

- біотехнології: Зб. наук. пр. Укр. т-ва генет. і селекц. ім. М.І. Вавилова; Редкол.: ... Кунах В. А. (голов. ред.) та ін. — К.: Логос, 2007. — Т. 2. — С. 512–516.
6. Кренке Н.П. Регенерация растений. — М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1950. — 667 с.
  7. Опалко О.А. Динаміка регенераційного потенціалу яблуні // Зб. наук. пр. Уманської ДАА. — 2002. — Вип. 55. — С. 182–188.
  8. Опалко О.А., Опалко А.И. Регенерационная способность как критерий использования представителей рода *Malus* Mill. в ландшафтных композициях // Труды Тбилисского ботанического сада. — 2006. — Т. 96. — С. 187–189.
  9. Селекція плодкових і овочевих культур. Практикум: навчальний посібник / А.І.Опалко, А.О.Яценко, О.А.Опалко, Н.В.Мойсейченко. — К.: Наук. світ, 2004. — 307 с.

#### **Резюме**

Наведено результати вивчення динаміки регенераційного потенціалу семи генотипів роду *Corylus* L., на підставі чого пропонується оптимізувати строки вегетативного розмноження та операцій догляду за насадженнями ліщини з урахуванням сприятливих для калусогенезу періодів.

Приведено результати изучения динамике регенерационного потенциала семи генотипов рода *Corylus* L., на основании чего предлагается оптимизировать сроки вегетативного размножения и операций ухода за насаждениями орешника с учетом благоприятных для каллусогенеза периодов.

The results of study of dynamics of regeneration potential of seven genotypes of *Corylus* L. genus are given. On the basis of these results it is offered to optimize the dates of vegetative propagation and operations of tending the hazel plantations taking into consideration favorable periods of callus formation.

**КРЕМЕНЧУЦКИЙ Г.Н., ШАРУН О.В., ЮРГЕЛЬ Л.Г., КОНДРАТЬЕВ Ю.А., СТЕПАНСКИЙ Д.А., БОНДАРЬ В.А., СЕМЕНОВА С.Н., КОШЕВАЯ И.П.**

Днепропетровская государственная медицинская академия,  
Украина, 49027, Октябрьская пл. 4, e-mail: [kremen@dsmu.dp.ua](mailto:kremen@dsmu.dp.ua)

#### **МОРФО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ АЭРОКОККОВ**

*Aerococcus viridans* - микроорганизм, обнаруженный в воздухе жилых помещений [22] и являющийся представителем нормальной микрофлоры человека и животных; антагонистически активен в отношении ряда групп патогенных бактерий.

Антагонистическая активность аэрококков обусловлена экскрецией бактерицидных концентраций пероксида водорода [12-13] в результате функционирования НАД-независимой лактатдегидрогеназы [10], а также вещества липопротеиновой природы, антагонистическое действие которого снимается каталазой [14, 15].

Ранее установлено спонтанное образование атипичных колоний в естественных посевах *A. viridans*, чистые культуры из которых обладали полиморфизмом, не продуцировали пероксид водорода и были лишены антагонистических свойств *in vitro*. Чистые культуры из атипичных колоний сохраняли "новые" свойства в течение длительных пересевов, что позволило их относить к морфофункциональным (МФ) мутантам.

Мутантные варианты при определенных условиях реверсировали, восстанавливая

все свойства исходного штамма [7,8,9]. Вместе с тем тонкое строение клеток аэрококков и их вариантов, образующихся при функциональном изменении исходного штамма, практически не изучено.

Цель настоящего сообщения - сравнительное изучение морфологических, биологических и ультраструктурных особенностей исходных культур аэрококков, продуцирующих пероксид водорода, мутантного варианта с нарушением продукции пероксида водорода и его ревертантов.

#### **Материалы и методы**

Объектами исследования служили штаммы аэрококков: *A. viridans* 770; *A. viridans* 56 н/а, полученный из негемолитической колонии в естественном рассеивании штамма 770 на 3%-ном кровяном агаре; ревертант с преимущественно выраженной оксидазной активностью - 56 окс. рев; ревертант с преимущественно выраженной редуказной активностью - 56 ред. рев. Вид преимущественной активности ревертантов оценивали на индикаторной среде определенного биохимического состава [11].

Оценку антагонистической активности аэрококков проводили с помощью тест-культур каталазонегативного штамма *Vibrio NAG p-6078* и каталазопозитивного штамма *Escherichia coli* АВ 1157. Показателем антагонистической активности аэрококков служили зоны подавления роста тест-культур после опыления их суспензиями суточных штрихов роста культур аэрококков.

Определение метилглиоксаля в штаммах аэрококков проводили при выращивании культур в жидкой среде [12], содержащей в качестве предшественников метилглиоксаля глюкозу, дигидроксиацетон,  $\alpha$ -глицерофосфат или треонин в концентрациях по 100 мкг/мл.

Выделение НАД-независимой лактатдегидрогеназы и определение ее активности проводили по ранее опубликованному методу [17]. Определяли также содержание пероксида водорода в культуральных жидкостях аэрококков [5]. Белок определяли биуретовым методом [20]. Фазово-контрастное исследование морфологии культур аэрококков проводили с помощью микрокамер [4].

Электронно-микроскопическое исследование культуры исходного штамма и ревертантов проводили соответственно [18], [6].

#### **Результаты и обсуждение**

Исследование морфологии клеток было проведено в фазово-контрастном микроскопе с использованием микрокамер и параллельно с помощью ультратонких срезов. При фазово-контрастной микроскопии штаммов *A. viridans* наблюдались в основном округлые кокковидные клетки. При просмотре той же культуры в электронном микроскопе также обнаружены кокки с гомогенной клеточной стенкой толщиной 40—45 нм. Слоистость клеточной стенки слабо выражена, цитоплазматическая мембрана выявлялась плохо, цитоплазма была более или менее равномерно заполнена рибосомами и обладала достаточно высокой электронной плотностью. В цитоплазме хорошо различимы небольшие зоны нуклеоида и гранулы волютина, которые, испаряясь под пучком электронов, имели вид светлой вакуоли, ограниченной трехслойной мембраной. Деление клеток происходило путем образования поперечных перегородок, в результате чего формировались четыре дочерние клетки.

При просмотре культуры мутанта *A. viridans* 56 н/а, не продуцирующего пероксид водорода, как в фазовом контрасте, так и в электронном микроскопе, отмечались существенные изменения морфологии и ультраструктуры клеток по сравнению с клетками исходного штамма. Клетки, выросшие на МПА с 10 % лошадиной сыворотки, и в световом и в электронном микроскопе имели не кокковидную, а удлиненную, иногда строго бациллярную, нередко удлиненно-грушевидную форму. В отличие от клеток исходного штамма, у клеток мутанта наблюдалась микрокапсула, которая отходила от поверхности клеточной стенки в виде коротких ворсинок и кустика. Клеточная стенка была гомогенной не на всем

протяжении клетки; в некоторых ее участках слоистость была выражена лучше. В цитоплазме закономерно выявлялись мембранные структуры ламеллярного типа, обычно расположенные в местах образования продукта, имевшего высокую электронную плотность. Дальнейшая идентификация гиперпродукции метилглиоксала клетками мутантов вследствие нарушения лактатоксидазной функции позволяет предполагать его концентрацию в электронно-плотных зонах. Морфологические изменения клеток мутанта более явно выражена на среде, обедненной нативным белком. В препаратах этой культуры, просмотренной в световом микроскопе, кокковидные клетки встречались реже, чаще встречались клетки грушевидной, гантелевидной и булавовидной форм. При электронно-микроскопическом исследовании обнаружено, что гетерогенность культуры объясняется атипичным делением; это приводит к образованию удлинённых клеток с множеством поперечных перегородок, нередко асимметрично расположенных. Некоторые из дочерних сегментов имели больший размер, придавая всей особи булавовидную или гантелевидную форму. Структура клеточной стенки данной культуры была аналогична структуре стенки мутанта, описанной выше.

Цитоплазма клеток, особенно в отдельных сегментах, имела высокую электронную плотность; зоны нуклеоида и внутрицитоплазматические мембранные структуры не выявлялись. Вне клеток обнаружены кристаллоподобные структуры округлой или гексагональной формы, обладавшие высокой электронной плотностью и имевшие определенную периодичность.

У культур ревертантов, особенно у его оксидазного варианта, продуцирующего увеличенные количества пероксида водорода, восстанавливалась форма и структура. У клеток редуктазного варианта со слабой продукцией пероксида водорода на поверхности клеточной стенки еще сохранялась небольшая микрокапсула, а клетки делились путем образования как симметричных, так и асимметричных перегородок. Даже когда клетки делились на четыре части, дочерние сегменты были неодинаковы по размеру.

Морфологические и ультраструктурные особенности исходной культуры аэрококка, мутанта и ревертантов, по-видимому, являются следствием изменений биологических свойств. Для установления этой связи было проведено сравнительное изучение ряда свойств культур аэрококков.

Было изучено отношение описываемых культур аэрококков к некоторым антибиотикам, действующим на основные пути биосинтеза клеточной стенки клетки мутанта в противоположность клеткам исходной культуры высокочувствительны к действию пенициллина, оксациллина, метициллина и устойчивы к действию лизоцима. У ревертантов в большей или меньшей степени наблюдается восстановление исходных свойств. Было установлено, что исчезновение антагонистической активности у мутантов связано с отсутствием продукции пероксида водорода вследствие потери активности НАД-независимой лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

Биосинтез лактата у исследованных культур аэрококков идет из метилглиоксала с участием глиоксалаз. Отсутствие окисления лактата у неактивного мутанта приводит к накоплению метилглиоксала, являющегося ингибитором биосинтеза полиаминов, регулирующих деление клеток [2,3,9]. Наибольшая концентрация метилглиоксала накапливается в культурах мутанта аэрококка, не продуцирующего пероксид водорода, особенно при введении в среду α-глицерофосфата. Обращает на себя внимание повышенное накопление метилглиоксала при введении в среду треонина в культуре редуктазного ревертанта, не полностью восстанавливающего исходную морфологию.

В литературе имеются единичные сообщения, связывающие морфологические изменения клеток без нарушения целостности клеточной стенки с функциональными изменениями. Снижение уровня супероксидной дисмутазы в культурах *Campylobacter*

*jejuni* ATС 29428 ведет к накоплению кокковидных форм [21]. Это указывает на невыясненную роль супероксидного радикала в процессе морфообразования. Csillag [16] описала кокковидную трансформацию культур микобактерий, связав ее с особыми условиями культивирования, в частности с изменением доступа кислорода в культуры.

#### **Выводы**

1. Наблюдения об изменчивости аэрококков отсутствуют. Получение и изучение различных морфологических вариантов аэрококков обсуждается впервые.

2. Отсутствие активности НАД-независимой лактатдегидрогеназы и накопление в культурах морфологических мутантов аэрококков метилглиоксаль позволяет связать эти явления с морфологической трансформацией аэрококков, так как метилглиоксаль является ингибитором биосинтеза полиаминов [20] и аутоингибитором бактерий [19].

#### **Литература**

1. А-бактерин в лечении и профилактике гнойно-воспалительных процессов / Кременчуцкий Г.Н., Рыженко С.А., Волянский А.Ю., Молчанов Р.Н., Чуйко В.И.- Днепропетровск.: Пороги, 2001.-252 С.
2. Алексеев В.С. Количественное определение лактата, пирувата и метилглиоксаль в их смеси // Укр. биохим. ж. - 1978. - 50. -№4. - С.517-518.
3. Алексеев В.С. Метилглиоксаль: метаболизм и биологическая активность // Укр. биохим. ж. - 1987. - 59. - №6. - С.88-94.
4. Гашинский В.В. Камера для микроскопического наблюдения за размножением микроорганизмов в проточной питательной среде. // Лаб. дело.-1964.-№12.- С.743-745.
5. Государственная фармакопея Союза Советских Социалистических Республик. - 10-е изд. - М.: Медицина, - 1968. - 1079 С.
6. Константинова Н.Д., Зигангирова Н.А., Прозоровский С.И., Кац Л.А. Исследование ультраструктуры микоплазм // Журн. микроб., эпидем. и иммунобиол.-1983.-Т.52, Вып.6.-С.56-59.
7. Кременчуцкий Г.Н., Ферхан Р. Определение лактатдегидрогеназной активности *Aerococcus viridans* // 5-я научно-практическая конференция КГМИ: тез.докл.- Кабул, ДРА.- 1986.-С.130-135.
8. Кременчуцкий Г.Н., Шарун Э.Н. Закономерности приобретения устойчивости к антибиотикам *Mycosoccus hyperoxydans* 167// VI съезд Украинского микробиологического общества: тез.докл.-Киев, 1984.-С.136.
9. Кременчуцкий Г.Н., Шарун Э.Н., Бицкий В.В. Отбор и изучение спонтанных «негемолитических» клонов *Aerococcus viridans* (*Mycosoccus hyperoxydans*) // Сб. Актуальные вопросы инфекционной патологии.- Днепропетровск, 1985.- С.34.
10. Кременчуцкий Г.Н. Биологические особенности А-бактерина // Медичні перспективи.-2001.-Т6, №3.-С.90-97.
11. Кременчуцкий Г.Н. А.с. № 1359301 СССР, Индикаторная среда для определения оксидазной активности *Aerococcus viridans*.- Оpubл. в БИ,1987, № 46.
12. Кременчуцкий Г.Н., Самойленко И.И. Действие перекиси водорода, продуцируемой *Aerococcus viridans* на *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* // Микробиол. ж.-1987.-Т.49, №2,-С.91-93.
13. Кременчуцкий Г.Н., Рыженко С.А., Вальчук С.И. Роль микроэкологии организма человека и принципы ее коррекции. – Днепропетровск: "Пороги", 2003.-230 С.
14. Ballester J.M., Ballester M., Belaich J.P. Virideocine: a bactericine from *Aerococcus viridans* // Ann.Microbiol.- 1977.-V.128, P.393 - 400.
15. Ballester J.M, Ballester M., Belaich J.P. Purification of the viridocine produced by *Aerococcus viridans* // Antimicrob. Agents Chemother.-1980.-V.17, N5.- P.784 - 788.
16. Csillag A. Growth of a Form 2 Mycobacterium and Various Bacillus Species on

- Lowenstein-Jensen Medium // J.Gen. Microbiol.-1964.-V.34.- P.341-352
17. *Doelle H.W.* Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Dependent and Nicotinamide Adenine Dinucleotide - independent lactate dehydrogenase in homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria // J.Bacteriol.-1971.-V.108, N3.- P.1284-1289.
  18. *Ferchan R., Kremenchutskyy G.* Research of production of hydrogen peroxide by aerococci // Abstr.Papers 6 Sci. Conference.-Kabul University.-1987.- P.135
  19. *Freedberg W.B., Kistler W.S., Lin E.C.* Lethal Synthesis of Methylglyoxal by *Escherichia coli* During Unregulated Glycerol Metabolism // J.Bacteriol.- 1971.-V.108, N 1.- P.137-144.
  20. *Gornall A.C., Bardawill C.J., David M.M.* Determinations of Serum proteins by means of the biuret reaction// J.Biol.Chem.- 1949.- V.177.- P751-766
  21. *Williams R.E.O., Hirsch A.* The detection of Streptococci in air // J.Hyg. - 1950. - V.48. - P.504-524.
  22. *Williams R.E., Hirsch A., Cowan S.T.* *Aerococcus* - a new bacterial genus // J.Gen.Microbiol.- 1953. -N.8. - P.475-480.

#### **Резюме**

Методами фазово-контрастної і електронної мікроскопії показані морфологічні і ультраструктурні зміни кліток *Aerococcus viridans*, втрачених здатність окислення лактату і не продуцируючих пероксид водню. У культурах мутантів виявлено підвищене вміст метилгліоксалу.

Методами фазово-контрастної і електронної мікроскопії показані морфологічні і ультраструктурні зміни кліток *Aerococcus viridans*, що втратили здатність окислення лактату і що не продукують пероксид водню. У культурах мутантів виявлений підвищений вміст метилгліоксалу.

The techniques of phase-contrast and electron microscopy were used to demonstrate morphological and ultrastructural modifications in *Aerococcus viridans* cells which had lost the ability to oxidise lactate synthesized in them via methyl glyoxal which accumulate in cells.

#### **КРИВОШЕЄВА Л.М., ЛОГІНОВ М.І.**

*Інститут луб'яних культур УААН,*

*Україна, 41400, м.Глухів Сумської обл., вул.Терещенків,45; E-mail: ibs@sm.ukrtel.net*

### **ГЕНЕТИЧНІ РЕСУРСИ РОСЛИН ЛЬОНУ ІНСТИТУТУ ЛУБ'ЯНИХ КУЛЬТУР УААН**

Льон – культура комплексного використання льоносировини в різних галузях виробництва. Успішний розвиток галузі льонарства залежить від селекційної роботи, завданням якої є створення високопродуктивних сортів льону-довгунця, які відповідають вимогам сільськогосподарського виробництва і легкої промисловості. Ефективність селекційної роботи залежить в першу чергу від генетичного різноманіття вихідного матеріалу, основним джерелом якого є світова колекція льону.

Розкриття потенціалу генетичних ресурсів за основними біологічними та селекційними ознаками забезпечує генетичну базу для реалізації селекційних програм різних напрямків. В цілому передселекційна робота включає всі етапи роботи з генофондом від збору, підтримання та вивчення до правових аспектів авторства на донори і джерела цінних ознак. Генетична різноманітність зразків, які зберігаються в центрах генетичних ресурсів рослин та генних банках світу, які слугують ефективною базою для поліпшення культур, повинні бути всебічно вивчені, а колекції ретельно організовані. Кожен зразок колекції повинен бути ідентифікований та паспортизований.