

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ
ім. Д.К.ЗАБОЛОТНОГО

на правах рукопису

ЄЛИНСЬКА
Наталія Олександрівна

БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ МОРСЬКИХ
ЦИТОФАГОПОДІБНИХ БАКТЕРІЙ

03.00.07 - мікробіологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1996



Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі мікробіології і вірусології Одеського державного університету ім.І.І.Мечникова.

Науковий керівник: доктор біологічних наук Іваниця В.О.

Офіційні опоненти: - доктор біологічних наук,

професор Гвоздяк П.І.

доктор біологічних наук,

професор Кіприанова О.А.

Провідна установа: - Інститут гідробіології

НАН України

Захист відбудеться "16" жовтня 1996 р. о 10-ій годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.81.01 по захисту дисертацій на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук при Інституті мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України за адресою:

252143, Київ - 143, вул.Заболотного, 154.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України.

Автореферат дисертації розіслано "14" вересня 1996 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

кандидат біологічних наук

Л.М.Пуріш

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Ковзні бактерії, які не утворюють плодові тіла, привертають особливу увагу завдяки своїм біологічним властивостям та активному метаболізму. Цитофагоподібні (ЦПБ) відіграють важливу роль у природі та житті людини, з одного боку, як деструктори високомолекулярних природних та синтетичних органічних сполук, з другого як продуценти ферментів, біологічно-активних речовин та антибіотиків. Бактерії цієї групи можуть викликати захворювання гідробіонтів і ссавців, у тому числі і людини. Проте ця група мікроорганізмів, як і раніше, залишається недостатньо вивченою і систематизованою. Не до кінця з'ясована роль ЦПБ в кругообігу речовин в природі, їх значення в екосистемах та взаємозв'язок з про- та еукаріотними організмами, метаболічний потенціал. Планомірні дослідження морських ковзних бактерій в даний час не проводяться. Більшість штамів морських ЦПБ ізольовано ще на початку 70-х років. Тому сьогодні виявлено значно менше видів, ніж реально існує у природі. Часто опис виду базується на одному штамі. В зв'язку з цим вилучення із природних джерел нових штамів ЦПБ, з одного боку, допоможе розширити знання біології даної групи, а з іншого - внести ясність в питання систематики.

Мета роботи. Вивчити розподіл, кількісний та якісний склад, біологічні особливості, таксономічний статус та значення в морських біоценозах вільномешкаючих хемоорганотрофних цитофагоподібних бактерій - мешканців евфотичного шару води різних зон Світового океану.

Задачі дослідження:

1. Визначення ефективності використання живильних середовищ різного складу для вилучення та кількісного обліку ковзних бактерій у морському середовищі.
2. Вивчення меж поширення ЦПБ у морському середовищі.
3. Визначення чисельності ЦПБ у морській воді та ґрунті різних районів Світового океану.

ЛНБ ім. В. Стефанишина
Львівський національний університет
імені Івана Франка

4. Вивчення закономірностей розподілу ЦПБ у північно-західній частині Чорного моря.

5. Вилучення чистих культур ковзних бактерій, вивчення їх загальних фенотипічних (морфологічних, культуральних, фізіолого-біохімічних) та генотипічних (визначення вмісту Г+Ц пар у ДНК) характеристик.

6. Визначення рівня резистентності ізольованих штамів ЦПБ до ксенобіотиків (солей важких металів, синтетичних органічних барвників, поверхнево-активних речовин, пестицидів) та антибіотиків.

7. Визначення таксономічного положення штамів ковзних бактерій, ізольованих з морського середовища.

Наукова новизна. Вперше встановлена наявність та визначена чисельність ковзних бактерій у воді відкритих зон Світового океану. Показано поширення ковзних бактерій в усіх кліматичних зонах - від тропічних до субарктичних. Вертикальні межі складають поверхневий і більш глибокі евфотичні шари води та ґрунт афотичного шару.

Вперше виявлені закономірності розподілу, чисельність та значення ковзних бактерій в північно-західній частині Чорного моря.

Показано, що цитофагоподібні бактерії відіграють вагомую роль у розкладі природних та синтетичних органічних сполук в морських біоценозах. Роль ковзних бактерій підсилюється в холодні періоди року, в умовах, коли значне зниження температури води стримує розвиток інших гетеротрофних бактерій.

Показано, що морська вода є середовищем мешкання представників різних таксономічних груп ковзних бактерій. З морської води вперше вилучено бактерії порядку *Lysobacterales* і нові види родини *Cytophagaceae*. Для морських агаролітичних видів ковзних бактерій запропоновано формування нового роду *Agarophaga* в рамках родини *Cytophagaceae*.

Практична цінність роботи. Ізольовані штами морських ковзних бактерій увійшли до фонду Одеської філії національної колекції мікроорганізмів України. Запропоновані методичні засоби та живильні середовища можуть

використовуватися для виявлення та визначення чисельності ковзних бактерій при проведенні екологічного моніторингу в різних районах Світового океану. Отримані результати використовують при читанні курсів “Загальної мікробіології”, “Біології клітини” спеціального курсу “Систематика бактерій”; увійшли до розділу спецпрактикуму “Виділення та ідентифікація бактерій”, що розроблені на кафедрі мікробіології та вірусології ОДУ.

Положення, які захищаються.

- вільномешкаючі ковзні бактерії широко розповсюджені у водах Світового океану, де складають значну частину бактеріопланктону евфотичного шару;

- в морських біоценозах ковзні бактерії представлені широким спектром таксономічних груп, між котрими переважають представники порядку Cytophagales;

- еколого-фізіологічні особливості, метаболічний потенціал, резистентність до дії широкого спектру токсичних речовин та деструктивна активність у відношенні високомолекулярних органічних сполук, забезпечують цитофагоподібним бактеріям вагомую роль в морських екосистемах.

Конкретна особиста участь автора в одержаних результатах. Робота виконана автором особисто. Добір, обробка проб у північно-західній частині Чорного моря, добір живильних середовищ, визначення чисельності, вилучення чистих культур, вивчення фенотипічних ознак, ідентифікація і виявлення стійкості ковзних бактерій до ксенобіотиків виконані автором самостійно. Добір проб в різних районах Світового океану, на прохання автора, проводився науковими співробітниками ОДУ та моряками Чорноморського морського пароплавства. Визначення вмісту Г+Ц пар в ДНК проведено в Інституті мікробіології АН Росії сумісно з к.б.н. О.М.Лисенко.

Апробація роботи. Основні результати по темі дисертації представлені на з'їздах Всесоюзного та Українського мікробіологічного товариств (м.Алма-Ата, 1985; м.Чернівці, 1989), на Всесоюзній науковій конференції “Людина - океан”

(м.Махачкала, 1990), на республіканській науково-практичній конференції (м.Одеса, 1990), на конференціях молодих учених ОДУ (м.Одеса, 1985, 1988, 1989), на засіданнях Одеського відділення Українського мікробіологічного товариства та засіданнях кафедри мікробіології та вірусології ОДУ.

Публікації. По темі дисертації опубліковано 12 друкованих робіт.

Структура та обсяг праці. Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, методичної глави, 5 глав експериментальної частини, заключної частини, висновків, списку використаної літератури, який складає 161 робота, додатка. Викладена на 152 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 21 таблицею та 19 малюнками.

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження були 69 штамів ковзних бактерій, що ізольовані у північно-західній частині Чорного моря та різних районах Світового океану у 1988-1994 рр. під час експедицій науково-дослідних суден "Антарес", "Ушаков" та в результаті поодиноких доборів проб морської води та ґрунту, а також колекційні штами *S.lytica* ВКМВ-1433 та *S.diffluens* ВКМВ-1434.

Для вилучення та визначення чисельності ковзних бактерій у воді та ґрунті використовували 20 варіантів живильних середовищ та їх модифікації. Усі середовища готували на натуральній або штучній морській воді (з додаванням 2% морської солі виробництва Сакського хімічного заводу), рН середовищ 7,2-7,4. Вилучення цитофаг здійснювали без попереднього етапу накопичуваної культури прямим висівом з відповідного розведення досліджуваної проби води на поверхню щільного середовища. Посіви культивували аеробно, при денному освітленні, при 20-22 С протягом 7-14 діб.

Чисті культури ковзних бактерій вирощували на середовищі КМ-1 (Іваница, Елинская, 1988). Визначення фенотипічних ознак проводили загальноприйнятими методами, використовуючи щільні та рідкі живильні середовища (Lewin, Lounsbery, 1966), та за допомогою систем індикаторних

паперових (СПП) підприємства по виробництву бактерійних препаратів (м. Нижній Новгород).

Електронну мікроскопію здійснювали за допомогою мікроскопу ІЕМ-100, ІЕОЛ, Японія.

Нуклеотидний склад ДНК визначали за методом теплової денатурації (Marmur et al., 1962).

Ідентифікацію бактерій проводили за Визначником бактерій Бергі (1989).

Резистентність до антибіотиків, іонів важких металів, синтетичних органічних барвників, пестицидів визначали за методом стандартних серійних розбавлень в щільному живильному середовищі.

Статистичну та графічну обробку отриманих даних виконали загальноприйнятими методами досліджень в форматі Microsoft Excel. Кластерний аналіз проводили за допомогою пакету програм "Biomatrix".

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Виділення ковзних бактерій з морського середовища. Живильні середовища.

Оцінку ефективності використання відомих з літератури (Lewin, Lounsbery, 1969; Reichenbach, Dworkin, 1981; Reinchenbach, 1981) та запропонованих нами живильних середовищ для вилучення та обліку морських ковзних бактерій здійснювали за такими критеріями: 1) легкість визначення та обліку колоній ковзних бактерій; 2) здатність до швидкого поширення колоній по поверхні середовища; 3) стимуляція утворення пігментів; 4) здатність до підтримки росту різноманітних представників ковзних бактерій.

Спектр досліджених середовищ складає 20 найменувань. Джерелом вуглецю та енергії були триптон, пептон, казеїн, знежирене молоко, глюкоза, використані окремо, або в комбінації. Концентрація живильних речовин у кожному середовищі не підвищувала 0,5%. Для затримки росту колоній супутної гетеротрофної мікробіоти до складу деяких середовищ були введені антибіотики.

Дослідження показало, що для вилучення морських цитофаг доцільним є використання середовища КМ-1, до складу якого входять пептон - 0,1%, знежирене молоко - 1%, дріжджовий екстракт - 0,02%, морська сіль - 2%, агар - 1,5%. На середовищі КМ-1 посилювалась інтенсивність забарвлення колоній, значно зростали їх розміри, що полегшувало їх облік. Термін культивування на цьому середовищі скорочувався від 7-10 до 2-3 діб.

Додання до складу середовища КМ-1 поліміксину (40 мкг/мл) показало, що на фоні зниження в 2-6 разів, порівняно з контрольним середовищем без антибіотика, загальної кількості бактерій, число виявлених ковзних бактерій вірогідно не змінювалося і становило у середньому 100-2000 КУО/мл. Відносна доля цитофаг зростала з 6-15% до 30-70% (табл. 1). Застосування селективного середовища збільшило ефективність виявлення ковзних бактерій в досліджуваних пробах з 55,5% до 83,3%.

Таблиця 1

Чисельність гетеротрофних бактерій, вилучених з поверхневого шару води Одеської затоки восени 1988 року, на середовищах КМ-1 та КМ-1+PoI

Станція	Загальна чисельність бактерій, КУО/мл		Частка цитофаг, %	
	КМ-1	КМ-1+PoI	КМ-1	КМ-1+PoI
Лузанівка	15.1 ± 1.9	3.3 ± 0.5	6.0	33.3
Порт	суцільний ріст	4.3 ± 0.2	0	59.1
Австрійський пляж	суцільний ріст	3.9 ± 1.4	0	41.0
Ланжерон	30.5 ± 5.8	5.8 ± 0.9	15.1	77.7
Мис М. Фонтан	2.4 ± 0.8	0.7 ± 0.08	2.5	12.8
Дача Ковалевського	5.7 ± 0.8	2.1 ± 0.4	0	1.9

Однак, застосування середовища з поліміксином в кожному окремому випадку повинно бути обгрунтованим. Це середовище можна застосувати для вилучення цитофаг з районів із значним бактеріальним забрудненням. При вилученні цитофаг з нових, не досліджених джерел є доцільним використання середовища КМ-1 без антибіотиків або одночасне застосування обох.

2. Поширення і чисельність ЦПБ в морських водах.

Вивчення географії поширення колових гетеротрофних бактерій у Світовому океані, визначення їх чисельності та співвідношення щодо інших груп гетеротрофних мікроорганізмів дозволило встановити, що частота виявлення їх в різних районах неоднакова.

Цитофаги виявлені у воді екваторіального, тропічного, субтропічного, субарктичного районів Світового океану та зоні помірної поясу. Виявлення їх коливалося від 13,9% (пів.-зах. частина Тихого океану) до 100% (прибережні води).

Вперше встановлена наявність та визначена чисельність цитофаг - мешканців еуфотичного шару води відкритих зон океану. Так, в екваторіальній області Індійського океану чисельність цитофаг становила 0,9 - 1,5 КУО/мл, або 5,0 - 11,8% від загальної кількості гетеротрофних мікроорганізмів (табл.2). У відкритій північно-західній частині Тихого океану число цитофаг було значно нижчим і коливалося від одиниць до сотень КУО/мл. В загальному числі гетеротрофів їх доля була незначною - 0,6 - 2,2%. Невисоким є й виявлення цитофаг в цьому регіоні - з 36 проб, відібраних з глибин 0 - 200 м на 15 станціях, цитофаги виявлені тільки в п'яти, що становить 13,9%.

Чисельність цитофаг у прибережних водах досліджених районів становила 1,5 - 20,0 тис. КУО/мл, при цьому їх частка в загальній кількості гетеротрофів складала до 35%.

Чисельність цитофаг (тис. КУО/мл) в воді різних районів Світового океану

Район дослідження	Гетеротрофи	Цитофаги	Частка цитофаг, %
Японське море	12,3 ±2,5	3,4 ±0,9	28,3
Тихий океан	38,3 ±5,2	0,2 ±0,01	2,2
Південно-Китайське море	130,0 ±24,5	19,8 ±3,4	15,2
Малакська протока	75,8 ±11,3	20,1 ±5,1	26,5
Індійський океан	18,0 ±5,4	0,9 ±0,3	5,0
Аравійське море	25,4 ±4,9	4,3 ±1,2	16,9
Червоне море	190,6 ±27,3	23,4 ±7,2	12,3
Суецька бухта	25,3 ±2,1	6,0 ±1,2	23,7
Середземне море	200,1 ±45,8	12,0 ±2,1	6,0
Егейське море	75,3 ±10,8	3,2 ±0,8	4,2
Протока Дарданели	10,0 ±1,3	3,5 ±1,0	35,0
Мармурове море	8,5 ±1,4	2,0 ±0,5	23,5
Протока Босфор	60,3 ±12,5	3,4 ±0,5	5,6

З огляду на тривалість транспортування проб ми не могли визначити чисельність, але констатували наявність цитофаг у поверхневих шарах води Балтійського, Берінгового, Іонічного, Тирренського морів та Атлантичного океану (поблизу м. Конакрі, Гвінея).

В північно-західній частині Чорного моря цитофаги звичайні мешканці водної товщі та доних відкладень. Максимальні значення (6-10 тис. КУО/мл) чисельності зареєстровані у воді Дунай-Дністровського межиріччя і Одеської затоки, мінімальні (десятки та сотні КУО/мл) - характерні для прибережжя мису Тарханкут і Каркінітської затоки. В ґрунті чисельність ковзних бактерій складає 2-50 тис. КУО/мл, що в 8-50 разів вище, ніж у морській воді.

Закономірності зміни чисельного складу ковзних бактерій у воді Одеської затоки мають сезонний характер і обернено пропорційно змінам чисельності інших гетеротрофних бактерій. Влітку, з підвищенням температури води та підсиленням рекреаційного навантаження, виявлене зростання чисельності гетеротрофної мікробіоти. В цей період число ковзних бактерій, що вилучаються було низьким і не підвищувало 1,0 тис. КУО/мл, що становило 6% від загального числа бактерій. У холодний, осінньо-зимовий період року чисельність ЦПБ підвищувалась до 6-10 тис. КУО/мл, їх частка у загальному числі гетеротрофних бактерій досягала 70-90%.

Показано, що чисельність ЦПБ не залежить від зміни таких гідрологічних характеристик, як температура, глибина, сольоність морської води. Очевидно, число ковзних бактерій в Одеській затоці регулюється концентрацією живильних речовин і швидкістю розмноження інших про- та еукаріотичних мікроорганізмів.

3. Загальна характеристика ковзних бактерій, вилучених з морського середовища.

В 1986 - 1994 рр. з морської води та ґрунту різних районів Світового океану ізолювано 69 штамів ковзних бактерій. Аналіз загальних фенотипічних ознак і вмісту Г+Ц пар в ДНК показав, що вилучені штами бактерій належать до порядків Мухосoccales, Cytophagales та Lysobacterales. Для чотирьох грампозитивних штамів таксономічне положення не встановлено (табл. 3).

Бактерії порядку Мухосoccales утворюють плодові тіла, які мають вигляд пагорбка, або складчастих структур. Утилізують полісахариди та білки, меншою мірою - вуглеводи та спирти.

Бактерії порядку Lysobacterales вилучені із поверхневого шару води Одеської затоки. Представлені поліморфними грамнегативними клітинами, шириною 0,4 мкм, довжиною 5-50 мкм. Мають дихальний тип метаболізму. Глюкозу окислюють, а не ферментують. Не утилізують інші вуглеводи та багатоатомні спирти. Гідролізують крохмаль, хітин. Мають високу протеолітичну та бактеріолітичну активність.

Таблиця 3

Таксономічний склад морських ковзних бактерій

Порядок	Число штамів	Характеристика
Muxococcales	7	Грамнегативні, здатні до ковзного руху, що утворюють плодові тіла, бактерії з вмістом Г+Ц пар в ДНК 62-68 моль %.
Cytophagales	52	Грамнегативні, здатні або не здатні до ковзного руху, що не утворюють плодові тіла, бактерії з вмістом Г+Ц пар в ДНК 35-45 моль %.
Lysobakterales	6	Грамнегативні, що не утворюють плодові тіла, рухаються за допомогою ковзання бактерії, утворюють коричневий водорозчинний пігмент
Не визначений	4	Грампозитивні, що не утворюють плодові тіла, бактерії, утворюють пігмент флексірубінового типу. Вміст Г+Ц пар в ДНК 39 моль %.

Вилучені 6 штамів лізобактерій схожі між собою за своїми фенотипічними ознаками, безсумнівно, відносяться до одного виду і являються першими морськими представниками роду *Lysobacter*.

Систематичне положення 4-х грампозитивних штамів, ізольованих з ґрунтів Чорного та Іонічного морів і води протоки Дарданели, не встановлено. Ці бактерії за культуральними ознаками схожі з ковзними бактеріями: на поверхні щільних середовищ утворюють поширені, іноді дуже слизисті, оранжеві колонії, що змінюють колір на червоний при обробці 10 % розчином

КОН. За морфологією їх клітини відрізняються від ЦПБ коккоїдною формою і нерухомі в живих мікроскопічних препаратах. Ці штами мають низьку біохімічну активність у відношенні до вуглеводів, полісахаридів, білків. Утворюють каталазу, уреазу, ліпазу. Таксономічне положення цих штамів можна установити тільки після визначення хімічної структури пігментів.

Бактерії порядку *Cytophagales* подані значним числом штамів, більшість із котрих вилучені з води Чорного моря. У данному порядку виділяються 2 родини: *Cytophagaceae* та "*Flavobacteriaceae*". Флавобактерії не утворюють поширені колонії на щільних середовищах. Їх клітини нерухомі. Вивчення фенотипічних ознак, дозволило віднести ці штами до видів *F. balustinum*, *F. multivorum* та до двох неідентифікованих видів роду *Flavobacterium*.

Таким чином, показано що спектр ковзних бактерій, які мешкають у воді Світового океану, достатньо широкий і не обмежений тільки представниками родини *Cytophagaceae*.

4. Загальна характеристика бактерій родини *Cytophagaceae*

4.1. Фенотипічні та генотипічні ознаки.

Дослідження фенотипічних ознак та нуклеотидного складу ДНК 32 штамів ковзних бактерій продемонструвало наявність у них ряду спільних властивостей.

Для усіх культур характерні грампозитивні паличковидної форми клітини, що не мають джгутиків, рухаються завдяки ковзанню. Довжина клітини складає 2-7 мкм, товщина клітин складає 0,3-0,5 мкм. У культур, вирощених в рідкому середовищі за умов аерації, довжина клітин може досягати 30-40 мкм.

У вилученій групі штамів ЦПБ виявлено три типи клітин, які відрізняються морфологічно: 1) молоді клітини довші ніж старі, які вкорочуються, стають товщими, фрагментуються; 2) молоді клітини вкорочені, з віком видовжуються; 3) для третього морфологічного типу клітин видимі зміни довжини клітин не виявлені.

Ізольовані штами утворюють колонії жовто-оранжевого кольору за рахунок каротиноїдних пігментів, або пігментів типу флексірубін, виявлених у 41 % штамів (Табл.4).

Таблиця 4

Біологічні властивості бактерій родини Cytophagaceae

Тест	Частка штамів, %	Субстрат	Частка штамів
флексірубін	41*	агар	59
NH ₃	69	пектин	81
индол	0	крохмаль	25
H ₂ S	0	хітин	6
NO ₃ ⁻ → NO ₂ ⁻	44	каррагінін	31
NO ₂ ⁻ → газ	31	желатин	84
каталаза	88	казеїн	19
оксидаза	78	фібрин	16
ліпаза	38	коллаген	81
уреаза	53	тирозин	78
β-галактозидаза	63	SDS	19

• - частка штамів, позитивних за данною ознакою.

У відношенні до кисня ізольовані штами ЦІПБ поділяються на факультативно-анаеробні і аеробні з перевагою перших. Відносяться до мезофілів з температурним оптимумом 20-22 С. Галотолерантні.

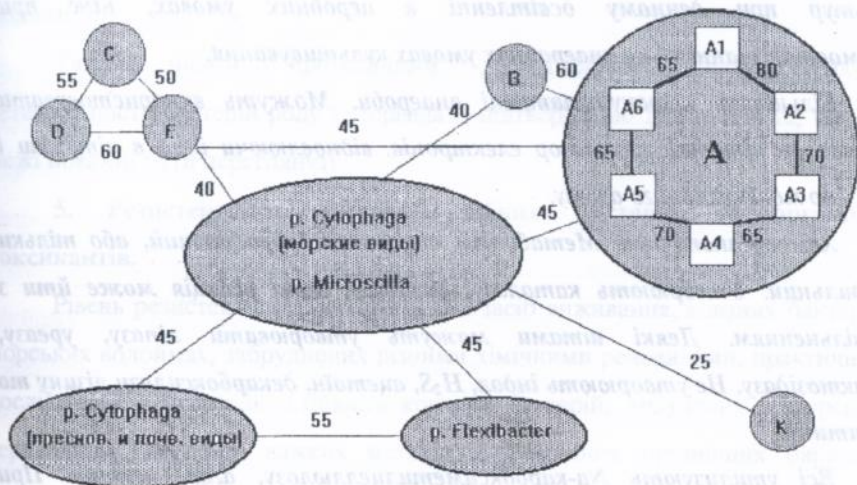
Хемоорганотрофи. Тип метаболізму або окисний, або бродильний, або окисний та бродильний водночас. Деякі застосовують нітрат як джерело енергії. Моно-, ді- та трисахариди утилізують краще, ніж багатоатомні спирти. Не розкладають целлюлозу, але гідролізують водорозчинну Na-карбоксиметилцеллюлозу. Гідролізують агар, агарозу, пектин, в меншому ступені - крохмаль, хітин і каррагінін.

Вміст Г+Ц пар в ДНК для 44 % штамів складає 37-39 моль %, для 28 % штамів - 40-42 моль %.

4.2. Таксономічний коментарій

Для з'ясування рівня подібності або відмінності між досліджуваними штамами було використано метод кластерного аналізу. Встановлення рекурентних груп проведено на основі порівняння 65 фенотипічних ознак та вмісту Г+Ц пар в ДНК. Мітку кластерного аналізу також застосували для з'ясування подібності досліджуваних штамів валідним видам родів *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Microscilla* (мал.1).

В результаті проведеного аналізу досліджувані штами ЦПБ були згруповані в 6 кластерів А-К, відповідних таксонам на рівні роду, з котрих штами кластеру А відрізняються від штамів інших кластерів здатністю до розладання агару. Кластер А розподіляється на 6 субкластерів, серед яких штами субкластера А3 ідентифіковані як представники виду *Cytophaga fermentans*, а штами субкластера А6 - як представники виду *C. agarovorans*.



Мал.1 Схема міжкластерних зв'язків.

Цифрами вказано коефіцієнт подібності, %.

Як видно з представленою малюнка, штами кластера А не належать до роду *Cytophaga* і можуть складати самостійний рід. Підтримуючи думку

Г.Рейхенбаха (Reichenbach, 1980, 1989), що морські агаролітичні види мають бути винесені за межі роду *Cytophaga* і складати самостійний рід *Agarophaga*, ми, на основі вивчених фенотипічних ознак, пропонуємо наступне описання роду *Agarophaga*.

Род Agarophaga gen. nov.

Грамнегативні, рухливі за допомогою ковзання палички довжиною 2-10 мкм, товщиною 0,3-0,5 мкм, кінці заокруглені. Під час вирощування на рідких середовищах можуть утворювати нитевидні клітини довжиною 30-40 мкм. Форми спокою не утворюють.

На щільних середовищах з низьким вмістом живильних речовин колонії поширюються швармом, утворюючи кратероподібні заглиблення. Агар розм'якшується, але не розріджується. На середовищі KM-1 колонії забарвлені в жовтий або оранжевий колір. Забарвлення колоній обумовлюють каротиноїдні пігменти, або пігменти типу флексірубін. Утворення пігментів більш інтенсивно відбувається під час культивування культур при денному освітленні в аеробних умовах, ніж при термостатуванні або в анаеробних умовах культивування.

Більшість - факультативні анаероби. Можуть використовувати нітрат як кінцевий акцептор електронів, відновлюючи його в нітрити і далі - до молекулярного азоту.

Хемоорганотрофи. Метаболізм дихальний і бродильний, або тільки бродильний. Утворюють каталазу, оксидазу, хоча реакція може йти з уповільненням. Деякі штами можуть утворювати ліпазу, уреазу, галактозидазу. Не утворюють індол, H_2S , ацетон, декарбоксилази лізину та орнітину.

Всі утилизують Na-карбоксиметилцеллюлозу, агар, пектин. При гідролізі агару у більшості випадків відзначається його розм'якшення, а не розрідження.

За аеробних умов можуть утилізувати арабінозу, ксилозу, лактозу, сахарозу, меншою мірою - фруктозу, галактозу, рамнозу, мальтозу, етанол,

інозитол, маннітол, сорбітол. Деякі штами гідролізують крохмаль, каррагінін.

Не розкладають целюлозу, хітин. З багатоатомних спиртів не використовують дульцитол, гліцерол, метанол.

Утилізують желатин, колаген. Не утилізують фібрин і казеїн.

Розкладають тирозин з почорніням середовища.

Температурний оптимум 20-22 °С, температурний діапазон - 4-42 °С.

Галотолерантні. Оптимальна концентрація NaCl 1,5-2%.

Максимальна -15-20%.

Середовище мешкання - морська вода.

Вміст Г+Ц пар в ДНК 37-42 моль %.

Штами субкластерів В,С, D і Е також, можливо утворюють окремі роди в межах родини Cytophagaceae. Винятком є 2 штами кластера К, які, без сумніву належать до порядку Cytophagales, але не можуть бути представниками однієї родини.

Таким чином, проведеними дослідженнями продемонстрована гетерогенність бактерій роду Cytophaga і підтверджено думку про те, що його межі повинні бути переглянуті.

5. Резистентність цитофагоподібних бактерій до органічних токсикантів.

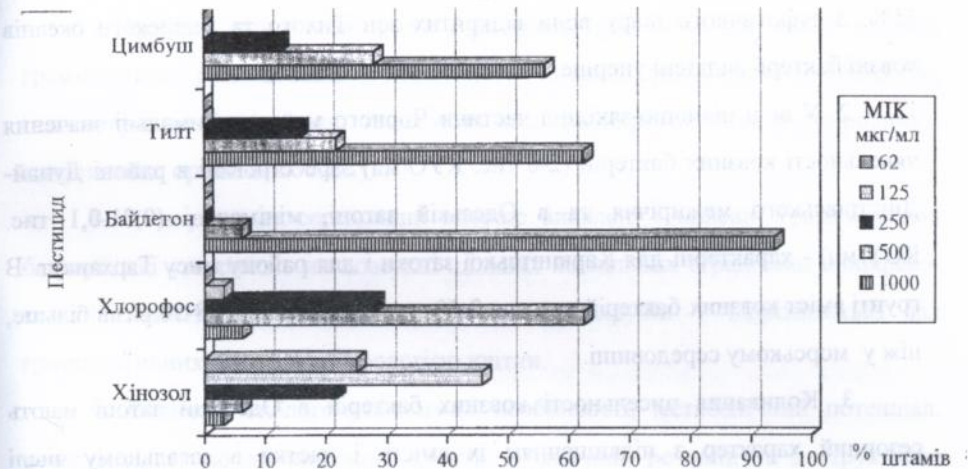
Рівень резистентності, як можливий засіб виживання, ковзних бактерій в морських водоймах, забруднених різними хімічними речовинами, практично не досліджений. Визначена стійкість ковзних бактерій, вилучених з морського середовища, до іонів важких металів, синтетичних органічних барвників, пестицидів та антибіотичних речовин В ході досліджень виявлені мінімальні концентрації полютантів, що інгібують ріст ковзних бактерій (МК) та концентрації, що інгібують ріст більшості штамів ЦПБ (мода МК). Показано, що цитофагоподібні бактерії, вилучені з морської води, стійкі до дії широкого

спектру антибіотичних речовин. Так, 93,8% штамів стійкі до дії поліміксину у концентрації 8000 мкг/мл; 75,05, 68,8% та 56,2% штамів - до дії, відповідно, налідиксової кислоти, канаміцину, та метициліну у концентрації 2000 мкг/мл; 65,6% - до дії мономіцину у концентрації 100 мкг/мл. Мода МК стрептоміцину, ампіциліну, хлорамфеніколу, лінкоміцину складала 250 мкг/мл, бензилпеніциліну - 128 мкг/мл. Найменшими значеннями характеризуються МК тетрацикліну та гентаміцину (16 та 8 мкг/мл, відповідно).

Вивчена стійкість цитофагоподібних бактерій до іонів важких металів. Показано, що досліджувані штами виявляють високу резистентність до іонів свинцю, нікелю і кадмію, мінімальна інгібуюча концентрація яких складає 1000 мкг/мл для 87,5%, 56,2% та 62,5% штамів, відповідно. Дещо нижчою була стійкість ЦПБ до дії іонів Co^{2+} , Cu^{2+} , мода МК яких складала 250 мкг/мл. Порівняно низька стійкість ковзних бактерій до впливу іонів заліза: для 84,3% штамів складала 62 мкг/мл. Найбільший інгібуючий ефект на клітини ковзних бактерій виявили іони ртуті, токсична дія яких виявлялась уже в концентрації 8 мкг/мл.

Порівнюючи отримані результати з даними, про стійкість до солей важких металів домінуючих грамнегативних бактерій, вилучених з різних акваторій Чорного моря (Іваниця, 1996), виявлено деякі подібні тенденції. Високий рівень резистентності (мода МК 500-1000 мкг/мл) гетеротрофні бактерії виявляють до нікелю та свинцю, найбільш чутливі до дії ртуті.

Рівень резистентності ЦПБ до дії пестицидів досліджено вперше. Показано, що ЦПБ дуже стійкі до токсичної дії таких пестицидів, як цимбуш, тилт, байлетон, діапазон МК яких складав 250-1000 мкг/мл, з модальним значенням 1000 мкг/мл. Найбільше виражену токсичну дію на ріст ковзних бактерій мав фунгіцидний препарат хінозол (мал. 2).



Мал. 2. Резистентність штамів ковзних бактерій до пестицидів.

Вилучені штами ЦПБ мають високу стійкість до дії органічних барвників. Ріст 100% штамів ковзних бактерій зазначено при дії барвників катіонового червоного, кислотних голубого, зеленого, чорного та активних жовтого та червоно-коричневого в концентрації 2500 мкг/мл. Нарівні з резистентністю до дії азобарвників, досліджувана група штамів мала високий деструктивний потенціал. Більше 70% штамів розкладали барвники катіоновий червоний, катіоновий чорний, кислотні - голубий, зелений, чорний та активний жовтий в концентраціях 30-300 мкг/мл.

Резюмуючи, можна зазначити, що високий метаболічний потенціал, еколого-фізіологічні особливості, рівень стійкості морських цитофагоподібних бактерій до органічних та неорганічних токсикантів і деструктивний потенціал показує їх широкі адаптаційні можливості, свідчить про життєздатність досліджуваної групи бактерій за умов антропогенного забруднення та забезпечує їм важливу роль в самоочищенні водойм.

ВИСНОВКИ

1. Вільномешкаючі ковзні бактерії виявлені у водах всіх досліджуваних зон Світового океану, де їх чисельність складала 0,01-200 тис. КУО/мл, виявлення 13,9-100%, частка в загальній кількості гетеротрофних бактерій - 0,6-

35%. З еуфотичного шару води відкритих зон Тихого та Індійського океанів ковзні бактерії виділені уперше.

2. У воді північно-західної частини Чорного моря максимальні значення чисельності ковзних бактерій (2-6 тис. КУО/мл) зареєстровані в районі Дунай-Дністрівського межиріччя та в Одеській затоці, мінімальні (0,01-0,1 тис. КУО/мл) - характерні для Каркінітської затоки і для району мису Тарханкут. В ґрунті вміст ковзних бактерій складав 2-50 тис. КУО/мл, що у 8-50 разів більше, ніж у морському середовищі.

3. Коливання чисельності ковзних бактерій в Одеській затоці мають сезонний характер з підвищенням їх вмісту і частки в загальному числі гетеротрофних бактерій в осінньо-зимовий сезон року із зниженням цих показників в літній період. Зміни чисельності ковзних бактерій у даній акваторії не залежать від температури, глибини та сольоності.

4. Виділення ковзних бактерій із морського середовища доцільно вести на щільних живильних середовищах, що містять як джерела вуглецю та енергії знежирене молоко у концентрації 1%. Для вилучення ковзних бактерій з районів із значним бактеріальним забрудненням доцільним є використання середовища КМ-1 з поліміксином (40 мкг/мл), що гальмує ріст значного числа гетеротрофних бактерій і не впливає на чисельність цитофаг.

5. З морського середовища ізольовані представники різних таксономічних груп ковзних і споріднених до них бактерій, включаючи бактерії, що утворюють плодові тіла порядку Мухососсаєс, що не утворюють плодові тіла, бактерії порядків Cytophagales і Lysobacterales. Бактерії порядку Lysobacterales із морського середовища вилучені вперше.

6. На основі досліджених фенотипічних ознак, вмісту Г+Ц пар в ДНК і результатів нумеричного аналізу 32 штами ковзних бактерій ідентифіковані як представники родини Cytophagaceae, серед котрих 19 штамів визначаються як представники 13 нових видів.

7. Вперше дано опис роду *Agarophaga* gen. nov., до якого входять грамнегативні, рухливі завдяки ковзанню, як правило, факультативно-анасеробні, галотолерантні бактерії, що утилізують агар та широкий спектр природних і синтетичних органічних сполук.

8. У морському середовищі вперше виявлені і описані грампозитивні бактерії, які утворюють на поверхні щільних живильних середовищ поширенні колонії, мають позитивну реакцію на флексірубін і відрізняються від грамнегативних цитофаг морфологією клітин.

9. Виявлені еколого-фізіологічні особливості, метаболічний потенціал, резистентність до дії широкого спектру токсичних речовин та деструктивна активність у відношенні високомолекулярних природних сполук; органічних полутантів свідчать про високу життєздатність та роль ковзних бактерій у морському середовищі.

СПИСОК

наукових робіт асистента кафедри мікробіології та вірусології

Слинської Наталії Олексіївни

1. Іваница В.А., Елинская Н.А. Численность и распределение скользящих бактерий в воде и грунте Одесского залива //Микробиологический журнал, 1988. -Т.50, №6. - С.3-5.

2. Елинская Н.А., Боклач Е.А. Биологические особенности цитофагоподобных бактерий северо-западной части Черного моря //Микробиологический журнал, 1994. - Т.56, №1. - С.108-109.

3. Іваница В.О., Слинська Н.О., Бугайцова Ж.А., Ворохова О.Л., Гомонюк В.В., Черединцева Т.А. Екологія, біологічні властивості, таксономія і колекція гетеротрофних ковзних бактерій //Мікробіологічний журнал, 1994. -Т.56, №1. - С.114-115.

4. Іваница В.А., Юргелайтис Н.Г., Кушниренко Е.К., Багаева О.С., Елинская Н.А. Проблемы бактериальной деструкции целлюлозосодержащих материалов //Пробл. биол. поврежд. матер. - Вильнюс, 1988. - С.99-105.

5. Елинская Н.А. Характер распределения скользящих бактерий в Одесском заливе /Матер. научн. конф. молодых ученых ОГУ, 16-17 мая, 1985 г. - Одесса, 1987. - С.165-172.

6. Кушниренко Е.К., Елинская Н.А., Иваница В.А. Распространение скользящих бактерий в пресных водоемах Украины //Матер. научн. конф. мол. ученых Одесского ун-та, Одесса, 22-23 сент., 1988 г. - Одесса, 1989. - С.191-195.

7. Елинская Н.А., Худченко Г.В., Иваница В.А. Биологические свойства *Cytophaga lytica*, выделенной из морской среды //Матер. научн. конф. мол. ученых Одес. ун-та, Одесса, 22-23 сент., 1989. - Одесса, 1989. - С.171-175.

8. Иваница В.А., Юргелайтис Н.Г., Елинская Н.А., Кошелева О.В. Проблемы выделения и идентификации бактерий группы цитофага-флавобактериум /Выделение, идентификация и хранение микромицетов и других микроорганизмов. - Вильнюс, 1990. - С.61-62.

9. Иваница В.А., Елинская Н.А., Кушниренко Е.К., Камара Яа Секу, Джахуди Абдель Гхани. Микробиологические исследования балластных вод и морских акваторий в районах Одесского побережья с различной антропогенной нагрузкой /Матер. Всес. научн. конф. "Человек-океан", 10-12 октября 1990 г. - Махачкала, 1990, ч.1 - С.29-30.

10. Иваница В.А., Елинская Н.А. Распространение скользящих бактерий в Одесском заливе и реке Днестр и их характеристика //Матер. УІІ съезда Всес. микробиол. об-ва. Т.6. Экология, геохимическая деятельность микроорганизмов и охрана окружающей среды. - Алма-Ата: Наука, 1985. - С.69.

11. Иваница В.А., Елинская Н.А., Кушниренко Е.К. Распределение цитофаго-подобных бактерий в воде и грунте курортной зоны Одесского залива /Матер. республ. научно-практической конференции "Пути уменьшения антропогенного воздействия на природные курортные ресурсы", Одесса, 9-11 октября, 1990 г. - Киев, 1990. - С.47-48.

12. Иваница В.А., Елинская Н.А., Худченко Г.В. Новые скользящие бактерии, выделенные из морской среды /Матер. УП съезда Украинского микробиол. об-ва, Черновцы, сентябрь, 1989 г. - Киев-Черновцы, 1989. - С.9-10.

Елинская Н.А.

Биологические особенности морских цитофагоподобных бактерий.

В диссертационной работе представлены результаты изучения эколого-физиологических особенностей, метаболического потенциала и резистентности к действию спектра токсических веществ 69 штаммов скользящих бактерий, выделенных из морской среды. Показано, что свободноживущие скользящие бактерии широко распространены в водах Мирового океана, где составляют значительную часть бактериопланктона эвфотического слоя. В морских биоценозах скользящие бактерии представлены широким спектром таксономических групп, среди которых преобладают представители порядка Cytophagales. Впервые предложено описание рода *Agarophaga* gen. nov.

Ключові слова: морські екосистеми, ковзні бактерії, фенотипічні ознаки, рівень Г+Ц пар, таксономічний склад, резистентність до токсикантів, деструктивна активність.

Elynskaya N.A.

Biological features of marine cytofaga - like bacteria.

The dissertation presents the results of the study of ecological-physiological features, metabolic potential and resistance to toxicants of range of 69 strains of gliding bacteria isolated from the marine substratum. It has been shown that free-living gliding bacteria are widely spread in the water of the world ocean and they make the considerable part of bacterioplankton of the evphotic layer. In marine biocenosis the gliding bacteria are presented by the wide range of taxonomic groups. Among them the representatives of the order Cytophagales prevail. For the first time the description of the genus *Agorophaga* gen. nov. has been suggested.

439286

AB 35.661