

© Л. А. Магданова,  
Н. В. Голясная

Институт экологии и генетики  
микроорганизмов УрО РАН,  
Пермь

✿ **Анализировали бактериальные популяции стабильных компонентов микрофлоры системы плавательных бассейнов: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus sp.*, *Acinetobacter lwoffii*, *Pseudomonas alcaligenes*. Микроорганизмы демонстрируют стабильную во времени гетерогенность популяций по признакам интенсивностей мутагенеза и биоуплотнения. При этом частота встречаемости слабого мутаторного фенотипа составляет 10–20 %, гипермутаторного фенотипа — около 1 %. Результаты отражают высокую степень генетической пластичности и адаптивности бактерий в условиях голодного стресса и постоянной обработки биоцидами.**

✿ **Ключевые слова:** гетерогенность популяции; мутагенез; толерантность к биоцидам; биоуплотнение.

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И МОРФОТИПИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ПЛАВАТЕЛЬНЫХ БАССЕЙНОВ

Универсальная толерантность бактериальных биопленок обуславливает ряд проблем, связанных с лечением хронических инфекционных заболеваний, дезинфекцией медицинских приборов, бытовых и промышленных вод и водно-инженерных сооружений (Lappin-Scott et al., 2003). Рост бактерий в форме биопленки значительно повышает степень устойчивого разнообразия клеток (Boles et al., 2004). Гетерогенность (неоднородность признаков) клеток бактериальной популяции — одна из основных причин экстремальной толерантности биопленок (Lappin-Scott et al., 2003). Вариации фенотипов возникают в результате разнообразных физиологических и генетических процессов и обеспечивают выживание популяции в условиях стрессов и изменений среды (Zgur-Bertok, 2007; Boles et al., 2004).

Показано, что бактерии, обладающие мутаторным фенотипом, т. е. демонстрирующие повышенную частоту спонтанных мутаций, характеризуются значительным адаптивным потенциалом, позволяющим преодолевать различные стрессы и стимулировать формирование устойчивости к химиотерапевтическим соединениям (Taddei et al., 1997). Однако интенсивный мутагенез приводит к накоплению негативных мутаций, поэтому в природных бактериальных популяциях поддерживается оптимальное для данных условий среды соотношение частот мутаций (Sniegowski et al., 1997). Обнаружение среди клинических штаммов *Escherichia coli* высокой частоты встречаемости слабого мутаторного фенотипа привело к предположению о преобладающем значении в микроэволюции бактерий именно слабого и умеренного, но не экстремального гипермутационного фенотипа (Vaquero et al., 2004).

Настоящее исследование направлено на изучение гетерогенности популяций микробиоценоза системы плавательных бассейнов. Выбор объекта объясняется тем, что исследуемый биотоп сочетает в себе относительную простоту и стабильность физико-химических условий, практическую важность рассматриваемых микроорганизмов и частичную схожесть системы с моделью хронической инфекции, характеризующейся продолжительной экспозицией бактерий с антибиотиками, окислительным стрессом и постоянным отсевом планктонных клеток.

### ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение гетерогенности бактериальной популяции системы бассейнов по признаку частоты возникновения мутаций, ее взаимосвязи с активностью образования биопленки и адаптацией к селективному давлению.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### Выделение бактериальных штаммов

Отбор образцов производили в пределах одного водно-инженерного сооружения, включающего в себя три плавательных бассейна и их системы очистки, каждые 3 месяца в течение периода с февраля 2007 по июль 2009 гг. В качестве проб брали смывы с различных поверхностей, образцы воды из чаш бассейнов, переливного потока, механических и сорбционных фильтров. Изоляты получали из морфологически различающихся колоний, выросших при расщеплении проб на агаризованных средах Luria-Bertani (LB) и M9 (Atlas,

Поступила в редакцию 12.11.2010  
Принята к публикации 14.03.2011

2004). Чистые культуры засеивали в пробирки со скошенным агаром и хранили при 4 °С. Отбор изолятов для проведения скрининга популяции *P. aeruginosa* на предмет поиска бактерий с гипермутаторным фенотипом (частотой возникновения спонтанных мутантов более  $10^{-6}$ ) осуществляли с помощью посева проб на селективную агаризованную среду с 0,3 % цетримида (Sigma-Aldrich, США) (Atlas, 2004). Колонии с характерной для *P. aeruginosa* морфологией изолировали и использовали для экспресс-теста на гипермутационность.

### Культивирование бактерий

Культивирование бактерий осуществляли при температуре 37 °С, в LB-бульоне на орбитальном шейкере при 100 об./мин либо на агаризованной среде LB в термостате. Ночную культуру засеивали в LB-бульон в пропорции 1:100. Рабочую культуру растили до стадии середины логарифмического роста (ОП600=1.0–1.3).

### Идентификация микроорганизмов

Идентификацию бактерий проводили на основе фенотипического тестирования и секвенирования последовательностей фрагментов 16S рДНК. Для идентификации использовали таблицы, представленные в руководствах Берги по систематике и детерминации бактерий (Беркли и др., 1997а, 1997б; Garrity, 2005), стандартные микробиологические методы (Герхардт и др., 1984) и среды (Atlas, 2004). В качестве контрольных использовали музейные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (American Type Culture Collection, США), *E. coli* K12S (*E. coli* Genetic Stock Center, США), *Staphylococcus epidermidis* 33 (Коллекция ГНИИСК им. Тарасевича). Фрагменты 16S рДНК трех представителей каждого вида амплифицировали с помощью вырожденных праймеров («Евроген», Россия) 342F-GAY ACG GYC CAG ACT CCT, 1373R-CTA GCG AYT CCR MCT TCA (для грамотрицательных микроорганизмов) и 390F-GGG AGG CAG CAG TRG GGA A, 1168R-CGC TCG TTR CGG GAC TTA (для грамположительных микроорганизмов); клонировали в плазмиду pUC19 («СибЭнзим», Россия) с помощью стандартных методов молекулярной биологии (Маниатис и др., 1984) и секвенировали с помощью M13–20 праймеров («СибЭнзим», Россия) на секвенаторе MegaBACE™ 1000 согласно рекомендациям производителя. Выравнивание последовательностей ДНК производили с помощью алгоритма BLAST на сайте NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### Определение частоты спонтанных мутантов (ЧСМ)

ЧСМ определяли на агаризованной среде LB с рифампицином (Sigma-Aldrich, США) 300 мкг/мл методом, описанным ранее (Mena et al., 2008). Здесь и далее в качестве контрольных использовали штаммы *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *S. epidermidis* 33. Клетки

5 мл рабочей культуры осаждали и ресуспендировали в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (Atlas, 2004). Для каждой суспензии готовили последовательные десятикратные разведения и высевали по 100 мкл исходных суспензий и первых двух разведений на LB-агар с рифампицином в трех повторностях. Исследовали три независимые рабочие культуры каждого изолята. Частоту мутантов определяли как отношение среднего количества выросших на агаре с рифампицином колоний к исходному количеству высеваемых клеток, определяемому методом подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ). Экспресс-скрининг изолятов *P. aeruginosa* на предмет поиска бактерий с гипермутаторным фенотипом производили с помощью посева рабочих культур по 10 капель объемом 5 мкл на LB-агар с рифампицином 300 мкг/мл. В случае формирования 10 и более колоний штаммы отбирали для более точного измерения частоты мутантов методом, указанным выше.

### Определение активности биопленкообразования (АБО)

Интенсивность формирования биопленки определяли колориметрическим методом (Merritt et al., 2005), с использованием генцианвиолета («Реахим», Россия). Каждую культуру изолята засеивали в 3 лунки планшета. Планшеты инкубировали в термостате в течение 48 ч. Оптическую плотность спиртовых элюатов генцианвиолета измеряли при 570 нм.

### Определение чувствительности к биоцидам и антибиотикам

В качестве показателя чувствительности к антибиотикам и применяемым в практике обработки исследуемой системы биоцидам использовали минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) антибиотика или биоцида. Определение МИК производили стандартным методом двукратных разведений на 96-луночном планшете (Watts et al., 2008). В качестве исходных растворов для приготовления последовательных двукратных разведений использовали 22,5 % хлорид гидроксипропилендиметиламмония (препарат Desalgine® Jet, Bayrol), 20 % полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (препарат «Биопаг-Д», Международный институт эколого-технологических проблем), 3 % гипохлорит натрия («Реахим»); рифампицин — 15 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США), стрептомицин — 25 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США), ципрофлоксацин — 5 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США). Здесь и далее исследовали по три представителя каждой субпопуляции либо каждого морфотипа *P. aeruginosa*.

### Удельная скорость роста (УСР)

Для определения УСР изолятов *P. aeruginosa* строили кривые роста стандартными методами (Герхардт и др., 1984). УСР вычисляли на участке кривой роста, соответствующем логарифмической фазе по формуле:

$$УСР = \frac{\Delta ОП_{600}}{ОП_{600} \cdot t},$$

где ОП<sub>600</sub> — начальная оптическая плотность ( $\lambda=600$  нм);  $\Delta ОП_{600}$  — изменение оптической плотности за время  $t$  (Oliver et al., 2002).

### Полуколичественное определение продукции рамнолипидов

Для сравнения продукции рамнолипидов представителей различных фенотипических групп *P. aeruginosa* использовали агар с метиленовым голубым и цетримидом (Siegmond et al., 1991). После высева и инкубации в течение 72 ч измеряли радиус образовавшегося темно-голубого гало при наблюдении в дневном свете (с точностью до 1 мм).

### Определение подвижности клеток изолятов

Подвижность «роения» (swarming motility) определяли с помощью метода, описанного ранее (Caiazza et al., 2005). Чашки Петри инкубировали 16 ч при 37 °С, затем 32 ч — при комнатной температуре, после чего измеряли средний радиус зон миграции клеток колонии.

### Определение чувствительности к пероксиду водорода

Чувствительность планктонной культуры к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> определяли методом, разработанным ранее (Vjarnsholt et al., 2005).

### Методы статистики

Статистическую обработку параметров производили при помощи программы Microsoft® Excel 2002 и пакета программ STATISTICA 6.0. Достоверность отличий параметров (ЧСМ, АБО, УСР, МИК, радиусов подвижностей роения и преципитации метиленового голубого) изолятов различных субпопуляций определяли с применением непараметрического U критерия Манна—Уитни. В случае  $p < 0,05$  отличия параметров двух независимых групп считали достоверными. Корреляцию уровней АБО и ЧСМ вычисляли с помощью непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Подсчет средних значений и стандартных отклонений, а также построение диаграмм осуществляли с помощью программы Microsoft® Excel 2002.

Все эксперименты выполняли в трех повторностях для каждого изолята.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

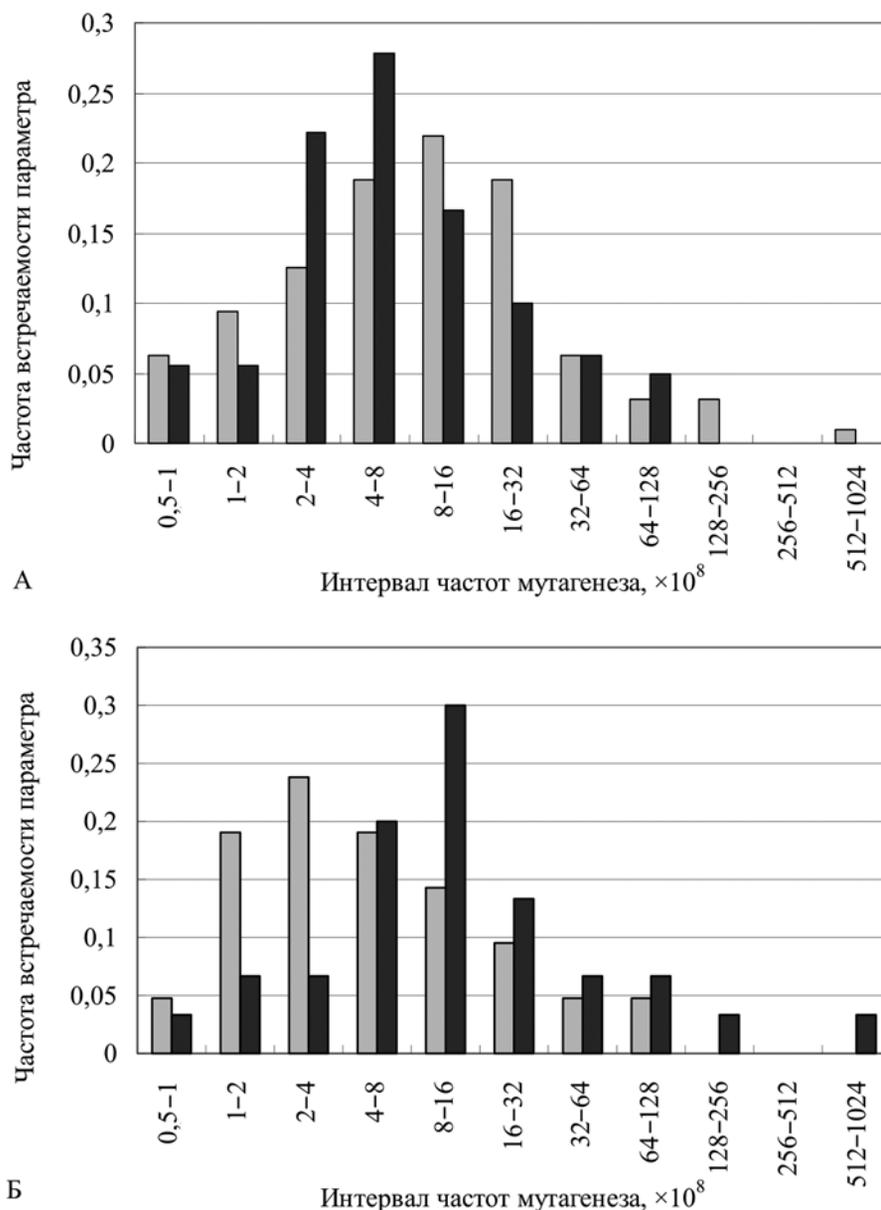
#### Выделение, идентификация и отбор бактерий.

В процессе работы отобрали 208 изолятов бактерий; 92 % идентифицированных изолятов принадлежали 8 резидентным видам, то есть видам, являющимся стабильными компонентами микрофлоры системы (обна-

руженным в пробах пяти и более дат отбора образцов). Для исследования структуры популяции выбирали виды, отвечающие следующим условиям: 1) сравнимые скорости роста; 2) широкая распространенность в рассматриваемом биотопе; 3) условная патогенность; 4) отсутствие устойчивости к рифампицину. В ряду таких видов идентифицированы *P. aeruginosa*, *Bacillus sp.* (группа *Bacillus cereus*), *Acinetobacter lwoffii*, *Pseudomonas alcaligenes*.

**Скрининг частоты мутагенеза изолятов.** Производили с целью установить моду распределения и процент штаммов с мутаторным фенотипом. К последним относили изоляты, ЧСМ которых в 10 и более раз превышала ЧСМ контрольных штаммов: *P. aeruginosa* ATCC 27853,  $(2,8 \pm 0,9) \times 10^{-8}$  (для видов *P. aeruginosa*, *A. lwoffii*, *P. alcaligenes*), и *S. epidermidis* 33,  $(4 \pm 1,2) \times 10^{-8}$  (для *Bacillus sp.*). Сравнение полученных распределений ЧСМ (рис. 1 А, Б) с данными публикаций результатов скрининга изолятов *P. aeruginosa* (Kenna et al., 2007), *E. coli* (Baquero et al., 2004) и *Bacillus simplex* (Sikorski et al., 2005) показывает заметное смещение модальных частот в сторону больших значений ЧСМ (моды ЧСМ в 2–4 раза превышают аналогичные величины для ранее описанных популяций). Смещение пика частот максимально в группе изолятов *P. aeruginosa*, мода частоты мутантов которых приблизительно в 10 раз превышает показатель, полученный в работах Кенна и соавторов  $((0,8–2,0) \times 10^{-8})$  (Kenna et al., 2007). Подобное явление описано для штаммов, выделенных из легких больных муковисцидозом. В данном случае причинами смещения пиков частот мутантов считают селективный пресс антибиотиков, гетерогенность колонизируемой среды, воздействие окислительного стресса, вызванного активизацией иммунного ответа, и первичную селекцию мутаторных штаммов при заражении (Kenna et al., 2007; Oliver, 2002). Аналогичные факторы действуют в исследуемой системе: роль селективного пресса антибиотиков выполняют биоциды, используемые в дезинфекции, тогда как окислительный стресс обусловлен хлорированием и озонированием воды.

Содержание вариантов со слабым и умеренным мутаторным фенотипом в популяциях *A. lwoffii* и *P. alcaligenes* составляют соответственно 11,5 % и 10 %, тогда как в группах изолятов *P. aeruginosa* и *Bacillus sp.* — 14 % и 17 % (рис 1 А, Б). Полученные значения превышают аналогичные показатели, выявленные ранее для природных и клинических штаммов *P. aeruginosa* (5 %) (Kenna et al., 2007) и клинических изолятов *E. coli* (4 %) (Baquero et al., 2004) и природных штаммов *B. simplex* (3–11 %) (Sikorski et al., 2005). В рамках экспресс-скрининга 125 изолятов *P. aeruginosa* выявлен один изолят бактерий с гипермутаторным фенотипом. ЧСМ штамма составляет  $2,4 \times 10^{-6}$  и превышает контрольный уровень приблизительно в 80 раз. Встречаемость гипермутаторного фенотипа в исследованной популяции соот-



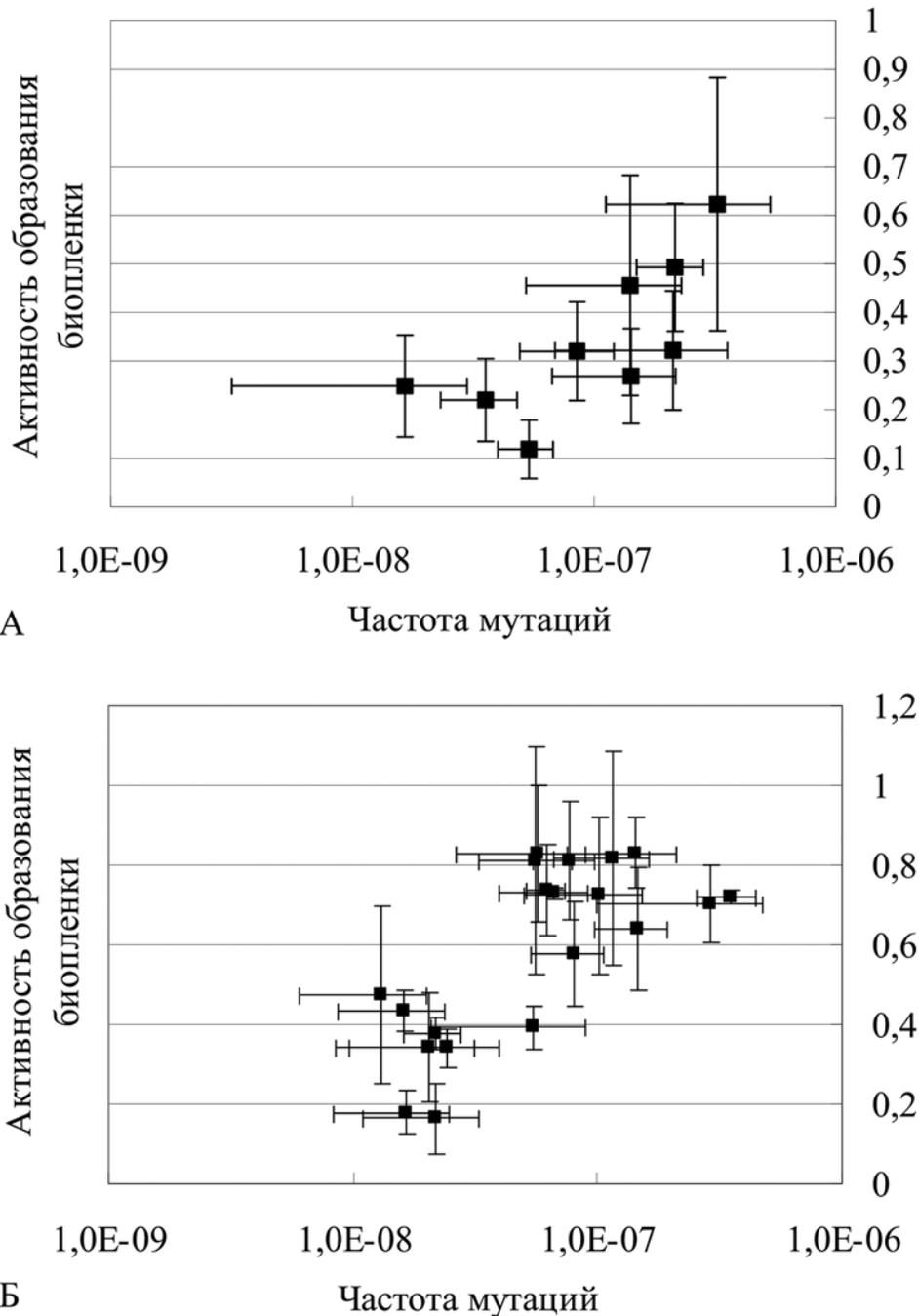
**Рис. 1.** Распределение частот мутантов в популяциях исследуемых видов: А — *P. aeruginosa* (▨) и *P. alcaligenes* (■); Б — *A. lwoffii* (▨) и *Bacillus sp.* (■).

ветствует таковой среди клинических штаммов *E. coli* и *Salmonella* (Вацего et al., 2004), тогда как в популяциях *P. aeruginosa*, обуславливающих хронические инфекции дыхательных путей, составляет от 5 % (на ранних стадиях развития инфекции) до 50 % (через 15–20 лет развития) (Кенна et al., 2007).

### Зависимость распределения ЧСМ и АБО

При измерении уровней интенсивности формирования биопленок выявлено зависимое распределение параметров ЧСМ и АБО. Наблюдается либо положительная корреляция параметров (*A. lwoffii*, рис. 2 А), либо дробление популяции на подгруппы с выраженными

различиями указанных признаков (*Bacillus sp.*, рис. 3 А; *P. aeruginosa*, рис. 3 Б). При этом для *P. alcaligenes* (рис. 2 Б) выявляется как корреляция параметров ЧСМ и АБО изолятов, так и дифференциация популяции на две субпопуляции. Коэффициент корреляции АБО и ЧСМ в группе изолятов *A. lwoffii* составляет 0,85 ( $p=0,004$ ), в группе изолятов *P. alcaligenes* — 0,62 ( $p=0,004$ ). Дифференциация на субпопуляции в пределах *P. alcaligenes*, *P. aeruginosa*, *Bacillus sp.* подтверждена с помощью методов непараметрической статистики. Результаты U-теста Манна–Уитни указывают на статистическую достоверность различий интенсивностей мутагенеза либо биопленкообразования в популяциях исследуемых ви-

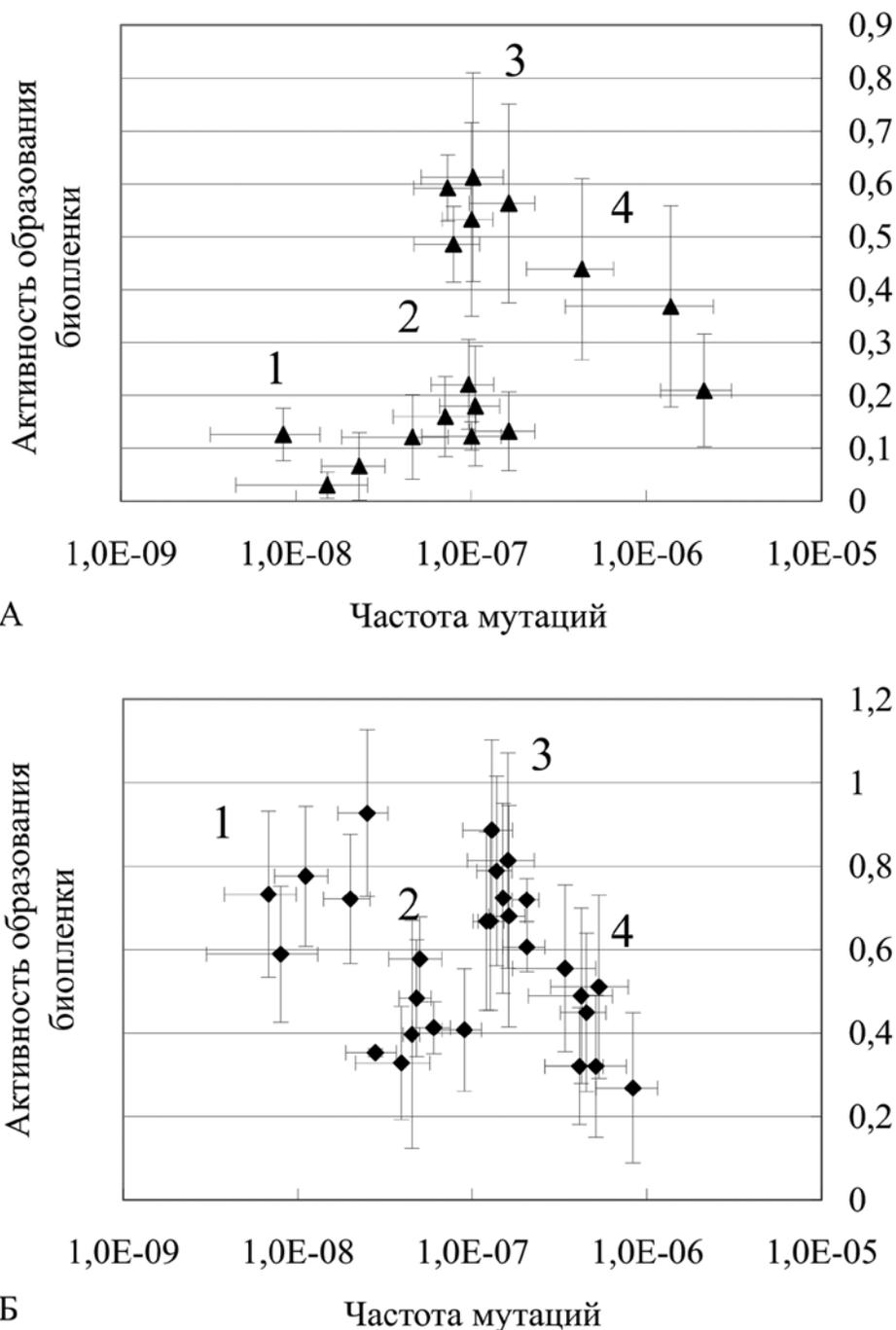


**Рис. 2.** Зависимость распределения интенсивностей мутагенеза и биопленкообразования в популяциях: А — *P. alcaligenes*, Б — *A. wolffii*. Указаны средние значения и стандартные отклонения

дов. Представителей различных субпопуляций обнаруживали на протяжении всего периода исследования, то есть выявленная дискретная гетерогенность популяций является стабильной во времени.

Можно выделить три группы гипотез, призванных объяснить наблюдаемое распределение параметров: 1) дискретная гетерогенность популяций отражает разнообразие штаммов, первично заселивших исследуемый биотоп; 2) фенотипически различные субпопуляции

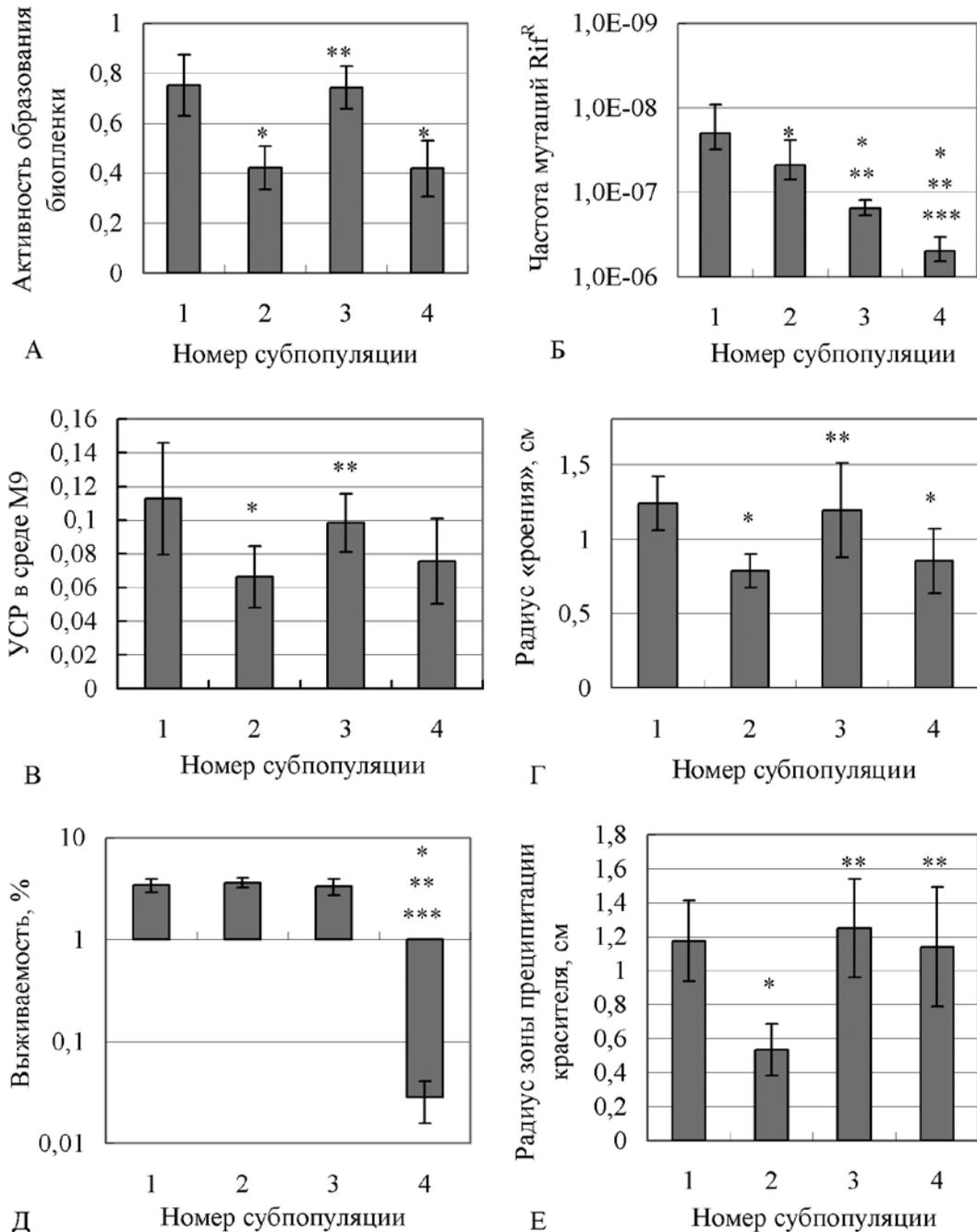
микроорганизмов возникли в результате кладогенеза на ранних стадиях колонизации биотопа; 3) субпопуляции представляют собой варианты, постоянно появляющиеся в популяции. Первая и вторая гипотезы не согласуются с принципом конкурентного исключения Гаузе, согласно которому два фенотипически близких варианта организмов не могут длительно существовать в пределах одного биотопа. В рамках третьей гипотезы в качестве причины возникновения описанных субпопуляций предположи-



**Рис. 3.** Зависимость распределения интенсивностей мутагенеза и биопленкообразования в популяциях: А — *Bacillus sp.*; Б — *P. aeruginosa*. Указаны средние значения и стандартные отклонения. Номера (1–4) на диаграммах обозначены выявленные субпопуляции изолятов, различающихся величиной указанных параметров

ли последовательное и взаимообусловленное развитие соответствующих фенотипов, направление которого диктуется экологическими условиями и особенностями физиологии микроорганизмов. Для анализа способов формирования наблюдаемой неоднородности фенотипов взяли вид *P. aeruginosa*, наиболее изученный в контексте биопленкообразования и мутагенеза (Cornelis, 2008). Вероятными претендентами на роль факторов, опре-

деляющих развитие выявленных фенотипов, являются системы чувства кворума. Ранее зарегистрирована корреляция встречаемости в клетках мутаторных мутаций и мутаций в генах *lasR* и *rhIR*, кодирующих регуляторные белки систем межклеточного сообщения *P. aeruginosa*. Явление объясняют последовательным развитием конститутивного мутаторного фенотипа на базе повышения чувствительности к АФК, вызванного нарушением сис-

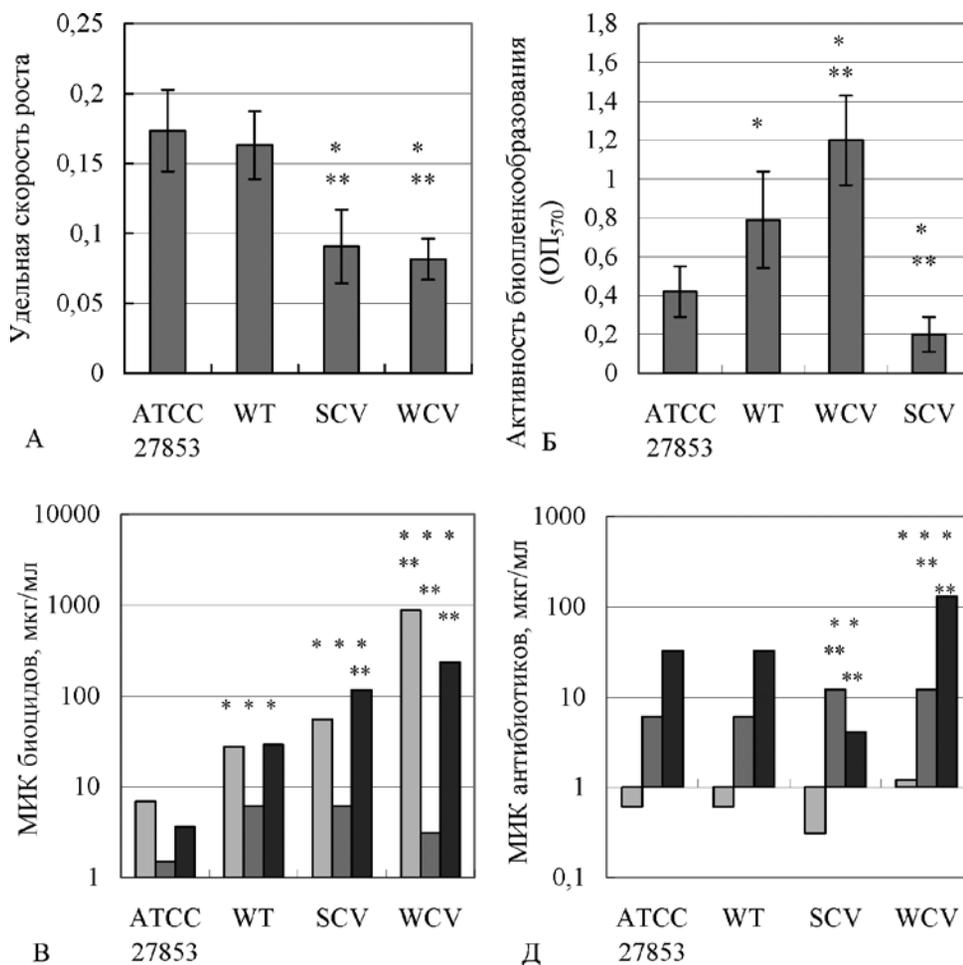


**Рис. 4.** Фенотипические свойства изолятов выявленных субпопуляций *P. aeruginosa*: А — активность биопленкообразования; Б — частота мутантов, устойчивых к рифампицину; В — удельная скорость роста в среде М9; Г — подвижность «роения»; Д — чувствительность к окислительному стрессу; Е — продукция рамнолипидов. Указаны средние значения и стандартные отклонения параметров. \* — достоверное отличие от параметров субпопуляции 1; \*\* — достоверное отличие от параметров субпопуляции 2; \*\*\* — достоверное отличие от параметров субпопуляции 3.

тем чувства кворума (Bjarnsholt et al, 2010). Для проверки предположения измерили экспрессию ряда функций, регулируемых системами *las* и *gHl*.

**Функции, зависящие от активности систем чувства кворума.** Представители субпопуляции 4 (бактерии с мутаторным фенотипом) выявили резкое снижение чувствительности клеток к действию пероксида водорода (рис. 4 Д),

тогда как продукция рамнолипидов (рис. 4 Е) и подвижность «роения» (рис. 4 Г) достоверно не отличались от параметров контрольной субпопуляции 2. Результаты подтверждают предположение об обусловленности развития мутаторного фенотипа нарушением антиоксидантной защиты микроорганизмов, однако, по-видимому, гены системы чувства кворума здесь участия не принимают. По сравнению с субпопу-



**Рис. 5.** Физиологические свойства морфотипов *P. aeruginosa*: А — удельная скорость роста в ЛВ-бульоне; Б — активность биопленкообразования; В — чувствительность к биоцидам: □ — гидроксипропилендиметиламмония хлориду, ▨ — полигексаметиленгуанидин гидрохлориду, ▩ — гипохлориту натрия; Г — чувствительность к антибиотикам: □ — ципрофлоксацину, ▨ — стрептомицину, ▩ — рифампицину. ATCC 27853 — контрольный коллекционный штамм; WT — штаммы дикого типа; SCV — изоляты вариантов с мелкими колониями; WCV — изоляты вариантов с «морщинистыми» колониями. \* — достоверные отличия от параметров контрольного штамма ATCC 27853; \*\* — достоверные отличия от параметров дикого типа.

ляцией 2, фенотипически соответствующей контрольному штамму *P. aeruginosa* ATCC 27853, субпопуляции 1 и 3 демонстрировали достоверно более высокие уровни развития признаков, зависящих от социального поведения и межклеточного сообщения (рис. А, Г, Д, Е). Наблюдаемое явление можно объяснить последовательным развитием признаков: сначала активного биопленкообразования (развитие субпопуляции 1 из субпопуляции 2), а затем конститутивного гипермутационного (субпопуляция 3 из субпопуляции 1). При этом связующим звеном, по-видимому, выступает интенсификация мутагенеза за счет стресс-индуцируемых механизмов, активизирующихся в условиях роста в составе биопленок (Lappin-Scott et al., 2003).

**Морфотипические варианты *P. aeruginosa***

Масштабы гетерогенности природных популяций вида *P. aeruginosa* по признаку активности биопленкообразова-

ния могут различаться. В условиях длительного роста в составе биопленок бактерии продуцируют ряд разнообразных морфотипов, т. е. вариантов, отличающихся морфологией колоний, образуемых на агаризованной среде (Boles et al., 2004). Возникновение морфотипов связывают с фазовыми вариациями (Webb et al., 2004), то есть соответствующие мутации происходят с высокой частотой и являются адаптивными для данных условий среды. В период исследования выделено три ранее описанных (Cornelis, 2008) морфотипа *P. aeruginosa*: «морщинистый» (далее WCV); вариант с мелкими колониями (далее SCV); вариант дикого типа (WT). Оба нетипичных варианта обладали выраженной биохимической инертностью и медленным ростом в питательной среде (рис. 5 А). Изоляты WCV демонстрировали исключительно высокую способность к образованию биопленки (рис. 5 Б) и интенсивную автоагрегацию в жидких средах. Уровень биопленкообразования варианта, опреде-

ленного в данной работе как SCV, оказался ниже соответствующего параметра дикого типа, тогда как SCV-варианты, изолируемые из легких больных муковисцидозом, как правило, отличаются повышенной активностью формирования биопленки (Cornelis, 2008). Объективная оценка ЧСМ морфотипов SCV и WCV затруднена ввиду значительных различий уровней чувствительности к антибиотикам, используемым для определения частоты мутантов (рис. 5 В). Минимальные МИК культур клеток SCV-морфотипа обуславливают низкие частоты формирования колоний на среде с рифампицином, в то время как экстремально высокие МИК, характерные для WCV-варианта, приводят к значительной переоценке ЧСМ при рутинном скрининге. Изоляты морфотипов SCV и WCV выявили наиболее высокие уровни МИК биоцидов (рис. 5 Г). Морфотипы SCV и WCV *P. aeruginosa* преобладали в пробах, отобранных после агрессивной обработки бассейнов препаратами Desalgine® Jet и NaClO, когда большая часть культивируемой микрофлоры погибала. По-видимому, SCV- и WCV-варианты *P. aeruginosa*, являются формами, приспособленными к переживанию сильных стрессов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стабильное присутствие в популяции вариантов с низкой конкурентоспособностью в обычных условиях обеспечивает выживание всей популяции при стрессе либо резком изменении факторов среды. В текущей работе исследовали биотоп, имеющий промежуточное положение между природной и лабораторной системами. Гетерогенность популяций исследованных видов реализуется посредством как специфических (фазовые вариации), так и неспецифических механизмов; стабильна во времени и является как результатом, так и средством адаптации целой популяции к условиям существования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 07-04-96000-р\_урал\_a (2007–2009).

## Литература

1. Беркли Р. и др., 1997. Определитель бактерий Берджи. В 2 т. Т.1. Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта и др. М.: Мир, 432 с.
2. Беркли Р. и др., 1997. Определитель бактерий Берджи. В 2 т. Т. 2. Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта и др. М.: Мир, 368 с.
3. Герхардт Ф., 1984. Методы общей бактериологии. В 3 т. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта и др. М.: Мир, 264 с.
4. Маниатис Т. И., Фрич Э., Сэмбрук Дж., 1984. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Пер. с англ. М.: Мир, 480 с.
5. Atlas R. M., 2004. Handbook of Microbiological Media. 3rd ed. / Eds. R. M. Atlas. London: CRC Press, 2051 p.
6. Baquero M. R., Nilsson A. I., Turrientes M. C., 2004. Polymorphic mutation frequencies in *Escherichia coli*: emergence of weak mutators in clinical isolates // J. Bacteriol., Vol. 186. N 16. P.5538–5542.
7. Bjarnsholt T., Jensen P. Ø., Burmolle M. et al., 2005. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent // Microbiology. Vol. 151. P.373–383.
8. Bjarnsholt T., Jensen P. Ø., Jakobsen T. H. et al., 2010. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients // PLoS One. Vol. 5. N 4. e10115.
9. Boles B. R., Thoendel M., Singh P. K. Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities // Appl. Environ. Microbiol. Vol. 71. N 3. P.1163–1168.
10. Caiazza N. C., Shanks R. M. Q., O’Toole G. A., 2005. Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol., Vol. 187. N 21. P.7351–7361.
11. Cornelis P., 2008. *Pseudomonas*: genomics and molecular biology. Horizon Scientific Press. 244 p.
12. Garrity G. M., 2005. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. Vol. 2. / Eds. D. J. Brenner et al. New York: Springer, 1388 p.
13. Kenna D. T., Doherty C. J., Foweraker J. et al., 2007. Hypermutability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis // Microbiology. Vol. 153. P.1852–1859.
14. Lappin-Scott H. M., Costerton W. J., 2003. Microbial Biofilms. 2nd ed. / Eds. H. M. Lappin-Scott, W. J. Costerton. Cambridge University Press, 328 p.
15. Mena A., Smith E. E., Burns J. L. et al., 2008. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation // J. Bacteriol. Vol. 190. N 24. P. 7910–7917.
16. Merritt J. H., Kadouri D. E., O’Toole G. A., 2005. Growing and analyzing static biofilms // Current Protocols in Microbiology. 2nd ed. / Eds. R. Coico. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1B.1.1–1B.1.17.
17. Oliver A., Baquero F., Blázquez J., 2002. The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants // Mol. Microbiol., Vol. 43. N 6. P.1641–1650.
18. Shehata T. E., Duran A., Collins E. B., 1971. Influence of temperature on the growth of psychrophilic strains of *Bacillus* // J. Dairy Sci. Vol. 54. N 11. P. 1579–1582.
19. Siegmund I., Wagner F., 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar // Biotechnol. Tech. Vol. 5. N 4. P. 265–268.

20. Sikorski J., Nevo E., 2005. Adaptation and incipient sympatric speciation of *Bacillus simplex* under microclimatic contrast at "Evolution Canyons" I and II, Israel // PNAS. Vol. 102. N 44. P. 15924–15929.
21. Sniegowski P. D., Gerrish P. J., Lenski R. E., 1997. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli* // Nature. N 387. P. 703–705.
22. Taddei F., Radman M., Maynard-Smith J. et al., 1997. Role of mutator alleles in adaptive evolution // Nature. N 19. P.700–702.
23. Watts J. L., Shryock T. R., Apley M. et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard. 3rd ed. // Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI document M31–A3.
24. Webb J. S., Lau M., Kjelleberg S., 2004. Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // J. Bacteriol. Vol. 186. N 23. P.8066–8073.
25. Zgur-Bertok D. Phenotypic heterogeneity in bacterial populations // Acta Agric. Slovenica. 2007. Vol.90. N 1. P.17–24.

#### GENETIC AND MORPHOTYPIC HETEROGENEITY OF SWIMMING POOL BACTERIAL POPULATIONS

L. A. Magdanova, N. V. Golyasnaya

✿ **SUMMARY:** The populations of resident bacterial species of the swimming pool community such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus sp.*, *Acinetobacter lwoffii* and *Pseudomonas alcaligenes* were analyzed. All these species showed stable in time heterogeneity by spontaneous mutation frequency and biofilm forming ability. There was notably high occurrence of mutators in all investigated populations. Our results show high level of genetic plasticity and adaptivity under conditions of starvation and exposure to biocides.

✿ **KEY WORDS:** population heterogeneity; mutagenesis; tolerance to biocides; biofilm.

#### ✿ Информация об авторах

**Магданова Лариса Альбертовна** — инженер-исследователь. Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, лаборатория химического мутагенеза. E-mail: lakonic@rambler.ru.

**Голясная Надежда Викторовна** — научный сотрудник, к. б. н. Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, лаборатория химического мутагенеза. E-mail: lakonic@rambler.ru.

**Magdanova Larisa A.** — research engineer. Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Department of Russian Academy of Sciences, Chemical Mutagenesis Laboratory. E-mail: lakonic@rambler.ru.

**Golyasnaya Nadezhda V.** — research assistant, Ph.D. Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Department of Russian Academy of Sciences, Chemical Mutagenesis Laboratory. E-mail: lakonic@rambler.ru.