантин, гуанин фирмы «Хемапол»; инозин, цитидин отечественные.

Эти соединения добавляли в среду культивирования в концентрации 200 *мкг/мл*. Эффект действия веществ определяли при концентрациях глюкозы в среде от 0,5 до 30 *мг/мл*. Действие ц-АМФ проверяли также добавлением его в среды, содержащие в качестве источника питания галактозу, лактозу или глицерин в концентрациях от 0,5 до 30 *мг/мл*. Контролем служили пробы со стандартной засевной дозой, выращенные в условиях стандартной синтетической среды без добавок.

Об эффекте действия испытанных соединений судили по изменению роста бактерий и рассчитывали по формуле

$$\frac{a_1 - a_2}{a_1} \cdot 100\%,$$

где a_1 и a_2 — общее количество бактериальных клеток, выросших в контроле и на синтетической среде с добавлением испытываемых соединений. Общее количество выросших клеток оценивали турбидиметрическим методом на фотоэлектрокалориметре ФЭК-56 при синем светофильтре. Содержание глюкозы в среде определяли ортотолуидиновым реактивом по методу Райциса и Устиновой [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные наблюдений за ростом *E. coli* на синтетической среде с содержанием глюкозы от 50 до 200 *мкг/мл* графически изображены на рис. 1. Видно, что оптимальной концентрацией глюкозы для роста бактерий является 4—8 *мг/мл*; при концентрации 15 *мг/мл* начинается снижение роста, которое достигает максимума при 120 *мг/мл*. Определение потребления глюкозы из среды показало, что при концентрации глюкозы от 100 *мкг/мл* до 2 *мг/мл* сахар почти полностью потребляется бактериями, при 4 *мг/мл* происходит уже неполный расход углевода. Возможно, что снижение роста *E. coli*, начинающееся при концентрации глюкозы 15 *мг/мл*, вызывается избытком субстрата или продуктов его распада.

Влияние ц-АМФ на рост бактерий выясняли на фоне глюкозного эффекта, т. е. действие ц-АМФ исследовали при всех концентрациях глюкозы в среде — от 0,5 до 30 *мг/мл*.

Нами обнаружен ингибирующий эффект ц-АМФ на фоне возрастающего содержания глюкозы (рис. 2). Кривые ингибирования роста бактерий имеют одинаковый характер при различных концентрациях ц-АМФ в среде. Интересно отметить, что наблюдается корреляция между концентрацией ц-АМФ в среде и эффектом ингибирования. Торможение роста при концентрации ц-АМФ 50 *мкг/мл* происходило на 35%, а при концентрации 400 *мкг/мл* — на 74%. Обнаружено также, что эффект ингибирования не зависит от содержания глюкозы в среде, т. е. при всех уровнях глюкозы и определенной концентрации ц-АМФ процент ингибирования одинаков. Например, при концентрации ц-АМФ в среде 200 *мкг/мл* торможение роста бактерий отмечено на 60% при всех уровнях глюкозы.

Для выяснения действия ц-АМФ на ферменты гликолиза мы определили расход глюкозы на одну клетку в среде, содержащей ц-АМФ и в его отсутствие. Различий не наблюдалось, так как потребление глюкозы одной клеткой составляло $4—8 \cdot 10^{-6}$ *мкг* за 8 *ч* в обоих случаях.

Так как концентрация глюкозы не влияет на ингибирующий эффект ц-АМФ, а ц-АМФ — на расход углевода из среды, можно сделать вывод, что действие ц-АМФ не связано с активностью ферментов, участвующих в метаболизме глюкозы.

Следующим этапом исследования было выяснение специфичности действия циклического нуклеотида на рост *E. coli*. Для этого проверяли влияние соединений на рост культуры. С этой целью было испытано влияние ряда пуриновых и пиримидиновых соединений и рибозо-5'-фосфата, имеющих химическую структуру, близкую ц-АМФ.

Ингибирующим действием среди пуриновых соединений обладал аденин, который тормозил рост бактерий не только при концентрации 200 *мкг/мл*, но и при 50 *мкг/мл* (рис. 3). Такие вещества, как АМФ, АТФ, аденозин, гипоксантин, инозин, ГМФ и гуанин, не влияли на рост бактерий. Несмотря на то, что торможение роста аденином было ниже (40%) по сравнению с действием

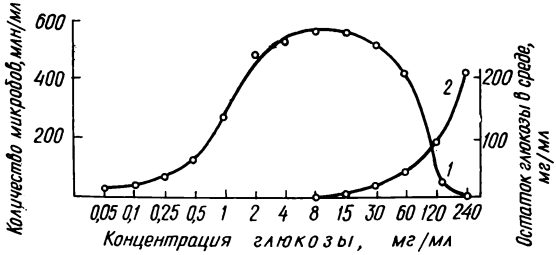


Рис. 1. Рост *E.coli* на синтетической среде с различным содержанием глюкозы:

1 — рост *E.coli*; *2* — остаточное содержание глюкозы в среде.

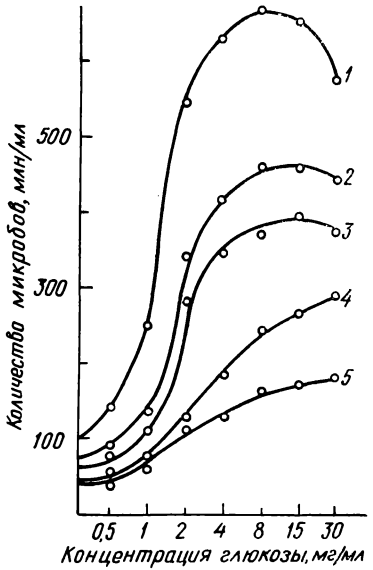


Рис. 2. Влияние концентраций ц-АМФ на рост *E.coli* в синтетической среде с различным содержанием глюкозы:

1 — контроль; *2—5* — концентрация ц-АМФ, *мкг/мл*: *2* — 50; *3* — 100; *4* — 200; *5* — 400.

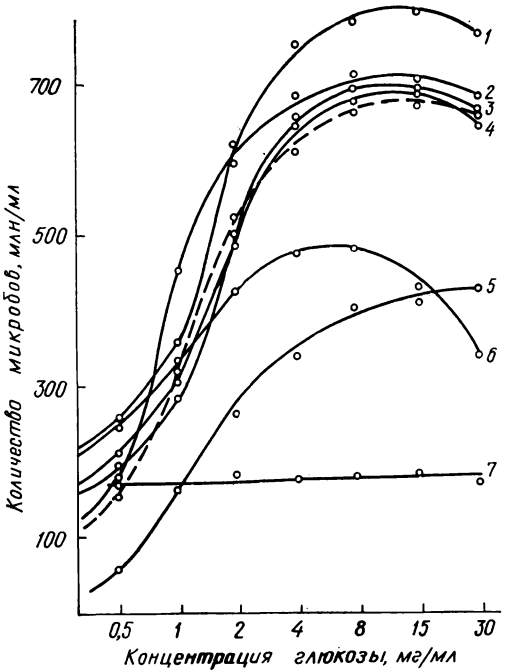


Рис. 3. Влияние пуриновых соединений, ц-АМФ и рибозо-5'-фосфата на рост *E.coli* в синтетической среде с различным содержанием глюкозы:

1 — ГТФ; *2* — ГМФ; *3* — АТФ; *4* — АМФ; *5* — аденин; *6* — ц-АМФ; *7* — рибозо-5'-фосфат; *штриховая линия* — контроль.

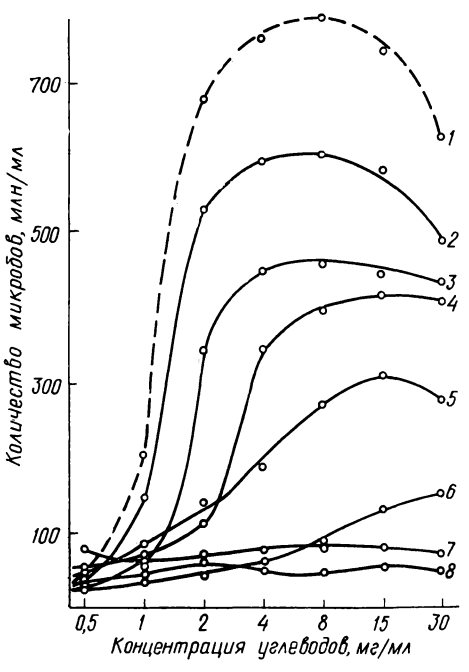


Рис. 4. Влияние ц-АМФ на рост *E.coli* в среде, содержащей различные источники углерода:

1 — контроль; *2* — глюкоза+ц-АМФ; *3* — лактоза; *4* — лактоза+ц-АМФ; *5* — галактоза; *6* — галактоза+ц-АМФ; *7* — глицерин; *8* — глицерин+ц-АМФ.

ц-АМФ (60%) в той же концентрации, ход кривой ингибирования напоминал кривую действия ц-АМФ. Очевидно, значительную роль в проявлении эффекта ингибирования играло адениновое кольцо.

Однако большая разница в активности аденина и ц-АМФ указывала на необходимость присутствия рибозного кольца. Обнаружен также ингибирующий эффект рибозо-5'-фосфата на рост *E. coli* (см. рис. 3).

На основании ингибирующего действия аденина и рибозо-5'-фосфата можно было предположить, что ингибирующий эффект проявится у нециклического аденозин-5'-монофосфата. Но в наших опытах АМФ не влиял на рост бактерий. Это означает важность циклической группировки фосфата для проявления ингибирующего действия.

Таким образом, ингибирующий эффект действия ц-АМФ, а также аденина и рибозо-5'-фосфата позволяет предполагать специфичность действия циклического нуклеотида на рост *E. coli*. Аналогичные данные по ингибирующему эффекту действия ц-АМФ имеются в литературе. Выявлено подобное влияние ц-АМФ на рост фибробластов [14]. Обнаружено [15], что ц-АМФ в концентрации 5 *мм* снижает скорость роста *E. coli* (Hfr 3000).

Интересный эффект мы наблюдали при нахождении в среде ГТФ, так как это одно из испытанных пуриновых соединений, которое стимулировало рост *E. coli*. В среднем эффект стимуляции роста ГТФ составлял 30%. Этот феномен можно предположительно объяснить, например, способностью бактерий утилизировать энергию данного соединения. Трудно сказать, на каких этапах метаболизма включается экзогенная ГТФ, но факт стимуляции в ее присутствии налицо.

При изучении действия пиримидиновых соединений — уридина, урацила и цитидина — обнаружено стимулирующее действие цитидина и урацила при всех концентрациях глюкозы. Уридин проявлял стимулирующий эффект только при низких концентрациях глюкозы, а начиная с концентрации 2 *мг/мл* его действие исчезало. Необходимы дальнейшие исследования для объяснения возможного механизма действия пиримидиновых соединений.

Интересно было проверить, является ли эффект действия ц-АМФ специфичным для источника питания глюкозы или он реализуется и в присутствии других субстратов. Как известно из литературы, действие ц-АМФ на рост клеток проявлялось при наличии источников углерода, которые понижали уровни внутриклеточного ц-АМФ, например глюкозы и пирувата. Действие его не обнаружено при использовании в качестве питательных субстратов сукцината, малата и глицерина [15].

Были проведены опыты по влиянию ц-АМФ на рост *E. coli*, когда источником питания были галактоза, лактоза и глицерин. Обнаружено, что кривые роста бактерий на галактозе и лактозе имеют тот же характер, что и кривая роста на среде, содержащей

глюкозу (рис. 4). Спад роста бактерий наблюдается при концентрации субстрата 15 *мг/мл*. Однако на среде, содержащей глицерин в качестве источника питания, рост *E. coli* был низкий и сохранялся на одном уровне при всех концентрациях глицерина.

Ингибирующий эффект ц-АМФ на рост *E. coli* обнаружен при всех концентрациях галактозы и лактозы и отсутствовал на среде, содержащей глицерин. Ингибирование роста бактерий, растущих на лактозе, составляло в среднем 78%, а на галактозе — 36%. Зависимость ингибирования от концентрации лактозы и галактозы носит примерно тот же характер, что и ингибирование ц-АМФ в среде, содержащей глюкозу. Торможение роста *E. coli* ц-АМФ в присутствии этих источников углерода явно выражено.

Таким образом, ингибирующий эффект ц-АМФ зависит от источника углерода. Эти результаты могут быть интерпретированы в соответствии с тем, что внутриклеточные уровни ц-АМФ в бактериях, растущих на сукцинате, малате или глицерине, т. е. источниках питания, не вызывающих катаболической репрессии, в 10 раз выше, чем в клетках, растущих на глюкозе или пирувате [2, 7, 8]. Если эндогенные уровни ц-АМФ достаточно высоки, то добавление экзогенной ц-АМФ не влияет на скорость роста, и наоборот.

Действие ц-АМФ на рост *E. coli* можно рассматривать как зависимое от его внутриклеточного содержания. Известно, что уровни ц-АМФ снижаются при добавлении трипсина или инсулина, т. е. агентов, которые стимулируют синтез ДНК и рост клеток [14]. Простагландин, ингибирующий рост клеток, повышает уровни ц-АМФ. Тот факт, что вещества, стимулирующие рост клеток, снижают концентрацию ц-АМФ и соединения, повышающие уровни ц-АМФ, ингибируют рост, подтверждает связь эндогенных уровней циклического нуклеотида с регуляцией роста. Регуляция роста за счет изменения внутриклеточных уровней ц-АМФ является примером негормональной регуляции физиологических процессов. Возможными точками приложения действия ц-АМФ могут быть аденилат-циклазная система, синтез ДНК и другие. Но этот вопрос до конца еще не изучен и требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Robinson, E. Sutherland. Cyclic AMP. N. Y., Academic Press, 1971.
2. R. Perlman, I. Pastan. J. Biol. Chem, 1968, 243, 5450.
3. R. Perlman, B. de Crombrugge, I. Pastan. Nature, 1969, 223, 810.
4. A. Ullman, J. Monod. Febs Lett, 1968, 2, 57.
5. T. Grodzicker, R. Arditti, H. Eisen. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 366.
6. E. Wise, S. Alexander, M. Powers. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 471.

7. A. Peterkofsky, C. Gadzar. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 2784.
8. R. Makman, E. Sutherland. J. Biol. Chem., 1965, 240, 1309.
9. D. Grouner, L. Chase, G. D. Aurbach, G. M. Tomkins. Science, 1968, 162, 1018.
10. J. Sheppard. Nature New Biol., 1972, 236, 14.
11. J. Sheppard. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 1316.
12. R. Kurth, H. Bauer. Nature, 1973, 243, 243.
13. C. Peery, G. Johnson, I. Pastan. J. Biol. Chem., 1971, 246, 5785.
14. G. Otten-Johnson, I. Pastan. J. Biol. Chem., 1972, 247, 7082.
15. H. D. Judewicz, E. M. de Robertis, Gr. H. N. Torres. Biochem. Biophys. Res. Communs., 1973, 52, 1257.
16. Сборник методик по генетике микроорганизмов. Под ред. Р. Клауса и У. Хейса. Перевод с англ. М., «Медицина», 1970.
17. А. Б. Райцис, А. О. Устинова. Лабораторное дело, 1965, 1.

Н. А. СОКОЛОВА

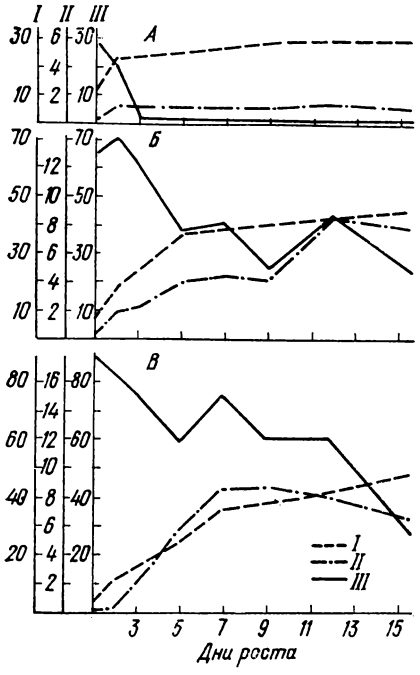
СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РАЗВИТИЯ ПОПУЛЯЦИИ *ESCHERICHIA COLI* М-17 НА АГАРИЗОВАННЫХ ПОЛНЫХ И МИНИМАЛЬНОЙ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

В последнее время повысился интерес исследователей [1—3] к изучению развития бактериальных популяций в плотных питательных средах.

При изучении динамики роста *E. coli* (штамм М-17) на различных питательных средах в нашей либоратории было установлено, что при соблюдении одинаковых условий культивирования размеры колоний и количество клеток в них в определенные сроки развития значительно варьируют. Известно также, что скорость размножения микроорганизмов зависит от ряда неспецифических факторов, таких, как физиологическое состояние микробов, плотность засева, состав питательной среды и др. [4]. Даже небольшие их колебания влияют на динамику развития бактериальных колоний.

Нами проведена серия экспериментов с целью изучения динамики роста бактериальных колоний на мясо-пептонном агаре (МПА), селективной среде Эндо и минимальной синтетической среде М-9.

В первых опытах определяли размеры бактериальных колоний, количество клеток и жизнеспособных особей на 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 16-е сутки роста. Производственный неколициногенный штамм *E. coli* М-17 засевали на агаризованные среды в концентрации, достаточной для получения изолированных колоний, с плотностью не выше 20 на чашку Петри. Выращивание производили при 37° С в течение 16 дней. Для предотвращения высыхания чашки помещались во влажную камеру. Диаметр колоний измеряли окуляр-микрометром в микроскопе МБС-2, затем их вырезали с агаром и суспендировали в 4,5 *мл* физиологического раствора [5]. В каждой полученной из колонии суспензии определяли концентрацию микроорганизмов методом прямого подсчета в камере Горяева и рассчитывали количество клеток в колонии. Для подсчета количества жизнеспособных особей образцы в десятикратном разведении высевали на чашки Петри со средой Эндо. Опыты дублировали. Результаты исследования графически изображены на рисунке.



Динамика развития бактериальных колоний *E.coli* (штамм М-17) на различных питательных средах:

А — МПА; *Б* — среда Эндо; *В* — М-9; I — количество клеток, *млрд*; II — диаметр, *мм*; III — количество жизнеспособных особей, %.

В результате проведенных исследований были выявлены определенные закономерности изменения величины колоний по мере их роста и развития. Появляясь на поверхности среды в виде мелких, иногда едва заметных невооруженным глазом точек, к 16-му дню роста колонии превращались в очень крупные, диаметр которых приближался к 6 *мм* на среде Эндо и до 10 *мм* и более на средах МПА и М-9.

Анализ динамики развития колоний на МПА и М-9 показал, что до 5-го дня размеры увеличиваются соответственно на 1; 1,3; 1,7; 2,4 *мм*, на 7—9-е сутки их диаметр возрастал на 0,4 *мм*, в то время как на среде Эндо отмечена стабилизация роста колоний. Затем интенсивность ежедневного прироста диаметра колоний на МПА и М-9 заметно снизилась. В более поздние сроки при высокой плотности засева колонии, сливаясь с соседними, продолжали увеличиваться. При редком посеве отдельные колонии достигали больших размеров (18—20 *мм*), чего не наблюдалось при росте на среде Эндо.

С ростом размеров колоний соответственно изменялось и количество в них клеток. Обнаружена существенная разница между небольшим количеством клеток и сравнительно быстрым увеличением диаметра колоний в 1—2-е сутки при культивировании на плотных средах. Это особенно заметно при развитии на среде М-9 и менее выражено на полных средах. Учитывая, что «емкость» колоний является производным от ее диаметра и высоты, можно предположить, что на данном этапе микробная популяция растет как бы распластываясь на поверхности среды.

Развитие культуры *E. coli* на среде Эндо характеризуется максимальным подъемом численности популяций на 2-е сутки (6,5 млрд.) и относительно постоянным количеством и процентом жизнеспособных особей в последующие 16 дней. Полученные данные позволяют сделать вывод, что развитие колоний на среде Эндо сдерживается веществами, обусловливающими элек-

тивность среды. На более поздних этапах наблюдения (к 25-м суткам) отмечено появление вторичных колоний, очевидно, мутантных форм, формирующихся в процессе роста в виде сосочков на старой колонии.

При развитии на МПА выраженный подъем численности популяций достигается к 12-му дню. На протяжении данного периода роста наблюдалось постепенное увеличение, сменяющееся затем незначительным снижением общего количества клеток. Из рисунка видно, что кривая, соответствующая проценту жизнеспособных особей, имеет волнообразный характер. Очевидно, максимумы количества живых особей на 7-й и 12-й день развития совпадают с максимумами общего количества клеток (см. рисунок).

Для среды М-9 характерно первоначальное замедление темпов размножения популяций в течение первых двух суток, а затем быстрое увеличение к 7—9-му дням, что совпадает с увеличением процента жизнеспособных особей. На остальных этапах развития колоний отмечается волнообразный характер изменения количества клеток (см. рисунок, *В*).

Полученные нами результаты могут оказаться полезными для изучения гетерогенности бактериальных популяций по анализируемым признакам и при проведении клонально-селекционных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Р. А. Пшеничнов, Н. А. Соколова, А. И. Лебединский. Экология и популяционная генетика микроорганизмов. Труды Института экологии растений и животных УНЦ АН СССР, вып. 98, 1975, с. 35.
2. S. J. Pirt. J. Gen. Mikrobiol., 1967, **47**, 181.
3. В. Браун. Генетика бактерий. М., «Наука», 1968.
4. И. Л. Работнова, И. И. Иванова. Успехи микробиологии, 1971, вып. 7, 67.
5. А. И. Лебединский, Н. А. Соколова, В. П. Шеховцов. Статья в наст. сборнике, стр. 84.
6. I. S. Meritz, E. R. Stanley, C. F. Yeo, D. A. Metcalf. Biometric, 1972, **28**, 3, 801.
7. F. Letellier, I. Reyrolle, J. Kauffman. C.r. Acad. Sci., 1974, **278**, 7, 975.
8. E. G. Afrikan, G. S. Julian, L. A. Bulla. Appl. Microbiol., 1973, **26**, 6, 934.
9. Ph. Boutibonnus. C.r. Acad. Sci., 1974, **278**, 19, 2485.

Р. А. ПШЕНИЧНОВ, В. П. ШЕХОВЦОВ, Г. А. ГАЛЯМИН, В. К. КОРОЛЕВ, А. И. ЛЕБЕДИНСКИЙ

ПРИБОР ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО УПРАВЛЯЕМОГО ВЫРАЩИВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОЛОНИЙ

Разработка методов управления развитием бактериальных популяций является одной из актуальных задач общей и промышленной микробиологии. До сих пор возможности исследователей ограничивались в основном моделированием развития бактериальных популяций в жидких питательных средах. Однако интенсивное развитие микробиологических производств требует замены пробирочного, флаконного, матрацного выращивания бактериальных колоний крупнообъемным и проточным культивированием, стандартизации питательных сред и их компонентов, внедрения синтетических контролируемых сред, селекции промышленных штаммов, оптимизации физико-химических условий культивирования, раскрытия особенностей выращивания бактерий [1, 2]. Было бы неверно утверждать, что культивирование бактерий в жидких средах исчерпало свои возможности, но это не единственное направление для поиска. Перспективно моделирование колониального роста на плотных питательных средах.

Исследования развития бактерий на плотных средах показали универсальность метода применительно к большинству бактериальных видов и одновременно выявили, казалось бы, непреодолимые для непрерывного культивирования ограничения, связанные с быстрой остановкой роста популяции в результате локального истощения питательных компонентов, накопления лимитирующих аутометаболитов и изменения физико-химических параметров среды обитания. Часть этих препятствий может быть преодолена применением пленчатого культивирования бактерий, в основе которого лежит возможность роста бактериальных колоний на полупроницаемых мембранах.

Нами сконструирован прибор (рис. 1) для длительного управляемого роста изолированных бактериальных колоний на пленке при отъемнодоливном и проточном поступлении жидких питательных сред. Предлагаемая установка относится к замкнутым непрерывным системам культивирования с выращиванием микроорганизмов в интерфазе жидкость — газ.

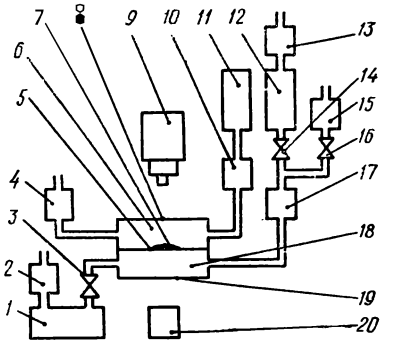


Рис. 1. Принципиальная схема прибора:

1 — приемный сосуд; *2* — выходной фильтр; *3* — спускной кран; *4, 10, 13, 15* — выходные фильтры; *5* — мембрана; *6* — газовая камера; *7* — колония; *8* — верхнее смотровое стекло; *9* — микроскоп, соединенный с фотоаппаратом или кинокамерой; *11* — компрессор; *12* — питающий сосуд; *14* — впускной кран; *16* — выпускной кран; *17* — капельница; *18* — жидкостная камера; *19* — нижнее смотровое стекло; *20* — осветитель.

Основой прибора является замкнутая емкость (бокс разъемного типа), разделенная по горизонтали съемной полупроницаемой мембраной *5*; верхняя и нижняя поверхности бокса ограничены стеклянными стенками *8, 19*. Засевной материал наносится стерильно на поверхность мембраны. Система питания включает емкость *12*, из которой через дозирующее устройство (кран с регулируемым просветом, капельницу или перистальтический насос) питательная среда поступает под мембрану *5* в нижнее отделение бокса *18* и вытекает в приемный сосуд *1*. Это позволяет моделировать как отъемнодоливной, так и проточный тип культивирования. Для создания свободного тока система питания разгерметизирована, ее стерильность поддерживается ватными фильтрами *2, 13, 15* на входе и выходе. Система транспорта кислорода оформлена вторым контуром, последовательно включающим регулируемый микрокомпрессор *11*, стерилизующий фильтр *10*, надмембранную часть камеры *6*, выходное отверстие со стерилизующим фильтром *4*. Система аэрации допускает регулируемую подачу воздуха, газов и определенного состава смесей, т. е. предусматривает аэробное и анаэробное выращивание.

Все системы компактно собраны на стойке и целиком входят как в автоклав, так и в термостат типа ТС-80, что позволяет решить вопрос стерилизации и роста бактерий при избранных температурных режимах. В комплект прибора введен стереоскопический микроскоп МССО с размещением бокса на его столике для наблюдения и документирования развития колоний в проходящем и падающем свете. Применение электрических кинокамер с цейтраферным устройством оригинальной конструкции А. Лебединского и А. Сиротенко[1] дает возможность кинодокументировать рост бактериальной колонии с последующим фотометрированием пленок на аппарате «G-II» производства ГДР [3].

В приборе культивировали клетки производственного штамма *E. coli* М-17 на целлофановой пленке с использованием полной

[1] Удостоверение № 1 от 13 декабря 1974 г., выданное БРИЗом ИЭРиЖ УНЦ АН СССР.

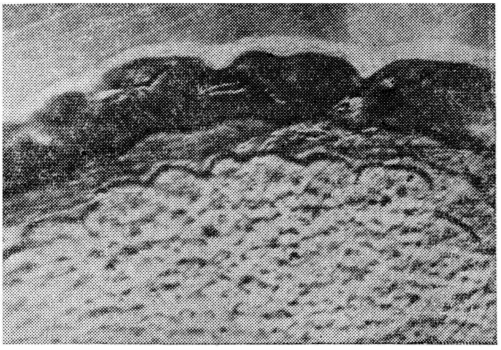


Рис. 2. «Террасовидная» краевая зона колонии *E.coli*.

среды — мясо-пептонного бульона. При засеве единичных клеток на центр мембраны видимая колония формировалась на вторые сутки наблюдения с последующим «террасовидным» периферическим ростом (рис. 2). К 12—15-му дню опыта ее диаметр достигал 7—8 *см* (рис. 3). При рассмотрении колоний удалось выявить краевые участки неравномерного роста с измененной конфигурацией, что, вероятно, свидетельствует о возникновении в составе популяции мутантных вариантов с измененной скоростью роста.

Выраженное влияние скорости обновления среды под мембраной на быстроту роста бактерий открывает возможности управления развитием колониальной популяции таким путем или введением в среду специальных добавок. Есть основания полагать, что описываемый прибор позволит: 1) изучать теоретически неограниченный рост колониальной популяции при регулярном поступлении свежей питательной среды, частичном удалении аутометаболитов и аэрации, т. е. в достаточно оптимальных и стабильных условиях; 2) управлять развитием колониальной популяции за счет количественных и качественных изменений газовой фазы, вводимой питательной среды, внесения добавок, стимулирующих или ограничивающих развитие популяции; 3) проследить процесс формирования гетерогенной колониальной популяции из первоначально однородных кле-

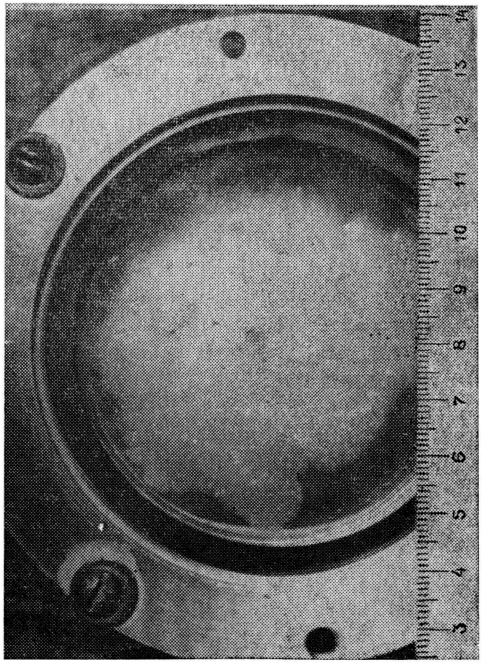


Рис. 3. Колония *E.coli* через 15 дней культивирования в приборе.

ток в обычных условиях и при введении в циркулирующую под мембраной среду мутагенов; 4) изучать тонкие механизмы дифференциации и специализации клеток колонии при оптимальных условиях и селективных воздействиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. D. Herbert. A theoretical analysis of continuous culture systems. Symposium on continuous culture of microorganisms. Ld., 1960, 21.
2. И. Малек, З. Фенцль. Непрерывное культивирование микроорганизмов. М., «Пищевая промышленность», 1968.
3. А. И. Лебединский, Н. А. Соколова, В. П. Шеховцов. Статья в наст. сборнике, стр. 84.

А. И. ЛЕБЕДИНСКИЙ, Н. А. СОКОЛОВА, В. П. ШЕХОВЦОВ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА В КОМПЛЕКСНОМ АНАЛИЗЕ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОЛОНИЙ

Оптическая плотность бактериальной колонии зависит от ряда факторов [1], основными из которых являются видовая принадлежность микроорганизма, возраст популяции и условия культивирования. Стандартизация условий развития культур позволяет получить фотометрическую запись изучаемой структуры, несущую в себе информацию о перечисленных факторах. Накопление фактического материала и его систематизация позволяют провести машинный анализ денситограмм для определения возраста колонии, скорости роста, вида культивируемого микроорганизма, т. е. на качественно новой основе реализовать возможность идентификации бактерий.

Цель настоящей работы — дальнейшая разработка фотометрического метода изучения структурной организации бактериальных колоний в комплексе с классическими приемами микробиологии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бульонную культуру неколициногенного штамма *E. coli* М-17 засевали на чашки с мясо-пептонным агаром в концентрации, рассчитанной на получение изолированных колоний, и инкубировали при 37° С в течение 16 дней. На 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12 и 16-е сутки измеряли диаметр колоний, подсчитывали в них количество клеток, процент жизнеспособных особей. При подсчете количества клеток отдельную колонию вырезали вместе с кусочком агара и в течение одной минуты гомогенизировали в микроизмельчителе РТ-2 в известном объеме физиологического раствора, после чего концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева. Для определения количества жизнеспособных клеток готовили десятикратное разведение образцов и 0,1 *мл* засевали

[1] Р. А. Пшеничнов, Н. А. Соколова, А. И. Лебединский. Популяционная генетика микроорганизмов. Труды Института экологии растений и животных УНЦ АН СССР, Свердловск, вып. 98, 1975, с. 35.

в чашки Петри на среду Эндо. Подсчет выросших колоний проводили через 18—20 *ч* инкубирования при 37° С.

Колонии, растущие на мясо-пептонном агаре, инкубировали под контролем 16-миллиметровых кинокамер, работавших в режиме цейтраферной съемки. Съемку вели в проходящем свете, в одном масштабе. По завершении опыта проявленную кинопленку фотометрировали на цейсовском микрофотометре «G-II» при точечном открытии щели. Ориентация пленки по отношению к направлению движения предметного столика была постоянной. Денситометрические изменения по диаметру фотографического изображения колонии регистрировали графически на ленте потенциометра, входящего в комплект прибора.

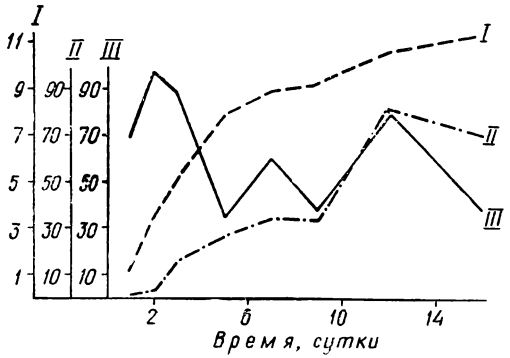


Рис. 1. Динамика развития колонии *E.coli* на плотной питательной среде:

I — диаметр колонии, *мм*; *II* — количество клеток, *млрд*; *III* — количество жизнеспособных особей, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее активный рост колоний наблюдался на 7-е сутки (рис. 1), затем он замедлялся. Размеры колоний отклонялись от среднего значения в первые трое суток на 0,2—0,4 *мм*, в последующие — на 0,6—0,7 *мм*. В конце опыта по достижении среднего размера 11,3 *мм* разброс величин колоний был максимален, что, очевидно, свидетельствует о неоднородности популяции по темпам размножения.

Параллельно увеличению размеров колоний происходило увеличение в них количества микроорганизмов. Если через сутки после засева в колонии насчитывалось 304 млн. особей, то к 12-му дню роста — 81,9 млрд., после чего отмечалось снижение до 70,4 млрд. На 7—9-е сутки наступала стабилизация темпов размножения. Этот период можно охарактеризовать как лаг-фазу между моментом прекращения роста исходного типа клеток и возобновлением роста устойчивых клеток. После лаг-периода общее количество бактерий увеличивалось логарифмически до 9—12-х суток развития, затем снижалось.

Изменения количества жизнеспособных клеток в процентном выражении можно представить в виде кривой, имеющей подъемы на 2-е и 12-е сутки с последующим снижением. Начиная с 4—5-го дня роста колоний общее количество клеток стало больше количества жизнеспособных.

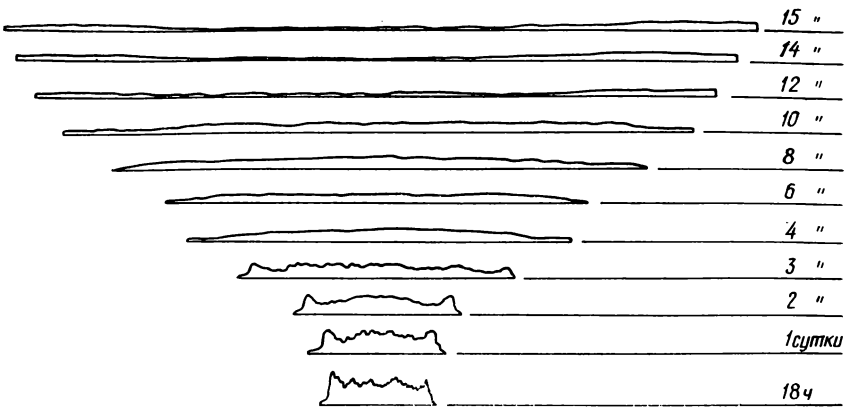


Рис. 2. Денситограммы колонии *E. coli* в различные сроки роста.

Данные фотометрического анализа (рис. 2) свидетельствуют о том, что светопоглощение колоний в различные периоды их развития неодинаково. Запись в проходящем свете позволяет получить кривые, характерные для колоний различного возраста. В ранние сроки высота кривой максимальна, неровности ее центральной части отражают многочисленные перепады плотности колонии. Симметричные повышения оптической плотности наблюдаются и в начале, и в конце записи. Эта форма кривой характерна для периода параллельного увеличения общего количества клеток и жизнеспособных особей. При уменьшении количества жизнеспособных клеток от их общего числа денситограмма колонии уплощается, теряет характерные для периода физиологической активности очертания. Исчезновение центрального подъема кривой объясняется уплощением колонии в результате увеличения ее диаметра, а стирание боковых подъемов — накоплением в среде метаболитов, сдерживающих размножение клеток, в результате чего колония распластывается по поверхности среды.

Таким образом, характер денситограммы колоний отражает особенности их жизнедеятельности. Информационную емкость метода можно расширить путем применения других способов освещения изучаемого объекта, в частности световых волн различных участков спектра.

С. А. ПЕЧЕРКИНА, Г. Н. ЛЮБИМОВА

ГЕТЕРОГЕННОСЬ ПОПУЛЯЦИИ РИККЕТСИЙ ПРОВАЧЕКА И ЕЕ СЕЛЕКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

Генетика и генетические рекомбинации разнообразных видов риккетсий — пока малоизученная область риккетсиологии. В научной литературе встречаются единичные указания о возможном обмене генетическим материалом между риккетсиальными клетками. Так, Прайс и др. [1] наблюдали трансформацию риккетсий Провачека в риккетсии Музера при совместном заражении ими морских свинок. О. С. Гудима [2], изучая структуру риккетсий, обнаружил на электронномикрофотограммах явления, сходные с конъюгацией риккетсий Провачека. Однако мы не встретили других работ, посвященных экспериментальному воспроизведению генетических рекомбинаций у риккетсий. Это объясняется отсутствием клонов риккетсий с определенными и стабильными маркерами. Выделение же маркированных клонов зависит от анализа гетерогенности той или иной популяции риккетсий и возможной селекции таких клонов, свойства которых четко проявлялись бы на разных биологических системах, используемых в экспериментальной риккетсиологии.

Имеется ряд работ, свидетельствующих о пестроте популяций разных видов риккетсий. В. А. Геник [3], используя методику предельных разведений для оценки неоднородности культур риккетсий Бернета, показала, что популяция содержит клетки высокоинфекционные для куриных эмбрионов и малопатогенные для лабораторных животных. При изучении вакцинного штамма *Е* риккетсий Провачека [4,5] обнаружено, что наряду с апатогенными риккетсиями штамм содержит варианты клеток, обладающих стойкой вирулентностью для белых мышей и морских свинок. Указанные варианты риккетсий получены селекционированием субпассажей на маловосприимчивых к риккетсиям Провачека белых мышах. Эксперименты были проведены на беспородных лабораторных животных, а также куриных эмбрионах.

Если оценка гетерогенности популяций любого вида микроба на беспородных живых организмах, обладающих разным генотипом, все-таки возможна, хотя и нежелательна, то селек-

тивный отбор определенных клонов в такой системе весьма затруднителен и может привести к ошибочной характеристике маркеров данного клона. Селективный отбор клона и объективная оценка его качеств возможны лишь тогда, когда клон микроорганизма в процессе последовательных пассажей испытывает всегда одинаковое воздействие или реакцию со стороны макроорганизма, в котором он пассируется и развивается. Такие условия могут быть созданы лишь при работе с чистыми, инбридинговыми линиями животных, куриных эмбрионов или насекомых, обладающих однородным генотипом и фенотипом и, следовательно, оказывающих однотипное влияние на пассируемый микроорганизм.

Приведенная аргументация явилась основанием для постановки серии экспериментов по оценке гетерогенности популяции риккетсий Провачека с последующей селекцией клонов путем заражения так называемых «кроличьих» насекомых на эпидермомембранах по методу А. В. Пшеничнова.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

«Кроличья» раса насекомых, выведенная группой сотрудников ПНИИВС под руководством А. В. Пшеничнова [6], по своему происхождению и биологии является чистой линией насекомых, обладающих необычайно высокой чувствительностью к разным видам риккетсий, а также прекрасной селекционирующей средой, дающей возможность исключить разнообразное влияние переносчика на выбранный клон риккетсий и тем самым достоверно оценить маркеры клона, отобранного из популяции. Мы считаем, что уникальная раса «кроличьих» насекомых в сочетании с методом эпидермомембран А. В. Пшеничнова, зарекомендовавшим себя как самый чувствительный метод индикации риккетсий, еще не получили должной оценки специалистов, которые занимаются генетикой микроорганизмов.

В проведенных нами опытах на чистой линии «кроличьих» насекомых оценку популяции овокультуры риккетсий Провачека осуществляли путем отбора риккетсий со следующими признаками: 1) обусловливающие у зараженных насекомых смертельный риккетсиоз с пятого дня после инфицирования с явлениями гемолитической имбибиции; 2) вызывающие отход вшей с 15-го дня после заражения без гемолитической имбибиции; 3) способные размножаться в кишечниках зараженных насекомых, но не приводящие их к гибели. Кроме того, анализ популяции риккетсий Провачека проводили с позиции селекции из овокультуры клеток, устойчивых к повышенной температуре, ультрафиолетовому облучению и антибиотику — тетрациклину, применяемому в практике лечения заболеваний риккетсиозной этиологии.

В экспериментах использовали овокультуру риккетсий Провачека эталонного штамма Брейнль, восстановленную из лиофильного состояния и вызывающую гибель зараженных куриных эмбрионов на восьмой день, а также способную обильно накапливаться в клетках желточного мешка. Овокультуру суспендировали в физиологическом растворе в соотношении 1:500.

Для выделения вариантов риккетсий, обусловливающих разную патогенетическую картину инфекции насекомых, овокультурой была заражена большая партия личинок насекомых эпидермомембранным методом. Дальнейшее наблюдение вели только над зараженными насекомыми. Не напившиеся крови единичные особи из серии вшей были удалены. Начиная с пятого дня после заражения, в опытной партии тщательно проводили отбор погибших насекомых, имеющих ярко-красную окраску (гемолитическая имбибиция); с 15-го дня отбирали павших насекомых без гемолитической имбибиции и через 22 дня — живых насекомых. Из части отобранных вшей готовили мазки и окрашивали по Романовскому — Гимза. Микроскопический анализ препаратов давал представление о развитии риккетсий в организме зараженных насекомых.

Для обнаружения термоустойчивых вариантов риккетсий исходную овокультуру разделили на три равные порции, которые прогревали в водяной бане при температурах 30, 50 и 70° С в течение 10 *мин.*

Селекцию риккетсий, устойчивых к ультрафиолетовым лучам, осуществляли путем обработки культуры риккетсий Провачека ультрафиолетовыми лучами с длиной волны 255 Å при экспозиции 5 *мин* на расстоянии от источника лучей (лампа БУВ) 40 *см* и толщине слоя обрабатываемой суспензии 2 *мм.*

При отборе антибиотикорезистентных вариантов риккетсий овокультуру соединяли с донорской кровью, делили на три порции, в которые соответственно вводили 150, 15 и 1,5 тыс. ед. тетрациклина на 5 *мл* крови и выдерживали в термостате при 37° в течение 1 *ч.*

После обработки овокультуры риккетсий температурой, ультрафиолетовыми лучами и тетрациклином производили заражение серий «кроличьих» насекомых для изоляции устойчивых к этим факторам риккетсиальных клеток. Контроль за развитием риккетсий в организме опытных насекомых осуществляли микроскопированием окрашенных по Романовскому — Гимза мазков, обнаружением риккетсий и оценкой их морфологии.

На завершающем этапе экспериментов сравнивались биологические свойства селекционированных вариантов риккетсий Провачека. Для этого определяли инфекциозность их для эмбрионов, вирулентность и иммуногенность для морских свинок, токсичность по дермонекротической пробе Жиру на кроликах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные эксперименты показали, что исследуемая овокультура риккетсий Провачека неоднородна. Обнаружены риккетсии, вызывающие гибель 55,8% зараженных насекомых с гемолитической имбибицией и 34% вшей — в поздние сроки без гемолитической имбибиции, а также риккетсии (9,2%), способные размножаться в насекомых, не причиняя им вреда. Выделены термоустойчивые риккетсии, сохраняющие биологическую активность после 10-минутного воздействия температуры 50° и устойчивые к ультрафиолетовому облучению. Эти варианты риккетсий обусловили смертельный риккетсиоз соответственно у 7 и 18% насекомых опытных серий. Что касается антибиотикорезистентных форм риккетсий, то запланированные опыты провести не удалось, так как тетрациклин оказался токсичным для личинок «кроличьих» насекомых.

Сравнительное изучение биологических свойств вариантов риккетсий показало, что типичные признаки, отвечающие эталонному штамму, присущи лишь риккетсиям, которые способны вызвать у насекомых смертельный риккетсиоз с явлениями гемолитической имбибиции. Эти риккетсии инфекциозны для куриных эмбрионов и морских свинок, токсичны для кроликов, индуцируют продукцию антител и стимулируют формирование напряженного постинфекционного иммунитета. У других выделенных вариантов риккетсий обнаружены некоторые особенности. Так, риккетсии, вызывающие гибель насекомых без гемолитической имбибиции и не дающие гибели вшей, не обладают токсичностью. Это свойство риккетсий стабильно, ибо в четырех субпассажах на куриных эмбрионах и в шести серийных пассажах в легких белых мышей токсичность восстановить не удалось.

Риккетсии, устойчивые к ультрафиолетовым лучам, не смогли развиваться в желточном мешке куриного зародыша, причем инфекциозность не реверсировала в условиях трех слепых субпассажей на куриных эмбрионах. Термостабильные риккетсии медленно накапливаются в организме вшей как при первичном заражении, так и в субпассажах, обусловливая гибель насекомых только лишь с 10—12-го дня после инфицирования.

Таким образом, селективный анализ овокультур риккетсий Провачека, проведенный путем наблюдения за инфицированными насекомыми чистой линии, показал гетерогенность данной популяции риккетсий. Популяция состоит преимущественно из высокопатогенных для насекомых риккетсий, которые одновременно инфекциозны и токсичны для других биологических моделей. Меньшая часть популяции представлена клетками, обладающими пониженной патогенностью для вшей и полным отсутствием токсичности для лабораторных животных. Незначительная часть риккетсий в популяции не инфекциозна для куриных

эмбрионов, но устойчива к ультрафиолетовым лучам. Меньше всего термостабильных клеток с пониженным потенциалом развития в переносчике.

Изолированные варианты риккетсий можно оценить как клоны со стабильными свойствами, передающимися потомству, о чем свидетельствует отсутствие реверсии в последовательных серийных пассажах. Выделенные клоны могут быть использованы в опытах по генетическим рекомбинациям у риккетсий Провачека.

ЛИТЕРАТУРА

1. W. H. Price, H. Emerson, H. Nagel, R. Blumberg, S. Taemadge. Amer. J. Hyg., 1958, 67, 154.
2. О. С. Гудима. Вестн. АМН СССР, 1969, 10, 51.
3. В. А. Гениг. Там же, стр. 40.
4. Н. М. Балаева. Там же, стр. 51.
5. Н. М. Балаева, В. Н. Никольская. Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунол., 1970, 8, 36.
6. А. В. Пшеничнов, Е. Г. Носкова. Вопросы вирусологии, 1957, 1, 53.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ 1977

Г. И. СТАРОДУБЦЕВА, В. М. МИНАЕВА

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОПУЛЯЦИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ЛАНДШАФТНО-КЛИМАТИЧЕСКИХ ПОДЗОН ЗАПАДНОГО УРАЛА

В природных условиях сочетания свойств, определяющих степень патогенности вируса, могут быть чрезвычайно многообразными. Треххозяинный тип паразитизма клещей-носителей вирусов открывает широкие возможности изменчивости их симбионтов-вирусов, в частности вируса клещевого энцефалита [1, 2]. По данным Е. Н. Павловского [3], число прокормителей личинок и клещей имаго превышает 190. Учитывая способность клещей к смене прокормителей в зависимости от условий сезона, а также наличие трансовариальной и трансфазовой передачи вируса, можно утверждать, что возможность варьирования экологических условий вируса весьма широка.

Исходя из этих предпосылок, А. В. Пшеничнов [4] первым сформулировал гипотезу о циркуляции в природных очагах штаммов вируса клещевого энцефалита с пониженной вирулентностью.

Сложившееся многообразие форм существования вирусов является причиной мозаичности внутривидовых особенностей и межштаммовых отличий вируса клещевого энцефалита, обусловливающих неоднородность популяции. Внутривидовые особенности вариантов вируса клещевого энцефалита в течение последнего десятилетия изучались многими исследователями. Для характеристики межштаммовых отличий вируса использовались различные маркеры: вирулентность для различных животных, способность вызывать вирусемию и морфологические изменения в тканях животных, величина и характер бляшек под агаровым покрытием, способность вируса к репродукции и степень инактивации при повышенной температуре, антигенные отличия, цитопатические, гемагглютинирующие свойства и др. [5—7].

В настоящей работе сделана попытка описать штаммы вируса клещевого энцефалита, сопоставляя их некоторые биологи-

ческие особенности с ландшафтно-климатической характеристикой очагов. В качестве маркеров при выделении вируса использовались гемагглютинирующие свойства и степень вирулентности для белых мышей; при последующем изучении выделенных штаммов — индекс инвазивности для белых мышей, способность к репродукции при 40 и 45° С (rct_{40} и rct_{45}) и их цитопатическая активность.

Изучалась вирофорность таежных клещей, собранных в двух ландшафтно-климатических подзонах, определяющих эпидемический потенциал области в отношении заболеваемости клещевым энцефалитом (подзона южной тайги и широколиственно-хвойных лесов).

Для выявления вируса в клещах использовали два теста: биопробу на белых мышах и реакцию гемагглютинации. Биопробу проводили по общепринятой методике. Вариант реакции гемагглютинации для индикации вируса непосредственно в клещевой взвеси был методически разработан в вирусологической лаборатории Пермского НИИВС [8, 9]. Способность вируса к репродукции при повышенной температуре определяли по разности титров вируса в тканевых культурах, инкубированных соответственно при 37, 40 и 45° С. Индекс инвазивности представлял собой разность логарифмов $ЛД_{50}$ при внутримозговом и подкожном заражении мышей [10].

Цитопатическую активность вируса определяли по методике Н. Либиковой и И. Вилчека [11].

Вирофорность клещей по данным реакции гемагглютинации (РГА) и биопробы в различных ландшафтно-климатических подзонах была следующей:

	Южная тайга	Широколиственно-хвойные леса
Количество исследованных клещей (партий)	1520(152)	2360(236)
Реакция гемагглютинации РГА		
абсолютное количество	25	38
%	15,8	16,1
Количество клещей, содержавших вирус		
абсолютное количество	17	22
%	11,1	9,3

Зараженность клещей, обитающих в обеих подзонах, была почти одинаковой по использованным тестам. Частота выделения вируса из клещевых взвесей с положительной и отрицательной РГА была следующей:

	Южная тайга	Широколиственно-хвойные леса
Количество партий клещей с положительной РГА	25	38
Из них выделен вирус	4	14

	Южная тайга	Широколиственно-хвойные леса
Частота выделения вируса	1:6,2	1:2,8
Количество партий клещей с отрицательной РГА	127	198
Из них выделен вирус	13	8
Частота выделения вируса	1:11,1	1:24

Соотношение показателей в очагах было различным. Так, в подзоне широколиственно-хвойных лесов вирус достаточно регулярно выделялся из РГА-положительных образцов (1 : 2,8) и крайне редко — при отрицательной РГА (1 : 24). В подзоне южной тайги гемагглютинирующая активность штаммов была менее выраженной, и из РГА-отрицательных образцов вирус выделялся в два раза чаще.

Для изучения биологических особенностей вируса по маркерам rct_{40} и rct_{45} исследовали 27 штаммов. Штаммы rct_{40} выявлялись примерно с одинаковой частотой в очагах обеих подзон и притом достаточно редко. Большинство штаммов активно репродуцировалось и при 45°. Из 27 штаммов только в одном случае вирус не определили в культуральной жидкости тканевой культуры. Это свидетельствует о выраженном преобладании в очагах Пермской области вируса клещевого энцефалита термостабильных вариантов.

По результатам изучения цитопатической активности 29 штаммов можно разделить на три группы: в первой были штаммы, цитопатогенное действие которых на клетки HeLa не удалось выявить. Таких штаммов было семь. Наибольшее количество штаммов (19 из 29), отнесенных ко второй группе, вызывало дегенерацию клеток при относительно низких показателях цитопатической активности (от 2,0 до 3,0 lg $ЦПД_{50}$). Штаммы третьей группы обладали высокой цитопатической активностью (от 3,5 до 5,5 lg $ЦПД_{50}$). В количественном отношении эта группа была наименьшей и насчитывала всего три штамма. Между эпидемическими особенностями ландшафтно-климатических подзон и характеристикой штаммов по цитопатогенному действию какой-либо зависимости выявить не удалось:

	Южная тайга	Широколиственно-хвойные леса
Исследовано штаммов	16	14
Индекс инвазивности		
$<2,0$	14	10
2,0	1	4
3 и выше	1	—

Видно, что штаммы с пониженной периферической активностью несколько чаще выявляются в подзоне широколиственно-хвойных лесов, где из 14 штаммов 5 характеризовались индек-

сом инвазивности более 2,0 lg, тогда как из 16 штаммов зоны южной тайги такой показатель выявлялся только у двух.

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. В зависимости от условий существования в популяциях вируса клещевого энцефалита преобладают варианты с различными биологическими свойствами. Поэтому для индикации вируса в клещах и изучения биологических свойств необходимо применять комплекс методов. Наряду с биопробой может быть рекомендована реакция гемагглютинации как простой, высокочувствительный экспрессный метод, позволяющий судить не только о наличии, но и о некоторых свойствах вируса.

2. Штаммы с выраженной гемагглютинирующей активностью доминировали в очагах подзоны широколиственно-хвойных лесов.

3. В Пермской области превалируют термостабильные варианты вируса клещевого энцефалита с умеренной цитопатической активностью, различными гемагглютинирующими свойствами и низким индексом инвазивности (в пределах 2 lg) для белых мышей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Д. К. Львов, А. Д. Лебедева. Вопросы вирусологии, 1963, 4, 427.
2. С. А. Шилова. Бюлл. МОИП, сер. биол., 1960, 1, 37.
3. Е. Н. Павловский, П. А. Петрищева, В. М. Шеханов, З. М. Жмаева. Природно-очаговые болезни человека. М., 1960, с. 121.
4. А. В. Пшеничнов, В. М. Минаева, Н. И. Подчас, Г. И. Стародубцева. Тезисы докл. конф. по природно-очаговым инфекциям. Тюмень, 1961, с. 80.
5. О. Г. Анджапаридзе, Л. Г. Степанова. Профилактика кори. М., «Наука», 1965, с. 65.
6. В. В. Погодина. Клещевой энцефалит, кемеровская клещевая лихорадка, геморрагическая лихорадка и другие арбовирусные инфекции. М., 1964, с. 31.
7. Г. Д. Засухина, Т. М. Брагина, В. В. Чекова, Т. И. Дживанян. Генетика, 1966, 8, 119.
8. А. В. Пшеничнов, В. М. Минаева, Г. И. Стародубцева, Е. А. Сергеевич, О. А. Кычанова. Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунол., 1967, 8, 116.
9. Г. И. Стародубцева. Использование реакций гемагглютинации для выявления вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах. Автореф. канд. дисс. Пермь, 1967.
10. H. Libikova, D. Stancek. Acta virologika, 1965, 9, 6, 481.
11. H. Libikova, J. Vilcek. Acta virologika, 1960, 4, 3, 165.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ 1977

А. А. ОБОРИН, И. Б. ИВШИНА

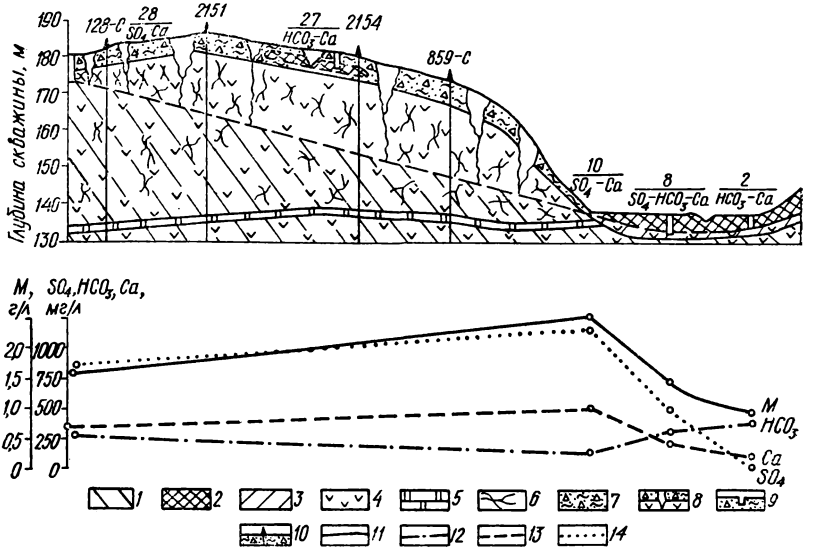
ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ГИДРОХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИОФЛОРЫ ГРУНТОВЫХ ВОД В РАЙОНЕ УФИМСКОГО ПЛАТО

В ходе газобиохимических поисковых работ в районе Уфимского плато были проведены режимные наблюдения за изменением состава водорастворимых газов и микрофлоры под влиянием некоторых гидрохимических факторов.

Опробовано 125 водопунктов, из них 24 родника и 101 колодец. Водопункты были расположены крайне неравномерно, в основном по долинам рек. Исследовался водоносный горизонт трещинно-карстовых вод в гипсовых отложениях кунгурского яруса, местным базисом разгрузки которого являются долины рек Ирени и Кунгура (см. рисунок). Естественные выходы в виде нисходящих источников встречались редко. Колодцами и скважинами этот водоносный горизонт вскрывается на глубине от 3 до 25 *м*. Воды сульфатно-кальциевого типа с минерализацией 1,2—2,3 *г/л*.

Формирование химического состава воды происходит за счет выщелачивания вмещающих пород, что выражается в повышении общей минерализации, содержании ионов $SO_4^{\cdot\cdot}$, $Ca^{\cdot\cdot}$, $K^{\cdot}$, $Na^{\cdot}$ и микрокомпонентов Ba, Sr, Li по направлению миграции вод от водораздела к зонам разгрузки. В речных долинах при смешении трещинно-карстовых вод сульфатно-кальциевого состава с грунтовыми водами аллювиальных отложений гидрокарбонатно-кальциевого типа сформировались воды смешанного сульфатно-гидрокарбонатно-кальциевого и гидрокарбонатно-сульфатно-кальциевого типов. На фоне общего снижения минерализации до 1,8 *г/л* происходило обогащение микрокомпонентного состава вод за счет привноса грунтовыми водами глинисто-коллоидальных частиц, сорбирующих большинство микрокомпонентов: Fe, Mn, Gr, Ni, Cu, Ba, Sr, Li и др. [1].

Отбор проб воды производили на газовый, химический и микробиологический анализы. Интенсивность развития углеводородокисляющей микрофлоры определяли по способу флакон-инъекции, разработанному микробиологической лабораторией ВНИИЯГГ [2].



Схематический гидрохимический профиль:

1 — зона трещинно-карстовых сульфатно-кальциевых вод; *2* — зона сульфатно-гидрокарбонатно-кальциевых вод аллювиально-пролювиальных отложений; *3* — зона гидрокарбонатно-кальциевых вод аллювиальных отложений и верховодки; *4* — гипсы и ангидриты; *5* — доломиты; *6* — трещиноватость; *7* — рыхлообломочные четвертичные отложения; *8* — карстовые воронки; *9* — номер колодца/тип воды; *10* — скважины; *11* — общая минерализация М, *г/л*; *12* — концентрация ионов HCO_3^-, *мг/л*; *13* — концентрация катионов Ca^{++}, *мг/л*; *14* — концентрация сульфат-ионов, *мг/л*.

По данным проведенных исследований, микробный биоценоз грунтовых вод отличается большим разнообразием физиологических групп. В водах исследуемых опорных водопунктов обнаружены с различной степенью интенсивности роста водородобразующие, сульфатредуцирующие и углеводородокисляющие бактерии.

Наблюдения показали, что химический состав грунтовых вод влияет на рост и развитие бактерий. Для группы углеводородокисляющих и водородобразующих бактерий характерно общее снижение интенсивности роста с уменьшением концентрации сульфат-ионов (см. таблицу). Максимальные концентрации метана в водах зоны смешения и аллювиальных отложений объясняются снижением развития метанокисляющих бактерий и главным образом резким повышением бактериальной редукции метана.

Сульфатредуцирующие микроорганизмы, использующие для своего развития уксуснокислый кальций, обнаружены во всех отобранных пробах. Наибольшее увеличение интенсивности роста сульфатвосстанавливающих бактерий наблюдалось в водах сульфатно-гидрокарбонатно-кальциевого типа. По-видимому, при смешении сульфатно-кальциевого состава вод с грун-

Результаты газового и микробиологического анализа грунтовых вод

Тип воды	Состав газа, $n \cdot 10^4$ $см^3/кг$					
	CH_4	C_2H_6	C_2H_4	C_3H_8	C_3H_6	$C_4H_8+C_5H_{10}$
Сульфатно-кальциевый	32,73	0,17	0,41	0,21	0,73	0,48
Сульфатно-гидрокарбонатно-кальциевый	56,53	0,00	0,09	0,11	0,02	0,11
Гидрокарбонатно-кальциевый	31,12	0,07	0,18	0,23	0,10	0,37

Тип воды	Интенсивность развития бактерий, ед. опт. плотн.			Интенсивность развития бактерий, усл. ед.		
	Метанокисляющие	Этанокисляющие	Пропанокисляющие	Водородобразующие	Метанобразующие	Сульфатредуцирующие
Сульфатно-кальциевый	0,024	0,09	0,161	15,0	2,0	1,5
Сульфатно-гидрокарбонатно-кальциевый	0,014	0,08	0,068	5,0	12,0	18,0
Гидрокарбонатно-кальциевый	0,012	0,00	0,034	2,5	10,0	2,0

товыми водами аллювиальных отложений гидрокарбонатно-кальциевого типа повышается их активная аэрация.

Пониженные концентрации тяжелых углеводородных газов в водах смешанного типа объясняются способностью сульфатредуцирующих бактерий в процессе жизнедеятельности использовать в качестве источника углерода предельные и непредельные углеводороды (метан, пропан, бутан).

Таким образом, выявленные зависимости следует учитывать для правильной оценки поисковой значимости углеводородокисляющих бактерий при проведении газобиохимической съемки по водоисточникам различных гидрохимических типов.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. Н. Шестов. Нижнепермские отложения Камского Предуралья. Труды ВНИГРИ. Пермь, вып. 118, 1973, с. 317.

2. Основы прямых геохимических методов поисков нефтяных и газовых месторождений. (Временное методическое наставление.) Под ред. Ф. А. Алексеева. М., ОНТИ ВНИИЯГГ, 1967.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ 1977

А. И. КОРОТЯЕВ, Т. П. КРОЛИЧЕНКО

ОБЪЕМ ГЕНОМА И ДЕЙСТВИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДНК У КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ

Геном бактериальной клетки представлен гаплоидной хромосомой и экстрахромосомными элементами — плазмидами, которые в отличие от хромосомы не являются жизненно необходимыми и поэтому присутствуют в клетке непостоянно. Объем генома *E. coli*, определенный разными методами, составляет $2{,}8 \cdot 10^9$ *дальтон* [1], или 4,4—$4{,}6 \cdot {}^{-15}$ *г* [2, 3].

Особенности репликации и последующей сегрегации ДНК позволяют предположить, что количество ДНК в клетках размножающихся бактерий не может быть постоянным и должно удваиваться в определенные моменты клеточного цикла, т. е. перед делением клетка должна иметь две хромосомы. По литературным данным, содержание ДНК у бактерий может варьировать в значительных пределах и нередко по весу соответствует более чем двум хромосомам. Это относится в первую очередь к быстро размножающимся культурам, у которых наблюдается несколько вилок репликации ДНК [2, 3]. Однако ряд авторов [4, 5] оспаривает возможность изменения содержания ДНК в клетках в процессе сбалансированного роста культуры и считает, что ее содержание в клетках бактерий постоянно.

В работе [6] было показано, что у некоторых штаммов *E. coli* содержание ДНК, определяемое методом фракционирования нуклеиновых кислот Шмидта — Таннхаузера [7], в процессе роста не только не увеличивается, но, наоборот, значительно снижается, достигая $0{,}6 \cdot 10^{-15}$ *г* ДНК на клетку. Поскольку вес индивидуальной гаплоидной хромосомы *E. coli* составляет $4{,}5 \cdot 10^{-15}$ *г*, маловероятно, чтобы клетки содержали только часть генома, и подобные результаты, скорее всего, могли быть обусловлены ошибкой метода. В связи с этим метод фракционирования нуклеиновых кислот Шмидта — Таннхаузера был подвергнут нами детальному анализу для исключения ошибок и выявления его недостатков.

Проведенные исследования показали, что при использовании этого метода значительная часть клеточной ДНК бактерий (33—90%) в силу каких-то обстоятельств подвергается щелочному гидролизу и обнаруживается во фракции РНК (щелоче-

лабильная фракция ДНК). Изменение условий щелочного гидролиза (концентрации щелочи и продолжительности гидролиза) на содержание щелочелабильной фракции ДНК существенно не влияет. Это свидетельствует о том, что содержание щелочелабильной фракции и природа щелочелабильности связаны с какими-то особенностями строения бактериальной ДНК, а не являются следствием режима гидролиза.

Нами предложена модификация метода фракционирования нуклеиновых кислот Шмидта — Таннхаузера для бактерий, основанная на осаждении этанолом щелочелабильной фракции ДНК из фракции РНК. Модифицированный метод позволяет выделять и учитывать почти всю (более 90%) клеточную ДНК бактерий вместо 10—67% при использовании оригинального метода.

Существующие противоречия относительно динамики содержания ДНК у бактерий, возможно, являются следствием того, что для определения ее количества используют оригинальный метод Шмидта — Таннхаузера. В связи с этим нами с помощью модифицированного метода фракционирования нуклеиновых кислот Шмидта — Таннхаузера изучено содержание ДНК у четырех штаммов *E. coli* на различных стадиях роста и в разных условиях культивирования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовались следующие штаммы кишечной палочки *E. coli:* M; 0-111; B и K 12S met⁻. Для культивирования бактерий применялась глюкозо-минеральная среда М-9 и L-бульон. Клетки инкубировали при 37° С в ультратермостате, пробы отбирали через различные промежутки времени, число клеток в пробе подсчитывали в камере Горяева. Клетки отмывали физиологическим раствором NaCl от питательной среды с помощью центрифугирования при 3000 *об/мин* в течение 15 *мин* и проводили фракционирование нуклеиновых кислот по модифицированному методу Шмидта — Таннхаузера.

Сначала с помощью оригинального метода получали две фракции нуклеиновых кислот: ДНК и РНК, а затем фракцию РНК делили на две части. Одну из них использовали для осаждения и количественного определения щелочелабильной фракции ДНК, а другую — для количественного определения РНК. Щелочестабильную фракцию ДНК и ту часть, которую предназначали для количественного определения РНК, подвергали кислотному гидролизу в 6%-ной хлорной кислоте на водяной бане и в каждой из фракций спектрофотометрически по методу А. С. Спирина [8] измеряли содержание соответствующей нуклеиновой кислоты на спектрофотометре СФ-16.

Оставшуюся часть фракции РНК нейтрализовали NaOH и добавляли к этой пробе 96%-ный этанол из расчета на один

объем фракции два объема этанола. После этого пробу выдерживали в течение 1 *ч* при —8° С. Затем центрифугировали при 7000 *об/мин* в течение 1 *ч*, надосадочную жидкость отбрасывали, осадок, представляющий собой щелочелабильную фракцию ДНК, ресуспендировали в 6%-ной хлорной кислоте, гидролизовали на кипящей водяной бане в течение 20 *мин* и в гидролизате спектрофотометрическим методом определяли содержание ДНК.

Общее количество ДНК в клетке рассчитывали путем суммирования ДНК щелочелабильной и ДНК щелочестабильной фракций.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали, что содержание ДНК в клетках бактерий в период роста на одной и той же питательной среде значительно колеблется и может достигать количеств, достаточных для формирования 2—3—5—8 хромосом. Однако определенной зависимости содержания ДНК от фазы роста культуры выявить, как правило, не удается. Клетки стационарной фазы характеризуются более постоянным содержанием ДНК, чем клетки лаг-фазы и экспоненциальной фазы роста.

В то же время результаты систематического изучения содержания ДНК свидетельствуют о том, что оно существенным образом зависит от условий культивирования. Клетки, культивируемые на разных питательных средах, резко отличаются по содержанию ДНК (см. таблицу). На глюкозо-минеральной среде М-9, где клетки имеют время генерации в среднем 60 *мин*, содержание ДНК у них составляет $6{,}4—12{,}3 \cdot 10^{-15}$ *г* на клетку, что соответствует 1,4—2,7 хромосомы. В отличие от этого на обогащенной среде (L-бульоне) время генерации сокращается до 20 *мин*, а содержание ДНК в клетках варьирует от $10{,}0 \cdot 10^{-15}$ *г* до $35{,}3 \cdot 10^{-15}$ *г*, или от 2 до 8 хромосом.

Таким образом, культивирование в условиях обогащенной среды приводит к резкому возрастанию содержания ДНК. Количество хромосом в бактериальной клетке при этом может достигать 7—8, т. е. содержание ДНК у бактерий является функцией условий роста. При благоприятных для роста условиях клетка накапливает сверхизбыточное количество ДНК, соответствующее по весу нескольким гаплоидным геномам (полигеномность или полиплоидность).

Вместе с тем на обогащенной среде клеточный цикл у *E. coli* осуществляется за 20 *мин*, т. е. в три раза быстрее, чем в условиях минимальной среды. Это свидетельствует о том, что на L-бульоне происходит интенсификация всех клеточных процессов, позволяющая удвоить биомассу клетки за более короткий срок, чем на среде М-9. Ранее проведенными исследованиями было показано, что содержание рибосом у бактерий являет-

Содержание ДНК в клетках кишечной палочки на разных стадиях и в различных условиях роста, $n \cdot 10^{-15}$ г

Штамм *E. coli*	Среда культивирования	Возраст культуры, *мин*					
		0	40	60	100	120	1200
M	M-9	10,5	—	8,0	—	9,5	8,9
		7,1	—	8,1	—	8,0	9,4
	L-бульон	13,3	20,3	15,8	10,2	—	—
		11,1	13,6	16,8	10,8	—	—
0-111	M-9	8,0	—	9,6	—	8,4	8,1
		8,2	—	9,1	—	6,4	8,1
	L-бульон	15,0	22,3	13,4	10,0	—	—
		10,0	17,5	13,3	10,9	—	—
K12 S	M-9	10,0	—	8,1	—	6,6	8,1
		12,3	—	9,9	—	7,3	8,3
	L-бульон	18,6	25,6	22,6	19,6	—	—
		11,3	18,5	25,6	19,2	—	—
B	M-9	7,1	—	7,6	—	10,2	10,2
	L-бульон	16,8	31,0	24,4	27,9	—	—
		20,6	33,3	35,3	29,2	—	—
		15,4	19,5	14,4	18,3	—	—

ся функцией условий их роста [9], а выражение бактериального генома носит равновероятностный в отношении оперонов характер [10]. Была доказана также возможность одновременной транскрипции нескольких (всех) имеющихся в клетке хромосом [11].

Все эти выявленные закономерности позволяют объяснить возможное значение накопления при благоприятных условиях роста нескольких копий хромосом. Наличие в бактериальной клетке нескольких хромосом позволяет ей регулировать продолжительность клеточного цикла путем более ускоренной мобилизации содержащейся в них информации за счет одновременной транскрипции, протекающей по типу равновероятностного в отношении оперонов характера выражения бактериального генома. Следовательно, способность бактерий накапливать несколько копий генома (полигеномность) является необходимым условием для сокращения времени генерации при благоприятных условиях роста. 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).

Таким образом, содержание ДНК у *E. coli*, гаплоидная хромосома которой имеет вес около $4{,}5 \cdot 10^{-15}$ г, при росте на одной и той же питательной среде сильно варьирует, отражая интенсивность процессов репликации. Общее содержание ДНК в клетках является функцией условий роста. При благоприят-

ных условиях роста клетка накапливает сверхизбыточное количество ДНК, соответствующее по весу нескольким гаплоидным геномам, что имеет определенное биологическое значение.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. Cairns. J. Mol. Biol., 1963, 6, 208.
2. А. И. Коротяев, В. Ф. Максимов, И. Н. Ширяева. Микробиология, 1968, **37**, 3, 395.
3. K. G. Lark. Bacteriol. Rev., 1966, **30**, 1, 3.
4. Г. Д. Бердышев. Изв. Сибирского отделения АН СССР, серия биол. мед. наук, 1964, вып. 3, 12, 151.
5. И. А. Хмель, Н. Б. Андреева. Микробиология, 1967, **36**, 3, 438.
6. Л. Г. Рыбкина, Р. В. Анохина. Управляемый биосинтез и биофизика популяций. Красноярск, 1969, с. 281.
7. G. Schmidt, S. J. Thannhauser. J. Biol. Chem., 1945, **161**, 1, 83.
8. А. С. Спирин. Биохимия, 1958, **23**, 5, 656.
9. А. И. Коротяев, В. Ф. Максимов, И. Н. Ширяева. Докл. АН СССР, 1968, **178**, 6, 410.
10. А. И. Коротяев. Управляемый биосинтез и биофизика популяций. Красноярск, 1969, с. 302.
11. А. И. Коротяев, В. Ф. Максимов, В. Г. Орлов. Докл. АН СССР, 1970, **194**, 1433.

СОДЕРЖАНИЕ

Р. А. Пшеничнов, В. М. Колотов, С. Я. Барихин, А. Г. Ткаченко. Реализация принципа обратных связей в системе аутометаболической регуляции роста клонов внутривидовых популяций *Escherichia coli* . . . 3

Р. А. Пшеничнов, А. Г. Ткаченко. Природа и направленность внутрипопуляционных сдвигов в бактериальных культурах как отражение меняющихся условий среды обитания 10

А. И. Коротяев, О. А. Зенцова. Содержание и эффективность работы рибосом и штаммов *Escherichia coli* различающихся по аминокислотному контролю синтеза РНК, при изменении скорости роста 6

Н. С. Чурилова, В. П. Коробов. Динамика люминесценции дыхательных ферментов на разных фазах развития популяции *Escherichia coli* 21

В. П. Коробов, Б. М. Лемкин. Активность оксидаз дыхательной цепи при изменении условий развития популяции *Escherichia coli* М-17 28

Г. А. Угодчиков. Математическая модель динамики роста биомассы фагов 34

А. М. Босенко, В. С. Лобунов, В. М. Аношин, Л. В. Петроченко. Метаболиты в среде обитания непрерывной культуры аспорогенных дрожжей *Candida scottii* 39

А. И. Лебединский, Л. Е. Глазачева, А. Г. Ткаченко. Морфологические аспекты действия фактора, стимулирующего рост микробной популяции 48

О. Д. Верхоланцева. О принципиальной возможности реутилизации питательных сред с позиций аутометаболической регуляции развития 52

К. Я. Соколова, И. Н. Блохина, А. В. Паничев. О критериях оценки микробиоценозов кишечника в норме и патологии 57

В. М. Калюжная, А. А. Шестакова, Н. С. Чурилова, В. П. Коробов. О возможности гормонального воздействия на развитие микробных популяций 63

М. М. Дедюкина, С. Я. Барихин. Ингибирующий эффект циклического АМФ на рост *Escherichia coli* . . . 70

Н. А. Соколова. Сравнительное изучение развития популяции *Escherichia coli* М-17 на агаризованных полных и минимальной питательных средах 77

Р. А. Пшеничнов, В. П. Шеховцов, Г. А. Галямин, В. К. Королев, А. И. Лебединский. Прибор для длительного управляемого выращивания бактериальных колоний 80

А. И. Лебединский, Н. А. Соколова, В. П. Шеховцов. Использование фотометрического метода в комплексном анализе развития бактериальных колоний . . 84

С. А. Печеркина, Г. Н. Любимова. Гетерогенность популяции риккетсий Провачека и ее селекционный анализ 87

Г. И. Стародубцева, В. М. Минаева. Некоторые особенности биологических свойств популяции вируса клещевого энцефалита в природных очагах ландшафтно-климатических подзон Западного Урала 92

А. А. Оборин, И. Б. Ившина. Влияние некоторых гидрохимических факторов на рост и размножение бактериофлоры грунтовых вод в районе Уфимского плато . . 96

А. И. Коротяев, Т. П. Кроличенко. Объем генома и действительное содержание ДНК у кишечной палочки . 99

УДК 576.809.5

Реализация принципа обратных связей в системе аутометаболической регуляции роста клонов внутривидовых популяций *E. coli*. Пшеничнов Р. А., Колотов В. М., Барихин С. Я., Ткаченко А. Г. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Исследован рост 153 клонов штамма М-17 *E. coli*. Установлена высокая степень гетерогенности популяций по темпам репликации ее сочленов в минимальной среде М-9, а также четко выраженная закономерность между темпами репликации клонов и влиянием регулирующих рост аутометаболитов.

Выявлена обратная зависимость между исходной скоростью репликации клонов и экскрецией ими в среду обитания видоспецифических аутометаболитов, регуляторов роста. Делается вывод, что популяция микроорганизмов стремится к сохранению гетерогенности составляющих ее особей за счет предполагаемой аутометаболической регуляции ее развития.

Таблиц 3. Библиогр. 6 назв.

УДК 576.809.5

Природа и направленность внутрипопуляционных сдвигов в бактериальных культурах как отражение меняющихся условий среды обитания. Пшеничнов Р. А., Ткаченко А. Г. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Описаны два различных пути достижения культурами максимальной численности при развитии больших и малых доз инокулята в минимальной некоррегируемой среде М-9.

Таблиц 2. Илл. 1. Библиогр. 11 назв.

УДК 576.851 : 48

Содержание и эффективность работы рибосом у штаммов *Escherichia coli*, различающихся по аминокислотному контролю синтеза РНК, при изменении скорости роста. Коротяев А. И., Зенцова О. А. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Проведено исследование содержания рибосом, соотношения тотальный белок/РНК и эффективности биосинтеза рибосомами белка у *E. coli* CP78 rel$^+$ и CP79 rel$^-$ при различных скоростях сбалансированного роста, а также при «shift-up». Показано, что мутация в rel-гене, не нарушая регуляции содержания рибосом в клетке, приводит к изменениям в механизме работы рибосомального аппарата, проявляющимся в том, что «сдвиг вверх» у rel$^-$-штамма при неизменном отношении тотальный белок/РНК значительно изменяет эффективность работы рибосом.

Таблиц 3. Библиогр. 8 назв.

УДК 576.809.5 : 577.158

Динамика люминесценции дыхательных ферментов на разных фазах развития популяции *Escherichia coli*. Чурилова Н. С., Коробов В. П. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Изучена динамика люминесценции дыхательных ферментов, отражающая их содержание в популяции *E. coli* на разных фазах развития в условиях полноценной (МПБ) и минимальной синтетической среды М-9. Отмечено изменение характера люминесцен-

ции клеток на разных фазах развития микробной популяции в зависимости от среды культивирования. Установлено, что наибольшее количество центров окислительной активности отмечается в период подготовки клеток к делению и на фазе экспоненциального развития.

Таблиц 2. Илл. 2. Библиогр. 22 назв.

УДК 576.809.52

Активность оксидаз дыхательной цепи при изменении условий развития *Escherichia coli* М-17. Коробов В. П., Лемкин Б. М. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Проведено исследование активности α-глицерофосфат-, НАДН, α-кетоглутарат-, пируват-, малат-, лактат- и сукцинатоксидазы на среде МПБ и минимальной глюкозной среде М-9 на разных фазах развития. Дана характеристика интенсивности функционирования отдельных участков конечного окисления с выявлением наиболее активного на данном этапе пути извлечения энергии. Выявлена наибольшая активность α-глицерофосфатоксидазы и сукцинатоксидазы при росте *E. coli* на МПБ и пируватоксидазы, малатоксидазы, сукцинатоксидазы, лактатоксидазы на среде М-9 в логарифмической фазе. Отмечен фазовый переход активности исследованных ферментов.

Таблиц 2. Илл. 1. Библиогр. 19 назв.

УДК 517.51 : 576.809.54

Математическая модель динамики роста биомассы фагов. Угодчиков Г. А. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Приведена методология построения математической модели динамики роста биомассы фагов, которая построена на базе молекулярных механизмов синтеза белка и РНК. Осуществлен теоретический анализ математической модели на ЭЦВМ М-222 для случая одноразового (периодического) культивирования бактерий совместно с фагами. Показано качественное совпадение теоретических результатов с экспериментальными данными.

Илл. 4. Библиогр. 2 назв.

УДК 576.809.53

Метаболиты в среде обитания непрерывной культуры аспорогенных дрожжей *Candida scottii*. Босенко А. М., Лобунов В. С., Аношин В. М., Петроченко Л. В. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Исследовано влияние источников углеродного питания (глюкозы, ксилозы, смеси глюкозы с ксилозой и древесного гидролизата) на выделение и накопление в культуральной жидкости нелетучих органических кислот, свободных аминокислот и некоторых легколетучих соединений дрожжеподобными грибами *Candida scottii* расы Тулунская-6.

Приведены данные по содержанию в культуральной жидкости молочной, яблочной, лимонной, α-кетоглутаровой, щавелевоуксусной, янтарной, фумаровой кислот и 18 свободных аминокислот. Описан способ выделения органических кислот с помощью ионообменных смол и определения их методом газо-жидкостной хроматографии.

Таблиц 4. Илл. 1. Библиогр. 36 назв.

УДК 576.809.4 : 576.809.51

Морфологические аспекты действия фактора, стимулирующего рост микробной популяции. Лебединский А. И., Глазачева Л. Е., Ткаченко А. Г. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Рассмотрено поведение популяции в условиях метаболической регуляции ее развития на примере *E. coli*, исходя из факта осуществления фильтратом микробной культуры стимулирующего эффекта. Изучено субмикроскопическое строение контрольной и опытной культур. Установлено, что действие фильтрата, содержащего комплекс стимулирующих факторов, выражается в изменении физиологического состояния популяции.

Илл. 2. Библиогр. 7 назв.

УДК 576.809.33

О принципиальной возможности реутилизации питательных сред с позиций аутометаболической регуляции развития. Верхоланцева О. Д. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

На примере четырех штаммов лактобактерий и производственного штамма *E. coli* М-17, прерывисто культивируемых на жидких оптимальных питательных средах (капустная, МРС-1, кишечная палочка — дополнительно на казеиновом бульоне), изучена роль специфических аутометаболитов, накапливающихся в среде на различных этапах роста, с позиции возможной реутилизации питательных сред. Проведена сравнительная оценка развития изо- и гетерологичных штаммов бактерий, для которых была установлена принципиальная пригодность повторного использования сред. Предполагается возможность стандартизации сред по питательным компонентам.

Таблиц 2. Библиогр. 5 назв.

УДК 576.809.5

О критериях оценки микробиоценозов кишечника в норме и патологии. Соколова К. Я., Блохина И. Н., Паничев А. В. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Предложен метод сопоставления микрофлоры кишечника по вычисленным с помощью ЭЦВМ показателям подобия для более объективной оценки характера микробиоценозов. Расчеты основаны на разработанных 32 тестах, отражающих количественные соотношения различных облигатных представителей микрофлоры, наличие и сочетания условно-патогенных микроорганизмов. С помощью предложенной методики определен наиболее типичный состав микрофлоры кишечника здоровых детей, принятый в качестве эталона сравнения.

Библиогр. 20 назв.

УДК 576.809.518

О возможности гормонального воздействия на развитие микробных популяций. Калюжная В. М., Шестакова А. А., Чурилова Н. С., Коробов В. П. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Проведено исследование влияния гормонов инсулина и тироксина на развитие культуры *E. coli* М-17 на МПБ и синтетической

среде М-9. Показана зависимость времени скрытого развития, скорости роста и выхода биомассы от состава среды и концентрации гормонов. Изучена морфология бактериальных клеток по стадиям развития культуры на синтетической среде с глюкозой и при воздействии на культуру тироксина и инсулина.

Таблиц 2. Илл. 4. Библиогр. 19 назв.

УДК 576.809.518

Ингибирующий эффект циклического АМФ на рост *Escherichia coli*. Дедюкина М. М., Барихин С. Я. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Обнаружен ингибирующий эффект ц-АМФ на рост *E. coli*. Действие циклического нуклеотида специфично и не связано с гликолитическим превращением глюкозы. Эффект ц-АМФ связан с источником питания и проявляется при наличии в среде культивирования глюкозы, галактозы и лактозы, но отсутствует при наличии глицерина.

Илл. 4. Библиогр. 17 назв.

УДК 576.809.33

Сравнительное изучение развития популяции *Escherichia coli* **М-17 на агаризованных полных и минимальной питательных средах.** Соколова Н. А. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Представлены результаты изучения развития популяций *E. coli* М-17 на агаризованных полных (мясо-пептонном агаре, селективной среде Эндо), а также минимальной синтетической среде М-9. Выявлены определенные фазовые закономерности изменения величины колоний по мере их роста и развития. Описаны значительные различия темпов роста и размножения колоний в разных средах. Кривая, соответствующая проценту жизнеспособных особей, имеет волнообразный характер, максимумы количества живых особей совпадают с максимумами общего количества клеток.

Полученные данные уточняют и детализируют наши представления об особенностях развития бактериальных колоний на разных питательных средах. Предложенные тесты могут оказаться полезными для изучения гетерогенности бактериальных популяций по анализируемым признакам и при проведении клонально-селекционных исследований.

Илл. 1. Библиогр. 9 назв.

УДК 57А+57(078)

Прибор для длительного управляемого выращивания бактериальных колоний. Пшеничнов Р. А., Шеховцов В. П., Галямин Г. А., Королев В. К., Лебединский А. И. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Предлагается прибор для длительного управляемого выращивания изолированных бактериальных колоний на полупроницаемой пленке. В основу конструкции прибора положены принципы отъемнодоливного и проточного поступления питательных сред. Управление ростом колонии осуществляется регуляцией состава газовой среды или введением в питательную среду веществ направленного действия.

Илл. 3. Библиогр. 3 назв.

УДК 57А+57(078)

Использование фотометрического метода в комплексном анализе развития бактериальных колоний. Лебединский А. И., Соколова Н. А., Шеховцов В. П. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Произведена цейтраферная киносъемка развивающейся колонии *E. coli*. Фотографическое изображение колонии подвергнуто фотометрическому анализу. Параллельно производились измерения колоний, подсчет количества микроорганизмов и определение процента жизнеспособных особей. Результаты фотометрического анализа соответствуют данным, полученным общепринятыми методиками.

Илл. 2. Библиогр. 1 назв.

УДК 576.851.71

Гетерогенность популяции риккетсий Провачека и ее селекционный анализ. Печеркина С. А., Любимова Г. Н. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Представлены результаты изучения гетерогенности яичной культуры риккетсий Провачека (штамм Брейнль) и селекции некоторых клонов путем последовательных пассажей риккетсий на инбридинговой линии «кроличьих» насекомых. Получено несколько клонов риккетсий со следующими маркерами: 1) высоковирулентные для вшей, обусловливающие раннюю гибель насекомых с явлениями гемолитической имбибиции, и инфекционные для морских свинок, белых мышей и куриных эмбрионов; 2) обладающие пониженной вирулентностью для вшей (вызывают гибель переносчика в поздние сроки без гемолитической имбибиции) и нетоксичные для лабораторных животных; 3) устойчивые к УФ лучам и неинфекциозные для куриных эмбрионов; 4) термоустойчивые риккетсии с пониженным потенциалом развития в переносчике.

Библиогр. 6 назв.

УДК 576.858.25

Некоторые особенности биологических свойств популяции вируса клещевого энцефалита в природных очагах различных ландшафтно-климатических подзон Западного Урала. Стародубцева Г. И., Минаева В. М. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Сделана попытка получить характеристику штаммов вируса клещевого энцефалита, сопоставляя их некоторые биологические особенности с ландшафтно-климатической характеристикой очагов. Для выявления вируса в клещах использовано два метода: биопроба на белых мышах и реакция гемагглютинации. У выделенных штаммов изучены следующие биологические свойства: индекс инвазивности для белых мышей, способность к репродукции при повышенных температурах, цитопатическая активность. Установлено, что штаммы вируса клещевого энцефалита с выраженной гемагглютинирующей активностью преобладали в очагах подзоны широколиственно-хвойных лесов.

Библиогр. 11 назв.

УДК 577.472

Влияние некоторых гидрохимических факторов на рост и размножение бактериофлоры грунтовых вод в районе Уфимского плато. Оборин А. А., Ившина И. Б. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Исследовано влияние некоторых гидрохимических факторов на изменение состава водорастворенных газов и бактериофлоры грунтовых вод в районе Уфимского плато.

Таблиц 1. Илл. 1. Библиогр. 2 назв.

УДК 576.851 : 48

Объем генома и действительное содержание ДНК у кишечной палочки. Коротяев А. И., Кроличенко Т. П. «Механизмы регуляции развития бактериальных популяций». Свердловск, 1977 (УНЦ АН СССР).

Показано, что действительное содержание ДНК в клетках кишечной палочки, объем генома которой составляет в среднем $4{,}5 \cdot 10^{-15}$ *г*, при росте на одной и той же питательной среде сильно варьирует, отражая интенсивность процессов репликации ДНК. Общее содержание ДНК в клетках *E. coli* является функцией условий роста, и при благоприятных условиях роста клетка накапливает сверхизбыточное количество ДНК, соответствующее по весу нескольким (3—5—8) гаплоидным геномам. Высказано предположение, что биологический смысл сверхизбыточного накопления ДНК состоит в создании необходимых предпосылок для сокращения времени генерации при культивировании в условиях обогащенной среды.

Таблиц 1. Библиогр. 11 назв.

МЕХАНИЗМЫ
РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Труды Института экологии растений и животных, вып. 104

Утверждено к печати
Редакционно-издательским советом
Уральского научного центра АН СССР

Редакторы **К. И. Ушакова, Н. И. Гладких**
Обложка художника **М. Н. Гарипова**
Техн. редактор **Н. Р. Рабинович**
Корректоры **Г. Н. Лобаченко, В. Б. Белоусова**

РИСО УНЦ № 729/815—21(77). Сдано в набор 20/V 1976 г. НС 12003. Подписано к печати 5/I 1977 г. Формат $60\times90^{1}/_{16}$. Усл.-печ. л. 7. Уч.-изд. л. 8,8. Тираж 1000. Заказ 335. Цена 88 к.

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