

УДК 579.841.11.017.6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОТРЕБНОСТЕЙ ДИССОЦИАНТОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* В УГЛЕРОДЕ, АЗОТЕ И ФОСФОРЕ

© 2004 г. П. В. Фурсова, Е. С. Милько, И. А. Ильиных, В. Н. Максимов, А. П. Левич

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Поступила в редакцию 20.12.02 г.

В работе получены точные количественные данные о потребностях микроорганизмов, необходимые для прогнозирования поведения бактериального сообщества в зависимости от условий культивирования и управления его структурой. По данным 88 опытов по культивированию монокультур R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* определены потребности бактерий в углеводе, азоте и фосфоре. В отличие от ранних исследований для каждого из диссоциантов найдены коэффициенты перевода оптической плотности культуры в количество клеток: зафиксировано достижение стационарной фазы роста; проверены изменения в диссоциативном составе культур на стационарной фазе: выявлены ресурсы, ограничивающие рост культур. Проведено сравнение полученных значений потребностей с данными других экспериментов.

Ключевые слова: диссоциация, *Pseudomonas aeruginosa*, потребность в основных источниках питания.

Многие бактерии, в том числе псевдомонады, в процессе роста могут расщепляться (диссоциировать) на варианты, которые различаются по физиолого-биохимическим и морфологическим признакам: по морфологии колоний, устойчивости к внешним воздействиям, способности к синтезу практически важных веществ, интенсивности разрушения ксенобиотиков и углеводов, требовательности к содержанию питательных веществ в среде [1]. Морфологические и некоторые физиолого-биохимические свойства диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* описаны в ряде работ [2–5].

Цель настоящей работы – определение величины потребностей диссоциантов *P. aeruginosa* в основных компонентах питания. Количественные данные о потребностях необходимы для прогнозирования поведения бактериального сообщества в зависимости от условий культивирования и управления его структурой. Под потребностью микроорганизмов в ресурсах среды понимается потребляемое из среды количество вещества в расчете на одну образовавшуюся в процессе культивирования клетку.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В период с 1999 г. по 2001 г. были проведены 88 опытов по культивированию R-, S-, и M-диссоциантов штамма *Pseudomonas aeruginosa* К-2 [2]. Бактерии выращивали на средах с различным начальным содержанием глюкозы, нитратов и фос-

фатов. Исходная среда для R- и S-диссоциантов содержала 2% глюкозы, 1.1% нитратов и 0.055% фосфатов, для M-диссоцианта количество веществ было уменьшено в два раза. Для изучения зависимости роста бактерий от начального содержания ресурса в среде уровень глюкозы варьировали в пределах от 0.03 до 2%, нитратов – от 0.01 до 1.1%, фосфатов – от 0.001 до 0.055%. Опыты проводили на 24 средах для каждого диссоцианта (для некоторых сред – с повторностями), причем среды составляли таким образом, чтобы один из ресурсов был лимитирующим.

Бактерии культивировали в пробирках на 50 мл с 10 мл среды на качалке (180 об/мин) при температуре 28°C в течении полутора-трех суток до достижения стационарной фазы роста. В качестве посевного материала использовали односуточные культуры диссоциантов псевдомонад, выращенных на агаризированной среде, содержащей мясопептонный бульон и сусло в отношении 1 : 1 (БСА). Бактерии со скошенного агара переносили петлей в пробирку с физиологическим раствором. Плотность инокулята каждого из диссоциантов во всех опытах выравнивали по нефелометру или по стандарту мутности до содержания клеток 10^9 в 1 мл. Посевной материал вносили в количестве 3% об.

Во время проведения эксперимента проводили измерения оптической плотности культуры, уровня кислотности, отмечали появление в монокультурах клеток других диссоциантов, а также в некоторых из опытов определяли уровень питательных веществ в среде в процессе культивирования. Пробы отбирали в начале опыта, через 14–16 ч, затем каждые 4–6 ч, пока культура не достигала

стационарной стадии. Для измерения рН среды использовали микропотенциометр Checker фирмы "HANNA Instruments". Глюкозу определяли с помощью трифенилтетразолия хлорида [6], азот – с сульфифеноловым реактивом [7], фосфор – методом Пануша [8].

Рост бактерий оценивали нефелометрически по клеточной плотности культуры. Измерения проводили на ФЭК 56 М (светофильтр № 6, зеленый, максимум пропускания 540 нм) в кювете с длиной оптического пути 0.5 см. При слабом росте бактерий использовали кювету с длиной пути 2 см, с последующим пересчетом полученных данных. Показания нефелометра для удобства расчетов умножали на 100.

Для определения количества клеток в культуре на стационарной стадии развития для каждого диссоцианта был получен коэффициент, связывающий оптическую плотность с численностью. С помощью люминесцентной микроскопии в фиксированных препаратах считали количество бактерий в суспензии известной оптической плотности. Для этого 48-часовые культуры R- и S-диссоциантов, выросших на исходной среде, разводили в 100 и 10000 раз, а 24-часовую культуру M-диссоцианта в 10 и 100 раз. Препараты просматривали на люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ-ИЗ (светофильтр Ж-С-19, окуляр × 4, объектив × 90Л). Количество микробных клеток, содержащихся в 1 мл исходной суспензии вычисляли по формуле

$$N = \frac{4an}{S} \times 10^{10},$$

где N – число клеток в 1 мл исходной суспензии; a – среднее число клеток в поле зрения; S – площадь поля зрения (10000 мкм²); n – показатель разведения [9].

В результате были получены следующие коэффициенты перевода оптической плотности в количество клеток: для R-диссоцианта – 10^8 кл/(мл ед.неф) × 100, для S-диссоцианта – 0.3×10^8 кл/(мл ед.неф) × 100, для M-диссоцианта – 0.17×10^8 кл/(мл ед.неф) × 100.

Соотношение диссоциантов в популяции определяли по морфологии колоний при расसेве клеточной суспензии на БСА.

Потребности в источниках питания рассчитывали по формуле $q_i^L = \frac{\Delta L}{\Delta n_i}$, где ΔL – количество потребленного из среды вещества, L – компонент питания, Δn_i – количество вновь образовавшихся клеток за тот же период времени. индекс i характеризует диссоциант. Для расчетов средних значений потребностей и доверительных интервалов применялось стандартное приложение Microsoft Excel 7.0 (анализ – описательная статистика).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным опытов, в динамике которых определяли концентрации питательных веществ, потребности рассчитывали, исходя из соответствующих измерений величин ΔL и Δn_i . В большинстве экспериментов химическое определение концентраций питательных веществ в динамике культивирования не проводили. Поэтому для определения количества потребленного ресурса, используемого при расчетах потребностей, руководствовались следующим: если остановка роста произошла по причине исчерпания некоторого питательного вещества, то количество этого ресурса, потребленного к концу роста культурой, можно считать равным его содержанию в среде в начальный момент культивирования. При этом для вычисления потребности необходимо использовать количество клеток, выросших за тот же период времени, то есть к моменту достижения стационарной фазы. Итак, для расчета потребностей необходимо выполнение следующих условий:

1. Число выросших клеток следует определять в стационарной фазе роста.
2. Остановка роста (достижение стационарной стадии) должна быть обусловлена исчерпанием в среде одного из изучаемых ресурсов.
3. Из ряда косвенных соображений, изложенных ниже, должно быть известно, какой именно ресурс полностью исчерпан, т.е. является лимитирующим.

Диктуемая названными условиями экспериментальная задача состояла в необходимости зафиксировать достижение стационарной стадии. Для этого измерения оптической плотности проводили с интервалом в несколько часов в течение двух-двух с половиной суток.

Задача анализа полученных данных состояла в выявлении лимитирующего роста ресурса. Для ее решения были применены три подхода. Первый основан на априорном представлении о том, какой питательный компонент мог бы ограничивать рост культуры на среде с заданным составом. Исходную (указанную в разделе о методике) среду, исходя из опыта культивирования *P. aeruginosa*, принимали за сбалансированную. А среду, где содержание некоторого ресурса было снижено по сравнению с исходной (в два и более раз), считали лимитированной по этому ресурсу. Второй путь – проверка пропорциональности оптической плотности культуры в стационарной фазе начальному количеству ресурса в среде в серии опытов с различными начальными содержаниями ресурса. При этом одна из сред в серии согласно первому подходу могла быть признана лимитирующей по рассматриваемому ресурсу. Третий подход основан на методе добавок. В некоторых опытах в предполагаемый момент достижения стационарной фазы культуру разделяли на четы-

Таблица 1. Начальный состав сред по углероду, азоту и фосфору, оптическая плотность культуры в единицах нефелометра, умноженных на 100, и уровень кислотности среды (рН) на стационарной стадии роста или в конце опыта. Символом “*” отмечены среды, при культивировании на которых применяли метод добавок

R-диссоциант						S-диссоциант					
номер среды	содержание ресурсов в среде (мг/мл)			оптическая плотность (×100)	рН	номер среды	содержание ресурсов в среде (мг/мл)			оптическая плотность (×100)	рН
	углерод	азот	фосфор				углерод	азот	фосфор		
1.	7.98	1.81	0.11	473		19*	0.78	0.03	0.008	63	7.3
2.	4	0.9	0.056	430		20*	0.78	0.1	0.002	30	6.6
3.	4	0.9	0.056	342	8.5	21.	0.4	0.035	0.01	30	8.4
4.	7.8	0.72	0.056	224	7.3	22.	1.62	0.14	0.04	123	8.7
5.	7.8	0.72	0.056	276	8	23.	0.4	0.015	0.01	28	7.6
6.	7.8	0.9	0.056	249	7.7	24.	1.6	0.06	0.04	136	8.8
7*	0.78	0.4	0.028	87	8.8	25.	0.12	0.035	0.01	9	7.7
8*	3.18	0.1	0.028	89	4.1	26.	0.48	0.14	0.04	30	6.9
9*	3.18	0.4	0.007	95	4	27.	0.12	0.015	0.01	14	8.2
10*	0.282	0.1	0.008	21	8.4	28.	0.48	0.06	0.04	52	8
11*	1.6	0.03	0.008	37	4.4	29.	0.78	0.1	0.01	74	8.2
12*	1.6	0.1	0.002	26	4.1	30.	3.24	0.4	0.04	177	8.3
13.	0.4	0.035	0.01	31	8.1	31.	1.6	0.2	0.01	99	8.6
14.	1.62	0.14	0.04	120	7.5	32.	6	0.8	0.04	220	8.9
15.	0.4	0.015	0.01	22	6.8	33.	1.2	0.035	0.01	68	7.3
16.	1.6	0.06	0.04	110	7.6	34.	4.8	0.14	0.04	160	3.2
17.	0.12	0.035	0.01	17	7.1	M-диссоциант					
18.	0.48	0.14	0.04	31	7.2	номер среды	содержание ресурсов в среде (мг/мл)			оптическая плотность (×100)	рН
19.	0.12	0.015	0.01	14	7.5		углерод	азот	фосфор		
20.	0.48	0.06	0.04	52	8.4	1.	4	0.9	0.056	72	3.3
21.	0.78	0.1	0.01	63	8.8	2.	4	0.9	0.056	75	3.3
22.	3.24	0.4	0.04	200	5.3	3.	1.62	0.9	0.056	86	5.5
23.	1.6	0.2	0.01	120	7.6	4.	1.62	0.9	0.056	76	3.5
24.	6	0.8	0.04	225	8.4	5.	7.8	0.2	0.056	37	4
25.	1.2	0.035	0.01	49	7.1	6.	7.8	0.2	0.056	42	3.9
26.	4.8	0.14	0.04	100	4.1	7.	7.8	0.9	0.01	67	4.1
S-диссоциант						8.	7.8	0.9	0.01	44	4.2
номер среды	содержание ресурсов в среде (мг/мл)			оптическая плотность (×100)	рН	9*	0.78	0.4	0.028	111	8.5
	углерод	азот	фосфор			10*	3.18	0.1	0.028	95	4.1
1.	7.98	1.81	0.11	400		11*	3.18	0.4	0.007	77	3.8
2.	7.98	1.81	0.11	372		12*	0.282	0.1	0.008	27	8.3
3.	4	0.9	0.056	376		13*	0.78	0.03	0.008	58	7.4
4.	4	0.9	0.056	334	7.7	14*	0.78	0.1	0.002	31	3.4
5.	7.98	0.72	0.056	350	6.7	15.	0.4	0.035	0.01	31	8.5
6.	7.98	0.72	0.056	340	6.2	16.	1.62	0.14	0.04	109	8.3
7.	7.98	0.9	0.056	320	8.6	17.	0.4	0.015	0.01	29	7.7
8.	7.98	0.9	0.056	243	4.4	18.	1.6	0.06	0.04	129	8.8
9*	0.78	0.4	0.028	51	8.8	19.	0.12	0.035	0.01	10	8.5
10*	0.78	0.4	0.028	74	8	20.	0.48	0.14	0.04	35	7.3
11*	3.18	0.1	0.028	111	4	21.	0.12	0.015	0.01	15	7
12*	3.18	0.1	0.028	109	4	22.	0.48	0.06	0.04	69	8.6
13*	3.18	0.4	0.007	106	3.7	23.	0.78	0.1	0.01	71	8.8
14*	3.18	0.4	0.007	90	3.6	24.	3.24	0.4	0.04	142	3.3
15*	0.282	0.1	0.008	22	8.3	25.	1.6	0.2	0.01	90	7.8
16*	0.78	0.03	0.008	60	7.4	26.	6	0.8	0.04	220	8.8
17*	0.78	0.1	0.002	34	6.6	27.	1.2	0.035	0.01	69	7.2
18*	0.282	0.1	0.008	25	8.2	28.	4.8	0.14	0.04	155	3.1

Таблица 2. Значения потребностей диссоциантов (10^{-12} мг/кл), рассчитанные по данным экспериментов. Обозначение: q_i^L – потребность диссоцианта i в ресурсе L ; номера сред соответствуют номерам сред из табл. 1

R-диссоциант			S-диссоциант				M-диссоциант				
номер среды	q_R^C	q_R^N	q_R^P	номер среды	q_S^C	q_S^N	q_S^P	номер среды	q_M^C	q_M^N	q_M^P
2.	96		0.7	3.	342		2.3	1.			4.2
3.	120			4.	384		5.6	2.	630		3.2
4.	156			5.			5.1	7.	384		9
6.			1.8	6.	384		3.1	9.	432		
7.	90			7.	432		6.5	11.			5.3
10.	148		1.2	9.	540			12.	642		
11.		8	1.1	10.	384			13.		31	
12.			0.8	15.	433			14.			4
14.	144			16.		19		17.		32	
15.		6		17.			2	18.		28	
18.	156			18.	381			21.	480		
21.	120			19.		18		22.	420		
22.			2	20.	243		2	23.	684		
24.			1.8	23.		18		25.			6.7
25.		7		24.		15		26.			10.6
				25.	450			27.		31	
				28.	348						
				29.	384						
				30.	612						
				32.			6				

ре части. В три из них вносили добавки – глюкозу, нитрат или фосфат, четвертую оставляли без изменений. Культуры оставляли расти еще четыре часа, затем проводили измерение оптической плотности. Возобновление роста после добавки ресурса принимали за экспериментальное доказательство его лимитирующей роли.

Были проведены 26 опытов с культурой R-диссоцианта, 34 опыта с S-диссоциантом, 28 – с M-диссоциантом. В табл. 1 приведены уровни содержания питательных веществ в начале эксперимента (в расчете на элемент), значения оптической плотности культуры (показания нефелометра, умноженные на 100) и уровня pH в стационарной фазе роста (или в конечный момент культивирования). Упомянутая в предыдущем абзаце исходная среда в табл. 1 приведена под номером 1. В последующих средах постепенно снижали начальные концентрации основных питательных веществ, что позволяло считать их лимитированными по соответствующему ресурсу. По данным табл. 1 судили о наличии пропорциональности оптической плотности культуры начальному количеству ресурса в среде. Среды, при культивировании на которых применяли

метод добавок, отмечены символом “*”. Необходимо отметить ряд причин, по которым часть экспериментальных данных исключали из дальнейшего рассмотрения:

1. Не во всех опытах конечный момент культивирования соответствовал стационарной стадии (это означает, что культура не достигла максимально возможной на данной среде численности клеток).

2. В некоторых экспериментах в процессе культивирования вместо исходной монокультуры возникала смесь диссоциантов [10] (эти данные не подходят для определения потребностей, поскольку по ним невозможно определить в каком количестве потребляются ресурсы каждым из диссоциантов).

В результате проведенного анализа были выбраны данные нескольких опытов, по которым можно рассчитывать потребности. Рассчитанные по результатам этих экспериментов значения потребностей приведены в табл. 2. Полученные значения потребностей были усреднены, для средних были рассчитаны 95%-ные доверительные интервалы (табл. 3).

Таблица 3. Средние значения потребностей R-, S-, M-диссоциантов в углеводе, азоте и фосфоре ($\times 10^{-12}$ мг/кл) с учетом 95%-ных доверительных интервалов

Диссоциант	Ресурс		
	углерод	азот	фосфор
R	129 ± 22	7.0 ± 2.5	1.0 ± 0.5
S	409 ± 55	17.5 ± 3.0	4.0 ± 1.5
M	525 ± 114	31 ± 3	6.0 ± 2.5

В конце 2002 г.–начале 2003 г. на основе рассчитанных потребностей (табл. 3) была составлена сбалансированная среда (0.225% глюкозы, 0.03% нитратов и 0.004% фосфатов), на которой были проведены дополнительные опыты по культивированию R- и S-диссоциантов (без применения метода добавок) для экспериментальной проверки полученных величин. По данным указанного опыта были получены следующие значения потребностей: в углеводе – 122×10^{-12} мг/кл и 345×10^{-12} мг/кл для R- и S-диссоцианта соответственно; в азоте – 5.75×10^{-12} мг/кл и 24×10^{-12} мг/кл; в фосфоре – 0.85×10^{-12} мг/кл и 3.5×10^{-12} мг/кл. Сравнение приведенных величин потребностей со значениями в табл. 3 показывает их близость в пределах погрешностей определения.

Отметим, что ранее были получены оценки потребности диссоциантов *P. aeruginosa* в глюкозе, нитратах и фосфатах на основе данных 1997–1999 гг. [11]. Однако, при расчетах этих значений для перевода оптической плотности в численность для всех диссоциантов использовался один и тот же коэффициент. В работе было высказано намерение осуществить “дифференцированную калибровку” показаний нефелометра для каждого из диссоциантов, что и сделано в настоящем исследовании. Уточненные значения потребностей в расчете на элемент содержатся в табл. 4. Как видно из сравнения представленных в данной работе величин потребностей и опубликованных раньше, имеет место их взаимное соответствие (с учетом погрешностей вычислений, которые достигают 50% [11]), за исключением значений потребностей M-диссоцианта. Это различие можно объяснить следующим обстоятельством. В опытах 1997–1999 гг. наблюдался очень плохой рост указанного диссоцианта. Так, оптические плотности, которых достигала M-культура в прежних и нынешних опытах, примерно одинаковые, а содержание ресурсов в средах опытов 1997–1999 гг. было в 5–10 раз выше. И наоборот, при одинаковом содержании питательных веществ в более поздних опытах оптическая плотность достигала значений в несколько раз превышающих уровень ранних экспериментов. Вероятно, остановка роста культуры M-диссоцианта в ранних опытах связана с образованием клетками из глюко-

Таблица 4. Ранее полученные значения потребностей R-, S-, M-диссоциантов в углеводе, азоте и фосфоре ($\times 10^{-12}$ мг/кл) с учетом погрешностей

Диссоциант	Ресурс		
	углерод	азот	фосфор
R	110 ± 8	8.5 ± 3.1	1.0 ± 0.3
S	366 ± 23	38.3 ± 10.3	3.8 ± 1.0
M	1706 ± 941	144.0 ± 63.5	11.8 ± 5.8

зы муравьиной кислоты и, как следствие, снижением уровня кислотности среды (указанная особенность клеток M-диссоцианта была обнаружена позднее [5]). Итак, можно сделать вывод о том, что в экспериментах 1997–1999 гг. остановка роста M-диссоцианта происходила по причине, не связанной с исчерпанием ресурса из среды, и предположение о том, что ресурсы были полностью потреблены из среды, было неверным, а рассчитанные величины потребностей оказались завышенными.

Авторы выражают глубокую благодарность Л.М. Полянской за помощь в проведении люминесцентной микроскопии, а так же Н.Г. Булгакову за плодотворные обсуждения материалов и помощь в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 02-04-48085 и 03-04-06044).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Милько Е.С., Егоров Н.С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации. М.: Изд-во МГУ, 1991. 142 с.
2. Милько Е.С., Мартынкина Л.П. Морфологические и физиолого-биохимические особенности диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. 1996. Т. 65. № 5. С. 352 – 356.
3. Милько Е.С. Выживаемость диссоциантов углеводородоксилирующего штамма *Pseudomonas aeruginosa* при хранении // Микробиология. 1998. Т. 67. № 1. С. 102 – 105.
4. Милько Е.С., Никитенко Л.А. Влияние физических и химических факторов среды на рост диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Прикл. биохимия и микробиология. 1998. Т. 34. № 2. С. 171 – 174.
5. Милько Е.С., Красильникова Е.Н. Особенности углеводного метаболизма R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. 1999. Т. 68. № 2. С. 211 – 214.
6. Химия углеводов / Под ред. Кочеткова Н.К. и др. М.: Химия, 1967. 671 с.
7. Поляков Г. Пособие по гидрохимии для рыбководов. М.: Пищепромиздат, 1950. 88 с.
8. Малый практикум по биохимии / Под ред. проф. В.В. Юркевича. М.: Изд-во МГУ, 1979. 209 с.

9. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под. ред. Звягинцева Д.Г. М.: Изд-во МГУ, 1991. 304 с.
10. Милько Е.С., Ильиных И.А. Влияние концентраций основных биогенных элементов в среде на динамику роста и состав популяции R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* и пути использования ими глюкозы: окисление и брожение // Микробиология. 2004. Т. 73. № 1. С. 37–44.
11. Максимов В.Н., Милько Е.С., Левич А.П. Потребности диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* в глюкозе, нитратах и фосфатах. Лимитирующие рост концентрации веществ при культивировании без пополнения запаса ресурсов // Изв. АН. Сер. биол. 2001. № 5. С. 607 – 612.

The Requirements of *Pseudomonas aeruginosa* Dissociants for Carbon, Nitrogen, and Phosphorus

P. V. Fursova¹, E. S. Mil'ko, I. A. Il'inykh, V. N. Maksimov, and A. P. Levich

Faculty of Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

¹ E-mail: polina_fursova@mail.ru

Abstract—Quantitative data on the nutritional requirements of microorganisms are necessary to predict the behavior of bacterial populations and to control their cultivation. The requirements of the R, S, and M dissociants of *Pseudomonas aeruginosa* for carbon, nitrogen, and phosphorus were derived from the results of 88 cultivation experiments. For each of the dissociants, we derived a coefficient that relates the optical density and the number of cells in the dissociant culture, determined the time when the cultures entered the stationary growth phase, studied cultural changes induced by transfer to the stationary phase, and determined what nutrients limit the growth of particular dissociants. The nutritional requirements of the dissociants are discussed in relation to our earlier data.

Key words: dissociation, *Pseudomonas aeruginosa*, requirement for major nutrients.