

ПРОВ 1320

ПРОВ 98

577.47
и 712

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ
им. А. О. КОВАЛЕВСКОГО

ПРОВ 2010

БИОЛОГИЯ МОРЯ

Вып. 17

ПРОДУКЦИОННО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ
ПРОЦЕССЫ В ПЛАНКТОНЕ ЮЖНЫХ МОРЕЙ

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА»

КИЕВ — 1969

Институт
биологии южных морей

БИБЛИОТЕКА

22713

Л и т е р а т у р а

- АЛФИМОВ Н.Н. Об использовании культуры диатомовых водорослей для оценки степени загрязнения морских вод. - Бот. журн., 46, 1956.
- ВОРОШИЛОВА А.А. и ДИАНОВА Е.В. О бактериальном окислении нефти и ее миграции в природных водоемах. - Микробиология, 1950, 19, 3.
- МИРОНОВ О.Г. и ЛАНСКАЯ Л.А. Выживаемость морских планктонных и бентопланктонных водорослей в морской воде, загрязненной нефтепродуктами. - Бот. журн., 58, 5, 1968.
- ALLEN J.a. NELSON E.W. On the artificial culture of plankton organisms. - J. Mar. Biol. Assoc., 3, 5, 1910
- GALTSOFF P.S., PRYTHERCH H.E., SMITH R.O., KOERING V. Effects of crude oil pollution on oysters in Louisiana water. - Bull. U.S. Bureau Fisher. 18, 1936 (цит. по ZOBELL C.E., 1964).
- MALLET L., SARDOU J. Recherche de la Presence de l'hydrocarbure polibenzenique benzo-3-4-pyrene dans le milieu planctonique de la region de la bail Villefranche. - Pollutions marines par les microorganismes et les produits petroliers. Paris, 1965.
- ZOBELL C.E. The occurrence, effects and fate of oil polluting the sea. 1964 (Reprinted from Int. Conf. on Water Pollut. Research; London, 1962. Pergamon Pres.)

АНТИБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОРСКИХ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

Е.М.Маркианович

Изучение антагонизма среди микроорганизмов - одна из важнейших проблем современной микробиологии. В настоящее время антибиотики не только грибного, но и бактериального происхождения широко применяются в медицине, сельском хозяйстве и других отраслях народного хозяйства. До недавнего времени поисковые работы по выявлению мигробов-антагонистов ограничивались в основном наземной микрофлорой. Микрофлора морей и океанов в этом отношении почти не изучена. В доступной нам литературе известны лишь

отдельные работы /ZoBell, 1936; Waksman, 1937; Красильников, 1938; Rosenfeld a. ZoBell, 1947; Красильникова, 1961; Виск и др., 1962; Крисс и др., 1964/, где сообщается о способности морских бактерий образовывать антибиотические вещества. Надо думать, что среди морских микроорганизмов можно обнаружить новых, перспективных микробов-антагонистов. Поэтому нам представлялось небезынтересным проверить на наличие антибиотической активности имеющуюся в Институте биологии южных морей АН УССР коллекцию культур микроорганизмов, выделенных из различных морей Средиземноморского бассейна, в Красном море и Аденском заливе.

В нашу задачу входило выяснение широты распространения явления антагонизма между морскими микроорганизмами и тест-организмами неморского происхождения и выявление среди морских бактерий активных антагонистов, которых в дальнейшем можно было бы всесторонне изучать.

Испытание антибиотической активности проводили на сухом питательном агаре¹ /СПА/, которым пользовались и при выделении культур из моря. Это было целесообразно в связи с тем, что наибольшая антибиотическая активность у морских микроорганизмов отмечена на белковых средах /Красильникова, 1961/. Синтетические и так называемые "экологические" среды либо не оказывают заметного влияния на антибиотическую активность, либо на них последняя совсем не проявляется.

Всего на антибиотическую активность было проверено более тысячи культур морских микроорганизмов, выделенных в экспедициях 1959-1962 гг. в указанных районах. Для этого использовали 11 тест-организмов, принадлежавших к различным систематическим группам: 1/ неспорным бактериям /*Bacterium coli*, *Pseudomonas putrescens*, *Bacterium prodigiosum* /, 2/ споровым бактериям /*Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* /, 3/ кокковым формам /*Staphylococcus aureus* /, 4/ дрожжам /*Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae* /, 5/ грибам /*Penicillium chrysogenum* и *Fusarium vasinfectum* / и 6/ актиномицетам /*Actinomyces violaceus* /. Применение довольно большого набора тест-микробов позволило полнее выявить наличие антибиотических свойств у изученных микроорганизмов.

¹ Триптический гидролизат рыбной муки.

Определение антибиотической активности культур проводили по методике агаровых блочков /Егоров, 1957, 1965/, выполняя основные условия, которые необходимо учитывать при использовании метода, основанного на диффузии вещества в агар. Отличие состояло в том, что в каждую чашку Петри, засеянную тест-организмом, помещали до 30 блочков с испытуемыми культурами. Для посева тест-организмов газоном предварительно из них готовили суспензию /из расчета 2 млрд. микробных клеток в 1 мл воды¹/, затем 1 мл этой суспензии добавляли к 100 мл расплавленной и остуженной до 45°C среды, благоприятной для роста теста. Бактериальные тест-организмы выращивали на СПА, приготовленном на дистиллированной воде; дрожжи - на агаризованном сусле; грибы - на картофельном агаризованном сусле и актиномицеты - на видоизмененной среде Чапека. Среду, содержащую суспензию тест-микроба, тщательно размешивали и разливали по 15 мл в чашки Петри, куда и раскладывали блочки с испытуемыми культурами, предварительно выращенными /в течение двух дней при 28°C/ на благоприятной для них среде. Затем чашки помещали в термостат с температурой, необходимой уже для роста тест-микробов /*Bact. coli* и *St. aureus* при температуре 37°C, а все остальные - при 28°C/. В каждом опыте проверяли до 180 культур.

Показателем антагонистического взаимоотношения между культурами, выделенными из моря, и тест-организмами служила стерильная зона вокруг блочка. По величине ее судили о силе антибиотического воздействия испытуемого микроба на тест-организм и об относительном количестве накапливающихся в зоне роста антибиотических веществ.

Анализ полученных материалов показал, что почти 50% культур, выделенных из Средиземного и Красного морей и Адриатического залива и изученных на наличие антибиотической активности, являются антагонистами неморских тест-организмов /табл. 1/.

По данным Е.Н.Красильниковой /1961/, из 326 культур гетеротрофных бактерий, выделенных из открытых областей Мирового океана, 27 /около 10%/ являлись антагонистами. Розенфельд и Зобелл /Rosenfeld a. ZoBell, 1947/ указывают, что из 58 чистых культур морских бактерий 9 /15,5%/ проявляли антибиотическую активность

¹ Суспензию из *P. chrysogenum* и *A. violaceus* готовили не по стандарту мутности, а делали смыв с косяка данной культуры. *Bac. mycoides* засеивали суспензией спор /приготавливали исходя из того же расчета/.

Т а б л и ц а 1

Встречаемость антибиотически активных культур
гетеротрофных бактерий в изученных морях

Район исследования	Общее число изученных культур	Из них проявили актив- ность	Процент активных культур
Средиземное море	570	205	36,0
Красное море	241	136	56,4
Аденский залив	219	123	56,1

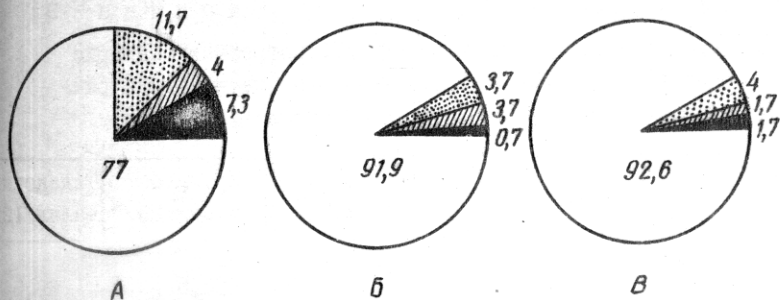
по отношению к неморским формам бактерий, и на основании этого делают заключение, что море можно считать потенциальным источником антибиотиков. Наши данные являются еще более убедительным подтверждением этого.

Антибиотически активные культуры чаще всего встречались среди споровых бактерий /от 55,8% в Средиземном море до 100% в Красном море и Аденском заливе/. На втором месте в Средиземном море стоят кокковые формы /45,4%/, затем следуют неспороносные палочки и **микобактерии**, среди которых примерно треть культур проявляла антибиотические свойства. В Красном море и Аденском заливе значительно возрастает процент антибиотически активных культур среди неспороносных палочек /58,1 и 57,3%/, в то время как среди кокковых форм они встречались реже. О широте распространения антагонизма у споровых бактерий и микобактерий в этих водоемах судить трудно, ввиду того что данные группы микроорганизмов были представлены малым числом культур. Они обладали большой антибиотической активностью /табл. 2/.

Поскольку во всех исследованных водоемах выделенные культуры в своей подавляющей массе оказались неспороносными бактериями /что в общем понятно, так как микрофлора в море представлена преимущественно этой группой бактерий/, то и основная масса антибиотически активных культур приходилась на эту группу микроорганизмов /см. рисунок/. Внутри группы неспороносных палочек наибольший процент активных культур отмечен для рода *Bacterium* /табл.3/. Среди остальных родов антагонистов было значительно меньше.

Т а б л и ц а 2
Антибиотическая активность у гетеротрофных бактерий различной систематической принадлежности в изученных морях

Группы микроорганизмов	Средиземное море				Красное море				Аденский залив			
	Общее число изученных культур в группе	Из них проявили активность	Процент активных культур	Общее число изученных культур в группе	Из них проявили активность	Процент активных культур	Общее число изученных культур в группе	Из них проявили активность	Общее число изученных культур в группе	Из них проявили активность	Процент активных культур	
Неспороносные палочки	468	158	33,8	215	125	58,4	199	114	57,3			
Спороносные палочки	43	24	55,8	5	5	100,0	5	5	100,0			
Микобактерии	26	8	30,8	1	1	100,0	2	2	100,0			
Кокковые формы	33	15	45,4	20	5	25,0	13	2	15,4			
И т о г о	570	205	36,0	241	136	56,4	219	123	56,1			



Распространенность антибиотических свойств среди гетеротрофных микроорганизмов по систематическим группам /в % от числа активных культур/:

□ - неспоронные палочки, ▤ - споронные палочки, ▨ - микобактерии, ■ - кокковые формы; А - в Средиземном море, Б - в Красном море, В - в Аденском заливе.

Представляло интерес выяснить, насколько часто морские бактерии проявляют антибиотические свойства по отношению к тем или другим группам тест-организмов - грамотрицательным и грамположительным бактериям, дрожжам, грибам и актиномицетам /табл. 4/. Оказалось, что в целом больше всего антагонистов среди морских микробов встречалось по отношению к грибным и грамположительным бактериям /49,6 и 49,3%/; несколько меньше - к дрожжам /39,4%/ и грамотрицательным тест-объектам /36,9%/. Реже морские бактерии проявляли антагонизм к актиномицетам /15,5%/.

Среди микроорганизмов разных родов наблюдаются некоторые различия в проявлении антибиотических свойств к тест-организмам, отличающимся окраской по Граму или систематической принадлежностью. Так, культуры рода *Bacterium* наиболее часто проявляли антагонизм по отношению к грибным и грамотрицательным, а культуры рода *Pseudomonas* - к грибным и грамположительным тестам. Среди культур рода *Bacillus* чаще всего встречались антибиотически активные культуры по отношению к грамположительным и дрожжевым тест-микробам. Отмечены также отличия в проявлении антагонизма у микроорганизмов разных родов. Так, в пределах рода *Bac-*

Т а б л и ц а 3

Антибиотическая активность у гетеротрофных бактерий различной родовой принадлежности в изученных морях /в % от общего числа активных культур/

Род бактерий	Средиземное море/205/*	Красное море/136/*	Аденский залив/128
<i>Bacterium</i>	56,2	68,5	69,0
<i>Chromobacterium</i>	2,4	1,4	0,7
<i>Pseudomonas</i>	10,7	4,3	6,2
<i>Vibrio</i>	1,9	5,8	5,4
<i>Spirillum</i>	-	3,6	1,4
<i>Pseudobacterium</i>	5,9	8,6	10,6
<i>Mycobacterium</i>	3,9	0,7	1,4
<i>Mycococcus</i>	0,9	2,8	-
<i>Micrococcus</i>	5,9	-	-
<i>Sarcina</i>	0,5	0,7	1,4
<i>Bacillus</i>	11,7	3,6	3,9

* В скобках приведено общее число активных культур в данном районе.

terium были наиболее распространены культуры, обладающие антибиотическими свойствами по отношению к *Fus.vasinfestum* и *Bact. prodigiosum*. Наименьшее число антагонистов у данного рода наблюдалось по отношению к *Bact.coli*. Довольно много антагонистов к *Fus.vasinfestum* отмечено также среди культур рода *Pseudomonas*. В пределах родов *Bacillus* и *Pseudobacterium* наиболее часто встречались культуры, проявляющие антибиотическую активность по отношению к *Cand.albicans* и *Sacch.cerevisiae*

Т а б л и ц а 4

Проявление антибиотических свойств у морских бактерий, принадлежащих к различным родам, по отношению к тест-организмам /цифры показывают число активных культур/

Род бактерий	Число активных культур данного рода	Тест-организмы										
		грамотрицательные			грамположительные			дрожжи		грибы		актиномицеты
		Bact.coli	Ps. pyocyaneum	Bact.prodigiousum	St.aureus	Bac. subtilis	Bac. mycoides	Cand. albicans	Sacch.cerevisiae	Pen.chrysogenum	Fus.vasinfecum	Act.violaceus
Bacterium	301	1	13	107	7	39	62	59	23	32	122	40
Chromobacterium	9	2	-	2	1	4	2	1	1	2	3	-
Pseudomonas	36	3	1	5	2	12	5	11	5	6	18	5
Vibrio	7	1	-	1	-	4	1	1	1	1	-	-
Spirillum	7	1	1	5	-	5	-	1	-	-	-	-
Pseudobacterium	37	2	4	5	10	9	6	24	14	2	3	11
Mycobacterium	11	1	-	-	3	1	3	1	-	2	9	2
Mycococcus	6	-	-	-	3	-	-	2	-	1	1	1
Micrococcus	12	-	-	-	1	2	2	1	-	1	5	5
Sarcina	4	-	-	-	1	1	-	3	1	1	-	-
Bacillus	34	3	-	11	13	12	14	20	14	8	13	8
И т о г о	464	169			229			183		230		72
Процент от числа активных культур		36,4			49,4			39,4		49,6		15,5

и реже к *Bact. coli*, а у рода *Pseudobacterium* — также и к *Pen. chrysogenum* и *Fus. vasenfectum*. Среди антибиотически активных культур других родов антагонистические свойства по отношению к каждому из тест-организмов проявляли преимущественно одиночные культуры.

Исследуемые культуры обладали довольно широким антибиотическим спектром. Представители 50% изученных родов бактерий показали антибиотическую активность по отношению к более чем четырем тест-организмам; третья часть культур проявляла антагонизм к 8-11. Диаметр стерильных зон значительно колебался /табл. 5/ и у отдельных культур доходил до 70 мм.

В ы в о д ы

1. Изучение антибиотической активности гетеротрофных бактерий морского происхождения показало, что почти половина изученных культур обладает антибиотическими свойствами.

2. Наибольший процент антибиотически активных культур в исследуемых районах приходился на группу спорообразующих бактерий; на втором месте в Средиземном море стояли кокковые формы, а в Красном море и Аденском заливе — неспороносные бактерии.

3. Наиболее активные культуры, образующие стерильные зоны диаметром от 21 до 70 мм, обнаружены в пределах родов *Bacillus*, *Bacterium*, *Pseudobacterium*. Эти культуры заслуживают дальнейшего всестороннего изучения.

Л и т е р а т у р а

- ЕГОРОВ Н.С. Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности. Изд-во МГУ, 1957.
- ЕГОРОВ Н.С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. "Вышая школа", М., 1965.
- КРАСИЛЬНИКОВ Н.А. Бактерицидность морской воды. — Микробиология, 7, 3, 1938.
- КРАСИЛЬНИКОВ Н.А. Биологическое значение антибиотических веществ. — Тр. Ин-та микробиологии АН СССР, 1, 1951.
- КРАСИЛЬНИКОВА Е.Н. Об антибиотических свойствах микроорганизмов, выделенных из различных глубин Мирового океана. — Микробиология, 30, 4, 1961.

- КРИСС А.Е., МИШУСТИНА И.Е., МИЦКЕВИЧ И.Н., ЗЕМЦЕВА Э.В. Микробное население Мирового океана. "Наука", М., 1964.
- BUCK I.D., MEYERS S.P., KAMP K.M. Marine bacteria with antiyeast activity.-Science, 138, 3547, 1962.
- ROSENFELD W.D. a. ZOBELL C.E. Antibiotic production by marine microorganisms.-J.Bact., 54, 1947.
- WAKSMAN S. Associative and antagonistic effects of microorganisms.-Soil.Sci., 43, 1, 1937.
- ZOBELL C.E. Bactericidal action of sea water.-Proc.Soc.Exper. Biol.Med., 34, 113, 1936.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА КУЛЬТУРОЙ
BACTERIUM AGILE МОРСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Э.А.Чепурнова

Главная роль в процессах разложения и превращения органического вещества в океанах отводится гетеротрофным бактериям. Многие органические вещества не растворимы в воде или же обладают большим молекулярным весом, в силу чего не могут проникнуть внутрь микробной клетки. К числу таковых относятся высокомолекулярные вещества типа полисахаридов /в частности, альгиновая кислота, водорослевый крахмал/, которые могут встречаться в относительно больших количествах в морской воде, являясь продуктами прижизненного и посмертного выделения водорослей. Первым этапом усвоения подобных веществ должно быть их разложение до низкомолекулярных соединений, что осуществляется гидролитической деятельностью микробов с помощью выделяемых в среду ферментов. Обнаружение внеклеточных ферментов бактерий в культуральных средах - давно известный факт, однако имеется небольшое число работ, устанавливающих, что выделение их осуществляется именно живыми клетками. В некоторых исследованиях появление ферментов в культуральных средах рассматривается исключительно как результат автолиза отмерших клеток, и можно назвать только единичные работы, касающиеся изучения ферментативной деятельности в морской воде.

Наблюдение за ферментативным расщеплением крахмала одной

Таблица 5

Антибиотическая активность морских бактерий различных родов по отношению к тест-организмам /цифры показывают число активных культур; / - / - отсутствие стерильной зоны/

Род бактерий	Bact. coli	Ps. pyocyaneum	Bact. prodigiosum	St. aureus	Bac. subtilis	Bac. mycoides	Cand. albicans	Sacch. cerevisiae	Pen. chrysogenum	Fus. vasinfectum	Act. violaceus
	Диаметр стерильных зон, мм										
	7-10 11-20 21-40 41-70	7-10 11-20 21-40 41-70	7-10 11-20 21-40 41-70	7-10 11-20 21-40 41-70	7-10 11-20 21-40 41-70	7-10 11-20 21-40 41-70	7-10 11-20 21-40 41-70	7-10 11-20 21-40 41-70	7-10 11-20 21-40 41-70	7-10 11-20 21-40 41-70	7-10 11-20 21-40 41-70
СРЕДИЗЕМНОЕ МОРЕ											
Bacterium	- - I -	I I - -	24 2 - -	2 5 - -	7 6 - -	I 6 - -	3 6 3 -	2 3 - -	I 5 2 -	57 22 - -	2 9 - -
Chromobacterium	- - - -	- - - -	I - - -	- - - -	I - I -	- - I -	- - I -	I - - -	- 2 - -	3 - - -	- - - -
Pseudomonas	- 2 - -	- I - -	2 I - -	- - I -	- 5 - -	I 2 - -	3 I I -	I I - -	- 2 - -	5 II I -	3 2 - -
Vibrio	- - - -	- - - -	I - - -	- - - -	- - - -	- I - -	I - - -	- - - -	- I - -	- - - -	- - - -
Spirillum	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Pseudobacterium	- - - -	- - - -	2 I - -	2 I - -	- 2 I -	I - 2 -	- 4 2 -	3 I - -	- 2 - -	I 2 - -	I - - -
Mycobacterium	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- I - -	I I - -	- - I -	- - - -	- I - -	4 2 - -	I I - -
Mycococcus	- - - -	- - - -	- - - -	I - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- I - -	I - - -	- I - -
Micrococcus	- - - -	- - - -	- - - -	I - - -	I I - -	- 2 - -	- I - -	- - - -	- I - -	3 2 - -	I 5 - -
Sarcina	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- I - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Bacillus	- 2 I -	- I - -	3 I 2 -	I 4 3 -	I 8 3 -	4 9 I -	3 4 3 I	3 4 - -	- 4 4 -	7 4 I -	I 7 - -
КРАСНОЕ МОРЕ											
Bacterium	- - - -	4 - - -	3 20 I -	- - - -	3 2 II -	II I 7 - I	- I 3 I 4 7	- 5 3 I	- 5 - I	I 27 5 -	- 10 - -
Chromobacterium	I - - -	- - - -	I - - -	- - - -	I - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Pseudomonas	- - - -	- - - -	I - - -	- - - -	4 - - -	I I - -	- 2 - -	- - - -	- I - -	- - - -	- - - -
Vibrio	I - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- 3 - -	- - - -	- - - -	- I - -	- - - -	- - - -	- - - -
Spirillum	I - - -	I - - -	3 - - -	- - - -	4 I - -	- - - -	- I - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Pseudobacterium	- 2 - -	- 2 - -	- - - -	- 5 - -	- 4 - -	- 2 - -	- 2 3 -	- 3 I -	- - - -	- - - -	- - - -
Mycobacterium	I - - -	- - - -	- - - -	I - - -	- - - -	I - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Mycococcus	- - - -	- - - -	- - - -	3 - - -	- - - -	- - - -	- 2 - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Micrococcus	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Sarcina	- - - -	- - - -	- - - -	I - - -	- - - -	- - - -	- I - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Bacillus	- - - -	- - - -	3 - - -	2 - - -	- - - -	- - - -	2 I I -	- 3 - -	- - - -	- - - -	- - - -
АДЕНСКИЙ ЗАЛИВ											
Bacterium	- - - -	2 3 2 -	22 30 4 -	- - - -	5 3 I -	9 I 4 3 -	- I 8 4	2 5 3 -	3 I 3 2 -	2 I 3 3 -	II 7 I -
Chromobacterium	I - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- I - -	I - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Pseudomonas	I - - -	- - - -	I - - -	- I - -	3 - - -	- - - -	- 2 - -	2 - - -	2 I - -	- I - -	- - - -
Vibrio	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	I - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Spirillum	- - - -	- - - -	2 - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Pseudobacterium	- - - -	- 2 - -	- 2 - -	- 2 - -	- 2 - -	I - - -	I 7 4 I	- 6 - -	- - - -	- - - -	- - 6 -
Mycobacterium	I - - -	- - - -	- - - -	2 - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- I - -	2 - - -	- - - -
Mycococcus	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Micrococcus	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Sarcina	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- I - -	- - - -	- I - -	- I - -	- I - -	- - - -	- - - -
Bacillus	- - - -	- - - -	2 - - -	- 3 - -	- - - -	- - - -	- - - -	- 3 I -	- - - -	- - - -	- - - -