

УДК 579.871:577.115.3:57.083.1

С.М. Мороз¹, Р.І. Гвоздяк¹, Є.П. Черненко², А.М. Остапчук¹

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

²Національний аграрний університет,
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041, Україна

ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД КЛІТИННИХ ЛІПІДІВ *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS*

Вивчали жирнокислотний склад клітинних ліпідів *C. michiganensis subsp. michiganensis* (Стт) при різних умовах культивування. Встановили, що він знаходиться у вузькому діапазоні C_{14} – C_{18} і належить до ізоантеїзового типу. Видовою ознакою Стт є постійне, незалежне від температури, тривалості культивування і складу середовища переважання насичених розгалужених жирних кислот, серед яких домінують антеїзокислоти, в основному α - C_{15} . Реакцію на зміну температури вироцування бактерій, середовища та віку культури найкраще виражали величини співвідношення між окремими жирними кислотами. При цьому зміни жирнокислотного складу від віку культури та температури культивування залежать від штаму. Вироцування бактерій на багатому середовищі порівняно з бідним збільшує в ліпідах вміст нерозгалужених і антеїзокислот.

Ключові слова: *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, ліпіди, жирні кислоти, умови культивування.

© С.М. Мороз, Р.І. Гвоздяк, Є.П. Черненко, А.М. Остапчук, 2010

Видовий статус бактерій визначається сумою фено- та генотипових ознак. Серед фенотипових ознак бактерій найбільша увага приділяється якісному і кількісному складу жирних кислот (ЖК), які локалізовані в ліпідах мембран. Ця ознака корелює з даними молекулярно-генетичних досліджень [2, 8, 17].

Кількісний вміст окремих ЖК у ліпідах мембран мікробних клітин не є сталою величиною. Він змінюється залежно від умов росту мікроорганізмів. Однак зміна величини співвідношення між ЖК не виходить за межі, характерні для виду [2]. Останнім часом посилилася увага до ЖК бактерій ще тому, що деякі з них (ненасичені та розгалужені) є автоіндукторами у кворум-чутливій системі, яка забезпечує контакти як між членами популяції, так і з макроорганізмами [4].

Ліпіди грампозитивних бактерій, до яких належить фітопатоген *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith 1910) Davis et al. 1984, майже повністю локалізуються в цитоплазматичній мембрані [1]. Як складові мембран клітин бактерій ЖК беруть участь у підтриманні стабільності внутрішнього середовища клітини і її зв'язку із зовнішнім середовищем [1, 12]. Фізіологічна активність мембран та їхня плинність залежить від довжини, ступеня ненасиченості і типу жирнокислотних ланцюгів. Вона підвищується зі збільшенням у ліпідах вмісту коротколанцюгових, ненасичених і розгалужених антеізо-ЖК [10]. Від їхнього складу залежить температура фазового переходу ліпідів, що дає можливість бактеріальній клітині мінімізувати коливання у плинності мембран при зміні температури навколишнього середовища.

У бактерій виявлені різні адаптаційні відповіді клітин за участю ЖК ліпідів на зміни температури навколишнього середовища. Зокрема, у *Mycobacterium phlei* зі зменшенням температури від 35 до 26–20 °С збільшується вміст ненасичених кислот, а в разі подальшого зниження її до 10 °С вміст розгалужених ЖК знижується, а середня довжина ланцюга збільшується [14].

Listeria monocytogenes на зниження температури культивування від 45 до 5 °С реагує скороченням довжини жирнокислотного ланцюга, зміною типу розгалуження його від ізо- до антеізоконфігурації [7] та збільшенням відношення $a-C_{15:0}/a-C_{17:0}$ у 7 разів [11]. У *Arthrobacter chlorophenolicus* за психрофільних умов також збільшується вміст антеізоікислот, тоді як при високих температурах вирощування відношення антеізо-/ізо-ЖК зменшується [16].

У *Bacillus subtilis* зі зниженням температури інкубації від 40 до 10 °С збільшується вміст антеізо-ЖК, тоді як ізо-ЖК, точка плавлення яких вища, зменшується. [13]. *Bacillus megaterium* виявляє складнішу двофазову відповідь на зміну температури культивування. Загалом, у *B. megaterium* зі зниженням температури інкубації вміст загальних розгалужених ЖК зменшується на тлі збільшення нерозгалужених. Таким чином, бактеріям роду *Bacillus* притаманні видоспецифічні механізми адаптації до зміни температури [13].

У багатьох бактерій із віком культури не відбувається істотних змін у жирнокислотному складі ліпідів, але у деяких видів виявлено чіткі вікові адаптаційні пристосування. Так, із віком культур *Pseudomonas mallei* та *P. pseudomallei* збільшується рівень циклопропанових ЖК і зменшується вміст ненасичених. Водночас вміст розгалужених ЖК у клітинах першого виду незначно зменшується, а у другого – стрімко збільшується [1].

Умови інкубації ентеробактерій на багатому середовищі порівняно з ростом на бідних синтетичних середовищах та картопляному агарі індують підвищений рівень ЖК із непарною кількістю атомів вуглецю в жирнокислотному ланцюгу. Диспропорція у вмісті певних амінокислот-праймерів у живильному середовищі зумовлює зміни в синтезі відповідних ЖК у клітинних ліпідах [1].

Таким чином, величина співвідношення між ЖК ліпідів клітин змінюється залежно від зовнішніх умов, однак межі цих змін встановлені лише для деяких видів бактерій, а їх механізм ще до кінця не з'ясований. Зокрема, ці питання зовсім не вивчені у *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), дуже шкідливого збудника бактеріального раку томату. Тому метою нашої роботи стало вивчення впливу умов вирощування на ЖК клітинних ліпідів *Cmm* і встановлення меж адаптаційних змін.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження були штами 10 та 13а *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* із колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту

мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Для виявлення впливу температури, віку культури та складу середовища на жирнокислотний склад клітинних ліпідів бактерії вирощували за таких умов:

2 доби на картопляному агарі (КА) при температурах 5, 10, 15, 22 (нижчі за оптимальну), 28 (оптимальна) та 35 °С (близька до критичної);

упродовж 1, 2, 3, 5 та 7 діб при 28 °С на КА;

протягом однієї доби при 28 °С на КА, м'ясо-пептонному агарі (МПА) та КА, до якого додавали 3 % дріжджового автолізу (КА+ДА).

Бактеріальну масу змивали фізіологічним розчином, клітини осаджували центрифугуванням (5000 об./хв), ресуспендували у фізіологічному розчині і знову осаджували. Метиллові ефіри жирних кислот ліпідів, одержані після оброблення бактеріальних клітин 1,5 %-м розчином H_2SO_4 в метанолі (1 год, 80 °С), екстрагували ефір-гексаном (1:1) [1]. Жирнокислотний склад визначали за допомогою хромато-мас-спектрометричної системи Agilent 6890N/5973 inert, колонка капілярна HP-5MS. Температурний режим 150–250 °С, градієнт температури 4 °С/хв. Газ-носії – гелій, швидкість потоку – 1 мл/хв, температура випаровування – 250 °С, режим вводу Split – 1 : 25. Температура інтерфейсу становила 280 °С, джерела іонів – 230 °С, квадруполя – 150 °С.

Метиллові ефіри жирних кислот ідентифікували за допомогою мас-спектрометричної бази даних та стандартного набору суміші метилових ефірів жирних кислот бактерій («Supelco», США). Вміст жирних кислот наведено у відсотках загальної площі піків. Повторність дослідів – 3-разова. Статистичне оброблення даних проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента як описано у книзі [3]; вірогідними вважали дані при $p < 0,05$. Відносна величина стандартної похибки не перевищує 2 % від середнього значення вимірюваного показника.

Результати та їх обговорення. За кількістю атомів вуглецю ЖК ліпідів клітин *Cmm* обох штамів представлені вузьким їх набором – від C_{14} до C_{18} . Незалежно від умов культивування (температури, віку культури і складу живильного середовища) вміст розгалужених кислот становить 94–99 % (82–90 % антеізоокислот та 5–16 % ізоокислот) (табл. 1–3). Отже, клітинні мембрани фітопатогену *Cmm* за складом ЖК належать до ізоантеізового типу [10].

Серед антеізо-ЖК домінує 12-метилтетрадеканова ($a-C_{15,0}$), вміст якої від 49 до 71 %. Кількість 14-метилгексадеканової кислоти ($a-C_{17,0}$) – 11–36 %. Ненасичена 12-метилтетрадеценева кислота ($a-C_{15,1}$) міститься у незначній кількості: у штаму 13а – у межах 1–7 %, у штаму 10 – 1–12 %. Серед ізо-ЖК переважає 14-метилпентадеканова ($i-C_{16,0}$), рівень її у штаму 13а залежно від умов росту бактерій коливається від 11 до 15 %, а у штаму 10 – від 5 до 13 %. Інші ізо-ЖК, такі як 12-метилтридеканова ($i-C_{14,0}$), 13-метилтетрадеканова ($i-C_{15,0}$) та 15-метилгексадеканова ($i-C_{17,0}$) є мінорними і їхній вміст у клітинних ліпідах не перевищує 1 %. Серед нерозгалужених ЖК штамів 13а та 10 виявлено лише насичені, переважно гексадеканову ($C_{16,0}$), яка становить 1–3 % і 2–12 % відповідно. Вміст пентадеканової ($C_{15,0}$), гептадеканової ($C_{17,0}$) та октадеканової ($C_{18,0}$) ЖК не перевищує 1 % за різних умов культивування (табл. 1–3).

Вплив температури вирощування на жирнокислотний склад ліпідів *Cmm*. Оптимальний температурний інтервал росту *Cmm* – 22–28 °С, температура 37–47 °С є критичною. При 50–53 °С бактерії гинуть. Разом із цим, штучне зараження зелених плодів томату найкраще проявляється при температурах, які нижчі 22 °С. Імовірно, низька температура сприяє розвитку інфекційного процесу. Відомо, що культивування деяких бактерій при 8–10 °С активує фактори патогенності з інвазивною і токсичною функціями, внаслідок чого підвищується їхня агресивність [6]. Припускають, що в патогенезі деяких бактерій певну роль відіграє високий вміст біологічно активних ненасичених ЖК [5]. Згідно з нашими даними у *Cmm* відсоток єдиної ненасиченої $a-C_{15,1}$ найвищий при 10 і 15 °С у штамів 10 та 13а відповідно (табл. 1). Однак, можливо, в патогенезі *Cmm* беруть участь, крім ненасиченої, і інші ЖК.

Ріст бактерій обох штамів упродовж двох діб при різних температурах не впливає на загальну картину спектра ЖК ліпідів – змінюються лише співвідношення між ними (табл. 1). З підвищенням температури культивування від 5 до 35 °С здебільшого збільшується сумарна кількість насичених антеізоокислот ($a-C_{15,0}$, $a-C_{17,0}$), переважно $a-C_{15,0}$. Відсоток ненасиченої $a-C_{15,1}$ у ліпідах, навпаки, зменшується, особливо, якщо бактерії культивують при 35 °С (табл. 1).

Вміст жирних кислот (% від загальної площі піків) у клітинних ліпідах штамів 13а та 10 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* залежно від температури культивування

Жирні кислоти	Штам 13а						Штам 10					
	5 °C	10 °C	15 °C	22 °C	28 °C	35 °C	5 °C	10 °C	15 °C	22 °C	28 °C	35 °C
a-C _{15:0}	55,14*	63,42	64,32	67,68	64,67	71,41*	63,08*	54,99*	57,07*	54,14	51,83	58,83*
a-C _{17:0}	22,69	18,62	10,92*	14,31*	19,59	17,46	17,62*	17,90*	22,27*	29,67	28,90	28,23
a-C _{15:1}	5,84*	2,30*	6,63*	1,95*	1,53	0,76*	2,57*	12,48*	7,15*	4,41*	1,97	1,66*
i-C _{14:0}	сл	сл	0,78	0,61	0,31	сл	сл	сл	сл	сл	0,27	сл
i-C _{15:0}	сл	сл	0,32	0,33	0,33	сл	сл	сл	сл	0,28	0,63	сл
i-C _{16:0}	11,30	11,19	14,65*	13,41*	11,29	7,36*	12,89	9,00*	7,90*	8,03*	12,46	5,06*
i-C _{17:0}	1,01	1,84	сл	сл	сл	1,16	1,47	0,94	сл	сл	0,60	сл
C _{15:0}	сл	сл	0,38	0,39	0,47	0	0	0	0,74	0,40	0,37	0
C _{16:0}	3,44*	2,64*	1,39*	1,32*	1,82	1,86	2,36*	3,50*	3,99*	2,69*	2,98	6,22*
C _{18:0}	сл	сл	сл	сл	сл	сл	сл	сл	0,25	сл	сл	сл
X ₁	0,58	0	0,61	0	0	0	0	1,19	0,64	0,38	0	0
a-C _{15:0} + a-C _{17:0}	77,83*	82,04	75,24*	81,99	84,26	88,87*	80,70	72,89*	79,34	83,81*	80,73	87,06*
Σ a-ЖК	83,67	84,34	81,87*	83,94	85,79	89,63*	83,27	85,37*	86,49*	88,22*	82,70	88,72*
Σ i-ЖК	12,31	13,03*	15,75*	14,35*	11,93	8,52*	14,36	9,94*	7,90*	8,31*	13,96	5,06*
Σ a-ЖК/ Σ i-ЖК	6,80	6,47	5,20*	5,85*	7,19	10,52*	5,80	8,59*	10,95*	10,62*	5,92	17,53*

Примітка. Лут і в табл. 2 і 3: сл – вміст жирної кислоти менше 0,1 %; і – ізокалізація метильної групи біля передостаннього атома вуглецю в молекулі ЖК; а – anteізокалізація метильної групи біля 3-го з кінця атома вуглецю в молекулі ЖК; X₁, X₂ – неідентифіковані кислоти з часом утримання 10,58 та 11,83 відповідно.
* Зміни вірогідні порівняно з даними, одержаними при оптимальній температурі (28 °C) для росту бактерій, P<0,05

Вміст жирних кислот (% від загальної площі піків) у клітинних ліпідах штамів 13а та 10 *C. michiganensis* різного віку

Жирні кислоти	Штам 13а, доба							Штам 10, доба							
	1	2	3	5	7	1	2	3	5	7	1	2	3	5	7
a-C _{15:0}	63,58	64,67	62,82	65,80	68,38	62,96	51,83*	54,68*	55,13*	68,38	62,96	51,83*	54,68*	55,13*	51,89*
a-C _{17:0}	16,66	19,59*	19,23*	18,42*	18,31*	22,62	28,90*	29,90*	27,05*	18,31*	22,62	28,90*	29,90*	27,05*	31,20*
a-C _{18:1}	1,76	1,53	1,55	1,30*	1,17*	2,41	1,97*	2,28	1,48*	1,17*	2,41	1,97*	2,28	1,48*	2,11
i-C _{14:0}	0,92	0,31*	0,48*	0,48*	сл	0,29	0,27	сл	0,34*	сл	0,29	0,27	сл	0,34*	0,21*
i-C _{15:0}	0,34	0,33	0,44	0,42	сл	сл	0,63	0,61	0,62	сл	сл	0,63	0,61	0,62	0,59
i-C _{16:0}	12,39	11,29*	13,43*	12,00	11,17*	8,62	12,46*	10,18*	11,99*	11,17*	8,62	12,46*	10,18*	11,99*	11,52*
i-C _{17:0}	сл	сл	сл	сл	сл	сл	0,60	сл	0,50	сл	сл	0,60	сл	0,50	0,17
C _{15:0}	0,73	0,47	0,41	0,30*	сл	0,42	0,37	0,28*	0,37	сл	0,42	0,37	0,28*	0,37	0,28*
C _{16:0}	2,23	1,82*	1,63*	1,27*	0,96*	2,48	2,98*	1,82*	2,51	0,96*	2,48	2,98*	1,82*	2,51	1,76*
C _{18:0}	0,14	сл	сл	сл	сл	сл	сл	сл	сл	сл	сл	сл	сл	сл	сл
X ₁	0,16	0	0	0	0	0,20	0	0,25*	0	0	0,20	0	0,25*	0	0,28*
X ₂	0,99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Σ розгалужені	95,65	97,72*	97,95*	98,42*	99,03*	96,9	96,66	97,65	97,11	99,03*	96,9	96,66	97,65	97,11	97,69
Σ нерозгалужені	3,1	2,29*	2,04*	1,57*	0,96*	2,9	3,35*	2,10*	2,88	0,96*	2,9	3,35*	2,10*	2,88	2,04*
Σ розгалужені/ Σ нерозгалужені	30,85	42,67*	48,01*	62,69*	103,16*	33,41	28,85*	46,50*	33,72	103,16*	33,41	28,85*	46,50*	33,72	47,89*
Σ а-ЖК/Σ і-ЖК	6,01	7,19	5,83	6,63	7,87*	9,88	5,92*	8,05*	6,22*	7,87*	9,88	5,92*	8,05*	6,22*	6,82*
Σ непарні / Σ парні	5,30	6,45*	5,43	6,27*	7,24*	7,76	5,37*	7,31	5,74*	7,24*	7,76	5,37*	7,31	5,74*	6,39*
Σ коротколанцюгові	67,33	67,31	65,7*	68,3	69,55*	66,08	55,07*	57,85*	57,94*	69,55*	66,08	55,07*	57,85*	57,94*	55,08*
Σ довголанцюгові	31,42	32,7	34,29*	31,69	30,44*	33,72	44,94*	41,9*	42,05*	30,44*	33,72	44,94*	41,9*	42,05*	44,65*

Примітка. * Зміни вірогідні порівняно з даними, одержаними для однодобової культури бактерій, $P < 0,05$

Вміст насичених розгалужених ізо-ЖК ($i-C_{14:0}$ – $i-C_{17:0}$) становить 5–15 % загальної кількості їх у ліпідах. При цьому серед них домінує $i-C_{16:0}$. Відсоток ізо-ЖК у ліпідах стрімко знижується, якщо бактерії культивують при максимальній температурі – 35 °С, порівняно з оптимальною, в 1,4 і 2,8 раз у штамів 13а та 10 відповідно. Слід відзначити, що відсоток ізо-ЖК у разі росту за нижчої від оптимальної температури збільшується. Тобто антеізо-ЖК у ліпідах більше при високих температурах культивування бактерій на тлі нижчого вмісту ізо-ЖК. Тому величина співвідношення між антеізо- й ізо-ЖК максимальна при 35 °С. Зважаючи на те, що температура плавлення ізо-ЖК вища, ніж антеізо-ЖК, таке співвідношення свідчить про їхню важливу роль у регуляції стану мембран.

Нерозгалужених ЖК у бактерій виявлено три: $C_{15:0}$, $C_{16:0}$ та $C_{18:0}$. Серед них домінує $C_{16:0}$, відсоток якої у штаму 10 коливається від 2,36 до 6,22, а у 13а від 1,32 до 3,44. $C_{18:0}$ міститься в ліпідах у слідовій кількості, а $C_{15:0}$ – у мізерній і то тільки тоді, коли бактерії ростуть за оптимальних умов. Крім того, в ліпідах клітин за культивування при оптимальних та низьких температурах з'являється неідентифікована ЖК (X_1).

Вплив віку культури на жирнокислотний склад ліпідів *Smm*. Вік культури (від 1 до 7 діб) менше впливає на жирнокислотний склад клітинних ліпідів бактерій, ніж температура культивування. У обох штамів переважають розгалужені ЖК, які становлять 97–99 % (табл. 2). Причому їхній сумарний вміст із віком культури зростає: співвідношення розгалужених ЖК до нерозгалужених на 7-у добу культивування штаму 10 зростає в 1,5 рази, а штаму 13а – у 3 рази. Аналогічне збільшення вмісту розгалужених і зменшення нерозгалужених ЖК із віком культури виявлено у грампозитивної *Arthrobacter* sp. [9].

Розгалужені ЖК на 83–88 % від загальної кількості представлені антеізокіслотами і на 9–14 % – ізокіслотами. Мінорну ненасичену $\alpha-C_{15:1}$ у найбільшій кількості в ліпідах виявлено на перших етапах росту культури, тобто на початку лаг-фази.

Із віком культури у штаму 13а вміст $\alpha-C_{15:0}$ загалом зростає на 4,8 %, водночас вміст $\alpha-C_{17:0}$ теж незначно підвищується. У штаму 10, навпаки, на сьому добу росту порівняно з однідобовою вміст $\alpha-C_{15:0}$ знижується на 11,1 %, тоді як $\alpha-C_{17:0}$ зростає на 8,6 %. Аналогічно співвідношення ЖК з непарним числом атомів вуглецю в ланцюзі до таких із парним або зростає (штам 13а), або зменшується (штам 10) (табл. 2).

Рівень коротколанцюгових (C_{14} – C_{15}) ЖК у штаму 13а з віком культури загалом зростає, у той час як довголанцюгових (C_{16} – C_{18}) зменшується. Однак у дво- і тридобових культур бактерій, навпаки, знижується вміст коротколанцюгових ЖК на тлі збільшення його у довголанцюгових. У штаму 10, навпаки, з віком культури підвищується кількість довголанцюгових ЖК (на 11 %), на тлі зниження коротколанцюгових.

Таким чином, штамам 13а і 10 із віком культури притаманне збільшення вмісту розгалужених і зменшення нерозгалужених ЖК. За перерозподілом пулів ізо- та антеізо-ЖК, а також довго- і коротколанцюгових ці штами відрізняються.

Вплив середовища на жирнокислотний склад клітинних ліпідів *Smm*. Відомо, що попередниками в біосинтезі ЖК у бактерій є різні амінокислоти. Так, непарні антеізо-ЖК ($\alpha-C_{15:0}$ та $\alpha-C_{17:0}$) синтезуються з ізолейцину, тоді як непарні ізо-ЖК ($i-C_{15:0}$ та $i-C_{17:0}$) – з лейцину. Для синтезу $i-C_{14:0}$ та $i-C_{16:0}$, а також нерозгалужених ЖК із аналогічною довжиною ланцюга необхідний валін [9]. Тому відмінності у складі живильного середовища спричинюють зміни у жирнокислотному складі клітинних ліпідів.

Вирощування бактерій на багатих амінокислотами середовищах, таких як МПА та КА + ДА, а також на КА, бідному на амінокислоти, свідчить, що профілі ЖК ліпідів *Smm* не залежать від живильного середовища (табл. 3). У ліпідах клітин, які виростили на різних середовищах, залишаються незмінними домінуючі і мінорні ЖК. Превалують розгалужені насичені ЖК, серед яких найбільший відсоток (49,13 – 63,58 %) припадає на $\alpha-C_{15:0}$ (табл. 3).

Однак ріст на різних середовищах неоднаково впливає на вміст ЖК у ліпідах. При рості на КА, бідному на амінокислоти, порівняно з КА + ДА та МПА, в ліпідах обох штамів значно збільшується вміст $i-C_{16:0}$, домінуючої $\alpha-C_{15:0}$ та $i-C_{14:0}$. При цьому така різниця істотна: збільшення цих ЖК у ліпідах становить 20,31 % для штаму 13а і 14,62 % для штаму 10. Вміст таких ЖК як $\alpha-C_{17:0}$, $\alpha-C_{15:1}$, $i-C_{15:0}$, $i-C_{17:0}$, $C_{17:0}$, $C_{18:0}$ навпаки, зменшується в ліпідах при рості штамів 13а та 10 на КА порівняно з багатими середовищами: штам 13а на КА + ДА – 17,28 %,

на МПА – 13,28 %, штамп 10 – на КА + ДА – 12,84 %, МПА – 13,95 %. Концентрація інших ЖК, мінорних, залежить як від середовища, так і від штаму. Збільшення вмісту нерозгалужених і антеїзокислот та зменшення ізо-ЖК при вирощуванні на багатших амінокислотами середовищах порівняно з біднішими, виявлене для *Stm*, відзначено також для інших видів корінеформних бактерій з ізоантеїзо типом ЖК [15].

Таблиця 3

Вміст жирних кислот (% від загальної площі піків) у клітинних ліпідах штамів 13а та 10 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* залежно від живильного середовища

Жирні кислоти	Штам 13а			Штам 10		
	КА	КА+ДА	МПА	КА	КА+ДА	МПА
a-C _{15:0}	63,58	49,13*	54,35*	62,96	53,03*	51,43*
a-C _{17:0}	16,66	32,66*	30,29*	22,62	33,55*	36,24*
a-C _{15:1}	1,76	4,41*	3,16*	2,41	3,53*	2,17
i-C _{14:0}	0,92	0,12*	сл	0,29	0,10*	сл
i-C _{15:0}	0,34	0,86*	0,50	сл	0,55	сл
i-C _{16:0}	12,39	7,53*	7,30*	8,62	5,89*	5,82*
i-C _{17:0}	сл	0,36	сл	сл	0,24	сл
C _{15:0}	0,73	0,55	0,92	0,42	0,30	0,71*
C _{16:0}	2,23	2,38	2,65	2,48	1,64*	3,12*
C _{17:0}	сл	0,17	0,29	сл	сл	0,51
C _{18:0}	0,14	0,14	0,29*	сл	сл	сл
X ₁	0,16	0,45*	0,26*	0,20	0,36*	0
X ₂	0,99	1,24	0	0	0,81	0
Σ a-ЖК	82,00	86,2*	87,8*	87,99	90,11*	89,84
Σ i-ЖК	13,65	8,87*	7,80*	8,91	6,78*	5,82*
Σ нерозгалужені	3,10	3,24	4,15*	2,9	1,94*	4,34*

Примітка. КА – картопляний агар, КА+ДА – картопляний агар з 3 % дріжджового автолізу, МПА – м'ясо-пептонний агар; * – зміни вірогідні порівняно з даними, одержаними при культивуванні бактерій на КА, $P < 0,05$.

Значне збільшення вмісту у клітинних ліпідах a-C_{17:0} і одночасне зменшення домінуючої a-C_{15:0} (попередником обох є ізолейцин) при вирощуванні бактерій на багатших амінокислотами середовищах порівняно з КА, свідчить про домінуючу регульовальну роль бактеріального синтезу ЖК.

Висновки:

Профілі клітинних ЖК *Stm* представлені вузьким набором C₁₄ – C₁₈ і не залежать від температури культивування, складу середовища та фаз розвитку.

У *Stm* домінують (94–99 %) насичені розгалужені антеїзо- й ізо-ЖК за всіх умов культивування. Серед них переважають антеїзо-ЖК (82–90 %) – a-C_{15:0} (49–71 %), a-C_{17:0} (11–36 %) та єдина ненасичена a-C_{15:1} (1–12 %).

Із підвищенням температури інкубації *Stm* від 5 до 35 °C в ліпідах збільшується відсоток насичених антеїзо-ЖК, особливо a-C_{15:0} і зменшується ненасиченої a-C_{15:1}. Відсоток ізо-ЖК стрімко знижується за вирощування при 35 °C.

З віком культури збільшується вміст розгалужених ЖК. Ця ознака є штамовою, а не видовою.

Співвідношення між ЖК клітинних ліпідів залежить від поживного середовища. За дефіциту в живильному середовищі амінокислот у клітинних ліпідах збільшується вміст ізо-, парних і коротколанцюгових ЖК, тоді як кількість антеїзо-, непарних і довголанцюгових зменшується.

Адаптаційні зміни жирнокислотного складу клітинних ліпідів *Stm* не виходять за межі, виду. Склад ЖК клітинних ліпідів *Stm* та співвідношення між основними ЖК можуть бути використані для ідентифікації виду.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИПИДОВ *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS*

Резюме

Изучали жирнокислотный состав клеточных липидов *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* при разных условиях культивирования. Установили, что он находится в узком диапазоне C₁₄–C₁₈ и принадлежит к изоантеизовому типу. Видовым признаком является постоянное, независимое от температуры, длительности культивирования и состава среды преобладание насыщенных разветвленных жирных кислот, среди которых доминируют антеизокислоты, в основном а–C₁₅. Реакцию на изменение температуры выращивания бактерий, среды и возраста культуры лучше всего выражают величины соотношения между отдельными жирными кислотами. При этом изменения жирнокислотного состава от возраста культуры и температуры культивирования зависят от штамма. Выращивание бактерий на богатой среде в сравнении с бедной увеличивает в липидах содержание неразветвленных и антеизокислот.

Ключевые слова: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, липиды, жирные кислоты, условия культивирования.

S.M. Moroz¹, R.I. Gvozdyak¹, E.P. Chernenko², A.M. Ostapchuk¹

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²National Agrarian University, Kyiv

EFFECT OF CULTIVATION CONDITIONS ON FATTY ACID CONTENT OF *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS* LIPIDS

S u m m a r y

The fatty acid content of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* cellular lipids in different culture conditions was investigated. It was established, that it lies in a narrow range C₁₄–C₁₈ and belongs to isoanteiso type. The species character is constant, independent of temperature, duration of cultivation and medium content dominance of saturated branched-chain fatty acids, among which the anteiso-acids dominate, generally а–C₁₅. A response to the temperature modification of bacteria cultivation, medium and age of culture is expressed by relations between separate fatty acids. Thus the modifications of fatty acid content, connected with age of culture and temperature of cultivation, depend on a strain. The cultivation of bacteria on a rich medium in comparison with poor one enlarges the content of nonbranched-chain and anteiso-acids in lipids.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, cellular lipids, fatty acids, culture conditions.

The author's address: Moroz S.M., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Васюренко З.П., Фролов А.Ф., Смирнов В.В., Рубан Н.М. Жирнокислотные профили бактерий, патогенных для человека и животных. – Киев: Наук. думка, 1992. – 263 с.
2. Колпанцева Е.И., Илхофф Й.Ф., Тиманн Б., Пантелеева Е.Е., Акимов В.Н. Сравнительное изучение жирнокислотного состава некоторых групп несерных пурпурных бактерий // Микробиология. – 2007. – 76, № 5. – С. 615–626.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. – Москва: Высш. школа, 1990. – 352 с.
4. Олексин О.В., Кировская Т.А. Популяционно-коммуникативное направление в микробиологии // Микробиология. – 2006. – 75, № 4. – С. 440–445.
5. Сельникова О.П., Полищук Е.И., Васюренко З.П., Рубан Н.М. Отсутствие различий в жирнокислотном составе клеток и липополисахаридов иерсиний разных видов в условиях роста при низкой температуре // Журн. микробиол. – 2005. – № 6. – С. 10–14.
6. Сомов Г.П., Варвашевич Т.Н. Влияние низкой температуры на вирулентность некоторых патогенных бактерий // Журн. микробиол. – 1992. – № 4. – С. 62–66.
7. Annous B.A., Becker L.A., Bayles D.O., Labeda D.P., Wilkinson B.J. Critical role of anteiso-C_{15:0} fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – 63, N 10. – P. 3887–3894.
8. Buyer J.S. Identification of bacteria from single colonies by fatty acid analysis // J. Microbiol. Meth. – 2002. – 48, N 2. – P. 259–265.

9. *Caudales R., Forni C., Wells J.M.* Cellular fatty acid composition of rod and coccus forms of *Arthrobacter globiformis*, *A. crystallopoietes* and *A. nicotianae* isolated from the water fern *Azolla* // *J. Appl. Microbiology*. – 1998. – **84**, N 7. – P. 784–790.
10. *Kaneda T.* Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance // *Microbiol. Rev.* – 1991. – **55**, N 2. – P. 288–302.
11. *Mastronicolis S.K., Boura A., Karaliota A., Magiatis P., Arvanitis N., Litos C., Tsakirakis A., Paraskevas P., Moustaka H., Heropoulos G.* Effect of cold temperature on the composition of different lipid classes of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*: focus on neutral lipids // *Food Microbiol.* – 2006. – **23**, N 2. – P. 184–194.
12. *Medeot D.B., Bueno M.A., Dardanelli M.S., de Lema M.G.* Adaptational changes in lipids of *Bradyrhizobium* SEMIA 6144 nodulating peanut as a response to growth temperature and salinity // *Curr. Microbiol.* – 2007. – **54**, N 1. – P. 31–35.
13. *Suutari M., Laakso S.* Unsaturated and branched chain-fatty acids in temperature adaptation of *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1992. – **1126**, N 2. – P. 119–124.
14. *Suutari M., Laakso S.* Effect of growth temperature on the fatty acid composition of *Mycobacterium phlei* // *Arch. Microbiol.* – 1993. – **159**, N 2. – P. 119–123.
15. *Suzuki K.-I., Komagata K.* Taxonomic significance of cellular fatty acid composition in some coryneform bacteria // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1983. – **33**, N 2. – P. 188–200.
16. *Unell M., Kabelitz N., Jansson J.K., Heipieper H.J.* Adaptation of the psychrotroph *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 to growth temperature and the presence of phenols by changes in the anteiso/iso ratio of branched fatty acids // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2007. – **266**, N 2. – P. 138–143.
17. *van den Velde S., Lagrou K., Desmet K., Verhaegen J.* Species identification of corynebacteria by cellular fatty acid analysis // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2006. – **54**, N 2. – P. 99–104.

Отримано 18.03.2009