МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК.579.253+579.812.11

**ЗНАЧЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИИ БАКТЕРИЙ,
СОЗДАВАЕМОЙ ПРОЦЕССОМ ДИССОЦИАЦИИ, ДЛЯ РОСТА ПУРПУРНЫХ
ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ЕСТЕСТВЕННЫХ
МЕСТАХ ИХ ОБИТАНИЯ****Е.С. Милько^{1,*}, Е.Н. Красильникова¹, Д.М. Милько²**

¹ Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

² Институт географии, РАН; Россия, 119017, г. Москва, Старомонетный переулок, д. 29

*e-mail: esmilko@mail.ru

Впервые из популяции пурпурной фотосинтезирующей бактерии *Rhodobacter capsulatus* получены R- и M-диссоцианты, изучен их рост при разных условиях освещенности и аэрации. Аналогичные опыты ранее проводили с R- и M-диссоциантами *Rhb. sphaeroides*. Физиолого-биохимические различия близких видов бактерий коррелируют с особенностями их естественных мест обитания: *Rhb. sphaeroides*, выделенный из почвы, обладает низкой скоростью роста и способностью его M-диссоцианта расти в аэробных условиях в темноте, что дает этому виду преимущества при обитании в ограниченном и гетерогенном пространстве. Быстрорастущий *Rhb. capsulatus*, выделенный из воды, лучше приспособливается к обитанию в свободном пространстве.

Ключевые слова: фотосинтезирующие бактерии, возобновление роста, диссоциация, бактериохлорофилл, экзопроотеиназы, выживаемость.

Диссоциация — это расщепление однородной популяции бактерий на варианты, различающиеся генетическими, физиолого-биохимическими и морфологическими свойствами. Возникновение диссоциантов в популяции и их реверсия происходят с частотой 10^{-2} – 10^{-5} на одно клеточное деление. Биологическое значение диссоциации — адаптация бактерий к изменениям в окружающей среде. Популяция бактерий всегда содержит то или иное количество диссоциантов, которое зависит от фазы развития [1] и условий культивирования [2], доминирует диссоциант, более приспособленный к данным условиям роста.

Нами впервые установлена способность пурпурной фотосинтезирующей бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, выделенной из почвы, расщепляться на R- и M-диссоцианты. Методом ПЦР их генов 16S рРНК установлена принадлежность R- и M-диссоциантов к исходному штамму. Диссоцианты различаются морфологией колоний и устойчивостью к действию ряда физических и химических факторов [3], содержанием бактериохлорофилла (Бхл) и экзопроотеиназ в клетках, особенностями дыхательной цепи [4].

Целью настоящей работы является получение диссоциантов другого вида того же рода пурпурной фотосинтезирующей бактерии — *Rhb. capsulatus* В10, выделенного из воды, изучение их молекулярных, физиолого-биохимических и морфологических свойств и сравнение этих свойств с аналогичными свойствами R- и M-диссоциантов *Rhb. sphaeroides*.

Материалы и методы

Объектами исследований являются фотосинтезирующие пурпурные бактерии *Rhodobacter capsulatus* В10 и *Rhb. sphaeroides* 2R из коллекции культур кафедры микробиологии. Бактерии выращивали в люминостате при 30°C на среде Ормерода [5] в присутствии 0,2% малата во флаконах, доверху заполненных средой (анаэробные условия), и в колбах на 250 мл с 50 мл среды на качалке при 250 об/мин (аэробные условия). Число жизнеспособных клеток и соотношение диссоциантов в популяции определяли подсчетом колониеобразующих единиц (КОЕ) на агаризованной среде (мясопептонный бульон и сусло, 1:1). При проведении полимеразной цепной реакции фрагментов генов 16S рРНК была использована система универсальных праймеров [6]. Общую внеклеточную протеолитическую активность определяли модифицированным методом Ансона [7]. За единицу протеолитической активности принимали такое количество фермента (в мл), которое за одну минуту высвобождает 1 мкг тирозина. Бхл определяли при 765 нм после его экстракции из целых клеток смесью ацетона и метанола в соотношении 7:2 [8]. В таблице и графиках представлены средние данные из трех опытов.

Результаты и обсуждение

Выделение диссоциантов. При расщепе трехсуточных культур *Rhb. capsulatus* на плотной среде вырастали колонии двух типов. В большинстве случаев это были колонии темно-красного цвета,

выпуклые, матовые, диаметром 3–3,5 мм (рис. 1, А). Кроме этого, обнаружены более мелкие колонии розового цвета, гладкие, блестящие, диаметром 1 мм (рис. 1, Б), в проходящем свете вокруг них видна бесцветная каемка капсульного материала (рис. 1, В).

ПЦР генов 16S рРНК. Для подтверждения принадлежности выделенного диссоцианта и исходного штамма *Rhb. capsulatus* B10 к одному виду была проведена полимеразная цепная реакция фрагментов их генов 16S рРНК (табл. 1). Последовательности генов 16S рРНК исходного штамма и выделенного диссоцианта идентичны между собой — 100% гомологии. На основании морфологических и молекулярных исследований исходный штамм идентифицировали как R-диссоциант, а вновь выделенный — как М-диссоциант.

Влияние освещенности и аэрации на рост и состав популяции диссоциантов *Rhb. capsulatus*. Диссоциация складывается из двух процессов: возникновения диссоциантов в результате изменений в геноме клетки и селекции возникших вариантов под воз-

действием внешних факторов [2]. Сравнивали влияние на рост диссоциантов и состав их популяции наиболее важных для фотосинтезирующих бактерий физических факторов — света и аэрации. Бактерии выращивали в анаэробных условиях на свету или в аэробных условиях на свету и в темноте.

Наибольший рост клеток R-диссоцианта наблюдается в анаэробных условиях на свету (рис. 2, А1). Клетки обладают большой скоростью роста, поэтому их максимальная концентрация ($9 \cdot 10^9$ клеток в 1 мл) достигается уже в первые сут культивирования. Ко вторым сут роста происходит лизис части клеток R-диссоцианта. Со вторых до третьих сут культивирования общее количество клеток не меняется, но происходит изменение соотношения диссоциантов в популяции, и к третьим сут количество возникших клеток М-диссоцианта составляет уже 10%. К четвертым сут рост бактерий возобновляется, и в популяции преобладающим становится М-диссоциант — 62%. Преимущество М-клеток обусловлено наличием у них более высокой литической активности, которая позволяет лизировать часть клеток R-диссоцианта — активность экзопроотеиназ М-клеток составляет 6,2 ед./мл, а R-клеток — 3 ед./мл.

Клетки М-диссоцианта (рис. 2, А2) обладают меньшей скоростью роста, чем клетки R-диссоцианта: максимальное количество бактерий на свету в анаэробных условиях достигается только к третьим сут культивирования, и оно в два раза ниже, чем у R-диссоцианта. Это связано, вероятно, с меньшим содержанием в их клетках Бхл: количество Бхл составляет в клетках R-диссоцианта 31,6 мкг/мг белка, а в клетках М-диссоцианта — 20,4 мкг/мг белка. На третьи сут культивирования в популяции появляются быстрорастущие клетки R-диссоцианта, доля которых к четвертым сут увеличивается до 37%.

При аэрации на свету (рис. 2, Б1) рост клеток R-диссоцианта в первые сут мало меняется по сравнению со стационарной культурой (рис. 2, А1). Начиная со вторых сут происходит лизис части бактерий, и концентрация клеток постепенно снижается к концу культивирования до $5 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл. Колонии М-диссоцианта выявляются на третьи сут, к концу культивирования их доля в популяции возрастает до 40%. За наблюдаемый период рост не возобновляется.

Рост М-диссоцианта на свету при аэрации (рис. 2, Б2) ускоряется, наблюдается снижение количества образованных клеток. На вторые сут роста в популяции начали выявляться быстрорастущие R-клетки, которые к третьим сут становятся доминирующими.

При аэрации в темноте (рис. 2, В1) рост R-диссоцианта резко снижается, при этом популяция на 90% замещается М-клетками. Рост М-диссоцианта (рис. 2, В2) снижается уже ко вторым сут культивирования, в популяции обнаруживаются R-клетки.

Сравнение влияния освещенности и аэрации на рост и состав популяции R- и М-диссоциантов *Rhb. sphaeroides* и *Rhb. capsulatus*. В табл. 2 приведены

Рис. 1. Колонии R- и М-диссоциантов *Rhb. capsulatus*: А — колонии R-диссоцианта, Б — колонии М-диссоцианта, В — колонии М-диссоцианта в проходящем свете

Таблица 1

Сравнение последовательностей генов 16S рРНК выделенного диссоцианта, исходного штамма *Rhb. capsulatus* и типового штамма *Rhb. capsulatus* NR029215

Seq	<i>Rhb. capsulatus</i> NR029215	Исходный штамм <i>Rhb. capsulatus</i>	Выделенный диссоциант
<i>Rhb. capsulatus</i> NR029215	1D	99,9%	99,9%
Исходный штамм <i>Rhb. capsulatus</i>	99,9%	1D	100%
Выделенный диссоциант	99,9%	100%	1D

Рис. 2. Влияние освещенности и аэрации на рост и состав популяции R-диссоциантов (1) и М-диссоциантов (2) *Rhb. capsulatus*: в анаэробных условиях на свету — А; в аэробных условиях на свету — Б; в аэробных условиях в темноте — В. Количество (%) в популяции клеток R-диссоцианта — 1*, М-диссоцианта — 2*

данные для сравнения роста и изменения соотношений R- и М-диссоциантов в популяции *Rhb. capsulatus* и изученного ранее *Rhb. sphaeroides* [3, 4] при различных режимах освещения и аэрации. Во всех сериях опытов клетки R- и М-диссоциантов *Rhb. capsulatus* обладают большей скоростью роста и образуют на порядок больше клеток,

чем соответствующие диссоцианты *Rhb. sphaeroides*. Это объясняется более высоким содержанием Бхл в клетках *Rhb. capsulatus* по сравнению с *Rhb. sphaeroides*: у R-диссоциантов — в 2,5 раза, у М-диссоцианта — в 5,7 раз. При всех условиях культивирования за 4 сут состав популяций медленно растущих клеток R- и

Таблица 2

Сравнение физиолого-биохимических свойств R- и M-диссоциантов *Rhb. capsulatus* и *Rhb. sphaeroides*

Свойства	<i>Rhb. capsulatus</i>		<i>Rhb. sphaeroides</i>		Ссылки
	R-диссоциант	M-диссоциант	R-диссоциант	M-диссоциант	
Максимальная концентрация клеток (рост в анаэробных условиях на свету), клетки/мл	$90 \cdot 10^9$	$50 \cdot 10^9$	$39 \cdot 10^8$	$28 \cdot 10^8$	[3,4]
Достижение максимального количества клеток, время культивирования, сут	1	3	2	3	[3]
Количество диссоциантов, возникших на четвертые сут роста в анаэробных условиях на свету, %	43 (M-диссоцианты)	37 (R-диссоцианты)	0	0	[3]
Содержание бактериохлорофилла, мкг/мг белка	31,6	20,4	12,7	3,6	[4]
Возобновление роста в анаэробных условиях на свету:					[1]
– время культивирования, сут	4	нет возобновления роста	26	нет возобновления роста	
– количество возникших клеток M-диссоцианта, %	43	—	20	—	
Экзопроотеиназы, ед./мл	6,2	3,0	4,0	2,1	[1]
Максимальная концентрация клеток (рост в аэробных условиях на свету), клетки/мл	$70 \cdot 10^9$	$20 \cdot 10^9$	$43 \cdot 10^8$	$23 \cdot 10^8$	[3]
Концентрация клеток (рост в аэробных условиях в темноте) на вторые сут культивирования, клетки/мл	$12 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^8$	$20 \cdot 10^8$	[3]

M-диссоциантов *Rhb. sphaeroides*, в отличие от *Rhb. capsulatus*, не меняется.

Возобновление роста на четвертые сут культивирования наблюдается только у самого быстрорастущего из 4-х диссоциантов — R-диссоцианта *Rhb. capsulatus* после предварительного лизиса части клеток и увеличении доли M-диссоцианта в популяции. У R-диссоцианта *Rhb. sphaeroides* периодическое возобновление роста начинается только с 26-х суток периодического культивирования без дополнительного внесения питательных веществ после предварительного лизиса части клеток и увеличения доли M-диссоцианта в популяции, т.е. только после более позднего истощения биогенов из среды [1].

На свету при аэрации рост и M-диссоциантов обоих видов бактерий ускоряется по сравнению с анаэробными культурами. Количество клеток, образованных M-диссоциантами по сравнению с R-диссоциантами, меньше у *Rhb. capsulatus* в 3 раза, у *Rhb. sphaeroides* — в 2 раза.

Количество клеток, образованных в темноте при аэрации по сравнению со световыми аэробными культурами, на вторые сут культивирования снижается: у R-диссоцианта *Rhb. capsulatus* — в 6 раз, у M-диссоцианта *Rhb. capsulatus* — в 10 раз, у R-диссоцианта *Rhb. sphaeroides* — в 9 раз, т.е. все эти культуры приспособлены к жизни в фотогетеротрофных условиях. У M-диссоцианта *Rhb. sphaeroides* при аэрации рост одинаковый на свету и в темноте. Это связано с тем, что в дыхательной цепи

переноса электронов M-диссоцианта *Rhb. sphaeroides* присутствует цитохром aa₃, выполняющий функцию цитохрома с оксидазы [4], что дает ему возможность расти в аэробных органотрофных условиях.

Таким образом, физиолого-биохимические различия двух близких видов фотосинтезирующих бактерий коррелируют с особенностями их естественных мест обитания: *Rhb. sphaeroides*, выделенный из почвы, обладает низкой скоростью роста и способностью расти на свету и в темноте, что дает ему преимущества при обитании в ограниченном и гетерогенном пространстве. Быстрорастущий *Rhb. capsulatus*, выделенный из воды, более приспособлен к обитанию в свободном пространстве.

При истощении питательных ресурсов наблюдается поочередный рост R-диссоциантов, обладающих большей скоростью роста и меньшей протеолитической активностью, и M-диссоциантов, обладающих меньшей скоростью роста и повышенной активностью экзопроотеиназ. Это приводит к периодическому лизису клеток и последующему возобновлению роста бактерий, а в целом — к увеличению выживаемости всей популяции данного штамма. Аналогичные закономерности возобновления роста и изменения состава популяции обнаружены при длительном периодическом культивировании без дополнительного внесения биогенов для S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* [9] и *Escherichia coli* [10].

При физических или химических условиях, неблагоприятных для существования данного вида,

возобновления роста не происходит, например, при культивировании диссоциантов *Rhb. capsulatus* в темноте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Milko E.S., Milko D.M. The process of bacterial population splitting into dissociants and long-term batch cultivation of bacteria // Appl. Biochem. Mikrobiol. 2014. Vol. 50. N 4. P. 368–373.
2. Милько Е.С., Егоров Н.С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2011. 111 с.
3. Ivanovskii R.N., Mil'ko E.S., Mil'ko D.M. Isolation of the phase variants of the purple photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* and investigation of their molecular, physiological, biochemical, and morphological characteristics // Microbiology (Mosc.). 2013. Vol. 82. N 2. P. 169–174.
5. Mil'ko E.S., Krasil'nikova E.N., Keppen O.I., Lebedeva N.V., Ivanovsky R.N. Metabolism of the phase variants of the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* // Microbiology (Mosc.). 2014. Vol. 83. N 4. P. 322–325.
5. Кондратьева Е.Н. Фототрофные бактерии. М.: Изд-во Акад. Наук СССР, 1963. 315 с.
6. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd., 1991. 329 pp.
7. Hagihara B., Matsubara H., Nakai M., Okunuki K. Crystalline bacterial proteinase. I. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis* // J. Biochem. 1958. Vol. 45. N 3. P. 185–194.
8. Cohen-Bazire G., Sistrom W.R., Stanier R.Y. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria // J. Cell. Physiol. 1957. Vol. 49. N 1. P. 25–32.
9. Mil'ko E.S., Kreier V.G., Egorov N.S., Loiko N.G., Golod N.A. Development and population structure of mixed (S + M) *Pseudomonas aeruginosa* cultures in the late stationary growth phase // Microbiology (Mosc.). 2008. Vol. 77. N 3. P. 275–280.
10. Finkel S.E. Long-term survival during stationary phase evolution and the GASP-phenotype // Nat. Rev. Microbiol. 2006. Vol. 4. N 2. P. 113–120.

Поступила в редакцию 09.03.2016 г.

Принята в печать 18.05.2016 г.

MICROBIOLOGY

THE VALUE OF HETEROGENEITY OF BACTERIA POPULATION, CREATED BY THE PROCESS OF DISSOCIATION, FOR THE GROWTH OF PURPLE PHOTOSYNTHETIC BACTERIA IN THEIR NATURAL HABITAT

E.S. Milko^{1,*}, E.N. Krasilnikova¹, D.M. Milko²

Department of Microbiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: esmilko@mail.ru

For the first time R- and M-dissociants were isolated from the population of purple phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*, their growth under different luminance and aeration conditions was studied. Earlier, similar experiments were conducted with R- and M-dissociants of *Rhodobacter sphaeroides*. The physiological-biochemical differences of connatural bacterial species correlate with the distinctions of their inhabitation: *Rhb.sphaeroides* isolated from the soil is characterized by low speed of growth along with the ability to grow in dark and aerobiotic places demonstrated only by M-dissociant, which offers this specie an advantage in adaptation for limited and heterogeneity space. Being extracted from the water, rapidly growing *Rhb. capsulatus* is better adapted for habitation at a free space.

Keywords: photosynthetic bacteria, resumption of growth, dissociation, bacteriochlorophyll, exoproteinase, survive

Сведения об авторах:

Милько Елена Серафимовна — канд. биол. наук., ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-45-45; e-mail: esmilko@mail.ru

Красильникова Елена Николаевна — канд. биол. наук., ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-03; e-mail: mguru@mail.ru

Милько Денис Михайлович — канд. географ. наук., науч. сотр. Института географии РАН. Тел.: 8-495-959-00-16; e-mail: d0@mail.ru