

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ім. А.К.ЗАВОЛОТНОГО

На правах рукопису

РЕВА ОЛЕГ МИКОЛАЙОВИЧ

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ
ПРИРОДНИХ ІЗОЛЯТІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *VACCILLUS* В ЗВ'ЯЗКУ З
ПЕРСПЕКТИВОЮ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ

03.00.07 – мікробіологія

А б т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового
ступеня кандидата біологічних наук

Київ – 1995 р.



АВ 32.367

Дисертація в рукописі

Робота виконана у відділі антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України.

Науковий керівник - доктор медичних наук, професор,
академік НАН України В.В.Смирнов.

О ф і ц і й н і о п о н е н т и :

Доктор медичних наук - Сельнікова О.П.

Кандидат біологічних наук - Ногіна Т.М.

Провідна установа - Український державний медичний університет ім. О.О.Богомольця МОЗ України.

Захист відбудеться "17" травня 1995 р о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.06.01 при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України (252143, Київ-143, вул.Заболотного 154, Інститут мікробіології і вірусології НАН України, зал засідань).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

Автореферат розісланий " " _____ 1995 р.

Вчений секретар
спеціалізованої Ради
кандидат біологічних наук

Л.М.Пуріш.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Нові препарати, що містять живі культури сапрофітних мікроорганізмів, знайшли застосування і чудово себе зарекомендували в медицині, сільському господарстві, рослинництві, для очищення ґрунту від хімічних забруднень і радіоізотопів, відновлення родючості ґрунту і його біосочіщення від патогенної мікрофлори та ін. До числа найбільш перспективних мікроорганізмів слід віднести бактерії роду *Bacillus* (Смирнов с соавт., 1992; Vanbelle et al. 1990).

Для сапрофітних бацил є властивим поєднання таких ознак, як повна безпечність для теплокровних і вищих рослин, значна ферментативна активність, спроможність здійснювати біодеградацію складних хімічних сполук, зв'язувати іони важких металів і радіонуклідів (Смирнов с соавт. 1993; Adami et al. 1993; Janiyani et al. 1993).

Досвід практичного використання таких пробіотиків, як біоспорин і бактерин-СЛ свідчить про те, що їх застосування у ряді випадків має переваги в порівнянні з використанням антибіотиків і хімічних препаратів (Вьюницкая с соавт. 1990; Войчишина с соавт. 1991). Це відсутність протипоказань, побічних і алергічних реакцій; висока активність невеликих доз препаратів, комплексний характер впливу на організм, який поєднує локальну антимікробну дію, підвищення неспецифічної і специфічної імунної відповіді, антитоксичний ефект, зв'язування іонів важких металів і радіонуклідів та ін.

Рід *Bacillus* є надзвичайно гетерогенним по морфо-фізіологічних ознаках і біологічних властивостях (Смирнов с соавт. 1983; Chiarini et al. 1993). Ідентифікація бацил до цього часу викликає певну складність, оскільки більшість фенотипо-

вих ознак не є стабільними у межах одного виду (Priest et al. 1987). Тому однією з головних проблем було розробити нові підходи і вдосконалити існуючі методи ідентифікації бактерій.

Важлива ознака, на якій базується скринінг перспективних культур, це специфічне, вузькоспрямоване пригнічення росту патогенів, зумовлене синтезом антибіотичних речовин і гідролітичних ферментів. Але штами бактерій, навіть у межах одного виду, сильно різняться як по інтенсивності, так і по спрямованості антимікробної дії. Скринінг полягає у тому, щоб знайти штами, які максимально відповідають вимогам конструювання конкретного біопрепарату, тобто забезпечували б вибіркове пригнічення певної групи патогенних культур. Тому було важливим створити на підставі факторного аналізу мікробного антагонізму автоматизовану систему пошуку культур відповідно до попередньо заданих вимог.

Встановлено, що корисний вплив сапрофітних бактерій на організм зумовлений унікальним поєднанням комплексу біологічних властивостей. Було зроблено припущення про існування екологічно відокремлених груп мікроорганізмів, які становлять екзогенний компонент нормальної мікрофлори вищих організмів, або ендоситну мікрофлору вищих рослин. Виникла необхідність проведення глибокого і детального аналізу біологічних особливостей цих груп мікроорганізмів і визначення у бактерій корисних фізіологічних властивостей, сукупність яких обґрунтована тривалою сумісною еволюцією мікроорганізмів і вищих організмів; створення алгоритму пошуку найбільш доцільних штамів.

Мета роботи. Провести порівняльну характеристику біологічних властивостей бактерій роду *Bacillus* стосовно перспектив їх використання. Розробити алгоритм визначення і аналізу

жорстких властивостей у природних ізолятів, створення колекції перспективних культур і проведення швидкого скринінгу серед культур колекції штамів відповідно до попередньо заданих вимог.

Завдання дослідів.

1. Розробити нові додаткові підходи швидкої і надійної видової диференціації бацил.

2. Провести факторний аналіз антагоністичної активності у бактерій роду *Bacillus* і розробити класифікацію бацил-антагоністів на групи в специфічному напрямком антимікробної дії.

3. Розробити алгоритм прогнозування антагоністичної активності і проведення швидкого і надійного скринінгу перспективних культур.

4. Визначити у штамів різних груп бацил-антагоністів біологічні властивості, які є важливими для практичного використання даних культур (серед яких: лізис клітин патогенів і деструкція складних хімічних речовин-забруднювачів ґрунту).

5. З числа вивчених штамів скласти колекцію культур з комп'ютерним програмним забезпеченням оперування базою даних, аналізу біологічних властивостей і пошуку найбільш перспективних культур відповідно до заданих вимог.

Наукова новизна роботи. Запропановані додаткові, принципово нові підходи видової диференціації згідно з чутливістю до антибіотиків і специфічним споживанням амінокислот сироватки крові. Наукова цінність розроблених методів полягає також у використанні кількісних даних, статистика аналізу і використання яких для цілей ідентифікації недостатньо розвинута.

Вперше розроблено математичну модель факторного впливу штамів-антагоністів на тест-культури, у якій факторні коефіцієнти незалежно відтворюють якісні і кількісні характеристики явища мікробного антагонізму.

Проведено класифікацію бацил-антагоністів на групи з характерним для кожної з них спектром чутливих тест-культур. Доведено, що запропонований розподіл культур на групи відображає еволюційно обгрунтоване пристосування до певних екологічних ніш з специфічним мікробним оточенням.

Розроблено метод визначення ймовірних значень пригнічення росту тест-культур штамми-антагоністами. Метод дозволяє швидко і з високим рівнем вірогідності проводити пошук найбільш активних антагоністів відносно заданих тест-культур без виконання прямих експериментальних досліджень.

Запропоновано прикладну комп'ютерну програму, яка дозволяє швидко і ефективно аналізувати біологічні властивості природних ізолятів і формувати з них колекцію культур, перспективних для створення біопрепаратів.

Практичне значення.

Отримані результати дозволили значно вдосконалити і скоротити термін і матеріальні витрати на проведення таких важливих етапів конструювання біопрепаратів, як аналіз перспектив використання нових ізолятів, пошук штамів і їх комбінацій, які найбільше відповідають конкретним вимогам дослідника.

Створено робочу колекцію бацил-антагоністів і розглянуто можливість використання штамів з різних груп і їх комбінацій у медичній і ветеринарній практиці, для захисту рослин від грибних і бактеріальних інфекцій. З різних груп бактерій відібрано культури з унікальним поєднанням біологічних влас-

тивостей і запропоновані практичні рекомендації щодо їх використання у складі біопрепаратів, у тому числі - комбінованих.

Апробація роботи. Головні результати доповідалися і були відзначені преміями на звітних наукових конференціях Інституту мікробіології і вірусології НАН України за 1992 і 1993 рр. Досліди по темі дисертації були підтримані грантом Національної Академії Наук України для проведення фундаментальних досліджень молодими вченими на 1994 р., відзначені особистою стипендією президента України на 1994 - 1995 рр і золотою медаллю з премією НАН України для молодих вчених за кращу роботу 1994 р.

Публікації. По матеріалах дисертації опубліковано 4 наукові роботи і одна праця прийнята до друку.

Структура і об'єм дисертації. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, експериментальної частини з 6 розділів власних досліджень і обговорення отриманих результатів, висновків і списку цитованої літератури. Робота викладена на 130 сторінках машинопису, ілюстрована 20 таблицями, 8 малюнками і 10 фотокартками. Бібліографічний вказівник містить 150 робіт, з яких 44 вітчизняних і 106 іноземних авторів.

Положення, що виносяться на захист.

1. Був розроблений принципово новий додатковий підхід до ідентифікації бактерій роду *Bacillus* по їх чутливості до антибіотиків і вдосконалений метод аналізу видоспецифічного споживання амінокислот сировотки крові.

2. Вперше для вивчення явища бактеріального антагонізму був використаний метод факторного аналізу, в наслідок чого проведено порівняльний аналіз антимікробної активності бацил

по кількісним і якісним показникам і показана можливість розраховувати з великою достовірністю ймовірні значення пригнічення росту тест-культур виключаючи прямі експериментальні дослідження.

3. Доказаний дискретний характер мінливості у бацил явища антагоністичної активності по спрямованості впливу. Це створює можливість відокремити групи штамів-антагоністів з специфічним для цієї групи спектром чутливих тест-культур і комплексом інших біологічних властивостей, які еволюційно сформувалися за тривалий час існування в певній екологічній ніші.

4. Створено робочу колекцію бактерій роду *Bacillus*, перспективних для використання у складі біопрепаратів. В основу формування колекції покладена система аналізу і статистичної обробки даних, адаптована до використання обчислювальної техніки, яка дозволяє ефективно і швидко тестувати і приєднувати до складу колекції нові ізоляти і проводити серед колекційних культур таких штамів, що відповідають попередньо заданим вимогам.

5. Запропоновано комп'ютерну робочу програму, завдяки якій можна швидко і надійно виконувати аналіз біологічних властивостей природних ізолятів стосовно перспектив їх подальшого використання.

З М І С Т Р О Б О Т И

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В роботі використовували 257 штамів роду *Bacillus*, виділених з різних місць існування, які належали до 16 видів. Штами виділяли з ґрунту, ризосфери, інтактних внутрішніх тканин рослин, крові і шлунково-кишкового тракту людини і тварин. Видову приналежність штамів визначали керуючись VI-I виданням визначника Бергі і згідно з "Методическими рекомендациями по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus*" (Смирнов с соавт., 1983).

Чутливість до антибіотиків вивчали методом дисків на середовищі Гаузе-2. Використовували стандартні диски з антибіотиками: мономіцином, олеандоміцином, окоациліном, ристоміцином, гентаміцином, левоміцетином, ампіциліном, еритроміцином, поліміксином, канаміцином, лінкоміцином, карбеніциліном, метициліном, неоміцином, тетрацикліном, стрептоміцином і бензилпенициліном. Культури інкубували добу при 37°C і заміряли діаметри зон затримки росту.

Переважає споживання амінокислот з сироватки крові визначали по методу, запропонованому Резніком з співавт. (1982 р). Використовували сироватку крові великої рогатої худоби, звільнену від високомолекулярних сполук осадженням сульфосалициловою кислотою. Культури засівали у пробірки з середовищем і інкубували на качалці протягом 18 годин при 28°C. Визначали вміст окремих амінокислот в контролі і в досліді на амінокислотному аналізаторі Biotronic LC 5001.

Антагоністичку активність бацил вивчали методом відс-

троченого антагонізму (Вьюницкая, 1988). Як тест-культури використовували штами патогенних і умовно патогенних для теплокровних, а також фітопатогенних бактерій і грибів.

Лізоцимну активність визначали чашковим методом Nawiger (Вьюницкая, 1988). Як тестову використовували добову культуру *Micrococcus luteus* 2665. Штами бацил засівали окремими колоніями, вирощували при 37°C на протязі доби, вбивали паров хлороформу і заливали розплавленим МПА що містив тест-культуру у кількості 10⁵ кл/мл.

Літична активність. Штам-антагоніст вирощували у пробірках в 20 мл рідкого середовища Гауге-2 (початкова кількість клітин під час засіву - 5×10⁵ кл/мл середовища) на качалці на протязі 3 діб. Культуральну рідину центрифугували і додавали 0,5 мл супернатанту (у контролі - фізіологічного розчину) до 2,5 мл суспензії живих клітин тест-культури (10⁵ кл/мл). Літичну активність визначали по зниженню оптичної щільності суспензії при довжині світлової хвилі 540 нм. Активність була виражена у одиницях, що розраховувалися за рівнянням:

$$E = -\ln(\rho/\rho_0)/(t-t_0)$$

де ρ/ρ_0 - відношення кінцевої і початкової оптичної щільності суспензії;

$t-t_0$ - протяг часу.

Вимірювали зменшення оптичної щільності суспензії через 45 хв., 90 хв. і 45 хв. між першим і другим вимірюванням і визначали середнє значення.

Деструкція вуглеводнів нафти. Бактерії вирощували на синтетичному середовищі, що містило (г/л): нафту сирець - 10,0; NH₄NO₃ - 1,0; MgCl₂ - 0,1; KH₂PO₄ - 3,0; K₂HPO₄ - 7,0; CaCO₃ - 1,0; pH середовища - 7,2. Бактеріальні культури ви-

рошували у колбах з об'ємом суспензії 100 мл на качалці при температурі 30°C.

Оптичну щільність бактеріальної суспензії визначали після триразового відмивання біомаси від живильного середовища і реосуспендування. Заміри проводили на фотоелектрокалориметрі ФЕК-56 М при довжині світлової хвилі 540 нм (протяг оптичного шляху - 3 мм). Емульгуючу спроможність культуральної рідини визначали по методу Cooper et al., 1987. Визначення загальних вуглеводнів у культуральній рідині проводили методом інфрачервоної спектрометрії на аналізаторі нафтопродуктів АН-1.

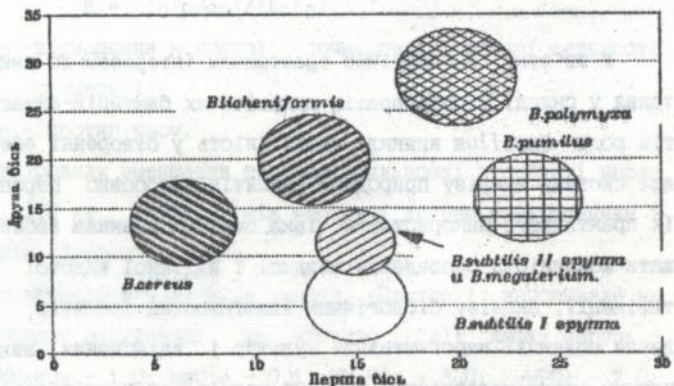
Статистична обробка даних. Проводили кореляційний аналіз, кластерний аналіз методом середніх зв'язків, дискримінантний аналіз і факторний аналіз по методу головних компонент (Носов 1990, Лакин 1973, Rosswall et al., 1978). Обчислювальні роботи проводили на комп'ютері IBM 386 SX з використанням пакетів прикладних програм QUATRO PRO і SYSTAT.

РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У зв'язку з постійно зростаючим інтересом до використання у складі біопрепаратів сапрофітних бактерій-антагоністів роду *Bacillus* виникла необхідність у створенні ефективної системи аналізу природних ізолятів стосовно перспектив їх практичного використання. Така система повинна забезпечувати можливість проведення швидкої і надійної видової ідентифікації, аналізу біологічних властивостей ізолятів, складання колекції перспективних культур і здійснення швидкого пошуку серед колекційних культур штамів, що у найбільшій мірі відповідають вимогам дослідника.

Систематика бактерій роду *Vacillus* не є досконалою, тому зберігається вацакавленність у пошуку нових підходів до видової диференціації бацил.

Нами були встановлені суттєві міжвидові розбіжності у чутливості до олеандоміцину, оксациліну, левоміцетину, ампіциліну, карбеніциліну, ристоміцину, тетрацикліну і бензилпеніциліну. Облік кількісних значень чутливості і їх перетворення для цілей видової ідентифікації бацил проводили з використанням методу дискримінантного аналізу. Були розраховані дві лінійні дискримінантні функції, рішення яких можуть бути представлені як координати штаму у двовимірному просторі. Результати обчислень експериментальних значень, отриманих для тестованих штамів найбільш поширених видів бацил, графічно відображені на Мал.1. Надійність методу ідентифікації була перевірена на культурах з відомою видовою приналежністю (у тому числі - типових), що були отримані з міжнародних колекцій мікроорганізмів. Ймовірність помилки під час ідентифікації для різних видів бацил не перебільшує 5-10%. Запропонований метод не слід розглядати як альтернативу зви-



Мал.1. Рішення першої і другої функцій для штампів 6 поширених видів бацил

ТАБЛИЦЯ 2.
Ключ ідентифікації бактерій роду *Bacillus*

Фенотипові групи	Види	Специфічність чутливості до антибіотиків I і II координати	Специфічні фенотипові ознаки	Перебачні амінокислоти
1	2	3	4	5
I група - діаметр спорангію не перебільшує товщину вегетативної клітини, анаеробний ріст (-)				
I-1 Р-ція Фогес-Проскауера гідроліз крохмалю	"+" B.subtilis	14.0 - 20.0 X 1.0 - 8.0	редукція нітратів - "+" утилізація цитрату - "+" ацетату - "-"	Ser, Gln, Cys, Met, Ile, Arg
	B.subtilis v. niger	14.0 - 20.0 X 10.0 - 13.0	Тіж самі, що і для B.subtilis; утворюють темний пігмент на середовищі Гаузе-2; не зброджують галактозу і лактозу.	Тіж самі
I-2 Р-ція Фогес-Проскауера гідроліз крохмалю	"+" B.pumilus	19.0 - 28.0 X 10.0 - 19.0	Редукція нітратів - "-"	Ser, Met, Ile, Leu, Arg
I-3 Р-ція Фогес-Проскауера гідроліз крохмалю	"-" B.megaterium	14.0 - 19.0 X 10.0 - 13.0	клітини > 3 мкм глобули у цитоплазмі ферментація глюкози - "+"	Ser, Gln, Cys, Met, Ile, Phe, His, Orn
	B.firmus	8.0 - 12.0 X 10.0 - 15.0	Редукція нітратів - "+" клітини < 3 мкм глобул відсутні	дані відсутні
	B.lentus	дані відсутні	ферментація глюкози - "+" Редукція нітратів - "+" клітини < 3 мкм глобули відсутні ферментація глюкози - "-"	дані відсутні

1	2	3	4	5	
II група - діаметр спорангію не перебільшує товщину безжовткової клітини, анаеробний ріст (+)					
II-1 Р-ція Фовес-Проскауера гідроліз крохмалю	"+" "+"	<i>B.licheni-</i> <i>formis</i>	10.0 - 20.0 X 10.0 - 13.0	Редуція нітратів - "+" газ з нітратів - "+" утилізація ацетату - "+"	Ser, Cys, Val, Met, Ile, Arg
		<i>B.cereus</i>	3.0 - 10.0 X 10.0 - 17.0	Редуція нітратів - "+" лецитіназа - "+" клітини > 3 шкв з глобулами у цитоплазмі	Ser, Gln, Cys, Ile, Arg
III група - діаметр спорангію перебільшує товщину безжовткової клітини, анаеробний ріст (-)					
III-3 Р-ція Фовес-Проскауера гідроліз крохмалю	"-" "-"	<i>B.sphaeri-</i> <i>cus</i>	17.0 - 23.0 X 17.0 - 23.0	Спори у клітині розміщені термінально, культури резис- тентні до стрептоміцину	Ser, Gly, Met, Arg
		<i>B.brevis</i>	5.0 - 10.0 X 13.0 - 18.0	Спори розміщені у центрі клітини або латерально, чутливі до стрептоміцину	Дані відсутні
IV група - діаметр спорангію перебільшує товщину безжовткової клітини, анаеробний ріст (+)					
IV-1 Р-ція Фовес-Проскауера гідроліз крохмалю	"+" "+"	<i>B.poly-</i> <i>truxa</i>	15.0 - 25.0 X 24.0 - 33.0	Редуція нітратів - "+" газ з глюкози - "+"	Дані відсутні
		<i>B.alvei</i>	20.0 - 25.0 X 10.0 - 15.0	Редуція нітратів - "-" газ з глюкози - "-"	Дані відсутні
		<i>B.coagu-</i> <i>lans</i>	18.0 - 23.0 X 5.0 - 10.0	Редуція нітратів - "-" газ з глюкози - "-"	Ser, Gla, Cys, Ile, Leu
IV-3 Р-ція Фовес-Проскауера гідроліз крохмалю	"-" "+"	<i>B.masera</i>	15.0 - 20.0 X 15.0 - 20.0	Редуція нітратів - "-" газ з глюкози - "+"	Ser, Met, Leu, Arg
		<i>B.circulan</i>	10.0 - 15.0 X 15.0 - 20.0	Редуція нітратів - "v" газ з глюкози - "-"	Дані відсутні
		<i>B.stearo-</i> <i>thermo-</i> <i>philus</i>	10.0 - 15.0 X 20.0 - 25.0	Редуція нітратів - "+" газ з глюкози - "-"	Дані відсутні
IV-4 Р-ція Фовес-Проскауера гідроліз крохмалю	"-" "-"	<i>B.latero-</i> <i>sporus</i>	8.0 - 13.0 X 13.0 - 17.0	росте при 50 C Редуція нітратів - "+"	Дані відсутні

гнучким, що дозволяє дослідникам обирати для ідентифікації шляхи і ознаки, що найбільш відповідають умовам лабораторії. Ідентифікація базується на трьох незалежних підходах диференціації по біохімічних тестах, чутливості до антибіотиків і на вибірковому споживанні амінокислот з роачину.

Наступним етапом аналізу природних ізолятів було вивчення їх антагоністичної активності, як одного з провідних факторів позитивного впливу біопрепаратів з живих культур.

Найбільша антагоністична активність була встановлена у представників видів *B. subtilis*, *B. pumilus* і *B. polymyxa*, що співпадає з літературними даними. Проте, у межах одного виду спостерігались значні розбіжності як по силі, так і по спрямованості антимікробної дії у різних штамів. Встановлено, що варіювання чутливості різних тест-культур до впливу штамів-антагоністів кореляційно пов'язані. Матриця коефіцієнтів кореляції була використована для проведення факторного аналізу по методу головних компонент. В результаті був створений факторний простір з п'яти незалежних ортогональних факторів, які на 85% визначили загальну дисперсію чутливостей тест-культур до вивчених штамів бацил-антагоністів.

Для опису пригнічення росту j -м штамом-антагоністом i -ї тест-культури нами було запропоновано наступне рівняння:

$$X_{ij} = M_i M_j (1 + a_{i1} P_{1j} + \dots + a_{ik} P_{kj}) + e$$

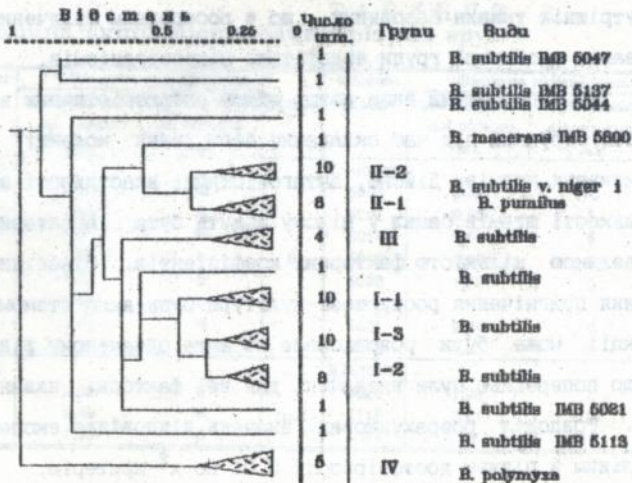
Де X_{ij} - значення пригнічення росту i -ї тест-культури j -м штамом-антагоністом;
 a_{ik} - факторне навантаження k -го фактору на i -ю тест-культуру;

M_i - усереднена чутливість i -ї тест-культури;
 P_{jk} - факторне значення k -го фактору для j -го штама-антагоніста;

M_j - усереднена активність j -го штама-антагоніста;

e - помилка методу обчислень;

Фактичне значення пригнічення росту тест-культури розглядається як зумовлене впливом врахованих факторів специфічне відхилення від середнього значення, властивого для певної пари антагоніста і тест-культури. Факторні значення штама-антагоніста можуть бути розраховані згідно з вище вказаним рівнянням по методу найменших квадратів по експериментальних значеннях пригнічення росту базових тест-культур в відомими факторними навантаженнями. І навпаки, факторні навантаження будь-якої тест-культури можна обчислити по експериментальних даних пригнічення її росту базовими штамами-антагоністами в попередньо визначеними факторними значеннями. Отримані факторні значення штамів-антагоністів виступають зручною базою даних для класифікації культур по групах згідно з спрямованістю антагоністичної дії по методу кластерного аналізу, оскільки, на відміну від експериментальних даних, факторні значення повністю незалежні і рівноважні. Розподіл бацил-антагоністів на групи зображено на Мал. 2.



Мал. 2. Дендрограма відношень між групами бацил-антагоністів.

Кожна з груп має свій своєрідний спектр чутливих тест-культур. Так група II спеціалізована у напрямку пригнічення росту ентеробактерій і грам-позитивних коків, III група - відносно фітопатогенних культур родів *Erwinia* і *Xanthomonas*; I група має широкий спектр чутливих культур, серед яких патогенні для теплокровних і рослин. Ці групи складають штами *B.subtilis*. Група II поряд з штамами *B.subtilis* містить штами *B.pumilus*, що вказує на подібність факторів антагонізму обох цих видів. Група IV складається з представників виду *B.polytuxa*. Для штамів цієї групи є властивим пригнічення широкого спектру тест-культур, серед яких патогенні і умовно патогенні мікроорганізми теплокровних і рослин.

Ряд штамів бацил-антагоністів мали настільки своєрідний спектр чутливих культур, що було неможливим приєднати їх до жодної групи.

Цікаво, що усі штами III групи, для яких є властивим пригнічення росту фітопатогенних культур, були ізольовані з внутрішніх тканин бавовнику, що є посереднім свідченням існування особливої групи ендоситних мікроорганізмів.

Запропонований вище метод опису антагоністичних властивостей зручний під час складання бази даних колекції перспективних штамів. Дійсно, антагоністичні властивості великої кількості штамів бацил у цілому можуть бути охарактеризовані невеликою кількістю факторних коефіцієнтів. Вірогідне значення пригнічення росту тест-культури будь-яким штамом з колекції може бути розраховане по вище означеному рівнянню, якщо попередньо були визначені для неї факторні навантаження. Розподіл розрахункових значень відповідає експериментальним з рівнем достовірності 0.01 по χ^2 -критерію.

Нами була розроблена і запропонована комп'ютерна прог-

рама, яка дозволяє проводити всі етапи, пов'язані з аналізом біологічної активності природних ізолятів, первинного визначення перспектив їх практичного застосування, складання і ефективного використання колекції промислово перспективних культур.

Було цікавим провести порівняльний аналіз деяких інших біологічних властивостей у штамів, які формують різні групи бацил-антагоністів. Так, серед факторів антагоністичного впливу особливе значення має літична активність, яка аум влена протеолітичними ферментами і бактеріальним лізоцимом (Захарова з соавт.1985).

В Табл.3 показана літична і, як складова її частина, лізоцимна активності ряду штамів бацил. Відносно культури *M.luteus* 2865 літична активність була у середньому вища у штамів II групи (максимальна у штама IMB 5012 - 3,53 од), ніж у штамів I групи (максимальна у штама IMB 5007 - 2,99

ТАБЛИЦЯ 3.
Літична активність бацил різних груп

Група	Штам (IMB)	Літична активність		Група	Штам (IMB)	Літична активність	
		культурами рідини од.	в тому числі лізоцимна мм			культурами рідини од.	в тому числі лізоцимна мм
I	<i>B.subtilis</i>			II	<i>B.subtilis</i>		
	5007	2.99	12		5008	2.89	16
	5009	1.83	0		5012	3.53	8
	5010	1.93	15		5014	2.55	5
	5017	2.32	0		5016	2.58	0
	5019	2.32	0		5038	1.72	0
	5062	1.16	0		<i>B.pumilus</i>		
	5116	1.75	4		5601	2.74	0
III	<i>B.subtilis</i>			5602	2.53	0	
	5043	2.02	0	III	<i>B.subtilis</i>		
	5049	2.49	0		5029	1.98	7
	5137	1.85	0		5113	3.61	0
				5074	1.7	12	

од). Але найбільша активність була визначена у штама IMB 5113 (3,61 од). Лізоцимна активність була визначена у 7 з 20 тестованих штамів, що належали до різних груп. Найбільш активними були штами IMB 5008, 5074 і 5010.

Крім використання біопрепаратів з лікувально-профілактичною метою і для захисту рослин, певний практичний інтерес становить створення препаратів для поновлення і підвищення родючості ґрунту. Зокрема, для біологічного очищення ґрунту від патогенних мікроорганізмів і хімічних забруднювачів.

Разом із співробітниками відділу технології біосинтезу Інституту мікробіології і вірусології НАН України нами була вивчена здатність штамів бацил здійснювати деструкцію вуглеводнів нафти. Було досліджено 91 штам бацил, які належали до різних видів. Спроможність до деструкції вуглеводнів нафти значно варіювала між штамми одного виду. Активні деструктори були визначені серед штамів *B.subtilis*, *B.licheniformis*, *B.megaterium* і *B.pumilus*. Але найбільш активні деструктори були визначені серед культур I і III груп (IMB 5007, 5018, 5045, 5112). Після 2 тижнів інкубації ступінь деструкції становив від 20 до 75% відносно до контролю.

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що розподіл бацил-антагоністів на групи має об'єктивний характер і викликаний пристосуванням мікроорганізмів до існування в різних екологічних нішах. Кожна з груп характеризується специфічним поєднанням біологічних властивостей: вибіркової антагоністичної активності, продукцією літичних ферментів, здатністю до деструкції складних речовин - забруднювачів ґрунту та ін. Окремі найбільш активні штами з різних груп, або їх комбінації, можуть бути запропоновані для використання у складі тих чи інших препаратів, залежно від мети їх конструювання. У

ТАБЛИЦЯ 4.

Середні значення прианічення росту окремих тест-культур для різних груп бацил-антагоністів.

Тест-культури:	Групи бацил-антагоністів: (середні значення діаметрів у мм)						
	I-1	I-2	I-3	II-1	II-2	III	IV
Bacillus cereus 5656	11	20	21	13	11	3	20
Salmonella equiabortus 202	10	4	7	9	12	0	16
S.typhimurium 11	11	7	10	12	15	1	21
S.newport 5751	21	14	19	7	7	6	14
S.reading 5270	40	24	32	17	19	24	32
S.westlaco 247/49	30	16	23	10	12	14	22
Shigella sonnei 659	14	9	12	12	16	6	24
Proteus vulgaris 72	17	16	17	18	18	17	27
Staphylococcus aureus 209	17	17	14	27	25	14	26
Klebsiella pneumoniae 5054	5	4	5	5	7	0	9
Micrococcus luteus 2665	24	21	21	19	17	11	18
Xanthomonas malvacearum 218	12	11	15	5	6	9	19
X.campestris 262	24	23	32	2	3	20	26
X.maltophilia 232	10	8	12	1	2	8	11
Serratia marcescens 49	5	7	7	11	11	3	14
Pseudomonas gladioli 8673	7	5	6	4	3	4	6
P.lachrimans 7395	18	9	14	7	9	9	18
P.syringae 8511	19	9	14	7	9	9	17
Erwinia carotovora 218	17	9	14	7	9	8	17
Fusarium graminis 25781	2	9	8	4	2	4	5
Verticillium dahliae 25313	4	7	7	4	2	2	5
Cladosporium sp.	1	11	7	8	4	13	4

Табл.4. показані середні розміри зон затримки росту ряду тест-культур, розраховані для різних груп. Був протестований широкий спектр бактерій і мікроміцетів патогенних і умовно патогенних для теплокровних і рослин. Так, для пригнічення росту бактерій роду *Salmonella* найбільш активних антагоністів слід шукати серед штамів груп I-1 і I-3; відносно бактерій родів *Shigella* і *Klebsiella* - II-2 і IV; відносно бактерій роду *Xanthomonas* - серед штамів груп I-2, I-3 і III; для пригнічення росту фітопатогенних мікроміцетів - серед штамів груп I-2 і III. Крім того, слід брати до уваги розбіжності між штамми різних груп по літичній активності і деструкції складних органічних сполук, міжштамовий антагонізм та ін.

В И С Н О В К И

1. Розроблено принципово новий підхід до видової диференціації бацил згідно з їх чутливістю до антибіотиків. Отриманий алгоритм запропоновано використовувати як додатковий метод ідентифікації бацил.

2. Вдосконалено метод ідентифікації бацил по переважному споживанню амінокислот сыворотки крові. Встановлений факт, що споживання амінокислот різними штамми бацил є видоспецифічним, і що однак доцільно використовувати для уточнення видової приналежності культур.

3. Розроблено ключ надійної і швидкої ідентифікації видів бацил, у якому були використані запропоновані підходи видової диференціації.

4. Розроблено факторну модель антагоністичної активності бацил, яка була покладена в основу класифікації бацил-антагоністів на групи з характерним для кожної з них спектром

найбільш чутливих тест-культур.

5. Запропонован метод прогнозування ймовірних значень антагоністичної активності бацил відносно конкретних тест-культур, що дозволяє проводити швидкий і ефективний пошук штамів, які мають заданий вибіркового спектру чутливих тест-культур.

6. Розроблено комп'ютерну програму, яка дозволяє проводити аналіз біологічних властивостей ізолятів, прогнозувати перспективність культур для практичного використання і проводити пошук штамів відповідно до попередньо встановлених вимг.

7. На основі запропонованих методів аналізу створено робочу колекцію бацил-антагоністів перспективних для практичного використання, для яких характерне унікальне поєднання вибіркової антагоністичної, літичної активностей і деструкції складних органічних сполук.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Reva O.N., V.A. Vyunitskaya, S.R. Reznik, I.A. Kozachko, and V.V. Smirnov. Antibiotic susceptibility as a taxonomic characteristic of genus *Bacillus* // Int. J. Syst. Bacteriol., 1995.-45, N2.

2. Смирнов В.В., Рева О.Н., Вьюницкая В.А. Деление бактерий антагонистов рода *Bacillus* на кластеры по спектру антагонистической активности // Микробиол. журн.-1995.-57, N1.-с.3-13.

3. Смирнов В.В., Рева О.Н., Вьюницкая В.А. Создание и практическое применение математической модели антагонистического действия бацилл при конструировании пробиотиков // Микробиология.-1995. (принята в печать).

4. Рева О.М., В'юницька В.О. Розподіл штамів бактерій роду *Bacillus* на групи за особливостями антагоністичного впливу на патогенні тест-культури // Мікробіол.журн.-1994.-56, N4.-с.80.

5. Василевская И.А., Рева О.Н., Сергейчук М.Г. с соавт. Видовая принадлежность спорообразующих бактерий песчаных отложений заповедного острова Круглик и природа продуцируемых ими слизистых веществ // Микробисл.журн.-1992.-54, N6.-с.3-9.

А Н Н О Т А Ц И Я

Рева О.Н. Сравнительная характеристика биологических свойств природных изолятов бактерий рода *Bacillus* в связи с перспективой их практического использования.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.07 - микробиология.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины, Киев, 1995.

Защищается рукопись кандидатской диссертации, которая содержит результаты экспериментальных исследований и их обсуждение в области анализа биологических свойств природных изолятов в связи с перспективой их использования в составе биопрепаратов. Культуры бацилл-антагонистов были разделены на ряд групп в соответствии со специфичностью проявлений биологических активностей. Был разработан алгоритм, реализованный в компьютерной программе, обеспечивающий анализ биологических свойств свежих изолятов, создание рабочей коллекции перспективных культур и проведение скрининга штаммов по предварительно заданным свойствам. Предложены новые подходы быстрой идентификации видов бацилл.

S U M M A R Y

Reva O.N. The comparative analysis of the biological properties of bacteria of the Bacillus genus isolated from nature in relation with perspective of their further application.

The Candidat Thesis for a Philosophy Doctor degree, the speciality 03.00.07 - microbiology. The Institute of Microbiology and Virology nm. D.K.Zabolotny of the NAS of Ukraine, Kiev, 1995.

The biological properties of the isolated from nature bacteria having been under investigation and discussion in relation with perspective of their application were represented in the Manuscript offered for defending. It was established, that bacillus-antagonists could be divided into a range of groups owning the specific combination of biological properties. A routine realised as a computer program was proposed for analysis of the biological activities of fresh isolates, creation the work collection of the perspective cultures and carrying out screening the strains according to the preliminary determined demands. New methods of quick identification of the bacillus species were represented.

Ключові слова: бацили-антагоністи, факторний аналіз, робоча колекція, біопрепарати.



Підписано до друку 04.04.95р формат 60x84/16
Папір друк. Умов. друк. л. 1,0. Тираж 100 примірник. Заказ №491
Надруковано ЦУОП ДНПП "Плодвінконсерв" м. Київ, Саксаганського,1

448778

AB 32.367