

ции голубей от количества особей в стайках прослеживается лишь для одного из трех лет исследований (таблица).

Соотношение частот фенотипов сизого голубя
в стайках разного размера

Год	Окрасочная морфа	Размер стайки					
		<10		11-20		>20	
		n	%	n	%	n	%
1992	сизая	34	26,8	25	21,0	46	26,7
	черно-чеканная	55	43,3	48	40,3	71	41,3
	черная	15	11,8	20	16,8	25	14,5
	частичные альбиносы	19	15,0	19	16,0	22	12,8
	хромисты	4	3,1	7	5,9	8	4,7
1993	сизая	12	21,8	22	16,8	56	26,4
	черно-чеканная	21	38,2	72	55,0	100	47,2
	черная	8	14,5	16	12,2	22	10,4
	частичные альбиносы	10	18,2	17	13,0	27	12,7
	хромисты	4	7,3	4	3,0	7	3,3
1994	сизая	55	29,7	54	24,0	96	23,5
	черно-чеканная	73	39,5	109	48,4	201	49,1
	черная	12	6,5	15	6,7	32	7,8
	частичные альбиносы	11	5,9	11	4,9	20	4,9
	хромисты	34	18,4	36	16,0	60	14,7

Таким образом, полученные данные, с одной стороны, дают представление о фенотипической структуре популяции сизых голубей в Минске по признакам окраски оперения, что может служить исходной базой для изучения возможной временной динамики соотношения фенотипов в связи с изменениями других характеристик популяции (динамика численности, изменения в трофике и т. д.). С другой стороны, для объяснения выявленных различий фенотипического состава стаек в разных районах города необходимо изучение ряда других экологических особенностей вида — плотности населения, трофических связей, лабильности и пр. — в конкретной связи с определенными фенотипическими морфами.

1. Москвитин С. С., Ксенц А. С. // ДЭП № 1228-81. М., 1981.
2. Москвитин С. С., Ксенц А. С. // Экология. 1982. № 5. С. 72.
3. Обухова Н. Ю., Креславский А. Г. // Зоол. журн. 1993. Т. 72. Вып. 3. С. 119.
4. Ксенц А. С., Москвитин С. С. // Фенетика популяций: Мат. 3-го Всесоюз. совещания. М., 1985. С. 186.
5. Обухова Н. Ю., Креславский А. Г. // Зоол. журн. 1984. Т. 63. Вып. 2. С. 233.
6. Обухова Н. Ю., Креславский А. Г. // Там же. 1985. Т. 64. Вып. 3. С. 400.
7. Обухова Н. Ю., Креславский А. Г. // Там же. Вып. 11. С. 1685.

УДК 579.8 + 582.232 + 579.06

Е. В. ДОБРОЖИНЕЦКАЯ, Н. П. МАКСИМОВА

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ОБЛИГАТНОГО МЕТИЛОТРОФА *Methylobacillus* M 75

A new strain of obligate methylotrophic bacteria using only methanol and methylamine as carbon and energy source, was isolated. According to a number of the physiological and biochemical characteristic this strain was believed to the genus *Methylobacillus* and designated as M75.

The rate of growth *Methylobacillus* M75 on the methanol and methylamine medium and the character of growth on the diverse concentration of this substrats were examined.

В настоящее время возникает проблема промышленного использования микроорганизмов, утилизирующих дешевые и легкодоступные субстраты. В связи с этим особое внимание привлекают метилотрофные бактерии, использующие C_1 -соединения в качестве единственного источника углерода и энергии [1]. Эти микроорганизмы могут быть эффективными продуцентами белка одноклеточных [2], аминокислот [3, 4], органических кислот, витаминов [5], полисахаридов, АТФ, биополимеров [6], ферментов [7]. Использование метилотрофов имеет важное экологическое значение для очистки сточных вод [8] и утилизации отходов промышленного производства [9].

Настоящая работа посвящена характеристике нового штамма облигатных метилотрофных бактерий и изучению его роста на средах, содержащих метанол и метиламин.

Материал и методика

Изучаемый штамм М75 был выделен из сточных вод Минского кожевенного объединения. Для культивирования бактерий использовали минеральную среду следующего состава (в г/л): KH_2PO_4 —2,0; $(NH_4)_2SO_4$ —2,0; $NaCl$ —0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ —0,025; $CaCl_2$ —0,00125; вода дистиллированная, рН 7,0. Культуру выращивали в колбах объемом 250 мл, содержащих 100 мл среды, на качалке (140 об/мин) при 30 °С в течение 24 ч. В качестве источников углерода и энергии использовали метанол (1 % об/об) или метиламин (1 %). Рост бактериальной культуры определяли спектрофотометрически при A_{540} .

Морфологию клеток изучали с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Питательные потребности бактерий проверяли на 39 источниках углерода и энергии: сахарах (в концентрации 0,2 %), спиртах (0,5—1 % об/об), солях органических кислот (0,2 %), метилированных аминах (1 %), аминокислотах (0,2 %).

Антибиотикорезистентность устанавливали методом серийных разведений на агаризованной среде с метанолом.

Тип убихиноновой системы определяли на силикагелевых пластинах Silufol (Cavalier) по методу Collins et al. [10]. Убихиноны экстрагировали в хлороформ-метанольной смеси (2:1 об/об) и хроматографировали в системе петролейный эфир — диэтиловый эфир (85:15 об/об). В качестве контроля использовали убихиноны Q-8 и Q-9.

Тонкослойную хроматографию фосфолипидов осуществляли по методике, предложенной Гальченко и др. [11]. Экстракцию проводили непосредственно на слое силикагеля Silufol в хлороформ/метанольной смеси (1:2 об/об) с последующим одномерным разделением в системе хлороформ — метанол — ацетон — уксусная кислота — вода (10:3:8:2:1 об/об). Фосфолипиды визуализировали после обработки 10 %-м $CuSO_4$ в 8 %-ом растворе ортофосфорной кислоты и нагревания при 180 °С в течение 3 мин. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре СФ-26. Идентифицировали бактерии согласно руководству Jenkins и Jones [12].

Результаты и их обсуждение

Изучение морфологических и культуральных свойств выделенной из сточных вод бактериальной культуры (первоначально обозначенной как штамм М75) позволило установить, что она представлена мелкими (1—1,5х2 мкм) граммотрицательными подвижными палочками, имеющими перитрихальные жгутики. Размножаются бактерии штамма М75 простым делением, не имеют капсул, спор, образуют большое количество полисахаридов.

Культура в жидкой среде растет без агрегации клеток с равномерным помутнением. Колонии на агаризованной среде округлые, непрозрачные, молочного цвета, диаметром 2—3 мм, поверхность гладкая, профиль выпуклый, край ровный, консистенция выуклая.

Исследование физиолого-биохимических свойств показало, что оптимальной для роста бактерий выделенного штамма является температура 30 °С, а оптимум рН лежит в пределах 6,8—7,2. Бактерии являются строгими аэробами, в витаминах и дополнительных факторах роста не

нуждаются, пигмента не образуют. Клетки устойчивы к ампициллину (до 2000 мкг/мл), оксипиллину (более 1000 мкг/мл), стрептомицину (100 мкг/мл) и чувствительны к налидиксовой кислоте, хлорамфениколу, канамицину, тетрациклину и рифампицину (таблица). Гидролизуют крахмал и лецитин, но не желатину, восстанавливают нитраты до нитритов; индол, сероводород и аммиак не образуют. Тесты на уреазу, каталазу и оксидазу положительные. Реакция Фогес-Проскауэра и тест на metil red отрицательные. В качестве источника углерода и энергии используют только метанол и метиламин; иные сахара, спирты, органические кислоты и аминокислоты не утилизируются.

Сравнительная характеристика метилотрофных бактерий *Methylobacillus*

Тесты	Бактерия <i>Methylobacillus glycogenes</i> (по Jenkins и Jones) [12]	Штамм <i>Methylobacillus</i> M75
Утилизация одноуглеродных соединений ¹	метанол и метиламин	метанол и метиламин
Утилизация полиуглеродных соединений ²	—	—
Группа фосфолипидов	1	1
Тип убихинона	Q-8	Q-8
Устойчивость к ампициллину	+	+
Устойчивость к стрептомицину	+	+
Устойчивость к тетрациклину	н.о	+
Устойчивость к канамицину	+	+
Устойчивость к фурагину	—	—
Гидролиз крахмала	+	+
Гидролиз лецитина	+	+
Гидролиз желатины	—	—
Восстановление нитратов	—	+
Образование H ₂ S	—	—
Образование NH ₃	—	—
Образование индола	н.о	—
Продукция уреазы	+	+
Продукция каталазы	+	+
Продукция оксидазы	+	+
Реакция Фогес-Проскауэра	—	—
Реакция с metil red	—	—

Примечания: 1 — формальдегид, формиат, метиламин; 2 — глюкоза, лактоза, фруктоза, ксилоза, галактоза, арабиноза, рамноза, мальтоза, маннит, дульцит, сорбит, инозит, бензоат, антранилат, лактат, ацетат, сукцинат, аспарат, цитрат, глутамат, п-оксибензоат, малонат, малат, оксалоацетат, глицерин, мочевины, этанол, пропанол, изопропанол, бутанол, диметиламин, триметиламин, лизин, аргинин, гистидин, аланин, треонин.

Тонкослойная хроматография изопреноидных хинонов показала, что изучаемый штамм обладает убихиноновой системой типа Q-8, что соответствует хемотаксономической характеристике метанолутилизирующих бактерий, данной Т. Urakami и К. Komagata [13].

Изучение фосфолипидного состава этих бактерий выявило присутствие липидов 1-й группы (фосфатидилглицерола, фосфатидилэтаноламина и дифосфатидилглицерола). Минорные липидные компоненты идентифицированы не были.

По совокупности дифференциальных признаков, указанных в руководстве Jenkins и Jones [12], выделенный бактериальный штамм отнесен нами к роду *Methylobacillus* и обозначен индексом M75.

В настоящее время описаны четыре вида бактерий этого рода: *M. glycogenes* ATCC 29475 [12], *M. viscogenes* [14], *M. flagellatum* KT [15] и *M. methanolovorvus*, описанный ранее как *Methylophilus methanolovorvus*

[16]. Представители этого рода являются грамотрицательными палочками, непигментированными, неспорообразующими, ассимилирующими метанол или метиламин посредством рибулозомонофосфатного пути. Подвижность бактерий и наличие жгутиков у различных видов могут различаться: от неподвижных (*M.glycogenes* и *M.methanolovorius*) до подвижных, имеющих 1 жгутик (*M.viscogenes*) или 1—4 жгутика (*M.flagellatum* КТ). Температурный оптимум роста также варьирует у различных видов от 30 °С (*M.glycogenes*) до 30—37 °С (*M.viscogenes* и *M.methanolovorius*) и 42 °С (*M.flagellatum* КТ). Некоторые из бактерий (*M.viscogenes*) продуцируют экзополисахариды.

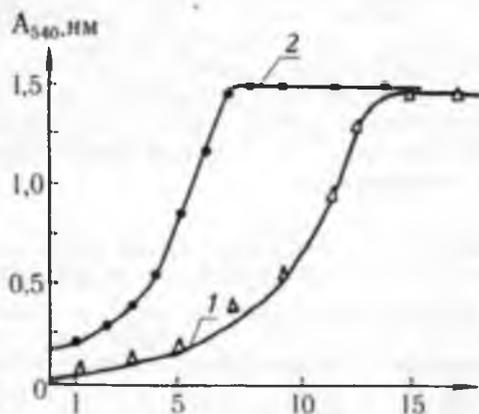


Рис. 1. Рост бактерий *Methylobacillus* M75 на среде с метанолом (1) и метиламином (2)

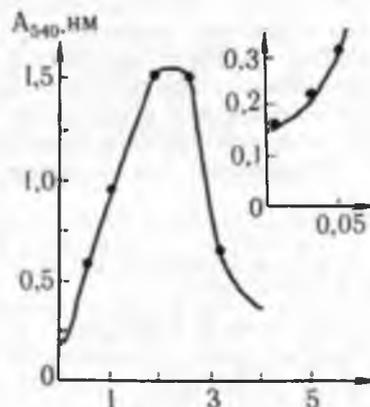


Рис. 2. Рост бактерий *Methylobacillus* M75 на различных концентрациях метиламина

Отмечена также существенная генотипическая гетерогенность этого рода. Так, молярное содержание ГЦ в ДНК у *M.glycogenes* — 56 %, *M.viscogenes* — 54 %, *M.flagellatum* КТ — 55,5 %, *M.methanolovorius* — 51 %. Имеются некоторые отличия и в биохимических свойствах. Например, бактерии *M.glycogenes* не восстанавливают нитраты до нитритов, а бактерии *M.methanolovorius* и *M.viscogenes* не гидролизуют крахмал. В остальном физиолого-биохимические свойства у представителей рода *Methylobacillus* идентичны. В таблице представлены данные исследуемого нами штамма в сравнении с типовым видом *M.glycogenes*. Выделенный штамм отличается по ряду морфологических и физиолого-биохимических признаков и, очевидно, является новым представителем рода *Methylobacillus*.

Результаты исследования динамики роста бактерий штамма *Methylobacillus* M75 на средах с метанолом и метиламином представлены на рис. 1. Как видно из рисунка, для этих бактерий метиламин является более легкоусвояемым субстратом, нежели метанол. Бактерии, выращиваемые на этом источнике питания, вступают в экспоненциальную фазу роста уже через 2 ч, а в стационарную фазу через 7 ч после начала культивирования, тогда как при использовании этими бактериями метанола фаза логарифмического роста наступает через 7 ч и длится также около 7 ч.

При изучении роста штамма M75 на средах с различными концентрациями метиламина (рис. 2) было

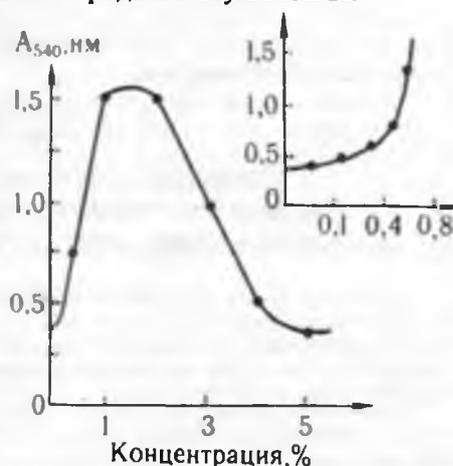


Рис. 3. Рост бактерий *Methylobacillus* M75 на различных концентрациях метанола

установлено, что оптимальной является концентрация 2 %, а минимальной концентрацией метиламина, которая может быть зарегистрирована по увеличению оптической плотности (A_{540}) с 0,12 до 0,18, является концентрация 0,025 %. Следовательно, бактерии *Methylobacillus* M75 могут быть использованы для спектрофотометрического определения даже следовых количеств этого субстрата.

Характер роста облигатных метилотрофных *Methylobacillus* M75 на средах с различными концентрациями метанола представлен на рис. 3. Максимальный рост клеток отмечался при содержании этого субстрата в среде 1—2 % (об/об), что согласуется с данными для других метилотрофных бактерий [17]. Минимальная концентрация метанола, при которой был зарегистрирован бактериальный рост, соответствовала 0,1 %, тогда как концентрация 5 % его полностью подавляла.

Таким образом, выделенный и идентифицированный нами новый штамм облигатных метилотрофных бактерий *Methylobacillus* M75 может быть использован в создании тест-системы для качественного определения в средах таких экологически опасных и токсичных одноуглеродных соединений, как метанол и метиламин.

1. Quayle Y. R. // *Journ. Biochem. Society Trans.* 1980. V.8. № 1. P.1.
2. Whindass Y. D., Worsley M. J., Pioli E. M. et al. // *Nature.* 1980. V. 287. P. 396.
3. Сассон А. Биотехнология: Свершения и надежды. М., 1987.
4. Пат. 4368271 США. 1983.
5. Nishio M., Tanaka R., Matsuno T. et al. // *Journ. Ferment. Technol.* 1977. V. 55. № 2. P.200.
6. Tani J., Yoon B. D., Yamada H. // *Agric. Biol. Chem.* 1985. V. 49. P.2385.
7. Tani J., Yamada H. // *Microbial growth on C₁-compounds.* 1984. P. 293.
8. Haber C., Allen Z., Ahaо S. et al. // *Science.* 1983. P. 1147.
9. Мосин О. В., Карнаухова Е. Н., Пшеничникова А. Б. и др. // *Биотехнология.* 1993. № 9. С. 16.
10. Jenkins O., Jones D. // *Journ. General Microbiol.* 1987. V. 133. P. 453.
11. Collins M. D. et al. // *Journ. General Microbiol.* 1977. V. 100. P. 221.
12. Гальченко В. Ф., Андреев Л. В., Троценко Ю. А. // *Таксономия и идентификация облигатных метилотрофных бактерий.* Пушино. 1986.
13. Urakami T., Komagata K. // *Journ. Syst. Bacteriol.* 1986. V. 36. № 4. P. 502.
14. Доронина Н. В., Троценко Ю. К. // *Микробиология.* 1991. Т. 60. Вып. 5. С. 908.
15. Говорухина Н. И., Клецова Л. В., Цыганков Ю. Д. и др. // *Микробиология.* 1987. Т. 56. Вып. 5. С. 849.
16. Логинова Н. В., Троценко Ю. А. // *Микробиология.* 1981. Т.50. Вып. 1. С. 21.
17. Максимова Н. П., Фомичев Ю. К. // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 1991. № 9. С. 6.

УДК 616.183.12—07 + 661.728

В. А. СТЕЛЬМАХ, Т. Л. ЮРКШТОВИЧ,

В. В. ШЕВЛЯКОВ, Н. В. ГОЛУБ

ВЛИЯНИЕ ЭНТЕРОСОРБЕНТНОЙ ТЕРАПИИ БИОРАСТВОРИМЫМИ ДЕРИВАТАМИ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ НА ФОРМИРОВАНИЕ АУТОИММУНОАЛЛЕРГИЧЕСКОГО СТАТУСА

As a result of the sensitization of guinea-pigs by formaldehyde it was obtained the model of autoimmunoallergic status in which the activation of reactions of immediated and retarded type hypersensitivity, the fising of autoimmune factors content, a sharp reduction of immunocompetent blood cells pul and the phenomena of antimicrobial and non-specific immunity depression are to be observed.

Under these conditions a 10-day enteral administration of the sodium salt of monocarboxylcellulose can not render a protective action. At the same time the enterosorbent therapy with sodium salt of monocarboxylcellulose allows to normalize the immunodepressive status, to activate, the factors of antimicrobial, humoral and cellular links of immunity, to rise sharply the barrier protective functions of the body, as well as to reduce slightly the manifestations of sensitization.