

В. В. Смирнов  
Е. А. Кишрианова

БАКТЕРИИ  
РОДА

PSEUDOMONAS



АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР  
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ  
им. Д. К. ЗАБОЛТНОГО

В. В. Смирнов  
Е. А. Киприанова

БАКТЕРИИ  
РОДА  
PSEUDOMONAS

УДК 579.841.11.222'-18

Бактерии рода *Pseudomonas* / Смирнов В. В., Киприанова Е. А.; Отв. ред. Айзенман Б. Е.; АН УССР, Ин-т микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного.— Киев: Наук. думка, 1990.— 264 с.— ISBN 5-12-001610-3.

Монография посвящена бактериям рода *Pseudomonas*, широко населяющим биосферу и играющим важную роль в патологии человека, животных и растений, в очистке окружающей среды от загрязнения, в различных областях народного хозяйства. Рассмотрены биологические особенности бактерий рода *Pseudomonas*, проблемы их систематики, пути и методы идентификации. Охарактеризованы важнейшие виды псевдомонад, предложены диагностические ключи. Большое внимание уделено антибиотикам и другим биологически активным веществам, выделенным из рассматриваемой группы микроорганизмов, возможностям их применения в народном хозяйстве и медицине, а также использованию живых культур бактерий — продуцентов антибиотиков для борьбы с возбудителями заболеваний сельскохозяйственных растений.

Для микробиологов, химиков, медицинских работников, преподавателей и студентов вузов.

Ил. 35. Табл. 77. Библиогр. : с. 235—259 (541 назв.).

Ответственный редактор *Б. Е. Айзенман*

Утверждено к печати ученым советом  
Института микробиологии и вирусологии  
им. Д. К. Заболотного АН УССР

Редакция биологической литературы

Редактор *Т. Д. Станишевская*

С 4107020000-499  
M221(04)-90 495-90

ISBN 5-12-001610-3

© В. В. Смирнов, Е. А. Киприанова, 1990

## ВВЕДЕНИЕ

Аэробные бактерии рода *Pseudomonas* — важная в научном и практическом отношении гетерогенная группа микроорганизмов, широко населяющих биосферу и принимающих активное участие в процессах минерализации органических соединений, очистке окружающей среды от загрязнения.

Многие виды псевдомонад патогенны для человека и животных. Среди них имеются возбудители особо опасных инфекций — сапа и мелиоидоза. Наряду с синегнойной палочкой — одним из наиболее резистентных к антибиотикам условно патогенных микроорганизмов — многие представители рода *Pseudomonas* приобретают в последнее время все более широкое распространение в клинике как возбудители так называемых оппортунистических инфекций [115, 500]. Псевдомонады могут оказывать положительное и отрицательное влияние на развитие сельскохозяйственных культур. Некоторые виды патогенны для них, другие, например, широко населяющие ризосферу сапрофитные псевдомонады, играют важную роль в защите растений от бактериальных и грибных заболеваний.

Разнообразие биосинтетических и катаболических реакций, высокая скорость роста на простых по составу средах, особенности генетической организации, в частности наличие плазмид, широкие возможности для генно-инженерного манипулирования, позволяют рассматривать бактерии рода *Pseudomonas* как перспективный объект для работ в области биотехнологии. Среди микроорганизмов этого рода имеются продуценты витаминов и коферментов, органических кислот и аминокислот, полисахаридов и поверхностно-активных веществ, антибиотиков и многих других биологически активных соединений.

В последние годы из бактерий рода *Pseudomonas* были выделены новые, своеобразные по структуре и спектру действия антибиотические вещества, в том числе аминокликозиды, монобактамы, псевдомоновые кислоты, эффективные в отношении антибиотикорезистентных возбудителей заболеваний [81, 503].

Наряду с поисками продуцентов, перспективных для медицинской практики, значительные успехи были достигнуты в области использования живых бактерий рода *Pseudomonas* (так называемых ризобактерий) для стимуляции роста растений, в качестве



средства биологической борьбы с бактериальными и грибными заболеваниями сельскохозяйственных культур [150]. Это направление, обогатившееся рядом новых подходов, активно развивается в последние годы.

Перечисленные достижения были подготовлены прогрессом в области химии природных соединений, биохимии, генетики и систематики бактерий рода *Pseudomonas*. Сегодня, более чем когда-либо, возрастает роль систематики — этого фундаментального раздела микробиологии, оказывающего непосредственное влияние на ее многие прикладные области.

Из разнообразных, часто разрозненных сведений о биологии микроорганизмов, строении их генома, структуре и свойствах белков, липидов, полисахаридов, вторичных метаболитов, путях биосинтеза и катаболизма различных веществ и механизмах их регуляции систематика создает цельную картину микробного мира, выявляет приуроченность отдельных химических структур и ферментативных реакций к определенным микробным таксонам. Тем самым она позволяет перейти от эмпирического скрининга к теоретически обоснованному поиску нужных продуцентов среди определенных групп микроорганизмов. Без развития систематики невозможно создание коллекций — этого золотого фонда биотехнологии.

Последние десятилетия характеризуются значительными успехами в изучении биологии и систематики бактерий рода *Pseudomonas* [390, 391]. Результаты гибридизации нуклеиновых кислот, данные секвенирования олигонуклеотидов рибосомальных РНК и ряд других подходов к эволюции микроорганизмов способствовали выяснению таксономической структуры рода *Pseudomonas* и его места в системе микробного мира [134, 164, 396, 467, 524].

Эти представления являются первым этапом в создании эволюционно обоснованной систематики бактерий. С получением новых данных изменяются и представления о структуре рода, в границах прежнего рода *Pseudomonas* возникают новые роды, описываются новые виды и подвергаются ревизии старые, давно описанные.

В настоящей монографии обобщены литературные данные и результаты многолетних исследований авторов в области биологии, систематики и идентификации бактерий рода *Pseudomonas*, а также изучения биологически активных метаболитов, синтезируемых этой группой микроорганизмов. Одним из необходимых этапов и в то же время итогом этой работы явилось создание коллекции штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из различных природных источников и охарактеризованных по многим признакам.

Цель монографии — проанализировать биологические особенности бактерий рода *Pseudomonas* в связи с их систематикой. Сделана попытка проследить эту связь на различных таксономических уровнях — от биовара до секции (соответствующей, со-

гласно современным представлениям, уровню рода, а может быть и семейства). Мы не ставили перед собой задачу рассмотреть все аспекты биологии псевдомонад (да это и невозможно, учитывая большой объем информации). Многие из них подробно освещены в ряде обзоров и монографии [9, 24, 77, 150, 240, 377, 390 и др.]. Поэтому мы ограничили круг рассматриваемых вопросов проблемами систематики рода *Pseudomonas* и связанными с ней особенностями биологии отдельных его представителей.

Несколько шире и подробнее рассмотрены антибиотические вещества, образуемые бактериями рода *Pseudomonas*. Исследуя на протяжении ряда лет антибиотическую активность псевдомонад, авторы выделили из них оригинальные ранее не описанные соединения либо обнаружили новые стороны биологической активности у известных веществ. Выше мы упоминали о достигнутых в последние годы успехах в области изучения антибиотиков из бактерий рода *Pseudomonas*.

Однако, за исключением обзора Лейзинджера и Марграффа [311], посвященного вторичным метаболитам псевдомонад, обобщенных источников на эту тему нет, что побудило нас рассмотреть этот вопрос более подробно.

При этом мы стремились не только охарактеризовать различные классы биологически активных веществ, синтезируемых псевдомонадами, но по возможности проанализировать их связь с таксономией данной группы микроорганизмов, роль в физиологии и экологии бактерий-продуцентов, перспективы практического использования.

Значительное внимание уделено таксономической структуре рода *Pseudomonas*, характеристике отдельных его видов, выяснению эволюционных отношений между ними. Одним из итогов проведенных исследований явилось создание ключа для идентификации важнейших видов рода *Pseudomonas*. Нам представлялось полезным дополнить предлагаемый ключ рядом практических рекомендаций, описанием сред и методов для выделения и идентификации бактерий.

# ГЛАВА 1

## КРАТКИЙ ОЧЕРК ИСТОРИИ КЛАССИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS

Род *Pseudomonas* описан Мигула в 1894 г. [346] для неспорообразующих грамотрицательных бактерий с полярными жгутиками. Наряду с родами *Bacillus* и *Bacterium* он был включен в состав семейства *Bacteriaceae*.

В описании рода, опубликованном в 1895 г., клетки бактерий характеризовались как «цилиндрические, длинные или короткие, иногда образующие небольшие нити, движущиеся с помощью полярных жгутиков, число которых на одном полюсе колеблется от 1 до 10, чаще 1 или 3—6. Спорообразование редко». Таким образом, первая классификация бактерий рода *Pseudomonas* строилась на их морфологии, подвижности, характере расположения жгутиков. Среди видов рода первым был описан *Pseudomonas pusuayana* [347].

Двадцатые годы XX ст. оказались знаменательными в истории изучения биологии рода *Pseudomonas*. Значительный вклад в познание этой группы микроорганизмов внесли исследования Дурен ден Ионга [169], выполненные им в Голландии в лаборатории Бейеринка. Используя различные органические соединения в качестве единственных источников углерода и энергии, автор выделил из почвы методом накопительных культур большое количество штаммов псевдомонад. Была показана исключительная способность выделенных микроорганизмов к ассимиляции различных классов органических веществ. Проведенные исследования позволили сделать важные обобщения в области физиологии, экологии и систематики рода *Pseudomonas*. Были предложены новые методические подходы к изучению этой группы бактерий, описан новый вид *P. acidovorans*. Однако работы Дурен ден Ионга, опубликованные на голландском языке в малодоступных изданиях, оставались неизвестными широкому кругу микробиологов на протяжении более 40 лет.

В 1-м издании определителя Берги [116] род *Pseudomonas* был включен в порядок *Eubacteriales*, семейство *Bacteriaceae*, трибу *Chromobacteriaceae*. Основное внимание в описании рода было уделено пигментам. Этот акцент в родовом определении *Pseudomonas* сохранился также во 2—4-м изданиях определителя и лишь в его 5-м издании тезис Мигула о полярном расположении жгутиков был вновь возрожден и упоминался как родовой признак. Однако характер пигментообразования на протяжении дол-

гих лет оставался одним из важных критериев в систематике и идентификации микроорганизмов рода *Pseudomonas*.

Авторы 7-го издания Берги [124] поместили род *Pseudomonas* вместе с родами *Xanthomonas* и *Aeromonas* в семейство *Pseudomonadaceae* (последнее описано Уинслоу в 1917 г. [523]).

Определитель 1957 г. явился ярким примером неудовлетворительного состояния классификации псевдомонад в то время. Родовая характеристика строилась в основном на отрицательных признаках, а род *Pseudomonas* представлял собой группу видов, оставшихся после исключения других родов. Последние были выделены на основании специфических физиологических свойств из большой группы микроорганизмов с полярными жгутиками и объединены в порядок *Pseudomonadales*. Еще менее благополучным было положение с видовой дифференциацией псевдомонад. Определитель Берги 1957 г. содержал описание 149 видов *Pseudomonas* (в том числе 80 флюоресцирующих). Некоторые из них отличались образованием характерного пигмента (например, пиоцианина или хлорорафина). Однако большинство видов было охарактеризовано крайне фрагментарно, а приведенные в определителе немногочисленные и малосущественные для идентификации признаки не позволяли различать эти виды.

Классификационная схема (как и перечисленные выше недостатки) 7-го издания Берги сохранена в определителе Прево [405], где описано 117 видов (в том числе 62 фитопатогенных). Еще обширнее определитель Н. А. Красильникова [57], где было описано (или упомянуто) более двухсот видов одних только флюоресцирующих бактерий.

Периодом накопления экспериментальных данных, характеризующих с различных сторон биологические свойства бактерий рода *Pseudomonas*, явились 40—60-е годы.

Родс [417] изучила по 43 признакам коллекцию из 169 штаммов флюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas* различного происхождения. В ходе этих исследований удалось выделить небольшую группу, образованную штаммами *P. aeruginosa*, а также группу фитопатогенных бактерий. В свойствах остальных культур была обнаружена широкая гамма переходов — от штаммов, положительных по 42 признакам (из 43 изученных), до отрицательных по 39. Вследствие этого Родс не удалось разделить на группы исследованные ею штаммы, что побудило ее рассматривать их как представителей единого вида *P. fluorescens*. Впоследствии применение компьютерной техники для обработки полученных результатов подтвердило невозможность группировки [418].

Для описания рода *Pseudomonas* и *P. fluorescens* Родс отобрала наиболее часто встречающиеся у исследованных культур 26 признаков. Было показано, что многие флюоресцирующие виды, описанные в 7-м издании Берги («*P. schuilkilliensis*»<sup>1</sup>, *P. geliculata*, «*P. mildenbergii*» и др.), идентичны или близки *P. fluo-*

<sup>1</sup> Здесь и далее в кавычки взяты названия видов, не включенных в «Одобрённые списки видовых названий бактерий» [455].

rescens. Более того, согласно представлениям Родс, штаммы *P. aeruginosa* также являлись подгруппой *P. fluorescens*, адаптировавшейся к организму животного.

Последующие 60-е годы знаменовались внедрением в микробиологию вычислительной техники и методов нумерической таксономии. Подробнее мы остановимся на этих исследованиях ниже, здесь лишь упомянем, что одна из первых работ в этой области принадлежит Лызенко [324], который выделил среди псевдомонад 18 видов и ряд промежуточных форм. Попытка усовершенствовать классификацию рода *Pseudomonas* была предпринята Иицука и Комагата [247]. Коллекция из 202 сапрофитных штаммов псевдомонад была разделена ими на три группы согласно экологии, характеру пигментации и некоторым физиологическим свойствам.

Фундаментальное исследование флюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas* было проведено Джессеном [267]. Более 800 штаммов псевдомонад, в том числе 354 штамма *P. aeruginosa*, были изучены этим автором по 29 фенотипическим признакам. В результате были подробно охарактеризованы типовой вид рода — *P. aeruginosa* — и флюоресцирующая группа в целом. Изученная коллекция микроорганизмов была разделена Джессеном на шесть групп (отличных одна от другой и разделяющихся, в свою очередь, на 82 биотипа). Первую группу составили штаммы *P. aeruginosa*, вторую — *P. ovalis* и *P. putida*, третью — культуры морского происхождения, четвертую — штаммы *P. fluorescens*, пятую — также штаммы *P. fluorescens*, но образующие полисахариды на средах с сахарозой, и, наконец, шестую группу — бактерии, патогенные для растений.

Работа Джессена позволила отобрать некоторые новые и важные диагностические признаки и показать принципиальную возможность дифференциации отдельных групп псевдомонад. Однако полученные выводы касались только флюоресцирующих бактерий. Кроме того, Джессеном не была предложена схема классификации и диагностики даже для сапрофитных флюоресцирующих микроорганизмов рода *Pseudomonas*.

Ряд важных описаний был сделан для видов *P. seracia* [129], *P. stutzeri* [493], *P. testosteroni* [332], *P. aureofaciens* [224, 293], *P. alcaligenes* [249], *P. maltophilia* [245], *P. aeruginosa* и *P. chloraphis* [223], *P. solanacearum* [226], *P. vesicularis* [187] и других. Однако в целом классификация рода оставалась неупорядоченной, а идентификация отдельных видов — неразработанной.

Данные о биологии псевдомонад и все более широкое использование в микробиологии биохимических методов исследования подготовили основу для ревизии рода *Pseudomonas*, блестяще осуществленной в 1966 г. Стейниером, Паллерони и Дудоровым [468]. В 1960 г. на кафедре микробиологии Калифорнийского университета в Беркли была создана коллекция бактерий рода *Pseudomonas* и начаты интенсивные таксономические исследования этой группы микроорганизмов. Успеху работы способствовало привлечение большого количества микробиологических, биохимических,

генетических и других методов. В основу одного из разделов исследований, характеризующего так называемые питательные спектры бактерий, легли упомянутые выше работы Дурен ден Йонга [169] по углеродному питанию бактерий рода *Pseudomonas*, с успехом использованные калифорнийскими авторами для целей систематики.

Эти исследования позволили провести фенотипическую классификацию 267 штаммов бактерий (позже теми же методами было изучено еще 600 штаммов) и выделить среди них несколько хорошо отграниченных видов, четко диагностируемых на основании предложенных критериев. Были описаны флюоресцирующая группа с видами *P. aeruginosa*, *P. putida* и *P. fluorescens*, «Acidovorans»- группа с видами *P. acidovorans* и *P. testosteroni*, «Alcaligenes»- группа с видами *P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes*, а также виды *P. multivorans*, *P. stutzeri*, *P. maltophilia*.

Таким образом, многочисленные, ранее мало различимые виды флюоресцирующей группы (за исключением *P. aeruginosa*) были «укрупнены» всего до двух — *P. fluorescens* и *P. putida*. Последние, в свою очередь, были разделены на биотипы, отличающиеся спектрами углеродного питания и наличием некоторых ферментных систем. Были найдены надежные критерии диагностики и для нефлюоресцирующих видов, ранее изученных очень слабо.

Предложенные Стейниером с соавторами методические подходы дали мощный толчок развитию систематики рода *Pseudomonas*. Подробные характеристики были получены для возбудителей сапа и мелиоидоза — *P. mallei* и *P. pseudomallei* [45], *P. diminuta* и *P. vezicularis* [108], *P. solanacearum* [393] и других фитопатогенных видов [433]. Описаны новые виды — *P. lemoignei* [159], *P. mendocina* [394].

Полученные данные расширили представления о свойствах бактерий рода *Pseudomonas*, позволили сформулировать родовой диагноз и были использованы для построения ключей и диагностических таблиц в 8-м и 9-м изданиях определителя Берги [171, 391].

Оба издания содержат обширную информацию о фенотипических свойствах различных видов *Pseudomonas*, полученную либо Стейниером с соавторами, либо с использованием их методических подходов. В определителе 1974 г. впервые приведены достаточно надежные приемы диагностики некоторых наиболее распространенных видов псевдомонад. Кроме того, в нем была предпринята первая попытка создать классификацию рода *Pseudomonas*, используя данные геносистематики. Последующее десятилетие знаменовалось дальнейшим развитием геносистематики и разработкой ряда новых подходов к филогении микроорганизмов. Ведущая роль в этих исследованиях принадлежала изучению бактериального генома. Ниже мы рассмотрим важнейшие результаты этих исследований, послужившие основой для создания современной систематики рода *Pseudomonas* и представлений об его внутренней структуре.

## ГЛАВА 2

### СТРОЕНИЕ ДНК И СИСТЕМАТИКА

Геносистематика «изучает физико-химические свойства ДНК с целью создания естественной системы микроорганизмов» [7]. Общее количество ДНК в геноме — важная интегральная характеристика ДНК. У бактерий рода *Pseudomonas* по сравнению с другими микроорганизмами оно достаточно велико: 3624 килобаз у *P. aeruginosa*, 3820 — у *P. putida*, 4107 — у *P. fluorescens* [240].

Одним из важных параметров ДНК, широко используемых в исследованиях по таксономии и идентификации микроорганизмов, является молярное содержание ГЦ (%), т. е. количественный показатель соотношения нуклеотидов ДНК бактериального генома. Представители рода *Pseudomonas* изучены с этой стороны достаточно подробно [7]. Наиболее обширное исследование было предпринято Мандель [328], которая проанализировала ГЦ-содержание ДНК у 165 штаммов различных видов псевдомонад; впоследствии при описании новых видов, а также более подробном изучении и ревизии уже описанных эта информация неоднократно пополнялась.

По нуклеотидному составу ДНК бактерии рода *Pseudomonas* представляют собой достаточно компактную группу: этот показатель колеблется у них в пределах 58—70 %. Несколько ниже (55—57 %) нуклеотидный состав ДНК *P. stanieri* [112], а также *P. luteola* (55,4—55,9 %) [295].

Колебания в ГЦ-составе ДНК внутри рода, как правило, не превышают 10 %; внутри вида — не более 1 %. Сведения, касающиеся рода *Pseudomonas*, несколько превышают эти показатели. Так, по данным Мандель, ГЦ-состав ДНК штаммов *P. putida* составляет 60,7—62,5 %, штаммов *P. stutzeri* — 62,1—65,0 %. По данным де Лея [160] ГЦ-содержание ДНК штаммов фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas* колеблется в достаточно узких пределах ( $60,5 \pm 1,2$ ), что, по мнению автора, свидетельствует об их тесном родстве и общем эволюционном происхождении.

Нами был исследован нуклеотидный состав ДНК более чем у 100 штаммов псевдомонад, в том числе у некоторых ранее не изученных в этом отношении видов (*P. aurantiaca*, *P. taetrolensis* и др.). Из фиксированной этанолом биомассы бактерий выделяли

ДНК по методу Арриги и соавт. [102]. Нуклеотидный состав ДНК определяли методом тепловой денатурации с применением формальдегида [60].

ГЦ-содержание ДНК исследованных штаммов бактерий колебалось в пределах 59,6—69,1 %. Внутри таких фенотипических однородных видов, как *P. aurantiaca*, *P. aureofaciens* и др., отличия в ГЦ-составе ДНК отдельных штаммов не превышали 1—1,5 %. Виды, гетерогенные по свойствам, были неоднородны и по нуклеотидному составу ДНК (*P. putida* — 62,5—65,0; *P. stutzeri* — 62,8—67,4; *P. fluorescens* — 61,2—64,5; *P. pseudoalcaligenes* — 60,8—63,8 % ГЦ). Некоторые отклонения в ГЦ-содержании ДНК отдельных штаммов могли быть, на наш взгляд, обусловлены наличием плазмид, распространенных у рода *Pseudomonas* и составляющих иногда до 15 % бактериального генома [10].

Результаты исследования нуклеотидного состава ДНК позволили ряду авторов пересмотреть таксономическое положение видов, включенных в свое время в состав рода *Pseudomonas*, и сузить его границы. Так, например, виды «*P. putrefaciens*», «*P. piscicida*», «*P. atlantica*» были отнесены к роду *Alteromonas*, а «*P. patriagens*» — к морским вибрионам; «*P. methanica*» был выделен в специализированную группу метанооксиляющих бактерий.

Исследование состава оснований ДНК (в сочетании с другими методами изучения) позволило уточнить таксономическое положение многих видов *Pseudomonas*. Была показана идентичность *P. seracia*, *P. multivorans* и *P. kingii* [454, 464], *P. pickettii* и *P. thomaasii* [283], «*P. melanogena*» и *P. maltophilia* [296]. Результаты изучения нуклеотидного состава ДНК типового штамма *P. aurantiaca* послужили одним из доказательств его принадлежности к *P. aureofaciens* [43]. Справедливость сделанных заключений была подтверждена методом гибридизации нуклеиновых кислот.

Метод молекулярной гибридизации ДНК—ДНК, широко используемый в последние годы для установления степени филогенетического родства между организмами, впервые применен Де Лем и Фридманом в 1965 г. при гибридизации ДНК *Pseudomonas* с ДНК *Xanthomonas pelargonii* [161]. Было продемонстрировано значительное (58—81 % гомологии) родство между *Pseudomonas* и *Xanthomonas*. Проведенные впоследствии исследования показали, однако, что значения гомологии резко завышены и, по-видимому, явились результатом ошибки.

В дальнейшем американскими исследователями [392, 410, 411] было предпринято фундаментальное изучение филогенетических связей между различными видами *Pseudomonas* с помощью молекулярной гибридизации ДНК—ДНК. Гибридизацию проводили методом конкуренции при оптимальной температуре (на 25° ниже температуры плавления ДНК) и более «жесткой» (80 °С).

Эти исследования подтвердили группировку бактерий по видам, предложенную ранее на основании их фенотипических свойств.



Так, было показано филогенетическое родство сапрофитных и фитопатогенных видов бактерий рода *Pseudomonas*, образующих зеленый флюоресцирующий пигмент, а также *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes*. Перечисленные виды были выделены в единую группу, названную «комплексом *P. fluorescens*». Значения реассоциации ДНК при температурах, на 25° ниже температуры плавления, между видами внутри этой группы чаще всего колебались в пределах 20—50 %, хотя в отдельных случаях были значительно ниже (например, исследованные штаммы *P. stutzeri* и *P. mendocina* проявили всего 5 % гомологии с фитопатогенными бактериями *P. syringae*, а штаммы *P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes* — 12—13 % гомологии с *P. fluorescens*). В целом опыты по молекулярной гибридизации ДНК показали значительную гетерогенность таких крупных таксонов, как *P. fluorescens* и *P. putida*, и определенную генетическую обособленность биотипов D и E *P. fluorescens*, по-видимому, эквивалентных рангу вида, а не биотипа. Этот вывод получил отражение в 8-м издании определителя, где названные биотипы приобрели видовую самостоятельность (*P. aureofaciens* и *P. chlororaphis*).

Сравнительно низкие значения гомологии (18—37 %) были обнаружены между сапрофитными и фитопатогенными флюоресцирующими видами псевдомонад. Аналогичные значения (7—29 %) получили Пекнольд и Гроген [401] при изучении взаимоотношений между фитопатогенными бактериями «*P. tomsprungum*», *P. cichorii*, *P. viridiflava*, *P. syringae* и сапрофитами *P. fluorescens*, *P. putida*. При изучении девяти штаммов *P. pseudoalcaligenes* и трех штаммов *P. alcaligenes* Ральстон-Барретт и соавт. [410] наблюдали от 17 до 37 % межвидовой гомологии ДНК — ДНК и от 53 до 82 % гомологии между штаммами одного и того же вида. Аулинг и соавт. [106], изучая оптическими методами реассоциацию ДНК — ДНК у водородокисляющих бактерий, наблюдали значения гомологии от 12 до 65 % между видами *P. palleronii*, *P. pseudoflava*, *P. facilis*, *P. flava*, *P. saccharophila* и от 84 до 100 % — внутри названных видов.

Объектом наших исследований служили преимущественно флюоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas*, а также родственные им беспигментные виды. Ряд экспериментов по гибридизации ДНК — ДНК был связан с выяснением генетической близости между штаммами *P. serasia*. Для большинства штаммов молекулярную гибридизацию ДНК — ДНК проводили спектрофотометрическим методом в разработанной Г. Ф. Левановой модификации [61]; у некоторых штаммов — по методу Денхарда [162], используя в качестве референтного типовой штамм *P. fluorescens*. Выделенную из него ДНК метили тритием *in vitro*, гибридизацию проводили при 70 °С. Некоторые данные, полученные при определении степени геномного родства штаммов различных видов бактерий рода *Pseudomonas* с типовым штаммом *P. fluorescens* ATCC 13525 методом молекулярной гибридизации ДНК — ДНК, приведены ниже:

Вид и штамм бактерий	Реассоциация, %
<i>P. aureofaciens</i> 2116	24 *
<i>P. aurantiaca</i> 2680	23
<i>P. fluorescens</i> биовар II 1602	21
<i>P. fluorescens</i> биовар III 1931	26 *
<i>P. fluorescens</i> биовар IV 2401	49 *
<i>P. fluorescens</i> биовар IV 2856	31 *
<i>P. fluorescens</i> биовар V 1488	31
<i>P. putida</i> биовар А 383	0 *
<i>P. putida</i> биовар В 1778	10 *
<i>P. putida</i> биовар В 1890	10 *
<i>P. putida</i> биовар В 2200	6 *
<i>P. stutzeri</i> 4136	35
<i>P. stutzeri</i> 1979	29
<i>P. fragi</i> 4002	25
<i>P. taetrolens</i> 4006	38
<i>P. pseudoalcaligenes</i> 3046	0 *
<i>P. pseudoalcaligenes</i> 3069	0 *

\* Гибридизация проведена изотопным методом по Денхарду.

Показатели геномного родства между отдельными флюоресцирующими и нефлюоресцирующими видами составляли в наших опытах в среднем 20—30 % (т. е. были близки данным других авторов), а в некоторых случаях достигали и более высоких значений (до 49 %). Весьма низкие уровни межвидовой гомологии ДНК были получены при гибридизации *P. fluorescens* с биоваром В *P. putida*. Полное отсутствие родства наблюдали при гибридизации ДНК типового штамма *P. fluorescens* с биоваром А *P. putida* и штаммами *P. pseudoalcaligenes*. В значительных пределах (от 45 до 99 %) колебались значения геномного родства между различными штаммами *P. seracia*.

Данные гибридизации ДНК — ДНК в комплексе с другими подходами послужили основанием для вывода о видовой самостоятельности *P. aurantiaca*, *P. taetrolens*, *P. fragi* и их принадлежности к видам «*P. fluorescens*-комплекса» (согласно современной терминологии — I секции рода *Pseudomonas*). Гибридизация ДНК — ДНК в настоящее время обязательна при описании новых видов *Pseudomonas*, уточнении таксономического положения старых, уже описанных [43—45], идентификации выделенных из почвы атипичных штаммов [157] и при решении многих других частных вопросов систематики рода *Pseudomonas*. Этот метод позволяет определять близкородственные связи, однако не пригоден для более высоких таксономических уровней.

Молекулярная гибридизация ДНК — ДНК выявила и другие группы родственных видов внутри рода *Pseudomonas*, например, патогенные для человека, животных и растений *P. solanacearum*, *P. seracia*, *P. mallei*, *P. pseudomallei*, виды групп «*acidovorans*» и «*facilis-delafieldii*», а также *P. diminuta* и *P. vezicularis*, далекие как генетически, так и фенотипически от других представителей рода.

Виды различных комплексов либо вообще не имели сходных нуклеотидных последовательностей в ДНК, либо степень их генетического родства была крайне низкой. Таким образом, исследование по гибридизации ДНК — ДНК разрушили представления о целостности рода *Pseudomonas* и показали, что, несмотря на фенотипическое сходство, представители этого рода образуют несколько филогенетически отдаленных видовых комплексов, или групп (рис. 1).

Значительным шагом вперед в развитии геносистематики рода *Pseudomonas* явилась гибридизация ДНК различных видов псевдомонад с рибосомальной РНК. Последняя кодируется наиболее консервативной в процессе эволюции частью бактериального генома, что позволяет выявить родство между относительно далекими группами микроорганизмов. Проведенные эксперименты [396] показали более высокий (чем при гибридизации ДНК — ДНК) процент сходства нуклеотидных последовательностей нуклеиновых кислот как внутри описанных выше групп, так и между ними (рис. 2). В некоторых случаях при полном отсутствии гомологии ДНК — ДНК авторам удалось получить до-

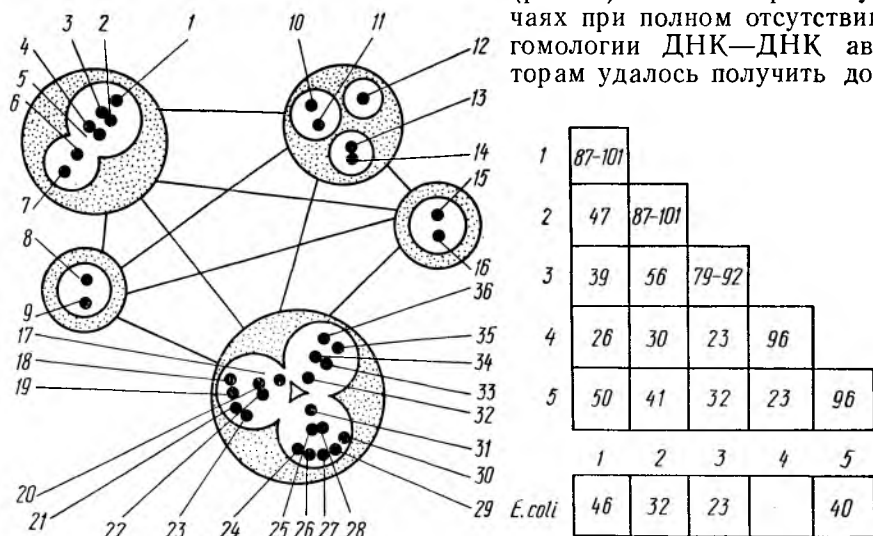


Рис. 1. Распределение видов и биотипов бактерий рода *Pseudomonas* в соответствии с гомологией рРНК и ДНК [396].

Заштрихованные круги соответствуют рРНК-группам: 1 — *P. caryophylli*, 2 — *P. mallei*, 3 — *P. pseudomallei*, 4 — *P. cepacia*, 5 — *P. marginata*, 6 — *P. pickettii*, 7 — *P. colanacearum*, 8 — *P. diminuta*, 9 — *P. vesicularis*, 10 — *P. acidovorans*, 11 — *P. testosteroni*, 12 — *P. saccharophila*, 13 — *P. facilis*, 14 — *P. delafieldii*, 15 — *P. maltophilia*, 16 — *Xanthomonas* sp., 17 — *P. cichorii*, 18 — *P. syringae*, 19 — *P. mori*, 20 — *P. savastanoi*, 21 — *P. tomato*, 22 — *P. phaseolicola*, 23 — *P. glycinea*, 24 — *P. putida*, 25 — *P. fluorescens* E, 26 — *P. fluorescens* B, 27 — *P. fluorescens* A, 28 — *P. fluorescens* D, 29 — *P. fluorescens* C, 30 — *P. fluorescens* F, 31 — *P. putida* A, 32 — *P. aeruginosa*, 33 — *P. pseudoalcaligenes*, 34 — *P. mendocina*, 35 — *P. alcaligenes*, 36 — *P. stutzeri*

Рис. 2. Значения конкуренции рРНК-ДНК (в %) между различными РНК-группами бактерий рода *Pseudomonas* (для сравнения с *E. coli*) [389].

Приведены средние значения межгрупповых показателей гомологии

статочны высокие значения гомологии ДНК с рибосомальной РНК. В ходе этих исследований были объединены в единый комплекс группы «acidovorans» и «facilis-delafieldii», а также создан новый, 5-й комплекс, включающий *P. maltophilia* и родственные ему микроорганизмы рода *Xanthomonas* (см. рис. 1). Межгрупповые значения гомологии рРНК—ДНК составляли от 2 до 66 % (в среднем 40 %).

Каждый из комплексов (РНК-групп), созданных на основании гомологии ДНК—рРНК, соответствует, по мнению авторов, рангу рода или даже семейства и филогенетически далек от остальных. Этот вывод подтверждается и результатами исследований лаборатории Де Лея [163—166], где были получены гибриды между  $23S^{14}C$ -меченой рибосомальной РНК и ДНК многих видов и родов бактерий. В результате полученных данных род *Pseudomonas* был распределен по трем крупным ветвям («суперсемействам»), первая из которых включала флюоресцирующие и беспигментные виды I РНК-группы, а также роды *Azotobacter* и *Azomonas*. Вывод о родстве между этими таксонами подтверждается сходством аминокислотных последовательностей их цитохромов и некоторыми другими данными эволюционной биохимии [529].

Виды псевдомонад, принадлежащие ко II и III РНК-группам, вошли в состав другой РНК-ветви вместе с родами *Chromobacterium*, *Janthinobacterium*, *Alcaligenes*. Особую ветвь составили виды рода *Xanthomonas* с родственным им *P. maltophilia*. Эти данные наряду с всесторонними фенотипическими исследованиями подготовили перенос *P. maltophilia* в состав рода *Xanthomonas* [476].

Метод гибридизации ДНК—рРНК позволил уточнить положение и филогенетические связи многих видов псевдомонад неопределенного таксономического статуса [167]. Некоторые из них («*P. muhogenes*», *P. oleovorans*, «*P. reptilivora*», *P. septica*, «*P. synxantha*» и др.) оказались генетически близкими микроорганизмам *P. fluorescens*-комплекса; другие были отнесены к родам *Xanthomonas* (*P. boreopolis*, *P. pictorum*, *P. hibiscicola*), *Alteromonas* («*P. atlantica*», «*P. piscicida*»), *Deleya* (*P. beijerinckii*), *Flavobacterium* (*P. paucimobilis*), *Acinetobacter* («*P. pavonacea*») и др.

Гибридизация ДНК-рибосомальных РНК легла в основу некоторых недавно предложенных методов экспресс-диагностики псевдомонад. Фестл и соавт. [177] выделили из  $23S$  рРНК-генов *P. aeruginosa* фрагмент, содержащий 360 пар оснований, и клонировали его в вектор *pUN* 121, получив плазмиду *pNF* 360. При гибридизации с хромосомальной ДНК многих микроорганизмов она оказалась высоко специфичной для флюоресцирующих и родственных им беспигментных видов *Pseudomonas*, позволяла четко дифференцировать их от других видов бактерий, в том числе от умеренно родственных *Azotobacter* и *Azomonas*. Авторами предложен быстрый метод гибридизации колоний *in situ* и выявления микроорганизмов группы *P. fluorescens* в смешанных культурах (рис. 3, см. на вклейке).

Значительный вклад в развитие сравнительной филогении прокариотов был внесен исследованиями 5S и 16S рибосомальных РНК [383, 467, 524]. Последние более пригодны для широкого филогенетического анализа, но труднее поддаются полному определению последовательностей. При их исследовании проводится частичный анализ последовательностей, так называемая сравнительная каталогизация олигонуклеотидов. Метод состоит в выделении 16S рРНК из различных бактерий, их частичном гидролизе до олигонуклеотидов, секвенировании последних и обработке полученных данных нумерическими методами. Построенные при этом дендрограммы близки истинному филогенетическому дереву.

Использованный метод позволил получить данные, близкие тем, которые были получены при гибридизации ДНК-рибосомальных РНК. Виды псевдомонад оказались распределенными по трем филогенетическим группам. В одну из них вошли флюоресцирующие бактерии, *Azotobacter vinelandii* и *Serpens flexibilis*, вторая содержала *P. cepacia* с близкими ему *Alcaligenes* и *Chromobacterium*, а также *P. acidovorans* и *P. testosteroni*, в третью филогенетическую группу вошли *P. diminuta*, *Agrobacterium tumefaciens* и *Rhizobium*.

Наряду с названными родами и видами, во всех трех группах присутствовали пурпурные фотосинтезирующие бактерии. Таким образом, представители рода *Pseudomonas* оказались распределенными среди многих видов и родов зубактерий.

Изложенные выше данные убедительно продемонстрировали гетерогенность рода *Pseudomonas*, полигенерический характер этого таксона, необходимость его ревизии. Эти представления нашли отражение в 9-м издании определителя Берги, несомненно, являющемся важным, однако далеко не завершенным этапом на пути создания эволюционно обоснованной систематики бактерий рода *Pseudomonas* [391].

Определитель содержит подробные характеристики 27 видов рода, распределенных по трем секциям (РНК-группам):

**РНК-группа I (секция I).**

Флюоресцирующие сапрофитные виды или оппортунистические патогены животных

1. *P. aeruginosa*
2. *P. fluorescens* (био-вары)
3. *P. chlororaphis*
4. *P. aureofaciens*
5. *P. putida* (био-вары)

**Фитопатогенные виды**

6. *P. syringae* (патовары)
7. *P. viridiflava*
8. *P. cichorii*

**Не флюоресцирующие виды**

9. *P. stutzeri*
10. *P. mendocina*
11. *P. alcaligenes*
12. *P. pseudoalcaligenes*

**РНК-группа II (секция II). Патогены, за исключением *P. pickettii***

13. *P. mallei*
14. *P. pseudomallei*
15. *P. caryophylli*
16. *P. cepacia*
17. *P. gladioli*
18. *P. pickettii*
19. *P. solanacearum*

**РНК-группа III (секция III). Непатогенны**

- 20. *P. acidovorans* \*
- 21. *P. testosteroni* \*
- 22. *P. delafieldii*

**Аутоотрофно растут в атмосфере водорода**

- 23. *P. facilis*
- 24. *P. saccharophila*
- 25. *P. flava*
- 26. *P. pseudoflava*
- 27. *P. palleronii*

\* В 1987 г. выведены из состава рода *Pseudomonas* и переведены в род *Comamonas* [484]. Поскольку оба вида принадлежали до недавнего времени к роду *Pseudomonas* и нами были изучены различные стороны их биологии, они рассматриваются в настоящей монографии наравне с другими представителями псевдомонад, но под видовыми названиями *Comamonas acidovorans* и *Comamonas testosteroni*.

Отнесение микроорганизмов к той или иной секции осуществляется с помощью дихотомического ключа, видовая дифференциация — с помощью диагностических таблиц.

Наряду с тремя названными выше секциями определитель включает описания филогенетически далеких от псевдомонад *P. diminuta*, *P. vezicularis* и *P. maltophilia*<sup>1</sup>.

Последнюю, V секцию составляют виды, филогенетические отношения которых с хорошо охарактеризованными видами рода *Pseudomonas* до недавнего времени не были изучены. Их фенотипические свойства исследованы в разное время различными авторами и с неодинаковой степенью полноты, таксономическое положение нуждается в уточнении, а иногда и пересмотре (примером может служить «*P. mesophilica*», более подробное изучение которого показало принадлежность его к метаноксиляющим бактериям) [526].

В полной мере сказанное выше относится к видам, не включенным в 9-е издание определителя Берги и «Одобренные списки видовых названий» [455]. Многие из них защищены патентами и недоступны для широкого круга исследователей. В их числе можно назвать «*P. bromoutilis*» [130], «*P. magnesorubra*» [189], «*P. sorbistinii*» [490] и др.

Несомненно, одной из задач систематики рода *Pseudomonas* является максимально полная характеристика как уже известных, так и новых описываемых видов псевдомонад на основе унифицированных методов, апробация на большом числе объектов существующих ключей и диагностических таблиц (часто разработанных всего на нескольких штаммах), проверка и отбор по возможности простых и надежных критериев, пригодных для диагностики. Необходимо широкое использование методов геносистематики для уточнения границ рода, выявления родственных видов, выведения из состава рода генетически отдаленных микроорганизмов, описания новых видов псевдомонад. Кроме того, несомненно актуальны молекулярно-биологические и сравнительные биохимические исследования различных родов граммотрицательных бактерий и их филогенетических отношений с псевдомонадами, что позволит создать их естественную классификацию и установить место рода *Pseudomonas* в системе микробного мира.

<sup>1</sup> С 1983 г. перенесен в состав рода *Xanthomonas* [481], рассматривается далее под видовым названием *X. maltophilia*.

## ГЛАВА 3

### ДИАГНОЗ РОДА И НЕКОТОРЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИДОВ ПСЕВДОМОНАД

Семейство *Pseudomonadaceae* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers et Smith, 1917, к которому принадлежит род *Pseudomonas*, входит наряду с другими семью семействами (*Azotobacteraceae*, *Rhizobiaceae*, *Methylococcaceae*, *Halobacteriaceae*, *Acetobacteraceae*, *Legionellaceae* и *Neisseriaceae*) в IV секцию определителя Берги «Грамотрицательные аэробные палочки и кокки». Выше мы упоминали о близости между некоторыми видами *Pseudomonas* и *Azotobacter*. Однако в целом филогенетические отношения между представителями названных семейств изучены недостаточно и подлежат дальнейшему выяснению.

Согласно 9-му изданию Берги, роду *Pseudomonas* наиболее близки роды *Xanthomonas*, *Zoogloea* и *Frateuria*, помещенные вместе с ним в семейство *Pseudomonadaceae*. Все они обладают полярными жгутиками, являются хемоорганотрофами, строгими аэробами, в подавляющем большинстве оксидазоположительны. В качестве источников углерода и энергии используют иные вещества, чем одноуглеродные соединения. Процент ГЦ в ДНК микроорганизмов семейства *Pseudomonadaceae* колеблется в пределах 58—71.

Фенотипические отличия представителей названных родов от бактерий рода *Pseudomonas* немногочисленны (табл. 1). Отличительной особенностью рода *Xanthomonas* является патогенность для растений, потребность в факторах роста, образование экстрацеллюлярных полисахаридов (эта особенность присуща также и многим представителям рода *Pseudomonas*), наличие характерных желтых пигментов ксантомонадинов. Последние представляют собой арилполиены, бромированные у *X. juglandis* и в различной степени метилированные у других видов этого рода [99]. Род *Zoogloea* отличается от *Pseudomonas* хлопьевидным характером роста на поверхности жидких сред и потребностью в витамине В<sub>12</sub>. Отличительной особенностью рода *Frateuria* является толерантность к низким значениям pH. Заметим, однако, что среди бактерий рода *Pseudomonas* также описаны кислотоустойчивые виды: *P. glathei*, «*P. acidophila*», «*P. mesoacidophila*» [540, 285, 286].

Данные гибридизации ДНК — рНК свидетельствуют о филогенетическом родстве между микроорганизмами родов *Pseudomo-*

Таблица 1. Дифференцирующие признаки четырех родов семейства Pseudomonadaceae (по [391])

Признак	Pseudomonas	Xanthomonas	Frateuria	Zoogloea
Потребность в факторах роста	—	+	—	+
Рост при pH 3,6	—	—	+	—
Образование хлопьев с древесными выростами	—	—	—	+
Образование ксантомонадинов	—	+	—	—
Патогенность для растений	в	+	—	—

Примечание. в — признак варьрует.

nas и Xanthomonas [396], Xanthomonas и Frateuria [477]. Таксономическое положение рода Zoogloea до настоящего времени остается неясным, а его отношения с другими родами семейства Pseudomonadaceae — неизученными.

Описание рода Pseudomonas, приведенное в 9-м издании определителя Берги (с. 141), включает прежде всего морфологические принципы, на которых строилась концепция рода у Мигула. Это «прямые или слегка изогнутые палочки (но не спиральные), диаметром 0,5—1,0 и длиной 1,5—5 мкм. Многие виды аккумулируют поли-β-оксибутират как резервный материал, обнаруживаемый в виде суданофильных включений. Не образуют протекты, не окружены чехлами, покоящиеся стадии неизвестны. Грамотрицательны. Подвижны с помощью одного или нескольких полярных жгутиков; редко неподвижны. У некоторых видов образуются более короткие латеральные жгутики.

Дальнейшее описание рода строится на его биохимических особенностях. Аэробы, имеющие строго респираторный тип метаболизма, использующие кислород в качестве терминального акцептора электронов. В ряде случаев в качестве альтернативного акцептора электронов может быть использован нитрат. Ксантомонадины не образуются. Большинство (если не все) виды не растут в кислых условиях (pH 4,5), не требуют органических факторов роста. Оксидазоположительны или отрицательны. Каталазоположительны. Хемоорганотрофы. Некоторые виды — факультативные хемолитотрофы, способные использовать H<sub>2</sub> или CO как источники энергии. Широко распространены в природе. Ряд видов патогенны для человека, животных и растений. Содержание ГЦ в ДНК составляет 58—70%. Типовой вид — Pseudomonas aeruginosa (Schroeter, 1872) Migula 1900.

Выше мы упоминали о сложности структуры рода Pseudomonas и его подразделении на отдельные группы (секции), объединяющие родственные виды. Более подробно вопросы внутреннего подразделения рода и характеристики входящих в его состав видов рассмотрены в последующих главах. В настоящей главе мы анализируем некоторые биологические особенности псевдомо-



над, уделив основное внимание тем из них, которые имеют значение для систематики и идентификации этой группы микроорганизмов.

### МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

К роду *Pseudomonas* относятся неспорообразующие граммотрицательные палочки, чаще всего прямые, редко слегка изогнутые. Как правило, клетки располагаются в препаратах одиночно, иногда попарно. Размеры клеток различных видов псевдомонад колеблются от 1 до 3,5—5,0 мкм в длину при ширине 0,5—1,5 мкм. Большинство представляют собой тонкие палочки; в препаратах штаммов *P. ceracia* мы обнаруживали короткие овоидные палочки (длиной 1,8—2,2 мкм и шириной в среднем 1 мкм). Однако этот морфологический критерий весьма изменчив, неоднократно наблюдались значительные изменения размеров клеток при выращивании штаммов различных видов в условиях аэрации с целью получения антибиотиков и других биологически активных веществ.

Все штаммы обладают активной поступательной подвижностью, обусловленной полярно расположенными жгутиками. Возбудитель сапа *P. mallei* — единственный неподвижный, лишенный жгутиков вид рода *Pseudomonas*. По данным Джессена [267], неподвижны 6 % штаммов *P. aeruginosa*. Единичные безжгутиковые варианты встречаются и среди других видов.

Наряду с полярно расположенными жгутиками у отдельных видов *Pseudomonas* (*P. stutzeri*, *P. mendocina*), особенно при выращивании на агаризованных средах, обнаруживаются более короткие латеральные жгутики.

Число жгутиков, определяемое в препаратах статистически, имеет важное значение для видовой дифференциации бактерий рода *Pseudomonas*. Среди исследованных нами культур лототрихальное жгутикование отмечалось у *P. fluorescens*, *P. putida*, *S. acidovorans*, *X. maltophilia* и др. (рис. 4, *a*, *д*), монотрихальное — у *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. vesicularis* (рис. 4, *e—з*, см. на вклейке). При этом отдельные виды различались по длине жгутиков (достигающей 10 мкм), числу изгибов, длине волны жгутика. В электронно-микроскопических препаратах штаммов *P. ceracia* и *Pseudomonas* sp. мы наблюдали перитрихально расположенные фимбрии или пили (рис. 5, *a*, *б*, см. на вклейке). Впервые эти образования были обнаружены у псевдомонад Фуэрстом и Хейвордом [184]: перитрихальные — у *P. ceracia* и *P. fragi*, полярные — у *P. aeruginosa*, *S. acidovorans*, *S. testosteronei*, *X. maltophilia*, *P. alcaligenes* и *P. solanacearum*. Фимбрии обуславливают «скользящую подвижность» флюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas*, лишенных жгутиков [123], и играют определенную

роль в процессах инфицирования, обеспечивая прикрепление патогена к поверхности клетки [126].

Клеточная стенка и мембрана микроорганизмов рода *Pseudomonas* типичны для грамотрицательных бактерий. С помощью электронной микроскопии в клетках *P. aeruginosa* и *P. saccharophila* обнаружены мембранные структуры типа мезосом [234, 538]. Нам удалось наблюдать мезосомы у *P. stutzeri* (рис. 6, см. на вклейке). Последние равномерно распределялись по всей клетке и имели вид пузырьков или коротких канальцев. В отдельных случаях была видна их связь с цитоплазматической мембраной.

Одним из цитологических критериев, предложенных для дифференциации видов рода *Pseudomonas*, является образование бактериями гранул резервного полимера поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты. Таксономическая ценность этого признака у псевдомонад впервые установлена исследованиями Форсита и соавт. [180].

Мы неизменно обнаруживали обильные включения поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты в клетках *P. seracia*, *S. acidovorans* и *S. testosteroni*, выращенных в условиях аэрации на синтетической среде Мюнца с избыточным содержанием углерода и пониженным — азота. У штаммов *P. pseudoalcaligenes* гранулы полимера обнаруживались непостоянно, и оценка результатов представляла определенные трудности.

У единичных штаммов флюоресцирующих бактерий, в клетках которых, по литературным данным, нет поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты, иногда мы наблюдали включения, окрашиваемые черным суданом. Возможно, окраска этим красителем не является высокоспецифичной для поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты и выявляет другие резервные жировые материалы, накапливающиеся в клетке в условиях дефицита в среде азота. Такая неспецифичность снижает, по нашим данным, таксономическую ценность этого важного цитологического критерия.

## ОСОБЕННОСТИ АЗОТНОГО И УГЛЕРОДНОГО ПИТАНИЯ

Большинство описанных к настоящему времени видов рода *Pseudomonas* не нуждаются в факторах роста и способны ассимилировать минеральные формы азота в качестве единственного источника углеродного питания. Среди 560 штаммов нашей коллекции 522 росли на простых синтетических средах с аммиачными либо нитратными солями в качестве источника азота, при этом среда содержала 0,1 % глюкозы либо (для видов, не ассимилирующих глюкозу) пировинограднокислого натрия. Штаммы *X. maltophilia* нуждались для роста в метионине, штаммы *P. vesicularis* были ауксотрофны по биотину, пантотеновой кислоте и витамину  $B_{12}$ , штаммы *P. diminuta* требовали наряду с перечисленными витаминами наличия в среде серосодержащих аминокислот — метионина или цистеина.

Большинство псевдомонад — типичные хемоорганотрофы. Вместе с тем в составе рода имеется несколько видов, способных к хемолитотрофному росту за счет окисления водорода. Это принадлежащие к III секции водородные бактерии *P. facilis*, *P. saccharophila*, *P. flava*, *P. pseudoflava* и *P. palleronii*, описанные позже «*P. hydrogenovora*» и «*P. hydrogenothermophila*», а также СО-окисляющие хемолитотрофные микроорганизмы «*P. carboxydoflava*», *P. carboxydohydrogena*, «*P. compransoris*», «*P. carboxydovorans*» и «*P. gasotropha*», филогенетические связи которых с другими видами рода пока не установлены.

Остановимся на особенностях углеродного питания — одном из важных критериев в современной систематике бактерий рода *Pseudomonas*. Основные представления о так называемых питательных спектрах бактерий, т. е. их способности усваивать определенный набор органических соединений в качестве единственного источника углерода и энергии, обоснованы работами Дурен ден Ионга [169]. Более 200 веществ различного химического строения были разделены автором на универсальные (используемые всеми испытанными штаммами *Pseudomonas*), видоспецифические и, наконец, вещества, доступные лишь для части культур. К первой группе отнесены метаболиты цикла Кребса, молочная, пировиноградная и глюконовая кислоты, а также ряд аминокислот. Видоспецифическими субстратами оказались дикарбоновые кислоты от адипиновой до пробковой, которые являются прекрасными источниками питания для *S. acidovorans*, но недоступны для микроорганизмов флюоресцирующей группы; в то же время некоторые амины, креатин и гиппуровая кислота избирательно потребляются штаммами *P. putida*.

Попытки использовать с диагностической целью способность псевдомонад к ассимиляции отдельных органических веществ содержатся в работах многих авторов [324, 417, 465]. Однако в полной мере методология Дурен ден Ионга была использована только Стейниером и соавт. [468], что явилось крупным шагом вперед в развитии систематики бактерий рода *Pseudomonas*. Метод изучения спектров углеродного питания с успехом заменил «пестрые ряды», полезные для идентификации энтеробактерий, однако абсолютно непригодные для различных видов псевдомонад.

При изучении способности бактерий рода *Pseudomonas* к ассимиляции 110 различных органических соединений в качестве единственного источника углерода мы вносили их в агаризованную среду Козера в количестве 0,1 %. Суспензии 24-часовых агаровых культур бактерий высевали на чашки репликатором. Контролем служила среда без источника углерода. Способность микроорганизмов ассимилировать легкокипящие углеводороды исследовали на агаризованной минеральной среде Мюнца в вакуумных эксикаторах, в атмосфере, насыщенной парами этих веществ. Использовали химически чистые *n*-алканы от гексана до декана.

Среди более чем 100 соединений различного химического строения, испытанных нами в качестве единственного источника угле-

рода, наиболее универсальным субстратом для псевдомонад являлась пировиноградная кислота, которую усваивали 98 % штаммов различных видов. Далее по степени доступности располагались  $\alpha$ -кетоглутаровая, янтарная и фумаровая кислоты. Уксусная и молочная кислоты поддерживали рост лишь 79 и 87 % штаммов соответственно. Поэтому пируват представляется нам наиболее подходящим источником углерода при испытании способности бактерий к росту на синтетической среде с минеральными формами азота. Из аминокислот наиболее доступны в качестве источников углерода пролин (потребляется 97 % штаммов) и  $\alpha$ -аланин (90 %).

Наряду с универсальными субстратами, потребляемыми всеми или большинством штаммов, ряд веществ избирательно усваивался определенными видами. Это крахмал (*P. stutzeri*), мальтоза (*P. stutzeri*, *X. maltophilia*), целлобиоза (*X. maltophilia*, *P. vezicularis*, *P. paucimobilis*), салицин (*P. cepacia*, *P. paucimobilis*), ацетамид (*P. aeruginosa*, *C. acidovorans*) и др. Обнаружены соединения, которые наряду с описанными в литературе избирательно усваиваются определенными видами рода *Pseudomonas* (например, фолиевая кислота — штаммами *C. testosteroni*).

По числу ассимилируемых углеродных субстратов изученные виды бактерий можно расположить в ряд, в начале которого находятся штаммы *X. maltophilia*, усваивающие, по нашим данным, от 8 до 20 различных источников углерода (на фоне метионина как источника азотного питания).

Штамм «*P. denitrificans*» ассимилирует 14 веществ, *P. taetrolens* — 16, *P. vezicularis* — 19. Спектры углеродного питания штам-

Вид	Число субстратов, усваиваемых отдельными штаммами данного вида
<i>P. aeruginosa</i>	54—73
<i>P. fluorescens</i>	40—72
<i>P. aurantiaca</i>	52—64
« <i>P. lemonnieri</i> »	53—63
<i>P. chlororaphis</i>	57—58
<i>P. aureofaciens</i>	67—63
<i>P. putida</i>	25—84
<i>P. syringae</i>	29—33
<i>P. alcaligenes</i>	9—15
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	8—35
<i>P. stutzeri</i>	30—41
<i>P. mendocina</i>	22—36
<i>C. acidovorans</i>	34—46
<i>C. testosteroni</i>	29—38
<i>P. cepacia</i>	60—66
<i>X. maltophilia</i>	8—20
<i>P. fragi</i>	29
<i>P. taetrolens</i>	16
« <i>P. denitrificans</i> »	14
<i>P. vezicularis</i>	19
<i>P. glathei</i>	34
<i>P. saccharophila</i>	23
<i>P. paucimobilis</i>	37
<i>P. mesophilica</i>	17

<i>P. pickettii</i>	27
<i>Pseudomonas</i> sp. A	39—44
<i>Pseudomonas</i> sp. B	33—44
<i>Pseudomonas</i> sp. C	45—53
« <i>P. rathonis</i> »	36—43

мов *P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes* также весьма узки (соответственно 9—15, 8—35 источников углерода). При этом спектр потребляемых субстратов шире у штаммов *P. pseudoalcaligenes*, способных к ассимиляции глюкозы. Как правило, к числу потребляемых соединений относятся органические кислоты и некоторые аминокислоты, которые являются универсальными источниками углерода для большинства псевдомонад. Спектр углеродных субстратов, потребляемых *C. acidovorans* и *C. testosteroni*, несколько шире: 34—46 и 29—38 различных соединений соответственно. Им близки штаммы *P. stutzeri*, *P. mendocina*, биовара. У *P. fluorescens* (40—52 субстрата). Остальные биовары *P. fluorescens*, как и другие флюоресцирующие виды, весьма сходны по числу ассимилируемых соединений (в среднем 50—70 веществ). В противоположность им флюоресцирующие фитопатогенные бактерии потребляли лишь 29—33 источника углерода.

Крайне растянуты спектры углеродного питания *P. fluorescens* (40—72) и *P. putida* (25—84 источника углерода). Это свидетельствует о таксономической неоднородности названных видов в отличие от таких фенотипически гомогенных видов, как, например, *P. aeruginosa* и *P. aureofaciens*.

У бактерий рода *Pseudomonas* широко распространена и имеет диагностическое значение способность к ассимиляции этанола. Ряд штаммов *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aurantiaca*, *P. mendocina* и «*P. rathonis*» хорошо росли на синтетической среде с 1 % этанола в качестве единственного источника углерода, однако только 41 штамм хорошо развивался на той же среде с 2,5 % этанола. Подавляющее большинство из них принадлежали к видам флюоресцирующей группы — *P. aeruginosa* и *P. putida*,

Таблица 2. Накопление биомассы и синтез витаминов группы В бактериями рода *Pseudomonas* на минеральной среде с этанолом, мкг/г абсолютно сухого вещества

Вид бактерий	Штамм	Биомасса	Содержание витаминов					В <sub>12</sub>
			Тиамин	Рибофлавин	Никотиновая кислота	Пиридоксин	Биотин	
<i>P. fluorescens</i> (биовар III)	2012	0,84	2,8	77,5	250,0	3,5	2,80	4,17
	2046	1,00	5,3	57,5	78,5	6,3	2,85	8,53
	2235	1,22	5,3	90,0	325,0	5,0	3,25	8,65
	2370	2,88	5,0	45,0	125,0	3,2	3,00	8,65
<i>P. putida</i>	447	0,86	3,5	42,5	125,0	2,0	2,80	0,78
	1041	2,07	7,0	75,0	325,0	9,3	1,65	0,28
	1923	1,84	2,0	40,0	175,0	2,5	2,75	2,12
<i>P. aurantiaca</i>	2570	1,03	11,2	52,5	175,0	2,0	2,80	0,30

отдельные штаммы — к видам *P. aurantiaca* и *P. fluorescens* (био-вары II и III). Рост часто сопровождался интенсивной желто-зеленой флюоресценцией. В дальнейшем было показано (табл. 2), что представители рода *Pseudomonas* способны использовать этанол в качестве единственного источника углеродного питания в условиях глубинного культивирования, накапливая при этом биомас-су, полноценную по аминокислотному и витаминному составу [26]. Ниже приведен аминокислотный состав *P. putida* 447, выращенных на среде с этанолом:

Аминокислота	Содержание аминокислоты, г/на 100 г сырого протеина	Аминокислота	Содержание аминокислоты, г/на 100 г сырого протеина
Лизин	6,07	Серин	4,37
Гистидин	1,30	Пролин	0,88
Треонин	5,50	Глютаминовая кислота	13,50
Валин	7,00	Глицин	7,3
Метионин	1,10	Аланин	10,05
Лейцин	1,45	Тирозин	3,22
Изолейцин	4,93	Орнитин	0,097
Фенилаланин	6,02	$\gamma$ -Аминомасляная кислота	0,004
Сумма незаме- нимых амино- кислот	33,37	$\beta$ -Аланин	0,167
Аспарагиновая кислота	9,35	Общая сумма аминокислот	82,308

Данные, полученные при изучении спектров углеродного питания, послужили отправной точкой для оценки способности псевдомонад к росту и антибиотикообразованию на легкокипящих *n*-алканах.

Известно, что бактерии рода *Pseudomonas* способны усваивать парафины, содержащие от 5 до 10 углеродных атомов в молекуле [5]. Однако имеющиеся литературные данные не позволяют сделать вывод, насколько эта способность связана с видовой принадлежностью микроорганизмов. Биосинтетические свойства бактерий рода *Pseudomonas* при выращивании их на средах с жидкими низкомолекулярными *n*-алканами мало изучены. В то же время литературные данные свидетельствуют о способности псевдомонад синтезировать ряд антибиотиков (флюопсины, феназины, рамнолипиды) на средах со среднецепочечными парафинами. Нами изучена способность различных видов псевдомонад к ассимиляции индивидуальных легколетучих *n*-алканов от гексана до декана (табл. 3), а также к синтезу некоторых биологически активных веществ на средах, где смесь легких парафинов являлась единственным источником углеродного питания.

Бактерии видов *P. aureofaciens*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, подавляющее большинство штаммов *P. putida*, *C. acidovorans*, *C. testosteroni*, *X. maltophilia* и ряда других видов вообще не ассимилировали *n*-алканы. Многие испытанные штаммы *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. stutzeri* и *P. mendocina*, значительная часть *P. pseudoalcaligenes*, единичные штаммы *P. fluorescens* и *P. putida* росли на средах с грозненским парафином, содержащим среднецепочеч-

Таблица 3. Усвоение парафинов штаммами различных видов бактерий рода *Pseudomonas*

Вид бактерий	Число изученных штаммов	Из них растут	
		на грозненском парафине ( <i>n</i> -алканы C <sub>14</sub> — C <sub>22</sub> )	в парах смеси <i>n</i> -алканов C <sub>6</sub> — C <sub>10</sub> )
<i>P. aeruginosa</i>	58	10	2
<i>P. fluorescens</i>	243	13	4
<i>P. putida</i>	46	1	0
<i>P. chlororaphis</i>	2	0	0
<i>P. aureofaciens</i>	9	0	0
« <i>P. leimonierii</i> »	15	1	0
<i>P. aurantiaca</i>	36	0	15
<i>P. syringae</i>	15	0	0
<i>P. alcaligenes</i>	3	0	0
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	22	10	0
<i>P. stutzeri</i>	4	2	0
<i>P. mendocina</i>	6	6	0
<i>Pseudomonas</i> sp. A	8	0	0
<i>C. acidovorans</i>	10	0	0
<i>C. testosteroni</i>	9	0	0
<i>P. cepacia</i>	4	3	0
<i>X. maltophilia</i>	35	0	0
« <i>P. rathonis</i> »	8	0	0
<i>Pseudomonas</i> sp. B	9	0	0
<i>Pseudomonas</i> sp. C	6	0	0
<i>P. fragi</i>	1	0	0
<i>P. taetrolens</i>	1	0	0
« <i>P. denitrificans</i> »	1	0	0
<i>P. vezicularis</i>	2	0	0
<i>P. glathei</i>	1	0	0
<i>P. saccharophila</i>	1	0	0
<i>P. paucimobilis</i>	1	0	0
<i>P. mesophilica</i>	1	0	0
<i>P. pickettii</i>	1	0	0

ные *n*-алканы (от C<sub>14</sub> до C<sub>22</sub>). Значительная часть штаммов *P. aurantiaca*, отдельные штаммы *P. fluorescens* (биовар III) ассимилировали только низкомолекулярные *n*-алканы (C<sub>6</sub> — C<sub>10</sub>). Таким образом, несмотря на то что способность к усвоению легких *n*-алканов, обнаруженную лишь у 42 % изученных штаммов *P. aurantiaca*, едва ли можно считать таксономически ценным признаком, полученные данные дополняют наши представления о биологических особенностях этого вида бактерий.

Штаммы бактерий рода *Pseudomonas*, хорошо растущие на агаризованных средах в парах низкомолекулярных *n*-алканов, способны развиваться и в жидких минеральных средах даже в присутствии высоких концентраций указанных субстратов. Установлено [27], что при выращивании на средах с легкими *n*-алканами штаммы *P. aurantiaca* накапливают биомассу, полноценную по аминокислотному составу, а также синтезируют комплекс свойственных этому виду антибиотических веществ.

Сведения об углеродном питании различных видов рода *Pseu-*

**Таблица 4. Усвоение додецилсульфата натрия в качестве единственного источника углерода и энергии различными видами бактерий рода *Pseudomonas***

Вид бактерий	Число исследованных штаммов	Из них усваивали ДДС	Вид бактерий	Число исследованных штаммов	Из них усваивали ДДС
<i>P. aeruginosa</i>	26	26	<i>C. testosteroni</i>	5	0
<i>P. fluorescens</i>	21	5	<i>P. alcaligenes</i>	4	2
<i>P. putida</i>	21	4	<i>P. pseudoalcaligenes</i> и близкие ему штаммы	21	15
« <i>P. lemonnierii</i> »	5	1	<i>P. fragi</i>	1	0
<i>P. aurantiaca</i>	32	19	<i>P. taetrolens</i>	1	0
« <i>P. fluoro-violaceus</i> »	5	1	« <i>P. denitrificans</i> »	1	0
<i>P. aureofaciens</i>	7	7	<i>P. pickettii</i>	1	0
<i>P. cepacia</i>	3	0	<i>P. diminuta</i>	1	0
<i>P. stutzeri</i>	2	0	<i>P. veziculare</i>	1	0
<i>P. mendocina</i>	3	2	<i>P. syringae</i>	9	0
<i>X. maltophilia</i>	5	0	<i>P. species</i>	10	0
<i>C. acidovorans</i>	5	0			

*domonas* могут быть использованы не только с целью получения микробного белка и биологически активных веществ на непищевых субстратах, но и при поисках деструкторов органических соединений, загрязняющих промышленные стоки. Авторы многочисленных работ и патентов, посвященных этому вопросу, не ставили своей задачей установить связи между таксономическим положе-

**Таблица 5. Деструкция додецилсульфата натрия бактериями рода *Pseudomonas* в условиях аэрации (исходная концентрация ДДС 500 мг/л)**

Вид и штамм бактерий	Концентрация ДДС в культуральной жидкости (в мг/л) через		
	24 ч	48 ч	96 ч
<i>P. aeruginosa</i>			
4000	0	0	0
75 л	0	0	0
<i>P. fluorescens</i> 1602	450	400	0
<i>P. aureofaciens</i>			
1972	470	410	0
2687	175	0	0
<i>P. aurantiaca</i>			
2465	500	407	360
2071	350	275	0
<i>P. mendocina</i>			
4014	405	350	0
3074	150	0	0
<i>P. alcaligenes</i> 2881	110	0	0
<i>P. pseudoalcaligenes</i>			
4134	470	410	0
2532	23	0	0
2945	465	415	0
3077	465	415	0



пием микроорганизма и его способностью к деструкции той или иной молекулы. Такая задача была поставлена нами при изучении возможности деструкции бактериями рода *Pseudomonas* некоторых синтетических органических соединений.

Установлено, что *п*-нитроанилин, капролактан, поверхностно-активные соединения сульфанола и алкилсульфоната используются в качестве единственного источника углерода единичными штаммами псевдомонад. Нам не удалось связать деструктивную способность отобранных культур с их таксономическим положением. В то же время способность к усвоению анионного поверхностно-активного вещества додецилсульфата натрия (ДДС) широко распространена у псевдомонад и присуща определенным видам этого рода [37]. Наиболее активными деструкторами ДДС являются штаммы *P. aëuginosa* и *P. aëgeofaciens* (табл. 4). Вокруг колоний бактерий этих видов на чашках с ДДС образовывались значительные по размеру прозрачные зоны уже через 24 ч инкубации. Потребление ДДС происходило и в условиях аэрации (табл. 5).

Хорошим питательным субстратом ДДС оказался и для многих штаммов *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. mendocina*, *P. aurantiaca*. Единичные и слабые деструкторы этого соединения встречались среди штаммов «*P. lemonnieri*», «*P. fluoro-violaceus*», *P. fluorescens*, *P. putida*. Ни один из исследованных представителей остальных 14 видов рода *Pseudomonas* не усваивал ДДС. В то же время практически все культуры использовали в качестве источника углерода и энергии додеканол — субстрат, являющийся первым продуктом микробного гидролиза ДДС [118]. Виды, не способные к ассимиляции ДДС, по-видимому, лишены гидролитических ферментов, разрушающих это соединение.

Полученные данные дополняют наши знания об углеродном питании отдельных видов *Pseudomonas* и могут быть использованы при поисках активных деструкторов ДДС среди микроорганизмов этого рода.

**НЕКОТОРЫЕ ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИЙ  
РОДА PSEUDOMONAS  
И ИХ РОЛЬ В ТАКСОНОМИИ**

**Оксидазная реакция и ее связь с системой цитохромов.** Различные модификации оксидазной пробы, основанной на окислении бактериями *n*-фенилендиамина в присутствии  $\alpha$ -нафтола, используются в микробиологии с 1885 г. Широкое распространение получила оксидазная проба Ковача [303] — экспресс-метод, основанный на окислении в течение нескольких секунд бесцветного тетраметилпарафенилендиамина до ярко окрашенного пурпурного соединения — красителя Вюрстера.

Подробное исследование оксидазной реакции у различных видов и родов грамотрицательных бактерий впервые проведено Стилом [469], в опытах которого из 1660 исследованных штаммов оксидазоположительными оказались все представители рода *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Neisseria*, *Pseudomonas*. Это наблюдение было подтверждено на различных видах *Pseudomonas*, среди которых только *X. maltophilia* и некоторые фитопатогенные виды дали отрицательную оксидазную пробу [364, 468].

Нами в качестве субстрата для оксидазной пробы был использован 1%-й водный раствор солянокислого диметилпарафенилендиамина. Среди изученных микроорганизмов только штаммы *X. maltophilia*, *P. syringae* и «*P. perlurida*» не обладали диметилпарафенилендиаминоксидазой. Слабую оксидазную активность проявили штаммы *P. serasia*, *P. vezicularis*, *P. saccharophila*, *P. raucimobilis*, *P. pickettii*. Остальные виды были оксидазоположительны, давая в течение нескольких секунд темно-пурпурное окрашивание с названным выше реактивом.

Обнаружение у бактерий тетра- или диметилпарафенилендиаминоксидазы свидетельствует о наличии цитохрома *c* в их терминальной дыхательной цепи. Многие виды псевдомонад богаты цитохромом *c*. Так, его содержание у *P. fluorescens* составляет  $1,7 \cdot 10^{-4}$  мкмоль/мг белка [62].

Адсорбционные спектры цитохромов могут быть использованы для решения таксономических вопросов. По данным Мейера и Джонса [345], различия в определенных наборах цитохромов наблюдаются у бактерий на уровне семейства.

Состав цитохромов и его различия у представителей рода *Pseudomonas* исследованы рядом авторов [29, 34, 35, 108, 431, 468]. Нами были изучены спектры поглощения цитохромов интактных

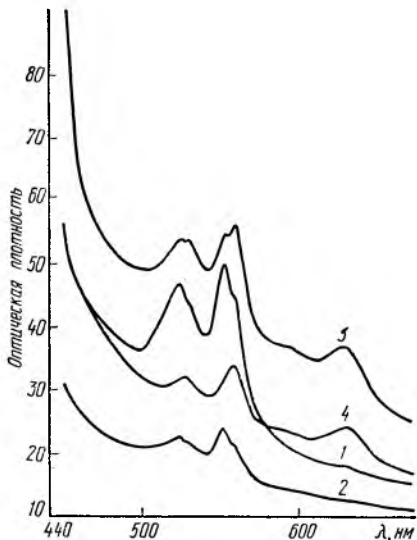


Рис. 7. Спектры поглощения восстановленных цитохромов в интактных клетках *Pseudomonas stutzeri* ИМВ 4005 (1), *Comamonas acidovorans* ИМВ 2863 (2), *Pseudomonas ceracia* ИМВ 3181 (3) и *Xanthomonas maltophilia* ИМВ 103 (4)

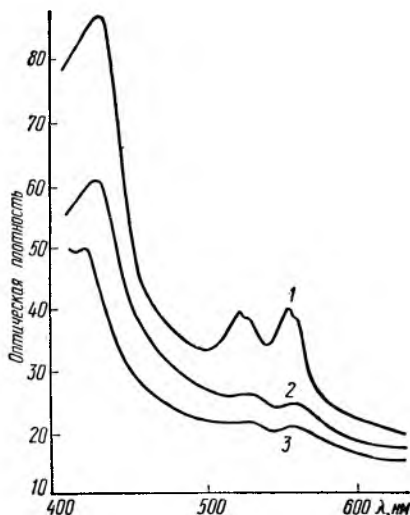


Рис. 8. Спектры поглощения восстановленных цитохромов в интактных клетках *P. fluorescens* ИМВ 1152 (1), *P. syringae* ИМВ 1946 (2) и *P. syringae* ИМВ 1951 (3)

клеток бактерий, выращенных в условиях аэрации на средах, содержащих 10 мкг/мл  $Fe^{2+}$ . Относительное содержание цитохрома *c* в клетках бактерий определяли по методу Лисенковой и Лозинова [62].

Спектрофотометрия интактных клеток сапрофитных флюоресцирующих видов рода *Pseudomonas*, а также *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *C. acidovorans*, *C. testosteroni*, «*P. rathonis*», *P. fragi*, *P. taetrolens*, «*P. denitrificans*» и *P. glathei* позволила обнаружить у них максимумы, характерные для цитохрома типа *c* ( $\alpha$ -полосой при 552—553 нм и  $\beta$ -полосой при 523—524 нм) и цитохрома типа *b* ( $\alpha$ - и  $\beta$ -полосами соответственно при 560—562 и 530—532 нм (рис. 7, 8, табл. 6)).

Оксидазная активность *P. ceracia* была умеренной; соответственно были снижены в спектре и максимумы, характерные для цитохрома *c*, однако появился выраженный максимум при  $\lambda$  634 нм, связанный с повышением удельного веса цитохрома *a*.

В спектре поглощения интактных клеток оксидазоотрицательного вида *X. maltophilia* максимумы, свойственные цитохрому *c*, отсутствовали, вместе с тем были резко выражены максимумы цитохромов *b* и *a*.

Цитохром *c* не был найден и в клетках фитопатогенного вида *P. syringae* (см. рис. 8). При этом у штаммов *P. syringae* обна-

Таблица 6. Набор цитохромов в клетках различных видов *Pseudomonas* (максимумы поглощения, нм)

Вид и штамм бактерий	a			b		c	
	α-полоса	α-полоса	β-полоса	α-полоса	β-полоса	α-полоса	β-полоса
<i>P. fluorescens</i> биовар III ИМВ 2125	—	560	532	552	523		
<i>P. aurantiaca</i> ИМВ 2030	—	562	532	552	524		
" <i>P. lemonnieri</i> " ИМВ 2111	—	560	530	552	523		
<i>P. aureofaciens</i> ИМВ 1972	—	560	530	553	523		
<i>P. putida</i> ИМВ 1608	—	560	530	552	523		
<i>P. syringae</i> ИМВ 1951	—	560	530	—	—		
<i>P. pseudoalcaligenes</i> ИМВ 2523	—	560	532	553	524		
<i>P. stutzeri</i> ИМВ 4005	(634)	560	530	552	523		
<i>P. mendocina</i> ИМВ 4014	(634)	560	530	552	523		
<i>P. fragi</i> ИМВ 4002	—	560	530	553	524		
<i>Pseudomonas</i> sp. A ИМВ 3187	—	560	530	552	523		
<i>C. testosteroni</i> ИМВ 2973	598 *	560	530	553	524		
<i>C. acidovorans</i> ИМВ 2863	632 *	560	530	553	524		
<i>P. seracia</i> ИМВ 3189	598	560	530	554	524		
	634						
<i>X. maltophilia</i> ИМВ 2658	598	560	530	—	—		
	536						

Примечание. (\*) — максимумы выражены очень слабо; (—) — максимумы не обнаружены.

руживались максимумы при 530 и 560 нм, свойственные цитохрому *b* (хотя содержание последнего было в несколько раз ниже, чем в клетках сапрофитных бактерий). Утрата цитохрома *c* фитопатогенными флюоресцирующими видами *P. syringae*, *P. mors-prunorum*, *P. phaseolicola*, *P. marginalis*, а также желтопигментными видами *P. luteola* и *P. orizihabitans*, выделенными из почвы рисовых полей и из клинических источников, описана в литературе [295, 364, 431].

Сопоставление относительного содержания цитохромов в интактных клетках различных видов бактерий (табл. 7) показало, что более высоким содержанием цитохрома *c* характеризуются виды *P. pseudoalcaligenes*, *P. mendocina*, *P. stutzeri*, умеренное содержание его — у штаммов *C. acidovorans* и *C. testosteroni*.

Таким образом, среди псевдомонад выявляются отличные по своим цитохромным профилям (набору и относительному содержанию цитохромов) группы видов. Первую составляют флюоресцирующие и родственные им беспигментные виды, вторую — штаммы *P. seracia*, третью — *X. maltophilia*. Их распределение по рассматриваемому признаку соответствует подразделению рода *Pseudomonas* на РНК-группы. В то же время к видам I РНК-группы принадлежит и *P. syringae*, по-видимому, утративший цитохром *c* в связи с паразитическими условиями существования.

**Денитрификация и азотфиксация.** Будучи строгими аэробами, бактерии рода *Pseudomonas* используют кислород в качестве конечного акцептора электронов. Многие виды способны использо-

Таблица 7. Относительное содержание цитохромов у штаммов некоторых видов рода *Pseudomonas* единицы оптической плотности на 1 г сухих клеток бактерий

Вид и штаммы бактерий	с	в	а
<i>P. fluorescens</i> биовар III, ИМВ 2125	335	232	—
<i>P. fluorescens</i> биовар II, ИМВ 2030	337	292	—
<i>P. putida</i> ИМВ 1608	305	268	—
<i>P. stutzeri</i> ИМВ 4005	549	302	—
<i>P. mendocina</i> ИМВ 4014	410	280	—
<i>P. pseudoalcaligenes</i> ИМВ 2765	464	347	—
<i>P. pseudoalcaligenes</i> ИМВ 2523	512	356	—
<i>C. acidovorans</i> ИМВ 2863	313	225	....
<i>C. testosteroni</i> ИМВ 2973	335	233	....
<i>P. cepacia</i> ИМВ 3189	188	217	47
<i>X. maltophilia</i> ИМВ 103	—	313	104
<i>X. maltophilia</i> ИМВ 2658	—	319	138

Примечание. (—) — цитохромы данного типа не обнаружены; (....) — величина пика не позволяет определить цитохромы количественно.

вать для этой цели нитраты, осуществляя при росте в анаэробных условиях так называемое нитратное дыхание. Анаэробное восстановление нитрата — денитрификация — полезный диагностический признак, отличающий *P. aeruginosa*, отдельные биовары *P. fluorescens* и другие виды. Это свойство легко утрачивается в процессе лабораторного культивирования бактерий и обладает плохой воспроизводимостью в различных лабораториях [462].

Процесс денитрификации идет через стадию восстановления нитратов до нитритов и далее — до свободного азота, а в ряде случаев и до  $N_2O$ . Мы наблюдали образование газообразного азота в анаэробных условиях на средах с нитратом у всех штаммов *P. aeruginosa*, *P. mendocina* и *P. aurantiaca*, у ряда биоваров *P. fluorescens*. У одного из наиболее активных денитрификаторов — *P. stutzeri* — нами описана разновидность, не способная к нитратному дыханию даже после продолжительных пассажей на средах к  $KNO_3$  [42].

Способность к восстановлению нитратов до нитритов в настоящее время не используется для диагностики различных видов *Pseudomonas*, однако этот признак оказался пригодным для разграничения биоваров *P. cepacia* [419].

До недавнего времени отсутствие у микроорганизмов рода *Pseudomonas* способности фиксировать азот являлось общепризнанным, и только в последние годы этот взгляд претерпел существенные изменения. Разработка новых высокочувствительных методов определения азотфиксации позволила обнаружить этот процесс у многих микроорганизмов, осуществляющих его в ассоциации с растениями. Многочисленными исследованиями было показано, что ассоциативные азотфиксаторы рода *Pseudomonas* широко распространены в ризосфере различных растений. Так, на-

пример, diaзотрофные псевдомонады были найдены в ризосфере риса [140]; из корневой зоны растений Канадской Арктики было выделено 15 штаммов азотфиксирующих бактерий рода *Pseudomonas*, 11 из которых принадлежали к флюоресцирующей группе [313]. Азотфиксирующие свойства выявлены у штаммов *P. saccharophila* и *P. delafieldii* [109, 141].

Нами исследована способность к азотфиксации более чем у 1000 штаммов различных видов рода *Pseudomonas*. Бактерии выращивали на безазотистых агаризованных средах Эшби и Беркли, содержащих сахарозу либо пируват в качестве источника углерода. Азотфиксирующую способность отобранных в этих опытах штаммов определяли ацетиленовым методом на газовом хроматографе «Хром-504». На безазотистых средах хорошо росло 300 штаммов бактерий, в том числе штаммы *P. aurantiaca*, *P. seracia*, более половины штаммов «*P. lemmonieri*», единичные представители других видов. Ацетиленредуктазная активность выявлена у трех штаммов *P. seracia* (263—700 нмоль на 1 г сырых клеток в сутки), штамма «*P. lemmonieri*» (412 нмоль/г), *P. aurantiaca* (47,5 нмоль/г), *P. fluorescens* и *P. syringae* (300—324 нмоль/г).

Полученные в последние годы данные свидетельствуют о возможности осуществления одними и теми же видами микроорганизмов двух диаметрально противоположных процессов — азотфиксации и денитрификации; ферменты, осуществляющие эти процессы, имеют ряд сходных характеристик [89]. В таком случае можно предполагать широкое распространение способности к азотфиксации у различных видов *Pseudomonas*.

**Гидролитические и некоторые другие ферменты.** Аргининдигидролаза. Система аргининдигидролазы включает фермент, образующий из аргинина цитруллин, и цитруллинуредазу, которая разлагает цитруллин до орнитина,  $\text{CO}_2$  и аммиака. Наличие у бактерий рода *Pseudomonas* этого комплекса ферментов впервые описано Шеррисом и соавт. [447]. В настоящее время определение аргининдигидролазной активности широко применяется для идентификации различных видов рода *Pseudomonas*. Эта система ферментов была нами обнаружена у всех исследованных штаммов *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, «*P. lemmonieri*», *P. mendocina*, *P. fragi*, *P. taetrolens* и у подавляющего большинства штаммов *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, «*P. rathonis*».

Штаммы *P. syringae*, *P. stutzeri*, *C. acidovorans*, *C. testosteroni*, *X. maltophilia*, «*P. denitrificans*», *P. vezicularis*, *P. glathei*, *P. saccharophila*, *P. paucimobilis*, *P. mesophilica*, *P. pickettii*, «*P. putrefaciens*», *P. seracia* не были способны к анаэробному расщеплению аргинина, хотя представители последнего вида хорошо усваивали его в качестве источника углерода и энергии.

Используя метод Меллера [350], мы изучили также наличие лизин- и орнитиндекарбоксилаз у имевшихся в нашем распоряжении штаммов бактерий рода *Pseudomonas*.

Декарбоксилазы лизина. Найдены Джиларди [191] у 99 % штаммов *X. maltophilia* и 90 % штаммов *P. ceracia*, выделенных из клинических источников. Исследованиями Фозерхилла и Геста [181] расшифрован биохимизм расщепления *l*-лизина бактериями рода *Pseudomonas*. Аэробные псевдомонады осуществляют этот процесс различными путями: через кадаверин (*P. aeruginosa*), кадаверин и 5-аминовалериат (*P. fluorescens*), только через 5-аминовалериат (*P. putida*) и через пилеколат (*P. ceracia*).

В наших опытах лизин декарбоксилировали 33 и 35 штаммов *X. maltophilia* и все изученные штаммы *P. ceracia*; орнитин декарбоксилировал единственный штамм «*P. putrefaciens*».

Различны и пути катаболизма триптофана у различных видов псевдомонад: ароматический у *P. fluorescens*, хинолиновый у *S. acidovorans*, хиназолиновый у *P. aeruginosa*. Синегнойная палочка метаболизирует триптофан до ароматического соединения *o*-аминоацетофенона [330]. Тест на это вещество предложен для дифференциации *P. aeruginosa* от *P. fluorescens* [152].

Среди ферментов аминокислотного обмена заслуживают внимания тирозиназы, осуществляющие синтез из тирозина темно окрашенных пигментов группы меланинов. Меланиногенные штаммы найдены у *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, некоторых фитопатогенных псевдомонад. У многих видов рода *Pseudomonas* способность к синтезу меланинов не изучена, а вопрос о химической природе этих пигментов нельзя считать окончательно решенным. Так, по данным Манна [329], меланины синегнойной палочки являются продуктами превращения гомогентизиновой кислоты и не имеют ничего общего с меланинами животных. Другие авторы [75] относят меланины *P. aeruginosa* по их химическим свойствам к «истинным» меланинам. При биосинтезе последних в процессе гидроксирования *l*-тирозина образуется *l*-3,4-диоксифенилаланин (*l*-ДОФА) — важный интермедиат аминокислотного обмена, эффективное фармакологическое средство при лечении болезни Паркинсона и некоторых других заболеваний [515].

При изучении способности 74 видов 8 родов бактерий к синтезу *l*-ДОФА из *l*-тирозина Йошида, Танака и Накаяма [536] наблюдали наиболее интенсивное гидроксирование *l*-тирозина штаммами родов *Vibrio* и *Pseudomonas*. Теми же авторами описан штамм-продуцент *l*-ДОФА «*P. melanogenum*» [482]. Однако сведений о том, насколько распространена у бактерий рода *Pseudomonas* способность к гидроксированию *l*-тирозина в третьем положении с образованием *l*-ДОФА, в литературе нет.

Образование различными видами бактерий рода *Pseudomonas* из *l*-тирозина *l*-ДОФА мы изучали на плотных средах чашечным методом [73]. Только 6 из 560 штаммов бактерий давали характерную для *l*-ДОФА темно-фиолетовую окраску на средах с тирозином и лактатом железа. Все они принадлежали к виду *X. maltophilia*.

Количественное определение *l*-ДОФА в культуральной жидкости проводили фотоколориметрически по методу Арноу [101],

а идентификацию этого соединения осуществляли хроматографически в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 2) на бумаге и тонкослойной хроматографией на целлюлозе в системе *n*-пропанол — уксусная кислота — вода (3 : 1 : 1); эталоном служил стандартный образец *l*-ДОФА фирмы «Serva».

Изучение трансформации *l*-тирозина на жидкой питательной среде в условиях аэрации показало, что в культуральной жидкости отобранных штаммов *X. maltophilia* накапливается *l*-ДОФА от 2,62 до 5,2 мг/мл:

Вид :: штамм бактерий	Количество <i>l</i> -ДОФА, мг/мл
<i>X. maltophilia</i> ИМВ 1163	3,696
<i>X. maltophilia</i> ИМВ 464	2,592
<i>X. maltophilia</i> ИМВ 1315	2,227
<i>X. maltophilia</i> ИМВ 648	3,514
<i>X. maltophilia</i> ИМВ 923	3,422
<i>X. maltophilia</i> ИМВ 64л	5,250
<i>P. aeruginosa</i> ИМВ 4096	0,460
<i>P. aeruginosa</i> ИМВ 2319	0,490
<i>P. aeruginosa</i> ИМВ 3л	0,233
<i>P. aeruginosa</i> ИМВ 5л	0,250
<i>P. aeruginosa</i> ИМВ 2325	0,422
<i>P. aeruginosa</i> ИМВ 1902	0,375
<i>P. aeruginosa</i> ИМВ 4000	0,266
<i>P. aeruginosa</i> ИМВ 1901	0,277
<i>P. aeruginosa</i> ИМВ 1906	0,256
<i>P. lemonnierii</i> ИМВ 2111	0,480
<i>P. fluorescens</i> ИМВ 1152	0,380
<i>C. acidovorans</i> ИМВ 2890	0,386
<i>C. acidovorans</i> ИМВ 2891	0,425

В аналогичных опытах со штаммами других видов псевдомонад были обнаружены следы *l*-ДОФА (в пределах 0,25—0,49 мг/мл).

Как мы упоминали выше, японскими авторами была показана возможность синтеза *l*-ДОФА штаммами «*P. melanogenum*». Впоследствии было обнаружено, что этот вид является синонимом *X. maltophilia*. Все изложенное свидетельствует о способности штаммов *X. maltophilia* к синтезу значительных количеств *l*-ДОФА из *l*-тирозина, отличающей этот вид от других видов микроорганизмов.

Псевдомонады ассимилируют большое количество низкомолекулярных продуктов, однако образуют весьма ограниченное число экзоферментов, гидролизующих крупные молекулы.

Общепринятым является представление о том, что микроорганизмы этого рода не способны к гидролизу агар-агара и клетчатки. Тем не менее описана разновидность *P. fluorescens* var. *cellulosa*, обладающая целлюлазной активностью [537]. У *Pseudomonas* sp. обнаружен [412, 413] комплекс внеклеточных целлюлаз (экзоглоуказ), внутриклеточных глюконаз и арил-β-глюкозидаз.

Лишь единичные виды рода *Pseudomonas* гидролизуют крахмал, амилолитическая активность присуща *P. stutzeri*, *P. mallei* и *P. pseudomallei*, флюоресцирующему фитопатогенному виду *P. fus-*



covaginae [349], водородным бактериям *P. saccharophila* и «*P. hydrogenovora*» [390], *P. paucimobilis* [239]. Подробно изучены  $\alpha$ -амилазы *P. saccharophila* и *P. stutzeri* [333, 422].

Одним из наиболее «старых» признаков, используемых для видовой дифференциации псевдомонад, является протеолитическая активность (гидролиз желатина). Это свойство является одним из немногих, отличающих не гидролизующий желатин вид *P. putida* от разжижающих желатин сапрофитных видов флюоресцирующей группы. У нефлюоресцирующих видов (*P. pseudoalcaligenes*, *P. serasia* и др.) способность к гидролизу желатина варьирует и, таким образом, эта проба мало пригодна для их диагностики. Среди ферментов, гидролизующих белки, наиболее подробно изучены протеазы *P. aeruginosa* [356], играющие определенную роль в механизмах патогенности этого вида [263]. С диагностической целью определяются также наличие РНКаз и ДНКаз, способность к гидролизу эскулина [191], а также разложение полимерного липидного вещества поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты [159].

Способность к гидролизу пектина встречается у псевдомонад сравнительно редко (по данным Патон, у 5 % исследованных штаммов) и, по-видимому, не имеет таксономической ценности [400]. Гидролизуются и другие растительные полимеры, например ксилан [327].

Описан штамм *P. putida* — продуцент кутиназы — фермента, гидролизующего полиэфирный компонент растительной кутикулы. *P. putida* и азотфиксирующий штамм *Corynebacterium* sp. образуют ассоциацию, населяющую филлосферу фасоли [444].

Представители рода *Pseudomonas* обладают значительной лецитиназной и липолитической активностью. Умеренная лецитиназная активность, в частности, обнаружена нами у штаммов *X. maltophilia* и *P. aeruginosa*. Высокоактивные лецитиназы найдены у штаммов *P. augeofaciens* и *P. serasia*. По результатам наших исследований и литературным данным, эти же виды наиболее активно гидролизуют твин-80.

**Холестеролэстеразы** принадлежат к ферментам липидного обмена, гидролизуют эфиры холестерина и высших жирных кислот. Эти ферменты привлекают внимание исследователей в связи с их действием на трудно гидролизуемые эфиры холестерина, накапливающиеся в значительных количествах в крови больных коронарным атеросклерозом. Несмотря на то что холестеролэстераза широко распространена в тканях животных и человека, получение ее из этих источников связано с определенными техническими трудностями и невысокой активностью [11].

Внутриклеточные и экстракеллюлярные холестеролэстеразы выделены из штаммов *P. fluorescens* [452]. Синтез фермента бактериями происходил лишь при добавлении в питательную среду индукторов, а активность полученных препаратов была сравнительно невысокой.

Холестеролэстеразы у различных видов рода *Pseudomonas* были изучены нами по специально разработанному методу [41].

Таблица 8. Наличие экстрацеллюлярных холестеролэстераз у бактерий рода *Pseudomonas*

Вид бактерий	Количество исследованных штаммов	Количество активных штаммов	Процент к общему числу
<i>P. aeruginosa</i>	58	8	13,8
<i>P. fluorescens</i>	279	5	1,7
<i>P. putida</i>	46	2	4,3
<i>P. chlororaphis</i>	2	0	0
" <i>P. lemonnierii</i> "	15	0	0
<i>P. aureofaciens</i>	9	0	0
<i>P. syringae</i>	15	0	0
<i>P. alcaligenes</i>	3	0	0
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	22	2	9
<i>P. stutzeri</i>	4	0	0
<i>P. mendocina</i>	6	6	100
<i>C. acidovorans</i>	10	0	0
<i>C. testosteroni</i>	9	0	0
<i>P. cepacia</i>	4	0	0
<i>X. maltophilia</i>	35	1	2,8
" <i>P. rathonis</i> "	8	0	0
<i>Pseudomonas p.</i>	23	0	0
<i>P. fragi</i>	1	0	0
<i>P. taetrolens</i>	1	0	0
" <i>P. denitrificans</i> "	1	0	0
<i>P. vezicularis</i>	2	0	0
<i>P. pickettii</i>	1	0	0
" <i>P. putrefaciens</i> "	1	0	0
Всего	555	23	4,1

В основу его положен принцип, предложенный для определения липаз: свободные жирные кислоты — продукт гидролиза жиров — образуют нерастворимые соли с содержащимися в среде ионами кальция. Эти нерастворимые соли в виде преципитата окружают колонии активных продуцентов. Гидролиз эфиров холестерина также должен привести к образованию свободных жирных кислот и выпадению в среде их нерастворимых кальциевых солей. Опыты проводили на МПА, содержащем в качестве субстрата для гидролиза 0,1 % олеата холестерина [79].

Проведенные эксперименты свидетельствуют о том, что способность к гидролизу эфиров холестерина и высших жирных кислот встречается у бактерий рода *Pseudomonas* довольно редко. Лишь 4,1 % штаммов образовывали зоны преципитации на средах с холестеринолеатом (табл. 8; рис. 9, см. на вклейке); у некоторых из них эти зоны достигали 25—30 мм. Активными оказались все шесть (100 %) испытанных штаммов *P. mendocina*. Среди представителей *P. aeruginosa* олеат холестерина гидролизовали 13,8 % штаммов. Внеклеточными холестеролэстеразами обладали также единичные штаммы *P. pseudoalcaligenes*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *X. maltophilia*.

В противоположность наблюдениям японских авторов у большинства отобранных продуцентов (за исключением штаммов

*P. aeruginosa*) нам не удалось обнаружить корреляции между липолитической и холестеразной активностью. Хроматографически было показано, что все отобранные в предварительных опытах на плотных питательных средах штаммы частично гидролизуют вне-сенный в среду холестеринолеат до свободного холестерина при выращивании их на жидких питательных средах в условиях аэрации.

В результате исследований отобран штамм — продуцент внеклеточной холестеролэстеразы — *P. mendocina* 3121. Его подробное изучение показало, что в отличие от описанных ранее продуцентов холестеролэстераз он продуцирует значительные количества фермента на простой синтетической среде в отсутствие индуктора. При наличии холестерина и его эфиров, взятых в качестве индукторов, специфическая активность синтезируемого фермента возрастает в 2—3 раза. Штамм *P. mendocina* 3121 и способ получения из него фермента защищены авторскими свидетельствами [95, 96]. Показана возможность использования иммобилизованного на мембранах фермента *P. mendocina* для клинических анализов общего холестерина сыворотки крови.

Исследование физиолого-биохимических свойств бактерий (т. е. их ферментативной активности) служит прежде всего целям их идентификации. Многие из перечисленных выше ферментативных реакций и диагностических проб широко используются в практических лабораториях, а некоторые внедрены в автоматические системы идентификации бактерий [379].

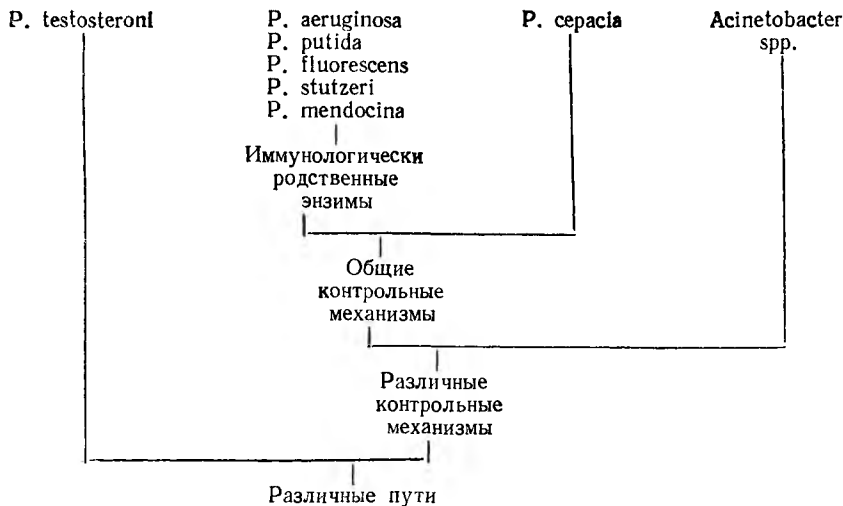
**Данные сравнительной энзимологии.** Исследование ферментов псевдомонад вносит вклад и в решение проблем систематики этой группы микроорганизмов. Для анализа родственных отношений между различными видами рода *Pseudomonas* широко используются результаты изучения строения и физико-химических свойств белков, их антигенной структуры, химизма и механизмов регуляции осуществляемых ими реакций.

Обширная таксономически ценная информация получена при изучении биохимических механизмов катаболизма и биосинтеза различных органических соединений, а также путей регуляции этих процессов. Достаточно сослаться на фундаментальные исследования, связанные с разрушением ароматических соединений различными видами псевдомонад [190, 390, 468].

Пути расщепления бензоата и контрольные механизмы этих реакций сходны у *P. serasia* и видов «*P. fluorescens*-комплекса», хотя ферменты, осуществляющие эти реакции, иммунологически различны (см. схему).

Контрольные механизмы расщепления ароматических соединений отличают перечисленные виды от микроорганизмов рода *Acinetobacter*, а химизм процесса — от штаммов *C. acidovorans* и *C. fest-tosteroni* [389].

Фундаментальное исследование ферментов биосинтеза тирозина и механизмов его регуляции проведено Бингом и соавт. [134] на 90 видах *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*. На основании



специфичности к кофакторам префенат- и арогенатдегидрогеназы и их чувствительности к ингибированию тирозином штаммы 40 видов вседомнад были разделены на 5 групп. Распределение совпадало с данными гибридизации ДНК-рибосомальных РНК и проливало свет на таксономическое положение многих ранее мало изученных с этой стороны видов рода (*P. rugrosynia*, *P. huttiensis*, *P. taetrolens* и др.). Аналогичные закономерности были выявлены при изучении ферментов биосинтеза *l*-фенилаланина — префенат- и арогенатдегидратазы [514].

Широкое распространение в таксономических исследованиях получило изучение белков бактерий методом электрофореза в полиакриламидном геле. Электрофореграммы клеточных экстрактов бактерий обрабатывали денситометрически, полученные данные подвергали нумерическому анализу и группировке по степени сходства с помощью ЭВМ. Исследовали в этом плане и белки бактерий рода *Pseudomonas*.

Изучение методом геле-электрофореза белков наружных мембран штаммов *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* и *P. anguilliseptica* продемонстрировало сходство между штаммами одного вида и существенные различия между представителями различных видов [372].

При двухмерном электрофорезе белков штаммов *P. fluorescens*, выделенных из растений, наблюдается не менее 100 окрашенных серебром полос, соответствующих различным белкам, что представляет определенные трудности для таксономического анализа [353]. Авторы считают более пригодными для этих целей электрофореграммы рибосомальных белков, состоящие из 5—10 полос и позволяющие дифференцировать отдельные виды псевдомнад.

В экстрактах, полученных из различных штаммов *P. raucimobilis* методом электрофореза, было обнаружено приблизительно 50 полос, соответствующих белкам с молекулярной массой от 12 до

5000 кД [385]. Наблюдалось хорошее совпадение между результатами электрофоретического анализа белков и данными гибридизации ДНК — ДНК штаммов *P. paucimobilis*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, 7 видов *Pseudomonas*. Так, при высоких (74—95 %) уровнях гомологии ДНК у различных штаммов *P. paucimobilis* сходными были и их белковые профили: 62—90 % нумерического сходства. Генетически отдаленные виды существенно различались и по своим белковым профилям.

Электрофорез растворимых белков штаммов *Comamonas terrigena* показал их значительное сходство между собой и определенные отличия от штаммов *P. acidovorans* и *P. testosteroni*. Результаты нумерического анализа электрофореграмм глутаматдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и некоторых других ферментов послужили одним из оснований для реклассификации *P. acidovorans* и *P. testosteroni* и их переноса в род *Comamonas* [481] (рис. 10). Результаты анализа электрофореграмм белков соответствовали данным гибридизации ДНК — ДНК, ДНК — рРНК, серологическим данным [166]. Эти исследования позволили осуществить ревизию рода *Comamonas* и уточнить видовую принадлежность ряда организмов неопределенного таксономического статуса.

Исследование электрофоретических профилей ферментов полезно для изучения структуры видов и их подразделения на биовары. Ха и Комагата [213] подвергли электрофорезу в полиакриламидном геле 7 различных ферментов, содержащихся в бесклеточных экстрактах штаммов *X. maltophilia*, и подтвердили существование у этого вида двух различных по свойствам биоваров.

Одним из подходов к выяснению степени эволюционного родства между микроорганизмами является сравнение последовательности аминокислот в их изофункциональных белках. Работы, посвященные аминокислотным последовательностям белков бактерий рода *Pseudomonas*, немногочисленны. Так, Эмбер и Винн [98] исследовали различия в аминокислотной последовательности цитохромов *c-551*, выделенных из денитрифицирующих видов *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *P. mendocina* и «*P. denitrificans*». Различия между видами составляли от 18 до 40 аминокислотных остатков на каждые 100 аминокислот, что свидетельствует об их значительной дивергенции:

Различия на 100 аминокислот

	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>h</i>
<i>P. aeruginosa</i> 6009	<i>a</i>	0						
<i>P. aeruginosa</i> 129B	<i>b</i>	1	0					
<i>P. fluorescens</i> 18	<i>c</i>	27	28	0				
<i>P. fluorescens</i> 50	<i>d</i>	26	27	3	0			
<i>P. fluorescens</i> 181	<i>e</i>	29	30	4	7	0		
<i>P. stutzeri</i> 221	<i>f</i>	26	27	23	26	24	0	
« <i>P. denitrificans</i> » 9496	<i>g</i>	35	35	39	37	40	32	0
<i>P. mendocina</i> 110	<i>h</i>	32	32	27	26	28	18	33
<i>Azotobacter vinelandii</i>	<i>i</i>	30	30	31	33	34	26	30
								0

У разных штаммов одного и того же вида эти различия составляли от 1 (*P. aeruginosa*) до 3—7 (*P. fluorescens*) аминокислотных остатков. Любопытно, что цитохром *c-551* *Azotobacter vinelandii* отличался от цитохромов названных выше видов *Pseudomonas* в тех же пределах — на 26—34 аминокислотных остатка [461].

Различия в аминокислотной последовательности белков, полученных из разных видов бактерий, пропорциональны «иммунологической дистанции» между ними. При иммунологическом сравнении глютаминсинтетазы более чем 30 видов и родов грамотрицательных бактерий установлено, что распределение видов рода *Pseudomonas* по степени серологического родства совпадает с их распределением по комплексам на основании гомологии ДНК — рРНК. При этом значительная близость была обнаружена между штаммами *Xanthomonas pruni*, *X. maltophilia* и *X. translucens* [111].

Объектом исследований служил также азурин — бактериальный белок, являющийся переносчиком электронов. В опытах Чемпиона и соавт. [139] препараты азурина были выделены из 6 референтных штаммов различных биоваров *P. fluorescens*. К ним были получены антисыворотки, использованные далее в сравнительной количественной реакции связывания комплемента со 107 штаммами *P. fluorescens*. Результаты иммунологических исследований позволили разделить изученные штаммы на 14 групп, весьма близко совпадающих с группами, образованными на основании гомологии ДНК и фенотипических исследований. Значительное совпадение (конгруэнтность) между генотипом и фенотипом у штаммов *P. fluorescens* свидетельствует, по мнению авторов, об отсутствии переноса генов между его отдельными биотипами и подтверждает «вертикальный» ход эволюции в этой группе микроорганизмов.

Кларке [143], изучая серологическое родство между алифатическими амидазами *P. aeruginosa*, *P. putida*, *C. acidovorans* и *P. seracia*, установила, что они сходны по электрофоретической подвижности. При этом ферменты, выделенные из различных штаммов *P. aeruginosa*, были высокогомологичны; ферменты *P. aeruginosa*, *P. putida* и *C. acidovorans* имели между собой частичную гомологию. Алифатические амидазы *P. seracia* существенно отличались по антигенной специфичности от ферментов остальных исследованных видов.

Из штаммов *P. aeruginosa*, *P. putida*, *C. acidovorans*, *P. stutzeri*, *C. testosteroni* и *P. seracia* Квинер и Гунзалюс [409] изолировали антранилатсинтетазу — фермент, распадающийся на субъединицы As-I и As-II. При смешивании этих компонентов из различных видов псевдомонад наблюдалась полная реассоциация между субъединицами из *P. aeruginosa* и *P. putida*, а также между *C. acidovorans* и *C. testosteroni*. Во всех остальных случаях субъединицы ферментов определенных видов были разных размеров и плохо ассоциировались.

Успехи в рассматриваемом направлении в значительной мере определяются прогрессом белковой химии и доступностью для исследований очищенных бактериальных ферментов. Результаты, полученные в этой области, в целом согласуются с данными геносистематики и вытекающими из них представлениями о структуре рода *Pseudomonas*, хотя некоторые частные вопросы до настоящего времени остаются неразрешенными.

Разработка техники получения моноклональных антител способствовала развитию многих областей иммунологии. Значительных успехов от применения этого метода можно ожидать и в области систематики и идентификации бактерий рода *Pseudomonas*, в частности при разработке экспресс-методов их диагностики. Таким примером может служить работа Мутариа и Хенкока [369], которыми были получены моноклональные антитела МА1-6 к липопротейну Н2 внешней мембраны *P. aeruginosa*. Полученные антитела давали перекрестные реакции с 50 из 52 штаммов различных серотипов *P. aeruginosa*, с различными видами I рРНК-группы (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri* и др.), а также с родственным им *Azotobacter vinelandii*, но не реагировали с представителями других РНК-групп рода *Pseudomonas*, а также других родов бактерий. Использование метода блоттинга колоний (рис. 11, см. на вклейке) позволило авторам разработать экспресс-метод диагностики микроорганизмов группы *P. fluorescens* — *A. vinelandii* в смешанных культурах.

Моноклональные антитела могут быть использованы для диагностики на различных таксономических уровнях в зависимости от того, к какому антигену эти антитела получены. Так, моноклональные антитела МА5-8, специфичные к белку F наружной мембраны, взаимодействовали только со штаммами *P. aeruginosa* [370], в то время как моноклональные антитела 5Е4 к липополисахариду липида А *E. coli* взаимодействовали с большинством испытанных граммотрицательных бактерий [368]. Наблюдаемый эффект связан с консервативностью структуры липида А, сходством в строении некоторых его компонентов у многих бактериальных таксонов. Подробнее на структуре липида А и значении этого признака для таксономии бактерий рода *Pseudomonas* мы остановимся в следующей главе.

## ГЛАВА 5

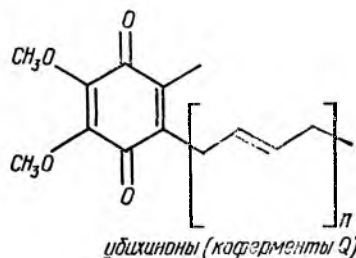
### ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ

Под хемотаксономическими особенностями микроорганизмов понимают их способность к образованию определенных классов соединений, различия в химическом строении и составе которых могут быть использованы для целей систематики. С этой точки зрения к хемотаксономическим критериям в широком смысле этого слова могут быть отнесены рассмотренные нами выше строение нуклеиновых кислот и белковый состав бактерий рода *Pseudomonas*, наличие и активность ряда ферментных систем, образование некоторых вторичных метаболитов и многие другие биохимические особенности. В последние годы для решения вопросов систематики и идентификации все шире привлекаются данные о строении бактериальных хинонов, липидов, липополисахаридов, экстрацеллюлярных полисахаридов.

#### СИСТЕМА УБИХИНОНОВ

Убихиноны (коферменты Q) — 2,3-диметокси-5,6-полипренил-1,4-бензохиноны широко распространены у многих микроорганизмов.

Цифровой индекс убихинонов указывает на число изопреноидных звеньев в боковой цепи их молекулы. В качестве компонентов дыхательной цепи убихиноны участвуют в транспорте электронов, окислительном фосфорилировании [90].



Тип убихинона, определяемый спектрометрией и бумажной хроматографией, оказался полезным хемотаксономическим критерием для разграничения бактерий рода *Pseudomonas* и некоторых других микроорганизмов [387, 533]. Система убихинонов была найдена Ямада и соавт. у всех исследованных ими 63 штаммов



35 видов псевдомонад. При этом убихинон Q<sub>9</sub> имелся у флюоресцирующих видов и родственных им микроорганизмов I секции (*P. alcaligenes*, *P. mendocina*, *P. stutzeri*), убихинон Q<sub>8</sub> обнаруживался у *S. acidovorans*, «*P. desmolytica*», *X. maltophilia* и *P. serasia*, убихинон Q<sub>10</sub> был свойствен штаммам *P. diminuta*, *P. vezicularis* и *P. raucimobilis*. Сходные данные были получены Ояйцу и Комагата при исследовании системы хинонов у 75 штаммов различных видов *Pseudomonas*. Наряду с сапрофитными авторами были изучены фитопатогенные виды: *P. avenae*, *P. caryophylli*, *P. gladioli*, *P. solanacearum*, содержащие убихинон Q<sub>8</sub>. Различные патовары *P. syringae* содержали убихинон Q<sub>9</sub>. Наличие в клетках более 90 % убихинона Q<sub>8</sub> (а также Q<sub>7</sub> и Q<sub>9</sub> в качестве минорных) — отличительная черта рода *Comamonas*, куда перенесены *P. acidovorans* и *P. testosteroni* [481]. Распределение по составу хинонов в основном совпадало с распределением различных видов *Pseudomonas* по РНК-группам (секциям), а также по общему жирнокислотному составу.

Клетки псевдомонад весьма богаты убихинонами. По данным Рамазарма [414], штаммы *P. fragi*, *P. fluorescens* и *P. aeruginosa* содержат 0,44—1,59 ммоль/г убихинона Q<sub>9</sub>. Между тем высокая биологическая активность этих соединений позволяет использовать их в качестве антиоксидантов, как лечебные препараты при анемиях, мышечной дистрофии, сердечно-сосудистой недостаточности [14]. Убихинон Q<sub>10</sub> оказывает кардиотропное действие, стимулирует окислительно-восстановительные процессы в митохондриях миокарда.

Для получения убихинов были предложены многочисленные штаммы псевдомонад. Выход этих веществ значительно повышается при внесении в среду их предшественника — изопентенилового спирта. Из штамма *P. diminuta*, выращенного на 15 л среды, получали 19,8 мг кристаллического убихинона Q<sub>10</sub>; в качестве продуцентов убихинона Q<sub>9</sub> предложены штаммы «*P. schuilkilliensis*» и *P. oleovorans*; в качестве продуцентов Q<sub>8</sub> — «*P. rubescens*» и *P. fulva* [14]. По своей биологической значимости убихиноны стоят в ряду таких соединений, как цитохромы и никотинамидные ферменты.

## ЛИПИДЫ

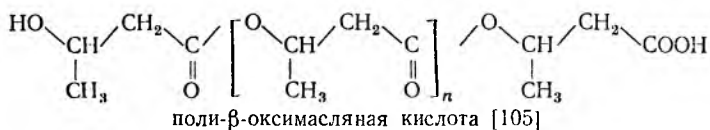
Связь между липидным составом и таксономией микроорганизмов убедительно продемонстрирована многочисленными исследованиями. Значительные успехи в этой области достигнуты благодаря развитию методов газожидкостной хроматографии.

Представители рода *Pseudomonas* имеют типичный для грам-отрицательных бактерий липидный состав. В их клетках содержатся свободные и связанные липиды: фосфолипиды, гликолипиды, липополисахариды, липопротеины. Большинство видов содержат фосфатидил- и бифосфатидилглицерин, а также фосфатидил-

этаноламин (последний не был найден лишь в клетках *P. diminuta*) [520]. В клетках *P. aeruginosa* и *P. fluorescens* обнаружен фосфатидилхолин [250], у *P. vesicularis* и *P. diminuta* найдены гептозилдиацилглицерин и глюкуронозилдиацилглицерин, а у «*P. putrefaciens*» также орнитинсодержащий липид [519, 521]. Несмотря на то что фосфо- и гликолипидам псевдомонад посвящено значительное число работ, а некоторые из этих соединений обнаружены у строго определенных видов, полярным липидам указанных микроорганизмов как возможным таксономическим маркерам уделялось мало внимания.

Перспективным и технически относительно простым оказалось исследование для целей систематики жирнокислотного состава бактерий рода *Pseudomonas*. Простейшим представителем жирных кислот, широко распространенным у псевдомонад, является поли- $\beta$ -оксимасляная кислота — резервный полимер, который накапливается у определенных видов в условиях избытка углерода [440]. О таксономической ценности этого признака у бактерий рода *Pseudomonas* мы упоминали выше.

Поли- $\beta$ -оксимасляная кислота — ценный природный термопластик, она иммунологически совместима с тканями организма, легко подвергается биодegradации, обладает многими другими полезными свойствами.



Поли- $\beta$ -оксимасляная кислота находит применение в сельском хозяйстве, фармацевтической промышленности и других областях народного хозяйства, в связи с чем является в настоящее время объектом биотехнологических разработок [307]. Бактерии рода *Pseudomonas* могут служить продуцентами этого полимера, а также осуществлять его ферментативную деполимеризацию.

Одним из первых изучен в отношении общего жирнокислотного состава типовой вид рода *P. aeruginosa*. Джеймс и Мартин [262] обнаружили в культуральной жидкости и клетках *P. aeruginosa* 29 жирных кислот с длиной цепи от 6 до 19 углеродных атомов. Подробно исследованы и жирные кислоты *P. fluorescens* [154]. Экстрагируемые липиды этого вида изучены на разных стадиях роста и при различных температурах. Показано, что процент ненасыщенных кислот (включая циклопропановые) существенно не изменялся в процессе ростового цикла. В то же время был подтвержден эффект, универсальный для многих родов микроорганизмов: с повышением температуры выращивания бактерий в их клетках возрастает процент насыщенных жирных кислот.

Значительный вклад в изучение липидного состава бактерий рода *Pseudomonas* внесли исследования Мосс и соавт. [359, 360—363, 430]. Полученные данные показали возможность дифференциации бактерий рода *Pseudomonas* по липидному составу. Обна-

Т а б л и ц а 9. Концентрации летучих жирных кислот, образуемых 357 штаммами хроматографии, % (по [402])

Вид бактерий	Количество исследованных штаммов	Уксусная		Пропионовая		Изомасляная	
		M	S <sup>2</sup>	M	S <sup>2</sup>	M	S <sup>2</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	54	25,0	5,8	5,6	1,0	16,9	2,0
<i>P. ceracia</i>	57	0	0	4,4	1,0	15,1	3,0
<i>P. fluorescens</i>	41	0	0	10,2	5,0	17,2	4,5
<i>P. putida</i>	57	0	0	7,7	2,0	28,6	3,5
<i>X. maltophilia</i>	53	0	0	4,0	1,0	8,0	1,0
<i>P. paucimobilis</i>	26	0	0	5,5	1,0	15,0	3,0
<i>P. stutzeri</i>	10	0	0	0	0	18,8	5,6
<i>C. acidovorans</i>	59	28,0	5,2	10,0	3,0	19,2	5,0

Примечание. M — средняя концентрация, S<sup>2</sup> — вариации в пределах группы.

ружены количественные и качественные различия в содержании жирных кислот (прежде всего оксизамещенных) у штаммов *P. aeruginosa*, *P. putida*, *C. acidovorans*, *C. testosteroni*, *P. stutzeri*, *P. alcaligenes*, *X. maltophilia* и *P. ceracia*.

Установлено, что одной из наиболее характерных черт большинства бактерий рода *Pseudomonas* является отсутствие у них 3-оксимиристиновой (окситетрадекановой) кислоты (3-ОН 14 : 0), характерной для многих других родов и видов грамотрицательных бактерий. В клетках флюоресцирующих видов *P. aeruginosa* и *P. putida* имелись значительные количества 3-оксидекановой, 2-оксидодекановой и 3-оксидодекановой кислот (3-ОН 10 : 0, 2-ОН 12 : 0 и 3-ОН 12 : 0). В то же время единственной оксикислотой, найденной у штаммов *C. acidovorans* и *C. testosteroni*, была 3-оксидекановая кислота (3-ОН 10 : 0). Штаммы *P. multivorans* (*P. ceracia*) отличались от перечисленных видов наличием 3-окситетрадекановой кислоты (3-ОН 14 : 0). Качественно иным был жирнокислотный состав штаммов *X. maltophilia*, представленный изоразветвленными жирными кислотами — 2-окси-9-метилдекановой, 3-окси-9-метилдекановой и 3-окси-11-метилдекановой.

На основании изучения жирнокислотного состава штаммов *P. ceracia*, *P. multivorans* и *P. kingii* показана идентичность этих видов.

Исследованы короткоцепочечные кислоты, выделяемые бактериями в среду, и найдены различия между видами. Так, штаммы *C. testosteroni* (в отличие от *C. acidovorans*) выделяли значительные количества фенилуксусной кислоты, а штаммы *P. diminuta* — глутаровой [125, 360, 361].

Газожидкостная хроматография летучих жирных кислот, выделяемых в среду 357 штаммами 8 видов рода *Pseudomonas* с последующей обработкой результатов на ЭВМ методами дискриминантного анализа (табл. 9) позволила надежно идентифицировать 89 % исследованных штаммов, не прибегая к биохимическим методам идентификации. При этом наблюдались четкие различия меж-

**ми бактерий рода *Pseudomonas* и определяемых методом газожидкостной**

Масляная		Изовалериановая		Изокапроновая		Капроновая	
М	S <sup>2</sup>	М	S <sup>2</sup>	М	S <sup>2</sup>	М	S <sup>2</sup>
2,5	1,0	50,0	2,7	0	0	0	0
50,3	8,5	31,2	8,0	0	0	0	0
14,6	6,0	57,9	8,0	0	0	0	0
8,1	2,0	55,1	3,9	0	0	0	0
10,0	3,0	74,6	3,0	0,9	0,2	2,5	0,2
22,8	4,5	55,2	8,2	0	0	2,5	0,1
13,0	5,1	68,0	8,5	0	0	0	0
11,6	6,0	31,2	5,1	0	0	0	0

ду *P. fluorescens* и *P. putida* — видами, дифференциация которых общепринятыми методами представляет определенные трудности [402].

Икемото и соавт. [252] изучили жирнокислотный состав метанольных экстрактов 50 штаммов, относящихся к 22 видам рода *Pseudomonas*. Полученные данные были обработаны нумерическими методами. В результате выделено несколько групп бактерий, различающихся по жирнокислотному составу: флюоресцирующие виды, ахромогенные, состоящие из двух подгрупп (первая включает *S. acidovorans*, «*P. criciviae*», «*P. desmolytica*» и *S. testosteroni*, вторая — *P. diminuta*). Обособленные группы образовали штаммы *P. seracia*, *X. maltophilia*, «*P. putrefaciens*» и «*P. tubescens*». Это распределение в основном совпадало с данными, полученными Мосс, важнейшими маркерами образованных групп служили различные оксикислоты.

Наблюдалось хорошее соответствие между распределением различных видов псевдомонад по жирнокислотному составу и их принадлежностью к определенным рРНК-группам. Сходные результаты были получены Яно и соавт. [534], которые проанализировали экстрагируемые и связанные липиды различных видов *Pseudomonas*.

Ояйцу и Комагата [387] разделили исследованные ими 75 штаммов на 9 групп (табл. 10). Основным критерием для разделения служили 3-оксикислоты. Наряду с описанными выше группами видов авторы выделили как самостоятельные группы штаммы *P. raucimobilis*, вообще не имеющие 3-оксигирных кислот, «*P. extorquens*» и «*P. rosea*», по-видимому, относящиеся к метанолосуаивающим бактериям, водородоокисляющие бактерии *P. pallagonii* и штаммы *P. avenae*. Таксономическое положение перечисленных видов требует более глубоких исследований.

Своеобразны по жирнокислотному составу *P. raucimobilis* и *P. pictorum* [158, 532]. Для первого характерно наличие 2-оксите-традекановой кислоты (2 OH 14 : 0), второй богат изо- и антеизо-

Т а б л и ц а 10. Группировка видов *Pseudomonas*, основанная на составе 3-оксикислот и систем хинонов (по [387])

Номер группы	3-Оксижирные кислоты								Система хинонов
	3 OH 8 : 0	3 OH 10 : 0	3 OH 12 : 0	3 OH 14 : 0	3 OH 14 : 1	3 OH 16 : 0	3 OH 18 : 0	3 OH 18 : 1	
1	—	+	+	+	—	—	—	—	Q <sub>9</sub>
2	—	—	—	+	—	+	—	—	Q <sub>8</sub>
3	—	+	—	—	—	—	—	—	Q <sub>8</sub>
4	—	—	+	+	—	—	—	—	Q <sub>10</sub>
5	—	—	+	—	—	—	+	+	Q <sub>8</sub>
6	—	—	—	—	—	—	—	—	Q <sub>10</sub>
7	—	—	—	+	—	—	—	—	Q <sub>10</sub>
8	+	—	—	—	—	—	—	—	Q <sub>8</sub>
9	—	+	+	+	+	—	—	—	Q <sub>8</sub>

Примечания: (+) — жирная кислота найдена, (—) — не найдена. Группа 1: *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. aureofaciens*, *P. azotoformans*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. fulva*, *P. lacunigenes*, «*P. ochracea*», «*P. ovalis*», *P. putida*, *P. straminea*, *P. stutzeri*, *P. syringae*, *pv. coronofaciens*, *P. syringae pv. eriobotryae*, *P. syringae pv. japonica*, *P. syringae pv. mori*, *P. syringae pv. tabaci*, *P. taetrolens*. Группа 2: *P. caryophylli*, *P. cepacia*, *P. gladioli pv. gladioli*, *P. solanacearum*. Группа 3: *C. acidovorans*, «*P. crucivias*», «*P. dacunhae*», «*P. desmolytica*», *P. flava*, *P. iners*, *P. pseudoflava*, *P. testosteronei*, «*Comamonas terrigena*». Группа 4: *P. diminuta*, *P. vezicularis*. Группа 5: *X. maltophilia*, *P. pistorum*. Группа 6: *P. paucimobilis*. Группа 7: «*P. extrorquens*», «*P. rosea*», *Pseudomonas sp.* Группа 8: *P. palleronii*. Группа 9: *P. avenae*.

разветвленными кислотами, что сближает его с *X. maltophilia*. Близки они и генетически [167].

Примером успешного использования данных липидного состава для целей таксономии является изучение *P. pertusicigena* [280]. Этот вид представлен в Американской коллекции типовых культур двумя штаммами, ранее ошибочно диагностированными как *Bordetella pertussis*. Изучение их свободных и связанных липидов показало, что штаммы *P. pertusicigena* проще по фосфолипидному и сложнее по жирнокислотному составу, чем *Bordetella pertussis*. Для них характерно присутствие в мембранах лизокардиолипина, высокое содержание кардиолипина, наличие в экстрагируемых липидах значительного количества гексадекановой и октадекановой кислот и преобладание оксикислот в жирных кислотах связанных липидов. Все это свидетельствует о том, что штаммы *P. pertusicigena* представляют собой самостоятельный вид рода *Pseudomonas*. По гомологии ДНК, фенотипическим свойствам и жирнокислотным профилям представители этого вида ближе всего штаммам *P. pseudoalcaligenes*.

Накопленные данные позволили ряду авторов идентифицировать некоторые штаммы бактерий рода *Pseudomonas* только на основании исследования состава их жирных кислот. Примером может служить сообщение Куране и соавт. [304], которыми штамм *P. seracia* идентифицирован по его жирнокислотному спектру.

Таблица 11. Жирнокислотный состав штаммов «*P. putrefaciens*» и «*P. perlurida*»

Содержание жирных кислот. %																														
14:0	ai 14:0	14:1	15:0	ai 15:0	i 15:0	15:1	16:0	ai 16:0	16:1	$\Delta 17$	17:0	ai 17:0	18:0	ai 18:0	18:1															
« <i>P. putrefaciens</i> » ИМВ 4127																														
2,6		1,1		0,4		9,0		2,6		21,3		1,7		11,0		1,3		25,2		2,1		1,3		12,7		1,0		0		16,6
« <i>P. perlurida</i> » ИМВ 4008																														
12,5		2,9		0,7		8,0		44,0		1,9		0		16,2		2,2		2,1		0		0,7		1,1		2,0		2,9		1,7

Нами был изучен общий жирнокислотный состав 98 штаммов различных видов рода *Pseudomonas*. Каждый вид по возможности представлен несколькими штаммами различного происхождения [40]. Общий жирнокислотный состав бактерий определяли по методу сопирилиза с гидроокисью тетраметиламмония [3]. Результаты исследований представлены в табл. 11, 12.

В зависимости от качественного состава компонентов жирнокислотного пула исследованные штаммы бактерий были разбиты на две группы. Первую из них, наиболее многочисленную, составили штаммы сапрофитных и фитопатогенных флюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas*, а также *P. fragi*, «*P. denitrificans*», *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. pickettii*, *P. cepacia*, *C. acidovorans*, *C. testosteroni*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. vezicularis*, *Pseudomonas species*. Жирнокислотный состав этих «истинных» представителей рода *Pseudomonas* оказался весьма сходным в качественном отношении. В их клетках преобладали жирные кислоты с четным числом углеродных атомов — гексадекановая 16:0, гексадеценная 16:1 и октадеценная 18:1. Последняя была у многих штаммов представлена олеиновой и вакценовой кислотами. Как правило, биомасса бактерий содержала также циклопропановые кислоты (метилгексадекановую  $\Delta 17$  и метилоктадекановую  $\Delta 18$ ). В качестве минорных компонентов обнаруживались тетра- (14:0), пента- (15:0) и октадекановая (18:0) кислоты (рис. 12, а — в).

Иная картина наблюдалась у штаммов «*P. putrefaciens*» и «*P. perlurida*» (см. табл. 11): качественный состав их жирнокислотных спектров богаче, в клетках преобладают кислоты с нечетным числом углеродных атомов, в том числе изо- и антеизоизомеры, встречались антеизоразветвленные кислоты с 14, 16 и 18 углеродными атомами.

Принадлежность «*P. putrefaciens*» и близкого ему по свойствам и липидному составу «*P. rubescens*» [386, 521] к роду *Pseudomonas* неоднократно подвергалась сомнениям в связи с низким значением ГЦ, что привело к их переносу в состав рода *Altegotomonas* [308]. Позднее их фенотипическая и генетическая обособленность

Таблица 12. Общий жирнокислотный состав различных видов бактерий род

Вид	Число штаммов	Содержание жи			
		14 : 0	15 : 0	16 : 1	16 : 0
<i>P. aeruginosa</i>	10	1,7	0,8	19,3	29,0
<i>P. fluorescens</i>	15	1,4	0,5	29,8	38,4
<i>P. aurantiaca</i>	3	1,5	0,7	32,4	36,7
« <i>P. lemonnieri</i> »	4	2,2	1,1	37,8	43,9
« <i>P. fluoroviolaceus</i> »	2	1,8	0,4	28,0	33,0
<i>P. aureofaciens</i>	4	1,5	0,2	30,4	38,4
<i>P. putida</i>	9	2,0	0,7	32,8	35,6
<i>P. fragi</i>	1	1,6	1,0	30,0	38,6
« <i>P. denitrificans</i> »	1	0,9	0,0	20,5	21,2
<i>P. species A</i>	5	1,2	0,3	24,0	40,0
<i>P. syringae</i>	8	1,4	0,7	36,4	29,6
<i>P. stutzeri</i>	2	2,0	0,6	30,0	25,2
<i>P. pickettii</i>	1	4,5	0,7	34,0	33,4
<i>P. mendocina</i>	3	1,2	1,2	25,0	23,7
<i>P. cepacia</i>	3	1,2	0,5	17,9	30,3
<i>C. acidovorans</i>	4	2,1	0,4	35,3	34,0
<i>C. testosteroni</i>	5	1,9	0,5	35,6	36,1
<i>P. alcaligenes</i>	1	7,0	2,5	27,7	24,9
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	7	2,2	3,0	31,6	22,5
<i>P. vezicularis</i>	2	2,8	3,1	5,5	22,8

\* Цифры в таблице обозначают средние значения содержания жирных кислот у штаммов

послужили основанием для создания самостоятельного рода *Shewanella* [167].

Изученный нами штамм «*P. perlurida*» ССБВ 526 (ATCC 490) способен к образованию кислоты из глюкозы в анаэробных условиях, что противоречит родовой характеристике *Pseudomonas*. Согласно данным гомологии ДНК—рРНК «*P. perlurida*» — грамположительный организм, близкий представителям рода *Arthrobacter* [167]. Таким образом, результаты изучения жирнокислотного состава рассмотренных выше видов подтверждают правомерность их исключения из состава рода.

Примыкали ко второй группе и шесть исследованных нами штаммов *X. maltophilia*. Изоразветвленная пентадекановая кислота — одна из ведущих в его жирнокислотном профиле (рис. 13).

Остальные изученные виды бактерий были сходны по качественному составу жирных кислот, но различались их количественными соотношениями (см. табл. 12). Это касается прежде всего содержания пальмитиновой, пальмитолеиновой и олеиновой кислот, соотношение которых, по нашим данным, может быть использовано для дифференциации отдельных видов *Pseudomonas*. В процессе развития микробной популяции происходит синтез циклопропановых кислот из мононенасыщенных; несмотря на изменения жирнокислотного состава в зависимости от времени и условий культивирования бактерий, сумма соответствующих моноеновых и циклопропановых кислот представляет собой постоянную ве-

**Pseudomonas**

ных кислот, % *					$\frac{K_1}{16:0}$	$\frac{K_2}{16:0}$
$\Delta 17$	17:0	18:1	18:0	$\Delta 19$		
1,5	0,3	43,7	2,2	1,5	0,7	1,6
10,3	0,1	17,1	1,6	0,9	1,1	0,5
9,5	0,1	16,9	1,9	0,3	1,2	0,5
2,4	0,2	18,5	2,8	0,0	1,2	0,5
9,5	0,4	22,8	1,6	0,5	1,1	0,7
12,2	0,4	14,8	1,2	0,7	1,1	0,4
7,3	0,1	19,7	1,7	0,0	1,2	0,6
13,6	0,5	11,9	1,9	0,9	1,0	0,4
6,6	0,5	44,4	1,5	4,4	1,3	2,3
22,9	0,1	9,5	1,4	0,6	1,2	0,3
2,6	0,4	25,6	3,3	0,1	1,3	0,9
1,5	0,3	38,1	2,0	0,7	1,6	1,5
5,2	0,1	20,2	1,2	0,7	1,2	0,6
0,7	0,6	45,4	1,3	0,8	1,1	2,0
13,1	0,4	30,4	3,3	3,2	1,0	1,1
7,1	0,3	19,1	1,7	0,0	1,2	0,6
4,7	0,5	18,0	2,3	0,3	1,1	0,5
0,8	0,7	35,6	0,7	0,0	1,1	1,4
1,8	0,7	36,2	1,7	0,3	1,5	1,7
2,7	2,1	54,3	4,3	0,3	0,4	2,4

каждого вида.

личину [2]. Отношение такой суммы к количеству пальмитиновой кислоты в клетках бактерий есть также величина постоянная и, по нашим данным, характерная для определенных видов рода *Pseudomonas*. В табл. 12 приведены значения этих коэффициентов, обозначенных нами как  $K_1$  и  $K_2$ , а также среднее содержание отдельных компонентов жирнокислотного пула у различных видов псевдомонад.

10 исследованных штаммов *P. aeruginosa* были высокооднородны по жирнокислотному составу, содержали в среднем 43,0% октадеценной кислоты и в 2,2 раза меньше пальмитолеиновой. Это различие статистически достоверно<sup>1</sup>. Весьма близки синегнойным бактериям по своим жирнокислотным спектрам три изученных штамма *P. mendocina*.

Полученные данные позволяют дифференцировать *P. aeruginosa* от других видов флюоресцирующей группы. Так, соотношение олеиновой и пальмитолеиновой кислот в клетках *P. fluorescens* обратно тому, которое наблюдается в клетках синегнойной палочки, процент циклопропановой кислоты  $\Delta 17$  в 5—6 раз выше. Различия в жирнокислотном составе *P. fluorescens* и других разжижающих желатин сапрофитных видов («*P. lemoignieri*», *P. aureofaciens*, *P. aurantiaca*) незначительны, хотя и статистически досто-

<sup>1</sup> В работе обсуждаются лишь те различия в содержании жирных кислот, достоверность которых подтверждена статистически.



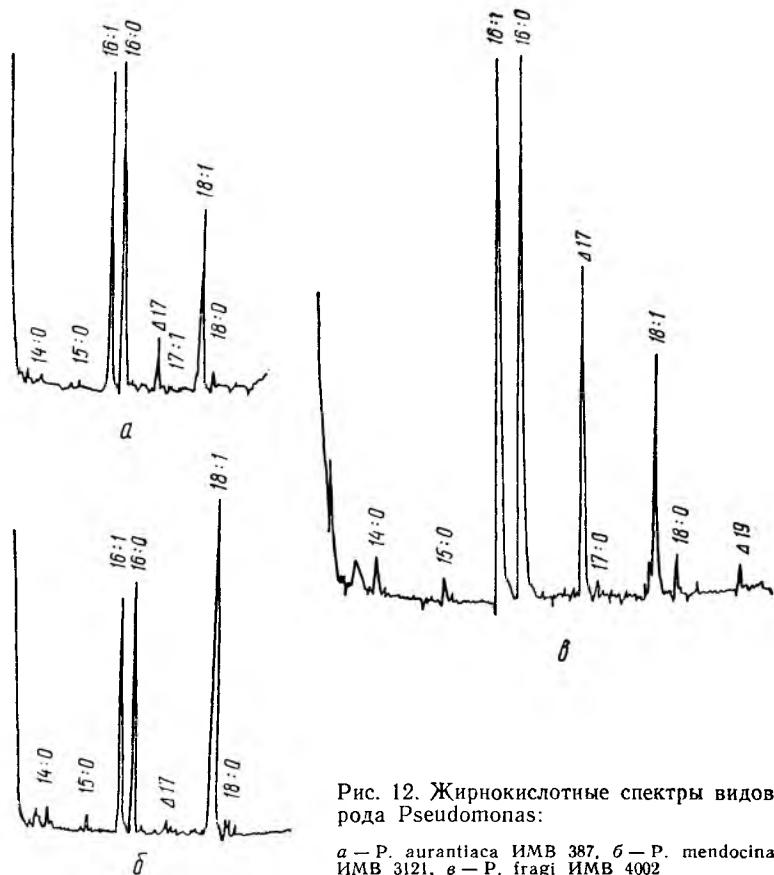


Рис. 12. Жирнокислотные спектры видов рода *Pseudomonas*:

а — *P. aurantiaca* ИМБ 387, б — *P. mendocina* ИМБ 3121, в — *P. fragi* ИМБ 4002

верны. По-видимому, жирнокислотный состав отражает таксономическую близость данной группы микроорганизмов. Нами не было найдено существенных различий в содержании жирных кислот у перечисленных выше видов и *P. putida*, *P. fragi*, *P. pickettii*, *C. testosteroni*, *C. acidovorans*. Критерием для дифференциации последних являются, как упоминалось выше, жирные оксикислоты.

Изученные штаммы *P. syringae*, *P. seracia*, *P. pseudoalcaligenes*, образовали обособленные группы, отличающиеся соотношениями основных компонентов жирнокислотного пула. Сходны по составу жирных кислот штаммы *P. pseudoalcaligenes* и *P. alcaligenes*. Соотношение пальмитолеиновой, пальмитиновой и олеиновой кислот составляло у них 1,2 : 1 : 1,5. Одна из отличительных особенностей — наличие 2,5—3 % пентадекановой кислоты (имеющейся у других видов в очень малых количествах) и высокий процент миристиновой кислоты у типового штамма *P. alcaligenes*. Отличительная особенность *P. vesicularis* — низкое содержание паль-

митолеиновой и высокое — олеиновой кислоты — 5,5 и 54,2 % соответственно.

Однородность жирнокислотного состава всегда являлась в наших опытах отражением таксономической однородности той или иной группы микроорганизмов, а отклонения в составе жирных кислот у какой-либо культуры коррелировали с отклонением в ее биологических свойствах. Так, два изученных нами музейных штамма *P. stutzeri* существенно различались фенотипически и по жирнокислотным спектрам; подобное явление мы наблюдали у свежевыделенных и типового штаммов *P. cerasia*.

Значения коэффициентов  $K_1$  и  $K_2$ , характеризующих отношение суммы некоторых ненасыщенных кислот к насыщенным, составляли для штаммов *P. aeruginosa* соответственно 0,71—1,55; для других видов флюоресцирующей группы — 1,16—0,58; для *P. vesicularis* — 0,36—2,38 и т. д.

Таким образом, нами показано, что общий жирнокислотный состав большинства исследованных видов рода *Pseudomonas* сходен в качественном отношении. В то же время количественные соотношения важнейших жирных кислот у них различны, что может быть использовано для их систематики и диагностики.

Выше мы упоминали о том, что виды рода *Pseudomonas*, принадлежащие к различным секциям (РНК-группам), существенно различаются и по составу оксизамещенных жирных кислот. Местом локализации последних являются бактериальные липополисахариды. Изучение липополисахаридов (ЛПС) бактерий рода *Pseudomonas* — интересное, но мало разработанное направление их хемотаксономии. Сводка данных, посвященных этому вопросу, содержится в обзоре И. Я. Захаровой и Н. В. Танатар [23]; мы кратко остановимся лишь на некоторых важнейших результатах исследований в этой области.

### ЛИПОПОЛИСАХАРИДЫ И ГОПАНЫ

До недавнего времени наиболее полно был охарактеризован липополисахарид *P. aeruginosa* [337]; сообщения о строении ЛПС других видов рода *Pseudomonas* немногочисленны.

Согласно современным представлениям, липополисахариды бактерий рода *Pseudomonas*, подобно таковым у энтеробактерий, имеют общую схему строения и состоят из трех частей, различных по структуре и биологической функции: липида А, кор-олигосахида и О-специфических боковых цепей. Отличительной особенностью ЛПС некоторых псевдомонад (*P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*) является высокое содержание фосфора. По данным Вилкинсона [517], существует корреляция между наличием высокого

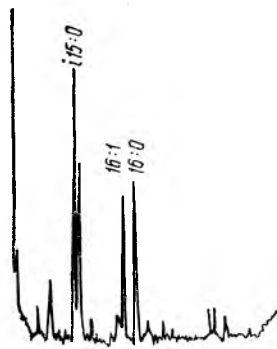
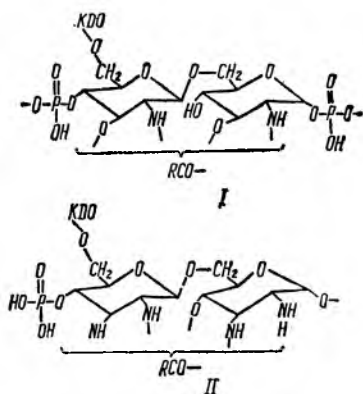


Рис. 13. Жирнокислотный спектр *Xanthomonas maltophilia* ИМВ 4131

содержания фосфора в наружной мембране и чувствительностью названных выше видов к ЭДТА. Металлсвязывающие свойства конденсированных фосфатов обеспечивают присоединение ЛПС через ионные мостики к другим компонентам клеточной оболочки; добавление ЭДТА разрушает эти связи и вызывает лизис бактерий [209, 516]. Менее чувствительные к ЭДТА виды (*P. augeofaciens*, *P. chlogographis*, *P. stutzeri* и др.) содержат меньше фосфора.

Л и п и д А. Несмотря на некоторые структурные вариации, липид А — консервативная часть молекулы ЛПС, менее всего изменяющаяся в процессе эволюции бактерий, имеет сходное строение у многих видов микроорганизмов. Как показали исследования последних лет [504], у грамотрицательных бактерий встречаются два основных типа структурной организации липида А; оба они обнаружены у бактерий рода *Pseudomonas*. Наиболее распространенный тип, свойственный, в частности, *P. aeruginosa* [172, 321], характеризуется следующей структурой: основой липида А служит бифосфорилированный дисахарид *D*-глюкозамина 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкоза, ацелированная жирными кислотами.

У ряда микроорганизмов, в том числе у *P. diminuta* и *P. vesicularis*, обнаружен другой тип структурной организации липида А — так называемый липид А<sub>ДАG</sub> [336]. Основу его молекулы составляет дисахарид 2,3-диамино-2,3-дидезокси-*D*-глюкоза; ему присуща меньшая степень фосфорилированности, чем у липида А первого типа, а также наличие необычной амидносвязанной 3-оксите-традекановой кислоты.



Структуры липида А из *P. aeruginosa* (I) и липида В (II) из *P. diminuta* [172, 276]

Согласно данным каталогизации олигонуклеотидов 16S рРНК, все виды, обладающие липидами А<sub>ДАG</sub>, относятся к одной и той же ветви филогенетического дерева [525]; таким образом, строение углеводной части липида А может иметь определенное таксономическое значение.

Еще более существенный вклад в решение таксономических и

Таблица 13. Жирные кислоты липида А липополисахаридов бактерий рода *Pseudomonas* (по [23])

Вид	Оксикислоты	Ненасыщенные кислоты	Автор
<i>P. aeruginosa</i>	2-OH 12:0 3-OH 10:0 3-OH 12:0	12:0 16:0	Hancock et al., 1970; Wilkinson et al., 1975
<i>P. alcaligenes</i>	3-OH 10:0 3-OH 12:0	12:0	Key et al., 1970; Moss et al., 1972
<i>C. acidovorans</i>	2-OH 12:0	—	Meadow, 1975
<i>P. aminovorans</i>	3-OH 10:0 3-OH 12:0	—	Moss et al., 1972
<i>P. ceracia</i>	2-OH 16:0 3-OH 14:0 3-OH 16:0	—	Samuels et al., 1973
<i>P. diminuta</i>	3-OH 12:0 3-OH 13:0 3-OH 14:0	14:0	Wilkinson et al., 1973; Moss et al., 1974
<i>X. maltophilia</i>	2-OH i 11:0 2-OH 12:0 3-OH i 12:0 3-OH 12:0 3-OH i 13:0		Moss et al., 1973
« <i>P. pavonaceae</i> »	3-OH 12:0 3-OH 14:0	12:0	Wilkinson et al., 1973
<i>P. putida</i>	2-OH 12:0 3-OH 10:0 3-OH 12:0	—	Meadow, 1975
« <i>P. rubescens</i> »	3-OH 10:0 3-OH 13:0	i13:0 13:0	Wilkinson et al., 1973
<i>P. stutzeri</i>	3-OH 10:0 3-OH 12:0	12:0	Wilkinson et al., 1973; Moss et al., 1972
« <i>P. syncyanea</i> »	2-OH 12:0 3-OH 12:0 3-OH 10:0	12:0	Wilkinson et al., 1973
<i>C. testosteroni</i>	3-OH 10:0	—	Moss et al., 1972

Примечание. (—) — не определяли.

филогенетических вопросов вносит жирнокислотный состав липида А. Наличие жирных оксикислот, и прежде всего 3-оксикислот, — отличительная особенность липида А (табл. 13). Последние не обнаруживаются в составе других липидов бактерий, составляют до 65 % жирных кислот липида А и могут служить его своеобразными маркерами [22]. Представленные выше данные о 3-оксикислотах различных видов *Pseudomonas* и их таксономической ценности касаются именно жирных кислот липида А. Иллюстрацией этого тезиса могут также служить данные Н. В. Касянчук [25], в опытах которой жирнокислотные профили ЛПС *P. aeruginosa*, *P. aurantiaca* и *P. putida* были сходны и характеризовались наличием 3-оксидекановой и 3-оксидодекановой кислоты; в отличие от них липополисахарид *C. testosteroni* не содержал 3-оксидодекановой кислоты. В составе липополисахарида *P. ceracia* были обнару-

жены 3-окситетрадекановая и 3-оксигексадекановая кислоты, а также несколько минорных компонентов. Наиболее отличным по составу был липополисахарид *X. maltophilia*, содержащий главным образом изоразветвленные жирные кислоты с длиной углеродной цепи не менее 12 атомов.

Ритчелем и соавт. [420] в составе липополисахарида *Xanthomonas sinensis*, а также девяти других видов рода *Xanthomonas* были найдены изоразветвленные 3-оксигирные кислоты (3-окси-9-метилдекановая и др.), сходные с таковыми у *X. maltophilia*. Ди Фабио и соавт. [168] выявили в составе липида А *X. maltophilia* 3-окси-9-метилдодекановую, 3-окси-11-додекановую и некоторые другие жирные кислоты, не найденные у других видов псевдомонад. Таким образом, строение 3-оксикислот липида А убедительно демонстрирует таксономическую гетерогенность рода *Pseudomonas*.

Кор. Роль связующего звена между липидом А и О-специфической полисахаридной цепью в молекуле ЛПС выполняет кор-олигосахарид.

Структура коровых олигосахаридов частично установлена лишь у двух штаммов *P. aeruginosa*, состав кора исследован у ряда видов рода *Pseudomonas*. Полученные данные свидетельствуют о значительно большей изменчивости кора, чем липида А. Кор липополисахарида *P. aeruginosa* содержит глюкозу, рамнозу, галактозамин, гептозу, аланин и 2-кето-3-дезоксиктоновую кислоту (КДО). Кроме общих компонентов, присущих кору ЛПС грамотрицательных бактерий, характерными структурными компонентами кора псевдомонад являются рамноза и  $\alpha$ -аланин. Так, они найдены в составе кора *P. alcaligenes*, большинства биоваров *P. fluorescens*, некоторых патоваров *P. syringae*, *P. pseudoalcaligenes* и *P. fragi* [12, 13, 282]. Коровые олигосахариды ЛПС различных биоваров *P. fluorescens* различались по количественному и качественному составу: у биовара В найдена редкая для этой части ЛПС арабиноза, у биовара С — ранее не обнаруженная в составе кора фукоза; уникальным оказался кор биовара G, не содержащий характерных для рода *Pseudomonas* компонентов: рамнозы, аланина, фосфора и КДО, что по мнению автора, свидетельствует об его таксономической самостоятельности [13].

Кор *P. stutzeri* состоит из гептозы, рамнозы и КДО; в нем отсутствуют аминосоединения и глюкоза [520]. Кор *X. maltophilia* содержит *d*-глюкозу, *d*-маннозу, *d*-галактозу, *d*-галактуроновую кислоту, фосфат и очень мало КДО. Эти особенности также сближают его с липополисахаридами других видов *Xanthomonas* [499]. Ди Фабио и соавт. нашли в составе кора *X. maltophilia* гексуроновую кислоту, фосфор, КДО, *d*-маннозу, *d*-глюкозу и 3-ацетамидо-3,6-дидезокси-*d*-галактозу [168]. Таким образом, несмотря на то что состав и структура коровых олигосахаридов бактерий рода *Pseudomonas* изучены далеко недостаточно, имеющиеся данные свидетельствуют об их значительном разнообразии и

существенных отличиях от кора ЛПС микроорганизмов других таксономических групп.

О-специфический полисахарид (О-ПС). Наибольшая изменчивость по сравнению с другими частями молекулы липополисахарида характерна для О-специфических боковых цепей, обуславливающих серологическую специфичность бактерий. Каждой О-серогруппе внутри вида свойственна определенная химическая структура О-цепи; последние могут значительно или в некоторых деталях (природой боковых заместителей либо положением одной из гликозидных связей в линейной цепи) различаться между собой.

Строение О-специфических полисахаридов бактерий рода *Pseudomonas* изучено еще крайне недостаточно, хотя в последние годы в этой области получен ряд интересных результатов.

Наиболее исследованным видом является *P. aeruginosa*, для большинства известных О-серотипов которого установлены структуры О-специфических полисахаридов [46]. Последние содержат большое количество различных, в том числе уникальных, аминсахаров, в то время как типичные для энтеробактерий нейтральные моносахариды, за исключением рамнозы, встречаются редко. Редко встречающиеся в других полисахаридах 6-дезоксигексозамины (*D*-хинозосамин, *D*- и *L*-фукозамин) входят в состав ЛПС почти всех серотипов синегнойных бактерий. Многие полисахариды содержат также кислые моносахариды: аминуроновые, диаминоуроновые и диаминононулозоновые кислоты.

Близким по структуре некоторым серогруппам *P. aeruginosa* оказался О-специфический полисахарид *P. aurantiaca*, содержащий *N*-ацетил-*L*-фукозамин и ди-*N*-ацетил-*D*-бациллозамин [13].

Значительные успехи достигнуты в последние годы в расшифровке структуры О-цепей ЛПС фитопатогенных псевдомонад. Изучение патогенов *P. syringae* и некоторых близких ему видов («*P. cerasi*», «*P. wieringae*», «*P. holcii*») показало, что у всех них О-цепь построена по общему принципу: в основе ее находится *L*-либо *D*-рамнан с три- либо тетрасахаридным повторяющимся звеном идентичной структуры [458, 48—53]. Выявленная общность строения подтверждает целесообразность объединения исследованных микроорганизмов в рамках единого вида *P. syringae*.

Иная закономерность была установлена при изучении различных биоваров *P. fluorescens*. ЛПС последних характеризовались крайним разнообразием моносахаридного состава, наличием уникальных сахаров (*D*-фукозы, 2-*O*-метил-*D*-рамнозы) и аминсахаров. Гетерогенность состава коррелировала с серологической гетерогенностью штаммов. Все это свидетельствует, по мнению авторов, о видовой самостоятельности отдельных биоваров *P. fluorescens* [13].

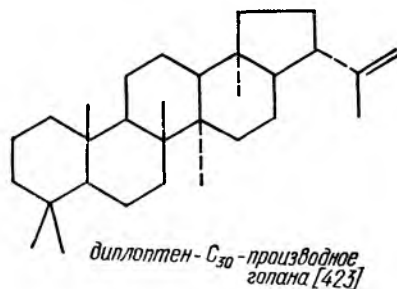
Широко исследованы О-специфические полисахариды *P. cerasi* [85]. Полные структуры повторяющихся звеньев О-ПС установлены у штаммов 9 различных серогрупп этого вида; более половины из них содержали в составе О-ПС по два полисахарида

различного строения. При этом О-ПС одной из серогрупп представлял собой линейный полимер энантиомера *D*-рамнозы [47, 85].

Минорный полисахарид, представляющий собой *D*-рамнан, был обнаружен и у ряда штаммов *P. aeruginosa*, а моноклональные антитела к нему связывались с различными серотипами синегнойной палочки [435, 535]. На основании этих данных выдвинута гипотеза о том, что *D*-рамнан данной структуры может служить общим внутривидовым антигеном *P. aeruginosa*. Выявление у других видов рода *Pseudomonas* *D*-рамнанов с близкими, хотя и несколько различающимися структурами послужило основанием для предположения, что *D*-рамнан может являться и общим внутривидовым антигеном псевдомонад. Для проверки этой гипотезы необходимы дальнейшие структурные исследования липополисахаридов различных видов *Pseudomonas*.

**Гопаны.** Важным компонентом мембраны эукариотических клеток являются стерины. В то же время у многих бактерий и цианобактерий были обнаружены гопаноиды — тритерпеновые производные семейства гопанов, рассматриваемые как структурные аналоги стеринов и их возможные филогенетические предшественники [423].

Типичным представителем гопанов является диплоптен.



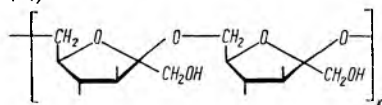
Гопаны сходны со стеринами по размеру, ригидности, амфифильному характеру. Благодаря своей структуре, они стабилизируют мембрану. В зависимости от числа углеродных атомов в политерпеновом скелете (от 30 до 50), а также наличия дополнительных метильных групп гопаны образуют несколько семейств, распространенных у ряда микробных таксонов. Гопаноиды были найдены у *P. sepcacia* и *Azotobacter vinelandii*, однако у *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *X. maltophilia* и *P. diminuta* эти компоненты мембраны не были обнаружены.

### ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЫ

Бактерии рода *Pseudomonas* синтезируют различные по строению экзополисахариды, играющие определенную роль в их экологии, патогенности для животных и растений. Многие аспекты биологической функции этих полимеров еще не изучены и являются предметом исследований. Немало публикаций посвящено использованию полисахаридов, образуемых бактериями рода

*Pseudomonas*, в нефтедобывающей промышленности в качестве загустителей и стабилизирующих агентов для получения взрывчатых гелей, как антимикробных, противовирусных и противоопухолевых средств, в качестве заменителей агара и т. д. Однако лишь в последние годы были установлены некоторые общие закономерности, касающиеся связи между строением некоторых экзополисахаридов и таксономическим положением их продуцентов.

К числу давно известных полисахаридов, синтезируемых псевдомонадами, принадлежат леваны, образуемые штаммами некоторых видов на средах с сахарозой. Леваны представляют собой разветвленные гомополисахариды, полифруктаны с высокой ( $10^6$ — $10^8$  Д) молекулярной массой; у бактерий найдены и низкомолекулярные ( $7 \cdot 10^3$ — $10^5$  Д) леваны.



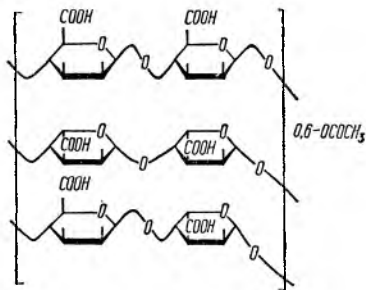
Строение левана [20]

Левансахараза ( $\beta$ -2,6-фруктан : *D*-глюкоза-1-фруктозилтрансфераза) впервые описана у микроорганизмов флюоресцирующей группы Фуком [183]. Для целей таксономии этот признак был с успехом использован Стейниером и соавт. [468].

Среди исследованных нами видов активно синтезировали леван некоторые биовары *P. fluorescens*, штаммы *P. aureofaciens* (одни из наиболее активных продуцентов), «*P. lemonnieri*», *P. aurantiaса*, *P. syringae*.

Подобно декстрану, леван представляет практический интерес, так как может использоваться в химической и пищевой промышленности [114], в медицине как митоген и иммуностимулятор [355], в качестве заменителя плазмы крови [438].

**Альгиновые кислоты.** Альгинаты образуют группу структурно родственных полисахаридов, состоящих их линейных цепей 1,4-связанных  $\beta$ -*d*-маннуроновой и  $\alpha$ -*l*-гулуруновой кислот [475].



Бактериальные альгиновые кислоты [20]

Альгиновые кислоты являются основными полисахаридами водорослей, из которых они выделяются с коммерческими целями и



широко используются в пищевой промышленности и других отраслях хозяйства. Более 20 лет тому назад было установлено, что альгинаты синтезируются мукоидными штаммами *P. aeruginosa*, выделяемыми при кистозном фиброзе легкого. Слизь, образуемая в этих условиях синегнойными бактериями, выполняет защитные функции, обеспечивая им большую устойчивость к антибиотикам и фагам, экологические преимущества в инфицированной ткани [407]. Альгинаты бактерий отличаются от полисахаридов водорослей наличием *O*-ацетильных групп. Так, различные штаммы *P. aeruginosa* содержат в экзополисахаридах 50—90 % *d*-маннуроновой кислоты и 9,7—11,6 % *O*-ацетильных остатков [475]. В обычных условиях синтез полисахарида происходит далеко не у всех штаммов синегнойных бактерий, а лишь у микроорганизмов — возбудителей кистозного фиброза легкого. Однако обработка карбенициллином или другими аминогликозидными антибиотиками позволяет выделить из обычной популяции мукоидные штаммы *P. aeruginosa* с частотой  $10^7$  клеток. Число слизиобразующих мутантов возрастает в десятки раз при обработке мутагенами (этилметансульфонат), фагами, бактериоцинами. Эти же агенты вызывают появление альгинатсинтезирующих мутантов у сапрофитных видов: *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. mendocina* [203, 215]. Полученные таким образом мукоидные варианты *P. mendocina* синтезировали до 20 г/л альгината в глубинной культуре.

Выше мы упоминали о преимуществах, которыми обладают в инфекционном процессе слизиобразующие штаммы *P. aeruginosa*. К числу биологических функций альгината относится и его способность увеличивать активность экзוליпазы — фермента, связанного с патогенностью *P. aeruginosa* [522]. Роль альгинатов у сапрофитных штаммов псевдомонад окончательно не выяснена. Представляет интерес сообщение о том, что капсулярные полисахариды *P. putida* накапливают до 100 % содержащихся в среде ионов тяжелых металлов, в частности кадмия [443]. По-видимому, альгинаты могут обеспечивать адгезию бактерий к корням (у колонизирующих корневую систему сапрофитов) и листьям растений (у фитопатогенных микроорганизмов рода *Pseudomonas*). Фетт и соавт. [178] рассматривают альгиновые кислоты как факторы патогенности некоторых видов для растений. Изученные ими штаммы «*P. artata*», «*P. lachrymans*» и других флюоресцирующих фитопатогенных псевдомонад синтезировали альгинаты с молекулярной массой от  $11,3 \cdot 10^3$  до  $4,7 \cdot 10^3$  Д; все полисахариды были ацетилированы и содержали от 1 до 28 % глюкуроновой кислоты. Способность к синтезу этого класса экзополимеров была присуща только видам I секции (I рНК-группы) рода *Pseudomonas*. В составе экзополисахаридов, синтезируемых штаммами *S. acidovorans*, *P. serasia*, *P. corrugata* и др., авторам не удалось обнаружить альгиновые кислоты.

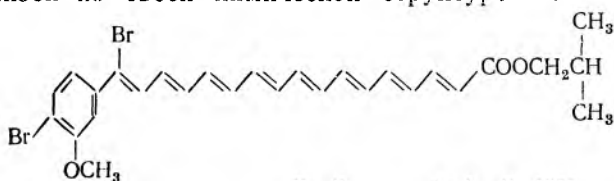
Среди микроорганизмов других таксономических групп способностью к образованию альгинатов обладает *Azotobacter vinelandii*,

родственный, согласно данным геносистематики, флюоресцирующим псевдомонадам [388].

Большую группу вторичных метаболитов, различия в химическом строении которых могут быть использованы для разграничения микробных таксонов, составляют пигменты и антибиотики.

Многие виды (*P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. vezicularis*, *P. gadiora*, *P. mesophilica*, водородные бактерии) содержат желтые, розовые, оранжевые пигменты, объединяемые общим названием «каротиноидных», однако их химическое строение изучено далеко не у всех видов. Выше мы упоминали о том, что наличие у бактерий рода *Xanthomonas* желтых пигментов ксантомонадинов составляет одно из их немногих отличий от рода *Pseudomonas*. Эта своеобразная группа веществ относится к бромированным арилполиенам.

Им близок по своей химической структуре желтый пигмент



ксантомонадин-пигмент *Xanthomonas juglandis* [99]

*X. maltophilia*. Типовой, а также многие другие штаммы этого вида содержат монохлорированный арилгексаеновый пигмент  $C_{23}H_{25}O_3Cl$ , некоторые штаммы — негалоидированные арилгептаеновые пигменты [266]. Химическая близость пигментов является отражением генетической близости между образующими их микроорганизмами. В то же время желтый пигмент *P. raucimobilis* каротиноид ностоксаинтин представляет собой 2R, 3R, 2R, 3R-β, β-каротин-2,3,2',3'-тетрол [264]. До настоящего времени подобные вещества были обнаружены лишь у некоторых цианобактерий. Данные о химическом строении пигментов подтверждают отсутствие родства между *P. raucimobilis* и *X. maltophilia*. Предполагают, что биологическая роль ксантомонадинов состоит в защите клетки от светового повреждения [265].

Немалая роль принадлежит пигментам в классификационных схемах и диагностических ключах, предложенных для идентификации бактерий рода *Pseudomonas*, в частности в 1—9-м изданиях определителя Берги. Следует, однако, отметить, что пигменты псевдомонад изучены далеко не полно, а связи между их химической природой и таксономическим положением продуцента не всегда уделялось должное внимание. Многие из них (псевдобактины, феназины, продигнозиноподобные пигменты и др.) обладают антибиотической активностью, у многих антимикробные свойства не были изучены. Сведений о связи между неокрашенными антибиотическими веществами и таксономическим положением бактерий рода *Pseudomonas* в литературе нет.

Химическое строение, биологическая активность, распространение и таксономические аспекты способности к синтезу ряда пигментов и антибиотиков у бактерий рода *Pseudomonas* рассматриваются нами в последующих главах.

## ГЛАВА 6

### ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS К АНТИБИОТИКАМ И ДРУГИМ АНТИМИКРОБНЫМ СОЕДИНЕНИЯМ

Большинство авторов рассматривают чувствительность к антибиотикам как вспомогательный признак в диагностике бактерий, однако описаны и успешные попытки идентификации микроорганизмов с помощью ЭВМ только на основании этого признака [182].

Микроорганизмы рода *Pseudomonas* в основном характеризуются высокой резистентностью к различным антимикробным веществам. Эта резистентность может быть обусловлена наличием у бактерий ферментов, разрушающих или модифицирующих антибиотики [377], а также особенностями строения их ЛПС [23, 337]. Резистентность к антибиотикам и тяжелым металлам может детерминироваться плазмидами [10].

Сведения о чувствительности к антибиотикам различных видов бактерий рода *Pseudomonas*, имеющих значение в патологии человека, суммированы в обзоре Фон Гравеница [500]. Типовой вид рода — *P. aeruginosa* — высокорезистентен к лекарственным веществам, что представляет серьезную проблему в клинике. Одной из отличительных особенностей этого вида, связанной как с хромосомным, так и с плазмидным контролем, является множественная устойчивость к антимикробным агентам [377]. В настоящее время наиболее эффективными средствами лечения синегнойной инфекции являются комбинации аминогликозидов с некоторыми полусинтетическими пенициллинами (карбенициллин, азлоциллин и др.) либо аминогликозидов с полусинтетическими цефалоспоридами третьего поколения (цефтазидим, цефоперазон). Значительной активностью в отношении *P. aeruginosa* обладают некоторые полусинтетические монобактамы (азтреонам).

Многочисленные селективные среды, предложенные для выделения синегнойных бактерий из патологического материала [76], основаны на высокой резистентности этого возбудителя к различным антимикробным соединениям. Последние при внесении в среду подавляют микроорганизмы других таксономических групп. Такие среды с цетримидом, ампициллином, фурагином и др. Создание среды, селективной для многих видов псевдомонад, представляет несравненно более сложную задачу, поскольку их чувствительность к различным антибактериальным веществам существенно отличается. Примером такой среды могут служить среды  $S_1$  и

S<sub>2</sub>, содержащие детергент натрийлаурилсаркозин и антимикробный компонент триметоприм, предложенные Голдом с соавт. [201] для селективного выделения из различных природных источников микроорганизмов флуоресцирующей группы рода *Pseudomonas*.

Штаммы флуоресцирующих видов — *P. fluorescens* и *P. putida*, как правило, чувствительны к полимиксину и антибиотикам-аминогликозидам [500]. Антибиограммы возбудителей сапа и мелиоидоза — *P. mallei* и *P. pseudomallei* — носят совершенно иной характер: на штаммы этих видов действуют тетрациклин, новобиоцин, канамицин и хлорамфеникол. Множественная устойчивость к антибиотикам свойственна штаммам *X. maltophilia*; для лечения заболеваний, вызванных этим возбудителем, рекомендованы комбинации гентамицина с карбенициллином и рифампицином.

Следует отметить, что информация о чувствительности псевдомонад к различным антимикробным агентам касается преимущественно штаммов клинического происхождения, а подавляющее большинство сообщений на эту тему посвящено *P. aeruginosa*. Целью таких исследований является, как правило, чисто прикладной, медицинский, а не таксономический аспект проблемы. Тем более интересны единичные сообщения, где сведения о чувствительности псевдомонад к определенным веществам послужили основой для таксономических обобщений. В этой связи особого внимания заслуживает работа Вилкинсона [516], изучившего лизирующее действие этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) на различные виды *Pseudomonas*.

Чувствительными к ЭДТА оказалось большинство исследованных видов, все они были из I секции рода *Pseudomonas*. В гл. 5 мы указывали на корреляцию между содержанием фосфора в липополисахаридах бактерий и их чувствительностью к лиганду. В то же время ЭДТА не снижала жизнеспособность штаммов «*P. iodinum*», «*P. rubescens*» и «*P. ravanasea*» (к настоящему времени исключенных из рода *Pseudomonas*) и очень слабо действовала на штаммы *P. diminuta* и *X. maltophilia*.

Как мы упоминали, ЭДТА разрушает определенные связи в наружной мембране псевдомонад. Возможно, с особенностями строения мембраны связана и обнаруженная недавно их высокая чувствительность к солям двухвалентного бария. По данным Е. П. Сиволодского [78], рост *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. alcaligenes*, *P. aurantiaca* и *P. fluorescens* ингибировался при наличии в среде 0,25—1,0 г/л BaCl<sub>2</sub> или Ba(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, микроорганизмов других таксономических групп в присутствии 17—64 г/л. На этом основании предложен тест для идентификации бактерий рода *Pseudomonas*.

Нашими исследованиями, проведенными на широком наборе видов, подтвержден вывод об избирательной чувствительности псевдомонад к ионам бария, хотя показатели этой чувствительности несколько отличались от цитированных выше. Виды I РНК-секции, т. е. «истинные» представители рода *Pseudomonas* были за небольшими исключениями чувствительны к 1—10 г/л

Таблица 14. Чувствительность различных видов бактерий рода *Pseudomonas* к азотнокислому барью

Вид бактерий	Число исследованных штаммов	Минимальная ингибирующая рост концентрация Ва (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , г/л	Вид бактерий	Число исследованных штаммов	Минимальная ингибирующая рост концентрация Ва (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , г/л
<i>P. aeruginosa</i>	17	1—10	<i>P. fragi</i>	15	1—10
<i>P. fluorescens</i>	41	0,5—10	<i>P. taetrolens</i>	6	1—5
<i>P. aurantiaca</i>	22	1—10	« <i>P. denitrificans</i> »	1	1
<i>P. aureofaciens</i>	7	1—5	« <i>P. rathonis</i> »	6	1—5
« <i>P. lemonnieri</i> »	8	5—10	<i>P. glathiei</i>	1	0,5
<i>P. chlororaphis</i>	2	10 *	<i>C. acidovorans</i>	16	50
<i>P. putida</i>	32	1—10	<i>C. testosteroni</i>	8	50 **
<i>P. stutzeri</i>	4	1—10	<i>P. cepacia</i>	17	50
<i>P. mendocina</i>	6	0,5—5	<i>P. diminuta</i>	2	50
<i>P. alcaligenes</i>	3	1 *	<i>P. vezicularis</i>	2	10
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	20	0,5—1 *	<i>X. maltophilia</i>	78	20—50

\* По одному штамму данных видов растет в присутствии 50 г/л. \*\* Рост одного штамма ингибируется 10 г/л Ва(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

Ва(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; рост микроорганизмов других секций (*P. cepacia*, *P. diminuta*, *Comamonas acidovorans*, *Xanthomonas maltophilia*) тормозился 50 и более г/л этого соединения (табл. 14).

Угнетающее действие ионов бария на псевдомонады ослабляется или не проявлялось вообще в присутствии ионов кальция и магния (но не марганца, кобальта, молибдена, меди, железа). Можно предположить, что ионы бария являются антагонистами некоторых дивалентных катионов, образующих мостики между молекулами липополисахарида и мембранными протеинами и играющих важную роль в стабилизации наружной мембраны. Это предположение предварительно: биохимические основы избирательной чувствительности бактерий рода *Pseudomonas* к ионам бария требуют специальных исследований.

Мустафа и Виттенбери [364] показали, что фитопатогенные бактерии («*P. tabaci*», «*P. mors-prunorum*», «*P. phaseolicola*» и др., объединяемые в настоящее время под видовым названием *P. syringae*) отличаются от флюоресцирующих сапрофитов устойчивостью к солям марганца и чувствительностью к солям кобальта.

Фунг и Миллер [186] изучали действие 42 красителей на микроорганизмы клинического происхождения (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Escherichia* и др.). Из представителей рода *Pseudomonas* был испытан *P. aeruginosa*; из 42 исследуемых красителей его рост тормозил только кристаллвиолет. Действие красителей на остальные виды псевдомонад не было изучено. Между тем чувствительность к красителям с успехом используется в качестве одного из критериев в систематике некоторых групп микроорганизмов, а многие красители входят в состав широко применяемых в практике дифференциально-диагностических сред.

Исходя из изложенного, мы поставили своей задачей изучить влияние на бактерии рода *Pseudomonas* 49 красителей различного химического строения, а также 14 антибиотиков и некоторых других химиотерапевтических веществ [38]. Чувствительность бактерий к антибиотикам изучали, используя стандартные диски, чувствительность к красителям — на чашках с мясо-пептонным агаром, содержащим 100 мкг/мл соответствующих соединений. Испытывались нитро- и азокрасители, арилметановые (в том числе группы парафуксина и эозина), акридиновые, ксантеновые, хинолиновые, цианиновые и оксикетонные красители.

Исследования показали, что представители рода *Pseudomonas* крайне гетерогенны по отношению к красителям, антибиотикам и другим химиотерапевтическим веществам. Определяется это химической природой антимикробного агента, видовой принадлежностью микроорганизма, а иногда и свойствами отдельных штаммов.

Прежде всего различались по широте спектра и силе действия на бактерии сами красящие вещества (табл. 15). Наиболее активны были арилметановые красители группы парафуксина: метилвиолет (угнетающий 22 из 23 исследованных видов рода *Pseudomonas*), генциан, кристаллвиолет и метиловый зеленый (тормозили рост 21 вида), далия (действовал на 17 видов). Сходным с последним действием обладал бриллиантовый зеленый. Уже был антимикробный спектр хинолинового синего, риванола, гематоксилина, тионина, малахитового зеленого, основного фуксина и родамина Ж. Остальные красители действовали на некоторые виды рода *Pseudomonas*, а два из 49 испытанных веществ — анилинблау и фенолрот — вообще не угнетали ни одного штамма бактерий.

Анализируя чувствительность псевдомонад к красителям, мы можем расположить их в ряд, в начале которого находятся виды, устойчивые ко всем или почти ко всем испытанным веществам. Завершают его микроорганизмы, превосходящие по своей чувствительности к красителям многие грамотрицательные и даже грамположительные роды и виды бактерий (энтеробактерии, стафилококки).

Наиболее резистентными к красителям были штаммы *P. augeofaciens* и *S. acidovorans* (на них не действовало ни одно из испытанных соединений) и штаммы *P. aeruginosa*, рост которых задерживал только метилвиолет (один штамм этого вида был также чувствителен к далии). На микроорганизмы сапрофитных видов флюоресцирующей группы, а также *P. fragi*, *P. ceracia*, *P. mendocina*, *S. testosteroni*, *P. taetrolens* и «*P. denitrificans*» действовало от 4 до 9 испытанных веществ, прежде всего арилметановые красители группы парафуксина. Часть видов угнеталась также риванолом и хинолиновым синим. Большинство взятых в опыт штаммов *S. testosteroni* не росло в присутствии родамина Ж, а *P. ceracia* — в присутствии метилрота.

Чувствительные к красителям виды *X. maltophilia*, *P. pickettii*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. stutzeri* и, наконец, *P. alcaligenes* угне-

Т а б л и ц а 15. Чувствительность бактерий рода *Pseudomonas* к красителям

Краситель	Вид, число								
	<i>P. aeruginosa</i> , 5	<i>P. aureofaciens</i> , 5	<i>P. fluorescens</i> , 5	<i>P. putida</i> , 5	<i>P. aurantiaca</i> , 5	« <i>P. lemonnierii</i> », 5	« <i>P. fluoro — violaceus</i> » 5	<i>P. syringae</i> , 9	<i>P. cepacia</i> , 5
Нитрокрасители									
ауранция	—	—	—	—	—	—	—	—	—
пикриновая кислота	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Азокрасители									
везувин	—	—	—	—	—	—	—	—	—
метилрот	—	—	—	—	—	—	—	—	в
хризоидин	—	—	—	—	—	—	—	—	—
вариаминовый голубой	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Арилметановые группа парафуксина									
кристаллвиолет	—	—	в	+	в	в	—	+	+
группа родамина									
родамин С	—	—	—	—	—	—	—	—	—
родамин Ж	—	—	—	—	—	—	—	в	—
Акридиновые									
акридиновый	—	—	—	—	—	—	—	в	—
оранжевый	—	—	—	—	—	—	—	в	—
пиронин	—	—	—	—	—	—	—	—	—
риванол	—	—	в	в	—	—	—	+	—
Ксантоновые									
фенолрот	—	—	—	—	—	—	—	—	—
крезолрот	—	—	—	—	—	—	—	в	—
бромфенолблау	—	—	—	—	—	—	—	—	—
бромтимолблау	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Азиновые									
нафтиловый красный	—	—	—	—	—	—	—	в	—
сафранин	—	—	—	—	—	—	—	в	—
нигрозин	—	—	—	—	—	—	—	в	—
Оксазиновые									
бриллиант-крезолблау	—	—	—	—	—	—	—	в	—
бромкрезоловый зеленый	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Триазиновые									
метиленблау	—	—	—	—	—	—	—	—	—
фуксин кислый	—	—	—	—	—	—	—	—	—
фуксин основной	—	—	—	—	—	—	—	+	—
метилвиолет	+	—	в	+	+	+	—	+	+
геницианвиолет	—	—	в	+	+	+	—	+	+
метиленовый зеленый	—	—	—	+	в	в	—	+	+
розанилин	—	—	—	—	—	—	—	в	—
анилинблау	—	—	—	—	—	—	—	—	—
далия	—	—	в	в	—	—	—	+	—

ИССЛЕДОВАННЫХ ШТАММОВ

<i>P. stutzeri</i> , 2	<i>P. mendocina</i> , 4	<i>P. alcaligenes</i> , 3	<i>P. pseudoalcaligenes</i> , 5	<i>C. acidovorans</i> , 5	<i>C. testosteroni</i> , 5	<i>X. maltophilia</i> , 5	<i>P. pickettii</i> , 1	<i>P. fragi</i> , 1	<i>P. taetrolensis</i> , 1	« <i>P. denitrificans</i> »	<i>P. vezicularis</i> , 1	<i>Pseudomonas</i> spA, 5	
+   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -	В   +   +   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -	В   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -	В   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -	-   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -	+   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -	В   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -	+   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -	+   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -	+   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -	+   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -	+   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -	+   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -	В   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -   -



Краситель	Вид, число								
	<i>P. aeruginosa</i> , 5	<i>P. aureofaciens</i> , 5	<i>P. fluorescens</i> , 5	<i>P. putida</i> , 5	<i>P. aurantiaca</i> , 5	« <i>P. lemonnierii</i> », 5	« <i>P. fluoro — violaceus</i> » 5	<i>P. syringae</i> , 9	<i>P. ceratiae</i> , 5
Группа аурамина	—	—	—	—	—	в	—	в	—
Группа малахитового зеленого									
малахитовый зеленый	—	—	—	—	—	в	—	в	—
бриллиантовый зеленый	—	—	—	—	—	в	—	+	+
Группа аурина									
аурин	—	—	—	—	—	—	—	в	—
розовая кислота	—	—	—	—	—	—	—	в	—
Группа эозина									
дихлорфлюоресценн	—	—	—	—	—	—	—	—	—
йодэозин	—	—	—	—	—	—	—	—	—
эозинкалий	—	—	—	—	—	—	—	—	—
бенгальская роза	—	—	—	—	—	—	—	—	—
янус зеленый	—	—	—	—	—	—	—	в	—
азурэозин	—	—	—	—	—	—	—	в	—
тионин	—	—	—	—	—	—	—	в	—
Цианиновые									
хинолиновый синий	—	—	—	—	—	—	—	+	—
хинолиновый желтый	—	—	—	—	+	—	—	—	—
Оксикетонные									
ализариновый красный	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ализариновый синий	—	—	—	—	—	—	—	в	—
гемаксиллин	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Индигоидные									
индигокармин	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечания. (+) — 80 и более % штаммов чувствительны к красителю; (—) — 20 и менее к красителю.

тались всеми перечисленными выше веществами, а также рядом других соединений, так что в целом на штаммы *X. maltophilia* действовало 10 красителей из 48 испытанных, на *P. pickettii* — 13, на *P. stutzeri* — 16, *P. alcaligenes* — 26. К числу красителей, угнетающих рост названных видов, относились тионин, малахитовый зеленый, азур-эозин, акридиновый оранжевый, основной фуксин, крезол- и метиленблау, сафранин и др. Завершал список типовой штамм *P. vesicularis*, высокочувствительный к подавляющему большинству испытанных соединений. Крайне чувствительными к



Таблица 16. Чувствительность бактерий рода *Pseudomonas* к антибиотикам и другим химиотерапевтическим веществам

Вид бактерий	Количество исследованных штаммов	Пенициллин	Ампициллин	Эритромицин	Олеандомицин	Линкомицин	Левомецетин	Тетрациклин	Стрептомицин	Неомицин	Мономицин	Гентамицин	Полимиксин	Фурадония	Невиграмон
<i>P. aeruginosa</i>	5	—	—	—	—	—	в	—	+	+	—	+	в	—	—
<i>P. aureofaciens</i>	5	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—
<i>P. fluorescens</i>	5	—	—	—	—	—	в	+	+	+	+	+	+	—	в
<i>P. putida</i>	5	—	+	—	—	—	в	в	+	+	+	+	+	—	—
<i>P. aurantiaca</i>	5	—	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	в
« <i>P. lemonnieri</i> »	5	—	в	в	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—
« <i>P. fluoro — violaceus</i> »	5	—	—	—	—	—	в	в	+	+	+	+	+	—	в
<i>P. syringae</i>	9	в	+	+	в	в	+	+	+	+	+	+	+	в	+
<i>P. cepacia</i>	5	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	+	—	—
<i>P. stutzeri</i>	2	—	+	+	—	—	+	+	+	+	+	в	+	—	+
<i>P. mendocina</i>	4	в	+	в	—	—	в	в	+	+	+	+	+	—	в
<i>P. alcaligenes</i>	3	—	+	в	в	—	в	+	+	+	+	+	+	в	—
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	5	—	+	—	—	—	+	+	в	+	+	+	+	—	+
<i>C. acidovorans</i>	5	—	—	—	—	—	+	в	+	в	—	—	—	—	+
<i>C. testosteroni</i>	5	—	в	в	—	—	+	+	+	+	в	+	в	—	+
<i>X. maltophilia</i>	5	—	—	в	—	—	+	—	+	+	+	+	в	—	+
<i>P. pickettii</i>	1	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—
<i>P. fragi</i>	1	—	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—
<i>P. taetrolens</i>	1	—	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+
	1	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+
	1	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—
	5	—	—	—	—	—	в	—	+	+	+	+	+	+	+

Примечания. (+) — 80 и более % штаммов чувствительны к антибиотику; (—) — 20 и менее % штаммов чувствительны к антибиотику; (в) — более 20 и менее 80 % штаммов чувствительны к антибиотику.

действовали лишь 2 антибиотика широкого спектра действия из 14 испытанных — левомецетин и гентамицин.

Антибиогаммы большинства видов рода *Pseudomonas* включали в первую очередь антибиотики-аминогликозиды: стрептомицин, неомицин, мономицин и гентамицин. Многие виды чувствительны к антибиотикам широкого спектра действия — левомецетину и тетрациклину, а также к полимиксину. Однако последний, а также антибиотик резерва — гентамицин — были неэффективны по отношению к *C. acidovorans*. Как упоминалось выше, этот вид оказался высокоустойчивым и к красителям.

С переходом от резистентных к чувствительным видам рода *Pseudomonas* в антибиогаммы последних включались ампициллин и невиграмон (угнетающие рост *P. aurantiaca*, *P. stutzeri* и др.), а на такие высокочувствительные виды, как *P. vesicularis*, действовали все испытанные антибиотические вещества вплоть до пенициллина.

Изучая действие красителей и антибиотических веществ на бактерии рода *Pseudomonas*, мы столкнулись с интересным явлением, заслуживающим, на наш взгляд, особого внимания. Ряд красителей обладал непостоянным антимикробным эффектом в разных опытах, то полностью задерживая рост бактерий, то не оказывая на те же штаммы заметного влияния. Поскольку при постановке этих экспериментов чашки со средой, содержащей красители, нередко находились в условиях различной освещенности, мы предположили, что непостоянство результатов связано с действием света на красители и так называемым фотодинамическим эффектом.

Для проверки этого предположения чашки со средой, куда были внесены 49 названных выше красителей, облучали лампой дневного света. Перед засевом чашки выдерживали в течение 1 ч при освещении 16—18 000 лк. Контролем служили необлученные чашки с теми же красителями.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ряд красителей приобретает под действием света способность угнетать рост бактерий рода *Pseudomonas*, в том числе таких высокоустойчивых к антимикробным агентам видов, как *P. aeruginosa* и *P. auriofaciens*. Это прежде всего арилметановые красители группы эозина — дихлорфлуоресцеин, йодэозин, эозинкалий, бенгальская роза, в обычных условиях антибиотически мало активные. Под влиянием облучения эти вещества приобретали способность тормозить рост многих флуоресцирующих бактерий — *P. serasia*, *P. mendocina* и др. (рис. 14, 15, см. на вклейке).

Значительный фотодинамический эффект мы наблюдали также у акридиновых красителей — риванола и акридинового оранжевого, сафранина, тионина, крезол-блау и гематоксилина.

Полученные данные дополняют таксономическую характеристику многих видов *Pseudomonas* и свидетельствуют о том, что чувствительность к тем или иным химиотерапевтическим веществам определяется их видовой принадлежностью. Этот критерий позволяет различать фенотипически сходные виды. Так, *S. testosteronei* значительно чувствительнее к красителям и антибиотикам, чем сходный с ним *S. acidovorans*. На первый действуют красители группы парафуксина, родамин, хинолиновый синий; в отношении второго перечисленные соединения не эффективны. Существенно различаются по чувствительности к антибиотическим веществам и красителям близкие виды *P. pseudoalcaligenes* и *P. alcaligenes*. Последний, по нашим данным, высокочувствителен к различным антимикробным агентам.

Наряду с заключением о чувствительности отдельных видов псевдомонад к определенным химиотерапевтическим веществам, полученные данные позволяют сделать вывод о высокой, низкой либо умеренной чувствительности того или иного вида бактерий рода *Pseudomonas* к антимикробным агентам в целом, что на наш взгляд, также может служить частью его таксономической характеристики.

Некоторые из изученных нами соединений могут быть использованы для селективного выделения отдельных видов или групп видов внутри рода *Pseudomonas*. К числу таких веществ относится препарат нитрофуранового ряда нитрофурантоин (фурадонин), эффективный в отношении грамположительных микроорганизмов и энтеробактерий, но не действующий на микроорганизмы флюоресцирующей группы. Поэтому мы широко пользовались нитрофурантоином в концентрации 100 мкг/мл в составе питательных сред при выделении флюоресцирующих видов из различных природных источников.

Представленные результаты свидетельствуют о невозможности создания на основе антибиотиков или красителей одной универсальной среды, пригодной для селективного выделения из природы всех без исключения видов рода *Pseudomonas*: слишком широк диапазон их чувствительности к этим антимикробным агентам. Среды, предложенные для этой цели и содержащие комбинации антибиотических веществ [207, 502], заведомо непригодны для выделения таких высокочувствительных микроорганизмов, как *P. syringae*, *P. stutzeri*, «*P. denitrificans*», *P. alcaligenes* и др., поскольку их рост, по нашим данным, ингибируется этими веществами.

В то же время обнаружение соединений (ЭДТА, соли бария), избирательно подавляющих различные виды *Pseudomonas*, независимо от их чувствительности к красителям и антибиотикам, свидетельствует о возможности создания универсальных сред и методов для селективного выделения микроорганизмов этой группы из природы и их быстрой дифференциации от других родов грамотрицательных бактерий.

**НУМЕРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
В СИСТЕМАТИКЕ  
БАКТЕРИЙ  
РОДА PSEUDOMONAS**

Бактерии рода *Pseudomonas* были одной из первых групп микроорганизмов, исследованных нумерическими методами. Целью нумерической таксономии, понятие которой введено в микробиологию Снитом [459, 460], является численное определение сходства между организмами и их классификация по степени этого сходства. Такие операции выполняются с помощью электронно-вычислительных счетных машин.

Нумерическая систематика основывается на возможно большем числе описываемых признаков, причем признаки рассматриваются как равноценные. Наряду с адансоновскими принципами (от имени французского ботаника Адансона — первого таксономиста, придававшего равный вес каждому признаку) были предложены и другие подходы к классификации, основанные на анализировании признаков, однако они не нашли всеобщего признания в систематике микроорганизмов.

Ранние попытки нумерической классификации бактерий рода *Pseudomonas* [147] касались выяснения взаимоотношений между псевдомонадами и другими граммотрицательными палочками прежде всего на родовом уровне. Так, было показано четкое различие между родами *Pseudomonas* и *Xanthomonas*, с одной стороны, и между *Aeromonas* и *Vibrio* — с другой, а также близость двух последних родов группе «*Coli-aerogenes*».

На 33 штаммах *P. aeruginosa* [317] были изучены границы варибельности этого вида и отобраны основные черты «гипотетического среднего организма», на основе которого авторами был предложен неотиповой штамм *P. aeruginosa*.

Развитие геносистематики и получение сведений о нуклеотидном составе ДНК бактерий позволило сопоставить эти данные с результатами нумерической классификации [146]. При группировке нумерическими методами 118 штаммов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Achromobacter*, *Vibrio* и *Flavobacterium*, исследованных по 150 признакам, были сформированы феноны, соответствовавшие родовой принадлежности (и нуклеотидному составу ДНК) изученных культур. При этом представители рода *Pseudomonas* образовали ряд подгрупп на уровне видов.

Глубокое исследование бактерий рода *Pseudomonas* с привлечением методов нумерического анализа было предпринято Лызенко [324]. Среди 46 исследованных им видов выявлено 18 видовых центров с множеством промежуточных форм между ними. Многие из них (*P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. chlorographis*, *P. putida*, *P. pseudomallei*, *P. diminuta*, *P. stutzeri*) вошли как самостоятельные виды в современные классификационные схемы и определители, а таксономическое положение других было впоследствии пересмотрено либо продолжает оставаться дискуссионным.

В 60-е годы были начаты исследования по использованию компьютеров для идентификации микроорганизмов. Эти работы, коснувшись, в частности, бактерий рода *Pseudomonas*, развивались в нескольких направлениях. Идентификацию проводили путем сравнения неидентифицированного штамма с другими, ранее сгруппированными при нумерической классификации в определенные таксоны [408], путем конструирования и использования диагностических ключей [231] и, наконец, применения вероятностных методов. В настоящее время использование вероятностных матриц для идентификации аэробных неферментирующих бактерий, принадлежащих к 66 таксонам, обеспечивает успех в 91,5 % случаях [239].

Начатые в 1966 г. исследования школы Стайниера знаменовали переломный этап в развитии систематики рода *Pseudomonas*. Как упоминалось выше, в ходе этих экспериментов несколько сот штаммов были изучены по 169 фенотипическим признакам. На первых этапах этих исследований распределение микроорганизмов по биотипам, видам, видовым комплексам строилось на субъективном анализе полученных данных, позже для обработки полученной обширной информации были привлечены методы нумерической таксономии [392, 396]. Степень сходства между организмами определялась путем расчета коэффициентов  $S_j$  (в этом случае учитывалось сходство штаммов только по положительным признакам) и  $S_{sm}$  (сходство как по положительным, так и по отрицательным свойствам). Расчеты по второму методу давали значительно более высокие (на 10—30 %) значения коэффициентов сходства. Результаты нумерических исследований сопоставляли с результатами гибридизации нуклеиновых кислот.

Сочетание генетических и математических методов исследования позволило сделать некоторые интересные выводы. Так, размещение на дендрограмме штаммов «*P. fluorescens*-комплекса» показало, что *P. mendocina* представляет собой связующее звено между видами *P. stutzeri* и *P. alcaligenes*. Это же было подтверждено данными генетического анализа.

Между отдельными видами *Pseudomonas* наблюдались достаточно высокие показатели фенотипического сходства при отсутствии филогенетического родства, однако в целом компьютерный анализ подтвердил классификацию рода, предложенную на основании фенотипических исследований и данных геносистематики.

Методы нумерического анализа были использованы и при группировке бактерий исключительно по характеру спектров их углеродного питания. 400 штаммов псевдомонад, у которых была изучена способность к усвоению более 150 различных источников углерода, распределялись по 29 фенонам, мало перекрывающим друг друга [463].

Баррет и соавт. [110] привлекли нумерические методы для изучения таксономической структуры биовара V (биотипа G) — одного из наиболее многочисленных и наименее изученных биоваров *P. fluorescens*. В результате проведенных исследований были предложены новые биовары (VI и C) для *P. fluorescens* и *P. putida* соответственно, а также отобраны признаки, позволяющие их идентифицировать.

Нумерические методы были использованы и при изучении фитопатогенных псевдомонад [433]. Последние были разбиты на пять групп на основании их физиологических особенностей и спектров углеродного питания. Авторы провели ревизию многочисленных флюоресцирующих фитопатогенных видов рода *Pseudomonas*, «укрупнив» их до двух видов — оксидазоположительного *P. cichorii* и оксидазоотрицательного *P. syringae*, сохранив старые видовые названия в качестве «патотипов» (патовары согласно 9-му изданию определителя Берги).

Подразделение штаммов *P. syringae* на патовары было подтверждено и другими нумерическими исследованиями: 80 штаммов этого вида, изученных по 215 признакам, образовали 3 фенона, соответствующие *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *morsprunorum* и *P. syringae* pv. *morsprunorum* paca 2 [426]. Группировка микроорганизмов с помощью ЭВМ оказалась весьма полезной при изучении бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из пищевых продуктов [446].

Джуфс [271] привела нумерическую классификацию 167 штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из сырого и пастеризованного молока. Бактерии были сгруппированы в 7 фенонов, соответствующих определенным видам. Многие из них были фенотипически гетерогенны. Так, у *P. aeruginosa* авторы наблюдали 10 различных фенотипов, у *X. maltophilia* — 3. Молин и Фернстрем [351] сгруппировали нумерическими методами 218 штаммов бактерий, выделенных из мяса. Среди 15 образованных групп крупнейшей была группа из 112 штаммов *P. fragi* — вида, преобладающего в микрофлоре охлажденных мясных продуктов. Остальные группы включали представителей различных биотипов *P. fluorescens* и *P. putida*, а также родов *Aeromonas* и *Alteromonas*.

Нумерические методы широко используются при описании новых видов и родов либо их ревизии. Примером могут служить таксономические исследования *P. paucimobilis* [238], *P. lundensis* [352], рода *Comamonas* [167].

При выделении микроорганизмов рода *Pseudomonas* из различных природных источников ряда почвенно-климатических зон СССР, их идентификации, исследовании таксономической струк-



туры отдельных видов рода нами неоднократно применялись методы нумерического анализа [39, 44, 45].

Для более точной диагностики бактерий, уточнения систематического положения не поддающихся идентификации культур, отбора диагностически ценных признаков нами была проведена нумерическая классификация 260 штаммов псевдомонад, выделенных в 1964—1974 гг. из различных природных источников, и 30 штаммов, полученных из разных коллекций, в том числе 16 типовых культур.

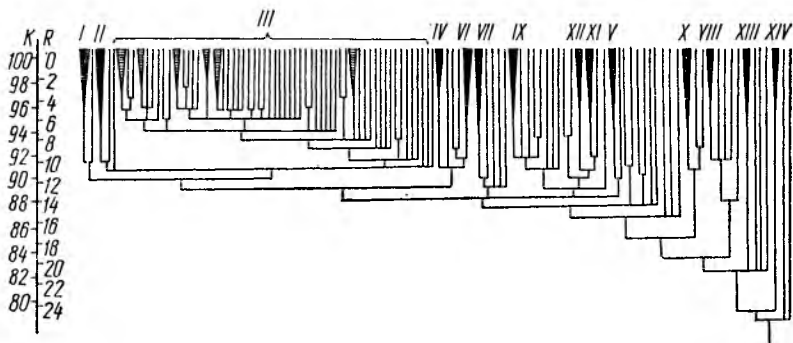


Рис. 16. Дендрограмма, полученная при нумерической классификации бактерий рода *Pseudomonas*:

I — *P. aeruginosa* (15 штаммов), II — *P. putida* (18 штаммов), III — *P. fluorescens* (106 штаммов), IV — *Pseudomonas* ps. A (6 штаммов), V — «*P. rathonis*» (6 штаммов), VI — *Pseudomonas* sp. B (7 штаммов), VII — *Pseudomonas* sp. C (6 штаммов), VIII — *P. syringae* (3 штамма), IX — *P. pseudoalcaligenes* (19 штаммов), X — *X. maltophilia* (33 штамма), XI — *C. acidovorans* (9 штаммов), XII — *C. testosteroni* (5 штаммов), XIII — *P. mendocina* (3 штамма), XIV — *P. ceracia* (3 штамма), K — процент сходства, R — число отличий между штаммами

Для нумерических исследований было отобрано 120 фенотипических признаков бактерий. Группировку штаммов по степени сходства проводили методом односвязевого анализа по Сокалу и Сниту [460] на ЭВМ М-222. Программы, реализующие алгоритмы классификации, составлены А. В. Паничевым [68]. Диагностически ценные признаки отбирали методом редукции матрицы [378]. Полученные данные использовались для построения дендрограммы, матрицы сходства, схемы распределения штаммов по группам (фенонам) с указанием наименьших расстояний (отличий) между ними, а также выявления центральных (наиболее типичных по свойствам) штаммов каждой группы.

Результаты нумерической классификации бактерий представлены на дендрограмме (рис. 16). Наряду с дендрограммой в работе приведена более наглядная и информативная схема распределения бактерий по группам с указанием наиболее близких связей между ними и средних межгрупповых расстояний (рис. 17).

Анализ дендрограммы позволяет выделить на уровне сходства 92,5% (а в ряде случаев и выше) 14 групп (фенонов). Это распределение в основном согласуется с результатами проведенной нами предварительной идентификации бактерий. Соответствует оно

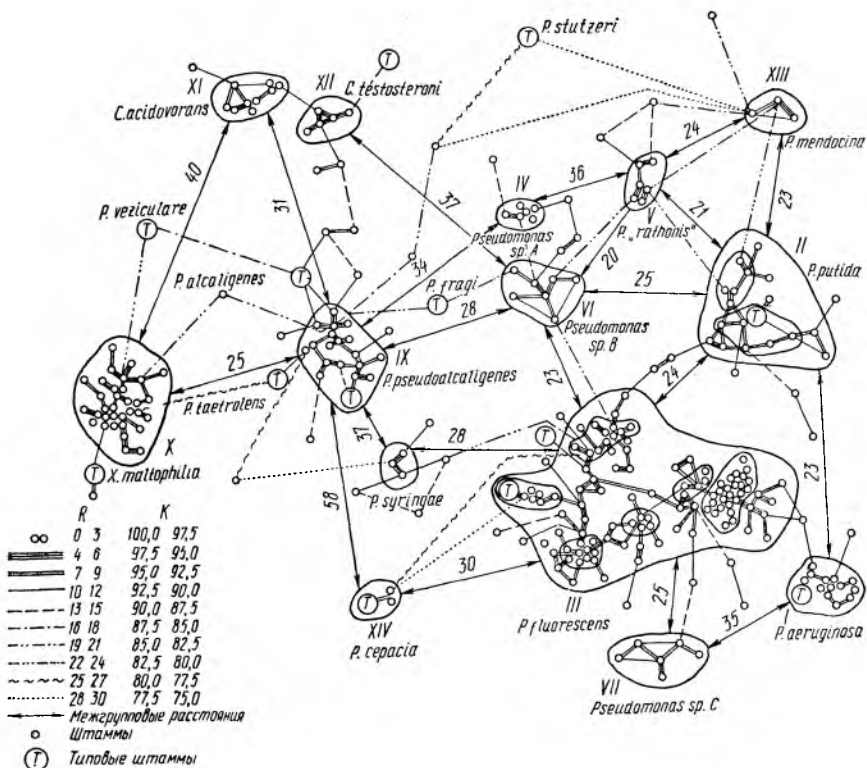


Рис. 17. Схема общей группировки бактерий рода *Pseudomonas* методами численной классификации

и современной классификации рода *Pseudomonas*; большинство фенонов эквивалентны широко распространенным в природе видам, содержат типовые культуры и коллекционные штаммы той же видовой принадлежности. Характеристики многих из них находятся в хорошем соответствии с литературными данными.

Образованные в результате численной классификации и обозначенные нами ранее как *Pseudomonas species* четыре группы бактерий не поддавались идентификации на основании существующих определителей, хотя, по-видимому, также соответствуют рангу вида.

Значительное число штаммов оказалось за пределами названных 14 групп, примыкая к ним и являясь промежуточными формами между ними. (Термином «примыкающие» мы обозначили штаммы, сходные с тем или иным феноном по своим биологическим свойствам, но присоединяющиеся к нему на уровне сходства менее 92,5 %). Такие штаммы имелись почти у всех фенонов (см. рис. 16). 10 штаммов обладали свойствами двух групп бактерий одновременно, являясь, таким образом, промежуточными формами между ними. Промежуточные формы были нами обна-

ружены в основном между видами флюоресцирующей группы, а также между фенонами V и IX («*P. rathonis*» и *P. pseudoalcaligenes*). Средние межгрупповые расстояния колебались от 9—10 между фенотипическими близкими группами (например, 9,05 между *P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes*) до 30 и выше между группами далекими (*P. syringae* — *P. ceracia* — 39, 11; *C. acidovorans* — *P. mendocina* 34, 17 и т. п.).

Один из наиболее однородных по свойствам фенонов (I) составляют штаммы *P. aeruginosa*. Степень внутригруппового сходства между ними не менее 95,8 % (отличие — 5 признаков). Центральное положение в группе занимает типовой штамм. Свойства штаммов хорошо согласуются с их видовым описанием.

Среди 18 штаммов *P. putida* (фенон II) типовой штамм также занимает центральное положение. Однако эта группа значительно гетерогеннее по свойствам, чем *P. aeruginosa*. Нумерические методы выявляют внутри *P. putida* две фенотипически отличные подгруппы. Свойства штаммов, образующих названные подгруппы, и проблемы их таксономии будут рассмотрены более подробно в разделах настоящей работы, касающихся *P. putida*.

Наиболее многочисленным и сложным по структуре оказался фенон III, объединяющий 106 штаммов разжижающих желатин флюоресцирующих сапрофитных бактерий рода *Pseudomonas*. Как видно из рис. 17, в состав этого фенона включены при нумерической классификации шесть высокооднородных по свойствам подгрупп штаммов, идентифицированных ранее как *P. aureofaciens*, *P. aurantiaca*, «*P. lemonnierii*», некоторые биовары *P. fluorescens*. Более подробно вопросы классификации этих микроорганизмов рассмотрены в следующих главах при анализе таксономической структуры разжижающих желатин видов флюоресцирующей группы.

Фенон IV (*Pseudomonas species A*) образован шестью нефлюоресцирующими оксидазоположительными левансинтезирующими штаммами бактерий рода *Pseudomonas*, выделенными нами из почв субтропиков, не поддающимися идентификации согласно существующим определителям и, по-видимому, представляющими собой самостоятельный вид. Центральным штаммом группы — *Pseudomonas* sp. ИМВ 3187.

Фенон V («*P. rathonis*») образован шестью выделенными из почвы беспигментными штаммами. Это монотрихи, растущие при 42 °С, слабо усваивающие углеводы и полиспирты, ассимилирующие низшие спирты и фенол. Не поддаются идентификации согласно 9-му изданию определителя Берги. Свойства исследованных штаммов (табл. 17) укладываются в крайне фрагментарную характеристику «*P. rathonis*» [124], в связи с чем мы дали штаммам фенона V это видовое название. Центральным штаммом группы — «*P. rathonis*» ИМВ 2987.

Фенон VI (*Pseudomonas* sp. B) образован семью штаммами, выделенными из почвы торфяников и ризосферы различных растений. Это монотрихи, образующие включения поли-β-оксимасляной

Т а б л и ц а 17. Признаки, ценные для дифференциации 14 групп бактерий рода *Pseudomonas*

Признак	Номер групп (фенонов) и их видовой состав													
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XIII	XIV	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. A	« <i>P. rathonis</i> »	<i>Pseudomonas</i> sp. B	<i>Pseudomonas</i> sp. C	<i>P. syringae</i>	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	<i>X. maltophilia</i>	<i>C. acidovorans</i>	<i>C. testosteroni</i>	<i>P. mendocina</i>	<i>P. cepacia</i>
Наличие одного жгутика	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Жгутиков более одного	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Включения поли-β-оксимасляной кислоты	-	-	-	-	-	+	в	-	+	-	+	+	-	+
Зеленый флюоресцирующий пигмент	+	+	+	-	-	-	-	в	-	-	-	-	-	-
Пиоцианин	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Желтый пигмент каротиноид	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Желтый пигмент феназин-1-карбоновая кислота	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Окисление глюконата	+	+	в	-	в	-	+	-	-	-	-	-	-	в
Денитрификация	+	-	в	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	в
Рост при 42 °С	+	-	-	-	+	-	-	-	в	-	-	-	+	-
Оксидаза	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	в
Аргининдигидролаза	+	+	+	+	в	+	+	-	+	-	-	+	+	+
Лизиндекарбоксиллаза	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
Левансахараза	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Гидролиз желатина	+	-	+	в	-	-	+	+	-	+	-	в	-	в
Гидролиз эскулина	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Усвоение минеральных форм азота	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Устойчивость к нитрофурантону	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Усвоение в качестве источника углерода														
глюкозы	+	+	+	+	+	+	+	+	в	+	-	-	+	+
арабинозы	-	в	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
маннозы	-	в	+	+	-	+	+	-	-	в	-	-	-	+
трегалозы	в	-	+	+	-	+	+	-	-	в	-	-	-	в
целлобиозы	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Признак	Номер групп (фенонов) и их видовой состав													
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. A	« <i>P. rathoni</i> »	<i>Pseudomonas</i> sp. B	<i>Pseudomonas</i> sp. C	<i>P. syringae</i>	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	<i>X. maltophilia</i>	<i>C. acidovorans</i>	<i>C. testosteroni</i>	<i>P. mendocina</i>	<i>P. cepacia</i>
глюконо- вой кисло- ты	+	+	+	+	+	+	+	в	-	-	+	+	+	+
салици- на	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
каприловой кислоты	+	+	+	-	+	в	+	+	-	-	-	-	+	+
малеиновой кислоты	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
адипиновой кислоты	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
пимелино- вой кисло- ты	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
гликолевой кислоты	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	в
итаконной кислоты	+	-	в	+	-	-	+	-	в	-	+	+	+	-
сорбита	-	в	в	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
инозита	+	в	+	+	-	-	+	+	-	-	-	в	-	+
бутанола	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	в	+	+
бензоата	+	+	в	-	-	-	+	+	-	-	+	в	в	+
<i>m</i> -оксибен- зойной кислоты	-	в	-	-	-	-	-	-	-	-	+	в	-	+
<i>p</i> -оксибен- зойной кис- лоты	+	+	+	-	в	в	-	+	-	-	+	+	-	+
фенилук- сусной кис- лоты	-	+	-	-	в	-	-	-	-	-	-	-	-	+
фенола	-	в	-	-	+	в	в	-	-	-	в	-	-	-
хинной кислоты	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	в	+	+
глицина	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
$\beta$ -аланина	+	+	+	+	+	в	+	+	в	-	+	+	+	+
лейцина	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
валина	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
аргинина	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	в	в
бетаина	+	+	+	+	+	+	+	+	в	-	-	-	+	+
саркозина	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
гиппуровой кислоты	в	+	-	-	+	в	-	-	-	-	в	+	-	+
ацетамида	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	в
фолиевой кислоты	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Примечание. Здесь и в следующих таблицах (+) — наличие признака; (-) — отсутствие признака более чем у 80 % исследованных штаммов; (в) — наличие или отсутствие признака более чем у 20 % и менее чем у 80 % штаммов.

кислоты, оксидазоположительны, анаэробно расщепляют аргинин, желатин не разжижают, к денитрификации не способны, к нитрофурантоину чувствительны. Свойства штаммов не укладываются в характеристики, приведенные в существующих определителях (см. табл. 17). Центральный штамм группы — *Pseudomonas* sp. ИМВ 2806.

Еще одна группа штаммов, не поддающихся идентификации, — фенон VII (*Pseudomonas* sp. С.) Объединяет штаммы, выделенные из ризосферы, почв, полей орошения, минеральных источников. Бактерии представляют собой лофотрихи, содержащие аргининдигидролазу и лизиндекарбоксилазу, восстанавливающие нитраты до свободного азота. Часть штаммов образует включения поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты. Перечисленные признаки сближают их с фитопатогенным видом *P. saurophylli*, однако они существенно отличаются от него по спектрам углеродного питания (см. табл. 17) и ряду других свойств. Центральный штамм группы — *Pseudomonas* sp. С ИМВ 2773.

Фенон VIII (*P. syringae*) состоит из трех штаммов флюоресцирующих фитопатогенных бактерий, полученных под видовым названием *P. holci*. Еще пять штаммов («*P. pisi*», «*P. lupini*», «*P. maculicola*», «*P. vignae*», «*P. lachrymans*») присоединяются к группе на различных уровнях сходства. Все эти видовые названия — синонимы фитопатогенного вида *P. syringae*.

В состав фенона IX (*P. pseudoalcaligenes*), охватывающего 19 культур, в том числе типовой штамм, при нумерической классификации были включены наряду со штаммами, не ассимилирующими глюкозу, четыре культуры псевдомонад, способные к усвоению этого углевода и кислотообразованию на среде Хью и Ливсона с глюкозой. Непостоянство этого признака у *P. pseudoalcaligenes* отмечали и другие авторы [191]. Сравнительно небольшое расстояние (9,05) отделяет этот фенон от типового штамма.

Фенотипически далек от других групп и не связан с ними промежуточными формами фенон X (*X. maltophilia*), объединяющий 33 штамма бактерий. Уровень сходства внутри группы высок (94,1 % и выше). Типовой штамм *X. maltophilia* примыкает к фенону на уровне 90,8 % сходства.

Весьма близкими оказались в наших опытах *S. acidovorans* (фенон XI) и *S. testosteroni* (фенон XII). Типовой штамм *S. testosteroni* существенно (на 15 признаков) отличался от других исследованных нами культур этого вида. Феноны XIII (*P. mendocina*) и XIV (*P. seracia*) относительно немногочисленны, а свойства составляющих их штаммов в основном соответствуют видовым описаниям.

Особое место занимали типовые культуры бактерий рода *Pseudomonas*, не вошедшие в состав каких-либо фенонов. Это уже упомянутые нами *P. alcaligenes*, а также штамм *P. fragi*, фенотипически близкий *P. pseudoalcaligenes* (отличие — 12 признаков). Меньшую степень сходства с *P. pseudoalcaligenes* проявляет

*P. taetrolens*; совершенно обособленные положение занимают «*P. denitrificans*», *P. glathei*, *P. mesophilica* и *P. vezicularis*.

В исследованиях по нумерической классификации были использованы два коллекционных штамма *P. stutzeri* (один из них типовой). Различия между ними весьма значительны (26 признаков). Существенно отличался от них штамм ИМВ 1979, полученный нами как «*P. caudatus*» и впоследствии также идентифицированный как *P. stutzeri*.

Используя метод редукции матрицы для диагностики 14 описанных выше фенонов, мы отобрали 50 признаков (см. табл. 17), присущих не только определенным фенонам, но и примыкающим к ним штаммам. Так, типовые штаммы *P. fluorescens* и *X. maltophilia* обладали всеми отобранными видоспецифическими свойствами, хотя по сумме отличий они находились за пределами фенонов. Таким образом, различия были обусловлены несущественными для идентификации признаками.

Изложенные данные свидетельствуют о том, что виды *P. aeruginosa*, *X. maltophilia*, *C. acidovorans*, *C. testosteroni* и *P. mendocina* однородны по свойствам, таксономически обособлены, достаточно легко диагностируются. Результаты их нумерической классификации подтверждают представление о том, что «в природе существуют плотные группировки микроорганизмов, отражающие традиционные виды и связанные немногочисленными промежуточными формами» [460]. Значительно сложнее таксономическая структура *P. fluorescens* и *P. putida*, для анализа которой необходимы наряду с нумерическими генетические и другие методы исследований.

Нумерические методы позволили уточнить систематическое положение некоторых ранее не поддававшихся идентификации штаммов бактерий рода *Pseudomonas*. В ходе нумерической классификации были выделены новые фенотипически обособленные группы штаммов, соответствующие рангу вида и нуждающиеся в дальнейшем изучении, например «*P. rathoris*», *Pseudomonas* ср. А, В, С и др. Наконец, с помощью нумерических методов были отобраны диагностически ценные признаки, позволяющие дифференцировать важнейшие виды рода *Pseudomonas* (см. табл. 17).

В дальнейшем нумерические методы были использованы нами при анализе таксономической структуры *P. fluorescens* и *P. putida*, *P. aurantiaca*, *P. taetrolens*, *P. fragi*. Результаты этих исследований приведены в соответствующих разделах настоящей монографии.

В последние годы ЭВМ с успехом используются повсюду, где необходим анализ большого объема информации (часто непосильный для исследователя). Они обязательны не только при группировке бактерий по большому числу фенотипических признаков, но и при анализе разнообразных биохимических данных: результатов секвенирования олигонуклеотидов 16S РНК, состава и последовательности аминокислот в цитохромах и других белках, результатов электрофореза бактериальных белков, данных масс-спектро-

скопии интактных клеток бактерий [406] и т. д. Можно без преувеличения сказать, что без использования ЭВМ современная биохимическая систематика микроорганизмов немыслима. В то же время успех нумерических исследований в большой мере зависит от содержания информации, поступающей на ЭВМ, и методического уровня, на котором она получена, а интерпретация полученных результатов в известной степени определяется опытом и взглядами исследователя. Об этом убедительно свидетельствуют приведенные выше литературные данные: вклад нумерической таксономии в изучение бактерий рода *Pseudomonas* на протяжении двух последних десятилетий находился в прямой зависимости от общего уровня исследований в области систематики этой группы микроорганизмов.



## ГЛАВА 8

### АНТИБИОТИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА, ОБРАЗУЕМЫЕ БАКТЕРИЯМИ РОДА PSEUDOMONAS

Бактерии рода *Pseudomonas*, несмотря на свою высокую биологическую активность и широкое распространение в природе, сравнительно слабо изучены как продуценты антибиотических веществ, а таксономическая ценность этого признака вообще не исследована. Отдельные, наиболее изученные виды рода представляют собой настоящие «фабрики антибиотиков». Так, из *P. aeruginosa* выделено более 30, из *P. fluorescens* — более 20 различных антибиотических веществ [1, 82, 93].

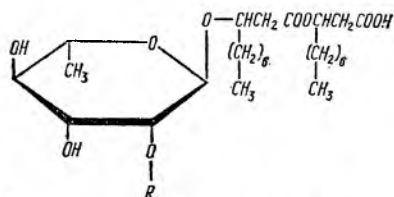
Среди нефлюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas* антибиотическая активность изучена у немногих видов, и описаны буквально единичные продуценты антибиотиков. В целом способность к синтезу антибиотиков установлена не более чем у 20 видов псевдомонад из свыше 200 описанных в литературе. Эти 20 видов синтезируют крайне разнообразные по структуре антибиотические вещества. Строение большинства из них установлено и подтверждено встречаемым синтезом. Накопленные в этой области данные кратко рассмотрим, исходя из классификации антибиотиков, основанной на их химическом строении, и остановимся несколько подробнее на антибиотических веществах, выделенных нами из бактерий рода *Pseudomonas*.

#### АНТИБИОТИКИ АЦИКЛИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ

Способность к синтезу ациклических антибиотиков широко распространена у бактерий рода *Pseudomonas*. К их числу относится прежде всего антифунгин, выделенный Я. П. Худяковым и соавт. [92] из культуральной жидкости «*P. putrefactans*». Антифунгин-сырец активен по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям в концентрации 10 мкг/мл. Он действует на возбудителя вилта хлопчатника *Verticillium dahliae*, в связи с чем высказывалось мнение о перспективности его применения в борьбе с грибными заболеваниями растений. В дальнейшем было показано [72], что антифунгин представляет собой комплексный препарат, содержащий смесь уксусной, пропионовой, масляной, валериановой, капроновой и салициловой кислот. Наиболее активный компонент смеси — *n*-капроновая кислота — угнетала рост *Verticillium dahliae* в разведении 1 : 40 960.

Ряд антибиотических веществ, содержащих жирные кислоты, выделен из культуральной жидкости *P. aeruginosa* [117]. Это рам-

нолипидполиповая кислота, состоящая из одного остатка рамнозы и двух остатков 1-β-оксидекановой кислоты и активная в отношении *Mycobacterium tuberculosis* в концентрации 30 мкг/мл.



Рамнолипиды (*P. aeruginosa*)

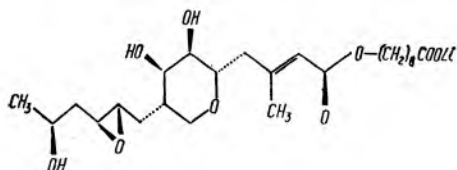
Менее активен другой рамнолипид из *P. aeruginosa*, содержащий две молекулы рамнозы. При выращивании на средах с *n*-алканами штаммы синегнойной палочки синтезируют два вида гликолипидов, угнетающих *in vitro* грамположительные бактерии, микоплазмы и некоторые вирусы [258].

Рамнолипиды синегнойных бактерий не нашли применения в качестве антибиотических веществ, однако оказались весьма ценными для практики поверхностно-активными соединениями. Растущий интерес к поверхностно-активным синтезируемым микроорганизмами веществам связан со способностью этих соединений эмульгировать, разделять фазы, уменьшать вязкость нефти [398], отсюда — возможности их применения в сельском хозяйстве, текстильной и пищевой промышленности, вторичной добыче нефти. Рамнолипиды играют важную роль при росте *P. aeruginosa* на избытке углеводов [233].

В настоящее время разработаны методы получения рамнолипидов на жидких питательных средах с помощью глубинного культивирования *P. aeruginosa* [416]. Несомненно, представляет интерес и поиск новых продуцентов поверхностно-активных соединений, и по-видимому, вести его следует в нефтеносных почвах и других экологических нишах, где синтез этих вторичных метаболитов дает бактериям селективные преимущества.

Антибиотик, названный бонгкрековой кислотой, был выделен Вап Вином и Мертенсом [498] на Яве при массовых отравлениях туземным пищевым продуктом «бонгкрек». Продукт изготавливается из кокосового ореха с помощью гриба *Rhizopus oryzae*, однако, как показали авторы, к пищевым отравлениям вело инфицирование «бонгкрека» микроорганизмом *Pseudomonas cocovenenans*. Этот продуцент образует несколько антибиотических веществ, два из них высокотоксичны, в том числе токсофлавин — гетероциклический антибиотик, на свойствах которого мы остановимся ниже, ненасыщенная разветвленная бонгкрековая кислота общей формулы  $C_{28}H_{38}O_7$  [323]. В основе токсического действия бонгкрековой кислоты на животные клетки лежит угнетение обмена адениновых нуклеотидов в митохондриях. Антибиотик обладает значительной фунгицидной активностью, угнетает как рост многих микроскопических грибов, так и прорастание спор [473].

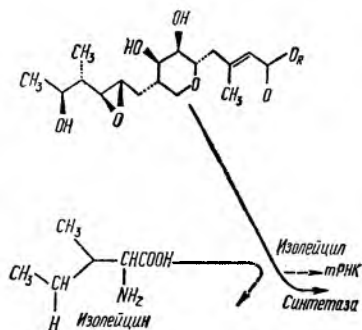
Из штамма *P. fluorescens* NCIB 10586 Фуллером и соавт. [185] получен активный антибиотик общей формулы  $C_{26}H_{44}O_9$ , названный псевдомоносовой кислотой. По химическому строению псевдомоносовая кислота не имеет сходства с другими антибиотическими веществами, применяемыми в клинике. Ее основной антибиотически активный компонент — псевдомоносовая кислота А — состоит из 9-оксинонановой кислоты, гидроксил которой присоединен к остальной части молекулы —  $C_{17}$ -фрагменту (моновой кислоте) [138] через  $\alpha$ ,  $\beta$ -ненасыщенную эфирную связь.



Мупируцин — литиевая соль псевдомоносовой кислоты

Минорными компонентами этого семейства структурно родственных антибиотиков являются псевдомоносовые кислоты В и С [137, 144]. Осуществлен химический синтез псевдомоносовой кислоты из рибозы [441]. Тем не менее получение препарата для медицинской практики осуществляется глубинным выращиванием *P. fluorescens*. С помощью мутагенеза селекционирован активный штамм *P. fluorescens* и изучены пути биосинтеза оригинальной, ранее не выделенной из природы жирнокислотной части антибиотика [176]. Впоследствии псевдомоносовая кислота получила название мупиросина. Под этим названием антибиотик включен в Британскую фармакопею и принят Всемирной организацией здравоохранения.

Имея структурные группировки, сходные с изолейцином, мупируцин обратимо связывается с изолейцил-тРНК-синтетазой, препятствуя включению изолейцина в белок и блокируя таким образом белковый синтез [246].



Механизм действия мупиросина [135]

Спектр антимикробной активности мупиросина *in vitro* включает прежде всего стафилококки и стрептококки, в том числе штаммы, множественно устойчивые к антибиотикам [135]:

Тест-микрорганнизм	Минимальная концентрация, ингибирующая рост, мкг/мл
<i>Staphylococcus aureus</i> Oxford	0,5
<i>S. aureus</i> Paler	0,125
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,25
<i>Streptococcus C</i> (equi)	125,0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,25
<i>Neisseria catarrhalis</i>	1,25
<i>Bacillus subtilis</i>	0,25
<i>B. alcaligenes</i>	25,0
<i>Vibrio cholerae</i>	1,25
<i>Escherichia coli</i>	12,5
<i>Corynebacterium diphteriae mitis</i>	>500,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	125,0
<i>Pseudomonas pyocyanea</i>	>500,0
<i>Proteus vulgaris</i>	500,0
<i>Salmonella typhi</i>	250,0
<i>Shigella Flexneri</i>	250,0
<i>Candida albicans</i>	>500,0

Их рост, как правило, подавляется мупироцином в концентрации 0,015—0,03 мкг/мл, редких штаммов — в дозе 2 мкг/мл. Выше приведен спектр антимикробного действия мупироцина [528]. В близких к минимальным ингибирующим рост концентрациях антибиотик оказывает бактериостатическое действие, в более высоких — бактерицидное. Активность мупироцина возрастает со снижением рН, что существенно для его местного применения, поскольку рН кожи — 5,5 [135]. Большинство грамотрицательных бактерий устойчиво к мупироцину, исключая *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoea* и *Bordetella pertussis* (минимальная ингибирующая концентрация 0,25 мкг/мл). Антибиотик связывается кровью, сывороткой, гноем, а при введении непосредственно в кровяное русло он быстро разрушается неспецифическими эстеразами и, следовательно, не может использоваться для системного применения. Вместе с тем он оказался высокоэффективным лечебным средством при первичных и вторичных кожных инфекциях и дал прекрасные результаты при санации носоглотки в борьбе с носительством метициллинустойчивых стафилококков, вызывающих вспышки госпитальной инфекции [135, 503]. Лекарственная форма мупироцина, представляющая собой 2%-й раствор литиевой соли антибиотика в полиэтиленгликоле, под названием «Бактробан» применяется в клинической практике. Этот малотоксичный и высокоэффективный препарат для местного применения не дает перекрестной устойчивости к используемым в клинике антибиотикам; устойчивость к мупироцину развивается слабо и не достигает высоких уровней.

Антибиотиком алифатической природы, содержащим в своей молекуле жирнокислотные фрагменты, является и АЛ-87, выделенный нами из бактерий рода *Pseudomonas* [36]. Продукент

антибиотика при нумерической классификации был отнесен к самостоятельной группе микроорганизмов (*Pseudomonas species A*), по-видимому, представляющих собой новый вид. Отличительной особенностью этих бактерий было образование, особенно на средах, содержащих глюкозу, желто-бурого, диффундирующего в среду пигмента. При этом колонии продуцента также окрашивались в желто-бурый цвет, более темный, чем среда.

Как показали исследования, высокая антагонистическая активность продуцента обусловлена его пигментным комплексом, а также неокрашенными антибиотическими веществами, выделяемыми в среду одновременно с пигментом. Все эти продукты экстрагировались хлороформом. Активность неочищенного суммарного хлороформенного экстракта в отношении *Staphylococcus aureus* 209 составляла 1 мкг/мл.

Фракционирование хлороформенного экстракта на отдельные компоненты осуществляли в тонком слое на кремниевой кислоте в системе хлороформ — метанол в отношении 90 : 5. Хроматограммы проявляли 5%-м спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты с последующим прогреванием при 120 °С. Тонкослойная хроматография показала наличие в составе антибиотика-сырца пяти фракций, три из которых давали темно-синее окрашивание с фосфорно-молибденовой кислотой. Ниже мы приводим некоторые физико-химические характеристики и данные о биологической активности компонентов полученного препарата.

I ф р а к ц и я. Соломенно-желтое кристаллическое вещество с  $R_f$  0,8, содержание в препарате 70—80 %. Содержание азота 12,5 %;  $\lambda_{\max}^{EtOH}$  = 250 и 365 нм, температура плавления 238 °С. На основании этих данных вещество идентифицировано как феназин-1-карбоновая кислота.

II ф р а к ц и я. Аморфный порошок вишнево-красного цвета с  $R_f$  0,5 (хлороформ — метанол 90 : 5), растворимый в хлороформе, спирте, ацетоне.  $\lambda_{\max}^{EtOH}$  = 205, 238 и 420 нм, содержание в препарате 1 %. Это вещество не обладало антибиотической активностью, не содержало серы, проба на азот была положительной.

III ф р а к ц и я, содержащаяся в препарате в количестве до 10 %, представляла собой смолообразное вещество, была высокоактивна и многокомпонентна, хорошо растворима в органических кислотах и щелочах. Ее активность в отношении *S. aureus* 209 составляла 0,01—0,005 мкг/мл.

Описанный выше комплекс антибиотиков имелся у всех исследованных штаммов *Pseudomonas species A*, хотя содержание его было различным.

Разделение фракции III повторной хроматографией показало, что ответственным за ее антимикробную активность является вещество с  $R_f$  0,2. Это соединение, названное нами антибиотиком АЛ-87, не содержит серы, дает положительную пробу на азот; его  $\lambda_{\max}^{EtOH}$  = 205 и 229 нм. Обращает на себя внимание крайняя избирательность препарата в отношении стафилококков и своеобразия

Т а б л и ц а 18. Спектр антимикробного действия антибиотика АЛ-87 из *Pseudomonas species*

Тест-микроорганизм	Доза, мкг/мл	
	бактериостатическая	бактерицидная
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	0,01	0,01
<i>Micrococcus roseus</i>	100,0	Не исследовали
<i>M. luteus</i>	100,0	—
<i>Sarcina species</i>	100,0	—
<i>Bacillus cereus</i>	100,0	100,0
<i>B. mycoides</i>	20,0	50,0
<i>Mycobacterium B<sub>5</sub></i>	—	—
<i>Corynebacterium michiganense</i>	50,0	Не исследовали
<i>Escherichia coli</i>	20,0	100,0
<i>Erwinia aroidea</i>	10,0	5,0
<i>Proteus vulgaris</i>	10,0	100,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—
<i>P. tabacum</i>	10,0	20,0
<i>Xanthomonas malvacearum</i>	50,0	Не исследовали
<i>X. vesicatoria</i>	—	—
<i>Candida albicans</i>	—	—
<i>Microsporium lanosum</i>	—	—
<i>Trichophyton gypseum</i>	—	—

П р и м е ч а н и е. (—) — вещество в концентрации до 200 мкг/мл не действует на тест-микроорганизм.

спектра его антимикробного действия: антибиотик АЛ-87 не влияет или оказывает слабое угнетающее действие на другие грамположительные микроорганизмы, не тормозит рост патогенных грибов и дрожжей рода *Candida* и проявляет различную степень активности в отношении энтеробактерий (10—50 мкг/мл) (табл. 18). Таким образом, это вещество обладает уникальным антимикробным спектром: его характеризует избирательная активность в отношении стафилококков при почти полном отсутствии угнетения другой грамположительной микрофлоры. В этом его принципиальное отличие как от антибиотиков, угнетающих только грамположительные бактерии, так и от препаратов широкого спектра действия.

Полирезистентные к антибиотикам клинические штаммы стафилококков, полученные нами из онкологических отделений и хирургических клиник, были чувствительны к антибиотику АЛ-87 уже в концентрации 0,01 мкг/мл. Его активность в отношении клинических штаммов протей составляла 20—50 мкг/мл и превышала таковую нитрофурантоина, используемого в хирургии в качестве местного средства для борьбы с инфекциями, вызванными протеем.

Антибиотик АЛ-87 малотоксичен: белые мыши переносили при однократном подкожном введении до 15 мг препарата, т. е. 750 мг на 1 кг живой массы.

Результаты изучения химических свойств и биологической активности этого соединения свидетельствуют о том, что это новый не описанный ранее антибиотик с уникальным спектром антимикробного действия, что позволило предположить и своеобразие механизма его влияния на микробную клетку.

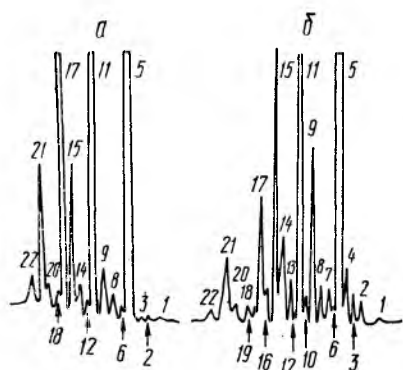


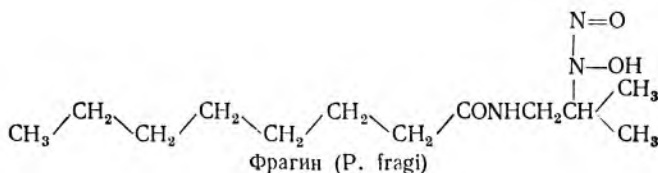
Рис. 18. Действие антибиотика АЛ-87 на жирнокислотный состав клеток *Staphylococcus aureus* 209:

а — среда без антибиотика, б — в присутствии 0,02 мкг/мл антибиотика; 1—3 — неидентифицированные жирные кислоты, 4 — C<sub>13</sub> p. н., 5 — C<sub>15</sub> p., 6 — C<sub>15</sub>:0, 7 — C<sub>16</sub> p. н., 8 — C<sub>16</sub> p., 9 — C<sub>16</sub>:0, 10 — C<sub>17</sub> p. н., 11 — C<sub>17</sub> p., 12 — C<sub>17</sub>:0, 13 — C<sub>18</sub> p. н., 14 — C<sub>18</sub> p., 15 — C<sub>18</sub>:0, 16 — C<sub>19</sub> p. н., 17 — C<sub>19</sub> p., 18 — C<sub>19</sub>:0, 19 — C<sub>20</sub> p. н., 20 — C<sub>20</sub> p., 21 — C<sub>20</sub>:0, 22 — неидентифицированная жирная кислота (н. — ненасыщенная, p. — разветвленная)

в-лененных жирных кислот, приводящие, согласно современным представлениям, к повышению текучести и проницаемости мембраны [84] (рис. 18). Действие антибиотика на микроорганизмы других таксономических групп *Escherichia coli* и *Micrococcus luteus*, различающихся как качественно, так и количественно по жирнокислотному составу, было сходно с действием на стафилококки и выражалось в изменении жирнокислотного состава липидов в сторону их ненасыщенности.

В наблюдаемых изменениях мембраны участвовали жирные кислоты нейтральных липидов и фосфолипидов стафилококка. Повышение мембранной проницаемости было подтверждено повышенным выходом в среду ряда аминокислот под влиянием суббактериостатических концентраций антибиотика АЛ-87.

К ациклическим азотсодержащим антибиотически активным соединениям относится фрагин — антибиотик, полученный японскими авторами из *P. fragi* и представляющий собой N-2N-нитрозогидроксил-амино-3-метил-бутил (каприламид) [366, 367].

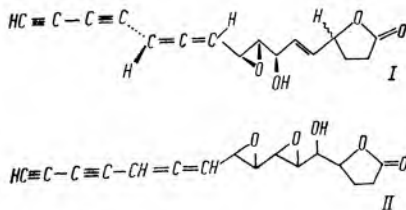


Установлено, что антибиотик АЛ-87 вызывает у чувствительного штамма *S. aureus* 209 значительное утолщение клеточной стенки и нарушение регуляции процессов деления [84]. Синтез белка и нуклеиновых кислот, повидимому, не является основной мишенью действия антибиотика, поскольку его суббактериостатические концентрации не оказывают существенного влияния на включение меченых предшественников (<sup>3</sup>H-лейцина, <sup>3</sup>H-уридина, <sup>3</sup>H-тимидина) в белок и нуклеиновые кислоты *S. aureus* 209 [82].

В то же время антибиотик АЛ-87 вызывал существенные изменения жирнокислотного состава чувствительного к нему штамма *S. aureus* 209: укорочение длины цепи, повышение ненасыщенности, в том числе за счет появления ненасыщенных развет-

Уникальная N-нитрозогидроксиламиногруппа фрагина обеспечивает его антимикробные, противоопухолевые и антивирусные свойства. Антибиотик действует на *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Penicillium chrysogenum*, *Saccharomyces cerevisiae* в концентрации 100 мкг/мл, угнетает *in vitro* клетки саркомы Йошида и размножение некоторых вирусов, проявляет цитотоксическое действие в отношении проростков салата и капусты.

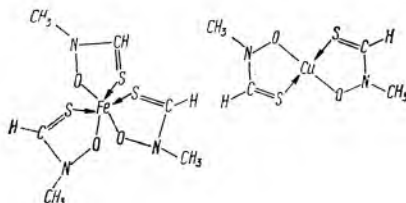
Антибиотики ацетиленового ряда сепацины А и В выделены из штамма *P. seracia* ATCC 39356 [397].



Сепацины А (I) и В (II) (*P. seracia*)

Эти активные в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий антибиотические вещества близки по строению немотну — ацетиленовому антибиотику, образуемому некоторыми базидиомицетами. Сепацины сходны по своим химическим свойствам, токсичности, антимикробной активности. Так, для сепацина А  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  = 248, 261,5 и 277 нм; для сепацина В — соответственно 248, 262 и 277 нм; их LD<sub>50</sub> для мышей при однократном внутрибрюшинном введении составляет 30 и 25 мг/кг для сепацинов А и В соответственно.

Низкомолекулярные, содержащие азот и серу антибиотики-флюопсины выделены из *P. fluorescens* двумя независимо работавшими группами японских авторов. Одной из них эти вещества были получены на средах с сахарозой и соевой мукой [173], другой — на средах с парафинами [259, 450]. При высоком содержании в среде меди синтезируется преимущественно флюопсин С, представляющий собой комплекс с медью, при ограничении в среде меди образуется флюопсин F (комплекс с железом).



Флюопсины (*P. fluorescens*)

Синтезированы комплексы флюопсинов с серебром, кобальтом, цинком и другими металлами. Позже флюопсины были найдены



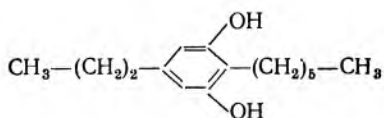
[334] у штамма «*P. reptilivora*» (согласно современной терминологии биовар У *P. fluorescens*).

Флюопсины проявляют высокую активность в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий, действуют *in vitro* на клетки HeLa, саркомы 180 и аденокарциномы Эрлиха. Однако *in vivo* флюопсины неактивны, кроме того, они весьма токсичны. К азотсодержащим ациклическим антибиотическим веществам относится 2-амино-4-метокси-*транс*-3-бутеновая кислота, образуемая *P. aeruginosa* и действующая на грамположительные и грамотрицательные бактерии. Это вещество образуется как на богатых органических средах, так и при росте продуцента на средах с гексадеканом [428]. Антибиотик является антиметаболитом, его действие на тест-микробы снимается метионином или гомоцистеином.

### АНТИБИОТИКИ АРОМАТИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ

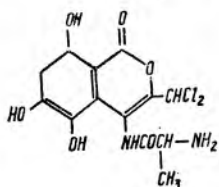
Простейшим антибиотиком ароматической структуры, образуемым бактериями *Pseudomonas*, является салициловая кислота — широко применяемое в медицинской практике и пищевой промышленности антисептическое средство. Псевдомонады образуют салициловую кислоту из нафталина, среди активных продуцентов описаны штаммы *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* и «*P. denitrificans*» [28].

Из клеток штамма *Pseudomonas species* Канда и соавт. [289] выделили новый антибиотик ароматического строения. Этот препарат, активный против грамположительной флоры, микобактерий, дрожжей и грибов, представляет собой 2*n*-гексил-5*n*-пропилрезорцин.



2*n*-Гексил-5*n*-пропилрезорцин

Ароматическое ядро содержит противоопухолевый антибиотик бактоболин, выделенный японскими авторами из *Pseudomonas species* ВМГ 13-А 7 [297]. Тот же продуцент способен к синтезу из бактоболлина его аланилзамещенного производного, действующего на грамположительные и грамотрицательные бактерии и опухоли.



Антибиотик — производное резорцина из *Pseudomonas sp.*

Комплекс антибиотиков ароматической структуры выделен нами из штаммов флюоресцирующего вида *P. aurantiaca* [31, 32].

Таблица 19. Некоторые физико-химические свойства антибиотических веществ, выделенных из *Pseudomonas aurantiaca* ИМВ 31

Вещество	Внешний вид	Температура плавления, °С	Элементарный состав, %			Реакция с FeCl <sub>3</sub> в спиртовом растворе	λ <sub>max</sub> в УФ-лучах	Инфракрасный спектр, частота, см <sup>-1</sup>
			С	Н	О			
Компонент I	Бесцветные палочки и пластинки	264—265 с разложением **	47,75	4,55	37,70	Красное окрашивание	285 *	900 (слабый), 1080 (средний), 1100—1130 (слабый), 1280 (слабый), 1380 (слабый), 1420—1440 (средний), 1590, 1630—1640 (очень сильный), 3190 (слабый)
Компонент II	Бесцветные кристаллы	168	57,00	4,70	38,30	То же	270	905 (слабый), 1310 (сильный), 1440 (средний), 1610—1640 (очень сильный пик), 3480 (размытый)
Компонент III	Белое кристаллическое вещество	218—219	56,76	4,70	38,44	Фиолетовое окрашивание	290	840 (слабый), 1080 (средний), 1180 (средний), 1140—1460 (средний), 1620 (сильный), 3600 (средний), 3150—3480 (размытый)

\* Спектр поглощения снят в спиртовой щелочи. \*\* После двукратного хроматографирования на колонке.

Высокой антибиотической активностью и широким спектром анти-микробного действия характеризовались все 36 исследованных нами штаммов *P. aurantiaca*. Комплексный антимикробный препарат был впервые получен из штамма *P. aurantiaca* ИМВ 31, в связи с чем был назван «препаратом 31».

Для выделения антибиотика культуральную жидкость, полученную при выращивании бактерий на среде Кинг А [284] в условиях аэрации, дважды экстрагировали серным эфиром. Объединенные эфирные экстракты обрабатывали 1%-м водным раствором NaOH, водный раствор подкисляли разбавленной соляной кислотой до pH 3—4. При этом антибиотик выпадал в осадок, который извлекали эфиром. Препарат получали в виде светло-коричневого порошка, растворимого в спирте, ацетоне и 2н. NaHCO<sub>3</sub> при нагревании. Полученный антибиотик-сырец обладал значительной активностью в отношении грамположительных микроорганизмов: спорообразующих грамположительных палочек — *Bacillus anthracis*, *B. mycoides*, *B. cereus* и др. (бактериостатическая доза 0,5—1 мкг/мл), стафилококков и стрептококков (1 мкг/мл), коринебактерий (0,5—1 мкг/мл), микобактерий (0,5—4 мкг/мл). В концентрации 2—4 мкг/мл антибиотик угнетал рост бруцелл и грибов-дерматофитов. Его бактериостатическая концентрация была близка к бактерицидной.

Препаративное разделение антибиотика 31 осуществляли хроматографически на колонке с водной кремневой кислотой. Элюцию компонентов с колонки производили хлороформом, а затем хлороформом с 2 % метанола. По порядку выхода с колонки и по хроматографической подвижности компоненты обозначили I, II, III. Основным веществом, ответственным за антибактериальную активность препарата, явился компонент II. Его содержание в препарате составляло от 35 до 78 %.

Компоненты I, II, III представляли собой кристаллические вещества. Как видно из табл. 19, все они имели близкий химический состав, сходные УФ- и ИК-спектры (рис. 19, 20), обладали кислыми свойствами и давали в спиртовых растворах характерную для фенолов цветную реакцию с FeCl<sub>3</sub>;

На основании данных элементарного анализа и определения молекулярной массы (210) определена формула компонента II — C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>. Установле-

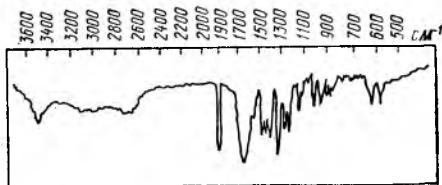
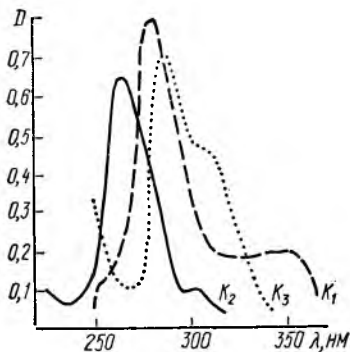


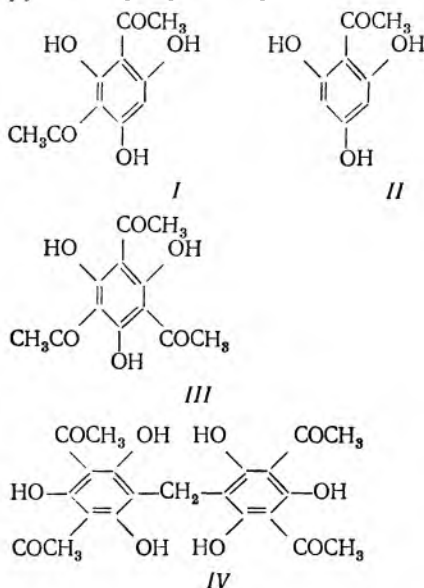
Рис. 19. УФ-спектры спиртовых растворов антибиотиков из *P. aurantiaca*  
Рис. 20. ИК-спектр компонента II (2,4-диацетилфлороглюцина)

но, что компонент II кристаллизуется с 0,5 моль  $H_2O$ . Состав кристаллогидрата: С — 54,59; Н — 5,13; О — 40,28.

Спектр ЯМР показал наличие в молекуле компонента II двух метильных групп, фенольных гидроксиллов и хелатной группировки. Наличие в молекуле компонента II карбоксильной группы было подтверждено получением соответствующего гидразона.

Таким образом, компонент II — антибиотически активное начало штаммов *P. aurantiaca* — представляет собой вещество ароматической природы с эмпирической формулой  $C_{10}H_{10}O_5$ , содержащее в молекуле две метильные и карбонильные группы. Это соединение дает характерную для производных флороглюцина красно-фиолетовую реакцию с «сосновой лучиной». Все изложенное позволило предположить, что компонент II относится к классу производных флороглюцина.

Данные о выделении и химическом изучении антибиотических веществ из *P. aurantiaca* опубликованы нами в марте 1969 г. В мае того же года ленинградские исследователи А. В. Боровков, Я. П. Худяков и Т. К. Редди, изучая, независимо от нас, фитотоксические метаболиты почвенных бактерий, опубликовали данные по расшифровке структуры двух веществ из штамма *P. fluorescens* 26-О. Антибиотические свойства этих соединений не были описаны. Одно из них — 2,4-диацетилфлороглюцин — оказалось идентичным компоненту II, другое — флорацетофенон — компоненту III [74].



Антибиотики — производные флороглюцина из *P. aurantiaca*:

I — диацетилфлороглюцин, II — флорацетофенон, III — триацетилфлороглюцин, IV — ди-(2,4-диацетилфлороглюцин)метан

2,4-Диацетилфлороглюцин и флорацетофенон не являются новыми соединениями. Они были получены ранее [113] путем химиче-

Т а б л и ц а 20. Антимикробная активность индивидуальных компонентов антибиотического препарата из *Pseudomonas aurantiaca*

Тест-микроорганизм	Бактериостатическая доза, мкг/мл*	
	Компонент I	Компонент II
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	0,5	1,0
<i>S. aureus</i> УФ-3	0,1	0,1
<i>Sarcina</i> sp.	1,0	5,0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,1	0,5
<i>S. faecalis</i>	0,1	0,1
<i>Bacillus subtilis</i>	0,2	0,5
<i>B. cereus</i>	0,2	1,0
<i>B. mycoides</i>	0,1	0,5
<i>Mycobacterium B<sub>5</sub></i>	0,1	2,0
<i>M. luteum</i>	0,1	0,5
<i>Corynebacterium michiganense</i>	0,1	0,5
<i>Caryophanon latum</i>	0,1	1,0
<i>Actinomyces griseus</i>	1,0	1,0
<i>Proteus vulgaris</i>	Не действует	50,0
<i>Escherichia coli</i>	« »	50,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	« »	Не действует
<i>Erwinia aroidea</i>	« »	100,0
<i>Candida albicans</i>	« »	200,0
<i>Fusarium avenaceum</i>	« »	50,0
<i>Verticillium dahliae</i>	« »	100,0
<i>Aspergillus flavus</i>	« »	200,0
<i>Trichophyton gypseum</i>	« »	50,0
<i>Microsporum equinum</i>	« »	50,0
<i>Epidermophyton K. W.</i>	« »	50,0
<i>Alternaria</i> sp.	« »	50,0
<i>Ascomphyta imperfecta</i>	« »	1,0
<i>Sclerotinia libertiana</i>	« »	0,5

\* Компонент III антимикробной активностью не обладал.

ского синтеза, однако их биологическая активность широко изучена нами впервые. Антибиотически высокоактивным веществом оказался 2,4-диацетилфлороглюцин (компонент II) (табл. 20). Его антимикробное действие проявляется прежде всего в отношении грамположительных бактерий — спорообразующих палочек, стафилококков и стрептококков, коринебактерий и микобактерий. Антибиотик полностью задерживает рост кишечной палочки и протей в концентрации 50 мкг/мл, *Erwinia aroidea* — 100 мкг/мл, *Candida albicans* — 200 мкг/мл. Его фунгистатические дозы в отношении ряда грибов, как сапрофитных, так и вызывающих дерматомикозы, колеблются в пределах 0,5—200 мкг/мл. Бактерицидные дозы препарата близки бактериостатическим; при наличии в среде 20 % сыворотки его бактериостатическая доза возрастает в 100 раз.

Максимальная переносимая доза компонента II для мышей при однократном подкожном введении составляет 125 мг/кг, LD<sub>50</sub> — 162,5, LD<sub>100</sub> — 200 мг/кг.

Значительным ингибирующим действием в отношении ВТМ обладают II и III компоненты антибиотика 31, вызывая снижение количества некрозов на 47—64 % по сравнению с контролем, причем

Т а б л и ц а 21. Противоопухолевые и антивирусные свойства компонентов антибиотического препарата 31

Биологическое действие препарата	Тест-объект	Оценка биологического действия препарата	Компонент I	Компонент II	Компонент III
Влияние на экспериментальные опухоли мышей	Аденокарцинома Эрлиха Саркома 37 Саркома К-239	Торможение развития опухолей у мышей, %	57,2	11,9	21,5
			79,3	17,2	54,2
			51,6	Не исследован	98,0
Антивирусные свойства	Вирус табачной мозаики	Торможение некритической реакции, вызванной ВТМ, %	37,0 43,0	47,0 59,0	45,0 64,0
	Вирус гриппа А <sub>2</sub>	Гемагглютинирующий титр вируса в куриных эмбрионах, ГО/мл	320/320	Снижение в 9 раз	Снижение в 2 раза

активность их в опытах *in vivo* выше, чем *in vitro* (табл. 21). Значительную активность проявляют эти же вещества и в отношении вируса гриппа А<sub>2</sub>, снижая в опытах *in ovo* титр гемагглютинина в 9 и 2 раза соответственно.

При экспериментальной гриппозной инфекции белых мышей, вызванной вирусом гриппа А (PR-8), наиболее активным оказался компонент III (флорацетофенон), который способствовал выживанию 73,3 % мышей при гибели всех животных в контроле. Данные этих опытов характеризовались высокой степенью достоверности.

Установлена способность 2,4-диацетилфлороглюцина и флорацетофенона индуцировать образование эндогенного интерферона [63]. Среди минорных соединений, сопутствующих 2,4-диацетилфлороглюцину, А. В. Боровков и Т. К. Редди обнаружили антимикробно менее активный триацетилфлороглюцин — соединение, также полученное ранее путем химического синтеза. Исследованные нами штаммы *P. aurantiaca* этого вещества не синтезировали, но продуцировали компонент I, строение которого установлено нами совместно с С. Е. Есиповым [21]. Данные элементарного анализа и определение молекулярной массы масс-спектрометрическим методом ( $m/e$  432, M<sup>+</sup>) позволили предположить для компонента I эмпирическую формулу C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub> (С — 57,8 %, Н — 4,6 %).

Наличие в масс-спектрах компонентов I и II общих фрагментов (рис. 21) и идентичность путей их образования позволили предположить, что компонент I построен из двух ароматических замещенных колец, строение которых близко или аналогично 2,4-диацетилфлороглюцину, соединенных между собой метиленовым мостиком, т. е. представляет собой ди-(2,4-диацетилфлороглюцил)метан. Этот вывод хорошо согласуется с данными спектра ЯМР-<sup>1</sup>Н компонента I, снятого в дейтерохлороформе.

Для окончательного подтверждения предполагаемой нами структуры компонента I был проведен встречный синтез этого

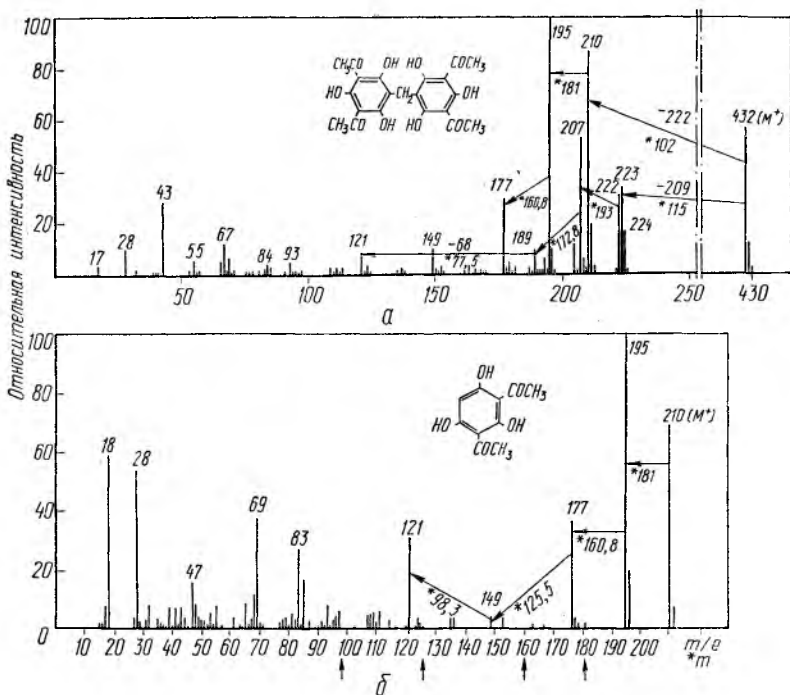


Рис. 21. Масс-спектры компонентов I (а) и I (б) из *P. aurantiaca*

соединения с использованием в качестве исходного продукта 2,4-диацетилфлороглюцина. Полученное с выходом 70 % соединение по своим физико-химическим характеристикам (ИК-, УФ-, масс-спектру и ЯМР-<sup>1</sup>H), температуре плавления смеси полностью соответствовало образцу, выделенному из культуральной жидкости *P. aurantiaca*.

Компонент I — ди-(2,4-диацетилфлороглюцил)метан — представляет собой новое, ранее не описанное соединение. Сходные с ним по строению вещества выделены из различных видов папоротника и применяются как противогельминтные средства, многие из них обладают антимикробной активностью.

Спектр антимикробного действия компонента весьма узок и охватывает исключительно грамположительную флору (см. табл. 20). Антибиотик токсичен — его максимально переносимая доза для белых мышей при однократном подкожном введении составляет 2,5 мг/кг; LD<sub>50</sub> (по Керберу) — 6,25 мг/кг; LD<sub>100</sub> — 10 мг/кг.

Таким образом, к настоящему времени установлено строение четырех биологически активных метаболитов штаммов *P. aurantiaca*, относящихся к производным флороглюцина и обуславливающих высокую антагонистическую активность этого вида. Это прежде всего 2,4-диацетилфлороглюцин, ответственный за широкий спектр его антагонистического действия; уступающий ему по активности

триацетилфлороглюцин; строго избирательно действующий на грамположительные бактерии ди-(2,4-диацетилфлороглюцил)метан и, наконец, флорацетофенон (компонент III), антимикробно не активный, однако обладающий противовирусной активностью.

Обращает на себя внимание интересная способность штаммов *P. aurantiaca* к образованию сложных многоядерных производных флороглюцина из более простых, осуществляемая, по-видимому, путем конденсации с помощью формальдегида, подобно тому как это происходит при химическом синтезе. У других представителей микробного мира способность к синтезу подобных веществ, как и производных флороглюцина, до настоящего времени не обнаружена.

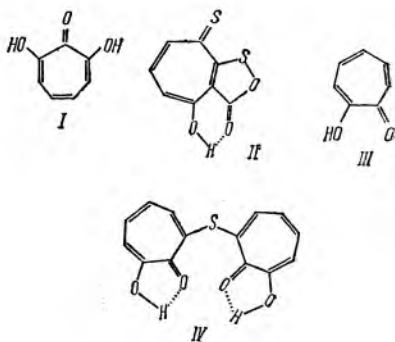
Представляло интерес выяснить, насколько распространена у штаммов *P. aurantiaca* способность к синтезу описанных выше антибиотиков. Было показано, что все исследованные 36 штаммов этого вида способны к антибиотикообразованию. Выход эфирных экстрактов культуральных жидкостей колебался в пределах 112—512 мг/л, причем в хроматограммах всех экстрактов присутствовали описанные выше компоненты (разница наблюдалась лишь в количественном отношении).

Ни у одного из изученных нами штаммов других видов либо биоваров *P. fluorescens* мы не обнаружили в эфирных экстрактах культуральных жидкостей антибиотических веществ, подобных описанным выше соединениям. Исключение составляли штаммы биовара II *P. fluorescens*, в культуральной среде которых мы наблюдали небольшие количества 2,4-диацетилфлороглюцина и флорацетофенона.

Штаммы *P. aurantiaca* способны к синтезу антибиотических веществ не только на богатой органическими формами азота и углерода среде Кинг, но и на синтетической среде Мюнца в атмосфере низкомолекулярных *n*-алканов (C<sub>6</sub>—C<sub>10</sub>) [27]. Способность штаммов *P. aurantiaca* к образованию антибиотических веществ стабильна и сохраняется на протяжении 10—15 лет лабораторного культивирования.

Особую группу антибиотиков ароматического строения, образуемых бактериями рода *Pseudomonas*, составляют трополоны. Антибиотик, изолированный Линдбергом и Ларкиным из штамма *Pseudomonas* [315], близок соединению, синтезируемому штаммами фитопатогенного вида *P. plantarii* [107]. Интересно, что именно этот трополон вызывает у растений риса симптомы заболевания.

Антибиотик, содержащий в молекуле два трополоновых ядра,



Антибиотики-трополоны из *Pseudomonas* spp. (I, II), *P. plantarii* (III), *P. cepacia* (IV)

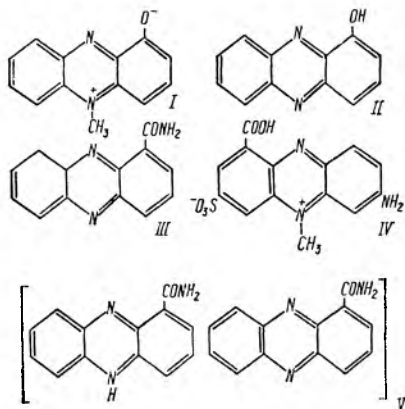


соединенных через сульфидный мостик, описан Кортон и соавт. [301] у штамма *P. серасиа* ATCC 17 759. Соединение активно в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Это не единственный серосодержащий трополоновый антибиотик из псевдомонад: из штамма *Pseudomonas* sp. CB-104 Кинтака и соавт. выделили тиотропоцин, высокоактивный в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, микоплазм, различных видов грибов [287]. Тиотропоцин токсичен: его LD<sub>50</sub> для мышей при однократном подкожном введении составляет 8 мг/кг.

В целом следует отметить, что антибиотики ароматической структуры встречаются у бактерий рода *Pseudomonas* сравнительно редко. В то же время у них широко распространена способность к синтезу азотсодержащих гетероциклических соединений. По многообразию структур, широте биологической активности образуемых антибиотиков-гетероциклов бактерии рода *Pseudomonas* не имеют себе равных, уступая лишь актиномицетам.

#### АНТИБИОТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПИГМЕНТЫ ГРУППЫ ФЕНАЗИНА

Способность к синтезу гетероциклического феназинового ядра является одной из отличительных особенностей метаболизма бактерий рода *Pseudomonas*. Среди других представителей микробного мира единичные феназиновые производные были найдены только у актиномицетов и некоторых коринеподобных бактерий. Многие антибиотики-феназины выделены из бактерий рода *Pseudomonas* сравнительно давно. Их химической структуре, биологической активности, путям синтеза и функциям в микробной клетке посвящена обширная литература.



Антибиотически активные пигменты группы феназина из *P. aeruginosa* (I—IV) и хлорорафин (V):

I — процианин, II — гемипроцианин, III — оксихлорорафин, IV — аэругинозин В; V — комплекс окисленного и восстановленного феназинкарбоксамиды

Т а б л и ц а 22. Некоторые физико-химические свойства пигментов *Pseudomonas aeruginosa*

Пигмент	Внешний вид	Температура плавления, °С *	$\lambda_{EtOH}$ , нм	Rf на бумаге в системах		
				изопропанол — вода 4 : 1	бутанол — уксусная кислота — вода 13 : 4 : 7	вода — метанол — NH <sub>3</sub> 1000 : 10 : 1
Пиоцианин	Темно-синие иглы	132 (133)	240, 322, 696	0,4	0,8	0,45
Гемипиоцианин (1-оксифеназин)	Желтые кристаллы	156 (158)	220, 280, 370	0,53	0,97	0,27
Оксихлорографин	Тонкие желтые иглы	242—243 (241)	250, 365	0,8	0,94	0,13

\* Цифры в скобках означают температуру плавления исследуемых веществ, согласно [93].

Один из наиболее «старых» антибиотиков — пиоцианин — синий пигмент *P. aeruginosa* — выделен в 1860 г. По химическому строению он представляет собой 9-N-метил-1-оксифеназин, активен по отношению к многим грамположительным и грамотрицательным бактериям, грибам родов *Trichophyton* и *Microsporium*, оказывает нейтрализующее действие на дифтерийный токсин. Пиоцианин проявляет определенную избирательность по отношению к *Proteus morganii*, штаммы которого в 16—64 раза чувствительнее к этому антибиотику, чем *Proteus mirabilis* и *Proteus vulgaris* [294].

Антимикробные свойства пиоцианина и его синтетического аналога саназина были подробно исследованы В. С. Деркачом [17, 18]. Предпринимались попытки применять препарат местно для лечения гонорей, глазных заболеваний, язвенных гингивостоматитов, однако широкого распространения в клинике этот антибиотик не нашел.

Способность к синтезу пиоцианина — один из важных критериев в диагностике синегнойной палочки. По данным Джессена [267], пиоцианин образуют около 95 % штаммов *P. aeruginosa*. Синтез антибиотика стимулируется при добавлении к среде глицерина, ионов магния, некоторых аминокислот и метаболитов цикла Кребса [326]. В значительных количествах пиоцианин синтезируется на синтетических средах с парафинами в качестве единственного источника углерода [71].

Среди исследованных нами 58 штаммов *P. aeruginosa* 52 при выращивании на среде Кинг А в условиях аэрации синтезировали пигмент, окрашивающий культуральную жидкость в цвета от черно-синего до зелено-голубого. На основании УФ-спектра, температуры плавления и некоторых других свойств (табл. 22) пигмент был нами идентифицирован как пиоцианин [93]. Он обладал значительной антимикробной активностью, угнетая грамположительные и грамотрицательные бактерии в концентрациях 1—20 и 10—50 мкг/мл соответственно (табл. 23, 24), слабо тормозил рост

Таблица 23. Антимикробная и противовирусная активность пигментов

Пигмент	Тест-микроорганизмы, бактериостатическая доза, мкг/мл					
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus</i> УФ-3	<i>Mycobacterium B<sub>s</sub></i>	<i>Escherichia coli</i> *	<i>Candida albicans</i>
Пиоцианин	20	10	1	2	10	400
Гемипиоцианин	50	100	20	10	—	50
Оксихлорографин	100	100	50	100	400	50
Аэругинозины А и В	100	100	50	50	—	400

\* (—) — антимикробного действия нет.

*Candida albicans* и микроскопических грибов. Исследованы противовирусные свойства пиоцианина и других феназиновых пигментов *P. aeruginosa*, а также их действие на фитопатогенные бактерии (табл. 24). Пиоцианин тормозил на 36—54 % некротическую реакцию, вызываемую вирусом табачной мозаики, и значительно снижал гемагглютинирующий титр вируса гриппа в опытах на куриных эмбрионах.

Полученные данные побудили нас испытать пиоцианин при экспериментальной гриппозной инфекции белых мышей. Лечение мышей, зараженных 10 LD<sub>50</sub> вируса гриппа А(PR<sub>8</sub>) проводили интраназальным способом. Применение пигмента через час после инфицирования животных приводило к увеличению продолжительности жизни опытных мышей по сравнению с контрольными. К моменту гибели всех контрольных мышей 30 % опытных еще оставались живыми, причем 10 % продолжали жить на протяжении двух месяцев.

Наряду с пиоцианином в культуральных жидкостях штаммов *P. aeruginosa* были обнаружены и другие пигменты феназинового ряда. Их идентификация была проведена на основании сопоставления физико-химических свойств этих соединений (см. табл. 22) с данными литературы [95], а также путем сравнения с синтетическими гемипиоцианином и оксихлорографин<sup>1</sup>.

У 47 из 58 исследованных штаммов в культуральной жидкости наряду с пиоцианином присутствовал желтый гемипиоцианин (1-оксифеназин). В количестве, достаточном для биологических испытаний, мы получали гемипиоцианин из пиоцианина по методике Такеда [479]. Его антибактериальная активность невысока, хотя в отличие от многих других природных феназинов этот пигмент действует на грибы (см. табл. 24).

Изумрудно-зеленый пигмент группы феназина — хлорографин (см. с. 100) — характерен для *P. chlorographis*, однако был выде-

<sup>1</sup> Синтетические производные феназина были любезно предоставлены нам проф. Ю. С. Розумом (Институт органической химии АН УССР).

***Pseudomonas aeruginosa***

Вирусы				
ВТМ, % снижения некрозов		Вирус гриппа А <sub>2</sub> in ovo, средний геометрический титр агглютининов, отрицательный логарифм		
in vitro	in vivo	Опыт	Контроль	Разница титров между контролем и опытом
51	54	0,45±0,09	7,7±0,5	7,25 ( <i>t</i> = 12,1; <i>p</i> < 0,001)
41	36	7,8±0,30	8,2±0,16	0,4 ( <i>t</i> = 1,3; <i>p</i> > 0,1)
25	18	2,0±0,30	8,8±0,17	6,8 ( <i>t</i> = 5,2; <i>p</i> < 0,001)
8	46	7,1±0,2	7,3±0,15	0,2 ( <i>t</i> = 1,0; <i>p</i> > 0,1)

лен некоторыми авторами и из культуральной жидкости *P. aeruginosa* [275]. На *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi* пигмент действует в концентрации 100 мкг/мл.

Некоторые штаммы *P. chlorocephala* образуют желтый пигмент оксихлорорафин, являющийся амидом феназин-1-карбоновой кислоты (см. с. 100). Этот феназин был найден нами в культуральной жидкости 17 штаммов *P. aeruginosa*, а также штамма *P. chlorocephala* ИМВ 5409. Пигмент идентифицировали по физико-химическим свойствам (см. табл. 22); его восстановлене насыщенным раствором NaHSO<sub>3</sub> по методу Кэннера и соавт. [275] приводит к выпадению изумрудно-зеленых кристаллов хлорорафина. Оксихлорорафин обладал умеренной антибиотической активностью в отношении различных видов бактерий и грибов (см. табл. 23, 24).

Гемипиоцианин и оксихлорорафин не действовали на ВТМ; оксихлорорафин угнетал репродукцию вируса гриппа А<sub>2</sub> в опытах in ovo.

Анализ полученных данных показал, что штаммы *P. aeruginosa*, способные к синтезу значительных количеств пиоцианина, оказывают более сильное угнетающее действие на грамположительную

**Таблица 24. Действие пигментов *Pseudomonas aeruginosa* на фитопатогенные грибы и бактерии**

Пигмент	Тест-микроорганизмы, бактерио- или фунгистатическая доза, мкг мл											
	<i>Corynebacterium michiganense</i>	« <i>Pseudomonas lachrymans</i> »	<i>Erwinia aroidea</i>	<i>Xanthomonas malvacearum</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Drechslera graminea</i>	<i>Mucor plumbeum</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Monilia fructigena</i>	<i>Alternaria sp.</i>
Пиоцианин	20	20	50	20	50	400	50	200	50	400	200	400
Гемипиоцианин	50	100	—	200	50	50	50	100	50	100	50	50
Оксихлорорафин	50	400	—	200	200	200	50	200	50	200	50	50

и граммотрицательную флору. Штаммы, образующие гемипиоцианин и оксихлорорафин, обладали более высокой антифунгальной активностью в опытах по антагонизму. Имевшиеся в коллекции ахромогенные штаммы *P. aeruginosa* были антагонистически неактивны.

Исследованный нами коллекционный штамм *P. aeruginosa* var. *erythrogenes* (ИМВ 1904-NCIB 9253), а также 4 штамма, выделенных от больных, синтезировали красные пигменты аэругинозины. По данным Ваба [501], изучившего около 700 штаммов *P. aeruginosa*, к синтезу красного пигмента способно 3,5 % культур. Попытки установить его химическую природу увенчались успехом в 1961 г., когда Холлимен выделил из культуральной среды *P. aeruginosa* два вещества: аэругинозин А, идентифицированный как 2-амино-6-карбокси-10-метилфеназин-бетаин, и аэругинозин В (2-амино-6-карбокси-10-метил-8-сульфофеназин-бетаин) [228, 236]. Биологическая активность этих соединений не была изучена.

Аэругинозин В — первая выделенная из природы ароматическая сульфоновая кислота. Оптимальными условиями для биосинтеза этого пигмента является дефицит в среде фосфора и наличие некоторых органических кислот [306].

Целью наших исследований было изучение антимикробных и противовирусных свойств аэругинозинов. Для их получения штамм-продуцент выращивали на агаризованной среде Кинг А. Экстрагировали высушенную среду водой, упаривали экстракт в вакууме, растворяли сухой остаток в абсолютном спирте и повторно отгоняли растворитель. Полученная сумма красных пигментов имела максимумы поглощения в этаноле при 255, 280, 370 и 510 нм и при хроматографии на бумаге в системе бутанол — соляная кислота (100 : 8) давала два пятна с красной флюоресценцией в ультрафиолете, характерные для аэругинозинов А и В [236]. Антимикробная активность смеси этих пигментов оказалась небольшой: не действуя на стафилококк, кишечную палочку и другие тест-микробы (см. табл. 23), аэругинозины полностью угнетали рост *Mycobacterium B<sub>5</sub>* в концентрации 100 мкг/мл и *Candida albicans* — 400 мкг/мл, не обладали противовирусной активностью.

Способность к синтезу феназиновых пигментов свойственна и некоторым другим видам рода *Pseudomonas*. Так, нами описана группа штаммов, идентифицированных как *P. fluorescens* [30] и проявляющих высокую антагонистическую активность в отношении грамположительных бактерий и грибов. При этом по краю колоний и в толще среды вокруг них выпадали желто-зеленые кристаллы пигмента. То же вещество, но в значительно больших количествах образовывалось при выращивании бактерий в условиях аэрации.

Для извлечения пигмента культуральную жидкость, освобожденную от микробных тел центрифугированием, подкисляли HCl до pH 2. Выпадающий желто-зеленый осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 80%-м водном ацетоне, затем растворитель отгоняли, а выпавшие кристаллы растворяли в бензоле и экстрагировали 0,1 н. раствором  $K_2HPO_4$  (pH 9). Полученный экстракт

Т а б л и ц а 25. Свойства кристаллических пигментов, образуемых *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas aureofaciens*

Пигмент	Внешний вид	Температура плавления, °С	$\lambda_{\text{max}}$ , нм (Et OH)	Rf на бумаге в системе вода — метанол — NH <sub>3</sub> , 1000 : 10 : 1
Феназин-1-карбоновая кислота	Желто-зеленые иглы	240	250 364	0,73
2-Оксифеназин-1-карбоновая кислота	Темно-красные кристаллы	224—225	260 370 460	0,5
2-Оксифеназин	Оранжевые палочки и пластинки	210 с разложением	260 370 460	0,27

подкисляли ледяной уксусной кислотой и снова экстрагировали бензолом. При отгонке бензола выпадали кристаллы, которые перекристаллизовывали из метанола.

Объектом исследований служили два пигмента, полученные по приведенному выше методу из штаммов *P. fluorescens* NN ИМВ 19 и ИМВ 102. Сопоставление некоторых физико-химических констант выделенных веществ и синтетической феназин-1-карбоновой кислоты (табл. 25), а также определение их смешанной точки плавления явилось доказательством их идентичности.

Штаммы *P. fluorescens* были способны к синтезу значительных количеств феназин-1-карбоновой кислоты. Интенсивность биосинтеза колебалась от 44 до 422 мг пигмента на 1 л культуральной среды и была непосредственно связана со степенью антагонистической активности продуцента.

Феназин-1-карбоновая кислота — сравнительно слабый антибиотик (табл. 26, 27). В наших опытах она полностью угнетала рост *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium B<sub>5</sub>* в концентрации 50 мкг/мл, *Candida albicans* — 100 мкг/мл, *Fusarium avenaceum* — 200 мкг/мл. В то же время рост некоторых фитопатогенных грибов, например *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, подавляется этим антибиотиком в дозе 1 мкг/мл [484].

Способность к синтезу феназин-1-карбоновой кислоты присуща многим видам рода *Pseudomonas*. Такеда выделил этот пигмент из культуральной жидкости *P. aeruginosa* [479], О. А. Берестецкий и соавт. [4] — из штамма *P. putida*, Хигашихара и Сато [229] — из штамма *P. fluorescens*, выращенного на средах с гексадеканом и тетрадеканом. Позже те же авторы получили феназин-1-карбоновую кислоту из штамма *P. aeruginosa*, источником углерода для которого служил этанол [230]. Огата и соавт. [380] получили до 1600 мг/л феназин-1-карбоновой кислоты и до 850 мг/л оксихлорофина из штамма *P. aeruginosa*, растущего на смеси *n*-алканов (от C<sub>13</sub> до C<sub>20</sub>). Наилучшим источником углерода для биосинтеза служил октадекан.

Феназин-1-карбоновая кислота мало токсична для животных, но обладает значительной токсичностью по отношению к некоторым

Таблица 26. Антимикробная и противовирусная активность пигментов, образуемых *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas aureofaciens*

Пигмент	Тест-микроорганизмы бактериостатическая доза, мкг/мл						Вирусы				
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus</i> УФ-3	<i>Mycobacterium</i> В <sub>6</sub>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	ВТМ, % снижения некрозов		Вирус гриппа А <sub>2</sub> in ovo, средний геометрический титр агглютининов, отрицательный логарифм		
							in vitro	in vivo	Опыт	Контроль	Разница титров между контролем и опытом
Феназин-1-карбоновая кислота	100	100	50	50	—	50	34	27	4,8±0,97	8,2±0,16	3,4 ( $t = 4,2$ ; $p < 0,001$ )
2-Оксифеназин-1-карбоновая кислота	2	5	1	2	400	10	28	35	6,6±0,70	7,6±0,20	1,0 ( $t = 1,4$ ; $p > 0,1$ )
2-Оксифеназин	20	50	—	10	—	—	Не исследовали		Не исследовали		

растениям и водорослям. Рост *Phleum pratense* угнетается этим веществом в дозе 6 мкг/мл, *Lemna minor* — 2,5 мкг/мл, что позволяет рассматривать феназин-1-карбоновую кислоту как потенциальный альгицид и гербицид [487]. По данным О. А. Берестецкого, в концентрации 50—100 мкг/мл это соединение ингибировало деление и рост клеток в корнях озимой пшеницы, а в более высоких дозах вызывало остановку роста и гибель растущей части корня [4].

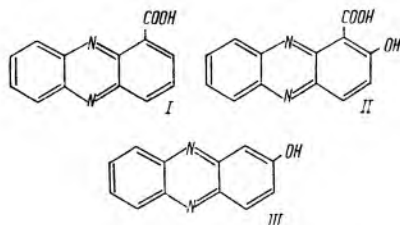
Феназин-1-карбоновая кислота входит также в состав пигментного комплекса *P. aureofaciens*. Красно-оранжевый комплекс содержали все девять изученных нами штаммов этого вида.

Смесь пигментов *P. aureofaciens* извлекали из подкисленной культуральной жидкости хлороформом. Выход экстракта из раз-

Таблица 27. Действие пигментов, образуемых *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas aureofaciens*, на фитопатогенные бактерии и грибы

Пигмент	Тест-микроорганизмы, бактериостатическая или фунгистатическая доза, мкг/мл											
	<i>Corynebacterium michiganense</i>	« <i>Pseudomonas lachrymans</i> »	<i>Erwinia atroidea</i>	<i>Xanthomonas malvacearum</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Drechslera graminacea</i>	<i>Mucor plumbeus</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Monilia fructigena</i>	<i>Alternaria</i> sp.
Феназин-1-карбоновая кислота	200	400	400	100	200	200	200	200	100	200	200	200
2-Оксифеназин-1-карбоновая кислота	5	—	400	50	50	200	100	100	100	200	200	50
2-Оксифеназин	50	—	—	20	20	Не исследовали						

личных штаммов колебался от 353 до 616 мг на 1 л среды. При хроматографии пигмента на бумаге в системе вода — метанол — аммиак (1000 : 10 : 1) и последующем проявлении хроматограмм в парах аммиака было получено три пятна с  $R_f$  0,73, 0,5 и 0,27, из которых верхнее принадлежало феназин-1-карбоновой кислоте, а два других — красной 2-оксифеназин-1-карбоновой кислоте и оранжевому 2-оксифеназину.



Пигменты — производные феназина из *P. augeofaciens*:

*I* — феназин-1-карбоновая кислота, *II* — 2-оксифеназин-1-карбоновая кислота, *III* — 2-оксифеназин

Идентификация этих соединений произведена на основании сравнения результатов изучения их физико-химических свойств (см. табл. 25) с литературными данными [69, 486].

Получение индивидуальных пигментов из *P. augeofaciens* для биологических испытаний проводили путем препаративной хроматографии на бумаге в описанной выше системе растворителей. Все они обладают антимикробной и фунгицидной активностью, что обуславливает антагонистические свойства образующего их вида. Наиболее сильным антибиотиком является 2-оксифеназин-1-карбоновая кислота (см. табл. 26).

2-Оксифеназин-1-карбоновая кислота и 2-оксифеназин, содержащие оксигруппу при втором углеродном атоме феназинового ядра (см. выше), являются пигментами, специфическими для *P. augeofaciens* как вида. По данным Манна [331], эти соединения дают характерное для 2-оксифеназинов красно-фиолетовое окрашивание с формалином, которое можно наблюдать и при опрыскивании формалином колоний бактерий. Таким образом, эта качественная реакция может служить вспомогательным методом диагностики *P. augeofaciens*, показывая наличие в клетках и культуральной среде бактерий свойственных данному виду веществ определенного химического строения.

Олсон и Ричардс [384], исследуя метаболиты *P. augeofaciens*, обнаружили в культуральной жидкости этого продуцента наряду с описанными выше веществами розовый, фиолетовый и коричневый пигменты. Предполагают, что последние представляют собой более окисленные производные феназина. Ряд новых феназиновых производных из *P. augeofaciens* описан в последние годы Ромером и



соавт. [424, 425], однако их биологическая активность не была изучена.

Широкое распространение феназиновых пигментов, в частности феназин-1-карбоновой кислоты, у бактерий рода *Pseudomonas*, высокая активность их биосинтеза свидетельствуют о важной и пока окончательно не выясненной роли их в жизнедеятельности бактерий-продуцентов.

Не рассматривая этот вопрос подробно, отметим лишь, что наиболее распространенным является взгляд на феназины как на сопряженные с цитохромами редокс-системы, компоненты дыхательной цепи бактерий [331]. Установлена роль феназиновых пигментов — пиоцианина, феназинкарбоновых кислот — в регуляции окислительного обмена у бактерий рода *Pseudomonas* [86, 87]. По-видимому, феназиновые пигменты играют разностороннюю роль как в физиологии, так и в экологии бактерий.

Так, например, показано, что феназин-1-карбоновая кислота, синтезируемая штаммом *P. fluorescens* 2-79, служила главным фактором защиты пшеницы от поражения грибом *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Мутанты, не образующие этого феназинового пигмента, не обеспечивали и защитного эффекта [484].

Перечисленные выше продуценты феназинов принадлежат к флюоресцирующей группе рода *Pseudomonas*. Однако к синтезу этого класса гетероциклов способны и некоторые нефлюоресцирующие псевдомонады.

Видовое название *Pseudomonas phenazinium* было дано штаммам, использующим треоин в качестве единственного источника азота и углерода и синтезирующим в этих условиях 10 различных феназиновых пигментов, в том числе 6-оксифеназин-1-карбоновую кислоту и йодинин [133]. Последний выделен ранее из *Sphoetobacterium iodinum*. Этот пурпурный, с медным блеском пигмент, относящийся к оксипроизводным феназина, действует на стрептококки, бациллы, коринебактерии и дрожжи рода *Candida* в концентрации 1 мкг/мл, на стафилококк — 10 мкг/мл, слабее угнетает рост энтеробактерий.

Возможно, к феназинам принадлежат и некоторые компоненты антибиотически активного пигментного комплекса, выделенного нами из штамма *P. serasia* ИМВ 4137 [80]. Желто-зеленый, окрашивающий клетки и диффундирующий в среду пигмент штамма 4137 получили путем экстракции хлороформом при pH 2 культуральной жидкости бактерий. Хлороформенный экстракт освобождали от загрязняющей его поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты. Выход пигмента-сырца составлял 230—250 мг на 1 л среды.

Результаты изучения компонентного состава антибиотика методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol» в системе хлороформ — ледяная уксусная кислота 9 : 1 показали, что выделенный препарат содержит три фракции: красно-оранжевую и две желто-зеленых. Все они обладали антимикробной активностью, близкими максимумами поглощения в ультрафиолетовой и видимой части спектра и давали окрашивание с бутанольным раство-

Т а б л и ц а 28. Некоторые физико-химические свойства антибиотика-сырца, образуемого *Pseudomonas ceracia*

Номер и окраска фракций	Rf в системе хлороформ — ледяная уксусная кислота 9 : 1	Окрашивание с FeCl <sub>3</sub>	λ <sub>max</sub> , нм		Инфракрасный спектр (ν, см <sup>-1</sup> )
			в нейтральном метаноле	в щелочном метаноле	
I. Ярко-желтая	0,97	Коричневое	280, 335, 410	360, 485	
II. Красно-оранжевая	0,67	Сине-фиолетовое	225, 325, 455	240, 338, 460	670, 750 (сильный), 837 (сильный), 1015, 1053, 1095, (сильный), 1155 (сильный), 1180, 1220, 1278 (сильный), 1375, 1460, 1520—1555 (сильный), 1655 (сильный)
III. Желто-зеленая	0,42	Темно-зеленое	220, 330, 405	240, 345, 415	
IV. Желто-зеленая	0,18	Зеленое	220, 340, 405	240, 340, 415	
V. Светло-желтая	0,02	Бурое	220, 330, 395	240, 340, 410	

ром FeCl<sub>3</sub>, что свидетельствует о наличии гидроксильных групп при ароматическом ядре (табл. 28).

При хроматографии на колонке с силикагелем препарат был разделен на красно-оранжевую и желто-зеленую фракции, а также ряд минорных компонентов. Последние антимикробной активностью не обладали, детально не изучались. Красно-оранжевая и желто-зеленая фракции препарата 4137 были получены в виде аморфных порошков. Результаты изучения их широкого антимикробного спектра представлены в табл. 29.

Желто-зеленая фракция антибиотика 4137 оказывала значительное антимикробное действие на грамположительные и грамотрицательные бактерии, дрожжи и грибы. В концентрации 20 мкг/мл она угнетала такой устойчивый к антибиотикам тест-организм, как *P. aeruginosa*. Красно-оранжевая фракция уступала желто-зеленой по антибиотической активности.

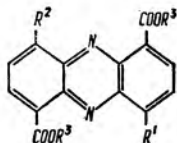
В связи с тем что красно-оранжевая фракция препарата 4137 была более очищенной и хроматографически однородной, исследован ее элементарный состав. Он оказался следующим (%): С — 54,10—54,19, Н — 6,85—7,05, N — 7,97—7,87, O — 31,22—30,89, что предполагает эмпирическую формулу C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>. Эти данные близ-

Таблица 29. Спектр антимикробного действия антибиотика-сырца, образуемого *Pseudomonas cerasia*, и его фракций

Тест-микрорганализм	Бактериостатическая доза препарата и его фракций, мкг/мл		
	Антибиотик-сырец 4137	Красно-оранжевая фракция II	Желто-зеленая фракция III + IV
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	20	50	20
<i>Bacillus subtilis</i>	100	100	10
<i>Streptococcus haemolyticus</i>	20	100	20
<i>Corynebacterium michiganense</i>	4	10	4
<i>Mycobacterium B<sub>5</sub></i>	50	100	20
<i>Escherichia coli</i>	50	100	10
<i>Proteus vulgaris</i>	50	200	10
<i>Erwinia aroidea</i>	4	20	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	200	20
<i>Xanthomonas malvacearum</i>	10	20	10
<i>Candida albicans</i>	50	200	10
<i>Fusarium culmorum</i>	100	400	50

Примечание. Бактерицидные концентрации исследованных препаратов были близки или совпадали с бактериостатическими.

ки результатам Морриса и Робертса [357], которыми показано, что красный внутриклеточный пигмент штамма *P. cerasia* ATCC 25416 представляет собой феназиновое производное общей формулы  $C_{16}H_{12}N_2O_6$ . Позже [302] было установлено, что это соединение является диметилловым эфиром 4,9-оксифеназин-1,6-дикарбоновой кислоты. Наряду с ним были выделены минорные компоненты: феназин-1,6-дикарбоновая кислота, диметилловый эфир 4-оксифеназин-1,6-дикарбоновой кислоты, диметилловый эфир 4-метоксифеназин-1,6-дикарбоновой кислоты, диметилловый эфир 4,9-диметоксифеназин-1,6-дикарбоновой кислоты и ряд других феназиновых производных.



#### Феназины из *P. cerasia*:

1 — феназин-1,6-дикарбоновая кислота, 2 — диметилловый эфир 4-оксифеназин-1,6-дикарбоновой кислоты, 3 — диметилловый эфир 4,9-диоксифеназин-1,6-дикарбоновой кислоты, 4 — диметилловый эфир 4-метоксифеназин-1,6-дикарбоновой кислоты, 5 — диметилловый эфир 4,9-диметокси-1,6-дикарбоновой кислоты

Их антимикробная активность не была изучена:

- 1)  $R' = R^2 = R^3 = H$ ;
- 2)  $R' = OH$ ;  $R^2 = H$ ;  $R^3 = CH_3$ ;
- 3)  $R' = R^2 = OH$ ;  $R^3 = CH_3$ ;
- 4)  $R' = OCH_3$ ;  $R^2 = H$ ;  $R^3 = CH_3$ ;
- 5)  $R' = R^2 = OCH_3$   $R^3 = CH_3$ .

Исследованные нами соединения не идентичны названным выше веществам из *P. serasia*, так как существенно отличаются от них по своим спектральным характеристикам.

В заключение отметим, что у других видов рода *Pseudomonas* нам не удалось найти вещества, сходные с пигментами *P. serasia*. Впоследствии при выделении псевдомонад из почв субтропиков нами были обнаружены микроорганизмы, синтезирующие характерный для *P. serasia* пигментный комплекс и на этом основании отнесенные к названному виду. Дальнейшее изучение биологических свойств этих продуцентов подтвердило их принадлежность к *P. serasia*. Таким образом, в данном случае видовая идентификация бактерий была проведена только на основании такого хемотаксономического критерия, как физико-химические свойства образуемого ими пигмента.

#### ДРУГИЕ АНТИБИОТИКИ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ, АМИНОГЛИКОЗИДЫ И МОНОБАКТАМЫ

**Производные хинолина и богатые азотом гетероциклы.** Среди антибиотиков гетероциклической природы, образуемых псевдомонадами, достаточно широко распространены производные хинолина. Впервые они были выделены из клеток *P. aeruginosa* Хейсом и подробно изучены А. Г. Козловским и соавт. [54, 225]. Эти вещества получили название пиосоединений, или псевданов. В настоящее время установлено их химическое строение и осуществлен синтез [510]. Ритер и Люкнер [421], изучив 60 штаммов синегнойной палочки, обнаружили, что все они синтезируют псевданы, у нескольких продуктивность биосинтеза алкалоидов достигала 560 мг на 1 л культуральной жидкости.

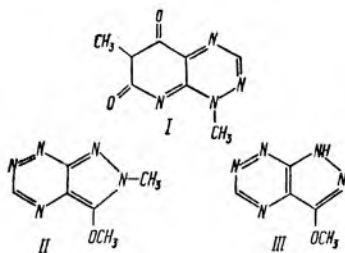
Псевдан-VII (2-*n*-гептил-4-оксихинолин, или Пио-IV) составлял 60 % этого количества, псевдан — IX (2-*n*-нонил-4-оксихинолин, или Пио-IC) — 40 %. Наиболее активные вещества среди соединений этой группы действуют на стафилококк в дозе 0,1—1,65 мкг/мл (табл. 30).

Близки пиосоединениям N-окси-2-алкил-4-аксихинолины, образуемые *P. aeruginosa*, действующие на грамположительную флору и являющиеся антагонистами стрептомицина [314]. Ингибитор липоксигеназы, выделенный Китамурой и соавт. [289] из штамма *P. methanica*, представляет собой 2-*n*-гептил-4-оксихинолин-*n*-оксид.

Т а б л и ц а 30. Химическое строение и антимикробная активность некоторых присоединений (псевданов) (по [93])

Название антибиотика и эмпирическая формула	Химическое строение	Минимальная концентрация, ингибирующая рост <i>Staphylococcus aureus</i> , мкг/мл
Пио-I в (псевдан VII) $C_{18}H_{21}NO$	2- <i>n</i> -Гептил-4-оксихинолин	6,25
Пио-I с (псевдан IX) $C_{18}H_{25}NO$	2- <i>n</i> -Нонил-4-оксихинолин	0,8
Пио-III ( $\Delta'$ псевден-IX) $C_{18}H_{23}NO$	2- <i>n</i> -Ноненил-4-оксихинолин	3,5

К богатым азотом гетероциклическим соединениям относится азаптеридиновый антибиотик токсофлавин, образуемый *P. socovenepans* [156]. Токсофлавин содержит в молекуле пиримидо-(5,4-*e*)-ассим-триазиновую кольцевую систему и представляет собой 1,6-диметил-5,7-диоксо-1,5,6,7-тетрагидропирамидо-(5,4-*e*)-ассим-триазин).



Токсофлавин (I) из *Pseudomonas socovenepans*. Псевдодинин (II) и его лишенное метильной группы производное (III) из *P. fluorescens* var. *pseudoiodinum*

Он угнетает рост грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Антибиотик высокотоксичен. Его LD<sub>50</sub> для мышей при однократном внутривенном введении составляет 1,7 мг/кг.

Среди флюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas* нами также были обнаружены продуценты богатых азотом гетероциклических антибиотиков. 13 штаммов бактерий, выделенных из ризосферы различных растений, синтезировали розово-фиолетовый антибиотически активный пигмент, извлекаемый из культуральной среды хлороформом [33]. Продуценты пигмента были отнесены к новому виду «*Pseudomonas fluoro-violaceus*» Kiprianova, Boiko, 1972.

Пигмент-сырец получали трехкратной экстракцией среды хлороформом. Выход пигмента-сырца составлял 150 мг на 1 л культуральной жидкости. Он обладал умеренной антибиотической активностью: тормозил рост *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium B<sub>5</sub>*, *Candida*

*albicans* в дозе 50 мкг/мл, *Staphylococcus aureus* и *Achorion schoenleinii* — 100 мкг/мл, *Escherichia coli* и *Penicillium rugulosum* — 200 мкг/мл. Препарат на 70 % тормозил развитие некротической реакции на листьях табака, вызываемой вирусом табачной мозаики, *in vitro* и на 47 % — *in vivo*.

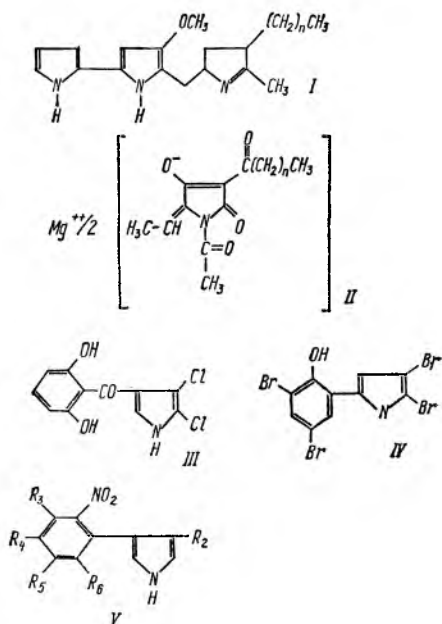
Хроматография на бумаге в системе вода — метанол — аммиак (1000 : 10 : 1) и в тонком слое на  $Al_2O_3$  (хлороформ — метанол 80 : 20) показала, что пигмент-сырец представляет собой смесь нескольких компонентов с различной окраской, *Rf* и свечением в ультрафиолете. Биоавтографически было установлено, что антибиотическая активность комплекса связана с его фиолетовым компонентом. Последний нестабилен и при хранении на воздухе, особенно при хроматографии на  $Al_2O_3$ , превращается в лимонно-желтый продукт, лишенный антибиотической активности. Этот химически более стабильный препарат был очищен методами хроматографии на  $Al_2O_3$  и водной кремниевой кислоте, его исследовали подробно. Полученные игольчатые кристаллы лимонно-желтого цвета имели температуру плавления 196—197 °С,  $\lambda_{\text{max}}^{E^1 OH} = 233, 280, 283$  и 375 нм. Данные элементарного анализа (С—39,9; Н—3,18; N—46, 10, галоиды и сера отсутствовали) позволили предположить принадлежность исследуемого вещества к классу богатых азотом гетероциклических соединений.

Возможно, описанный нами продуцент близок или идентичен штамму *P. fluorescens* var. *pseudoiodinum* [299], образующему на средах с глюкозатом фиолетовый пигмент псевдоиодинин с высоким содержанием азота. Исследованиями Линднера и Шадена [316] было установлено, что псевдоиодинин представляет собой пиразоло-(4,3 *e*)-ассим-триазин. Наличие триазинового ядра, сопряженного с другим гетероциклом, сближает эту группу соединений с токсофлавином (см. с. 112). Биологическая активность псевдоиодинина не была изучена.

**Производные пиррола.** Красный пигмент продигиозин и его гомологи образуются морским видом «*P. magnesorubra*» [189]. Тот же продуцент синтезирует магнезидин — первый выделенный из природы антибиотик, содержащий магний и представляющий собой смесь магниевых солей двух ацетилтетрамовых кислот [188].

Для роста и биосинтеза антибиотика «*P. magnesorubra*» требуют значительных количеств магния. Магнезидин действует только на грамотрицательные бактерии и обладает значительной токсичностью.

Из тропических вод в районе Пуэрто-Рико Беркхольдером и соавт. [130] выделено два штамма бактерий рода *Pseudomonas* с высокой антибиотической активностью. Проведенная традиционными микробиологическими и нумерическими методами идентификация бактерий позволила отнести продуцент к новому виду «*P. bromotilis*». Антибиотик, полученный в кристаллическом виде, оказался производным пиррола, содержащим 5 атомов брома [320]. Он высокоактивен против грамположительных бактерий. Штаммы *Stap-*



Антибиотики — производные пиррола из бактерий рода *Pseudomonas*:

*I* — продигиозин и его гомологи («*P. magnesiogubga*»), *II* — магниезидин («*P. magnesiogubga*»), *III* — пиолютеорин (*P. aeruginosa*), *IV* — антибиотик, содержащий бром («*P. bromoutilis*»), *V* — замещенные фенилпирролы из *P. putrescens*, *P. aureofaciens*, *P. fluorescens*, *P. serasia*; 1 — пирролнитрин, 2 — изопирролнитрин, 3 — оксипирролнитрин, 4 — бромонитрин

- 1)  $R_1 = R_4 = R_5 = R_6 = H; R_2 = R_3 = Cl;$
- 2)  $R_1 = R_2 = Cl; R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H;$
- 3)  $R_1 = R_4 = R_5 = H; R_2 = R_3 = Cl; R_6 = OH;$
- 4)  $R_1 = R_4 = R_5 = R_6 = H; R_2 = R_3 = Br$

*Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* полностью угнетались концентрацией препарата 0,0063 мкг/мл, *Mycobacterium tuberculosis* — 0,2 мкг/мл. На другие микроорганизмы — антибиотик не действовал.

К числу соединений, содержащих пиррольное ядро, относится также пиолютеорин (см. выше), выделенный из *P. aeruginosa* [480]. Антибиотик угнетает грамположительные бактерии и простейших, но не действует на грибы и дрожжи. Пиолютеорин и его производные в значительных количествах синтезируются бактериями на средах с *n*-парафинами [381].

Т а б л и ц а 31. Антифунгальная активность пирролнитрина в отношении 45 клинических изолятов грибов-дерматофитов (по [197])

Вид дерматофита	Общее число изолятов	Минимальная концентрация, ингибирующая рост			
		0,07—0,156	0,312—0,625	1,25—2,5	5,0—10,0
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	10	0	0	6	4
<i>T. rubrum</i>	10	0	1	4	5
<i>T. tonsurans</i>	9	3	1	1	4
<i>Epidermophyton floccosum</i>	4	3	0	1	0
<i>Microsporum gypsum</i>	5	5	0	0	0
<i>M. canis</i>	7	3	1	3	0

Еще одно производное пиррола — пирролнитрин — является одним из самых мощных антифунгальных агентов, выделенных из бактерий рода *Pseudomonas*. Пирролнитрин получен из культуральной жидкости *P. rugosum* [100]. Таксономические исследования продуцента проведены Иманака и соавт. [255, 256]. Эта же группа исследователей установила структуру пирролнитрина.

В качестве минорных метаболитов из культуральной жидкости *P. rugosum* выделены окси- и изо-пирролнитрин, а также близкий им 3-хлор-4-(*o*-нитрофенил)пиррол [219—221]. Позже исследованиями Лейвли с соавт. [318] пирролнитрин был обнаружен в культуральной жидкости *P. aureofaciens*. Методом меченых атомов показано, что непосредственным и специфическим предшественником его является *d*-триптофан [199].

Пирролнитрин и его производные были также обнаружены японскими авторами в культуральных жидкостях «*P. schuykilliensis*», *P. seracisa*, «*P. acidula*» и *P. azotoformans* [97]. Внесение в ферментационную среду бромистых солей взамен хлоридов приводило к образованию броманалогов антибиотика — бромонитринов: А, В, С. Большой набор бромированных амино- и нитрофенилпирролов был получен из культуральной жидкости мутанта *P. aureofaciens* ATCC 15 926. Аминопроизводные были неактивны, нитропроизводные уступали в активности пирролнитрину [494]. Таким образом, штаммы *P. rugosum*, *P. aureofaciens* и некоторых других видов *Pseudomonas* способны к образованию целого семейства биологически активных метаболитов, относящихся к одному химическому классу — фенилпирролам (см. выше).

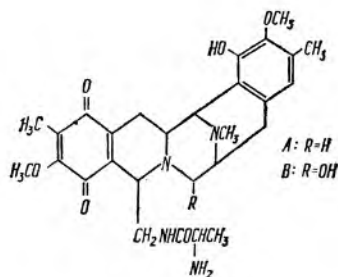
Ни один из аналогов пирролнитрина, как природных, так и синтетических, не превышал его антифунгальной активности [197, 298]. Угнетающая доза этого антибиотика в отношении различных видов паразитических и сапрофитных грибов и дрожжей колеблется от 0,19 до 6,25 мкг/мл, а на грибы-дерматофиты он действует в концентрации от 0,07 до 10 мкг/мл (табл. 31). Пирролнитрин угнетает также рост *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis* в концентрации 25 мкг/мл, *Proteus*, *Escherichia coli* и *Salmonella* — выше 100 мкг/мл, *Chlorella vulgaris* и *Euglena gracilis* — в дозе 10 мкг/мл.



Пирролнитрин оказался эффективным средством лечения экспериментальных дерматомикозов. Его активность *in vivo* сравнима с таковой гризеофульвина и ундециловой кислоты. В коже свинок препарат обнаруживался в течение 10 дней после его местных аппликаций, а устойчивость к нему у грибов-дерматофитов развивалась крайне медленно. В настоящее время пирролнитрин выпускается фармацевтической промышленностью Японии и под названием PYRO-AGE используется для лечения дерматомикозов [199].

Бактерии рода *Pseudomonas* способны к синтезу серосодержащих гетероциклических соединений, обладающих антибиотической активностью. К ним относится аэругиновая кислота, выделенная из культуральной жидкости *P. aeruginosa* и представляющая собой 2-о-оксифенил-тиазолкарбоновую кислоту [532], а также соединение, полученное из неидентифицированного штамма бактерий рода *Pseudomonas*, угнетающее рост *E. coli* и идентичное антилейкемическому антибиотику тиогуанину [436]. Его антимикробный эффект снижался в присутствии аденина и гуанина.

Своеобразную группу гетероциклических хинонов составляют сафрацины — антибиотики широкого спектра действия, образуемые штаммами *P. fluorescens* SC 12 695 и A 222 [251, 382].



Сафрацины А и В (*P. fluorescens*)

Методами  $^1\text{H}$  ЯМР- и  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопии показано, что сафрацины идентичны сафрамицинам — противоопухолевым антибиотикам из *Streptomyces lavendulae*. Брутто-формула сафрацина А —  $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_6$ , сафрацина В —  $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_7$ ,  $\lambda_{\text{max}}$  в метаноле — 271 и 270 нм соответственно. Угнетая рост грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов (табл. 32), антибиотики действуют также на хламидии (минимальная доза, ингибирующая рост *Chlamydia trachomatis*,  $<0,03$  мкг/мл). Однако при экспериментальных инфекциях сафрацины неактивны. В то же время они оказывали выраженное противоопухолевое действие при L 1210- и P 388-лейкемии, В 16-меланоме у мышей. Механизм действия этих соединений отличен: сафрацин В угнетает синтез РНК; сафрацин А — синтез ДНК, РНК и белка.

**Антибиотики-полипептиды.** Способность к синтезу антибиотиков-полипептидов сравнительно слабо распространена у бактерий рода *Pseudomonas*. Циклопептидом, содержащим *d*-аминокислоты,

Т а б л и ц а 32. Спектр антимикробного действия сафранинов (по [251])

Тест-микроорганизм	Минимальная концентрация, ингибирующая рост, мкг/мл	
	Сафранин А	Сафранин В
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,2	6,25
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,2	0,2
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0,2	0,2
<i>Bacillus subtilis</i>	0,2	3,13
<i>Escherichia coli</i>	0,78	25,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25,0	100,0

является вискозин, полученный из культуральной жидкости «*P. viscosa*» [232]. В кислотном гидролизате вискозина найдены лейцин, валин, треонин, серин и глицин в соотношении 2 : 1 : 1 : 1 : 1, а также β-оксикаприновая кислота. Вискозин обладает избирательной активностью в отношении патогенных и сапрофитных микобактерий и оказывает терапевтическое действие при экспериментальном туберкулезе морских свинок. Он угнетает вирус инфекционного бронхита и слабее действует на вирус гриппа.

Синтезировано 16 *D*- и *L*-3-оксиацил-*L*-лейцингидразидов, близких по строению вискозину [232]. Все они обладали активностью в отношении стафилококка, кишечной палочки, дрожжей рода *Candida* и *Mycobacterium tuberculosis*.

Пептидный и жирнокислотный фрагменты обнаружены также в составе антитрипанозомного фактора АТФ-II, выделенного из культуральной жидкости *P. fluorescens* [338]. Очищенная фракция АТФ-II содержала белок, олеиновую и пальмитолеиновую кислоты, вызывала лизис *Trypanosoma cruzi* и *Trypanosoma equiperdum*, обладала гемолитической активностью.

Антибиотик-полипептид, связанный с органической кислотой, получен Грэфом и Бикелем [205] из *P. fluorescens*. Препарат угнетающе действовал на простейших (амебы, трихомонады, лейшмании, трипанозомы), тормозил рост стрептококков, коринебактерий, диплококков, не был активен в отношении грибов.

Штаммы фитопатогенных бактерий *P. syringae* образуют два пептидсодержащих токсина, играющих роль в развитии заболеваний растений и обладающих антибиотической активностью. Продуценты сирингомицина выделены из кукурузы, персиковых и миндальных деревьев, продуценты сиринготоксина — исключительно из цитрусовых [195, 212]. В гидролизате сирингомицина обнаружены аргинин, фенилаланин, серин и диаминамасляная кислота в молярном соотношении 1 : 1 : 2 : 2, в гидролизате сиринготоксина — треонин, серин, глицин, орнитин и диаминамасляная кислота. Антибиотики подавляют рост грибов, бактерий, одноклеточных водорослей и *Daphnia*.

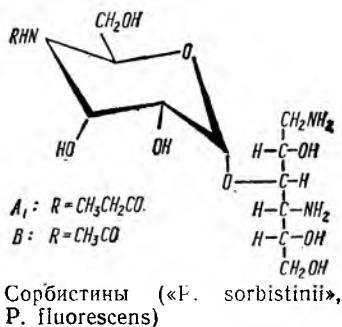
Сирингомицин токсичен для персиков и вызывает у них симптомы, характерные для бактериального рака плодовых деревьев

[453]. По некоторым данным [211], этот антибиотик является сидерофором — переносчиком железа (см. гл. 10).

К антибиотикам-пептидам примыкают микроцины — новое семейство антибиотических веществ, характеризующихся относительно низкой (до 1000) молекулярной массой, термостабильностью, устойчивостью к рН [319]. Образование микроцинов происходит на минимальных средах, их синтез кодируется плазмидами. Хотя большинство описанных к настоящему времени микроцинов синтезируются энтеробактериями, некоторые из них (микроцины 152, 290) были найдены и у штаммов *P. aeruginosa* [104].

**Аминогликозиды.** Широкое развитие программ целенаправленного поиска, прогресс в области изучения биологии и систематики бактерий рода *Pseudomonas* привели к выделению из этих микроорганизмов новых высокоактивных антибиотических веществ аминогликозидной и  $\beta$ -лактамной природы. В 1976 г. Сикиура и соавт. [485, 490] выделили из культуральной жидкости штамма «*P. sorbistinii*» комплекс антибиотиков-аминогликозидов широкого спектра действия. Два года спустя те же антибиотические вещества были изолированы независимо работавшей группой авторов из штамма *P. fluorescens* P-2663 [374].

Антибиотики, названные сорбистинами  $A_1$  и  $B$ , синтезировались бактериями на средах, содержащих полипептон либо  $NZ$ -амин в качестве источника азота; их соотношение в культуральной жидкости зависело от степени аэрации среды. Результаты физико-химических и спектроскопических исследований [300] показали, что сорбистины являются аминогликозидами с новой аминопиолильной структурой.



Молекулы этих антибиотиков содержат соответственно пропиоильную ( $A_1$ ) и ацетильную ( $B$ ) группы, а входящий в их состав аминопиолиол представляет собой 1,4-диамино-1,4-дидезоксигекситол.

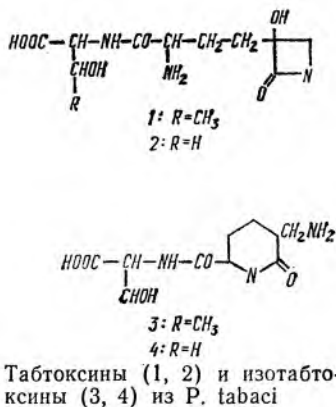
Сорбистины угнетают рост грамположительных и грамотрицательных бактерий. При этом сорбистин  $A_1$  несколько превосходит по активности сорбистин  $B$ . Так, на *Staphylococcus aureus* антибиотики действуют в концентрации 12,5—50 мкг/мл, *Escherichia coli*

12,5—100, *Proteus vulgaris* — 12,5—100, *Klebsiella pneumoniae* — 6,3—12,5, *P. aeruginosa* — 12,5—50 мкг/мл соответственно.

Несмотря на умеренную активность *in vitro*, сорбистины активны *in vivo* при экспериментальных инфекциях, вызванных *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *P. aeruginosa*. Токсичность обоих антибиотиков невелика. Они оказывают выраженное тормозящее действие на штаммы бактерий, резистентные к другим аминогликозидам и, по-видимому, устойчивы к большинству известных до настоящего времени энзимов, инактивирующих аминогликозидные антибиотики. Все изложенное дает основание считать эту группу веществ перспективной для клинического применения.

**β-Лактамные антибиотики.** Одним из главных объектов в современных программах скрининга являются β-лактамные антибиотики, обладающие ценными химиотерапевтическими качествами. До 1971 г. их единственными известными продуцентами были грибы, в связи с чем высказывалось предположение, что синтез β-лактамных антибиотиков, угнетающих рост прокариотов, свойствен только эукариотам. В 1971 г. способность к образованию соединений этой группы была обнаружена у актиномицетов и фитопатогенных бактерий «*P. tabaci*» [470].

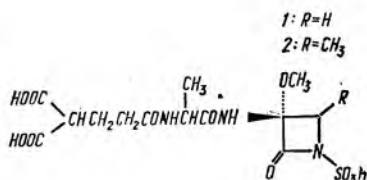
Экстрацеллюлярные токсины «*P. tabaci*» (а также, как было показано позже, некоторых других фитопатогенных видов псевдомонад) представляют собой смесь дипептидов — табтоксина и его серинового аналога. Вещества содержат β-лактамную группировку; они легко изомеризуются в изотабтоксины.



Рассматриваемые соединения высокотоксичны для бактерий, водорослей, высших растений и млекопитающих. Уже 0,05 мкг табтоксина вызывает образование некрозов на листьях табака.

В 1981 г. Кинтака и соавт. [285, 286] сообщили о выделении из бактерий рода *Pseudomonas* антибиотика β-лактамной природы. Продуцент нового антибиотика сульфазецина получил название «*P. acidophila*». Отличительной особенностью этого вида является способность к росту при низких значениях pH, что крайне редко встречается у псевдомонад. Сульфазецин — водорастворимый анти-

биотик, содержащий серу, аланин, глютаминовую кислоту и представляющий собой 3 (R)-3γ-d-глутамин-d-аланил-амино-3-метоксиазетидин-2он-сульфоновою кислоту.



Сульфазецин из «*P. acidophila*» (1)  
и антибиотик ММ 42842 из *P. coccineus* (2)

Он высокоактивен в отношении грамотрицательных бактерий; на грамположительные действует слабо (табл. 33). Изомер антибиотика изосульфазецин, образуемый близким ацидофильным видом «*P. mesoacidophila*», отличается от сульфазецина наличием в молекуле *l*-аланина вместо *d*-аланина. Эта замена ведет к значительному снижению антибиотической активности.

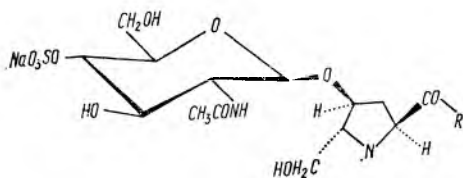
Сульфазецин проявил высокий химиотерапевтический эффект при инфекциях, вызванных грамотрицательными микроорганизмами, например *E. coli* O-111, и низкую токсичность. Он нечувствителен к пенициллиназе и лишь частично инактивируется цефалоспориной, однако в значительно меньшей степени, чем бензилпенициллин, цефалоспорин, цефамидин. Таким образом, по чувствительности к β-лактамазам он представляет собой β-лактам-

Таблица 33. Спектр антимикробного действия сульфазецина и изосульфазецина (по [254])

Тест-микроорганизм	Минимальная концентрация, ингибирующая рост, мкг/мл	
	Сульфазецин	Изосульфазецин
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	800	1600
Мутант <i>P. aeruginosa</i> , утративший хромосомную β-лактамазу	0,78	0,78
<i>Escherichia coli</i>	12,5	100
Мутант <i>E. coli</i> , лишенный β-лактамазы	0,39	0,78
<i>Proteus vulgaris</i>	0,25	100
<i>Salmonella typhi murium</i>	6,25	100
<i>Serratia marcescens</i>	25	100
<i>Alcaligenes faecalis</i>	25	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	200	200
<i>Bacillus subtilis</i>	50	100
<i>Candida albicans</i>	>800	>800
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>800	>800
<i>Penicillium chrysogenum</i>	>800	>800

ный антибиотик второго поколения. Получены антибиотически активные полусинтетические производные сульфазецина [445]. Почвенный микроорганизм, идентифицированный как *P. cosoვენepans*, синтезировал антибиотик ММ 42 842, относящийся к семейству монобактамов и близкий по строению к сульфазецину [121]; различия между этими антибиотиками состоят в наличии метильной группы при 4-м атоме углерода (см. выше). Как упоминалось, штаммы *P. cosoვენepans* являются продуцентами гетероциклического антибиотика токсофлавина. Продуцент нового монобактама был сравнен с коллекционным штаммом *P. cosoვენepans* NCIB 9450, а также со штаммами «*P. acidophila*» и «*P. mesoacidophila*», образующими сульфазецин и изосульфазецин. Установлено значительное сходство их фенотипических свойств, включая толерантность к низким значениям pH.

Наряду с антибиотиками-монобактамами штаммы «*P. mesoacidophila*» и *P. cosoვენepans* образуют группу своеобразных биологически активных метаболитов бульгечинов.



Бульгечины (*P. mesoacidophila*)

Будучи антимикробно неактивными, бульгечины А, В, С в то же время резко усиливают антимикробное действие  $\beta$ -лактамных антибиотиков на грамотрицательные микроорганизмы, вызывая у последних изменения морфологии (множественные выпячивания оболочек) и лизис клеток [449]. Бульгечины являются сульфацированными гликопептидами. Их молекулы содержат *d*-глюкозамин и новое производное пролина; в составе бульгечинов А и В имеются соответственно таурин и  $\beta$ -аланин.

Сульфазецин явился первым представителем монобактамов — нового класса моноциклических  $\beta$ -лактамных антибиотиков, найденных позднее наряду с бактериями рода *Pseudomonas* у микроорганизмов родов *Agrobacterium*, *Chromobacterium* и *Gluconobacter* [478]. Обнаружение этого класса веществ у различных представителей близких родов грамотрицательных бактерий послужило основанием для предположения об их широком распространении в природе. Монобактамы, их синтетические аналоги и полусинтетические производные оказались перспективными для медицинского применения, а некоторые из них (азтреонам и др.) уже используются в клинической практике как антибиотики резерва.

По-видимому, существуют перспективы использования некоторых видов *Pseudomonas* и для синтеза другой группы высокоактивных  $\beta$ -лактамных антибиотиков — цефалоспоринов. Так, интактные клетки «*P. melanogena*» были с успехом использованы для энзима-

тического синтеза цефалоспоринов из метилового эфира *d*-фенилглицина и рацемата 1-карбацефемового ядра [222]. Продукты энзиматического превращения обладали после химического ацилирования активностью цефалоспоринов третьего поколения.

Псевдомонады являются одними из немногочисленных родов бактерий, из которых получены к настоящему времени антибиотик β-лактоны. Примером их может служить обافلорин, синтезируемый штаммом *P. fluorescens* SC 12 936 [511].

Таким образом, к настоящему времени из бактерий рода *Pseudomonas* выделено более 50 антибиотических веществ самого разнообразного химического строения — от простых соединений, полученных ранее синтетическим путем, до оригинальных по структуре сложных молекул, представляющих собой новые классы органических соединений. Выделение этих веществ проводилось химиками, далекими от проблем систематики микроорганизмов. Как правило, объектом исследований служил один штамм-продуцент. Распространение способности к синтезу антибиотика у культур определенного вида не исследовалось, и чаще всего оценить на основании литературных данных таксономическую ценность этого признака невозможно.

Возникает вопрос: связана ли с таксономическим положением псевдомонад их способность к синтезу тех или иных антибиотических веществ? Здесь, по-видимому, не может быть однозначного ответа. Достаточно сослаться на *P. aeruginosa*, из которого к настоящему времени выделено более 30 антибиотических веществ, однако только способность к синтезу пиоцианина и нескольких других соединений является видовым признаком. Этот пигмент образуется подавляющим числом штаммов *P. aeruginosa*, но не свойствен другим видам *Pseudomonas*. Для красной разновидности этого вида характерны уникальные по структуре и ни из каких других объектов не выделенные аэругинозины А и В. По-видимому, видоспецифична и способность синегнойных бактерий к синтезу хинолиновых алкалоидов псевданов, имеющих, по литературным данным, в клетках всех исследованных штаммов этого вида. Как видно из представленных выше данных, штаммы «*P. acidophila*», «*P. mesoacidophila*» и *P. sosovepans* сходны как по своим свойствам (отличающим их от других видов псевдомонад), так и по структуре синтезируемых антибиотиков. Таким образом, способность к синтезу сульфазецина и его аналогов, по-видимому, может рассматриваться как хемотаксономический критерий.

Нашими исследованиями установлено, что образование некоторых классов органических соединений, целых «семейств» близких по структуре веществ (2-оксифеназинов, флороглюцинов и др.) может служить одним из хемотаксономических критериев и быть использовано в диагностике отдельных видов *Pseudomonas*. Выявленные закономерности не только представляют ценность для идентификации бактерий, но могут оказаться полезными при изыскании среди микроорганизмов рода *Pseudomonas* определенных классов биологически активных соединений.

**БАКТЕРИОЦИНОПОДОБНЫЕ ВЕЩЕСТВА  
БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS**

Бактериоцины — вещества белковой природы, избирательно угнетающие штаммы образующего их или близкородственных видов [58, 257, 298, 497]. Эти особенности отличают бактериоцины от «истинных» антибиотиков, рассмотренных нами в предыдущих главах. Помимо узкого спектра действия и наличия белковой части в составе молекулы для бактериоцинов характерны устойчивость продуцентов к синтезируемому антибиотику, бактерицидный тип действия, адсорбция на специфических рецепторах, летальный биосинтез (образование бактериоцина данной конкретной клеткой ведет ее к гибели). Во многих случаях способность к синтезу бактериоцинов детерминируется плазмидами. Спонтанная продукция бактериоцинов усиливается при обработке УФ-лучами, добавлении перекисей, митомицина С и других ДНК-тропных веществ.

Группа бактериоцинов (даже если ограничить их рамки бактериоциноподобными веществами, образуемыми бактериями рода *Pseudomonas*) объединяет вещества, разнообразные по спектру действия и физико-химическим свойствам. Некоторые из них отличаются по характеристикам от приведенных выше определений. Так, пиоцины — бактериоцины *P. aeruginosa* — характеризуясь в целом узким спектром действия, могут в то же время взаимодействовать с клетками *Neisseria gonorrhoeae*, что связано с наличием специфических рецепторов на поверхности последних [358]. Более того, по данным Фаркаш-Химсли [175], некоторые бактериоцины, в том числе и пиоцины, взаимодействуют с опухолевыми клетками, что позволило этому автору рассматривать их как специфические антибиотики широкого спектра действия.

Разнообразие веществ, объединяемых в рассматриваемую группу антибиотиков, затрудняет их классификацию. Согласно Бредли [122], существуют две группы бактериоцинов: к первой относятся вещества S-типа, обычно термостабильные, не способные к седиментации при ультрацентрифугировании, чувствительные к протеолитическим ферментам и не структурированные при электронно-микроскопическом изучении. Вторая группа объединяет бактериоцины R-типа, не чувствительные к протеазам, хорошо седиментирующиеся, сходные по морфологии с хвостами бактерио-



фага, что обнаруживается при электронной микроскопии. Обе группы характеризуются наличием белковой части в составе молекулы.

Согласно Израиль [257], к первой группе бактериоцинов относятся некорпускулярные неседиментирующиеся вещества различного химического строения, термоустойчивые и чувствительные к трипсину. Этим автором выделяется и третья, промежуточная группа — некорпускулярные вещества белковой природы, устойчивые к действию трипсина и инактивирующиеся при нагревании. Вполне вероятно существование и других типов бактериоцинов, не укладываемых в данную классификацию.

У бактерий рода *Pseudomonas* явление бактериоциногенности впервые описано Жакобом [260], который обнаружил способность штаммов *P. aeruginosa* синтезировать вещество, отличное от пиоцианина. Синтез этого агента, впоследствии названного пиоцином (аэругиноцином), стимулировался УФ-облучением. Были исследованы некоторые физико-химические свойства пиоцина и показано его отличие от бактериофагов. В опытах Хамона [217] 10 из 15 штаммов синегнойных бактерий были способны к синтезу пиоцинов. Все они характеризовались термолабильностью, устойчивостью к действию ДНКазы и УФ-облучения, наличием антигенных свойств, способностью осаждаться ацетоном и сульфатом аммония. Различные пиоцины отличались один от другого спектром действия, скоростью диффузии в агар, чувствительностью к протеолитическим ферментам. В дальнейшем при исследовании явления бактериоциногенности и лизогенности у бактерий рода *Pseudomonas* было показано, что пиоцины могут ингибировать от 2 до 7 индикаторных штаммов своего вида, а некоторые штаммы *P. aeruginosa* воздействовали также на 1—2 штамма *P. fluorescens* [218].

К настоящему времени явление бактериоциногенности у *P. aeruginosa* изучено достаточно подробно. Разработаны классификация и методы пиоцинотипирования штаммов *P. aeruginosa*, получены очищенные препараты пиоцинов, изучены их тонкая структура, иммунологические свойства, генетические детерминанты, условия биосинтеза, механизм действия. Однако если бактериоцинам *P. aeruginosa* посвящена обширная литература, у других видов псевдомонад эта группа антибиотиков изучена значительно слабее.

Хамон и соавт. [218] среди исследованных ими штаммов *P. fluorescens*, *P. stutzeri* и *P. putida* обнаружили способность к синтезу бактериоцинов, названных ими флюоцинами, у 12 штаммов *P. fluorescens*. Флюоцины были термолабильны, трипсинрезистентны и высокоспецифичны в отношении штаммов своего вида, не действовали на синегнойную палочку. Эти данные не были, однако, подтверждены исследованиями Паттерсон [399], в опытах которой штаммы *P. fluorescens* не обладали бактериоциногенными свойствами и не были чувствительны к бактериоцинам *P. aeruginosa*. Паттерсон не удалось найти бактериоцины и у штаммов «*P. ovalis*». В то же время ею было показано широкое распространение явления бактериоциногенности у штаммов *P. aeruginosa* и проведено

на основании спектра действия пиоцинов разделение 25 штаммов этого вида на 4 группы. Это была одна из первых попыток классифицировать микроорганизмы рода *Pseudomonas* в соответствии с их бактериоцинотипами.

Относительно подробно изучено явление бактериоциногенности у фитопатогенных видов рода *Pseudomonas* [218, 335]. Штаммы фитопатогенных псевдомонад были распределены на 11 групп по характеру образуемых ими бактериоциноподобных веществ. Первую и вторую группы образовали продуценты фазеолицинов — штаммы «*P. phaseolicola*», третью — пятую — штаммы «*P. glycinea*», синтезирующие глицины, и наконец, шестую — одиннадцатую — штаммы *P. syringae*, образующие сирингацины.

Исследование явления бактериоциногенности у фитопатогенного вида *P. solanacearum* затруднено из-за обильного образования слизи. Однако исследователям удалось наблюдать бактериоциногенную активность у штамма *P. solanacearum* К-60 и его авирулентного не продуцирующего слизи варианта В-1. Эти микроорганизмы подавляли рост 84 % штаммов собственного вида, но не влияли на другие виды псевдомонад и на штамм-продуцент [155].

Генетически близкий *P. solanacearum* вид *P. serasia* также способен к образованию бактериоциноподобных веществ. Гонзалес и Видэвер [196] пришли к выводу, что активные вещества этой группы синтезируются лишь фитопатогенными штаммами *P. serasia*, а клинические изоляты в их опытах такой активностью не обладали. Однако Гован и Харрис [204] обнаружили способность к синтезу бактериоцинов (сепациацинов) и у клинических изолятов *P. serasia*. Исследовав 373 штамма этого вида, авторы создали схему их бактериоцинотипирования, что позволило классифицировать 95 % исследованных культур.

Для выделения, очистки и изучения бактериоцинов широко применяются методы белковой химии: ультрацентрифугирование и ультрафильтрация, ионообменная и гель-хроматография, препаративный электрофорез, аминокислотный анализ и др. Многие бактериоцины высокочувствительны к повышению температуры, перепадам pH, действию протеаз, находящихся в культуральной жидкости. Различные методы выделения и обработки в шадящих условиях позволяют очистить бактериоцины в несколько тысяч раз.

Так, сирингацин 4-а был очищен в 1029 раз, а его специфическая активность составляла  $3,5 \cdot 10^{13}$  летальных единиц на 1 мг белка [214]. Удельная активность пиоцина S-типа составляла после очистки  $7,8 \cdot 10^4$  ед/мг белка [434]; сирингацин W —  $1,6 \cdot 10^6$  ед/мг белка [457]. Как видно из этих данных, удельная активность очищенных бактериоцинов весьма различна, что объясняется не только исходной активностью продуцента, но и количеством молекул антибиотика, необходимых для гибели одной клетки чувствительного штамма. На одну летальную единицу пиоцина R-типа приходится 1—2 молекулы, пиоцина F-типа — 280 молекул, а для пиоцина S-типа — более 300 [305].

Таблица 34. Основные группы бактериоцинов из бактерий рода *Pseudomonas*

Продуцент	Название бактериоцинов	Тип	Химический состав
<i>P. aeruginosa</i>	Пиоцины R <sub>1</sub> — R <sub>4</sub>	R	Белок
	Пиоцины F <sub>1</sub> — F <sub>4</sub>	F	»
	Пиоцины AP41 AP108 и др.	S	»
	Пиоцины P 25 P 50 P 70	Отличаются от остальных типов пиоцинов	Белок, ковалентно связанный с углеводной частью
<i>P. syringae</i> 44	Сирингацин 4-A		Белково-углеводный комплекс
<i>P. syringae</i> <i>p. v. syringae</i> <i>P. solanacearum</i>	Сирингацин W-1	Близок к пиоцинам R-типа Близок к пиоцинам S-типа	То же
<i>P. ceratia</i>	Сепациацины	То же	Не изучен
<i>P. fluorescens</i>	Флюоцины		Не

Примечание. (+) — чувствительны к протеазам, термолабильны; (—) — устойчивы к

По строению и размерам молекулы бактериоцины бактерий рода *Pseudomonas* представляют собой обширную и разнообразную группу веществ (табл. 34). Наиболее детально изучены в этом отношении пиоцины. Описано три класса пиоцинов: R-, F- и S-типов [136]. Пиоцины R-типа — крупные частицы, представляющие собой белковую молекулу с молекулярной массой  $1 \cdot 10^7$  Д. В УФ-области спектр пиоцина R-типа типичен для белков. Изучение аминокислотного состава показало наличие аланина, аспарагина, глицина, глутамина и лейцина. Цистеин, гистидин, метионин и тирозин содержатся в незначительных количествах.

Электронно-микроскопическая структура пиоцинов R-типа изучена достаточно подробно [202]. Палочковидная структура 120 нм длиной и 15 нм шириной представляет собой двухслойный цилиндр, состоящий из кора и оболочки, которая способна к сокращению. При нарушении структур происходит полная потеря биологической активности. Будучи сходными по строению с хвостом T-четного бактериофага, бактериоцины R-типа отличаются от него отсутствием головки и неспособностью репродуцироваться в клетке хозяина.

Известные к настоящему времени пиоцины R-типа сходны по морфологии, физико-химическим свойствам и антигенной структуре, имеют в своем составе белковые субъединицы, сходны по механизму действия (ингибируют синтез белка и нуклеиновых кислот), но отличаются по спектру действия.

Структура	Молекулярная масса, Д	Чувствительность к протеазам	Чувствительность к воздействию температуры
Палочковидная, корпускулярная, способная к сокращению. Сходна с хвостом Т-четного колифага	$1 \cdot 10^7$	—	+
Корпускулярная, не способная к сокращению, сходная с хвостом фага	$3,32 \cdot 10^6$	—	+
Некорпускулярная, структур, видимых в электронный микроскоп, не имеет	$1 \cdot 10^5$	—	—
Не изучена	$2,4 \cdot 10^6$	—	+
	$1,3 \cdot 10^6$	—	—
	$1,2 \cdot 10^6$	—	—
» »	$1,7 \cdot 10^7$	—	+
Корпускулярная, сходная с пиоцинами R-типа	Близка к сирингацину 4А	—	+
Некорпускулярная	$6,5 \cdot 10^4$	+	—
Корпускулярная, способная к сокращению	Не изучена	—	—
изучены		+	—

протеазам, термостабильны.

Пиоцины F-типа сходны морфологически и представляют собой палочки, к концу которых прикрепляются фибриллоподобные структуры [305]. Общие антигены пиоцинов F-типа содержатся в палочкообразных структурах, в то время как специфические связаны с фибриллами. Молекулярная масса одной частицы пиоцина  $3,32 \cdot 10^6$  Д. Изучена тонкая структура пиоцинов F, молекулярные массы и аминокислотный состав образующих их белков.

В отличие от двух описанных выше высокомолекулярных типов бактериоцинов пиоцины S-типа не имеют структур, видимых в электронный микроскоп, быстро диффундируют в агар, высокочувствительны к действию протеаз. Их молекулярная масса не превышает 100 000 Д.

Пиоцинам S-типа близок бактериоцин *P. solanacearum* [155], не способный к седиментации термостабильный белок с молекулярной массой 65 000 Д.

Сирингацин W-1 сходен с пиоцинами R-типа. Это палочкоподобная структура 20-75 нм, имеющая внутренний кор и наружную оболочку. В составе сирингацина 67,2 % белка и до 35 % углеводов, однако углеводная часть не является обязательной для проявления биологической активности. Аминокислотный анализ белковой части показал высокое содержание аланина, аспарагиновой, глутаминовой кислот и глицина [457].

По данным Гована и Харриса [204], бактериоцины *P. serasia* также сходны с пиоцинами R-типа. При электронной микроскопии осадка, полученного ультрацентрифугированием культуральной жидкости штаммов *P. serasia*, эти авторы наблюдали сокращенные, подобные хвостам бактериофага частицы сепациацинов.

Вопросы генетического детерминирования бактериоцинов у бактерий рода *Pseudomonas* изучены недостаточно, что связано с ограниченностью знаний об их генетической организации в целом, исключая *P. aeruginosa*. В то же время известно, что у многих других групп микроорганизмов синтез бактериоцинов кодируется плазмидами. Японскими авторами было установлено, что генетическая информация, ответственная за синтез пиоцинов R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> и R<sub>3</sub>, расположена на бактериальной хромосоме вблизи триптофанового маркера и тесно с ним связана [272, 273].

Среди практических аспектов приложения явления бактериоциногенности следует в первую очередь назвать типирование клинических штаммов бактерий. Особенно широкое распространение получил метод пиоцинотипирования, что связано с необходимостью четкого распознавания циркулирующих в стационарах возбудителей синегнойной инфекции. Схемы и методы пиоцинотипирования *P. aeruginosa* разработаны Гиллис и Гован [192], Джонс с соавт. [270], Мороз с соавт. [64] и широко используются практическими лабораториями в нашей стране и за рубежом. Как упоминалось ранее, разработаны и пути бактериоцинотипирования клинических изолятов *P. serasia* [204]. Успешным оказалось использование для пиоцинотипирования высокоочищенных пиоцинов НСР 2Р и НСР 2F, что обеспечивало четкие, легко воспроизводимые результаты и полностью исключало ошибки, связанные с лизогенностью культур [136].

Явление бактериоциногенности может быть использовано и для идентификации штаммов псевдомонад, вызывающих болезни растений. Так, применение в качестве индикаторов высокочувствительных к бактериоцинам штаммов на специальной селективной среде было предложено для выделения и идентификации *P. solanacearum* [513].

По-видимому, существуют определенные перспективы использования бактериоцинов для профилактики и терапии инфекций [6]. Иллюстрацией может служить сообщение о защитном действии пиоцинов при инфекции, вызванной антибиотикорезистентным штаммом *P. aeruginosa* [339].

Одним из перспективных направлений применения бактериоцинов в сельском хозяйстве является их использование в целях профилактики и борьбы с некоторыми заболеваниями растений [354, 496, 497]. Обработка листьев бобовых очищенным препаратом сирингацина А-4 или W-1 перед заражением их фитопатогенным штаммом «*P. phaseolicola*» приводила к полному исчезновению жизнеспособных клеток патогена, а обработка семян соевых бобов препаратом сирингацина А-4 — к увеличению их всхожести на 20 %. При введении в стебель бобовых штамма — продуцента си-

Таблица 35. Внутривидовой антагонизм у различных видов бактерий рода *Pseudomonas*

Вид бактерий	Всего испытано штаммов	Из них рост штаммов своего вида подавляли	Вид бактерий	Всего испытано штаммов	Из них рост штаммов своего вида подавляли
<i>P. aeruginosa</i>	5	2	<i>P. mendocina</i>	5	1
<i>P. fluorescens</i>			« <i>P. rathonis</i> »	5	0
биовар I	5	1	<i>P. fragi</i>	1	0
биовар II	5	2	« <i>P. denitrificans</i> »	1	0
биовар III	5	0	<i>P. taetrolens</i>	1	0
биовар V	5	1	<i>C. acidovorans</i>	5	0
биовар VI	5	5	<i>C. testosteroni</i>	5	0
<i>P. aurantiaca</i>	5	0	<i>P. cepacia</i>	4	3
« <i>P. lemonnierii</i> »	5	2	<i>X. maltophilia</i>	5	5
<i>P. aureofaciens</i>	5	0	<i>P. vesicularis</i>	2	0
<i>P. chlororaphis</i>	2	0	<i>P. pickettii</i>	1	0
<i>P. putida</i>	10	4	<i>P. paucimobilis</i>	1	0
<i>P. syringae</i>	5	1	<i>P. saccharophila</i>	1	0
<i>P. alcaligenes</i>	3	0	<i>P. glathei</i>	1	0
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	5	4	<i>P. mesophilica</i>	1	0
<i>P. stutzeri</i>	2	1	<i>Pseudomonas</i> spp.	18	0

рингацина W-1 — совместно с чувствительным к нему фитопатогенным штаммом рост последнего тормозился, что было вызвано синтезом бактериоцина в тканях растений [456]. По-видимому, использование сапрофитных бактериоциногенных штаммов — один из плодотворных подходов в биологической защите растений от возбудителей заболеваний.

Резюмируя исследования по бактериоциноподобным веществам бактерий рода *Pseudomonas*, следует отметить, что подобно продуцентам «истинных» антибиотиков из продуцентов бактериоцинов наиболее изучены виды флюоресцирующей группы, и прежде всего — *P. aeruginosa*. У большинства видов псевдомонад бактериоцины до настоящего времени не обнаружены, что, безусловно, является пробелом в характеристике их биологической активности.

Приступая к анализу бактериоциногенных свойств различных видов рода *Pseudomonas*, мы прежде всего поставили перед собой задачу изучить взаимоотношения штаммов внутри отдельных видов псевмонад. Для этих исследований было взято по 5 штаммов каждого вида или биовара у таких крупных видов, как *P. fluorescens* и *P. putida*, причем их испытывали в качестве продуцентов бактериоцинов и в качестве индикаторных на эти антибиотики культур. Способность к синтезу бактериоциноподобных веществ изучали методом отсроченного антагонизма [498]. Результаты исследований представлены в табл. 35.

Большинство флюоресцирующих видов (*P. aeruginosa*, *P. putida*, отдельные биовары *P. fluorescens*) характеризовалось ярко выра-

женным внутривидовым антагонизмом, значительно тормозя либо полностью задерживая рост штаммов своего вида.

Среди нефлюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas* внутривидовой антагонизм наблюдался у штаммов *P. pseudoalcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *X. maltophilia*. Последние были особенно активны: все испытанные нами штаммы *X. maltophilia* ингибировали рост представителей своего вида и в то же время сами были высокочувствительны к выделяемым ими литическим агентам.

Таким образом, уже на первом этапе исследований нам удалось обнаружить способность к синтезу бактериоциноподобных веществ не только у штаммов *P. aeruginosa* и *P. fluorescens*, у которых они были описаны ранее, но и у некоторых видов рода *Pseudomonas*, с этой стороны не описанных или не изученных.

Дифференциация явления бактериоциногенности от бактериофагии, бактериоциногенных культур от лизогенных представляет определенные методические трудности. Нам не удавалось перенести литический агент из зон лизиса на свежую среду с тест-культурой, что свидетельствует об его бактериоциногенной природе. При титрации культуральных жидкостей на газоне с тест-культурами мы неизменно наблюдали уменьшение размеров зон лизиса и возрастание степени их мутности (в то время, как при титрации фага на газоне наблюдались бы литические «бляшки», число которых в разведениях прогрессивно снижается). Все изложенное позволяет предположить, что мы имели дело с явлением бактериоциногенности.

Далее нами была изучена антагонистическая активность отобранных продуцентов в отношении других видов рода *Pseudomonas*. Как правило, бактериоциноподобные вещества, образуемые штаммами видов I секций, тормозили рост генетически близких им видов той же секции, но не действовали на представителей других секций (рис. 22, 23, см. на вклейке). В то же время некоторые штаммы *P. serasia* обладали широким спектром действия в отношении многих тест-микроорганизмов рода *Pseudomonas*.

Наблюдаемый антагонистический эффект мог быть обусловлен синтезом бактериями низкомолекулярных антибиотиков, описанных другими авторами и найденных нами у *P. serasia*. Поэтому мы попытались отобрать среди штаммов названного вида продуценты антибиотических веществ с высокой молекулярной массой, превышающей 10 000—12 000 Д, т. е. не способные к диффузии через целлофан. Эти исследования были проведены на 34 штаммах *P. serasia*, выделенных из клинических источников и из ризосферы растений. Антибиотические вещества, не способные к диффузии через целлофан, синтезировало 48 % культур. При этом угнетающее действие наблюдалось только в отношении штаммов собственного вида.

В дальнейшем, используя стандартный набор продуцентов бактериоцинов (СР) и индикаторных к ним культур (СS), любезно предоставленных нам профессором Гованом, мы провели типирование штаммов *P. serasia* как по чувствительности к бактериоци-

Т а б л и ц а 36. Чувствительность штаммов *Pseudomonas* серасіа к стандартному набору сепациацинов

Номер штамма	Действие на исследуемые штаммы стандартного набора продуцентов сепациацинов						Тип чувствительности к сепациацинам (S)
	CP <sub>1</sub>	CP <sub>2</sub>	CP <sub>3</sub>	CP <sub>4</sub>	CP <sub>5</sub>	CP <sub>6</sub>	
3187	+	+	+	—	+	—	6
3189	+	—	+	—	+	—	28
4013	—	—	—	—	—	—	H-3
4137	+	+	+	+	+	+	26
4176	—	—	+	—	—	—	H-2
4199	+	—	—	—	—	—	25
4200	—	+	+	—	—	+	H-4
4201	+	—	+	—	+	—	28
4202	—	—	—	—	—	—	H-3
4203	—	+	—	—	—	—	27
4204	—	—	—	—	+	—	21
4205	—	—	+	—	—	—	H-2
4207	+	+	+	—	+	—	6
4208	+	—	—	—	+	—	H-1
4209	—	+	—	—	—	—	27
4210	+	+	+	—	—	—	1
4211	—	—	—	—	—	—	H-3
4213	—	—	—	—	—	—	H-3
4214	+	—	—	—	—	—	25
4215	+	+	—	—	—	—	8
4216	+	—	—	—	+	—	H-1
5757	+	+	+	—	+	—	6
5758	+	+	+	—	+	—	6
5767	+	+	—	—	—	—	8
5768	+	+	—	—	—	—	8
5769	+	+	+	—	+	+	16
5772	—	—	+	—	—	—	5
5779	—	—	—	—	—	—	H-3
5795	+	+	—	—	+	—	17
5798	+	+	+	—	+	+	16
5874	+	+	+	—	—	+	27
5877	+	+	+	—	—	—	1
5979	+	+	+	—	+	+	16
5980	+	+	+	—	+	+	16

нам (табл. 36), так и по способности к их продукции [19]. Типовой штамм *P. серасіа* ИМВ 4137 соответствовал в наших опытах типу  $P_0/S_{26}$ . Ряд штаммов, как ризосферных, так и клинического происхождения, соответствовал типам:  $P_{12}/S_{27}$ ,  $P_8/S_8$ ,  $P_0/S_6$ ,  $P_0/S_{26}$ ,  $P_3/S_{27}$ ,  $P_0/S_{28}$ ,  $P_0/S_1$ ,  $P_0/S_{16}$  (2 штамма),  $P_0/S_{26}$ , а некоторые S- либо P-типам, описанным ранее. И наконец, 8 культур относились к новым группам как по чувствительности, так и по продукции к бактериоцинам (табл. 37). Из них только штамм *P. серасіа* 5779 был выделен из ризосферы, остальные 7 штаммов имели клиническое происхождение.

Бактериоциноподобные вещества, описанные до настоящего времени у *P. серасіа*, были трипсинрезистентны и напоминали по своему строению пиоцины R-типа *P. aeruginosa*. Среди обнаруженных



Таблица 37. Характеристика штаммов *Pseudomonas seracia* по способности к продукции бактериоцинов

Номер штамма	Влияние на стандартный набор индикаторных штаммов								Тип образуемого бактериоцина (Р)
	CS <sub>1</sub>	CS <sub>2</sub>	CS <sub>3</sub>	CS <sub>4</sub>	CS <sub>5</sub>	CS <sub>6</sub>	CS <sub>7</sub>	CS <sub>8</sub>	
3187	—	—	—	+	+	+	—	—	Новый 0
3189	—	—	—	—	—	—	—	—	Новый 0
4013	—	+	+	—	—	+	—	—	Новый 0
4137	—	—	—	—	—	—	—	—	0
4176	—	—	—	—	—	—	—	—	0
4199	—	—	—	—	—	—	—	—	0
4200	—	—	—	—	—	—	—	—	Новый 0
4201	—	—	—	—	—	—	—	—	0
4202	+	—	+	+	—	—	—	—	Новый 3
4203	—	—	—	+	+	+	+	—	Новый А
4204	+	+	—	—	+	+	+	—	Новый А
4205	—	—	+	—	—	—	—	—	Новый 12
4207	—	—	+	—	—	—	—	—	Новый А
4208	—	—	+	—	+	—	—	—	Новый А
4209	+	—	—	—	—	+	—	—	Новый 10
4210	—	—	—	—	+	—	—	—	Новый А
4211	—	—	+	—	—	—	—	—	Новый А
4213	—	—	+	—	—	+	—	+	Новый А
4214	—	—	+	—	—	—	—	—	0
4215	—	—	—	—	—	—	—	—	10
4216	—	—	—	—	—	+	—	+	В
5757	—	—	—	—	—	—	+	—	0
5758	—	—	—	—	—	—	—	—	Новый 0
5767	—	—	+	—	—	—	+	—	Новый 0
5768	—	—	—	—	—	—	—	—	Новый 0
5769	—	—	—	—	+	+	+	—	Новый 0
5772	—	—	+	+	—	+	—	—	»
5779	—	—	+	—	+	—	+	—	»
5795	—	+	—	—	—	—	—	—	»
5798	—	—	—	—	—	—	—	—	0
5874	—	—	+	—	—	—	—	—	А
5877	—	—	—	—	—	—	—	—	0
5979	—	—	—	—	—	—	—	—	0
5980	—	—	—	—	—	—	+	—	В

нами бактериоциноподобных веществ были чувствительные к трипсину и проназе (рис. 24, см. на вклейке). К их числу относится и антибиотик, образуемый штаммом *P. seracia* 5779. Его продуцент принадлежит к новому, ранее не описанному бактериоцино типу как по чувствительности к бактериоцинам, так и по их продукции. Все изложенное побудило нас более подробно исследовать сепациацию 5779.

Синтез активного вещества происходил на агаризованных и жидких средах в условиях аэрации, стимулировался УФ-лучами и митомицином С. Ультрацентрифугирование при 75 тыс. *g* и последующая гель-фильтрация на колонке с Sepharosa-6В позволили очистить препарат бактериоцина в 8000 раз и повысить его активность до  $1,26 \cdot 10^7$  ед/мг белка.

Очищенный препарат бактериоцина был термолабилен (полностью инактивировался при 60 °С), имел  $\lambda_{\max}$  271 нм, содержал 77 % белка и 23 % углеводов, что сближает его с сирингацинами А-4 и W-1.

Белковая часть его молекулы содержала аланин, гистидин, серин и глютамин; в небольшом количестве встречались изолейцин, триптофан и орнитин. Активность сепацицина 5779 снималась добавлением к нему липополисахаридов, выделенных из индикаторного штамма *P. serasia* 3181. Аналогичный эффект был описан Гованом [202] для пиоцинов R-типа из *P. aeruginosa*. Последние не-обратно адсорбировались на липополисахаридах чувствительных штаммов, вследствие чего теряли свою биологическую активность.

Одновременное проявление термолабильности и чувствительности к протеазам выделяет бактериоцин 5779 из ряда известных бактериоциноподобных веществ и не позволяет отнести его к какой-либо из двух групп, охарактеризованных Бредли [122]. Возможно, он принадлежит к не описанному ранее типу бактериоциноподобных веществ.

Полученные результаты свидетельствуют о крайнем разнообразии бактериоциноподобных веществ, синтезируемых *P. serasia*, и позволяют предположить, что они исследованы далеко не полно. Можно ожидать, что выделение и изучение новых штаммов этого вида из различных природных и клинических источников позволит расширить круг известных бактериоциноподобных веществ, дополнить схемы бактериоцинотипирования бактерий, выяснить мало изученные вопросы экологии *P. serasia* и пути его распространения в природе.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКИХ  
СВОЙСТВ  
БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS  
ДЛЯ БОРЬБЫ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

При поиске новых антибиотиков изучение антагонистических свойств бактерий является первым этапом исследований, тем фундаментом, на котором получены важнейшие применяемые в клинике антибиотические вещества. Однако антагонистические свойства бактерий обусловлены не только синтезом антибиотиков, но представляют собой сложный комплекс, включающий образование антибиотических веществ, белковых соединений и пептидов группы бактериоцинов и микроцинов, литических и некоторых других ферментов, сидерофоров и других биологически активных соединений. Далеко не все слагаемые этого сложного явления к настоящему времени расшифрованы. Исследование антагонизма бактерий может оказаться полезным для решения проблем их экологии и систематики, а также для их использования в качестве средства биологической борьбы с вредителями сельскохозяйственных растений. Последнее, казалось бы чисто прикладное направление, может успешно развиваться, лишь опираясь на фундаментальные теоретические данные. Согласно Куку [149], биологический контроль представляет собой науку, синтезирующую данные экологии, таксономии, почвенной микробиологии, генетики растений и микроорганизмов, молекулярной биологии и цитологии, биохимии и физиологии растений.

В настоящей главе мы рассмотрим некоторые аспекты использования антагонистических свойств бактерий рода *Pseudomonas*, сосредоточив основное внимание на их антифунгальной активности.

Антагонистическая активность бактерий рода *Pseudomonas* привлекала внимание бактериологов еще на начальных этапах развития микробиологии. Начиная с 80-х годов прошлого столетия представители флюоресцирующей группы рода *Pseudomonas*, и прежде всего *P. aeruginosa* и *P. fluorescens*, неоднократно описывались как антагонисты патогенных микроорганизмов.

Обширная литература посвящена антифунгальным свойствам бактерий рода *Pseudomonas*. Литическое действие псевдомонад на почвенные грибы описано Я. П. Худяковым в 1935 г. Микроорганизмы, вызывающие это явление, названы миколитическими. Было показано, что *P. aeruginosa* и *P. fluorescens* — одни из наиболее активных видов в группе миколитических бактерий. Одновременно

была предпринята попытка использовать явление антагонизма для борьбы с грибными болезнями полезных растений. Культуры бактерий, лизирующих *Fusarium graminearum* и *Fusarium lini*, вносили в почву для борьбы с фузариозом пшеницы и льна. Позже для обозначения метода обработки семян миколитическими бактериями, защищающими растение от патогенных грибов, был предложен термин «бактеризация» [67, 91]. Испытания миколитических бактерий, в первую очередь *P. aeguginosa* и *P. fluorescens*, в борьбе с фузариозом различных сельскохозяйственных растений в лабораторных и вегетативных опытах дали положительные результаты.

Как антибактериальные, так и антифунгальные свойства других флюоресцирующих видов рода *Pseudomonas* значительно менее изучены. Высокая антагонистическая активность и широкий спектр антимикробного действия установлены отечественными авторами у *P. aurantiaca* [15, 65]. В опытах М. И. Нахимовской штаммы *P. aurantiaca* препятствовали прорастанию спор головки (*Ustilago avenae*, *Ustilago puda*, *Ustilago zeae* и др.). В настоящее время мы можем с достаточной уверенностью связать этот эффект с образованием антибиотиков — производных флороглюцина, выделенных нами из штаммов этого вида.

Несмотря на более чем полувековую историю, использование живых культур бактерий-антагонистов для борьбы с грибными заболеваниями растений не получило широкого распространения в связи с непостоянством наблюдаемого защитного эффекта. Причины этого кроются в сложности взаимоотношений между микроорганизмами ризосферы и растениями, а также в недостаточности наших знаний о ключевых факторах, контролирующих эти процессы. В последние годы рассматриваемое направление переживает новый этап развития. После продолжительного перерыва внимание исследователей вновь привлечено к использованию живых культур бактерий рода *Pseudomonas* в качестве средства борьбы с грибными заболеваниями растений. Установлено, что важную роль в защите растений от инфекции играют такие свойства псевдомонад, как способность к активной колонизации корневой системы и синтез разнообразных антифунгальных соединений.

Микроорганизмы, активно размножающиеся на корнях и получившие название ризобактерий, состоят из нескольких групп. Это «нейтральные» бактерии, не оказывающие влияния на растение; вредные (их от 8 до 15 %); угнетающие прорастание семян; уменьшающие длину корней, вызывающие на них некрозы и усиливающие инфекцию корней грибами и бактерии; стимулирующие рост растений (их всего 2—5 %) [442]. Например, было показано, что вредная микрофлора сахарной свеклы представлена родами *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, снижающими урожай на 21—49 %. Бактерии, стимулирующие рост растений, вытесняли эту вредную микрофлору с поверхности корней и уменьшали на 21—72 % количество грибов родов *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* и др. [292, 474].

При обработке ризобактериями семян сахарной свеклы их количество достигало  $10^5$  КОЕ (колониеобразующих единиц) на 1 см корней. В не обработанных бактериями контролях эти цифры составляли 90—600 КОЕ/см. Сходные данные были получены на картофеле, пшенице и многих других сельскохозяйственных культурах.

Использование ростстимулирующих ризобактерий позволило повысить урожай картофеля на 5—33 % [131, 148, 530, 531], сахарной свеклы — на 15 (при этом выход сахара повышался на 955—1227 кг/га) [474], пшеницы — на 26—29 [507, 508, 509], риса — на 3—160 % [341, 429] и т. д.

Было установлено, что наиболее активные ризобактерии принадлежат к видам *P. putida* и *P. fluorescens*. При этом, по данным одних авторов, они гетерогенны по свойствам и не соответствуют биоварам, описанным у *P. fluorescens* [442]; по данным других [531] — они чаще всего принадлежат к биоварам III и V *P. fluorescens*. Этот вывод подтверждается и нашими исследованиями.

Значительные успехи достигнуты в расшифровке механизма стимулирующего действия ризобактерий. Показано, что это действие связано с подавлением грибов и фитопатогенных бактерий антибиотиками и другими биологически активными метаболитами ризобактерий-антагонистов. Иллюстрацией может служить работа Хоуэлла и Стипановича [241, 242], которые использовали для защиты хлопка штамм *P. fluorescens* Pf-5. Последний синтезировал два антибиотика — пирролнитрин, угнетающий рост фитопатогенного гриба *Rhizoctonia solani*, и пиолотеорин, ингибирующий рост *Pythium ultimum* — важного патогена сеянцев хлопка. Обработка семян штаммом-антагонистом либо образуемыми им антибиотиками увеличивала выживаемость растений на 28—71 %.

Штамм *Pseudomonas* sp. 19 (идентифицированный затем как *P. fluorescens*) — продуцент феназин-1-карбоновой кислоты — был с успехом использован А. Д. Гарагулей для защиты пшеницы от корневой гнили, вызванной *Fusarium oxysporum* [15]. Позднее Томашов и Уэллер сообщили о выделении из ризосферы пшеницы штамма *P. fluorescens* 2-79, эффективного в качестве средства борьбы с заболеваниями ячменя и пшеницы, вызванными грибом *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Антифунгальный эффект был обусловлен синтезом феназин-1-карбоновой кислоты; мутанты, не образующие феназиновый пигмент, не обеспечивали защитного действия [484].

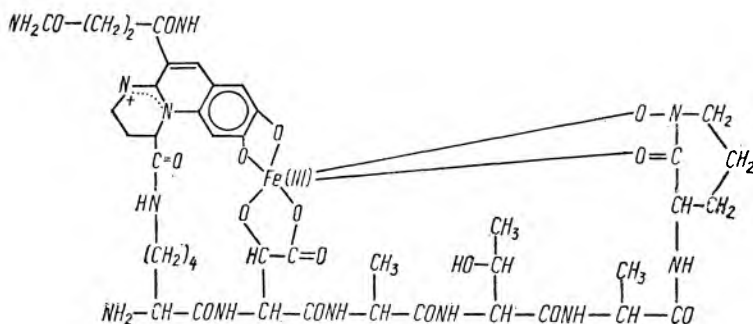
Цитированные работы — немногие, где антифунгальные свойства ризобактерий связывают с образованием антибиотических веществ. Подавляющее большинство исследований в этой области посвящено сидерофорам, синтезируемым бактериями рода *Pseudomonas* и играющим важную роль в ограничении численности патогенов.

Сидерофоры — соединения, осуществляющие транспорт железа, широко распространены у различных групп аэробных микроорганизмов. Многие из них обладают антибиотической активностью [376] либо являются факторами роста для некоторых бактерий.

Сидерофоры гидроксаматного типа выделены из грибов, дрожжей и бактерий, фенолятного типа — преимущественно из бактерий. Отличительной особенностью этих биологически активных соединений является их способность к образованию стабильных комплексов с трехвалентным железом [375].

К сидерофорам принадлежит и псевдобактин (пиовердин) — желто-зеленый флюоресцирующий пигмент бактерий рода *Pseudomonas*. Химическая природа этого соединения на протяжении многих десятков лет была предметом исследований и выяснена лишь в последние годы. К настоящему времени установлена роль псевдобактина в транспорте железа у *P. fluorescens* и других флюоресцирующих видов [342, 344]; установлено химическое строение пигмента и близких ему нефлюоресцирующих соединений [403, 483].

Молекулярная масса псевдобактинов, полученных из различных видов псевдомонад, составляет в среднем 1500 Д. Ниже представлен один из них, синтезируемый штаммом *P. fluorescens* В10.



Псевдобактин из штамма *P. fluorescens* В 10.

Главные компоненты молекулы — хинолиновый хромофор и 6-членная пептидная цепь, содержащая, в частности, необычной N<sup>5</sup>-оксиорнитин. Одновременно с псевдобактином *P. fluorescens* синтезирует нефлюоресцирующий сидерофор псевдобактин А, по-видимому, являющийся его предшественником и отличающийся некоторыми деталями строения хинолинового ядра.

Родственные псевдобактину сидерофоры из различных видов *Pseudomonas* отличаются числом и конфигурацией аминокислот пептидной цепи. Так, сидерофор из *P. aeruginosa* PAO1 содержит октапептид [512]. Установлено строение сидерофоров из *P. putida*, *P. syringae* [488] и других фитопатогенных псевдомонад [132]. Обладая высоким ( $K=10^{32}$ ) сродством к железу и образуя с ним стабильные комплексы, псевдобактин успешно конкурирует за этот элемент с сидерофорами фитопатогенных грибов, которые обладают более низкой константой связывания железа. Таким образом, его фунгистатическое действие связано с созданием дефицита железа для фитопатогенных грибов [149, 150, 290].

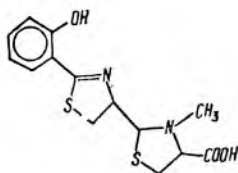
Препараты флюоресцирующих пигментов из сапрофитных и фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas* тормозили рост грибов

*Rhizoctonia colani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora megasperma* и др. Ингибирующий эффект снимался добавлением в среду солей железа. Антифунгальное действие наблюдалось не только при внесении в почву пигмента бактерий, но и при обработке семян растений живыми культурами микроорганизмов, синтезирующих этот пигмент. Связывание железа сидерофорами, образуемыми флюоресцирующими бактериями рода *Pseudomonas*, приводило также к угнетению ряда других вредных обитателей ризосферы, например *Erwinia carotovora* и др. Дефицит железа, создаваемый синтезом или внесением сидерофоров, ограничивал численность этих организмов, стимулируя тем самым рост сельскохозяйственных растений [348, 471, 492].

Бактерии — продуценты сидерофоров — были с успехом использованы при защите пшеницы, ячменя и райграсса от поражения грибом *Gaeumannomyces graminis* [150, 527]. Штамм *P. syringae* — продуцент сидерофоров и антибиотиков (по некоторым сообщениям синрингомицин также является сидерофором [212]) — защищал вяз от заболевания, вызываемого грибом *Seratiocystis ulmi*. Предохраняющее действие достигалось инъекцией  $5 \cdot 10^{11}$  клеток антагониста в корни деревьев и наблюдалось затем в течение двух лет [472].

У мутантов, лишенных антибиотической активности либо способности синтезировать сидерофоры, отсутствовала и способность стимулировать рост растений; эффект стимуляции не наблюдался также в стерильных почвах, т. е. в отсутствие патогенов [291].

Приведенные выше данные касаются антифунгальных свойств ризобактерий, в большинстве относящихся к видам *P. fluorescens* и *P. putida* и синтезирующих железотранспортирующие соединения группы псевдобактина. Как упоминалось выше, антифунгальные свойства других видов *Pseudomonas* изучены значительно слабее. Немногочисленны и сведения о иных сидерофорах, образуемых бактериями рода *Pseudomonas*. К их числу принадлежат нокардамин из *P. stutzeri* [343], пиримин, образуемый неидентифицированным до вида штаммом *Pseudomonas* [448], а также пиохелин — замещенный салициловой кислотой цистеинил-пептид из штаммов *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* и *P. ceracia* [153, 466].



Пиохелин — сидерофор из *P. ceracia*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*.

Нокардамин обладает слабой антибиотической активностью в отношении микобактерий; антимикробная активность двух других сидерофоров не была охарактеризована.

Таблица 38. Антагонистическая активность флюоресцирующих видов бактерий рода *Pseudomonas* в отношении фитопатогенных грибов

Вид бактерий	Количество исследованных штаммов	Штаммы, активные в отношении				
		<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Drechslera graminea</i>	<i>Mucor plumbeum</i>
<i>P. aeruginosa</i>	58	++++	++++	++++	++++	++++
<i>P. fluorescens</i>						
биовар I	72	—	++	—	++	++
биовар II	37	—	++	+	++	++
биовар III	88	—	++	++	++++	++
биовар V	365	—	+	—	++	+
<i>P. aureofaciens</i>	8	++++	++++	++++	++++	++++
<i>P. chloraphis</i>	3	++	++	++	++	++
<i>P. aurantiaca</i>	38	+	++++	++	++++	++++
« <i>P. lemonnierii</i> »	14	+	+	++	++++	++
« <i>P. fluoro-violaceus</i> »	19	++	+	++	++++	++
<i>P. putida</i>						
биовар А	199	—	+	—	+	+
биовар В	86	—	+	—	+	+
<i>P. taetrolens</i>	1	—	—	—	—	—
<i>P. syringae</i>	19	—	—	—	—	—

Примечание. (—) — активные антагонисты, среди штаммов данного вида составляют 0–10 %, (+) — 10–30, (++) — 30–50, (++++) — 50–100 %.

Исходя из изложенного, мы поставили перед собой цель исследовать в опытах *in vitro* действие различных видов бактерий рода *Pseudomonas* на фитопатогенные грибы, изучить влияние железа на их антибиотическое действие, провести отбор продуцентов антифунгальных активных сидерофоров.

Объектом исследования служили 1225 штаммов 30 видов бактерий рода *Pseudomonas*. Их антагонистическую активность *in vitro* изучали на агаризованной среде Кинг В методом перекрестных штрихов в отношении грибов *Fusarium oxysporum*, *Mucor plumbeum*, *Verticillium dahliae*, *Drechslera graminea* и *Trichothecium roseum*. У наиболее активных штаммов псевдомонад исследовали антифунгальное действие в присутствии 100 мкг/мл  $FeCl_3$  (в контроле — без него). У штаммов, антифунгальное действие которых снижалось в присутствии железа, что могло быть обусловлено синтезом веществ-сидерофоров, изучали устойчивость к синтетическим соединениям-комплексам: оксизетилендифосфоновой и диэтилендиаминпентауксусной кислотам. Суспензии суточных культур бактерий, выращенных на МПА, высевали репликатором на чашки Петри с синтетической средой Козера с глюкозой, содержащей от 250 до 5000 мкг/мл комплексонов. Контролем служила среда без добавления этих веществ. Рост бактерий в присутствии высоких концентраций комплексонов свидетельствовал об образовании ими сидерофоров с достаточно высокой константой связывания железа, обеспечивающих конкуренцию за этот элемент с синтетическим лигандом, содержащимся в среде.



Т а б л и ц а 39. Антагонистическая активность нефлюоресцирующих видов рода *Pseudomonas* в отношении фитопатогенных грибов \*

Вид бактерий	Количество исследованных штаммов	Штаммы, активные в отношении				
		<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Drechslera graminea</i>	<i>Mucor plumbeum</i>
<i>P. stutzeri</i>	9	—	—	—	+	—
<i>P. mendocina</i>	7	—	+	—	+++	+
<i>P. alcaligenes</i>	4	—	—	—	+	—
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	25	—	—	—	—	—
« <i>P. denitrificans</i> »	1	—	—	—	—	—
<i>Comamonas acidovorans</i>	19	—	++++	++	++++	++
<i>C. testosteronei</i>	12	—	—	—	+	+
<i>P. saccharophila</i>	1	—	—	—	—	—
<i>P. cepacia</i>	29	++	++++	++++	++++	++
<i>P. pickettii</i>	1	—	—	—	—	—
<i>P. diminuta</i>	2	—	—	—	—	—
<i>P. vezicularis</i>	2	—	—	—	—	—
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	77	—	+	+	++	+
<i>P. mesophilica</i>	1	—	—	—	—	—
<i>P. paucimobilis</i>	1	—	—	—	—	—
« <i>P. putrefaciens</i> »	1	—	—	—	—	—
<i>P. pictorum</i>	1	—	—	—	—	—
<i>P. glathei</i>	1	—	—	—	—	—
<i>P. fragi</i>	15	—	—	—	—	—
<i>P. species</i>	9	—	+	—	+	—

\* Условные обозначения те же, что и в табл. 38.

Проведенные эксперименты показали, что способность к синтезу антифунгальных соединений широко распространена среди бактерий рода *Pseudomonas*.

Как видно из табл. 38, наиболее активные в отношении грибов виды обнаруживаются среди микроорганизмов флюоресцирующей группы рода *Pseudomonas*. Это прежде всего *P. aeruginosa*, штаммы которого угнетают все испытанные грибные тест-культуры, *P. aureofaciens* и близкий ему *P. chlorographis*, *P. aurantiaca*. Слабее действуют на грибы штаммы *P. putida*: биовары А и В, входящие в состав этого вида, не отличались по своей антифунгальной активности.

Иная картина наблюдалась у *P. fluorescens*. Его различные биовары (около 600 штаммов) различались по спектру и интенсивности антифунгального действия. Высокоактивными были штаммы биовара III, среди которых 20 % культур угнетали не только микроскопические грибы, но и дрожжи рода *Candida*. Штаммы этого же биовара были наиболее активными в опытах Ксу и Гросса [531] в отношении возбудителя гнили картофеля *Erwinia carotovora*.

Объектом наших исследований были и значительно слабее изученные нефлюоресцирующие виды рода *Pseudomonas* (табл. 39). Здесь также обнаружены активные продуценты антифунгальных

Т а б л и ц а 40. Влияние железа на антифунгальную активность некоторых видов бактерий рода *Pseudomonas*

Вид бактерий	Общее число антифунгально активных штаммов	Процент штаммов, антифунгальное действие которых снижалось в присутствии 100 мкг/мл FeCl <sub>3</sub>	Вид бактерий	Общее число антифунгально активных штаммов	Процент штаммов, антифунгальное действие которых снижалось в присутствии 100 мкг/мл FeCl <sub>3</sub>
<i>P. fluorescens</i>	22	18,2	<i>P. mendocina</i>	3	0,0
биовар I	14	14,3	<i>Comamonas acidovorans</i>	8	50,0
биовар II	27	66,6	<i>C. testosteroni</i>	1	0,0
биовар III	63	23,8	<i>P. cepacia</i>	29	36,6
биовар V	17	23,5	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	13	0,0
<i>P. putida</i>	7	28,6	<i>Pseudomonas species</i>	2	0,0
<i>P. aurantiaca</i>	9	44,4			
<i>P. aureofaciens</i>	2	0,0			
<i>P. chlororaphis</i>	6	33,3			
« <i>P. lemonnieri</i> »					
« <i>P. fluore-violaceus</i> »	7	0,0			

веществ, в том числе *C. acidovorans*, *P. cepacia* — антагонист широкого спектра действия — и *X. maltophilia*.

Антифунгальная активность названных видов по сути не изучена. Нам удалось найти лишь несколько работ, посвященных защите лука, гороха и огурцов от поражения фитопатогенными грибами с помощью штамма *P. cepacia* [281, 322].

Для обнаружения штаммов — продуцентов сидерофоров — у 230 наиболее активных антагонистов была исследована антифунгальная активность в присутствии солей трехвалентного железа (табл. 40).

У большинства культур антифунгальная активность не изменялась в присутствии железа, и, по-видимому, не была связана с синтезом железотранспортирующих систем. В то же время у 33 % штаммов в этих условиях снижалось антифунгальное действие. Это микроорганизмы флюоресцирующей группы: *P. putida*, *P. aurantiaca* и *P. aureofaciens*, *P. fluorescens*, в особенности штаммы III биовара этого вида. Железозависимыми оказались и антифунгальные свойства 36—50 % штаммов *C. acidovorans* и *P. cepacia*.

Полученные результаты позволили предположить, что исследуемые штаммы бактерий рода *Pseudomonas* синтезируют антифунгально активные сидерофоры. На следующем этапе исследований изучалась их устойчивость к синтетическим комплексонам, что было необходимо для отбора продуцентов сидерофоров с более высокой, чем у этих соединений, константой связывания железа.

Результаты изучения устойчивости бактерий рода *Pseudomonas* к комплексонам представлены на рис. 25. Подавляющее большин-

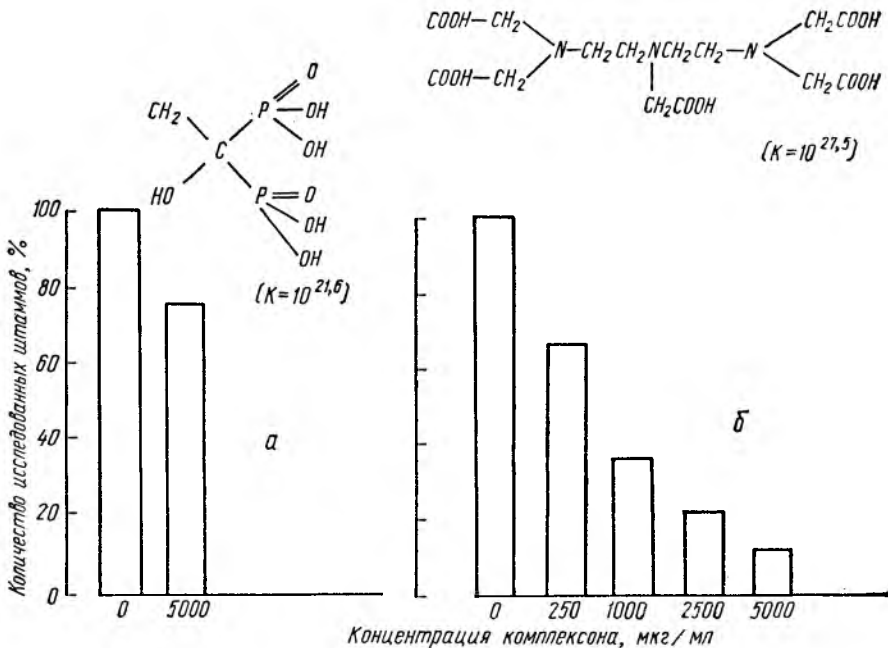


Рис. 25. Устойчивость бактерий рода *Pseudomonas* к оксиэтилендифосфоновой (а) и к диэтилендиаминпентауксусной (б) кислотам

ство штаммов было резистентно к 5000 мкг/мл оксиэтилендифосфоновой кислоты — вещества с умеренным ( $10^{21,6}$ ) сродством к железу. В то же время устойчивость бактерий к диэтилендиаминпентауксусной кислоте — соединению с более высокой ( $10^{27,5}$ ) константой связывания железа — была различной. Высокорезистентными к этому соединению оказались единичные штаммы *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aurantiaca*, *P. aureofaciens*, *S. acidovorans*, а также все испытанные штаммы *P. serasia*. У устойчивых к комплексонам культур микроорганизмов была изучена способность к синтезу сидерофоров на средах, содержащих железо, и без него.

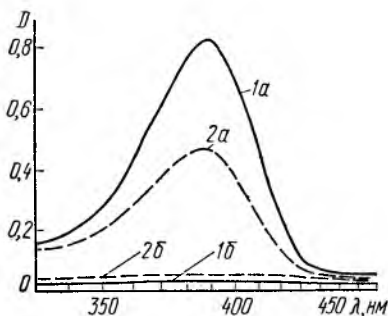


Рис. 26. Спектры поглощения культуральных жидкостей штаммов *P. fluorescens* 5406 (1) и 6012 (2), выращенных на среде без железа (а) и в присутствии 100 мкг/мл  $\text{FeCl}_3$  (б)

В условиях аэрации рост значительной части штаммов сопровождался интенсивной желто-зеленой флуоресценцией. Внесение в среду железа подавляло синтез пигментов. Спектры поглощения культуральных жидкостей этих продуцентов (рис. 26) свиде-

**Таблица 41. Некоторые антифунгальные вещества, образуемые бактериями рода *Pseudomonas***

Название вещества	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aurantiaca</i>	<i>P. putida</i> (5102, 4099)	<i>P. aureofaciens</i>	<i>P. chlororaphis</i>	« <i>P. fluoro-violaceus</i> »	<i>P. cepacia</i>	<i>X. maltophilia</i>	<i>C. acidovorans</i>
Сидерофоры группы псевдобактина	+	+	+	+	+	+			
Феназин-1-карбоновая кислота	+			+					
2-Оксифеназин-1-карбоновая кислота				+					
Оксихлорографин					+				
Комплекс антибиотиков ароматической природы			+						
Антибиотики — производные флороглюцина		+							
Фиолетовый, богатый азотом гетероциклический пигмент						+			
Желтый и красный пигменты гетероциклической природы							+		
Антифунгальные вещества неустановленной химической природы								+	+

тельствуют о том, что все они синтезируют сидерофоры группы псевдобактина.

Штаммы *P. aureofaciens* и *P. aurantiaca* наряду с флюоресцирующим пигментом выделяли в среду свойственные этим видам антибиотические вещества — феназиновые пигменты и производные флороглюцина, высокоактивные в отношении фитопатогенных грибов (табл. 41). Некоторые из этих соединений, в частности 2-оксифеназин-1-карбоновая кислота из *P. aureofaciens* и 2,4-диацетилфлороглюцин из *P. aurantiaca*, содержащие оксигруппы при гетероциклическом или ароматическом ядре, образуют окрашенные комплексы с железом. Их образование можно наблюдать на чашках со средой Кинг В, где в присутствии железа изменялся как внешний вид колоний бактерий, так и цвет образуемых ими пигментов. К антибиотикам ароматической структуры, образующим комплексы с железом, относится и полученный нами из антифунгально активного штамма *P. putida* антибиотик 4099, угнетающий рост *Fusarium oxysporum* в концентрации 20 мкг/мл [70].

Перечисленные выше вещества, а также некоторые другие антибиотики, образуемые бактериями рода *Pseudomonas*, были получены из культуральных жидкостей продуцентов, очищены методами препаративной колоночной и тонкослойной хроматографии, у них исследовали антифунгальную активность в присутствии железа и без него (табл. 42). Изучали также их действие на *Staphylococcus aureus* 209.

Перечисленные выше ароматические вещества, а также пигменты феназинового ряда не изменяли в присутствии железа антифунгальную и антимикробную активность. Их синтез бактериями не

Таблица 42. Влияние железа на антифунгальную активность некоторых антибиотических веществ, выделенных из бактерий рода *Pseudomonas*, мкг/мл

Название вещества	Активность в отношении *				
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Drechslera graminea</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Botrytis cynerea</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Пиоцианин	400	400	400		10
	<u>400</u>	<u>400</u>	<u>400</u>		<u>10</u>
Гемипиоцианин	100	100	50	50	50
	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>50</u>	<u>50</u>	<u>50</u>
Оксихлорографин	200	200	400	400	400
	<u>200</u>	<u>200</u>	<u>400</u>	<u>400</u>	<u>400</u>
Феназин-1-карбоновая кислота	400	50	50	50	50
	<u>400</u>	<u>50</u>	<u>50</u>	<u>50</u>	<u>50</u>
2-Оксифеназин-1-карбоновая кислота	200	20	100	20	20
	<u>200</u>	<u>20</u>	<u>100</u>	<u>20</u>	<u>20</u>
2,4-Диацетилфлороглюцин	10	50	100	20	1
	<u>10</u>	<u>50</u>	<u>100</u>	<u>20</u>	<u>1</u>
Антибиотик-сырец из <i>P. putida</i>	200			100	
	<u>200</u>			<u>100</u>	
Антибиотик-сырец из <i>P. ceracia</i> 5798	100	100	100	50	10
	<u>400</u>	<u>400</u>	<u>400</u>	<u>200</u>	<u>50</u>

\* Над чертой — антифунгальная активность соединений на среде без железа, под чертой — активность на той же среде с добавлением 100 мкг/мл  $FeCl_3$ .

стимулировался при дефиците в среде железа и не угнетался добавлением этого элемента. Таким образом, исследуемые вещества не обладают свойствами сидерофоров и, по-видимому, не участвуют в транспорте железа у бактерий рода *Pseudomonas*.

Выше мы упоминали пиохелин — сидерофор, выделенный из *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* и *P. ceracia* [466]. Обладая высоким

Таблица 43. Влияние железа на антимикробную активность желтого пигмента-сырца из *Pseudomonas ceracia* 5798

Тест-микроборганизм	Минимальная ингибирующая рост концентрация, мкг/мл	
	В отсутствие железа	В присутствии 100 мкг/мл $FeCl_3$
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	40
<i>Micrococcus luteus</i>	4	20
<i>Bacillus subtilis</i>	50	200
<i>Escherichia coli</i>	100	400
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	200	400
<i>Candida albicans</i>	50	400
<i>Fusarium oxysporum</i>	100	400

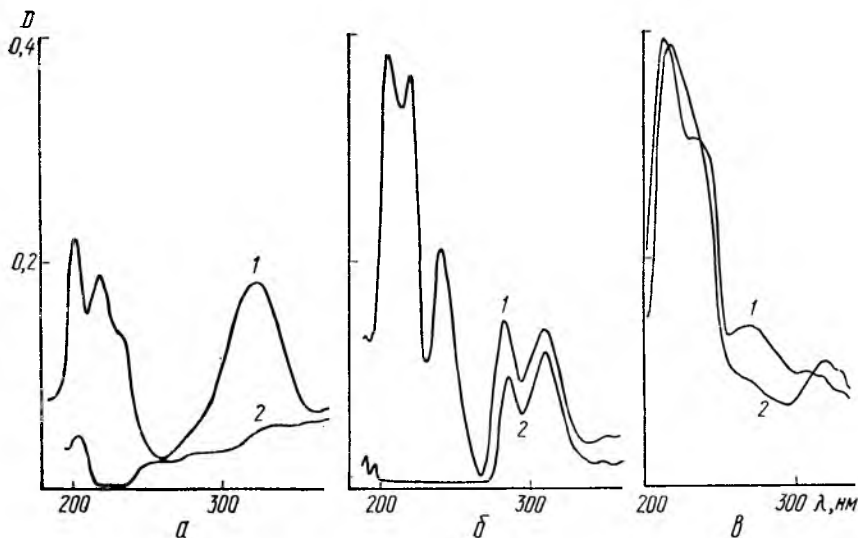


Рис. 27. УФ-спектры метанольных растворов препаратов из штаммов *R. serasia* 5798 (желтого — а), 4203 (фиолетового — б) и 5779 (красного — в), выращенных на среде Гаузе № 6 без железа (1) и с добавлением 100 мкг/мл  $\text{FeCl}_3$  (2)

средством к железу и извлекая этот элемент из железосодержащих белков микроорганизмов, пиохелин способствует размножению бактерий в сыворотке крови больных, являясь фактором патогенности клинических штаммов бактерий. Нами были предприняты попытки обнаружить пиохелин в культуральных жидкостях антифунгально активных продуцентов. Однако в этилацетатных экстрактах культуральных жидкостей бактерий мы не смогли обнаружить вещества, сходные с пиохелином по физико-химическим свойствам (хроматографической подвижности, свечению в ультрафиолете, окрашиванию с  $\text{FeCl}_3$ ).

В отличие от большинства изученных соединений антибиотическая активность желтого пигмента-сырца из штамма *R. serasia* 5798 снижалась в присутствии железа в несколько раз (см. табл. 42, 43), что побудило нас исследовать влияние железа на биосинтез этого соединения.

Внесение в ферментационную среду 100 мкг/мл  $\text{FeCl}_3$  тормозило биосинтез желтого пигмента штаммом *R. serasia* 5798. Выход суммарного хлороформного экстракта культуральной жидкости бактерий снижался с 32,8 до 11,0 мг/л, а спектрофотометрия его метанольного раствора не показала характерных для желтого пигмента максимумов поглощения (рис. 27). Изучаемый экстракт не обладал и антибиотической активностью. Угнетение железом биосинтеза желтого пигмента, способность к образованию окрашенных комплексов с железом позволили предположить его принадлежность к сидерофорам. В связи с этим нами было изучено влияние

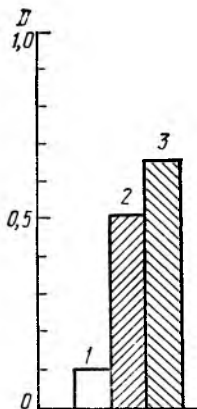


Рис. 28. Влияние комплекса препарата 5798 с железом на рост штамма-продуцента в железодефицитных условиях:

1 — рост на среде без железа, 2 — в присутствии 1 мкг/мл, 3 — 10 мкг/мл комплекса препарата с железом

У близко родственных *P. sarcasii* фитопатогенных видов *P. saurophylii* и *P. gladioli* также имеются пигменты, синтез которых усиливается в железодефицитных условиях [171]. Таким образом, рассматриваемые соединения, по-видимому, принадлежащие к особой группе сидерофоров, достаточно широко распространены у видов II РНК-группы рода *Pseudomonas*.

Наряду с антифунгальными свойствами одной из важнейших характеристик штаммов, перспективных для защиты растений, является их колонизирующая способность. Активное размножение на корнях отличает псевдомонады от многих представителей микробного мира, дает им преимущества в той сложной экосистеме, какой является ризосфера растений.

Различные аспекты микробной колонизации корневой системы исследованы достаточно подробно [120, 243]. Использование генетически маркированных штаммов позволило проследить судьбу бактерий-колонизаторов на протяжении различных периодов вегетации растений [507, 530]. При этом объектами исследования, как правило, служили единичные штаммы флюоресцирующих бактерий, предназначенные для защиты растений от грибных заболеваний.

Нами из 50 штаммов 15 видов бактерий рода *Pseudomonas*, проявляющих в опытах *in vitro* антифунгальную активность, были получены рифампициностойчивые мутанты и исследована их способность к колонизации корней озимой пшеницы [16]. Для подсчета бактерий на семенах и корнях пшеницы сорта Киянка использовали модификацию метода, предложенного для изучения

желтого пигмента и его комплекса с железом на рост некоторых штаммов *P. sarcasii*, выращенных в условиях дефицита железа.

Свободный от железа пигмент не обладал ростстимулирующей активностью, но его комплекс с железом в концентрации 1 мкг/мл усиливал рост штамма-продуцента и еще одного из пяти исследованных штаммов *P. sarcasii*, выращенных в железодефицитных условиях (рис. 28).

Полученные данные подтверждают предположение о роли желтого пигмента в транспорте железа у *P. sarcasii*. По-видимому, и антимикробное действие этого соединения обусловлено конкуренцией за железо, необходимое для ингибируемых бактерий и грибов.

Судя по устойчивости штаммов *P. sarcasii* к синтетическим лигандам, их сидерофоры обладают достаточно высокой константой связывания железа, что дает им преимущества в конкуренции за этот элемент с сидерофорами других микроорганизмов.

У близко родственных *P. sarcasii* фитопатогенных видов *P. saurophylii* и *P. gladioli* также имеются пигменты, синтез которых усиливается в железодефицитных условиях [171]. Таким образом, рассматриваемые соединения, по-видимому, принадлежащие к особой группе сидерофоров, достаточно широко распространены у видов II РНК-группы рода *Pseudomonas*.

Наряду с антифунгальными свойствами одной из важнейших характеристик штаммов, перспективных для защиты растений, является их колонизирующая способность. Активное размножение на корнях отличает псевдомонады от многих представителей микробного мира, дает им преимущества в той сложной экосистеме, какой является ризосфера растений.

Различные аспекты микробной колонизации корневой системы исследованы достаточно подробно [120, 243]. Использование генетически маркированных штаммов позволило проследить судьбу бактерий-колонизаторов на протяжении различных периодов вегетации растений [507, 530]. При этом объектами исследования, как правило, служили единичные штаммы флюоресцирующих бактерий, предназначенные для защиты растений от грибных заболеваний.

Нами из 50 штаммов 15 видов бактерий рода *Pseudomonas*, проявляющих в опытах *in vitro* антифунгальную активность, были получены рифампициностойчивые мутанты и исследована их способность к колонизации корней озимой пшеницы [16]. Для подсчета бактерий на семенах и корнях пшеницы сорта Киянка использовали модификацию метода, предложенного для изучения

колонизации бактериями корней кукурузы [439]. Колонизирующими свойствами (от  $5 \cdot 10^3$  до  $1,2 \cdot 10^5$  КОЕ на 1 г корней) обладало большинство штаммов флюоресцирующих видов псевдомонад (биовары *P. fluorescens* и *P. putida*, *P. aurantiaca*, *P. aureofaciens*, *P. chlorographis*), а также отдельные штаммы *X. maltophilia* и *S. acidovorans* (у двух последних видов колонизирующие свойства выявлены нами впервые). Способность активно размножаться на корнях растений была штаммоспецифичной и зависела от источника выделения бактерий. Наилучшие показатели колонизации имели штаммы, выделенные из ризосферы пшеницы либо других растений той же почвенно-климатической зоны. Так, различные штаммы *X. maltophilia* из ризосферы пшеницы сортов Полесская и Киянка обнаруживались на корнях пшеницы через 7 сут в количестве  $2,8 \cdot 10^3$ — $1,2 \cdot 10^5$  КОЕ на 1 г корней. В то же время типовой штамм *X. maltophilia*, выделенный из клинического материала, вообще не обладал колонизирующими свойствами. Исследованные штаммы *P. mendocina*, *P. serasia* и *P. fragi* не были найдены на корнях пшеницы после 7 сут инкубации при 26 °С.

Приведенные выше значения несколько ниже показателей колонизации, полученных для наиболее активных штаммов другими авторами. Так, в опытах Уэллера и Кука [506] растения пшеницы после бактеризации содержали около  $10^7$  КОЕ на 1 г корней. Следует, однако, отметить, что эти авторы работали при более низких температурах, обеспечивающих более высокие уровни колонизации, и использовали суспензии бактерий в метилцеллюлозе, что увеличивало степень их прикрепления к семенам. Подобные средства, улучшающие «прилипание» бактерий (метилцеллюлоза, гуммиарабик, ксантан, альгинаты и др.), применяются весьма широко. Однако значительно перспективнее использование бактерий в виде сухих порошков, и, по мнению специалистов, от положительного результата таких разработок зависит успех биологического контроля над патогенами в будущем.

Таким образом, нами широко охарактеризована антифунгальная активность различных видов рода *Pseudomonas*, изучены антибиотические вещества, обуславливающие действие бактерий на фитопатогенные грибы, проанализировано влияние железа на антифунгальные свойства бактерий. На основании изучения устойчивости псевдомонад к некоторым синтетическим лигандам выявлены штаммы, синтезирующие сидерофоры с высоким сродством к железу, охарактеризована колонизирующая способность антифунгально активных штаммов различных видов рода *Pseudomonas*.

Штаммы, обладающие максимальной устойчивостью к синтетическим комплексонам и наиболее высокой колонизирующей способностью, оказались наиболее эффективными в вегетационных опытах в качестве средства защиты озимой пшеницы сортов Полесская и Киянка от корневой гнили, вызванной *Fusarium oxysporum*.



Таблица 44. Влияние бактерий рода *Pseudomonas* на некоторые фитогельмы

Вид бактерий	Количество испытанных штаммов	Реакция нематод			
		Ditylenchus			
		отталкивание	индифферентное отношение	слабое привлечение	среднее привлечение
<i>P. aeruginosa</i>	5	5	0	0	0
<i>P. fluorescens</i>					
биовар I	6	0	1	4	0
биовар II	5	1	1	3	0
биовар III	6	1	1	5	0
« <i>P. lemonnierii</i> »	5	1	4	0	0
<i>P. aurantiaca</i>	5	1	4	0	0
« <i>P. fluoro-violaceus</i> »	5	2	0	3	0
<i>P. aureofaciens</i>	4	4	0	0	0
<i>P. chlororaphis</i>	2	0	2	0	0
<i>P. putida</i>	12	2	2	8	0
<i>P. syringae</i>	15	0	1	13	1

\* Цифрами обозначено количество штаммов, вызывающих ту или иную реакцию фитобактерий; индифферентное отношение — равномерное распределение по поверхности среды; 200 нематод в зоне вокруг бактериального газона.

По изучаемым показателям (энергия прорастания и всхожесть семян, длина корней, масса растений) некоторые из штаммов были более эффективны, чем применяемый фунгицид ТМТД (тетраметилтиурамдисульфид). Наиболее часто защиту пшеницы от фузариоза и вытекающий отсюда ростстимулирующий эффект обеспечивали флюоресцирующие штаммы бактерий рода *Pseudomonas* — продуценты псевдобактина. В мелкоделяночных полевых опытах бактерии-антагонисты способствовали повышению полевой всхожести семян, снижали в 2—5 раз поражаемость пшеницы гнилью на всех стадиях развития растений, увеличивали продуктивность растений на 11,5—15,6 %.

Несмотря на достигнутые успехи, разработка методов биологического контроля над патогенами растений находится на начальном этапе развития. Не считая возможным рассмотреть все направления этой проблемы, кратко отметим лишь некоторые из них.

Актуальны поиски активных штаммов ризобактерий не только в почве и на поверхности корней, но и среди эндофитных, населяющих ткани растения бактерий. Такие бактерии обнаружены и среди микроорганизмов рода *Pseudomonas* [261].

Перспективным направлением является получение авирулентных мутантов бактерий, которые активно колонизируют корни растений. Такие мутанты могут быть устойчивы к бактериофагу, в то время как дикие вирулентные обитающие в почве штаммы к нему чувствительны, они могут синтезировать бактериоцины [142, 496]. Широкие возможности для перенесения полезных признаков (антифунгальной, энтомопатогенной и других активностей) микро-

ИНТЫ

на бактерии \*

destructor		Aphelenchoides asteroceadatus					
сильное привлечение	накопление	отталкивание	индифферентное отношение	слабое привлечение	среднее привлечение	сильное привлечение	накопление
0	0	5	0	0	0	0	0
0	0	0	2	3	0	0	0
0	0	1	2	2	0	0	0
0	0	1	2	4	0	0	0
0	0	1	4	0	0	0	0
0	0	0	5	0	0	0	0
0	0	2	0	3	0	0	0
0	0	4	0	0	0	0	0
0	0	0	2	0	0	0	0
0	0	2	1	9	0	0	0
0	0	0	10	4	1	0	0

гельминтов: отталкивание — отсутствие нематод в зоне диаметром 2 см вокруг газона  
слабое привлечение — 50—100, среднее — 100—150, сильное — 150—200 и накопление — свыше

организмам-колонизаторам открываются перед генной инженерией.

Особый, мало изученный раздел экологии бактерий рода *Pseudomonas* составляют взаимоотношения этих микроорганизмов с фитонематодами, широко населяющими почву и вызывающими значительные (до 70 %) потери урожая сельскохозяйственных растений. Исследованиями Качнельсона и Хендерсона [278, 279] проанализировано влияние культур актиномицетов, бактерий и грибов на нематоды *Rhabditis oxycerca* (в одной серии опытов) и *Aphelenchoides parietinus* (в другой). Показано, что штаммы актиномицетов и 50 % испытанных штаммов грибов благоприятствуют накоплению нематод вблизи и внутри их колоний на агаризованной среде, т. е. нематоды, согласно принятой авторами терминологии, «привлекались» этими микроорганизмами. Остальные штаммы грибов не вызвали видимой реакции со стороны фитогельминтов. Фильтраты их культуральных жидкостей не обладали нематоцидными свойствами.

Культуры 60 идентифицированных штаммов бактерий в 85 % случаев «отталкивали» нематод, т. е. вызвали их движение в направлении, обратном от колоний. Таким образом, почвенные бактерии оказывали антагонистическое действие на фитогельминты, в противоположность актиномицетам и грибам, влияние которых на фитонематоды было благоприятным.

Интересное исследование нематоцидных свойств 267 штаммов бактерий было выполнено Иицука и соавт. [248]. Наряду с 88 видами бактерий ими было изучено 11 видов дрожжей, 19 видов грибов и 14 видов актиномицетов. Тест-объектом служила сапробио-

тическая нематода *Rhabditis terricola*. Позднее наблюдаемые закономерности были подтверждены на фитогельминтах *Panagrellus* и *Meloidogyna*. Наиболее сильными продуцентами нематоцидов оказались сапрофитные бактерии рода *Pseudomonas*. В то же время фитопатогенные бактерии родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *Erwinia* не угнетали фитогельминты. Более того, наблюдался синергизм в повреждающем действии на растения эндопаразитических нематод и фитопатогенных бактерий *P. viridiflava*, *P. marginalis* и *P. corrugata* [119].

Объектом наших исследований служили патогенно-неспецифичный фитогельминт *Aphelenchoides asterocaudatus* и патогенно-специфичный — стеблевая нематода картофеля — *Ditylenchus destructor*. Изучены отношения названных фитогельминтов с 69 штаммами 9 видов антибиотически наиболее активной флюоресцирующей группы рода *Pseudomonas*, в том числе 8 сапрофитными видами и одним фитопатогенным [56]. Исследования проводили по методу Кацнельсона и Гендерсона в разработанной О. Н. Корнюшенко модификации [55].

Результаты исследований представлены в табл. 44, где приведены средние данные определения числа нематод в течение 3 сут в зоне диаметром 2 см вокруг газона с культурой бактерий.

Из таблицы видно, что влияние, оказываемое псевдомонадами на нематоды, было различным в зависимости от вида, а иногда и штамма. Среди испытанных бактерий рода *Pseudomonas* можно выделить виды, не оказывающие на нематод заметного действия, виды — антагонисты нематод — и виды, их привлекающие.

Из 55 изученных сапрофитных культур и псевдомонад 17 (30 %) «отталкивали» *Ditylenchus destructor* и 16 (29 %) — *Aphelenchoides asterocaudatus*. При этом через 48—72 ч инкубации нематоды удалялись от колонии антагониста к противоположному краю чашки Петри и у газона оставалось лишь несколько нематод, находящихся в крайне угнетенном состоянии. По-видимому, выделение микроорганизмами в среду каких-то веществ создавало барьер, непреодолимый для фитогельминтов. Наиболее активными антагонистами нематод были *P. aeruginosa* и *P. aureofaciens*. Интересно, что такие активные антагонисты, как штаммы *P. aurantiaca*, оказались значительно менее эффективными в отношении испытанных фитогельминтов.

«Отталкивали» нематод и единичные штаммы некоторых биоваров *P. fluorescens* и *P. putida*. Другие штаммы этих видов слабо привлекали нематод: в зоне, окружающей бактериальный газон, обнаруживалось от 50 до 100 нематод из 500—700, внесенных на чашку. Это привлечение достигало максимума на первые-вторые сутки опыта. Более интенсивного привлечения, а тем более накопления нематод в зоне вокруг газона испытанные штаммы *Pseudomonas* не вызывали никогда.

Наконец, в 23 % случаев при испытании *Ditylenchus destructor* и в 40 % — *Aphelenchoides asterocaudatus* нематоды относились к бактериям рода *Pseudomonas* индифферентно, что выражалось в

равномерном или беспорядочном распространении их по всей чашке, независимо от локализации колоний микроорганизмов.

Таким образом, штаммы *P. aeruginosa* и *P. aureofaciens* оказывали антагонистическое действие на фитогельминты, *P. fluorescens* и *P. putida* иногда вызывали слабое привлечение нематод, *P. aurantiaca* и «*P. leopoldieri*» в большинстве случаев не оказывали на них влияния. В то же время фитопатогенные бактерии *P. syringae* вызывали в основном слабое привлечение (*Ditylenchus destructor*) либо проявляли индифферентное отношение (*Aphelenchoides asterocaudatus*). Было показано, что антибиотические вещества, синтезируемые исследованными видами бактерий, — пиоцианин, оксихлорорафин, феназин-1-карбоновая кислота, производные флюороглюцина — не обладают нематоцидными свойствами. Можно предполагать, что нематоцидный эффект обусловлен какими-то другими биологически активными метаболитами бактерий, угнетающими нематод в условиях эксперимента. Выделение таких веществ, изучение механизма их действия на фитогельминты представляет несомненный интерес.

**ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА  
И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ  
ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩЕЙ ГРУППЫ  
РОДА PSEUDOMONAS**

**РАЗЖИЖАЮЩИЕ ЖЕЛАТИН САПРОФИТНЫЕ ВИДЫ**

В предыдущих главах мы уделили значительное внимание эволюционным подходам к систематике бактерий рода *Pseudomonas*, их важнейшим биологическим особенностям, антибиотической активности и некоторым аспектам ее применения. Данные геносистематики и сравнительной энзимологии, представленные выше сведения о физиологии и биохимии псевдомонад свидетельствуют о значительной гетерогенности рода *Pseudomonas* и необходимости его ревизии. В процессе этой ревизии, некоторые начальные этапы которой уже осуществлены, в составе рода должны сохраниться его «истинные» представители — флюоресцирующие и родственные им нефлюоресцирующие бактерии I секции с типовым видом *P. aeruginosa*. В своих исследованиях мы сосредоточили внимание именно на этой группе микроорганизмов. Нас прежде всего интересовали бактерии, синтезирующие желто-зеленый флюоресцирующий пигмент. Последние широко распространены в природе и легкодоступны для исследователя, не требуют специальных методов обогащения и легко выделяются на общепотребимых средах. Несмотря на значительную изученность, состояние систематики и диагностики этой группы микроорганизмов остается пока не завершенным, чем и объясняются попытки ее пересмотра то в сторону расширения видового состава, то в сторону укрепления видов.

В настоящей главе представлены результаты фенотипического изучения более 400 штаммов флюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas*, а также исследования их генетической близости методом молекулярной гибридизации ДНК — ДНК. Анализируются таксономический ранг рассматриваемых групп бактерий, проблемы их классификации и идентификации.

Ряд особенностей общий для всех сапрофитных видов флюоресцирующей группы (табл. 45). Среди 409 изученных штаммов 388 образовывали характерный желто-зеленый флюоресцирующий пигмент, 21 штамм идентифицирован как ахромогенные варианты *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* и *P. putida*.

Бактерии флюоресцирующей группы не образовывали включений поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты, окисляли глюкозу в аэробных условиях, были оксидазоположительны по Ковачу. В спектрах поглощения их интактных клеток имелись максимумы, характерные

Таблица 45. Некоторые общие биологические особенности, присущие сапрофитным микроорганизмам флюоресцирующей группы рода *Pseudomonas*

Признак	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма» *
	абс.	%	
Образование зеленого флюоресцирующего пигмента	388	95	+
Наличие включений поли-β-оксимасляной кислоты	0	0	—
Наличие			
аргининдигидролаз	405	99	+
оксидаз	403	100	+
Усвоение в качестве источника углерода			
глюкозы	409	100	+
глюконовой кислоты	405	99	+
фруктозы	399	97	+
фукозы	0	0	—
целлобиозы	0	0	—
лактозы	0	0	—
крахмала	0	0	—
уксусной кислоты	403	98	+
пропионовой кислоты	391	95	+
капроновой кислоты	376	92	+
пеларгоновой кислоты	406	99	+
янтарной кислоты	404	99	+
малеиновой кислоты	3	0	—
фумаровой кислоты	409	100	+
глутаровой кислоты	408	100	+
молочной кислоты	403	98	+
гликолевой кислоты	4	0	—
лимонной кислоты	408	100	+
пировиноградной кислоты	409	100	+
α-кетоглутаровой кислоты	406	99	+
глицерина	405	99	+
хинной кислоты	402	98	+
<i>l</i> -оксибензойной кислоты	388	95	+
α-аланина	409	100	+
β-аланина	409	100	+
лейцина	404	99	+
валина	402	98	+
аспарагиновой кислоты	409	100	+
глутаминовой кислоты	409	100	+
лизина	397	97	+
аргинина	409	100	+
гистидина	384	94	+
пролина	390	95	+
бетаина	400	98	+
саркозина	408	100	+

\* Здесь и далее под «средним организмом» подразумевается типичный представитель вида или подгруппы [317].

для цитохромов *c* и *b*. Подавляющее большинство (405 из 409) штаммов анаэробно расщепляли аргинин, ни один не обладал лизин- и орнитиндекарбоксилазой, амилазой, способностью к гидролизу эскулина. Все они, за исключением 10 штаммов, усваивали хинную кислоту, окисляя ее до протокатеховой.

Обращает на себя внимание высокая антибиотическая активность флюоресцирующей группы рода *Pseudomonas* в целом. Около 30 % штаммов были антагонистами широкого спектра действия, угнетающими многие из испытанных тест-микроорганизмов. Как упоминалось выше, сапрофитные флюоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas* оказывали выраженное антагонистическое действие не только на бактерии и грибы, но и на фитонематоды.

Из 105 соединений различного химического строения 40 были универсальными источниками углеродного питания и использовались всеми или подавляющим большинством штаммов (см. табл. 45). Это глюкоза, близкая ей глюконовая кислота и фруктоза, жирные кислоты от капроновой до пеларгоновой, метаболиты цикла Кребса и некоторые другие органические кислоты.

Среди полиспиртов и гликолей универсальным субстратом служил глицерин и несколько худшим — маннит, недоступный для части штаммов *P. aeruginosa* и *P. putida*, хорошо усваивались также алициклическая хинная и ароматическая *n*-оксибензойная кислоты. Широко доступными были для флюоресцирующих псевдомонад большинство аминокислот и азотистые соединения — бетаин и саркозин.

Таким образом, целый ряд особенностей метаболизма присущ флюоресцирующей группе рода *Pseudomonas* в целом. В то же время некоторые другие признаки (способность к синтезу ряда пигментов и антибиотиков, рост при 42 °С, синтез левана из сахарозы, использование нитрата в качестве акцептора электронов, наличие некоторых экзоферментов, наконец, ассимиляция определенных соединений в качестве источников углерода) свойственны отдельным флюоресцирующим видам и используются для их дифференциации.

***Pseudomonas aeruginosa***  
**(Schroeter 1872)**  
**Migula 1900 — типовой вид**  
**рода *Pseudomonas***

*P. aeruginosa* — наиболее изученный вид рода. Его свойства исследуются более 10 лет, однако интерес к нему в настоящее время не только не снижается, но возрастает, что связано с его широким распространением в клинике как возбудителя госпитальных инфекций. Описанию свойств *P. aeruginosa*, методов его выделения, идентификации, серодиагностики, фаго- и бактериоцинтипирования, антибиотикорезистентности, механизмов па-

тогенности и многих других аспектов биологии этого опасного возбудителя посвящена обширная литература [24, 223, 267, 340, 377, 539].

Литературные данные свидетельствуют о значительной фенотипической однородности *P. aeruginosa*. Физиолого-биохимические свойства синегнойных бактерий не связаны с их серотипами и фаготипами и стабильны при хранении, таким образом, идентификация типичных представителей этого вида не представляет затруднений. Иначе обстоит дело с безжгутиковыми, апиоцианогенными, меланиногенными, беспигментными культурами синегнойных палочек. По мнению некоторых авторов, идентификация беспигментных штаммов *P. aeruginosa* практически невозможна.

Клетки синегнойных бактерий содержат один жгутик. К числу характерных для *P. aeruginosa* культуральных особенностей относятся специфический запах и металлический блеск колоний. Большинство изученных нами штаммов выделяли в среду пиоцианин, часть штаммов синтезировала и другие пигменты феназинового ряда — гемипиоцианин, оксихлорографин, аэругинозины. Различия в наборе и количестве названных пигментов определяли степень антибиотической активности бактерий. Многие из них оказывали значительное угнетающее действие на штаммы своего вида, что свидетельствует об их способности к синтезу бактериоцинов. Перечень важнейших фенотипических особенностей, позволяющих отличать *P. aeruginosa* от других видов флюоресцирующей группы, приведен в табл. 46.

Общеизвестна способность синегнойных бактерий к синтезу экстрацеллюлярных желатиназ. У 8 штаммов этого вида мы обнаружили способность к гидролизу эфиров холестерина.

Весьма важны для целей идентификации рост штаммов *P. aeruginosa* при 42 °С и активная денитрификация. К числу дифференцирующих признаков этого вида относятся неспособность к ассимиляции многих углеводов и полиспиртов, активное потребление жирных кислот от уксусной до пеларгоновой, высших дикарбоновых кислот — адипиновой и пимелиновой, а также алифатических спиртов от этанола до бутанола.

Из ароматических соединений, сравнительно мало доступных для других видов, штаммы *P. aeruginosa* хорошо усваивали миндальную и бензойную кислоты, из азотсодержащих соединений — триптофан, антрацилат, ацетамид.

Интересной видовой особенностью *P. aeruginosa* является его отношение к углеводородам нефти. Ни один из испытанных нами штаммов не усваивал легких *n*-алканов с длиной углеродной цепи от C<sub>6</sub> до C<sub>10</sub>, но многие хорошо росли на грозненском парафине (C<sub>14</sub>—C<sub>22</sub>), причем рост часто сопровождался обильным синтезом пиоцианина.

Штаммы *P. aeruginosa* высокорезистентны к антибиотическим веществам и красителям. Из последних на них действовал только



Таблица 46. Важнейшие особенности 58 штаммов *Pseudomonas aeruginosa*

Признак	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%	
Наличие одного жгутика	58	100	+
Образование пиоцианина	48	83	+
Гидролиз			
желатина	58	100	+
лецитина	56	97	+
Левансахараза	0	0	—
Рост при 42°C	58	100	—
Окисление глюконата до 2-кетоглюконата	58	100	+
Денитрификация	58	100	+
Усвоение в качестве источника углерода			
ксилозы	0	0	—
сахарозы	0	0	—
арабинозы	0	0	—
маннозы	0	0	—
галактозы	0	0	—
трегалозы	5	8	—
жирных кислот от уксусной до пеларгоновой	58	100	+
адипиновой кислоты	58	100	+
пимелиновой кислоты	53	91	+
сорбита	0	0	—
инозита	7	12	+
адонита	0	0	—
этанола	58	100	+
пропанола	58	100	+
бутанола	58	100	+
миндальной кислоты	32	55	в
бензойной кислоты	58	100	+
фенилуксусной кислоты	0	0	—
антрахилоновой кислоты	58	100	+
ацетамида	58	100	+
углеводородов нефти C <sub>14</sub> —C <sub>22</sub>	30	52	в

метил-виолет, из антибиотиков — аминогликозиды (гентамицин, неомицин, стрептомицин).

Исследованные нами 58 штаммов *P. aeruginosa* были в большинстве своем клинического происхождения; 30 из них выделены при вспышке энтероколита в детских учреждениях, 6 — из мочи и гнойных ран, 13 штаммов — из активного ила и 3 — из почв, пропитанных нефтью. Ни разу нам не удавалось выделить штаммы синегнойных бактерий из ризосферы растений.

Между тем известна способность штаммов *P. aeruginosa* вызывать заболевания сельскохозяйственных культур. Так, «*P. polycolog*», описанный как возбудитель заболеваний табака, оказался впоследствии тождественным *P. aeruginosa*. Мы полагаем, что эко-

логически этот вид, входящий в состав нормальной микрофлоры человеческого тела, тесно связан с местами обитания человека, и его попадание в почву и сточные воды связано с поступлением туда продуктов жизнедеятельности человека и животных.

**Другие разжижающие желатин  
флюоресцирующие  
бактерии рода *Pseudomonas***

Сложная внутренняя структура *P. fluorescens* — этого крупнейшего вида флюоресцирующей группы — отражена в 9-м издании определителя Берги, согласно которому многочисленные разжижающие желатин флюоресцирующие сапрофиты входят в состав *P. fluorescens* в качестве пяти его биоваров<sup>1</sup>. Эти отдельные биовары характеризуются, в свою очередь, значительной генетической и фенотипической неоднородностью. Так, Чемпион с соавт. [139] наблюдали у *P. fluorescens* 14 феногрупп, в том числе две внутри биотипа А, три внутри биотипа В, пять внутри биотипа С.

Многообразию выделяемых из природы и описанных в литературе флюоресцирующих микроорганизмов рода *Pseudomonas* не исчерпывается приведенными в определителе Берги характеристиками биоваров, что порождает трудности в их идентификации. С такими не поддающимися идентификации штаммами *P. fluorescens* нам неоднократно приходилось иметь дело при выделении псевдомонад из различных природных источников. Описаны они в литературе [442].

В «Одобренные списки видовых названий» [455] включены такие разжижающие желатин флюоресцирующие виды, как *P. boeopolis* и *P. geniculata*, однако их свойства не исследованы, а филогенетические отношения с *P. fluorescens* не изучены. В международных коллекциях имеются штаммы «*reptilivora*», «*P. tuхоgenes*», «*P. schuylkilliensis*», однако неясно, представляют они собой самостоятельные виды или идентичны уже известным биоварам *P. fluorescens*. В равной мере это касается «*P. effusa*», «*P. fairmontensis*», «*P. septica*» и других описанных ранее и крайне фрагментарно охарактеризованных видов рода *Pseudomonas*. Кроме того, не решен окончательно вопрос о таксономическом ранге самих биоваров *P. fluorescens*. Возможно, некоторые из них соответствуют рангу вида подобно *P. aureofaciens* и *P. chlorogaphis*, включенных ранее в состав *P. fluorescens*, однако получивших в 8-м издании определителя Берги видовую самостоятельность.

Таким образом, таксономическая структура разжижающих желатин флюоресцирующих видов нуждается в дальнейшем изучении и упорядочении.

---

<sup>1</sup> Ранее их обозначали как биотипы А, В, С, D, E, F.

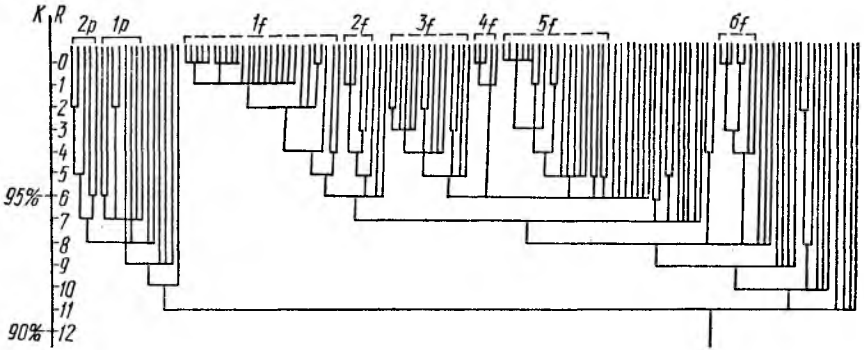


Рис. 29. Дендрограмма, образованная при численной классификации 124 штаммов флюоресцирующих бактерий:

1p, 2p — подгруппы, образованные внутри *P. putida*; 1f—6f — подгруппы, образованные внутри *P. fluorescens*, К — процент сходства, R — число отличий между штаммами

Нами изучено более 300 штаммов разжижающих желатин сапрофитных флюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas*. Все они — лоботрихи, не растущие при 42 °С, усваивающие трегалозу и инозит, не ассимилирующие ацетамид, глицин, гиппуровую кислоту. Следовательно, им свойственны некоторые общие физиолого-биохимические особенности.

Методами численной таксономии были изучены 106 штаммов. В ходе этих исследований они были распределены по шести подгруппам, объединяемым на уровне сходства 95,8 % (рис. 29, 30).

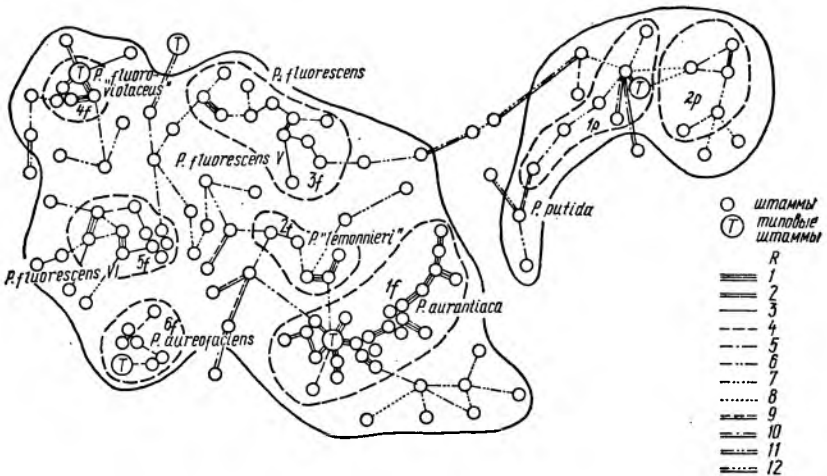


Рис. 30. Схема общей группировки флюоресцирующих бактерий рода *Pseudo-*  
*monas*.

R — число отличий между соседними штаммами. Обозначения те же, что и на рис. 29

1-я подгруппа — 25 штаммов, идентифицированных ранее как *P. aurantiaca*;

2-я подгруппа — 5 штаммов «*P. lemognieri*» (согласно 9-му изданию определителя Берги биовар IV *P. fluorescens*);

3-я подгруппа — 11 штаммов биовара V. *P. fluorescens*;

4-я подгруппа — 5 штаммов «*P. fluoro-violaceus*» — описанного нами сапрофитного флюоресцирующего вида, образующего фиолетовый пигмент гетероциклической природы;

5-ю подгруппу образовали 10 штаммов бактерий, синтезирующих значительные количества феназин-1-карбоновой кислоты и обозначенных нами ранее как биотип i (биовар VI) *P. fluorescens*.

Наконец, на уровне сходства 92,5 % к описанным микроорганизмам присоединилась подгруппа из 7 штаммов *P. augeofaciens*.

Нам не удалось выявить нумерическими методами подгруппы, соответствующие описанным в литературе биоварам I, II и III *P. fluorescens*. Штаммы, идентифицированные как представители этих биоваров, занимали промежуточное положение между названными выше подгруппами или примыкали к ним. В числе «примыкающих» оказался и типовой штамм *P. fluorescens* ИМВ 4125 (АТСС 13525).

Таким образом, изучаемый фенон слагался из субъединиц, в большинстве эквивалентных описанным ранее самостоятельным видам рода *Pseudomonas*. Средние расстояния между ними колебались от 10,01 до 15,67, т. е. были равны, а иногда и превышали межгрупповые расстояния, рассчитанные нами для других видов рода *Pseudomonas*<sup>1</sup>. Исключение составляли фенотипически близкие *P. aurantiaca* и «*P. lemognieri*», среднее расстояние между которыми было равно 5,76.

С помощью нумерических методов отобраны признаки, важные для дифференциации отдельных подгрупп (табл. 47). Ниже мы кратко охарактеризуем важнейшие фенотипические особенности этих групп и некоторых других флюоресцирующих видов, а также степень их геномного родства, изученную методом молекулярной гибридизации ДНК — ДНК.

***Pseudomonas aurantiaca* Nakhimovskaya, 1948.** Отличительным признаком этого вида является образование наряду с желто-зеленым флюоресцирующим пигментом красно-оранжевого, диффундирующего в среду, растворимого в воде и спиртах. Проведенные М. И. Нахимовской серологические исследования показали отсутствие родственной связи между *P. aurantiaca* и другими флюоресцирующими видами рода *Pseudomonas*. Однако никаких (кроме пигментообразования) отличительных особенностей этого вида ей обнаружить не удалось. Было сделано заключение, что утрата способности к синтезу оранжевого пигмента в условиях лабораторного культивирования «ведет к возникновению вариантов, не от-

<sup>1</sup> Показателями межгрупповых расстояний служили расстояния между центральными штаммами отдельных групп.

Таблица 47. Признаки, ценные для дифференциации некоторых подгрупп разжижающих желатин флюоресцирующих бактерий, образованных при их нумерической классификации

Признак	Номера подгрупп и их видовой состав					
	I. <i>P. aurantiaca</i>	II. « <i>P. lemonnieri</i> »	III. <i>P. fluorescens</i> биовар V	VI. « <i>P. fluorescens</i> » биовар VI	биовар VI	VII. <i>P. aureofaciens</i>
Оранжевый пигмент — комплекс фенозинов	—	—	—	—	—	+
Антибиотики — производные флороглюцина и оранжевый пигмент ароматической природы	+	—	—	—	—	—
Синий внутриклеточный пигмент — производное азабензохинона	—	+	—	—	—	—
Фиолетовый пигмент гетероциклической природы	—	—	—	+	—	—
Желтый пигмент — фенозин-1-карбоновая кислота	—	—	—	—	+	+
Денитрификация	+	+	—	+	+	—
Левансахараза	+	+	—	+	+	+
Гидролиз лецитина	—	—	+	+	+	+
Усвоение в качестве источника углерода						
ксилозы	+	+	в	+	+	—
галактозы	+	+	в	—	—	+
масляной кислоты	—	—	—	—	—	+
итаконовой кислоты	+	—	—	+	+	+
бутанола	+	+	—	+	—	—
о-оксибензойной кислоты	—	—	—	—	+	—
фенилаланина	+	+	+	—	+	+

личимых от *P. fluorescens*» [57, 66]. Нами выявлены дифференцирующие признаки *P. aurantiaca* и установлено положение этого вида среди других бактерий флюоресцирующей группы (табл. 48).

Все исследованные штаммы *P. aurantiaca* представляли собой подвижные грамтрицательные палочки, лофотрихи, имеющие от двух до пяти жгутиков.

Наряду с желто-зеленым флюоресцирующим бактерии образовывали красно-оранжевый, диффундирующий в среду пигмент ароматической природы ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} = 280$  и  $510$  нм). В среде вокруг колоний часто выпадали бесцветные кристаллы. В условиях лабораторного культивирования бактерий мы неизменно наблюдали пигментообразование при высеве культур на среду Кинг, жидкую либо агаризованную.

Все исследованные штаммы *P. aurantiaca* проявили высокую антибиотическую активность; последняя связана с синтезом комплекса антибиотических веществ — производных флороглюцина.

Таблица 48. Важнейшие биологические особенности штаммов *Pseudomonas aurantiaca* и биовара II *Pseudomonas fluorescens*

Признак	<i>P. aurantiaca</i> (33 штаммов)	<i>P. fluorescens</i> (29 штаммов)	Штаммы, положительные по данному признаку, %	Свойства «среднего организма»
Оранжевый пигмент ароматической природы, извлекаемый водой и спиртами	36	0	55	в
Комплекс антибиотиков — производных флороглюцина	36	29	100	+
Денитрификация	36	24	92	+
Синтез левана из сахарозы	36	29	100	+
Окисление глюконата	0	19	29	в
Гидролиз лецитина	0	24	37	в
Использование в качестве источника углерода				
ксялозы	36	28	98	+
галактозы	36	29	100	+
сахарозы	36	26	95	+
масляной кислоты	36	23	91	+
валериановой кислоты	36	29	100	+
адипиновой кислоты	0	2	3	—
пимелиновой кислоты	0	1	1	—
итаконовой кислоты	0	8	12	—
этанола	36	29	100	+
пропанола	34	29	100	+
сорбита	36	29	100	+
инозита	36	29	100	+
адонита	0	1	1	—
бутиленгликоля	36	24	92	+
бензойной кислоты	32	6	58	в
о-оксисбензойной кислоты	0	1	1	—
фенилуксусной кислоты	0	2	3	—
треонина	17	28	69	в
цитруллина	0	24	37	в
метионина	0	1	1	—
фенилаланина	36	24	92	+
триптофана	0	22	34	в
антраниловой кислоты	0	2	3	в
легких <i>n</i> -алканов C <sub>6</sub> —C <sub>10</sub>	15	1	25	в

Штаммы *P. aurantiaca* разжижали желатин, восстанавливали нитраты до свободного азота, образовывали леван на средах с сахарозой, использовали в качестве источника углерода более 50 органических соединений. Их отличительная особенность — усвоение жирных кислот (масляной, валериановой), низших спиртов, полиспиртов и гликолей (этанола, пропанола, бутанола, бутиленгликоля, сорбита). В то же время они не усваивали адонит, фенилацетат, итаконовую кислоту, триптофан, цитруллин. Своеобразная черта углеродного питания *P. aurantiaca* — его отношение к короткоцепочечным *n*-алканам. Из 36 штаммов 15 росли на синтетической среде в атмосфере разнообъемной смеси углеводов.

Рост сопровождался синтезом специфических для *P. aurantiaca* оранжевого пигмента и комплекса антибиотических веществ.

Штаммы *P. aurantiaca* характеризовались высокой однородностью фенотипических свойств, что подтверждено и при их нумерической классификации: различия между штаммами находились в пределах 1—2, редко 4 признаков, т. е. степень сходства между ними была не менее 96,6 %.

Среди других разжижающих желатин флюоресцирующих бактерий штаммам *P. aurantiaca* наиболее близки по свойствам штаммы биовара II *P. fluorescens*. Их сближает способность к денитрификации, синтезу левана, ассимиляция масляной кислоты, низших спиртов, сорбита и инозита.

В отличие от *P. aurantiaca* многие штаммы биовара II окисляли глюконат до 2-кетоглюконата, ассимилировали цитруллин и триптофан, обладали лецитиназной активностью. Определенные отличия обнаруживались и в их способности к пигментации и антибиотикообразованию, на чем мы остановимся ниже.

Нуклеотидный состав ДНК штаммов *P. aurantiaca* колебался в пределах 61,7—62,9 % ГЦ, степень их геномного сходства была высокой — 81—96 %:

Вид, биовар, штамм	ГЦ, % *	Вид, биовар, штамм	ГЦ, % *
<i>P. fluorescens</i>		<i>P. aureofaciens</i>	
биовар		2116	64,5
I 4125	62,3	4133	64,0
II 1602	62,1	4180	64,3
III 2125	63,2	<i>P. aurantiaca</i>	
V 1488	63,2	387	62,9
VI 1931	61,5	2041	61,7
VI 2303	61,2	2450	61,9
« <i>P. lemonnieri</i> »		2680	62,0
2401	61,8	« <i>P. fluoro-violaceus</i> »	
2856	61,8	3	63,2
		881	64,0
		2698	61,8

\* Результат представляет собой среднее из трех повторных определений.

В то же время значения гомологии ДНК штаммов *P. aurantiaca* с другими флюоресцирующими видами и биоварами *P. fluorescens* составляли 0—49 %, т. е. находились, согласно современным представлениям, на уровне межвидовых (табл. 49). Исключение составляли штаммы биовара II *P. fluorescens*, проявляющие высокую (90—100 %) степень генетического родства со штаммами *P. aurantiaca*.

Выше мы уже упоминали о значительном фенотипическом сходстве между штаммами *P. aurantiaca* и биовара II *P. fluorescens*. Данные геносистематики побудили нас изучить более подробно способность штаммов биовара II к пигментации и антибиотикообразованию — этой важнейшей отличительной особенностью *P. aurantiaca*. При выращивании 26 штаммов биовара II на агаризованной среде Кинг в течение 5 сут и ее последующей экстракции

Таблица 49. Степень геномного родства штаммов некоторых флюоресцирующих видов и биоваров *Pseudomonas fluorescens*, определенная методом молекулярной гибридизации ДНК — ДНК

Сопоставляемые штаммы	P. fluorescens, биовары					«P. lemonnierii» 2401	P. aurantiaca		«P. fluoro-violaceus»		P. aureofaciens 4180
	I 4125	II 1602	III 2125	V 1488	VI 2303		387	2041	381	3	
Биовар											
I 4125		21		31		49 *	0	4	60	45 *	
II 1602							100	90	46		
III 2125					29						
V 1488	31						49				48
VI 1931	26 *										
VI 2303			29					47			51
«P. lemonnierii» 2856	31										
«P. fluoro-violaceus» 2698										103	
P. aureofaciens 2116	24 *										
4133											82
4180						19	27				
P. aurantiaca 387	0	100		49							27
2041	4	90			47		86				19
2450	0							96			
2680	23		36			23	81	81	12		46

Примечания. Цифры в таблице обозначают процент реассоциации ДНК, у большинства штаммов гибридизация проведена спектрофотометрическим методом [61]; (\*) — гибридизация проведена изотопным методом.

серным эфиром мы наблюдали небольшие (однако определяемые методом тонкослойной хроматографии) количества 2,4-диацетилфлороглюцина и флорацетифенона. На жидкой среде в условиях азарации антибиотики не синтезировались. Штаммы биовара II не образовывали и красно-оранжевый пигмент. Последний является окисленной хиноидной формой производных флороглюцина, его предшественником служат бесцветные, антибиотически активные компоненты, а их содержание в среде в данном случае было низким и не обеспечивало пигментообразования.

Мы считаем, что штаммы биовара II можно рассматривать как штаммы *P. aurantiaca* с ослабленной способностью к синтезу характерных для этого вида антибиотиков и пигментов.

Как упоминалось выше, *P. aurantiaca* был включен в списки одобренных видовых названий с указанием типового штамма *P. aurantiaca* NCIB 10068 (ВКМ В-876).

Нами подробно изучены свойства штамма ИМВ 4180 и показано, что он является типичным представителем *P. aureofaciens*. Достаточно сказать, что при высокой степени гомологии ДНК (82 %) со штаммами *P. aureofaciens* он проявил весьма низкие уровни геномного родства со штаммами *P. aurantiaca* (см. табл. 49). Синтезируемый им оранжевый пигмент (вопреки описанию вида у М. И. Нахимовской) хорошо извлекался из среды хлороформом и представлял собой смесь феназинкарбоновых кислот.



Т а б л и ц а 50. Важнейшие биологические особенности штаммов *Pseudomonas aurantiaca*, *Pseudomonas aureofaciens* и предлагаемого нетипичного штамма *Pseudomonas aurantiaca*

Биологические свойства	<i>P. aureofaciens</i> ATCC 13 985 (ИМВ 4133) типовой	<i>P. aurantiaca</i> ВКМ В — 876 (ИМВ 4180) типовой	<i>P. aurantiaca</i> ATCC 49 054 ВКМ В — 1524 (ИМВ 387) предлагаемый неотип
Нуклеотидный состав ДНК (ГЦ, %)	64,5	64,0	62,9
Оранжевый пигмент, комплекс производных феназина	+	+	—
Оранжевый пигмент ароматической природы	—	—	—
Комплекс антибиотиков — производных флороглюцина	—	—	+
Денитрификация	—	—	+
Синтез левана из сахарозы	+	+	+
Окисление глюконата	+	+	—
Гидролиз			
лецитина	+	+	—
твина-80	+	+	—
РНК	+	+	—
Усвоение в качестве источника углерода			
ксилозы	—	—	+
масляной кислоты	—	—	+
итаконовой кислоты	+	+	—
этанола	—	—	+
пропанола	—	—	+
сорбита	—	—	+
фенилуксусной кислоты	+	+	—
триптофана	+	+	—
антралиловой кислоты	+	+	—

Штамм 4180 обладал также характерным для *P. aureofaciens* спектром углеродного питания.

Таким образом, представленный в настоящее время в международных коллекциях типовой штамм *P. aurantiaca* реклассифицирован нами как *P. aureofaciens*.

Под видовым названием *P. aurantiaca* мы предлагаем объединить описанные нами оранжевопигментные микроорганизмы, генетически и фенотипически близкие им штаммы биовара II *P. fluorescens*. В качестве нетипичного штамма нами предложен штамм *P. aurantiaca* ИМВ 387 (ВКМ-1524-АТСС 49054). Отличительными особенностями этого вида и его типичного штамма (табл. 50) являются: наличие комплекса антибиотиков группы флороглюцина, характерный оранжевый пигмент ароматической природы (у части штаммов), синтез левана, активная денитрификация, способность к ассимиляции ксилозы, сахарозы, галактозы, сорбита и инозита, масляной кислоты и низших спиртов.

Штаммы *P. aurantiaca* — одни из наиболее чувствительных к антибиотикам и красителям среди микроорганизмов флюоресци-

рующей группы. По своей экологии это типичные почвенные микроорганизмы. Около половины штаммов выделено нами из ризосферы пшеницы, ржи, конопли, льна и других растений, 43 % — из почв, свободных от растений, в том числе нефтеносных. Три штамма выделено из воды минеральных источников, пять получено из других коллекций.

*Pseudomonas aureofaciens* Kluuyver, 1956. Представители этого вида характеризуются наряду с желто-зеленой флюоресценцией ярко-оранжевым диффундирующим в среду пигментом, извлекаемым хлороформом и представляющим собой смесь близких по строению фенозикарбоновых кислот.

Штаммы *P. aureofaciens* выделены нами из нефтеносных почв и ризосферы растений. Исследовано 9 штаммов этого вида, в том числе типовой ИМВ 4133 (АТСС 13985).

Культуральные свойства *P. aureofaciens* весьма своеобразны. На многих средах колонии ярко-оранжевые в центре, коричневые по краю. Оранжевый пигмент диффундирует в среду, выпадая вокруг колоний в виде красно-бурых кристаллов. В состав пигментного комплекса *P. aureofaciens* входит феназин-1-карбоновая кислота — желтый антибиотически активный пигмент, широко распространенный у различных видов псевдомонад и ошибочно принимаемый за основной, характерный пигмент *P. aureofaciens*.

Между тем видоспецифичными для *P. aureofaciens* являются красные 2-оксифеназиновые пигменты, обуславливающие высокую антагонистическую активность этого вида и не найденные у других видов рода *Pseudomonas*.

Штаммы *P. aureofaciens* обильно синтезируют леван и являются наиболее активными продуцентами лецитиназ и липаз среди изученных видов рода *Pseudomonas* (табл. 51). Они характеризуются высокой однородностью свойств, что подтверждено нумерическим анализом: не усваивают ксилозу, сорбит, этанол и пропанол, хорошо растут на пропионовой, масляной, валериановой и (что типично для данного вида) фенилуксусной кислоте. Используют также триптофан и антранилат, не ассимилируют углеводороды нефти.

Полученные нами данные о нуклеотидном составе ДНК *P. aureofaciens* близки результатам других авторов (см. с. 162). Обладая высокой степенью геномного родства между штаммами своего вида, представители *P. aureofaciens* имеют от 19 до 51 % сходных нуклеотидных последовательностей ДНК с *P. aurantiaca* и некоторыми биоварами *P. fluorescens*.

*P. aureofaciens* — наиболее устойчивый к химиотерапевтическим агентам вид флюоресцирующей группы, превосходящий в этом отношении даже *P. aeruginosa*. Он резистентен ко всем испытанным красителям. Из антибиотиков на него действовал только полимиксин и некоторые аминогликозиды (гентамицин, мономицин, неомицин). В целом *P. aureofaciens* — один из наиболее легко идентифицируемых, однородных по свойствам, обособленных фенотипически и генетически видов флюоресцирующей группы.

Таблица 51. Важнейшие биологические особенности 9 штаммов *Pseudomonas aureofaciens*

Признак	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%	
Оранжевый пигмент — комплекс феназинов	9	100	+
Денитрификация	1	11	—
Синтез левана из сахарозы	9	100	+
Окисление глюконата	9	100	+
Гидролиз			
лецитина	9	100	+
ДНК	0	0	—
РНК			—
твина-80	9	100	+
Использование в качестве источника углерода			
ксилозы	0	0	—
галактозы	9	100	+
сахарозы	9	100	+
масляной кислоты	8	88	+
валериановой кислоты	9	100	+
адипиновой кислоты	0	0	—
итаконовой кислоты	9	100	+
этанола	0	0	—
пропанола	1	11	—
бутанола	4	44	в
сорбита	0	0	—
инозита	9	100	+
адонита	0	0	—
бутиленгликоля	8	88	+
бензойной кислоты	8	88	+
о-оксибензойной кислоты	0	0	—
фенилуксусной кислоты	9	100	+
треонина	5	55	в
цитруллина	5	55	в
метионина	0	0	—
триптофана	9	100	+
антраиловой кислоты	8	88	+
никотиновой кислоты	0	0	—
легких <i>n</i> -алканов C <sub>6</sub> —C <sub>10</sub>	0	0	0
среднепочечных C <sub>14</sub> —C <sub>22</sub>	0	0	—

*Pseudomonas chlororaphis* (Guignard and Sauvegeau, 1894), Bergey, Harrison, Breed, Hammer and Huntoon, 1930. Микроорганизмы этого вида выделялись различными авторами из разлагающихся остатков, воды, рыб, насекомых. Их отличительной особенностью является образование в центре колоний, а также в толще среды изумрудно-зеленых кристаллов феназинового пигмента хлорорафина.

Нами исследованы типовой штамм *P. chlororaphis* ИМВ 4139 (ATCC 9446), а также ИМВ 5409, выделенный из ризосферы банана и идентифицированный на основании химических свойств образуемого им пигмента (оксихлорорафина). Типовой штамм

Т а б л и ц а 52. Важнейшие биологические особенности штаммов *Pseudomonas chlorographis*

Признак	Штаммы		Признак	Штаммы	
	4139	5409		4139	5409
Зеленый феназиновый пигмент — хлорографин — или его амид оксихлорографин	—	+	пропанола	—	—
Денитрификация	+	+	сорбита	—	—
Синтез левана из сахарозы	+	+	инозита	+	+
Окисление глюконата	+	+	адонита	—	—
Гидролиз лецитина	+	+	бутиленгликоля	+	+
Использование в качестве источника углерода			бензойной кислоты	+	+
ксилозы	—	—	о-оксibenзойной кислоты	—	—
галактозы	+	+	фенилуксусной кислоты	+	+
сахарозы	+	—	треонина	—	—
масляной кислоты	+	—	цитруллина	+	—
валериановой кислоты	+	+	метионина	—	—
адипиновой кислоты	—	—	фенилаланина	+	+
пимелиновой кислоты	—	—	триптофана	+	+
итаконической кислоты	+	—	никотиновой кислоты	—	—
этанола	—	—	легких <i>n</i> -алканов C <sub>6</sub> —C <sub>10</sub>	—	—
			грозденского парафина C <sub>14</sub> —C <sub>22</sub>	—	—

*P. chlorographis* не синтезировал хлорографин даже на средах, оптимальных для его образования.

Результаты изучения этих микроорганизмов (табл. 52), а также характеристика *P. chlorographis*, приведенная в литературе, свидетельствуют, что дифференцирующими признаками этого вида являются: образование хлорографина или его амида, синтез левана, денитрификация, высокая лецитиназная активность, ассимиляция фенилацетата и триптофана, неспособность к усвоению ксилозы, сорбита, низших спиртов.

Обращает на себя внимание значительное сходство между штаммами *P. chlorographis* и *P. aureofaciens*. Различия между этими двумя видами касаются лишь химической природы образуемых пигментов и способности к денитрификации, близки они и генетически.

«*Pseudomonas lemonnierii*» (Lasseur) Breed, 1948. Штаммы «*P. lemonnierii*» включены Стейниером с соавторами в состав *P. fluorescens* в качестве биотипа F (он же биовар IV согласно 9-му изданию определителя Берги). Описание этого биотипа было основано на результатах изучения двух штаммов «*P. lemonnierii*».

В нашем распоряжении было 15 штаммов этого вида. При росте на общепринятых средах они не синтезировали иных пигментов, кроме зеленого флюоресцирующего, однако на капустной среде 14 штаммов образовали темно-синий, не диффундирующий в среду и прочно связанный с клетками пигмент (производное азабензохинона), обладающий слабой антибиотической активностью.

Т а б л и ц а 53. Важнейшие биологические особенности 15 штаммов «*Pseudomonas lemoignieri*»

Признак	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%	
Синий внутриклеточный пигмент — производное азабензохинона	14	93	+
Денитрификация	12	80	+
Синтез левана из сахарозы	15	100	+
Окисление глюконата	0	0	—
Гидролиз лецитина			
Усвоение в качестве источника углерода			
ксилозы	12	80	+
галактозы	13	93	+
сахарозы	14	93	+
масляной кислоты	0	0	—
валериановой кислоты	4	27	в
адипиновой кислоты	0	0	—
итаконовой кислоты	0	0	—
этанола	11	73	в
пропанола	11	73	в
сорбита	14	93	+
инозита	14	93	+
адонита	2	13	—
бутиленгликоля	12	80	+
бензойной кислоты	2	13	—
о-оксибензойной кислоты	2	13	—
фенилуксусной кислоты	0	0	—
треонина	7	47	в
цитруллина	3	20	—
метионина	0	0	—
триптофана	3	20	—
антраниловой кислоты	0	0	—
никотиновой кислоты	0	0	—
легких <i>n</i> -алканов C <sub>6</sub> —C <sub>10</sub>	1	6	—
среднепечечных C <sub>14</sub> —C <sub>22</sub>	0	0	—

Все штаммы «*P. lemoignieri*» были активными денитрификаторами (табл. 53), синтезировали леван, лецитиназная активность была слабой или отсутствовала. В отличие от большинства флюоресцирующих бактерий ни один из штаммов «*P. lemoignieri*» не окислял глюконат. Эта особенность сближает их со штаммами *P. aurantiaca*.

Спектры углеродного питания «*P. lemoignieri*» были пестрыми: подавляющее большинство штаммов использовало ксилозу, сахарозу, галактозу, инозит, бутиленгликоль; некоторым штаммам были доступны валериановая кислота, этанол, пропанол.

Штаммы «*P. lemoignieri*» выделены из ризосферы различных растений, почвы, свободной от растений, ила и воды минеральных источников, личинок комаров.

«*P. lemopnieri*» — один из наиболее чувствительных к действию красителей и антибиотиков видов флюоресцирующей группы. Рост большинства штаммов угнетался красителями группы парафуксина — кристалл-, метил-, генцианвиолетом и метиловым зеленым; части штаммов — хинолиновым синим, малахитовым и бриллиантовым зеленым. Из антибиотиков на них действовали левомицетин, тетрациклин, полимиксин, все испытанные аминогликозиды, ампициллин. Рост некоторых штаммов ингибировался эритромицином, как правило, эффективным лишь в отношении грамположительной флоры.

Штаммы «*P. lemopnieri*» плохо сохранялись в условиях лаборатории, быстрее других флюоресцирующих видов теряли способность к пересевам.

Количество ГЦ-пар в ДНК штаммов «*P. lemopnieri*» составляло 61,8—61,9 %. Результаты молекулярной гибридизации ДНК — ДНК штаммов этого вида с другими видами *Pseudomonas* (см. табл. 49) не превышали 49 %, т. е. находились на уровне межвидовых.

**Биовары I, III, V, *Pseudomonas fluorescens*.** Биовары I—V (биотипы А, В, С, G, созданные Стейннером с соавторами при ревизии *P. fluorescens*) отличаются наличием левансахараз, способностью к денитрификации, спектрами углеродного питания. Штаммы биоваров не способны к синтезу иных пигментов, кроме желто-зеленого флюоресцирующего. В нашем распоряжении было 202 таких штамма. Из них 29, отнесенные к биовару II, оказались генетически и фенотипически близкими штаммами *P. aurantiaca* и рассмотрены нами выше. Остальные 173 штамма принадлежали к биоварам I, III и V.

Биовар I (30 штаммов). Антагонистическая активность слабая или умеренная, антибиотические вещества не обнаружены. Все штаммы образовывали леван на средах с сахарозой, не были способны к денитрификации, активность лецитиназ варьировала. Среди представителей биовара А найдены продуценты бактериоцинов.

Отличительная особенность штаммов биовара I — неспособность к ассимиляции масляной кислоты и алифатических спиртов от этанола до бутанола (табл. 54). Значительная часть культур (83 %) усваивала адонит — субстрат, малопригодный для роста большинства флюоресцирующих видов.

Два фенотипически сходных с биоваром А штамма были лишены левансахараз. Подобные «примыкающие» штаммы обнаружены нами и при других биоварах (см. данные нумерической таксономии) и рассматриваются как переходные между биоварами. Штаммы биовара А выделены из почвы и ризосферы растений, воды минеральных источников, личинок комаров.

Содержание ГЦ в ДНК типового штамма ИМВ 4125 (АТСС 13525) составляло 62,3 %. Этот штамм проявил умеренное генетическое родство с представителями других биоваров *P. fluorescens* (см. табл. 49).

Таблица 54. Важнейшие биологические особенности штаммов биоваров I и III *Pseudomonas fluorescens*

Признак	Биовар I (30 штаммов)			Биовар III (73 штамма)		
	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%		абс.	%	
Флюоресцирующий пигмент	27	90	+	64	88	+
Денитрификация	0	0	—	73	100	+
Синтез левана из сахарозы	30	100	+	0	0	—
Окисление глюконата	23	27	в	60	82	+
Гидролиз						
лецитина	18	60	в	19	26	в
ДНК	0	0	—	0	0	—
РНК	2	6	—	0	0	—
Использование в качестве источника углерода						
ксилозы	25	83	+	43	59	в
галактозы	20	67	в	50	68	в
сахарозы	20	67	в	40	55	в
масляной кислоты	0	0	—	46	63	в
валериановой кислоты	13	43	в	59	81	+
адипиновой кислоты	0	0	—	11	15	—
итаконовой кислоты	12	40	в	13	18	—
этанола	0	0	—	65	89	+
пропанола	0	0	—	65	89	+
сорбита	27	90	+	45	62	в
инозита	29	97	+	45	62	в
адонита	25	83	+	15	20	—
бутиленгликоля	10	33	в	53	73	в
бензойной кислоты	8	27	в	58	79	в
о-оксibenзойной кислоты	0	0	—	0	0	—
фенилуксусной кислоты	3	10	—	13	18	—
треонина	6	20	—	40	55	в
цитрулина	6	20	—	25	34	в
метионина	0	0	—	2	3	—
триптофана	29	97	+	11	15	—
антралиновой кислоты	4	13	—	3	4	—
никотиновой кислоты	2	7	—	0	0	—
легких n-алканов C <sub>6</sub> —C <sub>10</sub>	0	0	—	8	11	—

Биовар III (биотип С согласно Стейниеру) — один из самых многочисленных и наиболее гетерогенных по составу биоваров *P. fluorescens*. Основными критериями для отнесения к нему бактерий являются способность к денитрификации и отсутствие левансахараз. Среди штаммов, обладающих этими свойствами, Чемпион и соавторы выделили несколько феногрупп, в том числе новые биовары К и I [139].

У исследованных нами штаммов биовара III также обнаружена значительная пестрота в спектрах углеродного питания. Преобладающая часть штаммов биовара III усваивала этанол, пропанол и инозит (см. табл. 54). Хорошим субстратом для роста

большинства штаммов служили также валериановая и бензойная кислоты.

Восемь штаммов биовара III хорошо росли на минеральной среде в атмосфере легких *n*-алканов. Рост сопровождался обильной желто-зеленой флюоресценцией и синтезом антибиотических веществ неуставленной химической природы.

Штаммы биовара III *P. fluorescens* выделены из ризосферы растений, нефтеносных и других почв, воды минеральных источников, нефтеносных скважин. Среди них имеются высокоактивные антагонисты, угнетающие рост грамположительных бактерий, *Candida albicans* и грибов.

Содержание ГЦ-пар в ДНК штамма биовара III *P. fluorescens* составляло 63,2 %, а значения гомологии ДНК с представителями некоторых других биоваров колебались в пределах 29—36 % (см. табл. 49).

К биовару V отнесены 70 штаммов *P. fluorescens*. В опытах Стейниера с соавторами этот биовар (биотип G) объединял все штаммы, не укладывающиеся в биотипы A, B, C, и характеризовался крайней фенотипической гетерогенностью, в связи с чем получил название «сборной группы штаммов». Сколько-нибудь приемлемые диагностические признаки для его идентификации не были предложены.

Штаммы биовара V лишены ферментов денитрификации и леваисахараз. Эти флюоресцирующие микроорганизмы широко распространены в природе. К биовару V были отнесены 65 % флюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных Сэндсом и Ровира [432] из почв Южной Австралии. Штаммы биовара V составляли 76 % среди флюоресцирующих бактерий, населяющих почвы Арктики, 66 % микрофлоры пустынь и полупустынь, 35 % микроорганизмов, выделенных из почв субтропиков [8].

Изученные нами штаммы биовара V, в отличие от данных Стейниера, были высокооднородны по свойствам (табл. 55). Биохимически наименее активные среди всех представителей *P. fluorescens*; штаммы этого биовара использовали лишь субстраты, универсальные для всей флюоресцирующей группы рода *Pseudomonas*, а часть штаммов — также некоторые углеводы и валериановую кислоту. Однако им были недоступны спирты, полиспирты, многие аминокислоты и другие соединения, избирательно потребляемые биоварами I, II, III *P. fluorescens* и отдельными флюоресцирующими видами.

Штаммы биовара V были преимущественно ризосферного (47 штаммов), почвенного (7) и водного (16) происхождения. Содержание ГЦ в ДНК штамма 1488 составляло 63,2 %, а его геномное сходство с некоторыми представителями флюоресцирующей группы колебалось в пределах 31—49 % (см. табл. 49).

Выше мы упоминали о проведенной Барретт и соавт. [110] нумерической классификации 72 штаммов биовара V *P. fluorescens*. Последние были разделены на 7 кластеров, различающихся по спектрам углеродного питания. Изученные нами 70 штаммов



Т а б л и ц а 55. Важнейшие биологические особенности 70 штаммов биовара V *Pseudomonas fluorescens*

Признак	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%	
Флюоресцирующий пигмент	69	98	+
Денитрификация	0	0	—
Синтез левана из сахарозы	0	0	—
Окисление глюконата	70	100	+
Гидролиз			
лецитина	28	40	в
ДНК	0	0	—
РНК	0	0	—
Использование в качестве источника углерода			
ксилозы	10	14	—
галактозы	28	40	в
сахарозы	28	40	в
масляной кислоты	0	0	—
валериановой кислоты	24	34	в
адипиновой кислоты	0	0	—
итаконовой кислоты	0	0	—
этанола	0	0	—
пропанола	0	0	—
сорбита	5	7	—
инозита	5	7	—
адонита	0	0	—
бутиленгликоля	0	0	—
бензойной кислоты	7	10	—
о-оксибензойной кислоты	0	0	—
фенилуксусной кислоты	0	0	—
треонина	0	0	—
цитруллина	4	6	—
метионина	0	0	—
триптофана	0	0	—
антраниловой кислоты	0	0	—
никотиновой кислоты	0	0	—
легких n-алканов C <sub>6</sub> —C <sub>10</sub>	0	0	—

флюоресцирующих бактерий не были сходны ни с одним из описанных кластеров и, по-видимому, представляют собой еще одну подгруппу среди многочисленных и гетерогенных по свойствам представителей биовара V *P. fluorescens*.

**Биовар VI *Pseudomonas fluorescens*.** 28 штаммов флюоресцирующих бактерий не поддавались идентификации согласно существующим определителям. Кроме признаков, общих для всех микроорганизмов флюоресцирующей группы, им были присущи высокая желатиназная и лецитиназная активности. Лишь один из исследованных штаммов синтезировал леван из сахарозы; 22 из 28 окисляли глюконат (табл. 56).

Специфична способность микроорганизмов исследуемой группы усваивать адонит — субстрат, доступный лишь для штаммов биовара I *P. fluorescens*. Галактоза, сахароза, масляная кислота,

Т а б л и ц а 56. Важнейшие биологические особенности 28 штаммов биовара VI *Pseudomonas fluorescens*

Признак	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%	
Денитрификация	13	46	в
Синтез желтого пигмента — феназин-1-карбоновой кислоты	13	46	в
Синтез левана из сахарозы	1	3	—
Окисление глюконата	22	78	в
Гидролиз			
лецитина	27	96	+
РНК			
ДНК			
Использование в качестве источника углерода			
ксилозы	27	96	+
галактозы	2	7	—
сахарозы	5	18	—
масляной кислоты	0	0	—
валериановой кислоты	22	78	в
адипиновой кислоты	3	11	—
итаконовой кислоты	26	93	+
этанола	10	36	в
пропанола	12	43	в
сорбита	26	93	+
инозита	28	100	+
адонита	25	89	+
бутиленгликоля	20	71	—
бензойной кислоты	7	25	в
о-оксибензойной кислоты	15	53	в
фенилуксусной кислоты	0	0	—
треонина	21	75	в
цитруллина	18	64	в
метионина	7	25	в
триптофана	27	96	+
антралиловой кислоты	23	82	+
никотиновой кислоты	27	96	+
легких <i>n</i> -алканов C <sub>6</sub> —C <sub>10</sub>	0	0	—
среднепечечных C <sub>14</sub> —C <sub>22</sub>	0	0	—

углеводороды нефти не потреблялись ни одним штаммом. Однако наиболее характерной чертой этой группы микроорганизмов являлась одновременная ассимиляция никотиновой кислоты, триптофана и антралилата.

Несмотря на значительную однородность свойств, описываемые штаммы распадались на две группы по способности к синтезу пигментов. 13 штаммов выделяли в среду значительные количества феназин-1-карбоновой кислоты, с чем была связана высокая антагонистическая активность этой группы. Все 13 культур использовали нитрат в качестве акцептора электронов. 15 остальных штаммов не синтезировали феназиновых пигментов и обладали значительно меньшей антагонистической активностью; они были не способны к денитрификации.

Т а б л и ц а 57. Важнейшие биологические особенности 13 штаммов «*Pseudomonas fluoro-violaceus*»

Признак	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%	
Денитрификация	13	100	+
Образование фиолетового пигмента, диффундирующего в среду и извлекаемого хлороформом	13	100	+
Синтез левана из сахарозы	13	100	+
Окисление глюконата	13	100	+
Гидролиз			
лецитина	13	100	+
ДНК	0	0	—
РНК	0	0	—
Использование в качестве источника углерода			
ксилозы	13	100	+
галактозы	4	31	в
сахарозы	7	54	в
масляной кислоты	0	0	—
валериановой кислоты	10	77	в
адипиновой кислоты	0	0	—
итаконовой кислоты	13	100	+
этанола	13	100	+
пропанола	13	100	+
сорбита	13	100	+
адонита	2	15	—
бутиленгликоля	13	100	+
бензойной кислоты	1	8	—
о-оксибензойной кислоты	0	0	—
фенилуксусной кислоты	0	0	—
треонина	0	0	—
цитрулина	10	77	в
метионина	12	92	+
триптофана	13	100	+
антраниловой кислоты	2	15	—
никотиновой кислоты	1	8	—
легких <i>n</i> -алканов C <sub>6</sub> —C <sub>10</sub>	0	0	—
среднецепочечных C <sub>14</sub> —C <sub>22</sub>	0	0	—

По своим биологическим особенностям эта группа штаммов была несколько сходна с биоваром III *P. fluorescens* и рассматривалась нами как новая фенотипическая группа в рамках этого гетерогенного биовара. Однако ее представитель штамм 2303 обладал лишь 29 % геномного родства со штаммом 2125 биовара III. Достаточно отдалены от него генетически и штаммы *P. aureofaciens* — вида, также синтезирующего феназин-1-карбоновую кислоту (см. табл. 49). Вопрос о таксономическом статусе рассматриваемой группы бактерий требует дополнительных исследований; пока мы обозначаем ее как *P. fluorescens*, биовар VI.

Штаммы биовара VI выделены из ризосферы, нефтеносных почв, воды минеральных источников. Их нуклеотидный состав

ДНК составлял 61,2—61,5 %, т. е. был типичным для микроорганизмов флюоресцирующей группы рода *Pseudomonas*.

«*Pseudomonas fluoro-violaceus*» Kirpianova, Voiko 1972. Группа своеобразных по свойствам микроорганизмов была отнесена нами к новому виду «*Pseudomonas fluoro-violaceus*».

Видовое название было дано исходя из принадлежности бактерий к флюоресцирующей группе и из их способности синтезировать экстрацеллюлярный фиолетовый пигмент. В табл. 57 приведены свойства, которые дают возможность отличить описываемые микроорганизмы от бактерий других флюоресцирующих видов.

Штаммы «*P. fluoro-violaceus*» были лофотрихами, активными денитрификаторами, синтезировали леван из сахарозы и обладали значительной желатиназной и лецитиназной активностью. В качестве единственного источника углерода представители этого вида усваивали ксилозу, итаконовую кислоту, алифатические спирты, бутиленгликоль, сорбит, инозит, метионин, триптофан.

По физиологии «*P. fluoro-violaceus*» наиболее близок к денитрифицирующим и левансинтезирующим видам *P. aurantiaca* и «*P. lemonnierii*». Однако он отличается от них характером образуемых пигментов, наличием лецитиназ, способностью усваивать итаконовую кислоту и триптофан. Кроме того, в противоположность «*P. lemonnierii*» штаммы «*P. fluoro-violaceus*» усваивали метионин; в отличие от *P. aurantiaca* не ассимилировали масляную кислоту.

Штаммы «*P. fluoro-violaceus*» выделены из ризосферы различных растений. Все они обладали умеренной антагонистической активностью в отношении грамположительных бактерий и грибов, что обусловлено синтезом фиолетового антибиотически активного пигмента.

ГЦ-содержание ДНК «*P. fluoro-violaceus*» составляло 61,8—64,0 % (см. с. 162). Значения гомологии ДНК между штаммами внутри группы были высокими, родство с представителями других флюоресцирующих видов составляло от 12 до 60 %. Типовой штамм — «*P. fluoro-violaceus*» ИМВ 881.

По некоторым биологическим свойствам штаммы «*P. fluoro-violaceus*» сходны (а может быть и идентичны) с «*P. fluorescens* var. *pseudo-iodinum*» — разновидностью, синтезирующей фиолетовый пигмент псевдоиодинин [299]. Краткое описание свойств этого продуцента свидетельствует, что подобно «*P. fluoro-violaceus*» он принадлежит к флюоресцирующей группе рода *Pseudomonas*, обладает пучком жгутиков, разжижает желатин, восстанавливает нитраты. По-видимому, сходны и образуемые этими микроорганизмами гетероциклические пигменты. Для окончательного решения вопроса о таксономическом статусе, родстве и наименовании обеих групп микроорганизмов необходимо их сравнительное изучение, включающее гибридизацию ДНК — ДНК.

## НЕ РАЗЖИЖАЮЩИЕ ЖЕЛАТИН ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩИЕ САПРОФИТНЫЕ ВИДЫ

***Pseudomonas putida*** (Trevisan, 1889) Migula, 1895.

Не разжижающие желатин сапрофитные флюоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas* описаны под видовыми названиями «*P. striata*», «*P. ovalis*», «*P. incognita*», «*P. rugosa*», «*P. convexa*», «*P. eisenbergii*», «*P. mildenbergii*», «*P. nonliquefaciens*», «*P. synsuapea*» и др. Их объединение было существенным шагом вперед, однако гетерогенность «укрупненного» вида *P. putida* была очевидной уже в момент его создания. Эта гетерогенность нашла отражение в структуре *P. putida*; в состав вида входят биовары А и В; в последние годы описан третий биовар — С [110].

Имевшиеся в нашем распоряжении 46 штаммов *P. putida* были отнесены к этому виду прежде всего на основании их неспособности к гидролизу желатина.

Помимо признаков, свойственных флюоресцирующей группе рода *Pseudomonas* в целом, эти штаммы характеризовались рядом общих особенностей (табл. 58): гидролитические ферменты отсутствовали; антагонистическая активность была умеренной или слабой; при этом многие из них оказывали угнетающее влияние на штаммы своего вида, что, по-видимому, связано с явлением бактериоциногении. На средах с тирозином 65 % культур синтезировали темноокрашенные пигменты группы меланинов.

Спектры углеродного питания позволяют выявить ряд субстратов, используемых значительным большинством штаммов *P. putida*. Помимо универсальных источников углерода хорошо усваивались масляная и валериановая кислоты, низшие спирты, бутилглицоль, орнитин; 41 % культур ассимилировали тартрат — соединение, редко используемое другими видами псевдомонад, и 45 % — глицин; большинство штаммов усваивали фенилацетат, креатин и гиппуровую кислоту. Способность к ассимиляции трех последних источников углерода является дифференциальным признаком *P. putida*.

В целом диагностика вида основывается не на положительных, а на отрицательных свойствах (отсутствие желатиназ, левансахараз, ферментов денитрификации и др.).

По набору ферментных систем и спектрам углеродного питания штаммы *P. putida* проявляют значительное сходство с представителями биовара V *P. fluorescens*. Однако их сравнительный анализ (табл. 59) показывает, что по ряду признаков (ассимиляция трегалозы, масляной кислоты, низших спиртов и др.) микроорганизмы этих таксонов четко дифференцируются.

Штаммы *P. putida* крайне гетерогенны в отношении источников углеродного питания, ассимилируя от 32 до 84 различных субстратов. Высокая неоднородность их свойств была подтверждена и при нумерическом анализе, с помощью которого у *P. putida* выявлены две подгруппы (рис. 31). Впоследствии по этим подгруппам

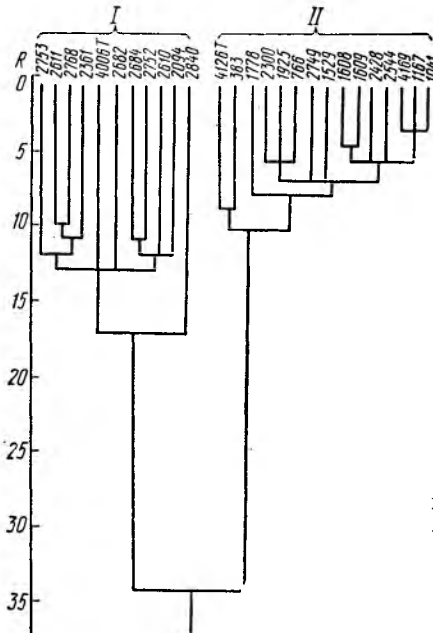
Т а б л и ц а 58. Важнейшие биологические особенности 46 штаммов *Pseudomonas putida*

Признак	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%	
Наличие пучка полярных жгутиков	46	100	+
Рост при 42 °С	0	0	—
Денитрификация	0	0	—
Окисление хинной кислоты до протокатеховой	44	96	+
Синтез левана из сахарозы	0	0	—
Окисление глюконата	30	65	в
Гидролиз			
желатина	0	0	—
лецитина	0	0	—
Усвоение в качестве источника углерода			
ксилозы	18	39	в
арабинозы	17	37	в
маннозы	28	61	в
галактозы	15	33	в
сахарозы	6	13	—
трегалозы	3	6	—
мальтозы	15	33	в
масляной кислоты	43	93	+
валериановой кислоты	44	96	+
адипиновой кислоты	6	13	—
пимелиновой кислоты	4	8	—
итаконовой кислоты	8	17	—
виновой кислоты	19	41	в
этанола	36	78	в
пропанола	34	74	в
бутиленгликоля	38	83	+
маннита	16	35	в
сорбита	8	17	—
инозита	13	28	в
адонита	6	13	—
бензойной кислоты	28	61	в
о-оксибензойной кислоты	14	30	в
м-оксибензойной кислоты	10	22	в
коричной кислоты	8	17	—
анисовой кислоты	10	22	в
миндальной кислоты	10	22	в
фенилуксусной кислоты	34	74	в
глицина	21	46	в
орнитина	35	76	в
цитруллина	18	39	в
триптофана	12	26	в
антралиловой кислоты	0	0	—
креатина	30	65	в
ацетамида	3	6	—
гиппуровой кислоты	31	67	в
никотиновой кислоты	13	28	в

Таблица 59. Некоторые фенотипические различия между штаммами *Pseudomonas putida* и биоваром V *Pseudomonas fluorescens*

Признак	<i>P. putida</i> (46 штаммов)		<i>P. fluorescens</i> , биовар V (70 штаммов)	
	Количество штаммов, положительных по признаку, %	Свойства «среднего организма»	Количество штаммов, положительных по данному признаку, %	Свойства «среднего организма»
Гидролиз желатина	0	—	100	+
Ассимиляция				
трегалозы	6	—	83	+
масляной кислоты	93	+	0	—
винной кислоты	41	в	0	—
этанола	78	в	0	—
пропанола	74	в	0	—
бутиленгликоля	83	+	0	—
фенилуксусной кислоты	74	в	0	—
глицина	46	в	0	—
креатина	65	в	0	—
гиппуровой кислоты	67	в	1	—

были распределены остальные, не обработанные нумерическими методами штаммы названного вида.



Важнейшие фенотипические особенности образованных подгрупп приведены в табл. 60.

Представители подгруппы I (38 штаммов), в состав которой входит типовой штамм *P. putida*, слабее ассимилировали полиспирты (сорбит и маннит), реже потребляли ароматические субстраты (фенол, оксибензойные кислоты, коричную, анисовую, миндальную), в отличие от штаммов подгруппы II, потребляли никотиновую кислоту.

Рис. 31. Дендрограмма, полученная при нумерической классификации не разжижающих желатин флюоресцирующих бактерий:

I — «атипичные» *P. putida*, II — «истинные» *P. putida*; 4006T — типовой штамм *P. taetrolens*, 4126T — типовой штамм *P. putida*

Представители II подгруппы (8 штаммов) чаще усваивали полиспирты, ароматические субстраты, серосодержащие аминокислоты. Фенилацетат, тартрат, гиппурат, креатин использовались штаммами обеих подгрупп приблизительно в равной степени.

Критерии, предложенные в 9-м издании определителя Берги для дифференциации составляющих *P. putida* биоваров А и В, основываются на более широком использовании штаммами биовара В углеводов, в частности галактозы, а также потреблении ими антраниловой кислоты и триптофана. В наших опытах эти критерии оказались непригодными для дифференциации. Изученные штаммы не соответствовали по своим свойствам и биовару С, описанному у *P. putida* позднее [110]. Тем не менее штаммы I подгруппы мы считаем фенотипически более близкими биовару А, штаммы II подгруппы — близкими или идентичными биовару В. Эти отличия не являются абсолютными. Некоторые признаки обнаруживаются у микроорганизмов обеих подгрупп, однако с различной степенью частоты. Таким образом, их дифференциация представляет определенные трудности.

В наших опытах у представителей различных подгрупп *P. putida* обнаружено от 62,5 до 65,0 % ГЦ в ДНК. Ниже показана степень геномного родства штаммов *P. putida*, *P. fluorescens* и «*P. rathonis*», определенная методом молекулярной гибридизации ДНК — ДНК:

Сопоставляемые пары штаммов	Реассоциация, %
<i>P. putida</i> биовар В 1178 } <i>P. putida</i> биовар В 2200 }	93
<i>P. putida</i> биовар А 4126 } <i>P. putida</i> биовар В 2200 }	38
<i>P. putida</i> биовар А 388 } <i>P. fluorescens</i> биовар I 4125 }	0
<i>P. putida</i> биовар В 1778 } <i>P. fluorescens</i> биовар I 4125 }	10
<i>P. putida</i> биовар В 2200 } <i>P. fluorescens</i> биовар I 4125 }	6
<i>P. putida</i> биовар В 1890 } <i>P. fluorescens</i> биовар I 4125 }	10
<i>P. putida</i> биовар А 4126 } « <i>P. rathonis</i> » 2987 }	19

Отмечена высокая степень гомологии ДНК у штаммов, принадлежащих к одному биовару, и значительно ниже между штаммами различных биоваров. Еще более низкие значения реассоциации (0—10 %) были получены при гибридизации ДНК — ДНК штаммов *P. putida* и *P. fluorescens*. Эти данные несколько ниже показателей, полученных Паллерони с соавторами. Однако в целом закономерность, обнаруженная этими авторами, подтверждается: штаммы биовара *P. putida* генетически ближе *P. fluorescens*, чем штаммы биовара А, а степень родства между этими двумя биоварами находится на уровне межвидовой. В то же время, как было показано выше, оба они весьма сходны фенотипически.

Подобно всем представителям флюоресцирующей группы, штаммы *P. putida* были устойчивы к препаратам нитрофуранового



Таблица 60. Потребление некоторых источников углерода штаммами биоваров А и В *Pseudomonas putida*

Источник углерода	I подгруппа (биовар А, 38 штаммов)			II подгруппа (биовар В, 8 штаммов)		
	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%		абс.	%	
Сорбит	1	3	—	7	87	1
Маннит	10	26	в	6	75	+
Галактоза	14	37	в	2	25	в
о-Оксибензойная кислота	10	26	в	4	50	в
м-Оксибензойная кислота	3	7	—	7	87	+
Коричная кислота	1	3	—	7	87	+
Анисовая кислота	4	10	—	6	75	в
Миנדальная кислота	4	10	—	6	75	в
Фенол	0	0	—	5	62	в
Антраниловая кислота	0	0	—	0	0	—
Никотиновая кислота	32	34	+	0	0	—
Триптофан	31	31	+	0	0	—
Метионин	0	0	—	8	100	+
Цистеин	0	0	—	7	87	+

ряда. Среди красителей на них действовали арилметановые соединения группы парафуксина, среди антибиотиков — ампициллин, полимиксин, аминогликозиды.

Штаммы *P. putida* выделены из почвы, ризосферы, воды лиманов и минеральных источников.

*Pseudomonas taetrolens* Haynes 1957 и *Pseudomonas lundensis* Molin, Tornstrom and Ursing, 1986. Описание *P. taetrolens* опубликовано в 7-м издании определителя Берги [124] с указанием его идентичности «*P. graveolens*», ранее выделенному из яиц [312]. Серологически штаммы *P. taetrolens* отличны от штаммов *P. fluorescens*, *P. putida* и *P. aeruginosa* [365]. *P. taetrolens* включен в «Одобрённые списки видовых названий» [455], однако свойства его до настоящего времени изучены неполно, а филогенетические связи с другими видами рода не установлены. В 9-м издании определителя Берги *P. taetrolens* помещен в V секцию, включающую виды неустановленного таксономического положения.

Нами был исследован типовой штамм *P. taetrolens* ИМВ 4006 (ATCC 4683). Его способность к синтезу желто-зеленого флюоресцирующего пигмента проявлялась лишь на оптимальных для пигментообразования средах. В препаратах *P. taetrolens* выявлялись грамотрицательные палочки, имеющие один полярный жгут и не образующие включений резервного полимера поли-β-оксималяной кислоты (табл. 61).

*P. taetrolens* — строгий аэроб, образует в аэробных условиях кислоту из глюкозы и мальтозы, в спектре поглощения его интактных клеток имеются максимумы, характерные для цитохромов

Т а б л и ц а 61. Биологические особенности штаммов *Pseudomonas taetrolens* ИМВ 4006 и *Pseudomonas lundensis* ИМВ 4231

Признак	<i>P. taetrolens</i> 4006	<i>P. lundensis</i> 4231
ГЦ в ДНК, %	60,5	59,1
Наличие одного жгутика	+	+
Флюоресцирующий пигмент	+	+
Оксидаза	+	+
Денитрификация	—	—
Наличие аргининдигидролазы	—	+
Образование кислоты из мальтозы	+	+
Рост при 0 °С	—	+
Гидролиз желатина	—	+
Усвоение в качестве источника углерода глюкозы, фруктозы, <i>l</i> -арабинозы, глюконовой, янтарной, фумаровой, глутаровой, молочной, лимонной, $\alpha$ -кетоглутаровой, пировиноградной кислоты, маннита, инозита, глицери- на, $\alpha$ -аланина, $\beta$ -аланина, аспараги- новой и глутаминовой кислоты, ли- зина, аргинина, орнитина, гистидина, пролина, бетаина, гиппуровой кисло- ты	+	+
фукозы, рамнозы, маннозы, сахаро- зы, трегалозы, мальтозы, лактозы, целлобиозы, крахмала, инулина, са- лицина, пропионовой, валериановой, капроновой, каприловой, пеларгоно- вой кислот, сорбита, адонита, эти- лен- и бутиленгликоля, этанола, про- панола, бутанола, бензойной, <i>o</i> -, <i>m</i> - и <i>p</i> -оксибензойной кислот, глицина, треонина, серина, цитруллина, трип- тофана, креатина, саркозина, ацета- мида, антраниловой и никотиновой кислот	—	—
укусной и масляной кислоты, ита- коновой кислоты, <i>l</i> -тирозина, фенила- ланина	+	—

*c*- и *b*-типов. По ряду свойств, а также по чувствительности к антимикробным агентам *P. taetrolens* сходен с другими видами флюоресцирующей группы.

*P. taetrolens* — активный антагонист широкого спектра действия. При испытании методом перекрестных штрихов он тормозит рост стафилококков, бацилл, корине- и микобактерий, энтеробактерий, различных видов псевдомонад. Этот эффект обусловлен образованием низкомолекулярных антимикробноактивных соединений, извлекаемых из подкисленной культуральной жидкости хлороформом. Максимум поглощения хлороформенного экстракта в ультрафиолете — 285 нм. По-видимому, антибиотическую активность *P. taetrolens* обуславливают также бактериоциноподобные вещества.

Т а б л и ц а 62. Важнейшие фенотипические различия между *Pseudomonas taetrolens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas putida*

Признак	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. taetrolens</i>
Число жгутиков	1	>1	>1	1
Рост при 42 °С	+	—	—	—
Гидролиз желатина	+	+	—	—
Денитрификация	+	в	—	—
Образование иных пигментов кроме зеленого флюоресцирующего	+	в	—	—
Ассимиляция в качестве источника углерода				
трегалозы	—	+	—	—
инозита	—	+	—	—
<i>n</i> -бутанола	+	в	+	—
пропионовой, капроновой, пеларгоновой кислот	+	+	+	—
фенилуксусной кислоты	—	—	+	—
гиппуровой кислоты	—	—	в	+
бензиламина	—	в	+	—
ацетамида	+	—	—	—
<i>l</i> -лейцина	+	+	+	+

Усваивая в качестве единственного источника углерода 25 из 95 испытанных соединений (см. табл. 61), *P. taetrolens* потребляет многие (хотя далеко не все) универсальные для микроорганизмов флюоресцирующей группы субстраты: глюкозу, фруктозу, глюконат, органические кислоты и метаболиты цикла Кребса, инозит, бетаин, хинную и гиппуровую кислоты, 9 различных аминокислот. Бактерии не способны к ассимиляции большинства испытанных углеводов, жирных кислот — от уксусной до пеларгоновой, низших спиртов — от метанола до бутанола, полиспиртов и гликолей, никотиновой кислоты, бензиламина, креатина, ацетамида, углеводов нефти.

По своим свойствам *P. taetrolens* существенно отличается от основных видов флюоресцирующей группы — *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* и *P. putida* (табл. 62). В частности, от штаммов *P. putida*, в том числе типового, *P. taetrolens* отличается более чем по 30 признакам, что убедительно иллюстрируется дендрограммой (см. рис. 3). Эти данные хорошо согласуются с результатами гибридизации ДНК — ДНК: степень геномного родства *P. taetrolens* с типовым штаммом *P. putida* составляет всего 7 %.

Значения гомологии ДНК типового штамма *P. taetrolens* ИМВ 4006 и остальных видов псевдомонад колеблются в пределах от 21 до 49 %.

Вид и штамм бактерий	Реассоциация, %
<i>P. fluorescens</i> ИМВ 4125	38
<i>P. putida</i> ИМВ 4126	7
<i>P. aureofaciens</i> ИМВ 4133	36
« <i>P. lemonnieri</i> » ИМВ 2401	21

<i>P. aurantiaca</i> ИМВ 387	24
<i>P. fragi</i> ИМВ 4002	29
<i>P. putida</i> ИМВ 2610, «ати- пичный»	56
<i>P. putida</i> ИМВ 2756, «ати- пичный»	44
<i>P. lundensis</i> ИМВ 4231	51

Все эти виды принадлежат к I секции (I РНК-группе) рода *Pseudomonas*. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют как о генетической и фенотипической обособленности *P. taetrolens*, так и об его принадлежности к I секции рода *Pseudomonas*.

Представленные данные касаются единственного имеющегося в международных коллекциях штамма *P. taetrolens*. Нами изучено более 1000 штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из различных природных источников — почвы, ризосферы растений, морской и пресной воды, активного ила, однако ни в одном из названных природных субстратов штаммы изучаемого вида обнаружить не удалось. В ходе исследований было выявлено несколько штаммов флюоресцирующих бактерий, которые не разжижали желатин и проявляли определенное фенотипическое сходство с *P. taetrolens*. Эти штаммы, условно обозначенные как «атипичные *P. putida*», отличались узким спектром углеродного питания, неспособностью к ассимиляции жирных кислот, низших спиртов, гликолей. Различия между *P. taetrolens* и «атипичными штаммами» достигали 12 признаков (см. рис. 31), степень гомологии ДНК составляла 44—56 %.

Таксономический ранг рассматриваемой группы штаммов неясен. Как по своим фенотипическим свойствам, так и по данным гибридизации ДНК — ДНК эти штаммы ближе к *P. taetrolens*, чем «типичные» *P. putida*. Существование у псевдомонад форм, промежуточных между некоторыми видами, описано в литературе [468]. Возможно, рассматриваемая группа бактерий является промежуточной между *P. putida* и *P. taetrolens*.

Полученные данные характеризуют биологические особенности *P. taetrolens* и определяют его положение внутри рода *Pseudomonas*. Особого внимания заслуживает вопрос об экологии этого вида.

Почва, вода, ризосфера растений, обильно населенные другими видами псевдомонад, по-видимому, не являются для него подходящей средой обитания. Как упоминалось выше, типовой штамм *P. taetrolens* выделен из яиц. Возможно, экологической нишей для этого вида являются и другие пищевые продукты. Это предположение основывается на том, что по своим свойствам *P. taetrolens* очень близок флюоресцирующему виду *P. lundensis*, описанному в 1986 г. и широко распространенному в охлажденных мясных продуктах [352]. Нами проведено сравнительное исследование *P. taetrolens* и типового штамма *P. lundensis* ИМВ 4231 (ССМ 3503).

Таблица 63. Биологические особенности флюоресцирующих фитопатогенных видов рода *Pseudomonas* (по [391])

Признак	<i>P. syringae</i> , патовары	<i>P. viridiflava</i> (Sands et al., 1970)	<i>P. cichorii</i>
Число жгутиков	1	1—2	1
Образование зеленого флюоресцирующего пигмента	+	+	+
Образование феназинов	—	—	—
Наличие оксидазы	—	—	+
Образование левана из сахарозы	в	—	—
Гидролиз желатина	в	+	—
Денитрификация	—	—	—
Наличие			
лецитиназы	в	в	+
липазы	в	в	—
аргининдигидролазы	—	—	—
Гидролиз крахмала	—	—	—
Рост при 4 °С	в	—	—
Молярная доля ГЦ в ДНК, %	59—61	—	59

Для обоих видов характерны следующие признаки: наличие одного жгутика (табл. 61), положительная реакция на оксидазу и аргининдигидролазу, образование флюоресцирующего пигмента, неспособность к денитрификации и росту при 42 °С, образование кислоты из мальтозы и целлобиозы. Сходны они и по спектрам потребляемых источников углерода, отличаясь усвоением лишь нескольких субстратов. Близок их нуклеотидный состав ДНК: 60,5 % у *P. taetrolens*, 59,1 — у *P. lundensis*. К немногочисленным различиям между исследуемыми микроорганизмами относится способность *P. lundensis* к росту при 0 °С и гидролизу желатина (у *P. taetrolens* эти признаки отрицательны). Степень геномного родства между ними, определенная методом молекулярной гибридизации ДНК — ДНК, составила в наших опытах 51 %. При значительном фенотипическом сходстве эти данные можно рассматривать как доказательство принадлежности бактерий к одному виду [59]. Исходя из полученных данных, мы считаем целесообразным рассматривать *P. lundensis* как разновидность *P. taetrolens*, присвоив ему в соответствии с приоритетом описания название *P. taetrolens* var. *lundensis*.

Фитопатогенные флюоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas*. Наряду с флюоресцирующими сапрофитами к I секции рода *Pseudomonas* принадлежат многочисленные фитопатогенные псевдомонады, представленные тремя видами: оксидазоотрицательными *P. viridiflava* и *P. syringae* (включающим 41 патовар) и оксидазоположительным *P. cichorii* (табл. 63). В задачу наших исследований не входил широкий таксономический анализ этой группы микроорганизмов. Однако мы предприняли попытку проанализировать некоторые отличия флюоресцирующих фитопатогенных бактерий от сапрофитных псевдомонад [34]. Исследовано 9 штаммов

фитопатогенных бактерий, полученных из других коллекций под названиями «*P. lachrymans*», «*P. holci*», «*P. pisi*», «*P. vignae*», «*P. maculicola*», «*P. lupini*» и объединяемых в настоящее время единым видовым названием *Pseudomonas syringae* van Hall 1902. Все они, хотя и в различной степени, были способны к синтезу желто-зеленого флюоресцирующего пигмента, все усваивали аммиачную соль в качестве единственного источника азота (хотя энергия их роста была значительно ниже, чем у сапрофитных штаммов).

Универсальными источниками углерода для сапрофитных флюоресцирующих бактерий служили около 40 соединений. Диапазон веществ, используемых фитопатогенными бактериями, значительно уже. Так, они были не способны усваивать многие жирные кислоты и аминокислоты, им были недоступны спирты (этанол, пропанол, бутанол), ароматические (кроме *n*-оксибензойной кислоты) и гетероциклические соединения, избирательно используемые отдельными сапрофитными видами. Фитопатогенные бактерии были не способны к денитрификации, лишены аргининдигидролазы и оксидазы.

Спектрофотометрия интактных клеток *P. syringae* показала у них максимумы при 530 и 560 нм, свойственные цитохрому *b*, причем содержание последнего было в несколько раз ниже, чем у сапрофитных бактерий. Максимумы, характерные для цитохрома *c*, у штаммов *P. syringae* не были выявлены.

Таким образом, по изученным биохимическим свойствам фитопатогенные микроорганизмы повторяли характеристику флюоресцирующей группы в целом, однако набор их ферментов значительно беднее, диапазон углеродного питания уже. Можно предположить, что эти особенности *P. syringae* связаны с его патогенностью для растений и утратой ряда ферментных систем в связи с паразитическими условиями существования.

#### **ВНУТРЕННЕЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ И НОМЕНКЛАТУРА МИКРООРГАНИЗМОВ ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩЕЙ ГРУППЫ**

Итак, согласно существующим классификационным схемам, флюоресцирующие сапрофитные бактерии рода *Pseudomonas* (исключая *P. aeruginosa*) представлены четырьмя видами: таксономически близкими феназинсинтезирующими *P. aureofaciens* и *P. chlorographis*, а также обширными *P. fluorescens* и *P. putida* с образующими их биоварами. Таксономическая структура двух последних видов сложна, уровень гомологии ДНК между их представителями, по нашим данным, не превышает 10 %.

Определенная совокупность признаков отличает разжижающие желатин флюоресцирующие микроорганизмы от не разжижающих. Обе эти группы включают, в свою очередь, ряд подгрупп

со свойственными им пигментами, антибиотиками, экстрацеллюлярными ферментами, спектрами потребляемых источников углерода. Это *P. aurantiaca* с генетически и фенотипически близким ему биоваром II *P. fluorescens*, «*P. lemonnieri*» и описанный нами «*P. fluoro-violaceus*», наконец, биовары *P. fluorescens* и *P. putida*, а также *P. taetrolens* (*P. lundensis*). По-видимому, полученные фенотипические данные и результаты гибридизации ДНК — ДНК свидетельствуют в пользу видовой самостоятельности рассматриваемых подгрупп.

Согласно существующим представлениям [7, 59, 269], реассоциация ДНК более чем на 70 % свойственна штаммам одного вида, от 50 до 20 % — отдельным видам внутри рода.

Показатели геномного родства между биоварами I, III и V *P. fluorescens*, биоварами А и В *P. putida*, штаммами *P. aurantiaca* (с близкими ему биоваром II *P. fluorescens*), штаммами «*P. lemonnieri*» и «*P. fluoro-violaceus*» колебались в наших опытах от 0 до 60 %, составляя чаще всего около 30 %.

При этом сходные показатели геномного родства наблюдались как между представителями отдельных биоваров *P. fluorescens* и *P. putida*, так и между самостоятельными видами рода *Pseudomonas*.

Так, гомология ДНК у штаммов *P. fluorescens* — *P. stutzeri* составляла 35 %, у штаммов *P. putida* — «*P. rathonis*» — 19, между биоварами А и В *P. putida* — 38, I и II *P. fluorescens* — 21, I и III *P. fluorescens* — 31 % и т. д. Эти данные свидетельствуют о видовой самостоятельности названных биоваров.

Исходя из изложенного, мы считаем целесообразным сохранить видовое название *P. fluorescens* лишь за биоваром I, включающим типовой штамм данного вида, и признать самостоятельность других биоваров *P. fluorescens* и *P. putida*, а также «*P. lemonnieri*» и *P. aurantiaca*, введя в состав последнего близкий ему биовар II *P. fluorescens*. Специального рассмотрения требует вопрос о номенклатуре отдельных биоваров *P. fluorescens* и *P. putida*.

Согласно данным ряда авторов [267, 468], штаммы, полученные ими под видовыми названиями *P. geniculata* и «*P. schuykilliensis*», принадлежали к биовару V *P. fluorescens*. По-видимому, для обозначения биовара V могут быть использованы эти либо некоторые другие видовые названия, не вошедшие в «Одобренные списки», не представленные типовыми штаммами и по сути являющиеся «*pomina puda*».

Так же обстоит дело и с биоваром III *P. fluorescens*, представляющим собой, по заключению Паллерони, «самостоятельную ветвь эволюции». Для его обозначения может быть использовано такое видовое название, как «*P. tuxogenes*». Штаммы этого вида, согласно 7-му изданию определителя Берги, образуют слизь, являются лофотрихами, восстанавливают нитраты до нитритов (перечисленные свойства сближают их со штаммами биовара III). Соответственно мы предлагаем сохранить видовое название *P. putida*

за биоваром А этого вида, обозначив биовар В старым видовым названием «*P. copvexa*».

Предлагаемое нами разделение основывается не только на данных гибридизации ДНК — ДНК, но и на фенотипических отличиях одного вида от другого. Это же касается и нефлюоресцирующих микроорганизмов I секции рода *Pseudomonas*, список которых пополнен видами *P. fragi*, «*P. denitrificans*» и «*P. rathonis*». Их таксономическому анализу посвящена следующая глава монографии.



**КЛАССИФИКАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ  
НЕФЛЮОРЕСЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ I  
СЕКЦИИ РОДА PSEUDOMONAS**

Наряду с представителями флюоресцирующей группы членами I секции (I РНК-группы) рода *Pseudomonas* являются *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. stutzeri* и *P. men-docina*. В настоящей главе нами рассматриваются биологические особенности и дифференцирующие признаки этих микроорганизмов, а также некоторых других видов и групп штаммов, относящихся, по нашим данным, к членам рассматриваемой секции.

***Pseudomonas alcaligenes* Monias, 1928.** К настоящему времени в международных коллекциях имеется три штамма *P. alcaligenes*. Нами изучено еще два, выделенных из природы, а также типовой штамм этого вида, что позволяет уточнить и дополнить биологическую характеристику *P. alcaligenes*.

Все штаммы представляют собой грамотрицательные палочки с одним полярным жгутиком. Колонии на общеупотребимых средах нежные, прозрачные. Антагонистически неактивны, пигменты и антибиотики не обнаружены. Бактерии оксидазоположительны и имеют сходный с микроорганизмами флюоресцирующей группы набор цитохромов. Диагностика представителей *P. alcaligenes* строится в основном на отрицательных признаках (табл. 64). Спектры их углеродного питания очень узки и включают от 9 (у типового штамма) до 15 источников углерода, преимущественно органические кислоты и аминокислоты. Ни один штамм не потребляет углеводы, полиспирты и низшие спирты, ароматические и большинство азотсодержащих соединений.

Штаммы *P. alcaligenes* высокочувствительны к нитрофурантоину. Их рост угнетался также всеми исследованными антибиотиками, кроме пенициллина и линкомицина, и 26 разнообразными красителями. Таким образом, высокая чувствительность к антимикробным агентам — видовой признак *P. alcaligenes*. Нуклеотидный состав ДНК штаммов *P. alcaligenes* — 64—68 % ГЦ.

***Pseudomonas pseudoalcaligenes* Stanier, 1966.** По морфологическим и многим биохимическим особенностям этот вид близок *P. alcaligenes*, однако отличается от него способностью образовывать включения поли-β-оксимасляной кислоты при росте на дефицитных по азоту средах. Включения этого резервного полимера мы наблюдали у 7 из 22 штаммов, однако непостоянно и в незначительных количествах.

Таблица 64. Важнейшие биологические особенности штаммов *Pseudomonas alcaligenes* и *Pseudomonas pseudoalcaligenes*

Признак	<i>P. alcaligenes</i> (3 штамма)			<i>P. pseudoalcaligenes</i> (22 штамма)		
	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%		абс.	%	
Наличие одного жгутика	3	100	+	22	100	+
Включения поли-β-оксимасляной кислоты				7	31,8	в
Образование кислоты из глюкозы на среде Хью и Лейвсона	0	0	—	0	0	—
Наличие оксидазы	3	100	+	22	100	+
Рост при 42 °С	3	100	+	14	64	в
Денитрификация	0	0	—	0	0	—
Наличие						
аргининдигидролазы	3	100	+	22	100	+
лизиндекарбоксилазы	0	0	—	0	0	—
левансахаразы	0	0	—	0	0	—
Окисление глюконата	0	0	—	0	0	—
Гидролиз						
желатина	0	0	—	3	14	—
лецитина	0	0	—	4	18	—
крахмала	0	0	—	0	0	—
ДНК	0	0	—	0	0	—
РНК	0	0	—	0	0	—
эскулина	0	0	—	0	0	—
холестеринолеата	0	0	—	2	9	—
Усвоение в качестве источника углерода						
глюкозы	0	0	—	6	27	в
маннозы	0	0	—	2	9	—
фруктозы	0	0	—	2	9	—
мальтозы	0	0	—	4	18	—
целлобиозы	0	0	—	0	0	—
глюконовой кислоты	0	0	—	2	9	—
уксусной кислоты	3	100	+	7	32	в
масляной кислоты	0	0	—	2	9	—
каприловой кислоты	1	33	в	3	14	—
малоновой кислоты	0	0	—	4	18	—
янтарной кислоты	3	100	+	20	91	+
фумаровой кислоты	2	66	в	21	95	+
глутаровой кислоты	2	66	в	14	64	в
винной кислоты	0	0	—	7	32	в
молочной кислоты	1	33	в	8	36	в
гликолевой кислоты	0	0	—	2	9	—
лимонной кислоты	1	33	в	16	73	в
α-кетоглутаровой кислоты	2	66	в	19	86	+
пировиноградной кислоты	3	100	+	20	91	+
аконитовой кислоты	1	33	в	4	18	—
щавелевоуксусной кислоты	2	66	в	22	100	+
итаконной кислоты	0	0	—	10	45	в
яблочной кислоты	2	66	в	15	68	в
глицерина	0	0	—	2	9	—

Признак	P. alcaligenes (3 штамма)		Свойства «среднего организма»	P. pseudoalcaligenes (22 штамма)		Свойства «среднего организма»
	Количество штаммов, положительных по данному признаку			Количество штаммов, положительных по данному признаку		
	абс.	%		абс.	%	
этанола	0	0	—	1	4	—
пропанола	0	0	—	3	14	—
хинной кислоты	0	0	—	2	9	—
глицина	0	0	—	5	23	в
$\alpha$ -аланина	0	0	—	18	82	+
$\beta$ -аланина	0	0	—	18	82	—
серина	0	0	—	0	0	—
лейцина	0	0	—	2	9	—
аспарагиновой кислоты	0	0	—	20	91	+
глутаминовой кислоты	3	100	+	22	100	+
аргинина	3	100	+	21	95	+
орнитина	0	0	—	3	14	—
цитруллина	1	33	в	0	0	—
$\gamma$ -аминомасляной кислоты	1	33	в	19	86	+
гистидина	0	0	—	6	27	в
пролина	3	100	+	22	100	+
тирозина	1	33	в	10	45	в
фенилаланина	1	33	в	7	32	в
бетайна	0	0	—	8	36	в
саркозина	0	0	—	2	9	—
<i>n</i> -алканов C <sub>6</sub> —C <sub>10</sub>	0	0	—	1	4	—
<i>n</i> -алканов C <sub>14</sub> —C <sub>22</sub>	0	0	—	10	45	в

Все штаммы *P. pseudoalcaligenes* — монотрихи, пигменты и антибиотики не синтезируют, 80 % культур обладают бактериоциногенной активностью. Все они оксидазоположительны и сходны с *P. alcaligenes* отсутствием ряда экзо- и эндоферментов (см. табл. 64).

Спектры углеродного питания *P. pseudoalcaligenes* шире, чем у *P. alcaligenes*. Всего штаммы *P. pseudoalcaligenes* ассимилировали от 8 до 32 (чаще 17—26) различных соединений. Различия между двумя видами наблюдались в потреблении  $\alpha$ - и  $\beta$ -аланина, аспарагиновой кислоты, а также бетайна, гистидина, среднепочечных *n*-алканов, служащих источниками углерода для многих (хотя и не всех) штаммов *P. pseudoalcaligenes*, но недоступных для *P. alcaligenes*.

В последние годы предложено несколько дополнительных критериев для дифференциации этих фенотипически гетерогенных видов. По данным Пикетта и Гринвуда [404], для этих целей может быть использована способность бактерий подкислять либо подщелачивать среду при росте на некоторых субстратах. Штаммы *P. pseudoalcaligenes* подкисляют среду с фруктозой и подщелачивают среду с  $\beta$ -аланином и аргинином; в отличие от них боль-

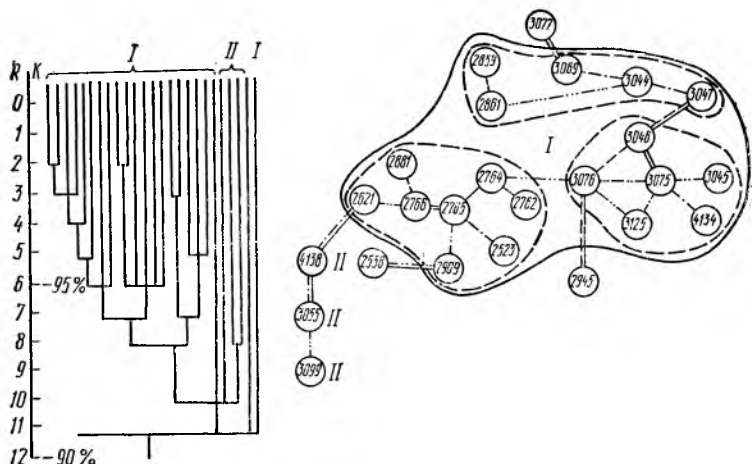


Рис. 32. Дендрограмма, образованная при численной классификации, и схема группировки 25 штаммов *P. pseudoalcaligenes* (I) и *P. alcaligenes* (II)

большинство штаммов *P. alcaligenes* подщелачивают среду с глюкозатом.

Значительная неоднородность свойств *P. pseudoalcaligenes* была показана при численной классификации штаммов этого вида (рис. 32). Штаммы подгрупп I и II, выделяемых численными методами, отличались по способности к ассимиляции тирозина, бетаина, *n*-алканов ( $C_{14} - C_{22}$ ), уксусной, глутаровой, винной, лимонной, молочной и итаконовой кислот.

В состав *P. pseudoalcaligenes* были включены при численной классификации наряду со штаммами, не ассимилирующими глюкозу, шесть культур, способных к усвоению этого углевода и кислотообразованию на средах Хью и Лейвсона. Непостоянство этого признака у *P. pseudoalcaligenes* отмечали другие авторы [191]. По нуклеотидному составу и гомологии ДНК штаммы, усваивающие глюкозу, близки микроорганизмам II подгруппы (63,6—63,8 % ГЦ, 100 % гомологии), по спектрам углеродного питания они занимают промежуточное положение между обеими подгруппами. В то же время представители I и II подгрупп существенно различаются по нуклеотидному составу ДНК (60,8—63,8 % ГЦ, соответственно).

Согласно литературным данным [410], содержание ГЦ ДНК у штаммов *P. pseudoalcaligenes* составляет 62—64 %, а степень родства между штаммами этого вида колеблется в пределах 57—82 %. Описанные в последние годы разновидности *P. pseudoalcaligenes* еще значительно различаются по свойствам и нуклеотидному составу ДНК. Так, *P. pseudoalcaligenes* var. *citrulli*, патогенный для арбуза, имеет 65—67 %, а *P. pseudoalcaligenes* var. *konjac*, вызывающий заболевание съедобного растения «коняк», — 66—68 % ГЦ в ДНК [200, 437].

Все изложенное свидетельствует о значительной генетической и фенотипической гетерогенности *P. pseudoalcaligenes*, возможно, объединяющего под одним названием несколько самостоятельных видов рода *Pseudomonas*.

Штаммы *P. pseudoalcaligenes* сходны по антибиограммам с *P. alcaligenes*, однако отличаются от последнего вида резистентностью к некоторым красителям (малахитовому и бриллиантовому зеленому, бенгальской розе, сафранину, бромкрезоловому зеленому, ализариновому красному).

Интересна экология видов «*alcaligenes*-группы». Все изученные нами штаммы, в том числе типовые, водного происхождения, выделены из луж, ручьев, минеральных источников, активного ила. Для их выделения наиболее пригоден высев проб воды на МПА.

*Pseudomonas stutzeri* (Lehmann and Neumann, 1896) Sijderius, 1946. Вид *P. stutzeri* охарактеризован Ван Нилем и Алленом [493] и более полно описан Стейниером с соавт. Полученные ими данные легли в основу диагноза *P. stutzeri*, приведенного в 9-м издании определителя Берги.

*P. stutzeri* — активный денитрификатор, восстанавливающий в анаэробных условиях нитрат до свободного азота и  $N_2O$ . Среди других видов псевдомонад штаммы *P. stutzeri* выделяются морщинистой структурой колоний, часто утрачиваемой в процессе лабораторного культивирования, и амилолитической активностью. Несмотря на значительную генетическую и фенотипическую гетерогенность *P. stutzeri*, попытки разделить его на несколько самостоятельных видов пока были безуспешными.

В нашем распоряжении имелось два коллекционных штамма *P. stutzeri*, в том числе типовой, а также штамм ИМВ 1979, полученный под видовым названием «*P. caudatus*» и проявивший способность к денитрификации после семи пассажей в полуаэробных условиях на средах с нитратом. Им близок по свойствам штамм ИМВ 3000, выделенный из почвы методом обогащения на синтетической среде с норлейцином и лишенный одной из отличительных особенностей *P. stutzeri* — способности к денитрификации. Последняя не проявлялась при многократном пассировании бактерий на нитратсодержащих средах, не была выявлена и более чувствительным методом газовой хроматографии.

Все четыре названных выше штамма образовывали (особенно на средах с глицерином) желтый внутриклеточный пигмент не установленной химической структуры и росли в виде сухой, морщинистой пленки, типичной для этого вида. Все они характеризовались слабой антагонистической активностью, угнетая лишь наиболее чувствительные грамположительные тест-микроорганизмы. Среди представителей этого вида обнаружены продуценты бактериоцинов узкого спектра действия.

Электронная микроскопия показала у этих культур наличие одного полярного жгутика. Бактерии не образовывали включений поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты, были оксидазоположительны, богаты цитохромом *c*, не окисляли глюконат, не гидролизovali желатина.

Т а б л и ц а 65. Важнейшие биологические особенности штаммов *Pseudomonas stutzeri*

Признак	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%	
Сухие морщинистые колонии, желтый пигмент	4	100	+
Наличие одного жгутика	4	100	+
Включения поли-β-оксимасляной кислоты	0	0	—
Образование кислоты из глюкозы на среде Хью и Лейсона	4	100	+
Наличие оксидазы	4	100	+
Рост при 42 °С	2	50	в
Денитрификация	3	75	в
Наличие			
аргининдигидролазы	0	0	—
лизиндекарбоксилазы	0	0	—
левансахаразы	0	0	—
Окисление глюконата	0	0	—
Гидролиз			
желатина	0	0	—
лецитина	0	0	—
крахмала	4	100	+
ДНК	0	0	—
РНК	0	0	—
эскулина	0	0	—
холестеринолеата	0	0	—
усвоение в качестве источника углерода			
глюкозы	4	100	+
ксилозы	0	0	+
маннозы	0	0	—
арабинозы	1	25	в
галактозы	0	—	—
фруктозы	4	100	+
сахарозы	0	0	—
трегалозы	2	50	в
мальтозы	4	100	+
целлобиозы	0	0	—
крахмала	4	100	+
уксусной кислоты	3	75	в
пропионовой кислоты	2	50	в
масляной кислоты	2	50	в
каприловой кислоты	2	50	в
пеларгоновой кислоты	0	0	—
молочной кислоты	4	100	+
гликолевой кислоты	4	100	+
итаконовой кислоты	2	50	в
маннита	4	100	+
сорбита	0	0	—
инозита	0	0	—
адонита	0	0	—
глицерина	2	50	в
бутиленгликоля	3	75	в
этанола	4	100	+
пропанола	3	75	в

Признак	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%	
<i>n</i> -оксибензойной кислоты	0	0	—
хинной кислоты	0	0	—
глицина	2	50	в
$\alpha$ -аланина	4	100	+
$\beta$ -аланина	0	0	—
аргинина	0	0	—
бетаина	0	0	—
саркозина	0	0	—
<i>n</i> -алканов C <sub>14</sub> —C <sub>22</sub>	2	50	в

тин, лецитин, эскулин, твин-80, не метаболизировали хинную кислоту до протокатеховой (табл. 65).

К числу общих особенностей всех штаммов, свойственных *P. stutzeri* как виду, относятся наличие амилазы, способность к ассимиляции мальтозы, крахмала, гликолевой кислоты. Универсальными субстратами служили также глюкоза, фруктоза, маннит, этанол, метаболиты цикла Кребса, некоторые аминокислоты. Этиленгликоль, в противоположность литературным данным, не усваивался ни одним штаммом.

Обладая рядом характерных для *P. stutzeri* особенностей, штамм ИМВ 3000 отличался по способности ассимилировать некоторые источники углерода. Разнообразным было и содержание ГЦ в ДНК исследованных штаммов (табл. 66).

ДНК штамма 3000 имела 43 % сходных нуклеотидных последовательностей с ДНК типового штамма *P. stutzeri*. Таким образом, генетические различия между ними находятся, согласно современным представлениям, на уровне межвидовых. Однако, учитывая, что в нашем распоряжении был лишь один такой штамм и что по своим фенотипическим свойствам он весьма близок типовому, мы сочли возможным рассматривать его пока как не способную к денитрификации разновидность *P. stutzeri*.

Штаммы *P. stutzeri* высокочувствительны к антимикробным веществам: антибиотикам (включая эритромицин, как правило, угнетающий лишь грамположительные виды), многим красителям (в том числе риванолу, акридиновою оранжевою, хиолиновому синему).

Широко распространены в почве и воде, выделяются из клинических источников.

*Pseudomonas mendocina* Palleroni, 1970. Исследовано шесть штаммов *P. mendocina*, в том числе три коллекционных. В противоположность *P. stutzeri*, этот родственный ему денитрифицирующий вид высокооднороден по свойствам (что соответствует литературным данным и подтверждено нумерическими исследованиями).

Штаммы *P. mendocina* имеют один полярный жгутик, не образуют включений поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты, пять штаммов синтезировали желтый внутриклеточный пигмент каротиноидной природы. Иные пигменты или антибиотики (за исключением бактериоциноподобных веществ) не обнаружены. Найдены высокоактивные холестерол-эстеразы (табл. 67).

Таблица 66. Нуклеотидный состав ДНК и степень геномного родства некоторых штаммов *Pseudomonas stutzeri*

Сопоставляемые штаммы	Содержание ГЦ, %	Реассоциация, %
<i>P. stutzeri</i> 1979	66,9	77
<i>P. stutzeri</i> 4136	67,4	
<i>P. stutzeri</i> 3000	62,8	
<i>P. stutzeri</i> 4136	67,4	43
<i>P. stutzeri</i> 1979	66,9	
<i>P. stutzeri</i> 3000	62,8	56
<i>P. stutzeri</i> 4136	67,4	
<i>P. fluorescens</i> 4125	62,3	
<i>P. stutzeri</i> 1979	66,9	35
<i>P. fluorescens</i> 4125	62,3	
		29

Исследуемые штаммы сходны по числу и набору ассимилируемых углеродных субстратов (22—31 источник углерода). Они слабо усваивают углеводы и полиспирты, в частности маннит, ассимилируют итаконовую и хинную кислоты, глицин,  $\alpha$ - и  $\beta$ -аланин, бетаин и саркозин, *n*-алканы с длиной цепи от  $C_{14}$  до  $C_{22}$ .

Наличие аргининдигидролазы, способность к денитрификации, рост при 42 °С, спектры углеродного питания сближают штаммы *P. mendocina* с *P. aeruginosa*. Сходны и жирнокислотные спектры их клеточных гидролизатов. Однако названные виды легко дифференцируются на основании характера пигментообразования, а также способности ассимилировать жирные кислоты, адипиновую и пимелиновую кислоты, ароматические субстраты, низшие спирты, ацетамид (присущий синегнойным бактериям) и усвоения гликоллата (характерного для *P. mendocina*).

Штаммы *P. mendocina* умеренно чувствительны к антибиотикам и красителям. Источниками их выделения были почва и активный ил; наилучшие результаты получены при выделении на средах с тартратом и  $KNO_3$  при 42 °С.

***Pseudomonas fragi*** (Eichholz, 1902) Gruber, 1905. *P. fragi* — психрофильный вид, обитающий в пищевых продуктах. Несмотря на то что штаммы *P. fragi* неоднократно выделялись различными авторами из мяса, рыбы, молока, масла, сыра [208, 351, 446], таксономическая информация о нем до недавнего времени была ограниченной, а степень родства с другими видами рода не установлена. В 9-м издании определителя Берги *P. fragi* помещен в V секцию рода *Pseudomonas*, включающую виды не установленного таксономического положения.

Штаммы *P. fragi* широко распространены в охлажденных мясных продуктах. Среди 200 штаммов аэробных психротрофных бактерий, выделенных из мяса, 112 были идентифицированы как *P. fragi* и вошли в состав крупнейшего из 15 фенонов, образованных при нумерическом анализе [351].



Таблица 67. Важнейшие биологические особенности штаммов *Pseudomonas mendocina*

Признак	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%	
Желтый внутриклеточный пигмент каротиноид	5	83,3	+
Включения поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты	0	0	—
Наличие одного жгутика	5	83,3	+
Образование кислоты из глюкозы на среде Хью и Лейвсона	6	100	+
Оксидаза	6	100	+
Рост при 42 °С	5	83,3	+
Денитрификация	6	100	+
Наличие			
аргининдигидролазы	6	100	+
лизиндекарбоксилазы	0	0	—
левансахаразы	0	0	—
Окисление глюконата	0	0	—
Гидролиз			
желатина	0	0	—
лецитина	3	50	в
крахмала	0	0	—
ДНК	0	0	—
РНК	0	0	—
эскулина	0	0	—
желатина	0	0	—
холестеринолеата	6	100	+
Усвоение в качестве источника углерода			
глюкозы	6	100	+
ксилозы	0	0	—
арабинозы	0	0	—
маннозы	0	0	—
галактозы	0	0	—
фруктозы	0	0	—
сахарозы	0	0	—
мальтозы	0	0	—
трегалозы	0	0	—
крахмала	0	0	—
пропионовой кислоты	0	0	—
масляной кислоты	0	0	—
каприловой кислоты	6	100	+
пеларгоновой кислоты	4	66	в
молочной кислоты	6	100	+
гликолевой кислоты	6	100	+
итаконовой кислоты	6	100	+
сорбита	0	0	—
инозита	0	0	—
адонита	0	0	—
глицерина	1	16	—
бутиленгликоля	0	0	—
этанола	0	0	—
пропанола	0	0	—
<i>n</i> -оксибензойной кислоты	1	16	—
хинной кислоты	6	100	+

Признак	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%	
глицина	3	50	в
$\alpha$ -аланина	6	100	+
$\beta$ -аланина	6	100	+
аргинина	6	100	+
бетаина	6	100	+
саркозина	6	100	+
<i>n</i> -алканов C <sub>14</sub> —C <sub>22</sub>	6	100	+

Объектом нашего исследования служили микроорганизмы рода *Pseudomonas*, выделенные из охлажденных мясных продуктов (говядины, телятины, свинины, мясного фарша, замороженных кур и индеек). Выделение бактерий проводили прямым посевом проб на мясопептонный агар с последующей инкубацией чашек Петри при 5 °С до появления изолированных колоний. 14 штаммов, идентифицированных как *P. fragi*, а также типовой штамм этого вида ИМВ 4002 (ATCC 4973) были изучены по 120 фенотипическим признакам, проведена их нумерическая классификация.

Штаммы *P. fragi* весьма однородны по фенотипическим свойствам. Различия между ними, как видно из дендрограммы (рис. 33), лежат в пределах 2—7 признаков. Типовой штамм присоединялся к группе на уровне 91,7 % сходства.

При росте на большинстве сред штаммы *P. fragi* бесpigментны, однако на средах с глицерином многие из них образуют желтый внутриклеточный пигмент неустойчивой химической природы. Строгие аэробы, образуют кислоту из глюкозы и, что характерно для *P. fragi*, из мальтозы и целлобиозы. Оксидазоположительны, в спектрах поглощения интактных клеток имеются максимумы, характерные для цитохромов *c*- и *b*-типа. Психрофилы, хорошо растут при 5 °С.

Свойства бактерий	Процент штаммов, положительных по данному признаку
Наличие одного жгутика	100
Включения поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты	0
Наличие оксидазы	100
Образование в аэробных условиях кислоты из	
глюкозы	100
мальтозы	100
целлобиозы	100
Наличие	
аргининдигидролазы	93
лизиндекарбоксилазы	0
левансахаразы	0
Денитрификация	0
Рост при 5 °С	100

Рост при 42°C	0
Гидролиз	
желатина	0
лецитина	0
твина-80	0
крахмала	0
эскулина	0
холестеринолеата	0
Окисление глюконата	100
Чувствительность к	
нитрофурантоину	87
пенициллину	0
стрептомицину	93
мономицину	100
левомицетину	100
тетрациклину	87
неомицину	100
олеандомицину	7
полимиксину	100
метициллину	0
ампициллину	0
карбенициллину	0
канамицину	100
линкомицину	0
ристомицину	0
оксациллину	100
гентамицину	100

Из 105 испытанных соединений разнообразного химического строения 25 используются всеми или подавляющим большинством штаммов *P. fragi* в качестве единственного источника углеродного питания. Это глюкоза, близкая ей глюконовая кислота, фруктоза, уксусная, каприловая и пеларгоновая кислоты, метаболиты цикла Кребса, бетаин, более 10 различных аминокислот. Среди полиспиртов и гликолей универсальным субстратом служил глицерин и несколько худшим — маннит.

В целом спектр углеродного питания *P. fragi* достаточно узок: штаммы этого вида слабо ассимилируют низшие спирты, полиспирты, ароматические и некоторые азотсодержащие соединения.

Чувствительны к нитрофурантоину и многим другим испытанным антимикробным агентам. Однако пенициллин и его полусинтетические производные не ингибируют рост *P. fragi*.

Отличительной особенностью штаммов *P. fragi* является их высокая антибиотическая активность. В опытах по антагонизму все они, независимо от источника выделения, тормозили рост стафилококков, бацилл, коринебактерий и энтеробактерий, *P. aeruginosa*, но не оказывали влияния на фитопатогенные грибы и дрожжи рода *Candida*.

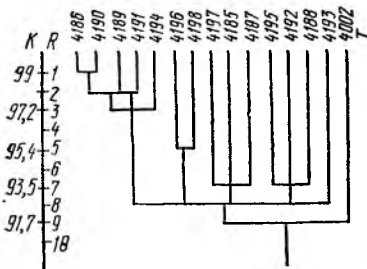


Рис. 33. Дендрограмма, образованная при нумерической классификации штаммов *P. fragi*:

T — типовой штамм, K — процент сходства, R — число отличий между штаммами

Хлороформенные и бензольные экстракты культуральных жидкостей штаммов *P. fragi*, выращенных на среде с глюкозой и дрожжевым экстрактом, обладали значительной антибиотической активностью в отношении грамположительных и более слабой — в отношении грамотрицательных бактерий. Минимальная ингибирующая доза бензольного экстракта культуральной жидкости *P. fragi* ИМВ 4002 в отношении *Staphylococcus aureus* 209 составляла 4 мкг/мл.

Японскими авторами из штамма *P. fragi* был выделен антибиотик фрагин [366]. Возможно, наблюдаемые нами антибиотические свойства *P. fragi* обусловлены синтезом этими бактериями фрагина либо близких ему производных.

ГЦ-содержание ДНК типового штамма *P. fragi* составляло 60,9 %, что близко литературным данным [7], у двух других штаммов — 59,6 и 61,1 %. Таким образом, рассматриваемый вид весьма однороден и по нуклеотидному составу ДНК. В опытах по молекулярной гибридизации ДНК — ДНК у типового штамма *P. fragi* ИМВ 4002 обнаружено 71—73 % гомологии с избранными представителями собственного вида:

Вид и штамм бактерии	Реассоциация, %
<i>P. fluorescens</i> ИМВ 4125	25
<i>P. fluorescens</i> ИМВ 1488	32
<i>P. aeruginosa</i> ИМВ 4000	20
<i>P. putida</i> ИМВ 2610	24
<i>P. aurantiaca</i> ИМВ 387	27
<i>P. mendocina</i> ИМВ 4172	25
<i>P. stutzeri</i> ИМВ 4136	25
<i>P. taetrolens</i> ИМВ 4006	29
<i>P. fragi</i> ИМВ 4181	71
<i>P. fragi</i> ИМВ 4187	73

Степень генетического родства штаммов *P. fragi* с представителями других видов рода *Pseudomonas* составляла 20—32 %. В этих экспериментах были использованы флюоресцирующие и нефлюоресцирующие виды I секции рода *Pseudomonas*. Предположение о родстве *P. fragi* с этими микроорганизмами было высказано ранее Бингом с соавт. [134] на основании косвенных данных при изучении ферментов тирозинового обмена у различных видов псевдомонад.

Полученные нами данные гибридизации ДНК — ДНК указывают на близость *P. fragi* видам I секции (I РНК-группы) рода *Pseudomonas*. Эти данные в целом сходны с результатами исследований Урсинг [491], согласно которым степень родства типового штамма *P. fragi* со штаммами видов I секции составляла

33—36 % и была несколько выше лишь для штаммов *P. augeofaciens* и *P. chlorographis* — 52—59 %. В то же время с видами III секции (*C. acidovorans* и *C. testosteroni*) значения гомологии ДНК *P. fragi* были весьма низкими — 9—10 %.

Приведенные выше данные свидетельствуют о принадлежности *P. fragi* к I секции рода *Pseudomonas*.

Интересна экология *P. fragi*. Ни разу штаммы этого вида не были обнаружены нами в почве и ризосфере растений. В то же время многочисленные литературные и полученные нами данные свидетельствуют о том, что этот вид широко населяет мясные продукты, молоко, рыбу. Из приведенной выше характеристики *P. fragi* трудно заключить, какие биологические особенности обеспечивают избирательность его распространения в пищевых продуктах. По-видимому, к их числу может быть отнесена способность к образованию гликокаликса — внеклеточного полимерного материала, обеспечивающего прикрепление бактерий к мясу и накопление ферментов, ответственных за его порчу [309]. Определенные селективные преимущества *P. fragi* перед микроорганизмами, вызывающими порчу пищевых продуктов, может давать и его антибиотическая активность, присущая, по нашим данным, всем штаммам этого вида и, очевидно, являющаяся таксономически ценным признаком.

«*Pseudomonas denitrificans*» Bergey et al., 1923. Если филогенетические отношения многих видов V секции рода *Pseudomonas* пока не исследованы, то типовой штамм «*P. denitrificans*» ИМВ 4007 (ATCC 19244) в этом отношении изучен достаточно подробно. По данным Дудорова и соавт. [170], нуклеотидный состав его ДНК равен 62,8 % ГЦ. Обнаружена значительная гомология ДНК «*P. denitrificans*» и еще более высокая — ДНК — рРНК с некоторыми видами «*P. fluorescens*-комплекса». Подробное изучение фенотипических свойств «*P. denitrificans*» ИМВ 4007 показало их своеобразие:

Признак	Наличие или отсутствие
Наличие одного жгутика	+
Включения поли-β-оксимасляной кислоты	—
Образование пигментов	—
Образование кислоты из глюкозы на среде Хью и Лейвсона	—
Наличие оксидазы	+
Рост при 42 °С	+ (слабо)
Денитрификация	+
Аргининдигидролаза	—
Лизиндекарбоксилаза	—
Левансахараза	—
Гидролиз	
желатина	—
лецитина	+
крахмала	—
твина-80	—
эскулина	—
холестеринолеата	—

Усвоение в качестве источника углерода уксусной, пропионовой, итаконовой кислоты,  $\alpha$ - и  $\beta$ -аланина, пролина, глюкозы и других углеводов, полиспиртов и гликолей, низших спиртов, ароматических соединений, многих аминокислот, бетаина, саркозина, гиппуровой кислоты, легких и средцепочечных *n*-алканов

---

В частности, весьма узким был спектр ассимилируемых «*P. denitrificans*» источников углерода. Это всего несколько веществ, преимущественно органические кислоты и некоторые аминокислоты.

Несмотря на то что Дудоров и соавторы были убеждены, что имеют дело с представителем нового вида, тем не менее они предложили упразднить видовое название «*P. denitrificans*» до момента, когда будут выделены из природы новые сходные по свойствам штаммы. Такое предложение представляется нам не вполне оправданным. Многие видовые описания были сделаны в результате изучения одного штамма (*P. alcaligenes*, *P. saccharophila*, *P. lemoiniei* и др.). Поэтому вид «*P. denitrificans*» мы считаем полным членом I секции рода *Pseudomonas*.

«*Pseudomonas rathonis*» Gray and Thornton, 1928. Эта группа микроорганизмов представлена восемью штаммами, выделенными из почв методом обогащения на антранилате при 40 °С. По-видимому, названный метод является наиболее подходящим для выделения штаммов «*P. rathonis*».

Все штаммы снабжены одним жгутиком (табл. 68), включений поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты не образуют. Колонии бактерий на агаризованных средах нежные и прозрачные. На средах с тирозином синтезируются темные пигменты, другие пигменты либо антибиотики не обнаружены. Бактерии слабо усваивают углеводы и полиспирты, но хорошо растут на низших спиртах. Из ароматических соединений они ассимилируют такой токсичный и редко усваиваемый псевдомонадами субстрат, как фенол. Активно потребляются также *n*-оксибензойная и гиппуровая кислоты, бетаин, саркозин, креатин.

По спектрам углеродного питания исследуемые штаммы сходны с биоваром *A P. putida*. Однако в отличие от последнего они не окисляют глюконат, не метаболизируют хинную кислоту, чувствительны к нитрофурантону, растут при 42 °С, имеют один жгутик, не синтезируют желто-зеленый флюоресцирующий пигмент. Их отличают также некоторые особенности углеродного питания, в частности способность к усвоению фенола.

Свойства исследуемых штаммов соответствовали крайне фрагментарной характеристике «*P. rathonis*» Gray and Thornton, 1928, в связи с чем мы дали описываемой группе это видовое название.

В международных коллекциях не сохранилось аутентичных культур этого вида, обладающего, согласно описанию, следующими свойствами: мелкие палочки, грамотрицательные, подвижные с

Т а б л и ц а 68. Важнейшие биологические особенности штаммов «*Pseudomonas gathonis*»

Призна	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%	
Наличие одного жгутика	8	100	+
Включения поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты	0	0	—
Образование кислоты из глюкозы на среде Хью и Лейсона	8	100	+
Наличие оксидазы	6	100	+
Рост при 42 °С	8	100	+
Денитрификация	0	0	—
Наличие			
аргининдигидролазы	7	87	+
лизиндекарбоксилазы	0	0	—
левансахаразы	0	0	—
Окисление глюконата	0	0	—
Гидролиз			
желатина	0	0	—
лецитина	0	0	—
крахмала	0	0	—
ДНК	0	0	—
РНК			
эскулина	0	0	—
холестеринолеата	0	0	—
Усвоение в качестве источника углерода			
глюкозы	8	100	+
ксилозы	8	0	—
арабинозы	0	0	—
маннозы	0	0	—
галактозы	0	0	—
фруктозы	0	0	—
сахарозы	0	0	—
трегалозы	0	0	—
мальтозы	0	0	—
целлобиозы	0	0	—
крахмала	0	0	—
пропионовой кислоты	0	0	—
масляной кислоты	2	25	в
валериановой кислоты	0	0	—
капроновой кислоты	2	25	в
пеларгоновой кислоты	0	0	—
малеиновой кислоты	0	0	—
гликолевой кислоты	0	0	—
итаконовой кислоты	0	0	—
маннита	0	0	—
сорбита	0	0	—
инозита	0	0	—
адонита	0	0	—
глицерина	0	0	—
бутиленгликоля	8	100	+
этанола	8	100	+
пропанола	8	100	+
<i>n</i> -оксibenзойной кислоты	6	75	в
фенилуксусной кислоты	4	50	в

Признак	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%	
хинной кислоты	0	0	—
фенола	7	87	+
глицина	0	0	—
$\alpha$ -аланина	8	100	+
$\beta$ -аланина	8	100	+
аргинина	8	100	+
бетаина	8	100	+
саркозина	8	100	+
креатина	6	75	в
гиппуровой кислоты	5	62	—
<i>n</i> -алканов			
$C_6-C_{10}$	0	0	—
$C_{14}-C_{22}$	0	0	—

помощью полярного жгутика; желатин не разжижают, могут восстанавливать нитраты до нитритов, образуют кислоту из глюкозы и глицерина, усваивают фенол и крезол, иногда нафталин, растут при 35 °С, место обитания — почва и навоз [124].

Нуклеотидный состав ДНК штаммов «*P. rathonis*» колебался в пределах 66,0—67,7 % ГЦ. Нами не найдено сходных нуклеотидных последовательностей в ДНК штаммов этого вида и типового штамма *P. fluorescens*, однако степень геномного родства между «*P. rathonis*» и *P. putida* составляла 19 %. Таким образом, как фенотипически, так и генетически штаммы «*P. rathonis*» близки видам I секции рода *Pseudomonas*.

Итак, наряду с сапрофитными бактериями флюоресцирующей группы, вопросы таксономии которых рассмотрены нами в предыдущих главах, а также фитопатогенными *P. syringae*, *P. viridiflava* и *P. cichorii* обширная I секция включает, по нашим данным, еще семь нефлюоресцирующих видов рода *Pseudomonas* (в том числе *P. fragi*, «*P. denitrificans*», «*P. rathonis*»). Предлагаемая схема классификации микроорганизмов I секции отражена в ключе для их идентификации (заключительная глава монографии). Согласно полученным недавно результатам гибридизации ДНК — рРНК [167], видам I секции родственны также «*Pseudomonas caudata*», *P. mucidolens*, *P. oleovorans*, «*P. reptilivora*», *P. resinovorans*, «*P. septica*», «*P. sunxantha*» и ряд описанных ранее фитопатогенных видов. Однако для включения в существующие классификационные схемы рода необходимо их подробное фенотипическое изучение и сравнение с более широко охарактеризованными видами I секции рода *Pseudomonas*.



## ГЛАВА 13

### ВИДЫ ДРУГИХ СЕКЦИЙ РОДА PSEUDOMONAS

Анализируя в предыдущих главах различные аспекты биологии и систематики бактерий рода *Pseudomonas*, мы очертили перечень рассматриваемых микроорганизмов границами рода, принятыми в 9-м издании определителя Берги. Однако исследования последних лет сузили эти границы. Из состава рода были исключены виды некоторых секций, отнесенные к родам *Xanthomonas* и *Comamonas*. В настоящее время род *Pseudomonas* включает виды I секции, детально рассмотренной нами, а также генетически более отдаленной II секции. Таксономический статус водородооксиляющих микроорганизмов III секции, а также многих слабо изученных видов V секции остается пока неясным. Несомненно, подлежат исключению из состава рода *P. diminuta* и *P. vezicularis*.

В настоящей главе мы рассмотрим биологические особенности некоторых изученных нами микроорганизмов, принадлежащих (или принадлежавших ранее) ко II, III и IV секциям рода *Pseudomonas*. Несмотря на низкие уровни генетического родства с псевдомонадами, эти бактерии фенотипически во многом с ними сходны, как сходны занимаемые ими в природе экологические ниши, а также методы их идентификации.

#### PSEUDOMONAS SERACIA (EX BURKHOLDER, 1950) PALLERONI AND HOLMES, 1981

Ко II секции (РНК-группе) принадлежат виды, патогенные для животных и растений. Это прежде всего возбудители особо опасных инфекций: сапа — *P. mallei* и мелиоидоза — *P. pseudomallei*, *P. pickettii*, выделенный из клинических источников, и фитопатогенные *P. gladioli*, *P. caryophylli* и *P. solanacearum*. Фитопатогенны также многие штаммы *P. seracia*. Дифференцирующие признаки видов II секции приведены в табл. 69.

Не ставя перед собой задачу изучить все члены II РНК-группы, мы исследовали лишь один из них — *P. seracia*. Впервые этот вид описан как возбудитель гнили лука [129]. В 1966 г. Стейниером на основании изучения 19 штаммов бактерий почвенного и клинического происхождения был описан вид *P. multivorans*, а четыремя годами позднее Джонсоном [268] — вид *P. kingii*, представленный штаммами, выделенными из патологического материала. Впослед-

Таблица 69. Дифференцирующие признаки видов II секции рода *Pseudomonas* (по [391])

Признак	<i>P. maltei</i>	<i>P. pseudomallei</i>	<i>P. saguophylli</i>	<i>P. ceratiae</i>	<i>P. glandioli</i>	<i>P. pickettii</i>	<i>P. solanacearum</i>
Число жгутиков	0	1	1	1	1	1	1
Диффундирующие в среду пигменты	—	—	+	+	+	—	В**
Наличие аргининдигидролазы	+	+	+	—	—	—	+
Денитрификация	+	+	+	—	—	+	—
Рост при 40 °С	+	+	+	+	+	+	—
Гидролиз							
желатина	+	+	—	В	+	—	—
крахмала	В	+	—	—	—	—	—
поли-β-оксибутирата	В	+	—	—	—	—	—
Источники углерода, используемые для роста							
<i>d</i> -ксилоза	+	—	+	В	+	+	—
<i>d</i> -рибоза	—	+	+	+	—	—	В
<i>l</i> -рамноза	—	—	+	В	—	—	—
сахарат	—	—	+	+	+	+	+
левулинат	—	—	+	+	+	+	+
цитратонат	—	—	—	—	+	—	—
мезаконат	—	—	—	—	+	—	—
<i>d</i> -тарترات	—	—	—	—	+	—	—
мезотарترات	—	—	+	+	—	+	В
эритрит	—	+	—	—	—	—	—
адонит	—	В	—	+	+	—	—
2,3-бутиленгликоль	—	—	+	+	—	—	—
<i>m</i> -оксибензоат	—	—	—	+	—	—	—
триптамин	—	—	—	+	—	—	—
α-амиламин	+	+	—	+	—	—	—

\* Штаммы *P. ceratiae* могут образовывать нефлюоресцирующие пигменты различного цвета; штаммы *P. glandioli* и *P. saguophylli* могут синтезировать желто-зеленые нефлюоресцирующие пигменты.

\*\* Некоторые штаммы образуют бурый диффундирующий пигмент.

ствии было показано, что все три названные выше вида сходны по культуральным и биохимическим свойствам, составу ДНК, жирнокислотным спектрам [454, 464]. Таким образом, была доказана идентичность этих видов, за которыми из соображений номенклатурного приоритета было сохранено название *P. ceratiae* [395].

Литературные данные свидетельствуют о возрастающей роли *P. ceratiae* в клинике в качестве оппортунистического патогена — возбудителя кистозного фиброза легких, эндокардита, раневых инфекций и других заболеваний [500, 210, 427]. Способность этих высокорезистентных к антимикробным веществам бактерий размножаться в растворах антисептиков представляет серьезную опасность для больных. Однако если клиническим штаммам *P. ceratiae* посвящено значительное число сообщений, то сапрофитные, населяющие почву представители этого вида изучены недостаточно.

Таблица 70. Сравнительная характеристика штаммов *Pseudomonas cerasia*, выделенных из ризосферы растений и из клинических источников

Признак	Количество штаммов, положительных по исследованным признакам, %		Признак	Количество штаммов, положительных по исследованным признакам, %	
	из ризосферы растений	из клинических источников		из ризосферы растений	из клинических источников
Наличие пучка жгутиков	100	100	Образование левана из сахарозы	0	0
Включения поли-β-оксимасляной кислоты	100	100	Гидролиз крахмала	0	0
Образование желтого пигмента	32	16	лецитина	100	84
фиолетового пигмента	0	8	твина-80	100	100
слизи	40	12	желатина	24	76
кислоты из глюкозы на среде Хью и Лейсона	96	88	эскулина	32	40
Рост при 42 °С	16	44	Гемолиз эритроцитов	36	56
Денитрификация	0	0	Чувствительность к антибиотикам		
Восстановление нитратов в нитриты	56	64	пенициллину	0	0
Оксидаза			стрептомицину	0	0
отсутствует	56	68	эритромицину	10	16
слабая	48	28	мономицину	0	12
умеренная	4	4	левометицину	100	92
Наличие аргининдигидролазы	0	0	тетрациклину	32	32
лизиндекарбоксилазы	100	84	неомицину	0	8
			олеандомицину	0	0
			полимиксину	0	0
			метициллину	0	0
			карбенициллину	0	12
			канамицину	21	28
			ристоминцину	0	0
			гентамицину	0	12

Нами исследовано 24 штамма *P. cerasia*, выделенных из ризосферы растений, типовой штамм ИМВ 4137 (АТСС 25416), а также 25 штаммов клинического происхождения, полученных из ряда зарубежных коллекций [83].

Наиболее подходящими для выделения из природы штаммов *P. cerasia* оказались в наших опытах методы обогащения на синтетической среде Козера с гликолатом в качестве единственного источника углерода (выделено 50 % штаммов), *m*-оксибензоатом (25 % штаммов), антранилатом и целлобиозой (по одному штамму). Два штамма выделены путем прямого посева почвы на МПА. Нам не удалось выделить штаммы *P. cerasia* из других почвенно-климатических зон СССР, кроме зоны влажных субтропиков. Безуспешными были и попытки выделения представителей этого вида из пораженного гнилью лука. В то же время в почвах Батумского ботсада штаммы *P. cerasia* были распространены очень широко.

ко, выделялись в различные годы и обнаруживались в ризосфере почти всех исследованных растений (эвкалипта, бамбука, китайского дуба, туи и др.). Напомним, что сапротитные представители этого вида были выделены из почв Тринидада, Калифорнии, Миссисипи, Южной Каролины, из ризосферы риса — растения, распространенного в областях с теплым и влажным климатом [103]. В доступной нам литературе мы не встречали сообщений о распространении *P. серасиа* в зонах умеренного климата (исключая, разумеется, штаммы клинического происхождения). Создается впечатление, что природный ареал обитания этого вида очерчен тропической и субтропической зонами.

Все исследованные штаммы *P. серасиа* — лофотрихи, образуют обильные включения резервного полимера поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты; в их электронно-микроскопических препаратах обнаруживаются перитрихиально расположенные фимбрии.

Весьма разнообразны штаммы *P. серасиа* по своим культуральным особенностям (табл. 70). Некоторые из них образуют обильную слизь; продуценты экстрацеллюлярной слизи чаще встречаются среди культур, выделенных из ризосферы. Штаммы растительного (32 %) и клинического (16 %) происхождения синтезируют лимонно-желтый, окрашивающий клетки и диффундирующий в среду пигмент; несколько культур образуют красно-бурый и фиолетовый пигменты. Оптимальными для пигментообразования являлись среды с глицерином.

Оксидазная активность бактерий отсутствовала или была слабой; соответственно были понижены максимумы, характерные для цитохрома *c* (554 и 524 нм), в спектрах поглощения интактных клеток бактерий.

Исследованные штаммы не синтезировали леван, анаэробно не расщепляли аргинин (усваивая его как источник углерода), не были способны к денитрификации, обладали активными лизиндекарбоксилазами. Многие штаммы гидролизovali желатин и вызывали гемолиз эритроцитов, причем оба эти свойства чаще встречались у штаммов клинического происхождения. Последние чаще росли при 42 °С, чем штаммы, выделенные из ризосферы растений.

Спектры углеродного питания различных штаммов *P. серасиа* были сходны независимо от источников их выделения (табл. 71). Все они усваивали более 60 различных соединений, в том числе мальтозу и салицин, жирные кислоты, адипиновую и пимелиновую кислоты, полиспирты, в том числе дульцит и адонит, разнообразные ароматические соединения, почти все исследованные аминокислоты. На низших спиртах от метанола до бутанола штаммы *P. серасиа* не росли. В целом штаммы, выделенные от больных, несколько слабее усваивали многие источники углерода, чем ризосферные культуры.

Как ризосферные, так и клинические штаммы этого вида были резистентны к большинству испытанных антибиотиков, за исключением левомицетина. Из красителей на них действовали только бриллиантовый зеленый и соединения группы парафуксина.

Т а б л и ц а 71. Спектр источников углерода, потребляемых штаммами *Pseudo-pomax seracia*

Источник углерода	Процент штаммов, усваивающих данный источник углерода		Источник углерода	Процент штаммов, усваивающих данный источник углерода	
	из ризосферы растений	из клинических источников		из ризосферы растений	из клинических источников
Глюкоза	100	92	Валериановая кислота	64	24
Ксилоза	100	32	Капроновая кислота	64	24
<i>l</i> -Арабиноза	96	68	Каприловая кислота	68	24
<i>l</i> -Рамноза	4	8	Пеларгоновая кислота	96	76
<i>d</i> -Манноза	100	90			
<i>d</i> -Галактоза	96	80	Метанол	0	0
<i>d</i> -Фруктоза	100	92	Этанол	8	0
Сахароза	100	88	<i>n</i> -Пропанол	4	4
Трегалоза	100	80	<i>n</i> -Бутанол	22	32
Мальтоза	80	24			
Целлобиоза	92	56			
Лактоза	0	8			
Крахмал	0	0	Анисовая кислота	58	32
Инулин	0	0	Коричная кислота	5	20
Глюконовая кислота	96	80	Миндальная кислота	21	21
Салицин	100	80	Бензойная кислота	92	76
			Салициловая кислота	68	40
			<i>m</i> -Оксибензойная кислота	87	60
Уксусная кислота	96	80	<i>n</i> -Оксибензойная кислота	100	84
Пропионовая кислота	100	84	Фталевая кислота	0	0
Масляная кислота	100	76	Фенилуксусная кислота	100	84
Фенол	9	4	Дульцит	96	92
			Маннит	100	92
$\alpha$ -Аланин	100	88	Сорбит	100	80
$\beta$ -Аланин	100	92	Мезоинозит	100	88
Глицин	28	16	Адонит	92	72
Серин	76	76	Глицерин	96	92
<i>l</i> -Треонин	61	36	Этиленгликоль	22	0
Лейцин	26	20	Бутиленгликоль	48	80
<i>l</i> -Изолейцин	42	36	<i>l</i> -Валин	100	52
			<i>l</i> -Аспарагин	100	92
			<i>l</i> -Глютаминная кислота	100	80
Щавелевая кислота	0	0	Лизин	96	76
Малоновая кислота	100	84	Аргинин	100	100
Янтарная кислота	100	100	Орнитин	84	64
Малеиновая кислота	0	8	Цитруллин	92	60
Фумаровая кислота	100	96	$\gamma$ -Аминомасляная кислота	9	0
			Мегионин	8	4
Глютаровая кислота	92	44	Гистидин	100	84
Адипиновая кислота	100	96	Пролин	100	96
Винная кислота	72	84	<i>l</i> -Тирозин	100	88
Молочная кислота	100	92	Фенилаланин	100	84
Гликолевая кислота	80	72			
Лимонная кислота	100	84			

Источник углерода	Процент штаммов, усваивающих данный источник углерода		Источник углерода	Процент штаммов, усваивающих данный источник углерода	
	из ризосферы растений	из клинических источников		из ризосферы растений	из клинических источников
$\alpha$ -Кетоглутаровая кислота	92	80	<i>l</i> -Триптофан	92	76
Пировиноградная кислота	100	88	Антралиловая кислота	68	64
Аконитовая кислота	78	76	<i>p</i> -Аминобензойная кислота	0	0
Итаконовая кислота	44	52	Гиппуровая кислота	100	100
Бензиламин	62	52	Ацетамид	60	72
Бетаин	100	76	Никотиновая кислота	60	68
Саркозин	68	32	$C_6-C_{10}$	0	0
Креатин	8	0	$C_{14}-C_{22}$	70	32

Высокая резистентность штаммов *P. serasia* к различным антимикробным соединениям побудила многих авторов к созданию селективных сред для выделения представителей этого вида из природных источников и патологического материала. Такова среда с азелаиновой кислотой и хлороталонилом [127], с лактозой, бацитрацином и полимиксином [505] и, наконец, с тетрациклином и трипановым синим [216]. Последняя была высокоселективной: среди вырастающих на ней бактерий 72 % принадлежали к виду *P. serasia*.

Нам не удалось сгруппировать изученные штаммы по описанным ранее биотипам А, В и С [174], отличающимся способностью к гидролизу желатина, росту при 42 °С, ассимиляции ацетамида, пролина, тестостерона. В то же время по способности к гидролизу эскулина, наличию нитратазы и расщеплению *o*-нитрофенилгалактозида (признаки, предложенные для отличия 8 биовариантов *P. serasia* [419]), исследуемые культуры распределены по 6 группам. Как видно из табл. 72, наиболее многочисленными как среди клинических, так и среди ризосферных культур были представители биоварианта 6; 20 % штаммов, выделенных от пациентов, принадлежали к биоварианту О (весьма слабо представленному штаммами, выделенными из растений). Распределение по биовариантам не коррелировало с пигментацией и другими культуральными свойствами бактерий.

Штаммы *P. serasia* быстро теряют способность к пересевам в условиях лабораторного хранения. На мясопептонном агаре при комнатной температуре изученные нами штаммы теряли жизнеспособность на протяжении 14—30 дней, при 0 °С — в течение 40—

Таблица 72. Распределение штаммов *Pseudomonas cerасiа* по биовариантам

Биовариант	Характеристика биоварианта			Число штаммов данного биоварианта	
	Гидролиз эскулина	Нитратаза	Проба с о-нитрофенил-галактозидом	среди микроорганизмов клинического происхождения	среди ризосферных культур
0	—	—	—	5	1
1	+	—	—	0	0
2	—	+	—	1	1
3	+	+	—	0	0
4	—	—	+	2	5
5	+	—	+	2	5
6	—	+	+	8	9
7	+	+	+	7	4

60 дней; при этом быстрее становились нежизнеспособными штаммы клинического происхождения.

Штаммы *P. cerасiа* обладают высокой антагонистической активностью в отношении стафилококков, бацилл, микобактерий, коринеформ, энтеробактерий, различных видов псевдомонад, оказывают ингибирующее действие на многие виды сапрофитных и фитопатогенных грибов. Эта антибиотическая активность обусловлена низкомолекулярными антибиотическими веществами, в том числе пигментами, некоторые из них, по-видимому, участвуют в переносе железа. Из рис. 34 видно, что антибактериальные, особенно антифунгальные свойства, более выражены у штаммов *P. cerасiа*, выделенных из ризосферы растений, что, очевидно, связано со средой их обитания. Можно предположить, что синтез антибиотических веществ широкого спектра действия дает преимущества этим штаммам-продуцентам в такой сложной микробной экосистеме, как ризосфера растений.

Наряду с низкомолекулярными антибиотиками штаммы *P. cerасiа* образуют высокомолекулярные бактериоциноподобные вещества (см. гл. 9). Нами среди ризосферных штаммов *P. cerасiа* найдены продуценты высокомолекулярных термоллабильных бактериоцинов, чувствительных к трипсину и проназе.

Способностью к синтезу бактериоцинов обладало подавляющее большинство (72,2 %) испытанных штаммов *P. cerасiа*. Чаще эти продуценты встречались среди клинических штаммов (рис. 35), что, по-видимому, также обусловлено спецификой их экологии. Известно, что, действуя на близкородственные штаммы бактерий, населяющие организм человека, бактериоцины могут играть важную роль в микробной сукцессии [319]. Таким образом, можно предположить, что их синтез дает продуцентам селективные преимущества в данной среде обитания.

Штаммы *P. cerасiа* весьма однородны по нуклеотидному составу ДНК, однако степень их генетического родства колеблется в широких пределах: от 45 до 99 % (табл. 73). Выявить корреляцию

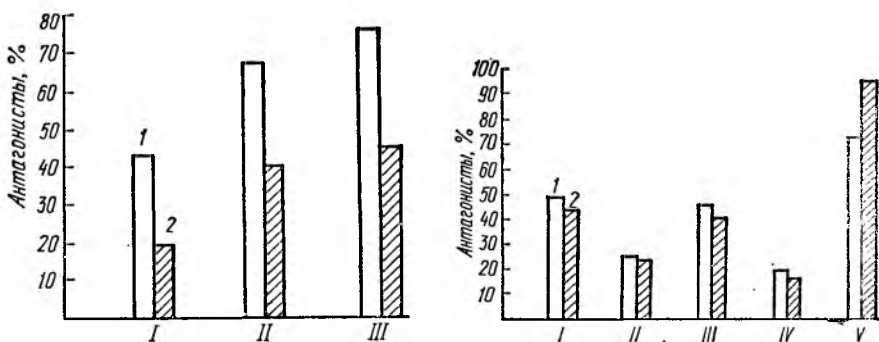


Рис. 34. Антагонистическая активность штаммов *Pseudomonas seracia*, выделенных от больных и из ризосферы растений, в отношении фитопатогенных грибов: I — *Fusarium oxysporum*; II — *Verticillium dahliae*, III — *Drechslera graminea*; 1 — штаммы ризосферного, 2 — клинического происхождения

Рис. 35. Антагонистическая активность штаммов *Pseudomonas seracia*, выделенных от больных и из ризосферы растений, в отношении различных тест-микрорганов, а также штаммов собственного вида:

I — *Staphylococcus aureus*, II — *Escherichia coli*, III — *Mycobacterium B<sub>8</sub>*, IV — *Pseudomonas aeruginosa*, V — штаммы собственного вида (образующие бактериоцины); 1 — штаммы ризосферного, 2 — клинического происхождения

между характером пигментации, принадлежностью к определенным биоварам, степенью генетической близости бактерий нам не удалось.

Таким образом, важнейшими видовыми особенностями *P. seracia* являются: образование включений поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты; наличие фимбрий; слабая оксидазная активность или отсутствие оксидазы; наличие лизиндекарбоксилазы и отсутствие аргининдигидролазы; высокая лецитиназная и липолитическая активность; устойчивость к большинству антимикробных агентов (кроме левомицетина); ассимиляция многих углеводов, высших дикарбоновых кислот, полиспиртов и ароматических соединений; неспособность к усвоению низших спиртов. Подобно штаммам синегнойных бактерий *P. seracia* характеризуется высокой антагонистической

Таблица 73. Нуклеотидный состав и гомология ДНК штаммов *Pseudomonas seracia*, определенные методом молекулярной гибридизации ДНК — ДНК

Сопоставляемые штаммы	Реассоциация, %				Содержание ГЦ в ДНК, %
	3187	4137	4203	5779	
3181			45	49	68,1
4137					68,3
4176		60			68,1
4203	45	85		99	68,7
5758		55			68,8
5779					68,9
5798		94		93	68,9
5779		54			67,2



активностью в отношении различных групп микроорганизмов, что связано с синтезом ряда высоко- и низкомолекулярных антибиотических веществ. Сложная серологическая структура [227, 373], наличие различных по свойствам бактериоциноподобных веществ также позволяют провести аналогию между *P. serasia* и *P. aeguginosa*. В отличие от последнего, хорошо изученного возбудителя, многие вопросы биологии *P. serasia* еще не решены.

Результаты наших исследований свидетельствуют как об определенных закономерностях распространения штаммов *P. serasia* в природе, так и об особенностях их физиологии в связи с условиями обитания. Наряду с некоторыми ферментативными свойствами к таким особенностям принадлежит способность бактерий к синтезу низко- и высокомолекулярных антибиотических веществ, дающих их продуцентам селективные преимущества в той или иной экосистеме.

### МИКРООРГАНИЗМЫ III И IV СЕКЦИЙ РОДА PSEUDOMONAS

**Виды III секции.** Микроорганизмы III секции рода *Pseudomonas* до недавнего времени были представлены несколькими водородоокисляющими видами, а также не растущими автотрофно в атмосфере водорода *P. delafieldii*, *P. acidovorans* и *P. testosteroni*. В последние годы таксономическое положение двух последних видов пересмотрено. Показано, что по данным секвенирования олигонуклеотидов 16S РНК, показателям ДНК—рРНК-гомологии, составу убихинонов и клеточных жирных кислот, а также другим хемотаксономическим критериям *P. acidovorans* и *P. testosteroni* близки к микроорганизму *Comamonas terrigena*. Вместе с ним они включены в состав рода *Comamonas* [166, 481].

К отличительным особенностям рода *Comamonas* относится способность накапливать поли- $\beta$ -оксибутират, подвижность, осуществляемая с помощью полярных жгутиков, наличие оксидазы и каталазы. Основные клеточные жирные кислоты — 16 : 0, 16 : 1 и 18 : 1; всегда содержится ЗОН 10 : 0; основной убихинон Q<sub>8</sub>; содержание ГЦ в ДНК колеблется в пределах 61—67 %.

Типовой вид рода *Comamonas* нуждается в факторах роста и усваивает более узкий набор источников углерода, чем родственные ему *C. acidovorans* и *C. testosteroni*. Дифференцирующие признаки этих трех видов представлены в табл. 74.

Исследованные нами штаммы *C. acidovorans* были получены из активного ила методом обогащения на ацетамиде, выделены из личинок комаров и ризосферы некоторых растений.

Все они лифотрихи, обильно образующие включения поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты на средах, дефицитных по азоту. У многих штаммов обнаружена антифунгальная активность, возможно, связанная с синтезом сидерофоров. Бактерии не синтезируют пигментов, не растут при 42 °С, не обладают гидролитической актив-

Таблица 74. Дифференцирующие признаки видов рода *Comamonas* (по [481])

Признак	<i>C. terrigena</i> (4 штамма)	<i>C. acidovorans</i> (15 штаммов)	<i>C. testosteroni</i> (17 штаммов)
Потребность в ростовых факторах	Метионин, никотинамид	—	—
Усвоение			
<i>d</i> -фруктозы	—	+	—
<i>d</i> -маннита	—	+	—
<i>dl</i> -тартрата	—	+	—
этиленгликоля	—	+	—
пропиленгликоля	—	+	—
<i>dl</i> -β-оксибутирата	—	—	+
тестостерона	—	—	+
Состав жирных кислот, %			
14 : 0	3	1	1
2ОН 16 : 0	1	1	1
ГЦ, %	65,1—65,3	66,2—67,1	61,0—62,1

ностью в отношении большинства испытанных субстратов (табл. 75).

Будучи не способными к ассимиляции глюкозы и других сахаров, за исключением фруктозы, штаммы *C. acidovorans* ассимилировали в качестве единственного источника углерода от 35 до 46 соединений. Значительное количество культур усваивало масляную, винную кислоты и такой малодоступный для флюоресцирующих бактерий субстрат, как малеиновую кислоту. Из алифатических спиртов часто усваивался *n*-бутанол, из ароматических соединений — *m*- и *p*-оксибензойная кислота, потреблялись многие аминокислоты. Хороший рост *C. acidovorans* наблюдался на ксантине, ацетамиде, гиппуровой и никотиновой кислотах.

*C. acidovorans* существенно отличается от *C. testosteroni* по нуклеотидному составу ДНК (табл. 74). Нами изученно 9 штаммов *C. testosteroni*, все они выделены из активного или и ризосферы сельскохозяйственных растений обогащением на *m*-оксибензоате.

По многим биологическим свойствам штаммы *C. testosteroni* сходны с *C. acidovorans* (см. табл. 75). В отличие от последнего, они не гидролизуют желатин и не ассимилировали некоторые источники углерода. Обнаружена интересная особенность *C. testosteroni*: 6 штаммов этого вида росли на средах с фолевой кислотой, при этом колонии их приобретали ярко-оранжевую окраску.

Таким образом, дифференциация *C. testosteroni* от *C. acidovorans* на основании способности усваивать некоторые источники углерода не представляет трудностей, хотя перечень отобранных нами для этой цели субстратов несколько отличен от описанных в литературе. Это малеиновая, винная и никотиновая кислоты, бутиленгликоль и ацетамид, усваиваемые *C. acidovorans*, но недоступные для *C. testosteroni*. Согласно литературным данным, штаммы *C. testosteroni* отличаются также наличием фосфоамидазы

Таблица 75. Важнейшие биологические особенности штаммов *Comamonas acidovorans* и *Comamonas testosteroni*

Признак	<i>C. acidovorans</i> (10 штаммов)			<i>C. testosteroni</i> (9 штаммов)		
	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%		абс.	%	
Включения поли-β-оксимасляной кислоты	10	100	+	9	100	+
Наличие пучка жгутиков	10	100	+	9	100	+
Образование кислоты из глюкозы	0	0	—	0	0	—
Наличие оксидазы	10	100	+	9	100	+
Рост при 42 °С	0	0	—	0	0	—
Денитрификация	0	0	—	0	0	—
Наличие						
аргининдигидролазы	0	0	—	0	0	—
лизиндекарбоксилазы	0	0	—	0	0	—
левансахаразы	0	0	—	0	0	—
Окисление глюконата	0	0	—	0	0	—
Гидролиз						
желатина	6	60	в	0	0	—
лецитина	0	0	—	0	0	—
крахмала	0	0	—	0	0	—
ДНК	0	0	—	0	0	—
РНК	0	0	—	0	0	—
эскулина	0	0	—	0	0	—
холестеринолеата	0	0	—	0	0	—
Усвоение в качестве источника углерода						
глюкозы	0	0	—	0	0	—
ксилозы	0	0	—	0	0	—
сахарозы	0	0	—	0	0	—
галактозы	0	0	—	0	0	—
фруктозы	7	70	в	2	22	в
мальтозы	0	0	—	0	0	в
целлобиозы	0	0	—	0	0	—
крахмала	0	0	—	0	0	—
глюконата	10	100	+	9	100	+
уксусной кислоты	10	100	+	8	89	+
пропионовой кислоты	1	10	—	5	55	в
масляной кислоты	7	70	в	6	67	в
капроновой кислоты	0	0	—	1	11	—
пеларгоновой кислоты	0	0	—	0	0	—
малеиновой кислоты	9	90	+	0	0	—
адипиновой кислоты	0	0	—	1	11	—
пимелиновой кислоты	10	100	+	9	100	+
винной кислоты	8	80	+	1	11	—
гликолевой кислоты	10	100	+	7	78	в
итаконовой кислоты	10	100	+	7	78	в
маннита	7	70	в	0	0	—
сорбита	0	0	—	0	0	—
инозита	5	50	в	0	0	—
глицерина	2	20	—	1	11	—
этанола	0	0	—	0	0	—
пропанола	1	10	—	1	11	—

Признак	C. acidovorans (10 штаммов)		Свойства «среднего организма»	C. testosteroni (9 штаммов)		Свойства «среднего организма»
	Количество штаммов, положительных по данному признаку			Количество штаммов, положительных по данному признаку		
	абс.	%		абс.	%	
бутиленгликоля	10	100	+	0	0	—
хинной кислоты	7	70	в	0	0	—
<i>n</i> -оксибензойной кислоты	9	90	+	6	67	в
глицина	10	100	—	4	44	в
аргинина	0	0	—	0	0	—
гистидина	10	100	+	8	89	+
тирозина	9	90	+	5	55	в
фенилаланина	10	100	+	7	78	в
пролина	10	100	+	9	100	+
бетанина	0	0	—	0	0	—
саркозина	0	0	—	0	0	—
гиппуровой кислоты	10	100	+	3	33	в
ацетамида	10	100	+	0	0	—
никотиновой кислоты	10	100	+	0	0	—
фолиевой кислоты	0	0	—	6	67	в
<i>n</i> -алканов C <sub>8</sub> —C <sub>10</sub>	0	0	—	0	0	н

[166]. Отличие в способности *C. acidovorans* ассимилировать ацетамид позволяет рекомендовать этот источник углерода для выделения штаммов данного вида из природы.

Штаммы *C. acidovorans* и *C. testosteroni* существенно отличались и по чувствительности к химиотерапевтическим агентам. Так, первые были резистентны ко всем испытанным красителям, в то время как на *C. testosteroni* действовали красители группы парафуксина, бриллиантовый зеленый и родомин бж. Последний вид был также чувствителен к мономицину, гентамицину и полимиксину, неэффективным в отношении *C. acidovorans*.

Фенотипическая однородность обоих видов подтверждена методами нумерического анализа. Распространены в воде, почве, ризосфере растений. Штаммы *C. acidovorans*, по нашим данным, способны к колонизации корней пшеницы и ее защите от поражения грибами.

Наряду с не способным к хемолитотрофному росту в атмосфере водорода *P. delafieldii* в состав III секции входят водородокисляющие псевдомонады. Важнейшие свойства микроорганизмов этой группы приведены в табл. 76.

**Виды IV секции.** IV секцию составляют виды *P. diminuta* и *P. vezicularis*, временно сохраняемые в составе рода, но генетически далекие от других псевдомонад [193, 167], а также *P. maltophilia*, отнесенный в 1983 г. к роду *Xanthomonas* [476]. Фенотипические свойства *P. diminuta* и *P. vezicularis* своеобразны, что выде-

Таблица 76. Биологические свойства видов III секции рода *Pseudomonas* (по [391])

Признак	<i>P. delafieldii</i>	<i>P. facillis</i>	<i>P. saccharophila</i>	<i>P. flava</i>	<i>P. pseudoflava</i>	<i>P. pailleronii</i>
Число жгутиков	1	1	1	1*	1**	1*
Желтые или оранжевые клеточные пигменты	—	—	—	+	+	+
Аутоτροφный рост с H <sub>2</sub>	—	+	+	+	+	+
Наличие оксидазы	+	+	+	+	+	+
Накопление поли-β-оксибутирата						
Накопление гликогена				+		
Разжижение желатина	—	+	+	—	—	—
Гидролиз крахмала	—	—	+	—	—	—
Наличие липазы	—	—	—	—	+	+
Гидролиз поли-β-бутирата	+	+	—	—	—	—
Рост при 41 °С	—	—	—	—	+	—
Денитрификация	—	—	—	—	+	—
Наличие аргининдигидролазы	—	—	—	—	—	—
Метаразрыв протокатехата	+	+	+	+	—	+
Молярное содержание ГЦ в ДНК, %	65—66	61,7—63,8	68,9	67,3	66,5—68	66,8

\* С тенденцией к пучку жгутиков и их субполярному расположению.

\*\* Полярное или субполярное расположение.

ляет их среди других псевдомонад [108]. К числу таких особенностей относится потребность обоих видов в факторах роста, крайне ограниченный спектр используемых источников углерода, образование кислоты из этанола.

Нами были изучены типовой штамм *P. vezicularis* и штамм ИМВ 2526, выделенный из минеральных вод Трускавецкого курорта. Типовой штамм этого вида выделен из пиявки, а второй, подробно изученный штамм *P. vezicularis*, — из воды ручья. Создается впечатление, что экология этого редко встречающегося вида связана с водоемами.

Оба штамма — монотрихи, образующие включения поли-β-оксимасляной кислоты. Они синтезируют оранжевые каротиноидные пигменты, антагонистически неактивны. Растут медленно даже на сложных питательных средах. Оксидазоотрицательны. На среде Хью и Лейвсона с 5% этанола образуют кислоту. Оба штамма требуют внесения в среду пантотената, биотина и витамина В<sub>12</sub>. В присутствии 10 мкг/мл этих факторов роста они слабо ассимилируют глюкозу, целлобиозу, уксусную и пировиноградную кислоты, этанол, пропанол, пролин, а типовой штамм — также янтарную и глютаминовую кислоты.

*P. vezicularis* — наиболее чувствительный к антимикробным веществам вид из всех изученных нами видов рода *Pseudomonas*.

Рост обоих штаммов тормозили 32 из 49 испытанных красителей, а также все испытанные антибиотики, кроме линкомицина.

Содержание ГЦ в ДНК *P. vezicularis* составляет 65,8 %, у близкого ему *P. diminuta* колеблется в пределах 66,3—67,3 %. Оба вида сходны по морфологии, физиолого-биохимическим свойствам, чувствительности к антимикробным агентам. В отличие от *P. vezicularis* штаммы *P. diminuta* не образуют пигментов, оксидазоположительны, требуют для роста наряду с перечисленными выше витаминами группы В присутствия в среде серосодержащих аминокислот — метионина или цистеина.

*Xanthomonas maltophilia* (Hugh, 1981) Swings, De Vos, Van den Mooter, De Ley, 1983 — член последнего, пятого, генетически обособленного комплекса, созданного внутри рода *Pseudomonas* на основе данных гибридизации ДНК — рРНК. С другими представителями рода *Xanthomonas* этот вид имеет наибольшую степень эволюционного родства: от 4 до 37 % гомологии ДНК — ДНК [253, 396].

*X. maltophilia* и другие виды рода *Xanthomonas* обладают сходным ( $Q_8$ ) составом респираторных хинонов, близки по общему жирнокислотному составу клеток и набору жирных оксикислот липида А, химической природе пигментов. Близость между рассматриваемыми группами микроорганизмов подтверждается и данными сравнительной энзимологии [476].

Одной из важнейших биологических особенностей бактерий рода *Xanthomonas* является их патогенность для растений. У представителей *S. maltophilia* это свойство до настоящего времени не было выявлено, однако имеются сообщения об идентичности *X. maltophilia* виду *P. hibiscicola*, вызывающему заболевания растений [391]. В то же время *X. maltophilia* — широко распространенный оппортунистический патоген тепличных, второй после синегнойных бактерий представитель псевдомонад по частоте выделения из патологического материала (мокроты, мочи, гноя, крови, фекалий) [237, 500]. У ослабленных пациентов *X. maltophilia* вызывает пневмонию, менингит, инфекции мочевого тракта, бактериемию, эндокардиты. Из тканевых фильтратов пациентов с язвенным колитом (возбудитель которого до настоящего времени неизвестен) были выделены *l*-формы бактерий, ревертанты которых идентифицированы как *X. maltophilia* [206]. Штаммы *X. maltophilia* избирательно обнаруживались в органах и тканях, пораженных опухолями [371].

При вспышке экссудативного дерматита овец, сопровождающегося пигментной гнилью руна, были выделены в качестве этиологических агентов 286 штаммов *X. maltophilia* [325]. У возбудителей выявлены ферменты патогенности: хитиназа, коллагеназа, ДНКаза, эластаза, гиалуронидаза, муциназа, фосфолипаза, хондроитинсульфатаза.

Таким образом, *X. maltophilia* — организм, потенциально патогенный для человека и животных. Штаммы этого рода были выделены из ризосферы многих сельскохозяйственных растений — пшеницы, картофеля, люпина и др. Установлено широкое распрост-

Таблица 77. Важнейшие биологические особенности штаммов *Xanthomonas maltophilia*

Признак	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%	
Бледно-желтый внутриклеточный пигмент	35	100	+
Включения поли-β-оксимасляной кислоты	0	0	—
Наличие жгутиков	35	100	+
Наличие оксидазы	0	0	—
Образование кислоты из глюкозы	11	31	в
мальтозы	35	100	+
Рост при 42 °С	0	0	—
Денитрификация	0	0	—
Наличие			
аргининдигидролазы	0	0	—
лизиндекарбоксилазы	33	94	+
левансахаразы	0	0	—
Окисление глюконата	0	0	—
Гидролиз			
желатина	33	94	+
лецитина	28	80	+
крахмала	0	0	—
ДНК	30	86	+
РНК	33	94	+
твина-80	23	66	в
эскулина	29	83	+
холестеринолеата	1	3	—
Усвоение в качестве источника углерода			
глюкозы	30	86	+
ксилозы	0	0	—
арабинозы	0	0	—
мальтозы	35	100	+
целлобиозы	32	91	+
крахмала	0	0	—
глюконата	0	0	—
салицина	12	34	в
пропионовой кислоты	3	8	—
масляной кислоты	0	0	—
капроновой кислоты	0	0	—
пеларгоновой кислоты	0	0	—
гликолевой кислоты	0	0	—
пировиноградной кислоты	35	35	+
маннита	0	0	—
сорбита	0	0	—
инозита	0	0	—
адонита	0	0	—
глицерина	0	0	—
этанола	9	26	в
пропанола	12	34	в
бензойной кислоты	0	0	—
п-оксибензойной кислоты	0	0	—
фенилуксусной кислоты	0	0	—
хиной кислоты	5	14	—

Признак	Количество штаммов, положительных по данному признаку		Свойства «среднего организма»
	абс.	%	
$\alpha$ -аланина	33	94	—
$\beta$ -аланина	0	0	—
лизина	0	0	—
аргинина	0	0	—
пролина	22	63	в
бетаина	0	0	—
саркозина	0	0	—
<i>n</i> -алканов			
$C_6—C_{10}$	0	0	—
$C_{14}—C_{22}$	0	0	—

ранение этого вида в различных почвенно-климатических зонах СССР — от Крайнего Севера (Земля Франца-Иосифа) до зоны пустынь и полупустынь.

В табл. 77 представлены результаты изучения 35 штаммов *X. maltophilia* (впоследствии нами было изучено еще 50 штаммов). На общеупотребимых средах клетки бактерий окрашены в бледно-желтый цвет (арилполиеновые пигменты). Антагонистическое действие обнаруживалось в отношении штаммов своего вида, а также микроорганизмов рода *Xanthomonas*, что, по-видимому, связано с синтезом бактериоциноподобных веществ. Наряду с этой особенностью у штаммов *X. maltophilia* выявлена антифунгальная активность.

Бактерии оксидазоотрицательны, в спектрах поглощения их интактных клеток не найдены максимумы, присущие цитохрому *c*. Характерная особенность *X. maltophilia* — способность к окислению мальтозы на среде Хью и Лейвсона. Исследуемые микроорганизмы лишены аргининдигидролаз, но обладают активной лизен-декарбоксилазой. 29 штаммов гидролизуют эскулин, многие штаммы проявили значительную липолитическую активность. Не ассимилируя минеральные источники азота, все они хорошо растут в присутствии 50 мкг/мл метионина как источника азотного питания.

По данным Икемото с соавт. [253], некоторые штаммы *X. maltophilia* при росте на цитрате, fumarate, *l*-гистидине и пролине не нуждались в метионине. При нумерической классификации они образовывали отдельный кластер, рассматриваемый авторами как биовар этого вида. Однако значения гомологии ДНК этих культур (30—35 %) с типовым штаммом *X. maltophilia* свидетельствуют, на наш взгляд, о том, что авторы имели дело не с биоваром *X. maltophilia*, а с близким ему самостоятельным видом.

На фоне метионина как источника азотного питания штаммы *X. maltophilia* ассимилировали узкий (не более 20 соединений) набор различных источников углерода: мальтозу и целлобиозу, неко-



торые органические кислоты, пролин и  $\alpha$ -аланин, многие штаммы росли на этаноле и пропаноле.

Несмотря на то что нами были исследованы сапрофитные, обитающие в ризосфере штаммы *X. maltophilia*, более половины из них вызывали гемолиз эритроцитов и подавляющее большинство гидролизовало ДНК. Из антибиотиков на них действовали левомицетин, тетрациклин, стрептомицин, полимиксин и гентамицин.

Ранее мы упоминали о резистентности *X. maltophilia* к ЭДТА, отличающей его от многих видов псевдомонад. Эта особенность была использована при создании селективной среды для выделения этого вида от больных [88]. Штаммы его устойчивы и к солям бария [78].

ГЦ-содержание ДНК штаммов *X. maltophilia* составляет по литературным данным 63—67,5 %.

В заключение коснемся одного из интересных аспектов экологии этого вида. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в природе *X. maltophilia* связан с микроорганизмами цикла серы, по-видимому, получая в ассоциации с ними необходимые для роста серосодержащие соединения. Так, из разрушенных покрытий корродированных газопроводов *X. maltophilia* выделяется в ассоциации с *Thiobacillus thioparus*. Он способен осуществлять десульфуризацию угля в процессе его флотации [489]. Можно предположить, что и *Pseudomonas* sp., разлагающий диметилсульфоксид в ассоциации с *Thiobacillus thioparus*, принадлежал к виду *X. maltophilia* [274].

## НЕКОТОРЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS

Виды рода *Pseudomonas* существенно различаются по способности к ассимиляции источников углерода, чувствительности к антимикробным агентам и другим свойствам, на использовании которых основываются селективные среды для их выделения. Как упоминалось выше, для выделения из природы сапрофитных флюоресцирующих видов мы использовали МПА с добавлением 100 мкг/мл нитрофурантоина, подавляющего многие грамотрицательные и грамположительные бактерии, но не действующего на псевдомонады. Селективные среды, предложенные для выделения *P. aeruginosa* [76], *P. ceracia* [127, 505, 216], *X. maltophilia* [87] и *P. solanacearum* [513], упомянуты нами в соответствующих разделах настоящей монографии.

Для выделения некоторых видов *Pseudomonas* могут быть использованы различные методы накопления. Для этих целей мы применяли синтетическую среду Козера следующего состава (в г): NaCl — 5, MgSO<sub>4</sub> — 0,2, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 1, дистиллированная вода — 1 л, с добавлением 0,1 % соответствующих источников углерода. В среду, разлитую по 100 мл в 0,5-литровые эрленмейеровские колбы, вносили исследуемые пробы (воды, почвы, активного ила и т. д.) и инкубировали на качалке (220 об/мин) при 26—42 °С в течение 2—5 сут до появления хорошего роста, после чего содержимое колб высевали на чашки Петри с МПА для получения изолированных колоний. Оптимальными источниками углерода для выделения штаммов *S. acidovorans* по литературным данным являются малеиновая кислота и *d*-триптофан (температура выделения — 30 °С) [468], а по нашим данным — ацетамид; для выделения *S. testosteroni* пригодны дикарбоновые кислоты (адипиновая, пимелиновая и др.) и *m*-оксибензоат (30 °С). Для выделения штаммов *P. stutzeri* и *P. mendocina* можно использовать методы обогащения на средах с этанолом либо тарtratом и KNO<sub>3</sub> при 40 °С; для выделения штаммов «*P. gathonis*» — среды с антранилом при той же температуре. Оптимальными источниками углерода для выделения штаммов *P. ceracia* служили в наших опытах гликолевая и *m*-оксибензойная кислоты.

Многие виды псевдомонад выделяют путем прямого посева проб на МПА. Штаммы *P. fragi* хорошо вырастают при 5 °С, *P. alcaligenes* — при 42.

*Отношение к окраске по Граму.* Изучают у чистых культур микроорганизмов, выделенных из изолированных колоний. Наряду с общепринятым методом в последние годы получил распространение тест с КОН [191]. Небольшое количество суточной культуры бактерий наносят петлей на стекло с каплей 3%-го КОН и размешивают в ней. Через 1—2 мин грамотрицательные бактерии лизируют, и капля становится желеобразной из-за выделяющейся ДНК. Суспензии грамположительных микроорганизмов сохраняют свой прежний вид.

Далее исследуют подвижность бактерий в висячей капле.

*Изучение подвижности и характера расположения жгутиков.* Для этого используют суточные бульонные культуры бактерий. Число и расположение жгутиков изучают в электронном либо обычном световом микроскопе; в последнем случае применяют специальные методы окраски [310].

У грамотрицательных палочек, подвижных с помощью полярных жгутиков, исследуют *способность окислять либо ферментировать углеводы на среде Хью и Лейвсона* [244] следующего состава (в %): пептон — 0,2, NaCl — 0,5,  $K_2HPO_4$  — 0,03, агар-агар — 0,3, бромтимолблау (водорастворимый) — 0,003, глюкоза — 1 %.

Культуру засевают в две пробирки (содержащие по 5 мл среды), одну из которых заливают после этого 2—3 мл стерильного вазелинового масла или голодного агара для создания анаэробных условий. Бактерии рода *Pseudomonas* — строгие аэробы, не способные к анаэробной ферментации глюкозы и не изменяющие зеленый цвет содержащей индикатор среды под вазелиновым маслом. В аэробных условиях многие виды псевдомонад окисляют глюкозу до кислот, о чем свидетельствует изменение цвета индикатора в желтый от поверхности в глубину среды. Некоторые виды не изменяют или подщелачивают среду в аэробных условиях (синий цвет индикатора).

Важным диагностическим признаком, позволяющим отнести бактерии к флюоресцирующей группе рода *Pseudomonas*, является образование ими *желто-зеленого флюоресцирующего пигмента*. У многих штаммов это свойство наблюдается на общепотребимых средах (МПА, бульоне, желатине). Если пигмент не образуется, бактерии высевают на среды, оптимальные для флюоресценции: МПА с 10 % яичного белка (белок добавляют стерильно к расплавленному и охлажденному агару) или среду Кинг В [284] (в г): пептон — 20, глицерин — 10,  $K_2HPO_4$  — 1,5,  $MgSO_4$  — 1,5, агар-агар — 16, дистиллированная вода — 1000 мл. Обязательно исследование культур в ультрафиолете, где пигмент дает интенсивную желто-зеленую флюоресценцию.

*Способность бактерий к синтезу иных пигментов* исследуют на агаризованной среде Кинг А [284] (в %): пептон — 2,  $K_2SO_4$  — 2, глицерин — 2,0,  $MgCl_2$  — 0,7, агар-агар — 1,6, дистиллированная вода, на протяжении 5 сут инкубации при 28 °С, после чего пигмент извлекают из клеток либо среды соответствующими органическими растворителями.

Для обнаружения включений резервного полимера поли-β-оксимасляной кислоты бактерии выращивают в условиях аэрации (качалка) в течение 48 ч при 26 °С на синтетической среде Мюнца, содержащей (в г):  $MgSO_4$  — 0,1,  $KNO_3$  — 0,2,  $NaCl$  — 1,0, янтарнокислый натрий — 5, водопроводная вода — 800 мл,  $Na_2HPO_4$  — 0,6 г,  $KH_2PO_4$  — 0,14 г, дистиллированная вода — 200 мл (стерилизуется отдельно и соединяется с остальной средой перед употреблением).

Клетки бактерий, выращенных на этой дефицитной по азоту среде, наносят на предметное стекло и окрашивают по методу Бердена [128]. Препарат высушивают на воздухе, фиксируют жаром. Затем на стекло наливают раствор черного судана (0,3 г в 100 мл 70%-го этилового спирта). Окрашивание при комнатной температуре продолжается 5—15 мин (препарат может при этом высохнуть). Затем стекло следует промокнуть, высушить, просветлить ксилолом и докрасить в течение 5—10 с 0,5%-м водным раствором сафранина или разведенного карболового фуксина. В препаратах, исследуемых с иммерсионной системой, видны красные клетки бактерий с лежащими в них черными включениями поли-β-оксибутирата.

Идентификация бактерий до вида строится далее на изучении следующих признаков.

*Способность к росту при 42 °С* изучают в трех пассажах (по 24 ч каждый) на МПБ; к росту при 5 °С — на скошенном МПА в течение 2 недель; для обнаружения оксидазной активности [303] суточную культуру бактерий, выращенных на МПА, наносят петлей на фильтровальную бумагу, смоченную 1%-м водным раствором солянокислого диметилпарафенилендиамина, приготовленным *ex tempore*. Подавляющее большинство видов *Pseudomonas* дает с этим реактивом пурпурное окрашивание на протяжении нескольких секунд.

*Аргининдигидролаза* исследуется по методу Меллера [350] на среде следующего состава (в г): пептон — 1, пиридоксин (витамин  $B_6$ ) — 0,005, глюкоза — 0,5, бромкрезоловый пурпурный — 0,01, крезол-рот — 0,005, *l*-аргинин — 10, мясная вода — 5 мл, дистиллированная вода — 1 л. Пробирку с 3—5 мл этой среды и контрольную (без аргинина) засевают суточной агаровой культурой бактерий и заливают стерильным вазелиновым маслом. Инкубация — при оптимальной для исследуемых культур температуре на протяжении 7 сут.

В контрольной пробирке с бактериями рода *Pseudomonas*, не способными к анаэробной ферментации глюкозы, среда остается неизменной (серой или бледно-розовой). В опытной пробирке появляется фиолетовое окрашивание, свидетельствующее о разложении аргинина.

Аналогичным образом, однако с использованием лизина либо орнитина вместо аргинина исследуется наличие у бактерий лизин- и орнитиндекарбоксилазы.

*Образование левана из сахарозы* [151]. Расплавляют 1 л агара Хоттингера, содержащего 50 г сахарозы, охлаждают до 40 °С, асептически добавляют 50 мл стерильной лошадиной сыворотки без консерванта и разливают по чашкам Петри. Испытуемые штаммы бактерий засевают штрихом, контролем служат посевы на МПА. Штаммы, обладающие левансахарозой, образуют на среде с сахарозой и сывороткой характерную студенистую слизь.

*Денитрификация* [462]. 6—8 мл МПБ, содержащего 0,5 %  $KNO_3$  и 0,1 % глицерина, засевают суточной культурой бактерий и заливают стерильным вазелиновым маслом или голодным агаром (3—5 мл). Инкубация — до 7 сут при оптимальной температуре. О положительной денитрификации свидетельствуют рост бактерий в анаэробных условиях и появление под агаром или вазелиновым маслом пузырьков свободного азота.

Та же среда может быть использована для выяснения способности бактерий восстанавливать нитраты до нитритов [145]. Для этой цели применяют реактивы: 8 г сульфаниловой кислоты в 1 л 5 н. уксусной кислоты и 5 г диметил- $\alpha$ -нафтиламина в 1 л 5 н. уксусной кислоты. Среда, содержащая нитраты, дает при смешивании на стекле с несколькими каплями этих реактивов красное, розовое или каштановое окрашивание.

*Гидролиз желатина* изучают в пробирках с 25 %-м мясопептонным желатином на протяжении 30 дней; для облегчения учета опыта пробирки выдерживают 1 ч в холодильнике.

*Гидролиз эскулина* [462] исследуют на среде, содержащей (в г): пептона — 10, эскулина — 1, цитрата железа — 0,05, цитрата натрия — 1,0, дистиллированной воды — 1 л. Среду, разлитую в пробирки по 5 мл, засевают суточной культурой бактерий и инкубируют 2 сут. Гидролиз эскулина ведет к образованию эскулина, и в случае положительной реакции среда из бледно-флюоресцирующей становится коричневой.

Для выявления *лецитиназной активности* [94] к расплавленному и охлажденному до 50 °С МПА добавляют 5 % стерильного «яичного раствора» (яичный желток, разведенный наполовину 0,85 %-м раствором  $NaCl$ ), размешивают и разливают в чашки Петри. Бактерии засевают штрихом и инкубируют 3—5 сут при оптимальной температуре; колонии лецитиназоположительных микроорганизмов окружены радужными зонами.

*Липолитическую активность* бактерий исследуют по методу Сьера [451] на среде, содержащей (в г): пептона — 10,  $NaCl$  — 5,  $CaCl_2$  — 0,1, дистиллированной воды — 1 л. К расплавленной и слегка охлажденной среде добавляют 1 % простерилизованного 20 мин при 120 °С твина-60, разливают в чашки Петри и засевают суточными культурами бактерий. При гидролизе твина вокруг колоний бактерий образуются зоны преципитации, состоящие из кальциевых солей жирных кислот.

Сходным методом определяют *холестеролэстеразную активность* бактерий [41], однако в этом случае в среду вносится холестеринный эфир олеиновой кислоты.

*Гидролиз крахмала* [468] определяют на чашках с МПА, содержащим 0,2 % растворимого крахмала. Бактерии выращивают на чашках 2—5 сут, после чего заливают раствором Люголя. Последний дает с крахмалом синее окрашивание; колонии продуцентов амилаз окружены прозрачными неокрашенными зонами.

*Способность к хемолитотрофному росту в атмосфере водорода* [468] изучают на среде, содержащей (в г):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  — 1,  $\text{MgSO}_4$  — 0,5,  $\text{FeCl}_3$  — 0,05,  $\text{CaCl}_2$  — 0,005 (два последние ингредиента стерилизуются отдельно), агар-агар — 10, 1 М буфер  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ — $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , рН 6,8—33 мл, дистиллированная вода — 1 л. Бактерии высевают на чашки с агаризованной средой и инкубируют при 30 °С в эксикаторах в атмосфере, содержащей  $\text{H}_2$  — 65 %,  $\text{CO}_2$  — 5,  $\text{O}_2$  — 6,  $\text{N}_2$  — 24 %. Контрольные чашки инкубируют на воздухе. Одинаковая интенсивность роста в опыте и контроле в течение двух недель позволяет сделать вывод, что штамм не способен к хемолитотрофному росту в атмосфере водорода.

*Способность бактерий к усвоению минеральных форм азота* исследуют на агаризованной синтетической среде Козера с 0,1 % глюкозы и параллельно — с 0,1 % пировинограднокислого натрия. При испытании большого числа штаммов 1-миллиардные суспензии суточных культур бактерий в 0,85%-м растворе  $\text{NaCl}$  высевают на среду в чашках Петри репликатором. Контролем служит посев на среду Козера без источника углерода. Учет опыта — через 48 ч роста при 28 °С. Некоторые виды псевдомонад (*P. alcaligenes*, «*P. denitrificans*» и др.) не способны к усвоению глюкозы, однако хорошо растут на средах с минеральными формами азота и пируватом в качестве источника углерода.

В случае отсутствия роста на средах с аммиачными либо нитратными источниками азота к ним добавляют витамины (1—10 мкг/мл) и серосодержащие аминокислоты — метионин и цистеин (100 мкг/мл).

Спектры углеродного питания бактерий исследуют по описанной выше методике, высевая бактерии репликатором на синтетическую среду Козера, содержащую 0,1 % различных веществ в качестве источников углерода и энергии. Если микроорганизмы аукотрофны по витаминам или аминокислотам, источники углерода вносятся в синтетическую среду, содержащую необходимые добавки.

Ниже представлен ключ для идентификации микроорганизмов I секции — основного ядра рода *Pseudomonas*, отражающий предлагаемую нами схему их классификации. Отдельные биовары *P. fluorescens* и *P. putida* рассматриваются в этой схеме как самостоятельные виды. Предлагаемый ключ указывает лишь на общее направление исследований; более подробные сведения о свойствах изучаемых микроорганизмов могут быть почерпнуты из соответствующих разделов книги. Для идентификации представителей других, генетически более далеких секций рода могут быть использованы сведения, представленные в гл. 13.

Ключ для идентификации микроорганизмов I секции рода *Pseudomonas*

Грамотрицательные палочки, подвижны с помощью одного или нескольких полярных жгутиков, не способны к анаэробной ферментации глюкозы на среде Хью и Лейсона. Чувствительны к ионам  $Ba^{2+}$  в концентрации 10 мг/мл. Как правило, не образуют включений резервного полимера поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты. Оксидазоположительны (за исключением двух фитопатогенных видов) \*

1. Образуют желто-зеленый диффундирующий в среду флюоресцирующий пигмент . . . . . 2
- Не образуют желто-зеленого флюоресцирующего пигмента 13
2. Аргининдигидролаза положительна. Сапрофиты либо «оппортунистические патогены» . . . . . 3
- Аргининдигидролаза отрицательна. Фитопатогенные микроорганизмы . . . . . 11
3. При 42 °С растут. Обладают одним полярным жгутиком, образуют синий пигмент пиоцианин либо красные азругинозины. Возможны беспигментные варианты. Активные денитрификаторы, разжижают желатин, не образуют леван. Слабо ассимилируют многие углеводы и полиспирты. Усваивают пропионовую, масляную, валериановую, адипиновую, пимелиновую, бензойную и антралиловую кислоты, этанол и пропанол, ацетамид . . . . . 1. ***Pseudomonas aeruginosa***
- При 42 °С не растут . . . . . 4
4. Имеют один жгутик. К денитрификации не способны, леван не образуют, слабо усваивают углеводы, жирные кислоты, ароматические соединения, спирты и полиспирты, при 5 °С не растут, желатин не разжижают . . . . . 2. ***Pseudomonas taetrolens***
- При 5 °С растут, желатин разжижают . . . . .
- . . . . . ***Pseudomonas taetrolens* var. *lundensis***
- Имеют несколько жгутиков . . . . . 5
5. Желатин не разжижают, трегалозу и инозит не усваивают 6
- Желатин разжижают, трегалозу и инозит усваивают . . . . . 7
6. К денитрификации не способны, леван не образуют, многие штаммы ассимилируют креатин, фенилуксусную, гиппуровую и винную кислоты. Не ассимилируют сорбит и м-оксibenzoат, метионин и цистеин, многие штаммы потребляют никотиновую кислоту . . . . . 3. ***Pseudomonas putida*** (биовар А)
- Ассимилируют сорбит и серосодержащие аминокислоты, не усваивают никотиновую кислоту . . . . .
- . . . . . 4. «***Pseudomonas convexa***» (биовар В Р. *putida*)
7. Не образуют иных пигментов, кроме зеленого флюоресцирующего . . . . . 8
- Образуют дополнительно к зеленому флюоресцирующему пигменты иной химической природы . . . . . 10

\* Общие хемотаксономические особенности видов I секции см. в гл. 4, 5.

8. Образуют леван из сахарозы. К денитрификации не способны, не усваивают масляную кислоту, этанол и пропанол, хорошо ассимилируют ксилозу, сорбит, адонит, триптофан . . . . . 5. ***Pseudomonas fluorescens*** (биовар I)
- Не образуют леван из сахарозы . . . . . 9
9. Активные денитрификаторы. Ассимилируют этанол и пропанол, многие штаммы усваивают масляную кислоту, сорбит, бутиленгликоль, бензоат . . . . . 6. ***Pseudomonas myxogenes*** (биовар III *P. fluorescens*)
- Не способны к денитрификации. Не ассимилируют этанол и пропанол, полиспирты, масляную и итаконовую кислоты . . . . . 7. ***Pseudomonas schuylkilliensis*** (биовар V *P. fluorescens*)
10. Образуют дополнительно к зеленому флюоресцирующему пигменту пигменты иной химической природы. Образуют синий внутриклеточный пигмент,  $\lambda_{\max}=630$  нм. Синтезируют леван, способны к денитрификации. Усваивают ксилозу, галактозу, сахарозу, сорбит, большинство штаммов — этанол и пропанол. Не ассимилируют масляную и итаконовую кислоты . . . . . 8. ***Pseudomonas lemonnieri*** (биовар IV *P. fluorescens*)
- Образуют красно-оранжевый пигмент, диффундирующий в среду и извлекаемый бутанолом,  $\lambda_{\max}=290$  и  $510$  нм; наряду с пигментом образуются антибиотики — производные флороглюцина. Возможны беспигментные варианты, слабо синтезирующие антибиотики. Образуют леван, активные денитрификаторы, хорошо усваивают ксилозу, сахарозу, масляную кислоту, сорбит, этанол и пропанол . . . . . 9. ***Pseudomonas aurantiaca***
- Образуют желто-оранжевый, диффундирующий в среду пигмент, извлекаемый хлороформом и представляющий собой смесь производных феназина,  $\lambda_{\max}=260$  и  $370$  нм. Активно синтезируют леван, гидролизуют жиры и лецитин. Не усваивают ксилозу, этанол, пропанол, сорбит. Ассимилируют масляную, итаконовую, бензойную, фенилуксусную, антраниловую кислоту и триптофан . . . . . 10. ***Pseudomonas aureofaciens***
- Синтезируют изумрудно-зеленые кристаллы хлорорафина либо желтые оксихлорорафина. Синтезируют леван, способны к денитрификации. По спектрам углеродного питания и другим свойствам близки *P. aureofaciens* 11. ***Pseudomonas chlororaphis***
- Образуют розово-фиолетовый диффундирующий в среду и извлекаемый хлороформом пигмент. Синтезируют леван, активные денитрификаторы, усваивают ксилозу, итаконовую кислоту, сорбит, этанол и пропанол, метионин, триптофан. Не ассимилируют масляную кислоту . . . . . 12. ***Pseudomonas fluoro-violaceus***
11. Аргининдигидролаза отрицательна. Фитопатогенные микроорганизмы. Оксидаза положительна. Лофотрихи, не образуют леван, не гидролизуют желатин, не усваивают сорбит, лейцин, тартрат . . . . . 13. ***Pseudomonas cichorii***
- Оксидаза отрицательна . . . . . 12



12. Образуют леван, лофотрихи. Гидролизуют эскулин, не ассимилируют лейцин и тартрат . . . 14. ***Pseudomonas syringae***  
 — Не образуют леван, имеют 1—2 жгутика. Гидролизуют желатин, усваивают сорбит, тартрат, лейцин . . . . . 15. ***Pseudomonas viridiflava***
13. Растут на простых синтетических средах с глюкозой в качестве источника углерода и минеральными формами азота . . . 14  
 — Не растут на простых синтетических средах с глюкозой в качестве источника углерода и минеральными формами азота. Растут на синтетических средах с некоторыми органическими кислотами (пировиноградной,  $\alpha$ -кетоглutarовой, янтарной) и минеральными формами азота . . . . . 17
14. Способны к денитрификации . . . . . 15  
 — Не способны к денитрификации . . . . . 16
15. Имеют аргининдигидролазу. Образуют желтый внутриклеточный пигмент — каротиноид, имеют 1 жгутик, растут при 42 °С, гидролизуют эфиры холестерина. Слабо ассимилируют углеводы, полиспирты и низшие спирты. Усваивают гликолат, бетаин, саркозин, среднепочечные *n*-алканы . . . . . 16. ***Pseudomonas mendocina***  
 — Не имеют аргининдигидролазы. Колонии сухие, морщинистые, имеют 1 жгутик, способны к гидролизу крахмала и его усвоению в качестве единственного источника углерода. Ассимилируют также мальтозу, гликолат, маннит, этанол . . . . . 17. ***Pseudomonas stutzeri***
16. Растут при 42 °С. Пигментов не образуют, имеют 1 жгутик, аргининдигидролаза положительна, слабо усваивают углеводы, жирные кислоты, полиспирты, ассимилируют этанол, пропанол, фенол . . . . . 18. «***Pseudomonas rathonis***»  
 — При 42 °С не растут. Пигментов не образуют, имеют 1 жгутик, аргининдигидролаза положительна, растут при 5 °С, образуют кислоту из мальтозы и целлобиозы, не усваивают низшие спирты и фенол . . . . . 19. ***Pseudomonas fragi***
17. Имеют аргининдигидролазу . . . . . 18.  
 — Не имеют аргининдигидролазы. Активные денитрификаторы, имеют 1 жгутик, не усваивают углеводы, полиспирты, жирные кислоты от масляной до пеларгоновой, бетаин и саркозин. Ассимилируют уксусную, пропионовую, итаконовую кислоты, пролин,  $\alpha$ - и  $\beta$ -аланин . . . 20. «***Pseudomonas denitrificans***»
18. Усваивают  $\alpha$ - и  $\beta$ -аланин, аспарагиновую кислоту. Отдельные штаммы образуют включения поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты. Большинство штаммов растет при 42 °С. Не ассимилируют углеводы\*, жирные кислоты, низшие спирты и полиспирты, ароматические соединения. Часть штаммов ассимилирует итаконат, гистидин, тирозин, среднепочечные *n*-алканы . . . . . 21. ***Pseudomonas pseudoalcaligenes***

\* Единичные штаммы способны к ассимиляции глюкозы.

— Не усваивают  $\alpha$ - и  $\beta$ -аланин, аспарагиновую кислоту. Растут при 42 °С, не ассимилируют углеводы, низшие спирты и полиспирты, ароматические соединения, бетаин и саркозин. Усваивают некоторые органические кислоты и аминокислоты (уксусную, пировиноградную, янтарную, глутаминовую, аргинин, пролин) . . . . . 22. ***Pseudomonas alcaligenes***

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей монографии мы попытались по возможности полно охарактеризовать микроорганизмы обширного рода *Pseudomonas*, уделив особое внимание его таксономической структуре, вопросам классификации и идентификации псевдомонад. Представленные данные не только свидетельствуют о существовании внутри рода *Pseudomonas* эволюционно далеких групп микроорганизмов, но дают возможность выявить некоторые фенотипические особенности, позволяющие дифференцировать эти группы одна от другой. К таким особенностям относятся ауксотрофность по аминокислотам и витаминам, строение и состав убихинонов, экстрацеллюлярных полисахаридов, 3-оксициклотрикарбоната, спектры поглощения цитохромов, чувствительность к ЭДТА и солям бария. Перечисленные критерии могут быть использованы для разграничения секций — таксонов более высокого ранга, чем виды. В то же время приведенные в монографии данные свидетельствуют о том, что для видовой дифференциации псевдомонад пригодны не только общепринятые приемы (изучение цитологических и физиолого-биохимических свойств бактерий, спектров потребляемых источников углерода, чувствительности к антимикробным агентам и др.), но и многие хемотаксономические критерии. К числу последних наряду с общим жирнокислотным составом клеток принадлежат качественный и количественный состав выделяемых в среду летучих жирных кислот, строение ряда экзополисахаридов, пигментов, антибиотиков и некоторых других вторичных метаболитов.

Проведенные нами исследования характеризуют антибиотическую активность различных видов бактерий рода *Pseudomonas* и позволяют проанализировать роль этого признака в систематике данной группы микроорганизмов. Показано, что образование некоторых классов органических соединений (пиоцианина, 2-оксифеназинов, производных флороглюцина, псевданов, монобактамов) может служить одним из хемотаксономических маркеров.

Наряду с синтезом антибиотиков и пигментов существует корреляция между таксономическим положением псевдомонад и образованием некоторых других вторичных метаболитов, а также способностью к разложению ряда органических соединений. Такова обнаруженная нами способность штаммов *X. maltophilia* к син-

тезу 1-ДОФА, локализация ферментов, гидролизующих эфиры холестерина, среди штаммов *P. mendocina*.

Эти особенности отдельных видов и подгрупп рода *Pseudomonas* могут быть использованы при направленном скрининге продуцентов биологически активных метаболитов. Так, например, активные продуценты убихинона  $Q_{10}$  целесообразно, по-видимому, искать среди видов IV, а экстрацеллюлярных альгинатов — I секции рода *Pseudomonas*, для которых названные свойства универсальны.

Сведения о биологических свойствах различных видов псевдомонад и данные геносистематики легли в основу предлагаемой нами схемы классификации микроорганизмов I секции рода *Pseudomonas*. Именно эта группа бактерий, включающая флюоресцирующие и родственные им нефлюоресцирующие виды, будет сохранена в составе рода при дальнейшем пересмотре таксономического положения многих его представителей. К числу общих особенностей бактерий этой группы следует отнести высокий удельный вес цитохрома *c* и отсюда — характерные цитохромные профили (исключение составляют фитопатогенные *P. syringae* и *P. viridiflava*, лишенные цитохрома *c*). Типично наличие убихинона  $Q_8$ , 3-оксидекановой и 3-оксидодекановой кислот в липополисахаридах, образование экстрацеллюлярных полисахаридов, относящихся к классу альгинатов.

Согласно предлагаемой нами схеме классификации, рассматриваемая группа микроорганизмов включает 22 вида. Несомненно, в дальнейшем при описании новых видов и более детальном изучении старых, описанных фрагментарно, список этот будет пополняться.

Некоторые из рассмотренных выше видов рода *Pseudomonas* приурочены к определенным климатическим зонам (*P. seracina*), другие распространены повсеместно от Крайнего Севера до зоны пустынь и полупустынь (*P. fluorescens*, *X. maltophilia*).

Значительная (более 30 %) часть исследованных штаммов происходит из ризосферы различных растений. Подавляющее большинство этих культур принадлежат к флюоресцирующей группе, где локализуются наиболее активные антагонисты (некоторые биовары *P. fluorescens*, *P. aurantiaca*, *P. aureofaciens* и др.). Не обладающие антибиотическими свойствами нефлюоресцирующие виды, как правило, происходят из иных ниш обитания, чем ризосфера растений. Однако показательно, что активные антагонисты, принадлежащие к видам *P. seracina*, *S. acidovorans* и *X. maltophilia*, также в основном ризосферного происхождения. При этом некоторые из них, по нашим данным, способны колонизировать корни пшеницы.

Перечисленные виды оказывают выраженное антагонистическое действие на многие группы гетеротрофной микрофлоры почвы, в том числе на фитопатогенные грибы. Антагонистический эффект связан с синтезом низкомолекулярных антибиотиков, а также образованием сидерофоров. Соединения этой группы, однако иной

химической природы, чем широко исследованные сидерофоры группы псевдобактина, найдены нами у штаммов *P. seracia*.

Использование бактерий-антагонистов из рода *Pseudomonas* в качестве средства биологической борьбы с грибными заболеваниями растений становится в последние годы все более актуальным, а знание химической природы и биологической роли веществ, обуславливающих фунгицидное действие, знаменует новый этап этих исследований, первые попытки которых были предприняты отечественными авторами более 50 лет тому назад.

Для борьбы с возбудителями бактериальных заболеваний растений могут быть использованы и псевдомонады — продуценты бактериоцинов, подобно тому как используются для этой цели штаммы *Agrobacterium* [142, 496]. Полученные нами данные позволяют предположить, что некоторые виды бактерий рода *Pseudomonas* могут препятствовать инвазии растений фитонематодами; природа этого эффекта требует специальных исследований.

Упомянутое выше направление является лишь одним из многих возможных путей использования псевдомонад в народном хозяйстве. Не менее важно изыскание среди них продуцентов новых антимикробных, противоопухолевых и противовирусных соединений, их применение для очистки окружающей среды от ксенобиотиков, вторичной добычи нефти и в других быстро развивающихся областях биотехнологии. Дальнейший прогресс в развитии этих направлений будет определяться прогрессом фундаментальных исследований в области биологии, систематики и экологии бактерий рода *Pseudomonas*.

## BACTERIA OF THE PSEUDOMONAS GENUS

V. V. Smirnov, E. A. Kiprianova

Kiev: Nauk. dumka.— 1990.— 264 c.

### SUMMARY

The monograph is devoted to bacteria of the *Pseudomonas* genus — heterotrophic microorganisms widely distributed in nature. They play an important role in biological cycle, destruction of different compounds, animal, human and plant pathology. The particular attention recently attracted to this group of bacteria is connected with synthesis by pseudomonads of new classes of biologically active substances: antibiotics — aminoglycosides and monobactams inhibiting the drug-resistant strains of pathogens and iron-transport systems — siderophores which protect the plants against the phytopathogenic fungi.

The monograph summarizes the data of literature and results of more than twenty years research carried out by authors in the field of systematics, identification and biologically active metabolites produced by pseudomonads. Creation of collection of *Pseudomonas* strains isolated from various sources and characterized for many properties was one of the necessary stages and at the same time the result of this work.

The monograph starts with a brief essay on the history of classification of pseudomonads. The following chapters elucidate the genosystematics contribution to the development of modern notions on the structure of the genus *Pseudomonas*, its place in microbial world system and the most important biological characteristics of microorganisms belonging to this enormous and heterogenous genus. Authors concentrate their attention mainly on taxonomically significant properties of bacteria: their morphological and cytological characteristics, the oxidase activity and its relation to the cytochrome system, the presence of a number of enzymes, the nutritional capacities, the total fatty acid composition, structure and composition of ubiquinones, lipopolysaccharides, exopolysaccharides. Tyrosinemonooxygenases and cholesterolesterases were also under study; as a result of these experiments the strain of *P. mendocina*, a producer of cholesterolesterase and the method of isolation of enzyme were proposed.

The data on sensitivity of pseudomonads to a wide set of antibiotics, dyes, ethylene-diamine tetraacetic acid and barium salts are presented. The possibilities of using these data for systematics, diagnostics and selective isolation of certain *Pseudomonas* species or groups of species from nature are analysed.

The role of numerical methods in systematics and identification of pseudomonads is elucidated with wide attraction of own authors experimental data. More than 300 strains of different *Pseudomonas* species studied for 120 phenotypical characteristics were grouped using methods of numerical taxonomy; properties useful for differentiation of the formed clusters were selected. The data of numerical analysis are also presented in the following chapters, where some

particular problems of the genus *Pseudomonas* systematics are discussed and certain species or groups of species are described.

The special attention is paid to antibiotic substances synthesized by bacteria of the *Pseudomonas* genus: aliphatic and aromatic compounds, various classes of heterocycles, peptides, tropolones, aminoglycosides, monocyclic  $\beta$ -lactamides. A relation between the taxonomic position of bacteria and the structure of produced biologically active metabolite is analysed. Authors have isolated from different species of *Pseudomonas* a number of antibiotics: various phenazine pigments, phloroglucinol derivatives (including new phloroglucide di-(2,4-diacetylphloroglucil) methane), aliphatic antibiotic AL-87 with unique selective activity against staphylococci and some other low molecular weight compounds with antimicrobial, antifungal and antiviral action.

Touching upon the bacteriocin-like substances of pseudomonads authors pay especial attention to bacteriocinogeny in *P. cepacia*. and present data on isolation and investigation of a new high molecular weight bacteriocin produced by the strain of this species.

Separate chapter is devoted to the use of *Pseudomonas* strains for the biological control of plant pathogens. The antifungal properties were studied in strains of more than 30 species of the genus, the influence of iron on the antifungal activity of bacteria was investigated. Data obtained in these experiments give evidence of synthesis of a new group of antibiotically active siderophores by *P. cepacia* strains.

The capacity of various *Pseudomonas* species strains to colonize wheat roots was studied and the results of wheat protection against fusariosis using strains with high antifungal and colonizing activity are given. Original methods were used to study the effect of fluorescent bacteria on phytohelminths.

The second part of monograph deals with the taxonomic structure and identification of bacteria of the *Pseudomonas* genus. Here are presented data on phenotypical peculiarities of different species, their habitats, procedures of isolation and identification, levels of their genetic relatedness determined by the method of DNA—DNA hybridization. The main attention is concentrated on the "true" members of the genus *Pseudomonas*—the fluorescent and non-fluorescent microorganisms of section I. The authors have essentially widened the list of species included in section I and suggested a key for their identification.

The last chapter contains a number of practical recommendations, descriptions of media and methods for isolation and diagnostics of pseudomonads.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айзенман Б. Е. Антибиотические свойства бактерий.— Киев: Наук. думка, 1973.— 183 с.
2. Андреев Л. В. Регуляция жирнокислотного состава бактерий и ее физиологическая целесообразность // Регуляция биохимических процессов у микроорганизмов: Материалы симп.— Пушино: Б. И., 1979.— С. 77—84.
3. Андреев Л. В., Склифас А. Н. Использование гидроокиси тетраметиламмония для определения общего жирнокислотного состава микроорганизмов // Изв. АН СССР.— 1979.— № 1.— С. 95—102.
4. Берестецкий О. А., Патыка В. Ф., Мочалов Ю. М., Граб Т. А. Изучение фитотоксических свойств *Pseudomonas putida* штамма 2181 // Физиолого-биохимические основы взаимодействия растений в фитocenозах.— Киев: Наук. думка, 1975.— Вып. 6.— С. 96—99.
5. Бириштехер Э. Нефтяная микробиология.— Л.: Гостоптехиздат, 1957.— 382 с.
6. Блинкова Л. П. Перспективы использования бактериоцинов для профилактики и терапии инфекций // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.— 1984.— № 5.— С. 10—14.
7. Блохина И. Н., Леванова Г. Ф. Геносистематика бактерий.— М.: Наука, 1976.— 150 с.
8. Бойко О. И., Колесова Э. А., Киприанова Е. А. и др. Флюоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas*, выделенные из различных эколого-географических зон СССР, и их антагонистические свойства // VI съезд Укр. микробиол. о-ва (Донецк, июнь, 1984 г.): Тез. докл.— Киев: Наук. думка, 1984.— С. 124—125.
9. Боронин А. М. Состояние и перспективы генетических исследований бактерий рода *Pseudomonas* // Генетика и физиология микроорганизмов — перспективных объектов генной инженерии.— Пушино, 1985.— С. 25—39.
10. Боронин А. М. Биология плазмид // Успехи микробиологии.— М.: Наука, 1983.— Т. 18.— С. 143—163.
11. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты.— М.: Мир, 1978.— 396 с.
12. Веремейченко С. Н. Коровые олигосахариды липополисахаридов *Pseudomonas fluorescens* // Микробиол. журн.— 1987.— 49, № 5.— С. 18—22.
13. Веремейченко С. Н. Изучение липополисахаридов бактерий группы *Pseudomonas fluorescens*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1988.— 22 с.
14. Воробьева Л. И. Микробиологический синтез витаминов.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1982.— 168 с.
15. Гарагуля А. Д. Антибиотическое действие почвенных бактерий на фитопатогенные грибы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1975.— 28 с.
16. Гарагуля А. Д., Бабич Л. В., Киприанова Е. А., Смирнов В. В. Способность различных видов бактерий рода *Pseudomonas* к колонизации корней пшеницы // Микробиол. журн.— 1988.— 50, № 6.— С. 77—81.
17. Деркач В. С., Гайдамака М. Г., Повелица Ф. Д. и др. Изучение антибиотических свойств пиоцианина // Тр. Укр. Ин-та эпидемиологии и микробиологии им. Мечникова.— 1946.— 10.— С. 55—76.
18. Деркач В. С. Саназин и его применение // Там же.— 1951.— 18.— С. 5—16.



19. Додатко Т. А., Киприанова Е. А., Смирнов В. В. Бактериоцинтипирование штаммов *P. serasia*, выделенных из клинических источников и ризосферы растений // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.— 1989.— № 1.— С. 21—26.
20. Елинов Н. П. Химия микробных полисахаридов.— Л.: Высш. шк., 1984.— С. 187—189.
21. Есипов С. Е., Аданин В. М., Баскунов Б. П. Новый антибиотически активный флороглюцид из *Pseudomonas aurantiaca* // Антибиотики.— 1975.— 20, № 12.— С. 1077—1081.
22. Захарова И. Я., Варбанец Л. Д. Углеродсодержащие биополимеры мембран бактерий.— Киев: Наук. думка, 1983.— 125 с.
23. Захарова И. Я., Танатар Н. В. Липополисахариды бактерий рода *Pseudomonas* // Микробиол. журн.— 1984.— 46, № 6.— С. 78—92.
24. Илюхин В. И. Псевдомонадные инфекции в патологии человека // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.— 1985.— № 2.— С. 110—114.
25. Касянчук Н. В. Липополисахариды некоторых видов бактерий рода *Pseudomonas*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1980.— 23 с.
26. Квасніков Є. І., Ісакова Д. М., Кіпріанова О. А. та ін. Бактерії роду *Pseudomonas*, що засвоюють етанол // Микробиол. журн.— 1974.— 36, № 6.— С. 683—685.
27. Квасніков Є. І., Айзенман Б. Е., Соломко Э. Ф. и др. Рост и образование антибиотиков бактериями рода *Pseudomonas* на средах с низкомолекулярными *n*-алканами // Микробиология.— 1975.— 44, № 1.— С. 55—60.
28. Квасніков Є. І., Тиньянова Н. А. Нафталіноокислючі бактерії — продуценти саліцилової кислоти // Микробиол. журн.— 1971.— 33, № 4.— С. 417—422.
29. Кіпріанова О. А., Корнюшенко О. Н. Вплив концентрації заліза в середовищі на синтез цитохромів *Pseudomonas fluorescens* // Там же.— 1969.— 31, № 5.— С. 530—532.
30. Киприанова Е. А., Рабинович А. С. Образование феназин-1-карбоновой кислоты *Pseudomonas fluorescens* // Микробиология.— 1969.— 38, № 2.— С. 224—227.
31. Киприанова Е. А., Рабинович А. С., Бойко О. И., Каминская Л. Ю. Высокоактивное антибиотическое вещество, выделенное из бактерий рода *Pseudomonas* // Антибиотики.— 1969.— 14, № 3.— С. 228—231.
32. Киприанова Е. А., Рабинович А. С., Каминская Л. Ю. Химическая и биологическая характеристика антибиотических веществ, образуемых *Pseudomonas aurantiaca* // Физиологически активные вещества.— 1971.— № 3.— С. 283—290.
33. Кіпріанова О. А., Бойко О. І., Рабінович А. С. та ін. *Pseudomonas fluorescens* nov. sp. і утворюваний ним фіолетовий антибіотично активний пігмент // Доп. АН УРСР.— 1972.— № 12.— С. 1104—1107.
34. Кіпріанов О. А., Айзенман Б. Ю., Бойко О. І. Деякі фізіологічні відміни сапрофітних і фітопатогенних флюоресціюючих бактерій роду *Pseudomonas* // Микробиол. журн.— 1972.— 34, № 3.— С. 275—277.
35. Кіпріанова О. А., Бойко О. І., Рубан В. І. Біологічні властивості нефлюоресціюючих бактерій роду *Pseudomonas* // Там же.— 1974.— 36, № 1.— С. 661—669.
36. Кіпріанова О. А., Бойко О. І., Рабінович А. С., Айзенман Б. Ю. Комплекс антибіотичних речовин, утворюваних *Pseudomonas species* // Там же.— 1974.— 36, № 6.— С. 781—783.
37. Киприанова Е. А., Ставскя С. С., Бойко О. И., Кривец И. А. Усвоение додецилсульфата натрия бактериями рода *Pseudomonas* // Микробиол. журн.— 1978.— 40, № 4.— С. 503—505.
38. Киприанова Е. А., Корнюшенко О. Н. Действие красителей и антибиотических веществ на бактерии рода *Pseudomonas* // Там же.— № 6.— С. 683—689.
39. Киприанова Е. А., Паничев А. В., Бойко О. И., Гарагуля А. Д. Нумерическая систематика бактерий рода *Pseudomonas* // Микробиология.— 1979.— 48, № 6.— С. 1023—1032.

40. Киприанова Е. А., Андреев Л. В., Бойко О. И. Исследование жирнокислотного состава различных видов бактерий рода *Pseudomonas* // Микробиол. журн.— 1980.— 42, № 1.— С. 11—16.
41. Киприанова Е. А., Корнюшенко О. Н., Бойко О. И., Колесова Э. А. Метод отбора микроорганизмов — продуцентов холестеролэстераз // Там же.— № 5.— С. 658—660.
42. Киприанова Е. А., Гарагуля А. Д., Леванова Г. Ф. и др. Штамм *Pseudomonas stutzeri*, неспособный к денитрификации // Там же.— 1983.— 45, № 2.— С. 88—90.
43. Киприанова Е. А., Леванова Г. Ф., Новова Е. В. и др. Таксономическое изучение *Pseudomonas aurantiaca* Nakhimovskaya 1948 и предложение не-отипового штамма этого вида // Микробиология.— 1985.— 54, № 3.— С. 434—440.
44. Киприанова Е. А., Гарагуля А. Д., Леванова Г. Ф. и др. Таксономическое изучение *Pseudomonas taetrolens* Haunes 1957 // Микробиол. журн.— 1987.— 49, № 6.— С. 8—12.
45. Киприанова Е. А., Гарагуля А. Д., Леванова Г. Ф., Барышева Н. Н. Таксономическое изучение *Pseudomonas fragi* // Микробиология.— 1988.— 57, № 1.— С. 119—125.
46. Книрель Ю. А. Липополисахариды грамотрицательных бактерий // Прогресс химии углеводов.— М.: Наука, 1985.— С. 54—76.
47. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А. и др. Антигенные полисахариды бактерий. II. Структура и спектр <sup>13</sup>C-ЯМР O-специфического полисахарида из *Pseudomonas ceracia* // Биоорг. химия.— 1980.— 6, № 12.— С. 1851—1859.
48. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Дашунин В. М. и др. Антигенные полисахариды бактерий. 15. Структура повторяющегося звена O-специфической полисахаридной цепи ЛПС *Pseudomonas wieringae* и некоторых патоваров *P. syringae* // Там же.— 1986.— 12, № 9.— С. 1253—1262.
49. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шашков А. С. и др. Антигенные полисахариды бактерий. 26. Строение O-специфического полисахарида цепей ЛПС *Pseudomonas cerasi* 467 и *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* штаммов 218 и P-55, относящихся к серогруппам II и III // Там же.— 1988.— 14, № 1.— С. 82—91.
50. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шашков А. С. и др. Антигенные полисахариды бактерий. 27. Строение O-специфических полисахаридных цепей ЛПС 120а и P. holci 8299, относящихся к серогруппе VI // Там же.— С. 92—99.
51. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Яковлева Л. М. и др. Антигенные полисахариды бактерий. 28. Структура O-специфической цепи ЛПС *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens* K-1025 и P. holci 90а (серогруппа 2) // Там же.— № 2.— С. 166—171.
52. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шашков А. С. и др. Антигенные полисахариды бактерий. 29. Структура полисахаридной цепи ЛПС *Pseudomonas* P. holci 8300 (серогруппа 1) // Там же.— С. 172—179.
53. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шашков А. С. и др. Антигенные полисахариды бактерий. 30. Структура полисахаридной цепи ЛПС *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 281 (серогруппа 1) // Там же.— С. 180—186.
54. Козловский А. Г. Алкалоиды микроорганизмов // Биохимия и физиология микроорганизмов.— Пушино, 1975.— С. 74—77.
55. Корнюшенко О. М. До методики вывращения взаимосвязи нематод с микроорганизмами грунта // Микробиол. журн.— 1972.— 34, № 4.— С. 528—530.
56. Корнюшенко О. М., Киприанова О. А. Влияние бактерий родов *Pseudomonas* и *Bacillus* на деякі фітогельмінти // Там же.— № 5.— С. 589—595.
57. Красильников Н. А. Определитель бактерий и актиномицетов.— М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1949.— 830 с.
58. Кудлай Д. Г., Лиходед В. Г. Бактериоциногенез.— Л.: Мир, 1966.— 203 с.
59. Леванова Г. Ф. Основные принципы геносистематики в приложении к решению практических задач таксономии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.— М., 1987.— 42 с.
60. Леванова Г. Ф. Опыт применения модифицированного метода определения нуклеотидного состава ДНК бактерий по температуре плавления // Сравни-

- тельная физиология микроорганизмов.— Горький, 1970.— С. 108—111.— (Уч. зап. Горьк. ун-та. Сер. Биология; Т. 110, № 1).
61. Леванова Г. Ф., Новова Е. В., Сорокина В. Н., Киприанова Е. А. Спектрофотометрический метод оценки молекулярной гибридизации ДНК — ДНК в применении к бактериям рода *Pseudomonas* // Биол. науки.— 1984.— № 8.— С. 23—26.
  62. Лисенкова Л. Л., Лозинов А. Б. Количественное изучение цитохромов хемосинтезирующих и гетеротрофных микроорганизмов // Изв. АН СССР. Сер. Биология.— 1966.— № 4.— С. 132—140.
  63. Мильченко К. П. Антивирусные свойства почвенных бактерий и веществ бактериального происхождения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1975.— 23 с.
  64. Мороз А. Ф., Петропавловская И. С., Осокина Т. И., Фролова В. В. Пиоцинтипирование штаммов *Pseudomonas aeruginosa* // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.— 1984.— № 1.— С. 31—35.
  65. Нахимовская М. И. Влияние бактерий на прорастание спор головни // Микробиология.— 1939.— 8, № 1.— С. 116—122.
  66. Нахимовская М. И. *Pseudomonas aurantiaca* nov. sp. // Там же.— 1948.— 17, № 1.— С. 58—65.
  67. Новогрудский Д. М. Антагонистические взаимоотношения у микробов и биологические методы борьбы с грибковыми заболеваниями культурных растений // Успехи соврем. биологии.— 1936.— 5, № 3.— С. 509—536.
  68. Паничев А. В. Алгоритмы сравнительного анализа микроорганизмов // Физиология и биохимия микроорганизмов.— 1974.— № 2.— С. 24—26.
  69. Петренко М. Б., Боровков А. В. Производные феназина из *Pseudomonas* sp. штамм 2/3 // Химия природ. соединений.— 1970.— № 6.— С. 779.
  70. Пиляшенко И. И., Есинов С. Е., Сабурова Л. А., Клюев Н. А. Антимикробные вещества, выделенные из *Pseudomonas putida* // Биосинтез вторичных метаболитов: Тез. докл. Всесоюз. конф.— Пушкино: 1987.— С. 84.
  71. Помогцева Н. В. Образование пиоцианина на средах с углеводородами // Микробиология.— 1965.— 34, № 3.— С. 473—476.
  72. Попова Ж. П., Эськин С. Б., Матисова А. Н. О составе антифунгина-сырца // Бюл. ВНИИ с.-х. микробиологии.— 1971.— 15, № 1.— С. 79—80.
  73. Пширков С. Ю., Бойко О. И., Киприанова Е. А., Старовойтов И. И. Трансформация *l*-тирозина в *l*-диоксифенилаланин культурами *Pseudomonas* // Микробиология.— 1982.— 51, № 2.— С. 272—274.
  74. Редди Т. К., Боровков А. В. Моно-, ди- и триацетилфлороглюцины из *Pseudomonas fluorescens* // Химия природ. соединений.— 1969.— № 2.— С. 133.
  75. Рожавин М. А. Биологические свойства меланинообразующих штаммов *Pseudomonas aeruginosa*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1982.— 26 с.
  76. Рожавин М. А., Бугаева Е. И. Селективные среды для выделения синегнойной палочки // Антибиотики и мед. биотехнология.— 1986.— 31, № 11.— С. 822—825.
  77. Рубан Е. Л. Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas*.— М.: Наука, 1986.— 198 с.
  78. Сиволодский Е. П. Тест идентификации бактерий рода *Pseudomonas* // Лаб. дело.— 1988.— № 11.— С. 64—66.
  79. Смирнов В. В., Корнюшенко О. Н., Бойко О. И. и др. Способность бактерий рода *Pseudomonas* к гидролизу эфиров холестерина // Микробиол. журн.— 1980.— 42, № 5.— С. 566—570.
  80. Смирнов В. В., Гарагуля А. Д., Киприанова Е. А. Антибиотические свойства *Pseudomonas serasia* // Антибиотики.— 1982.— 27, № 8.— С. 577—580.
  81. Смирнов В. В., Киприанова Е. А. Бактерии рода *Pseudomonas* — продуценты новых антибиотиков // Механизмы биосинтеза антибиотиков.— М.: Наука, 1986.— С. 149—160.
  82. Смирнов В. В., Чуркина Л. Н., Машковский Н. Н., Гарагуля А. Д. Действие антибиотика АЛ-87 на включение меченых предшественников нуклеиновых кислот и белка в клетки *Staphylococcus aureus* // Микробиол. журн.— 1984.— 46, № 1.— С. 88—90.
  83. Смирнов В. В., Киприанова Е. А., Бойко О. И. и др. Экология и физиоло-

- гия штаммов *Pseudomonas cepacia* // Там же.— 1988.— 50, № 5.— С. 49—56.
84. Смирнов В. В., Васюренко З. П., Чуркина Л. Н. Липиды // Стафилококк / Под ред. В. В. Смирнова, А. Е. Вершигоры.— Киев: Наук. думка, 1988.— С. 54—59.
  85. Солдаткина М. А. Иммунохимическое исследование липополисахаридов *Pseudomonas cepacia*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1989.— 19 с.
  86. Трутко С. М., Гарагуля А. Д., Киприанова Е. А., Акименко В. К. Физиологическая роль фенольных пигментов, синтезируемых бактериями *Pseudomonas aureofaciens* // Биохимия.— 1989.— 54, № 8.— С. 1329—1336.
  87. Трутко С. М., Гарагуля А. Д., Киприанова Е. А., Акименко В. К. Физиологическая роль пиоцианина, синтезируемого *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология.— 1988.— 57, № 6.— С. 957—964.
  88. Тюрин М. В., Шуб Г. М. Метод выделения *Pseudomonas maltophilia* из клинического материала // Лаб. дело.— 1986.— № 12.— С. 748—751.
  89. Умаров М. М. Ассоциативная азотфиксация.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1986.— 133 с.
  90. Федиров В. Ф. Биохимия убихинонов // Успехи соврем. биологии.— 1976.— 82, № 4.— С. 3—17.
  91. Худяков Я. П. Литическое действие почвенных бактерий на паразитные грибы // Микробиология.— 1935.— 4, № 2.— С. 193—198.
  92. Худяков Я. П., Шкляр М. С., Савадеров Е. П. Антибиотик антифунгин, образуемый бактериями рода *Pseudomonas* // Прикл. биохимия и микробиология.— 1965.— 1, № 2.— С. 186—190.
  93. Шелякин М. М., Хохлов А. С., Колесов М. Н. и др. Химия антибиотиков.— М.: Изд. АН СССР, 1961.— 1550 с.
  94. Экспериментальная микробиология / Под ред. С. Бырдарова.— София: Медицина и физкультура, 1965.— С. 368.
  95. А. с. № 966115 СССР, МКИ. Штамм *Pseudomonas mendocina* 3121 продуцент холестеролэстеразы / В. В. Смирнов, О. Н. Корнюшенко, О. И. Бойко и др.— Опул. 15.10.82, Бюл. № 38.
  96. А. с. № 1395671 СССР, МКИ. Способ получения холестеролэстеразы / Л. Ю. Мярцинкавичене, И. В. Бахматова, Г. Р. Браженас и др.— Опул. 15.05.88, Бюл. № 18.
  97. Ajsaka M., Kariyone K., Jomon K. et al. Production of Pyrrolnitrin analogues by fermentation // Progress in antimicrobial and anticancer chemotherapy: Proc. 6th Intern. conf. chemotherapy.— Baltimore: Univ. park press, 1970.— Vol. 1.— P. 77—79.
  98. Ambler P., Wynn M. The amino acid sequences of cytochromes *c*-551 from three species of *Pseudomonas* // Biochem. J.— 1973.— 131, N 3.— P. 485—498.
  99. Andrewes A., Hertzberg S., Liaen-Jensen S., Starr M. P. Xanthomonas pigments. 2. The Xanthomonas "carotenoids"—non-carotenoid brominated arylpoyene esters // Acta chem. scand. B.— 1973.— 27, N 7.— P. 2383—2395.
  100. Arima K., Imanaka H., Konsaka M. et al. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas* // Agr. and Biol. Chem.— 1964.— 28, N 8.— P. 575—582.
  101. Arnow L. E. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydro-phenylalanine-tyrosine mixtures // J. Biol. Chem.— 1937.— 118, N 3.— P. 531—537.
  102. Arrighi F., Bergendahl J., Mandel M. Isolation and characterization of DNA from fixed cells and tissues // Exp. Cell. Res.— 1968.— 50, N 1.— P. 47—53.
  103. Asanuma Sh., Tanaka H., Yatazawa M. *Pseudomonas cepacia*—a characteristic rhizoplane microorganism in rice plant // Soil Sci. and Plant Nutr.— 1980.— 26, N 1.— P. 71—78.
  104. Asensio C., Perez-Diaz J. C., Martinez M. C. et al. A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1976.— 69, N 1.— P. 7—14.
  105. Asselineau J. The Bacterial lipids.— Paris: Hermann, 1966.— 112 p.
  106. Auling G., Dittbrenner M., Maarzahl M. et al. Deoxyribonucleic acid relationships among hydrogen-oxidizing strains of the genera *Pseudomonas*, *Alcaligenes* and *Paracoccus* // Int. J. Syst. Bacteriol.— 1980.— 30, N 1.— P. 123—128.

107. *Azegami K., Nishiyama K. Watanabe Y. et al.* *Pseudomonas plantarii* sp. nov., the causal agent of rice seedlings blight // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1987.—37, N 2.—P. 144—152.
108. *Ballard R., Doudoroff M., Stainer R. et al.* Taxonomy of aerobic pseudomonads: *P. diminuta* and *P. veziculare* // *J. Gen. Microbiol.*—1968.—53, N 3.—P. 349—361.
109. *Barraquio W., Padre B., Watanabe I. et al.* Nitrogen fixation by *Pseudomonas saccharophila* Doudoroff ATCC 15946 // *Ibid.*—1986.—132, N 2.—P. 237—241.
110. *Barrett E., Solanes R., Tang J., Palleroni N.* *Pseudomonas fluorescens* biovar V, its resolution into distinct component groups and the relationship of these groups to other *P. fluorescens* biovars, to *P. putida* and to Psychrotrophic Pseudomonads associated with Food Spoilage // *Ibid.*, N 10.—P. 2709—2721.
111. *Baumann L., Baumann P.* Studies of relationship among terrestrial Pseudomonas, Alcaligenes and Enterobacteria by an immunological comparison of glutamine synthetase // *Arch. Microbiol.*—1978.—119, N 1.—P. 25—30.
112. *Baumann P., Bowditch R., Baumann L., Beaman B.* Taxonomy of marine *Pseudomonas* species: *P. stanieri* sp. nov., *P. perfectomarina* sp. nov. nom. rev., *P. nautica* and *P. doudoroffii* // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1983.—33, N 4.—P. 957—965.
113. *Bawden K., Broadbent J., Ross W.* Some simple anthelmintics // *Brit. J. Pharmacol. and Chemother.*—1965.—24, N 3.—P. 714—724.
114. *Behrens U., Ringspiel M.* Microbielle polysaccharide.—Berlin: Akad. Verl., 1964.—210 S.
115. *Bergan T.* Human and animal pathogenic members of the genus *Pseudomonas* // *The Procaroyotes.*—Berlin etc.: Springer Verl. 1981.—P. 666—700.
116. *Bergey D., Harrison F., Breed R. et al.* *Bergey's manual of determinative bacteriology.*—Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1923.—442 p.
117. *Bergström S., Theorell H., Davide H.* On a metabolic product of *Pseudomonas pyocyanea*, pyolipic acid, active against *Mycobacterium tuberculosis* // *Ark. kemi, miner. och. geol. A.*—1947.—23, N 13.—P. 1—15.
118. *Bogan R.* Biochemical degradation products—a new demention in stream pollution // *Sew. Ind. Wast.*—1958.—30, N 2.—P. 208—214.
119. *Bookbinder M., Bloom J., Lukeric F.* Interactions among selected endoparasitic nematodes and 3 pseudomonas on alfalfa // *J. Nematol.*—1982.—14, N 1.—P. 105—109.
120. *Bowen G., Rovira A.* Microbial colonization of plant roots // *Annu. Rev. Phytopathol.*—1976.—14.—P. 121—144.
121. *Box S. J., Brown A. G., Gillis M. L. et al.* MM 42842, a new member of the monobactam family produced by *Pseudomonas cocovenenans*. II. Production, isolation and properties of MM 42842 // *J. Antibiot.*—1988.—41, N 1.—P. 20—24.
122. *Bradley D.* Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins // *Bacteriol. Revs.*—1967.—31, N 4.—P. 230—234.
123. *Bradley D. A.* Function of *Pseudomonas aeruginosa* polar pili: twitching motility // *Can. J. Microbiol.*—1980.—26, N 1.—P. 146—154.
124. *Breed K., Murray E., Smith N.* *Bergey's manual of determinative bacteriology.*—Baltimore, 1957.—1094 p.
125. *Brooks J., Weaver R., Tatum H. et al.* Differentiation between *Pseudomonas testosteronei* and *P. acidovorans* by Gas chromatography // *Can. J. Microbiol.*—1972.—18, N 9.—P. 1477—1482.
126. *Buchanan T., Pearce W.* Pathogenic aspects of outer membrane components of Gram-negative bacteria // *Bacterial outer membranes, biogenesis and function.*—New York: Wiley and Sons, 1979.—P. 475—514.
127. *Burbage D., Sasser M.* A medium selective for *Pseudomonas cepacia* // *Phytopathology.*—1982.—72, N 6.—P. 706—710.
128. *Burdon K.* Fatty material in Bacteria and Fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations // *J. Bacteriol.*—1946.—52, N 6.—P. 665—668.
129. *Burkholder W.* Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs // *Phytopathology.*—1950.—40, N 1.—P. 115—117.

130. *Burkholder P., Pfister R., Leitz F.* Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium // *Appl. Microbiol.*—1966.—14, N 4.—P. 649—653.
131. *Burr T., Schroth M., Suslow T.* Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida* // *Phytopathology.*—1978.—68, N 9.—P. 1377—1383.
132. *Buyer J., Wright J., Leong J.* Structure of pseudobactin A 214, a siderophore from a bean-deleterious *Pseudomonas* // *Biochemistry.*—1986.—25, N 19.—P. 5492—5499.
133. *Byng G., Turner J.* Phenazine biosynthesis by a pseudomonad // *Biochem. Soc. Trans.*—1975.—3.—P. 742—744.
134. *Byng G., Whitaker R., Cherna et al.* Variable enzymological patterning in tyrosine biosynthesis as a means of determining natural relatedness among the Pseudomonadaceae // *J. Bacteriol.*—1980.—144, N 1.—P. 247—257.
135. *Casewell M., Hill R.* Mupirocin (pseudomonic acid) — a promising new topical antimicrobial agent // *J. Antimicrob. Chemother.*—1987.—19, N 1.—P. 1—5.
136. *Chacon D., Sancho A., Solvas J. et al.* Possibility of using purified pyocins for typing *Pseudomonas aeruginosa*: purification of pyocins and sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* in different tests // *Ann. Inst. Pasteur. Microbiol. A.*—1986.—137.—P. 253—266.
137. *Chain E., Mellows G.* Pseudomonic Acid. Part 1. The Structure of Pseudomonic acid A, a novel antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens* // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. Part 1.*—1977.—N 3.—P. 294—308.
138. *Chain E., Mellows G.* Pseudomonic Acid. Part 3. Structure of Pseudomonic Acid B // *Ibid.*—P. 318—322.
139. *Champion A., Barrett E., Palleroni N. et al.* Evolution in *Pseudomonas fluorescens* // *J. Gen. Microbiol.*—1980.—120, N 2.—P. 485—511.
140. *Chan Yiu-Kwok.* Denitrification by a diazotrophic *Pseudomonas* species // *Can. J. Microbiol.*—1985.—31, N 12.—P. 1136—1141.
141. *Chan Yiu-Kwok, Wheatcroft R., Watson R.* Physiological and Genetic characterization of a diazotrophic pseudomonad // *J. Gen. Microbiol.*—1986.—132, N 8.—P. 2277—2285.
142. *Chen W., Echandi E., Spurr H. W.* Protection of tobacco plants from bacterial wilt with avirulent bacteriocin-producing strains of *Pseudomonas solanacearum* // *Proc. 5th Intern. conf. plant pathogen. bacteria.*—Kansas City: Colombia Univ. Missouri press, 1981.—P. 216.
143. *Clarke P. H.* Biochemical and immunological comparison of aliphatic amidases produced by *pseudomonas* species // *J. Gen. Microbiol.*—1972.—71, N 2.—P. 241.
144. *Clayton J. P., O'Hanlon P. J., Rogers N. H., King T. J.* Chemistry of pseudomonic acid. 5. Structure and chemistry of pseudomonic acid. C. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*—1982.—10/12.—P. 2827—2834.
145. *Collins C. H.* *Microbiological methods.*—London: Butterworths, 1964.—P. 94—188.
146. *Colwell R., Citarella R. V., Ryman I.* Deoxyribonucleic acid base composition and adansonial analysis of heterotrophic aerobic pseudomonads // *J. Bacteriol.*—90, N 4.—P. 1165—1965.
147. *Colwell R., Liston J.* Taxonomic analysis with the electronic computer of some *Xanthomonas* and *Pseudomonas* species // *Ibid.*—1961.—82, N 6.—P. 913—919.
148. *Colyer P. D., Mount M. S.* Bacterization of potatoes with *Pseudomonas putida* and its influence on postharvest soft rot diseases // *Plant Dis.*—1984.—68, N 3.—P. 703—706.
149. *Cook J.* Biological control of plant pathogens: Theory to application // *Phytopathology*, 1985.—75, N 1.—P. 25—29.
150. *Cook R. J., Weller D. M.* Management of take-all in consecutive crops of wheat or barley // *Innovative approaches to plant disease control.*—New York, J. Wiley & sons inc., 1987.—P. 41—76.
151. *Cowan S. T., Steel K. J.* *Manual for the identification of medical bacteria.*—Cambridge: Univ. press, 1965.—218 p.

152. Cox C. D., Parker J. Use of 2-aminoacetophenone production of *Pseudomonas aeruginosa* // J. Clin. Microbiol.—1979.—9, N 4.—P. 479—484.
153. Cox C. D., Rinehard K. L., Moore M. L., Cook J. C. Pyochelin: Novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78, N 7.—P. 4256—4260.
154. Cullen J., Phillips M. C., Shipley G. G. The Effect of Temperature on the composition and physical properties of the lipids of *Pseudomonas fluorescens* // Biochem. J.—1971.—125, N 3.—P. 733.
155. Cuppels D. A., Hanson R. S., Kelman A. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by *Pseudomonas solanacearum* // J. Gen. Microbiol.—1978.—109, N 2.—P. 295—303.
156. Daves G. D., Robins R. K., Cheng C. C. Synthesis of 1,6-Dimethyl-5,7-dioxo-1,5,6,7-tetrahydropyrimido [5,4-e]-as-triazine (toxoflavin) and related compounds // J. Amer. Chem. Soc.—1962.—84, N 9.—P. 1724—1729.
157. Debette J., Blondeau R. Characterization de bacteries telluriques assimilables à *Pseudomonas maltophilia* // Can. J. Microbiol.—1977.—23, N 9.—P. 1123—1127.
158. Dees S. B., Moss C. W., Weaver R. E., Hollis D. Cellular fatty acid composition of *Pseudomonas paucimobilis* and groups 11k-2, Ve-1 and Ve-2 // J. Clin. Microbiol.—1979.—10, N 2.—P. 206—209.
159. Delafield F. P., Doudoroff M., Palleroni N. et al. Decomposition of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by Pseudomonads // J. Bacteriol.—1965.—90, N 5.—P. 1455.
160. De Ley J. DNA-base composition and hydridization in the taxonomy of phytopathogenic bacteria // Ann. Rev. Phytopathol.—1968.—6.—P. 63—90.
161. De Ley J., Friedman S. Similarity of *Xanthomonas* and *Pseudomonas* deoxyribonucleic acid // J. Bacteriol.—1965.—89.—P. 1306—1309.
162. Denhardt D. T. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1966.—23, N 3.—P. 641—646.
163. De Smedt J., Bauwends M., Tytgat R., De Ley J. Intra- and intergeneric similarities of ribosomal ribonucleic acid cistrons of free-living, nitrogen-fixing bacteria // Int. J. Syst. Bacteriol.—1980.—30, N 1.—P. 106—122.
164. De Vos P. Intragenetic and intergeneric similarities of ribosomal RNA cistrons of the Genus *Pseudomonas* and the implications for taxonomy // Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. and Serol.—1980.—46, N 1.—P. 96.
165. De Vos P., De Ley J. Intra- and intergeneric similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons // Int. J. Syst. Bacteriol.—1983.—33, N 3.—P. 487—509.
166. De Vos P., Kersters K., Falsen F. et al. *Comamonas* Davis and Park 1962 gen. nov., nom. rev. emend., and *Comamonas terrigena* Hugh 1962 sp. nov. nom. rev. // Ibid.—N 4.—P. 443—453.
167. De Vos P., Van Landschoot A., Segers P. et al. Genotypic Relationships and Taxonomic Localization of Unclassified *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-like Strains // Ibid.—1989.—39, N 1.—P. 35—49.
168. Di Fabio J., Perry M. B., Bundle D. R. Analysis of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas maltophilia* 555 // Biochem. and Cell Biol.—1987.—65.—P. 968—977.
169. Dooren de Jong L. E. Bijdrage tot de Kennis van het mineralisatieproces.—Rotterdam: Nijgt, van Ditmar, 1926.
170. Doudoroff M., Contopoulou R., Kunisawa K., Palleroni N. I. Taxonomic validity of *Pseudomonas* denitrificans (Christensen) Bergey et al. request for an opinion // Int. J. Syst. Bacteriol.—1974.—24, N 2.—P. 294.
171. Doudoroff M., Palleroni N. J. Genus *Pseudomonas* Migula 1894 // Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.—8th ed.—Baltimore: Williams and Wilkins Co, 1974.—P. 217—243.
172. Drewry D. T., Lomax Y. A., Gray G. W., Wilkinson S. G. Studies of lipid A fractions from the lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas alcaligenes* // Biochem. J.—1973.—133, N 3.—P. 563—572.
173. Egawa Y., Unimo K. et al. Antibiotic Yc73 of *Pseudomonas* origin. I. Production, isolation and properties // J. Antibiot. Int. J.—1970.—23, N 6.—P. 894—899.

174. *Esanu J. G., Schubert R. H.* Zur Taxonomie und Nomenklatur von *Pseudomonas cepacia* // Zbl. Bacteriol., Parasitenk., Infektionskrankh. und Hyg.—1973.—224.—S. 478—483.
175. *Farkas-Himsley H.* Bacteriocins are the broad-spectrum antibiotics // J. Antimicrob. and Chemother.—1980.—6, N 4.—P. 424—427.
176. *Feline T. C., Jones R. B., Mellous G., Phillips L.* Pseudomonic acid. Part 2. Biosynthesis of Pseudomonic acid A, a novel antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens* // J. Chem. Soc. Perkin Trans. Pt I.—1977.—N 3.—P. 294—308.
177. *Festl H., Ludwig W., Schleifer K. H.* DNA hybridization probe for the *Pseudomonas fluorescens* group // Appl. and Environ. Microbiol.—1986.—52, N 5.—P. 1190—1194.
178. *Fett W. F., Osman S. F., Fishman M. L., Siebles T. S.* Alginate production by plant-pathogenic *Pseudomonads* // Ibid.—N 3.—P. 466—473.
179. *Finnerty W. R., Singer M. E.* Microbial enhancement of oil recovery // Biotechnology.—1983.—1, N 1.—P. 47—54.
180. *Forsyth W. G., Hayward A. C., Roberts J. B.* Occurrence of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in aerobic gram-negative bacteria // Nature.—1958.—182, N 4638.—P. 800.
181. *Fothergill J. C., Guest J. R.* Catabolism of *l*-Lysine by *Pseudomonas aeruginosa* // J. Gen. Microbiol.—1977.—99, N 1.—P. 139—155.
182. *Friedman R., Mac Lowry J.* Computer identification of bacteria on the basis of their antibiotic susceptibility patterns // Appl. Microbiol.—1973.—26, N 3.—P. 314—317.
183. *Fuchs A.* Synthesis of levan by pseudomonads // Nature.—1956.—178, N 4539.—P. 921—922.
184. *Fuerst J. A., Hayward A.* Surface appendages similar to fimbriae (pili) von *Pseudomonas* species // J. Gen. Microbiol.—1969.—58, N 2.—P. 227—237.
185. *Fuller A. T., Mellows G., Walfröd M. et al.* Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens* // Nature.—1971.—234, N 5329.—P. 416.
186. *Fung D. Y., Miller R. R.* Effect of dyes on bacterial growth // Appl. Microbiol.—1973.—25, N 5.—P. 793—798.
187. *Galarneault T., Leifson E.* *Pseudomonas vesiculare* (Busing et al.) comp. nov. // Int. Bull. Bact. Nomencl. Taxon.—1964.—14, N 1.—P. 165.
188. *Gandhi N. M., Nazareth J., Divecar P. V. et al.* Magnesium, a novel magnesium-containing antibiotic // J. Antibiot.—1973.—26, N 12.—P. 797—798.
189. *Gandhi N. M., Patell J. R., Gandhi J. et al.* Prodigiosin metabolites of a marine *Pseudomonas* species // Marine Biol.—1976.—34, N 3.—P. 223—227.
190. *Genetics and biochemistry of Pseudomonas* / Eds P. H. Clarke, M. H. Richmond.—Chichester: J. Wiley and sons, 1975.—366 p.
191. *Gilardi G.* Cultural and biochemical aspects for identification of glucose-nonfermenting Gram-negative rods // Nonfermentative Gram-negative rods.—New York; Basel: Marcel Dekker Inc.—1985.—Vol. 16.—P. 17—84.
192. *Gillies R., Govan J.* Typing of *Pseudomonas pyocyanea* by pyocine production // J. Pathol. Bacteriol.—1966.—91, N 2.—P. 339—345.
193. *Gillis M., De Ley J.* Intra- and intergeneric similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter* // Int. J. Syst. Bacteriol.—1980.—30, N 1.—P. 7—27.
194. *Girolami R. L., Stamm J. M.* Inhibitory effect of light on growth-supporting properties of eosin methylene blue agar // Appl. and Environ. Microbiol.—1976.—31, N 1.—P. 141—142.
195. *Gonzales C. F., De Vay J. E., Wakeman R. J.* Syringotoxin: a phytotoxin unique to citrus isolates of *Pseudomonas syringae* // Physiol. Plant Pathol.—1981.—18, N 1.—P. 41—50.
196. *Gonzalez C. F., Vidaver A. K.* Bacteriocin, plasmid and peptolytic diversity in *Pseudomonas cepacia* of clinical and plant origin // J. Gen. Microbiol.—1979.—110, N 1.—P. 161—170.
197. *Gordee R. S., Matthews T. R.* Evaluation of the in vitro and in vivo antifungal activity of pyrrolnitrin // Antimicrobial agents and Chemotherapy.—1967.—P. 379.



198. *Gordee R., Matthews F.* Systemic antifungal activity of pyrrolnitrin // *Appl. Microbiol.*—1969.—17, N 5.—P. 690—694.
199. *Gorman M., Lively D. H.* Pynolnitrin: new mode of tryptophan metabolism // *Antibiotics.*—1967.—2.—P. 433—438.
200. *Goto M.* *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* subsp. nov., the causal agent of bacterial leaf blight of konjac (*Amorphophalus konjac* Koch.) // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1983.—33, N 3.—P. 539—545.
201. *Gould W. D., Hagedorn C., Bardinelli T. R., Zabrotowicz R. M.* New selective media for enumeration and recovery of fluorescens *Pseudomonads* from various habitats // *Appl. and Environ. Microbiol.*—1985.—49, N 1.—P. 28—32.
202. *Govan J. R.* Studies on the pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*: Morphology and mode of action of contractive pyocins // *J. Gen. Microbiol.*—1974.—80, N 1.—P. 1—15.
203. *Govan J. R. W., Fyfe J. A. M., Jarman T. R.* Isolation of alginateproducing mutants of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina* // *Ibid.*—1981.—125, N 1.—P. 217—220.
204. *Govan G. R. W., Harris G.* Typing of *Pseudomonas cepacia* by bacteriocin susceptibility and production // *J. Clin. Microbiol.*—1985.—22, N 4.—P. 490—494.
205. *Gräf W., Bickel H.* Antibiotische Eigenschaften und Toxizität des Wirkstoffes aus *Pseudomonas fluorescens* // *Arch. Hyg. und Bacteriol.*—1961.—145, N 1.—S. 21.
206. *Graham D. Y., Yoshimura H. H., Estes M. K.* DNA hybridization studies of the association of *Pseudomonas maltophilia* with inflammatory bowel diseases // *J. Lab. and Clin. Med.*—1983.—101, N 6.—P. 940—954.
207. *Grant M. A., Holt J. G.* Medium for the selective isolation of members of the genus *Pseudomonas* from natural habitats // *Appl. and Environ. Microbiol.*—1977.—33, N 5.—P. 1222—1224.
208. *Gray P. A., Stewart D. J.* Numerical taxonomy of some marine pseumonads and alteromonads // *J. Appl. Bacteriol.*—1980.—49, N 2.—P. 375—383.
209. *Gray G. W., Wilkinson S. G.* The action of ethylenediaminetetraacetic acid on cell walls of some gram-negative bacteria // *J. Gen. Microbiol.*—1965.—39, N 3.—P. 385—399.
210. *Gregory W. J., McNabb P. C.* *Pseudomonas cepacia* // *Infec. Contr.*—1986.—7, N 5.—P. 281—284.
211. *Gross D. C.* Evidence that syringomycin, produced by *Pseudomonas syringae*, is a ferric siderophore // *Phytopathology.*—1982.—72, N 7.—P. 941.
212. *Gross D. C., De Vay J. E., Stadtman F. H.* Chemical properties of syringomycin and syringotoxin: toxigenic peptides produced by *Pseudomonas syringae* // *J. Appl. Bacteriol.*—1977.—43, N 3.—P. 453—463.
213. *Ha D. M., Komagata K.* Electrophoretic comparison of enzymes in the strains in biovars of *Pseudomonas maltophilia* // *J. Gen. Appl. Microbiol.*—1984.—30, N 4.—P. 277—287.
214. *Haag W., Vidaver A.* Purification and characterization of syringacin 4-A, a bacteriocin from *Pseudomonas syringae* 4-A // *Antimicrob. Agents and Chemotherapy.*—1974.—6, N 1.—P. 76—83.
215. *Hacking A. J., Taylor I. W., Jarman T. R. et al.* Alginate Biosynthesis by *Pseudomonas mendocina* // *J. Gen. Microbiol.*—1983.—129, N 11.—P. 3473—3480.
216. *Hagedorn C., Gould W. D., Bardinelli T. R., Gustavson D. R.* A Selective medium for enumeration and recovery of *Pseudomonas cepacia* biotypes from soil // *Appl. and Environ. Microbiol.*—1987.—53, N 9.—P. 2265—2268.
217. *Hamon Y.* Contribution a l'etude des pyocines // *Ann. Inst. Pasteur.*—1956.—91, N 1.—P. 82.
218. *Hamon Y., Veron M., Péron Y.* Contribution a l'etude des propriétés lysogènes et bacteriocinogènes dans le genre *Pseudomonas* // *Ibid.*—101, N 5.—P. 738—753.—1961.
219. *Hashimoto M., Hattori K.* Isopyrrolnitrin: a metabolite from *Pseudomonas* // *Bull. Chem. Soc. Jap.*—1966.—39.—P. 410.

220. *Hashimoto M, Hattori K.* Oxypyrrrolnitrin: a metabolite of *Pseudomonas* // Chem. and Pharm. Bull.—1966.—14.—P. 1314.
221. *Hashimoto M., Hattori K.* A new metabolite from *Pseudomonas pyrrolnitrica* // *Ibid.*—1968.—16, N 6.—P. 1144.
222. *Hashimoto Y., Takasawa S., Ogasa T. et al.* Enzymatic synthesis of optically pure 1-carbacephem compounds // Ann. N. Y. Acad. Sci.—1986.—434.—P. 206—209.
223. *Haynes W. C.* *Pseudomonas aeruginosa*—its characterization and identification // J. Gen. Microbiol.—1951.—5, N 6.—P. 939.
224. *Haynes W. C., Stodola F. H., Locke J. M. et al.* *Pseudomonas aureofaciens* Kluver and phenazine- $\alpha$ -carboxylic acid, its characteristic pigment // J. Bacteriol.—1956.—72, N 3.—P. 412—417.
225. *Hays E. E., Wells I. C., Katzman P. A. et al.* Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa* // J. Biol. Chem.—1945.—159, N 3.—P. 725.
226. *Hayward A. C.* Characteristics of *Pseudomonas solanacearum* // J. Appl. Bacteriol.—1964.—27.—P. 265.
227. *Heidt A., Monteil H., Richard C.* O and H serotyping of *Pseudomonas cepacia* // J. Clin. Microbiol.—1983.—18, N 3.—P. 738—740.
228. *Herbert R. B., Holliman F. G.* Aeruginosin B—a naturally occurring phenazinsulphonic acid // Proc. Chem. Soc.—1964.—N 1.—P. 19.
229. *Higashihara T., Sato A.* Microbial formation of *l*-phenazine-carboxylic acid from hydrocarbons // Agr. and Biol. Chem.—1969.—33, N 12.—P. 1802—1804.
230. *Higashihara T., Sato A.* Production of *l*-phenazinecarboxylic acid from ethanol by a hydrocarbon-assimilating bacterium *Pseudomonas aeruginosa* // Rep. Ferment. Res. Inst.—1985.—N 63.—P. 80—92.
231. *Hill L. R., Silevstri L. G.* Quantitative methods in the systematics of Actinomycetales, III. The taxonomic significance of physiological-biochemical characters and the construction of a diagnostic key // G. microbiol.—1962.—10, N 1.—P. 1—28.
232. *Hiramoto M., Okada K., Nagai S., Kawamoto H.* The structure of viscosin, a peptide antibiotic. I. Syntheses of *D*- and *L*-3-hydroxyacyl-*l*-leucine hydrazides related to viscosin // Chem. and Pharm. Bull.—1971.—19, N 7.—P. 1308—1314.
233. *Hisatsuca K., Nakahara T., Sano N., Yamada K.* Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation // Agr. and Biol. Chem.—1971.—35.—P. 686—692.
234. *Hoffman H. P., Geftic S. C., Heymann H., Adair F. W.* Mesosomes in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol.—1973.—114, N 2.—P. 434—438.
235. *Hofstad G. A., Marung J. D., Verjans G. M., Weisbeek P. J.* Iron, siderophores and plant disease // Proc. NATO Adv. res. workshop, Wye, July 1—5, 1985.—New York; London, 1986.—P. 71—75.
236. *Holliman F. G.* Some bacterial pigments-phenazines // South Afr. Ind. Chem.—1961.—15.—P. 233.
237. *Holmes B., Lapage S. P., Easterling B. G.* Distribution in clinical material and identification of *Pseudomonas maltophilia* // J. Clin. Pathol.—1979.—32.—P. 66—72.
238. *Holmes B., Owen R. J., Evans A., Willcox W. R.* *Pseudomonas paucimobilis*, a new species isolated from human clinical specimens—the hospital environment and other sources // Int. J. Syst. Bacteriol.—1977.—27, N 2.—P. 133.
239. *Holmes B. B., Pinning C. A., Dawson C. S.* A probability matrix for the identification of gram-negative aerobic non-fermentative bacteria that grow on nutrient agar // J. Gen. Microbiol.—1986.—132, N 7.—P. 1827—1842.
240. *Holloway B. W., Morgan A. F.* Genome organisation in *Pseudomonas* // Ann. Rev. Microbiol.—1986.—40.—P. 79—105.
241. *Howell C. R., Stipanovic R. D.* Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with an antibiotic produced by the bacterium // Phytopathology.—1979.—69, N 5.—P. 480—482.
242. *Howell C. R., Stipanovic R. D.* Suppression of pythium ultimum-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin // *Ibid.*—1980.—70, N 8.—P. 712—715.

243. *Howie W. J., Cook R. J., Weller D. M.* Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent *Pseudomonas* suppressive to take-all // *Ibid.*—1987.—77, N 2.—P. 286—296.
244. *Hugh R., Leifson E.* The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria // *J. Bacteriol.*—1953.—66, N 1.—P. 24—25.
245. *Hugh R., Ryschenkow E.* *Pseudomonas maltophilia*, an alcaligenes-like species // *J. Gen. Microbiol.*—1961.—26, N 1.—P. 123—132.
246. *Hughes J., Mellows G.* On the mode of action of pseudomonic acid: inhibition of protein synthesis in *Staphylococcus aureus* // *J. Antibiot.*—1978.—31, N 3.—P. 330—335.
247. *Iizuka H., Komagata K.* An attempt at grouping of the genus *Pseudomonas* // *J. Gen. and Appl. Microbiol.*—1963.—9, N 1.—P. 73—82.
248. *Iizuka H., Komagata K., Kawamura T. et al.* Nematocidal action of microorganisms // *Agr. and Biol. Chem.*—1962.—26, N 3.—P. 199.
249. *Ikari P., Hugh R.* *Pseudomonas alcaligenes monias* (1928) a polar monotrichos dextrose non-oxidizer // *Bacteriol. Proc.*—1962.—70.
250. *Ikawa M.* Bacterial phosphatides and natural relationships // *Bacteriol. Revs.*—1967.—31, N 1.—P. 54—64.
251. *Iheda Y., Idemoto H., Hirayama F. et al.* Safracins, new antitumor antibiotics // *J. Antibiot. Int. J.*—1983.—36, N 10.—P. 1279—1294.
252. *Ikemoto S., Kuraishi H., Komagata K. et al.* Cellular fatty acid composition in *Pseudomonas* species // *J. Gen. and Appl. Microbiol.*—1978.—24, N 4.—P. 199—213.
253. *Ikemoto S., Suzuki K., Kaneko T., Komagata K.* Characterization of strains of *Pseudomonas maltophilia* with do not require methionine // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1980.—30, N 2.—P. 437—447.
254. *Imada A., Kitano K., Kintaka K. et al.* Sulfazecin and isosulfazecin, novel  $\beta$ -lactam antibiotics of bacterial origin // *Nature.*—1981.—289, N 5798.—P. 590—591.
255. *Imanaka H., Mananobu K., Tamura G., Arima K.* Studies on pyrrolnitrin, a new antibiotic. II. Taxonomic studies on pyrrolnitrin producing strain // *J. Antibiot. Int. J. A.*—1965.—18, N 2.—P. 205—206.
256. *Imanaka H., Mananobu K., Tamura G., Arima K.* Studies on pyrrolnitrin, a new antibiotic. III. Structure of pyrrolnitrin // *Ibid.*—P. 207.
257. *Israel A. M.* Recent data on the molecular biology of bacteriocins // *Arch. Roum. exp. microbiol.*—1984.—43, N 1.—P. 5—30.
258. *Itoh S., Honda H., Tomita F., Suzuki T.* Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on *n*-paraffin (mixture of  $C_{12}$ ,  $C_{13}$  and  $C_{14}$  fractions) // *J. Antibiot. Int. J.*—1971.—24, N 12.—P. 855—859.
259. *Itoh S., Inusuka K., Suzuki T.* New antibiotics produced by bacteria grown on *n*-paraffin (mixture of  $C_{12}$ ,  $C_{13}$  and  $C_{14}$  fractions) // *Ibid.*—1970.—23, N 11.—P. 542—545.
260. *Jacob F.* Biosynthese induit et mode d'action d'une pyocine antibiotique de *Pseudomonas pyocyanea* // *Ann. Inst. Pasteur.*—1954.—86.—P. 149—160.
261. *Jacobs M. J., Bugbee W. M., Gabrielson D. A.* Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots // *Can. J. Bot.*—1985.—63, N 7.—P. 1262—1265.
262. *James A. T., Martin A. J.* Gas-Liquid chromatography: the separation and identification of the methyl esters of saturated and unsaturated acids from formic acid to *n*-octadecanoic acid // *Biochem. J.*—1956.—63, N 1.—P. 144.
263. *Janda J. M., Bottone E. J.* Pathogenic profiles of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* // *Nonfermentative gram-negative rods. Ser. Microbiol.*—1985.—6.—P. 233—254.
264. *Jenkins Ch. L., Andrewes A. G., McQuade Th. J., Starr M. P.* The pigment of *Pseudomonas paucimobilis* is a carotenoid (nostoxanthin), rather than a brominated aryl-polyene (xanthomonadin) // *Curr. Microbiol.*—1979.—3, N 1.—P. 1—4.
265. *Jenkins Ch. L., Starr M. P.* The brominated aryl-polyene (xanthomonadin) pigments of *Xanthomonas juglandis* protect against photobiological damage // *Ibid.*—1982.—7, N 5.—P. 323—326.

266. *Jenkins Ch. L., Starr M. P.* Formation of halogenated aryl-polyene (xanthomonadin) pigments by the type and other yellow-pigmented strain of *Xanthomonas maltophilia* // *Ann. Inst. Pasteur. Microbiol. B.*—1985.—136, N 3.—P. 257—264.
267. *Jessen O.* *Pseudomonas aeruginosa* and other green fluorescent pseudomonads.—Munksgaard, Copenhagen, 1965.—240 p.
268. *Jonsson V.* Proposal of a new species *Pseudomonas kingii* // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1970.—20, N 3.—P. 255—257.
269. *Johnson J. L.* Use of Nucleic Acid Homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria // *Ibid.*—1973.—23, N 4.—P. 308—315.
270. *Jones L. F., Zakanycz G. P., Thomas E. T., Farmer J. J.* Pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa*: a simplified method // *Appl. Microbiol.*—1974.—27, N 2.—P. 400—406.
271. *Juffs H. S.* Identification of *Pseudomonas* spp. isolated from milk produced in south eastern Queensland // *J. Appl. Bacteriol.*—1973.—36, N 4.—P. 585—598.
272. *Kageyama M.* Genetic mapping of pyocin R<sub>1</sub> factor in *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Gen. and Appl. Microbiol.*—1974.—20, N 5.—P. 269—275.
273. *Kageyama M., Inagaki A.* Genetic mapping of pyocin R<sub>3</sub> factor in *Pseudomonas aeruginosa* // *Ibid.*—1974.—20, N 5.—P. 257—267.
274. *Kanagawa T., Kelly D. P.* Degradation of demethyl sulphide by *Thiobacillus thioparus* // *Rep. Ferment. Res. Inst.*—1986.—66, N 1.—P. 37—45.
275. *Kanner D., Gerber N., Bartha R.* Pattern of phenazine pigment production by a strain of *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Bacteriol.*—1978.—134, N 2.—P. 690.
276. *Kasai N., Arata S., Mashimo I. et al.* *Pseudomonas diminuta* LPS with a new endotoxic lipid A structure // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1987.—142.—P. 972—978.
277. *Katoh K., Suzuki T.* Microflora of manured soils // *Bull. Natl. Inst. Agric. Sci. Ser. B.*—1979.—30, N 1.—P. 73—135.
278. *Katznelson H., Henderson V. E.* Studies on the relationship between nematodes and other soil microorganisms. I. The Influence of actinomycetes and fungi on rhabditis oxyerca de man // *Can. J. Microbiol.*—1962.—8, N 6.—P. 875—882.
279. *Katznelson H., Henderson V. E.* Studies on the relationship between nematodes and other soil microorganisms. II. Interactions of aphelenchoides parietinus with actinomycetes, bacteria and fungi // *Ibid.*—1964.—10, N 1.—P. 37—41.
280. *Kawai Y., Moribayashi A.* Taxonomic implications of the lipid composition of *Pseudomonas pertucinogena* // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1978.—28, N 3.—P. 394—400.
281. *Kawamoto S. O., Lorbeer J. W.* Protection of onion seedlings from *Fusarium oxysporum* F. sp. cepae by seed and soil infestation with *Pseudomonas cepacia* // *Plant Disease Reporter.*—1976.—60, N 3.—P. 189—191.
282. *Key B. A., Gray G. W., Wilkinson S. G.* The purification and chemical composition of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas alcaligenes* // *Biochem. J.*—1970.—120, N 3.—P. 559—566.
283. *King A., Holmes B., Phillips J., Lapage S.* A taxonomic study of clinical isolated of *Pseudomonas pickettii*, *P. thomasi* and "Group IVd" bacteria // *J. Gen. Microbiol.*—1979.—114, N 1.—P. 137—147.
284. *King E. O., Ward M. K., Raney D. E.* Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein // *J. Lab. Clin. Med.*—1954.—44.—P. 301—307.
285. *Kintaka K., Haibara K., Asai M., Imada A.* Isosulfazecin, a new  $\beta$ -lactam antibiotic of pseudomonad // *J. Antibiot.*—1981.—34, N 9.—P. 1081—1090.
286. *Kintaka K., Kitano K., Nosaki Y. et al.* Sulfazecin, a novel  $\beta$ -lactam antibiotic of bacterial origin. Discovery, fermentation and biological characterization // *J. Ferment. Technol.*—1981.—59, N 4.—P. 263—268.
287. *Kintaka K., Ono H., Tsubotani Sh. et al.* Thiotropocin, a new sulfur-containing 7-membered-ring antibiotic produced by a *Pseudomonas* sp. // *J. Antibiot.*—1984.—37, N 11.—P. 1294—1301.

288. *Kitahara T., Kanda N.* DB-2073, a new alkylresorcinol antibiotic. II. The chemical structure of DB-2073 // *Ibid.*—1975.—28, N 12.—P. 943—946.
289. *Kitamura S., Hashizuma K.* Studies of lipoxygenase inhibitors. II. KF 8940 (2-*n*-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide), a potent and selective inhibitor of 5-lipoxygenase, produced by *Pseudomonas methanica* // *Ibid.*—1986.—39, N 8.—P. 1160—1167.
290. *Kloepper J. W., Schroth M. N.* *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils // *Phytopathology.*—1981.—71, N 2.—P. 232.
291. *Kloepper J. W., Schroth M. N.* Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions // *Ibid.*—71, N 6.—P. 642—644.
292. *Kloepper J. W., Schroth M. N.* Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growth-promoting Rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora // *Ibid.*—N 10.—P. 1020—1024.
293. *Kluyver A. J.* *Pseudomonas aureofaciens* nov. spec. and its pigments // *J. Bacteriol.*—1956.—72, N 3.—P. 406—411.
294. *Knight M., Hartman Ph., Hartman Z., Young V.* A new method of preparation of pyocyanin and demonstration of an unusual bacterial sensitivity // *An. Biochem.*—1979.—95, N 1.—P. 19—23.
295. *Kodama K., Kimura N., Komagata K.* Two new species of *Pseudomonas*: *P. oryzae* isolated from rice paddy and clinical specimens and *P. luteola* isolated from clinical specimens // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1985.—35, N 4.—P. 467—474.
296. *Komagata K., Yabuuchi E., Tamagawa Y., Ohya A.* *Pseudomonas melanogena* Iizuka and Komagata 1963, a later subjective synonym of *Pseudomonas maltophilia* Hugh and Ryschenkow 1960 // *Ibid.*—1974.—24, N 2.—P. 242—247.
297. *Kondo S., Horuichi Y., Hamada M. et al.* A new antitumor antibiotic bacterobolin produced by *Pseudomonas* // *J. Antibiot.*—1979.—32, N 12.—P. 1069—1071.
298. *Konisky J.* Colicins and other bacteriocins with established modes of action // *Ann. Rev. Microbiol.*—1982.—36.—P. 125—144.
299. *Korth H.* *Pseudomonas fluorescens* var. *pseudoidiodinum* // *Zbl. Bakteriol., Parasitenk. Infektionskrankh und Hyg. I. Abt. Orig. A.*—1970.—215, N 4.—S. 461—465.
300. *Korth H.* Einfluß von Eisen und Sauerstoff auf die Pigmentbildung bei verschiedenen *Pseudomonas*-spezies // *Arch. Microbiol.*—1971.—77, N 1.—S. 59—64.
301. *Korth H., Budzikiewicz H., Pulverer G.* Isolation of an antibacterial active tropolone from a *Pseudomonas cepacia* strain // *Zbl. Bacteriol.*—1982.—Abt. 1A.—252, N 1.—P. 83—86.
302. *Korth H., Romer A., Budzikiewicz H., Pulverer G.* 4,9-Dihydroxyphenazine-1,6-dicarboxylic acid dimethylester and the "missing link" in phenazine biosynthesis // *J. Gen. Microbiol.*—1978.—104, N 2.—P. 290—303.
303. *Kováč N.* Identification of *P. pyocyanea* by the oxidase reaction // *Nature.*—1956.—178.—P. 703.
304. *Kurane R., Suzuki T., Takahara Y., Komagata K.* // *Agr. and Biol. Chem.*—1977.—41.—P. 1031.
305. *Kuroda K., Kageyama M.* Comparative study on F-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Biochem.*—1981.—89, N 6.—P. 1721—1736.
306. *Lacoste A., Labeyrie S., Neuzil E.* Production des aeruginosines par les souches pyocyaninogènes de *Pseudomonas aeruginosa* // *Bull. Soc. pharm. Bordeaux.*—1971.—110, N 4.—P. 177.
307. *Lafferty R. M., Braunegg G., Korneti L. et al.* Poly-D-(3)-hydroxybutyric acid (poly-HB): biotechnological production and polymer applications // *Biotechnol. Lett.*—1984.—6, N 12.—P. 825.
308. *Lee J. V., Gibson D. M., Shewan J. M.* A numerical taxonomic study of some *Pseudomonas*-like marine bacteria // *J. Gen. Microbiol.*—1977.—98, N 2.—P. 439—451.
309. *Lee C. W., Yada R. Y., Skure B. J.* Electron microscopic investigation of *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 on intact and sarcoplasm-depleted bovine

- longissimus dorsi muscle at 21° // *J. Food Sci.*—1983.—48, N 2.—P. 475—478.
310. *Leifson E.* Staining, shape and arrangement of bacterial flagella // *J. Bacteriol.*—1951.—62, N 4.—P. 377—390.
  311. *Leisinger T., Margraff R.* Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads // *Microbiol. Rev.*—1979.—43, N 3.—P. 422—442.
  312. *Devine M., Anderson D.* Two new species of bacteria causing mustiness in eggs // *J. Bacteriol.*—1932.—23, N 4.—P. 337—347.
  313. *Ljshitz R., Kloepper J. W., Scher F. M.* Nitrogen-Fixing pseudomonads isolated from roots of plants grown in the canadian high arctic // *Appl. and Environ. Microbiol.*—1986.—51, N 2.—P. 251—255.
  314. *Lightbown J. W.* An antagonist of streptomycin and dihydrostreptomycin produced by *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Gen. Microbiol.*—1954.—11, N 3.—P. 477—492.
  315. *Lindberg G. D., Larkin J. M.* Production of tropolone by a *Pseudomonas* // *J. Nat. Proc.*—1980.—43, N 4.—P. 592—594.
  316. *Lindner H. J., Schaden G.* Pyrazolo-[4,3-e]-as-triazin, ein neues heterocyclisches system aus *Pseudomonas fluorescens* var. *pseudoiodinum* // *Chem. Ber.*—1972.—105, N 6.—P. 1949—1955.
  317. *Liston J., Wiebe W., Colwell R.* Quantitative Approach to the Study of Bacterial Species // *J. Bacteriol.*—1963.—85, N 5.—P. 1061—1070.
  318. *Lively D., Gorman M., Mabe M.* Metabolism of tryptophans by *Pseudomonas aureofaciens*. I. Biosynthesis of pyrrolnitrin // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*—Philadelphia, 1966.—P. 462—469.
  319. *Lorenzo V., Aguilar A.* Antibiotics from gram-negative bacteria: do they play a role in microbial ecology? // *Trends Biochem. Sci.*—1984.—9, N 6.—P. 266—269.
  320. *Lovell F. M.* The structure of a bromine-rich marine antibiotic // *J. Amer. Chem. Soc.*—1966.—88.—P. 4510.
  321. *Lüderitz O., Freudenberg M. A., Galanos C. et al.* Lipopolysaccharides of gram-negative bacteria // *Membrane lipids of procaryotes* / Ed. S. Razin, S. Rottem. New York: Acad. press, 1982.—Vol. 17.—P. 79—151.
  322. *Lumsden R. D., Fraiss G., Caraa E. K., Dunn M. T.* Biocontrol of *Pythium aphanidermatum* on cucumber by microbial isolates from mexican soils // *Phytopathology.*—1982.—72.—P. 1010.
  323. *Lymbach G. W., Cox H. C., Berens W.* Elucidation of the chemical structure of bongkreki acid. I. Isolation, purification and properties of bongkreki acid // *Tetrahedron.*—1970.—26.—P. 5993—5999.
  324. *Lysenko O.* *Pseudomonas*—an attempt at a general classification // *J. Gen. Microbiol.*—1961.—25, N 3.—P. 379—408.
  325. *MacDiarmid J. A., Burrell D. H.* Characterization of *Pseudomonas maltophilia* isolated from fleece rot // *Appl. and Environ. Microbiol.*—1986.—51, N 2.—P. 346—348.
  326. *MacDonald J. C.* *Pyocyanine. Antibiotics. Vol. 2. Biosynthesis.*—London ; New York : Springer Verl., 1967.—P. 52—65.
  327. *Maino A. L., Schroth M. N., Palleroni N. J.* Degradation of xylan by bacterial plant pathogens // *Phytopathology.*—1974.—64.—P. 881—885.
  328. *Mandel M.* Deoxyribonucleic acid base composition in the genus *Pseudomonas* // *J. Gen. Microbiol.*—1966.—43, N 3.—P. 273—292.
  329. *Mann S.* Über melaninbildende Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* // *Arch. Microbiol.*—1969.—65, N 4.—P. 359—379.
  330. *Mann S.* Taxonomic studies of tryptophan breakdown in *Pseudomonas aeruginosa* // *Spisy Prirodoved fak. Univ. Brne.*—1970.—N 1/6.—P. 27—35.
  331. *Mann S.* Zur Identifizierung und Redoxfunktion der Pigment von *Pseudomonas aureofaciens* und *P. iodina* // *Arch. Mikrobiol.*—1970.—71, N 4.—P. 304.
  332. *Marcus P., Talalay P.* Induction and purification of  $\alpha$ - and  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases // *J. Biol. Chem.*—1956.—218, N 2.—P. 661—674.
  333. *Markowitz A., Klun H. P., Fischer E. H.* Purification, crystallization and properties of the alpha-amylase of *Pseudomonas saccharophila* // *Biochim. biophys. acta.*—1956.—19.—P. 267—273.
  334. *Martinez-Molina E., Olivares J.* Antibiotic production by *Pseudomonas repti-*

- livora as a phage conversion // *Can. J. Microbiol.*—1979.—25, N 9.—P. 1108.
335. *Mattewa P.* Bacteriocin activity in *Pseudomonas morsprunorum* and *P. syringae* // *John Innes Institute 55th annual report.*—1964.—P. 35—36.
  336. *Mayer H., Weckesser J.* "Unusual" Lipid A'S: structures, taxonomical relevance and potential value for endotoxin research // *Handbook of Endotoxin. Chemistry of Endotoxin* / Ed. E. T. Rietschel.—Amsterdam: Elsevier sci. publ., 1984.—P. 221—247.
  337. *Meadow P. M.* Wall and membrane structures on the genus *Pseudomonas* // *Genetics and biochemistry of Pseudomonas* / Ed. R. Clarke.—London; New York: John Wiley and sons, 1975.—P. 67—98.
  338. *Mercado T. J., Strickler M. P., Rice K. C., Ferrans V. J.* Purification of antitrypanosomal factor from *Pseudomonas fluorescens* by high-pressure liquid chromatography // *Curr. Microbiol.*—1988.—16, N 4.—P. 179—183.
  339. *Merrikin D., Fery C.* Use of pyocin 78-C2 u in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* in mice // *Appl. Microbiol.*—1972.—23, N 1.—P. 164—165.
  340. *Meschede W.* *Pseudomonas aeruginosa* // *Med. Welt.*—1986.—37, N 41.—P. 1269—1272.
  341. *Mew T. W., Rosales A. M.* Bacterization of rice plant for control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani* // *Phytopathology.*—1986.—76, N 11.—P. 1260—1264.
  342. *Meyer J. M., Abdallah M. A.* The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties // *J. Gen. Microbiol.*—1978.—107, N 2.—P. 319—328.
  343. *Meyer J., Abdallah M.* The siderochromes of non-fluorescent pseudomonads: production of nocardamine by *Pseudomonas stutzeri* // *Ibid.*—1980.—118, N 1.—P. 125—129.
  344. *Meyer J. M., Hornsperger J. M.* Role of pyoverdine, the ironbinding fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in iron transport // *Ibid.*—1978.—107, N 2.—P. 329—331.
  345. *Meyer D. J., Jones C. W.* Distribution of cytochromes in bacteria: Relationship to general physiology // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1973.—23, N 4.—P. 459—467.
  346. *Migula W.* Shizomycetes // *Engler and Prante. Naturlichen pflanzenfamilien*, 1895.—P. 29.
  347. *Migula W.* *System der Bacterien.*—Jena: G. Fischer.—1900.—Vol. 2.—876 p.
  348. *Misaghi I. J., Stowell L. J., Grogan R. G., Spearman L. C.* Fungistatic activity of water-soluble fluorescent pigments of fluorescent *Pseudomonads* // *Phytopathology.*—1982.—72, N 1.—P. 33—36.
  349. *Miyajima K., Tanii A., Akita T.* *Pseudomonas fuscovaginae* sp. nov. nom. rev. // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1983.—33, N 3.—P. 656—657.
  350. *Moeller V.* Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dehydrolase system // *Acta pathol. et microbiol. scand.*—1955.—36, N 1.—P. 158—172.
  351. *Molin G., Ternstrom A.* Numeric taxonomy of psychrotrophic pseudomonads // *J. Gen. Microbiol.*—1982.—128, N 6.—P. 1249—1264.
  352. *Molin G., Ternstrom A., Ursing J.* *Pseudomonas lundensis*, a new bacterial species isolated from meat // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1986.—36, N 2.—P. 339—342.
  353. *Moline H. E., Johnson K. S., Anderson J. D.* Use of tow-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis soft rotting bacteria // *Phytopathology.*—1981.—71, N 7.—P. 769.
  354. *Moore L. W.* *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of Crown gall.—*Ann. Rev. Phytopathol.*—1979.—17.—P. 163—179.
  355. *Moreno C., Hale Ch., Iuangi L.* The mitogenic immunogenic and tolerogenic properties of dextran and levan. Lack of correlation according to differences of molecular structure and size // *Immunology.*—1977.—33, N 2.—P. 261—267.
  356. *Morihara K., Tsuzuki H., Oka T. et al.* *Pseudomonas aeruginosa* elastase. Isolation, crystallization and preliminary characterization // *J. Biol. Chem.*—1965.—240, N 8.—P. 3295—3304.

357. *Morris M., Roberts J.* A group of pseudomonads able to synthesize poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid // *Nature*.—1959.—183, N 4674.—P. 1538.
358. *Morse S. A., Vanghan P., Johnson D., Iglevski B. H.* Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by a bacteriocin from *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob. Agents and Chemother.*—1976.—10, N 2.—P. 354—362.
359. *Moss C. W., Dees S. B.* Cellular fatty acids and metabolic products of *Pseudomonas* species obtained from clinical specimens // *J. Clin. Microbiol.*—1976.—N 4.—P. 492—502.
360. *Moss C. W., Kaltenbach C. M.* Production of glutaric acid useful criterion for differentiating *Pseudomonas diminuta* and *P. vesicularis* // *App. Microbiol.*—1974.—27, N 2.—P. 437—439.
361. *Moss C. W., Samuels S. B.* Short-chain acids of *Pseudomonas* species encountered in clinical specimens // *Ibid.*—N 3.—P. 570—574.
362. *Moss C., Samuels S. B., Liddle J., McKinney R. M.* Occurrence of branched-chain hydroxy-fatty acids in *Pseudomonas maltophilia* // *J. Bacteriol.*—1973.—114, N 3.—P. 1018.
363. *Moss C. W., Samuels S. B., Weaver R. E.* Cellular fatty acid composition of selected *Pseudomonas* species // *Appl. Microbiol.*—1972.—24, N 4.—P. 596—598.
364. *Moustafa F. A., Whittenbury.* A Comparison of some phytopathogenic and nonphytopathogenic pseudomonads // *Phytopathol. Z.*—1970.—67, N 1.—P. 63.
365. *Munoz J., Scherago M., Weaver R. H.* A serological study of members of the *Pseudomonas* genus // *J. Bacteriol.*—1949.—57, N 3.—P. 269—278.
366. *Murayama A., Hato K., Tamura S.* Fragin, a new biologically active metabolite of a *Pseudomonas*. I. Isolation, characterization and biological activities // *Agr. and Biol. Chem.*—1969.—33, N 11.—P. 1599—1605.
367. *Murayama A., Tamura S.* Über Fragin, ein neues biologisch aktives Stoffwechselprodukt von *Pseudomonas fragi*. II. Mitteilung. Zur Struktur und Chemie des Fragins // *Ibid.*—1970.—34, N 3.—P. 122—128.
368. *Mutharia L. M., Crockford G., Bogard W. C., Hancock R. E. W.* Monoclonal antibodies specific for *Escherichia coli* J-5 lipopolysaccharide: crossreaction with other gram-negative bacterial species // *Infect. Immun.*—1984.—45, N 5.—P. 631—636.
369. *Mutharia L. M., Hancock R. E.* Monoclonal antibody for an Outer membrane lipoprotein of the *Pseudomonas fluorescens* group of the family *Pseudomonadaceae* // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1985.—35, N 4.—P. 530—532.
370. *Mutharia L. M., Hancock R. E.* Characterization of two surface-localized antigenic sites on porin protein F of *Pseudomonas aeruginosa* // *Can. J. Microbiol.*—1985.—31, N 4.—P. 381—386.
371. *Nagai T.* Association of *Pseudomonas maltophilia* with malignant lesions // *J. Clin. Microbiol.*—1984.—20, N 5.—P. 1003—1005.
372. *Nakajima K., Muraga K., Hancock R. E.* Comparison of fatty acid, protein and serological properties distinguishing outer membranes of *Pseudomonas anguilliseptica* strains from those of fish pathogen and other pseudomonads // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1983.—33, N 1.—P. 1—8.
373. *Nakamura Y., Hyodo S., Chonan E. et al.* Serological classification of *Pseudomonas cepacia* by somatic antigen // *J. Clin. Microbiol.*—1986.—24, N 1.—P. 152—154.
374. *Nara K., Katamoto K., Suzuki S., Mizura E.* The aminoglycoside antibiotic from *Pseudomonas fluorescens*. III. Absolute configuration of P-2563 (P) (Sorbistin A<sub>1</sub>) and P-2563 (A) (Sorbistin B) // *Chem. and Pharm. Bull.*—1978.—26, N 4.—P. 1091—1099.
375. *Neilands J. B., Leong S. A.* Siderophores in relation to plant growth and disease // *Ann. Rev. Plant Physiol.*—1986.—37.—P. 187—208.
376. *Neilands J. B., Valenta J. R.* Iron-containing antibiotics.—*Met. J. Biol. Syst.*—1985.—19.—P. 313—333.
377. *Neu H. C.* Ecology, clinical significance and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* // *Nonfermentative gram-negative rods*, 1985.—P. 117—159.



378. Niemelä S. I., Hopkins J. W., Quardling C. Selecting an economical binary test battery for a set of microbial cultures // *Can. J. Microbiol.*—1968.—14, N 3.—P. 271—279.
379. Oberhofer T. R. Rapid identification of glucose-nonfermenting gram-negative rods with commercial miniaturized kits // *Nonfermentative gram-negative rods*, 1985.—P. 85—117.
380. Ogata K., Minami K., Tani Y. Образование 1-феназинкарбоновой кислоты и оксихлорофарина из углеводов под влиянием микроорганизмов. Хакко когаку дзасси / *J. Ferment. Technol.* 1971.—49, № 11.—P. 925—934. Цит. по РЖ биохимии.—1972.—№ 9.—p. 9Ф 756.
381. Ohmori T., Hagiwara S., Ueda A. et al. Production of pyoluteorin and its derivatives from *n*-paraffin by *Pseudomonas aeruginosa* S 10B2 // *Agr. and Biol. Chem.*—1978.—42, N 11.—P. 2030—2036.
382. Okumoto T., Kawana M., Nakamura I. et al. Activity of safracins A and B, heterocyclic quinone antibiotics on experimental tumors in mice // *J. Antibiot.*—1985.—38, N 6.—P. 767—771.
383. Olsen C. J., Lane D. J., Giovannoni J. et al. Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach // *Ann. Rev. Microbiol.*—1986.—40.—P. 337—365.
384. Olson E. S., Richards S. H. The structure of the Orange Pigment from *Pseudomonas aureofaciens* // *J. Org. Chem.*—1967.—32, N 9.—P. 2887.
385. Owen R. J., Jackman P. J. H. The Similarities between *Pseudomonas paucimobilis* and allied bacteria derived from analysis of deoxyribonucleic acids and electrophoretic protein patterns // *J. Gen. Microbiol.*—1982.—128, N 12.—P. 2945—2954.
386. Owen R. J., Legros R. M., Lapage S. P. Base composition, size and sequence similarities of genome deoxyribonucleic acids from clinical isolates of *Pseudomonas putrefaciens* // *Ibid.*—1978.—104.—P. 127—138.
387. Oyaizu H., Komagata K. Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid composition and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids // *J. Gen. and Appl. Microbiol.*—1983.—29, N 1.—P. 17—40.
388. Page W. J., Sadoff H. L. Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii* // *J. Bacteriol.*—1975.—122, N 1.—P. 145—149.
389. Palleroni N. J. General properties and taxonomy of the genus *Pseudomonas* // *Genetics and biochemistry of Pseudomonas*.—London; New York: Wiley and sons.—1975.—P. 1—37.
390. Palleroni N. J. The *Pseudomonas* group.—Bushey: Meadowfield press Ltd, 1978.—80 p.
391. Palleroni N. J. Genus *Pseudomonas* Migula 1894 // *Bergey's manual of systematic bacteriology* / Ed. R. Noel, Krieg J. G. Holf.—Baltimore; London: Williams Wilkins.—1984.—Vol. 1.—P. 141—198.
392. Palleroni N., Ballard R., Ralston E., Doudoroff M. Deoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species // *J. Bacteriol.*—1972.—110, N 1.—P. 1—11.
393. Palleroni N., Doudoroff M. Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum* // *Ibid.*—1971.—107, N 3.—P. 690.
394. Palleroni N. J., Doudoroff M., Stanier R. Y. et al. Taxonomy of the aerobic pseudomonads: the properties of the *Pseudomonas stutzeri* group // *J. Gen. Microbiol.*—1970.—60, N 2.—P. 215—231.
395. Palleroni N. J., Holmes B. *Pseudomonas cepacia* sp. nov., rev. // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1981.—31, N 4.—P. 479—481.
396. Palleroni N., Kunisawa R., Contopoulou R., Doudoroff M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas* // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1973.—23, N 4.—P. 333—339.
397. Parker N. L., Rathum M. L., Seiner V. et al. Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia* // *J. Antibiot.*—1984.—37, N 5.—P. 431—440.

398. *Parkinson M.* Bio-surfactants // *Biotechnol. Adv.*—1985.—3, N 1.—P. 65—83.
399. *Paterson A. C.* Bacteriocinogeny and Lysogeny in the genus *Pseudomonas* // *J. Gen. Microbiol.*—1965.—39, N 3.—P. 295—303.
400. *Paton A. M.* Pectin-decomposing strains of *Pseudomonas* // *Nature.*—1958.—181, N 4601.—P. 62.
401. *Pecknold P. C., Grogan R. G.* Deoxyribonucleic acid homology groups among phytopathogenic *Pseudomonas* species // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1973.—23, N 2.—P. 111—121.
402. *Peladan F., Turlot J. C., Monteil H.* Discriminant analysis of volatile fatty acids produced in culture medium, a novel approach to the identification of *Pseudomonas* species // *J. Gen. Microbiol.*—1984.—130, N 12.—P. 3175—3182.
403. *Philson S. B., Llinas M.* Siderochromes from *Pseudomonas fluorescens*. I. Isolation and characterization // *J. Biol. Chem.*—1982.—257, N 14.—P. 8081—8085.
404. *Pickett M. J., Greenwood J. R.* *Pseudomonas alkaligenes* and *Pseudomonas testosteroni*: Characterization and Identification // *Curr. Microbiol.*—1986.—13, N 4.—P. 197—201.
405. *Prevot A. R.* Traité de systématique bactérienne.—Paris: Dunod, 1961.—Vol. 2.—P. 41—191.
406. *Puskey D. J., Norris J. R., Gutteridge C. S.* Discrimination of microorganisms using direct probe mass spectrometry // *J. Gen. Microbiol.*—1980.—118, N 2.—P. 535—538.
407. *Pugashetti B. K., Metzger H. M., Vadas L., Feingold D. C.* Phenotypic differences among clinically isolated mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains // *J. Clin. Microbiol.*—1982.—16, N 5.—P. 686—691.
408. *Quardling C., Colwell R.* The use of numerical methods in characterizing unknown isolates // *Develop. Ind. Microbiol.*—1964.—5.—P. 151—161.
409. *Queener S. F., Gunsalus I. C.* Anthranilate synthetase enzyme system and complementation in *Pseudomonas* Species // *Proc. Nat. Acad. Sci.*—1970.—67, N 3.—P. 1225—1232.
410. *Ralston E., Palleroni N., Doudoroff M.* Deoxyribonucleic acid homologies of some so called "Hydrogenomonas" species // *J. Bacteriol.*—1972.—109, N 1.—P. 465.
411. *Ralston-Barrett E., Palleroni N. J., Doudoroff M.* Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of the "Pseudomonas alcaligenes" group // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1976.—26, N 4.—P. 421—426.
412. *Ramasamy K., Meyers M., Bevers J., Verachtert H.* Isolation and characterization of cellulolytic bacteria from activated sludge // *J. Appl. Bacteriol.*—1981.—51, N 3.—P. 475—482.
413. *Ramasamy K., Verachtert H.* Localization of cellulase components in *Pseudomonas* sp., isolated from activated sludge // *J. Gen. Microbiol.*—1980.—117, N 1.—P. 181—191.
414. *Ramasarma T.* Lipid quinones // *Adv. Lipid. Res.*—1968.—6.—P. 107—170.
415. *Redfearn M. S., Palleroni N. J., Stanier R. Y.* A comparative study of *Pseudomonas pseudomallei* and *Bacillus mallei* // *J. Gen. Microbiol.*—1966.—43, N 3.—P. 293.
416. *Reiling H. E., Thanel-Wyss U. et al.* Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* // *Appl. and Environ. Microbiol.*—1986.—51, N 5.—P. 595—989.
417. *Rhodes M. E.* The characterization of *Pseudomonas fluorescens* // *J. Gen. Microbiol.*—1959.—21, N 1.—P. 221—263.
418. *Rhodes M. E.* The characterization of *Pseudomonas fluorescens* with the acid of an electronic computer // *Ibid.*—1961.—25, N 2.—P. 331.
419. *Richard C., Monteil H., Megraud F. et al.* Caracteres phénotypiques de 100 souches de *Pseudomonas cepacia*. Proposition d'un schema de biovars // *Ann. biol. clin.*—1981.—39, N 1.—P. 9—15.
420. *Rietschel E. T., Luderitz O., Volk N. A.* Nature, type of linkage and absolute configuration of hydroxy fatty acids in lipopolysaccharides from *Xanthomonas sinensis* and related strains // *J. Bacteriol.*—1975.—122, N 3.—P. 1180.

421. Ritter C., Luckner M. Zur Biosynthese der 2-*n*-Alkyl-4-hydroxychinolinderivate (pseudane) bei *Pseudomonas aeruginosa* // Eur. J. Biochem.—1971.—18, N 3.—P. 391—400.
422. Robyt J. F., Ackerman R. J. Isolation, purification and characterization of a maltotriose producing amylase from *Pseudomonas stutzeri* // Arch. Biochem. and Biophys.—1971.—145, N 1.—P. 105—114.
423. Rohmer M., Bouvier P., Ourisson G. Molecular evolution of biomembranes: structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76, N 2.—P. 847—851.
424. Romer A., Budzikiewicz H., Korth H., Pulverer G. Neue Phenazinderivative aus *Pseudomonas aureofaciens* // Tetrahedron Lett.—1979.—N 6.—P. 509.
425. Romer A., Scholl H., Budzikiewicz H. et al. Phenazine aus *Pseudomonaden* // Z. Naturforsch B.—1981.—36b.—S. 1037—1046.
426. Roos I. M., Hattingh M. J. Pathogenicity and numerical analysis of phenotypic features of *Pseudomonas syringae* strains isolated from deciduous fruit trees // Phytopathology.—1987.—77, N 6.—P. 900—908.
427. Rubio T. T. Infection in patients with cystic fibrosis // Amer. A. Mod.—1986.—81, N 1.—P. 73—77.
428. Sahm U., Knobloch G., Wagner F. Isolation and characterization of the methionine antagonist 1-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid from *Pseudomonas aeruginosa* grown on *n*-paraffin // J. Antibiot.—1973.—26, N 7.—P. 389.
429. Sakthivel N., Gnanamanickam S. S. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of sheath rot disease and for enhancement of grain yields in rice (*Oryza sativa* L.) // Appl. and Environ. Microbiol.—1987.—53, N 9.—P. 2056—2059.
430. Samuels S. B., Moss C. W., Weaver R. E. The fatty acids of *Pseudomonas multivorans* (*Pseudomonas cepacia*) and *Pseudomonas kingii* // J. Gen. Microbiol.—1973.—74, N 2.—P. 275.
431. Sands D. C., Gleason F. H., Hildebrand D. C. Cytochromes of *Pseudomonas syringae* // J. Bacteriol.—1967.—94, N 5.—P. 1785—1786.
432. Sands D. C., Rovira A. D. *Pseudomonas fluorescens* biotype G, the dominant fluorescent pseudomonad in South Australian soils and wheat rhizospheres // J. Appl. Bacteriol.—1971.—34, N 1.—P. 261—275.
433. Sands D. C., Schroth M. N., Hildebrand D. C. Taxonomy of phytopathogenic *Pseudomonads* // J. Bacteriol.—1970.—101, N 1.—P. 9.
434. Sano Y., Kageyama H. Purification and properties of an S-type pyocin AP 41 // Ibid.—1981.—146, N 2.—P. 733—739.
435. Sawada S., Kawamura T., Masuho Y., Tomibe K. A New common polysaccharide antigen of strains of *P. aeruginosa* detected with a monoclonal antibody // J. Infect. Diseases.—1985.—152, N 6.—P. 1290—1299.
436. Scannell J. P., Pruess D. L., Kellett M. et al. Antimetabolites produced by microorganisms. III. 2-minopurine-6-thiol (thioguanine) // J. Antibiot. Int. J.—1971.—24, N 5.—P. 328.
437. Schaad N. W., Sowell G., Coto J. R. et al. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol.—1978.—28, N 1.—P. 117—125.
438. Schechter J., Hestrin S. Levan sa blood volume expander: relationship of polymer size and behaviour in the organism // J. Lab. and Clin. Med.—1963.—61, N 6.—P. 962—978.
439. Scher F. M., Ziegler J. S. A Method for assessing the rootcolonizing capacity of bacteria on maize // Can. J. Microbiol.—1984.—30, N 2.—P. 151—157.
440. Schlegel H. G., Gottschalk G. Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure, ihre Verbreitung, Funktion und Biosynthese // Angew. Chem.—1962.—74, N 10.—P. 342.
441. Schoenenberger B., Summermatter W., Ganter C. Enantioselective synthesis of pseudomonic acid. I. Synthesis of key intermediates // Helv. chim. acta.—1982.—65, N 7.—P. 2333—2337.
442. Schroth M. N., Hancock J. G. Disease-suppressive soil and rootcolonizing bacteria // Science.—1982.—216, N 4553.—P. 1376—1381.
443. Scott J. A., Sage G. K., Palmer S. J., Powell D. S. Cadmium adsorption by

- bacterial capsular polysaccharide coatings // *Biotechnol. Lett.*—1986.—8, N 10.—P. 711—714.
444. *Sebastian J., Chandra A. K., Kolattukudy P. E.* Discovery of a cutinase-producing *Pseudomonas* sp. cohabiting with an apparently nitrogenfixing *Corynebacterium* sp. in the phyllosphere // *J. Bacteriol.*—1987.—169, N 1.—P. 131—136.
445. *Sendai M., Hashiguchi Sh., Tomimoto M. et al.* Chemical modification of sulfazecin. Synthesis of 4-(substituted methyl)-2-azetidinone-1-sulfonic acid derivatives // *J. Antibiot.*—1985.—38, N 3.—P. 346—372.
446. *Shaw B. G., Latty J. B.* A numerical taxonomic study of *Pseudomonas* strains from spoiled meat // *J. Appl. Bacteriol.*—1982.—52, N 2.—P. 219—228.
447. *Sherris J. S., Shoemith J. G., Parker J. G., Breckon M. T.* Tests for the rapid breakdown of arginine by bacteria: their use in the identification of *Pseudomonads* // *J. Gen. Microbiol.*—1959.—21, N 2.—P. 389—396.
448. *Shiman R., Neilands J.* Isolation, characterization and synthesis of pyrimine, an iron (II)-binding agent from *Pseudomonas* GH // *J. Biochem.*, 1965.—4, N 10.—P. 2233.
449. *Shinagawa S., Maki M., Kintaka K. et al.* Isolation and characterization of bulgecins, new bacterial metabolites with bulge-inducing activity // *J. Antibiot.*—1985.—38, N 1.—P. 17—23.
450. *Shirahata K., Deguchi T., Hayashi T. et al.* The structures of fluopsins C and F // *J. Antibiot. Int. J.*—1970.—23, N 11.—P. 546—550.
451. *Sierra J.* A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations in the influence of the contact between cells and fatty substrates // *Antoni van Leeuwenhoek J. Microbiol. and Serol.*—1957.—23, N 1.—P. 15—16.
452. *Sigiura M., Isobe M., Oikawa T., Oono H.* Sterol ester hydrolytic activity of lipoprotein lipase from *P. fluorescens* // *Chem. and Pharm. Bull.*—1976.—24, N 6.—P. 1202—1208.
453. *Sinden S. L., De Bay J. E., Backman P. A.* Properties of syringomycin, a wide spectrum antibiotic and phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae* and its role in the bacterial cancer disease of peach frees // *Physiol. Plant. Pathol.*—1971.—1, N 2.—P. 199.
454. *Sinsabaugh H. A., Howard G. W.* Emendation of the description of *Pseudomonas cepacia* Burkholder (Synonyms: *Pseudomonas multivorans* Stanier et al., *Pseudomonas kingae* Jonsson; EO-1 group) // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1975.—25, N 2.—P. 187—201.
455. *Skerman V. D., McGowan V., Sneath P. H.* Approved lists of bacterial Names // *Ibid.*—1980.—30, N 1.—P. 225—420.
456. *Smidt M. L., Vidaver A. K.* Bacteriocin production by *Pseudomonas syringae* PsW-1 in plant tissue // *Can. J. Microbiol.*—1982.—28, N 6.—P. 600—604.
457. *Smidt M. L., Vidaver A. K.* Isolation and characterization of syringacin W-1, a bacteriocin produced by *Pseudomonas syringae* // *Ibid.*—1986.—32, N 3.—P. 231—236.
458. *Smith A. R., Zamze S. E., Muuro S. M. et al.* Structure of the sidechain of lipopolysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv *morsprunorum* s28 // *Eur. J. Biochem.*—1985.—149, N 1.—P. 73—78.
459. *Sneath P. H.* The application of computers to taxonomy // *J. Gen. Microbiol.*—1957.—17, N 1.—P. 201—226.
460. *Sneath P. A.* Computer taxonomy // *Methods in microbiology* / Ed. I. Norris, D. Ribbons.—London; New York: Acad. press, 1972.—Vol. 7.—P. 29.
461. *Sneath P. H. A.* Phylogeny of microorganisms // *Evolution in the Microbial World*, 24th Symp. Soc. microbiol.—Cambridge: Univ. press, 1974.—P. 1—39.
462. *Sneath P. H., Collins V. G.* A study in test reproducibility between Laboratories: report of a *Pseudomonas* working Party // *Antoni van Leeuwenhoek J. Microbiol. and Serol.*—1974.—40, N 4.—P. 481—527.
463. *Sneath P. H. A., Stevens M., Sackin M. J.* Numerical taxonomy of *Pseudomonas* based on published records of substrate utilization // *Ibid.*—1981.—47, N 5.—P. 423—448.

464. Snell J. J., Hill L. R., Lapage S. P., Curtis M. A. Identification of *Pseudomonas cepacia* Burkholder and its synonymy with *Pseudomonas kingii* Johnson // Int. J. Syst. Bacteriol.—1972.—22, N 3.—P. 127.
465. Snell J. J., Lapage S. P. Carbon source utilization test as an aid to the classification of none-fermenting gram-negative bacteria // J. Gen. Microbiol.—1973.—74, N 1.—P. 9—20.
466. Sokol P. A. Production of the ferripyochelin outer membrane receptor by *Pseudomonas* species // FEMS Microbiol. Lett.—1984.—23, N 2/3.—P. 313—317.
467. Stackerbrandt E., Woese C. R. The evolution of prokaryotes // Molecular and cellular aspects of microbial evolution: Soc. gen. microbiol. symp.—Cambridge: Univ. press, 1981.—P. 1—31.
468. Stanier R. V., Palleroni N. J., Doudoroff M. The aerobic pseudomonas, a Taxonomic study // J. Gen. Microbiol.—1966.—43, N 2.—P. 159—271.
469. Steel K. I. The Oxidase Reaction as a Taxonomic Tool // Ibid.—1961.—25, N 2.—P. 297—306.
470. Stewart W. W. Isolation and proof of structure of wildfire toxin // Nature.—1971.—229, N 5281.—P. 174—176.
471. Stowell L. J., Stanghellini M. E., Misaghi I. J. The bacteriostatic activity of fluorescent pigment on *Pseudomonas fluorescens* // Phytopathology.—1981.—71, N 8.—P. 906.
472. Strobel G. A. *Pseudomonas syringae* as antagonist, field tests of its effectiveness against dutch elm disease // Ibid.—N 9.—P. 1009.
473. Subik J., Behun M. Effect of bongkrekic acid on growth and metabolism of filamentous fungi // Arch. Microbiol.—1974.—97, N 1.—P. 81—88.
474. Suslow T. V., Schroth M. N. Rhizobacteria of sugar beets: Effects of seed application and root colonization on yield // Phytopathology.—1982.—72, N 2.—P. 199—206.
475. Sutherland I. W. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides // Ann. Rev. Microbiol.—1985.—39.—P. 243—270.
476. Swing J., De Vos P., Van den Mooter M., De Ley J. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh, 1981) comb. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol.—1983.—33, N 2.—P. 409—413.
477. Swings J., Gillis M., Kersters K. et al. *Frateuria*, a new genus for "*Acetobacter aurantius*" 33 // Ibid.—1980.—30, N 3.—P. 547—556.
478. Sykes R. B. et al. Monocyclic  $\beta$ -lactam antibiotics produced by bacteria // Nature.—1981.—291.—P. 489—491.
479. Takeda R. *Pseudomonas* pigments (II). Two pigments, phenazine-carboxylic acid and oxychlororaphine, produced by *P. aeruginosa* T 359 // J. Ferment. Technol.—1958.—36, N 2.—P. 286—290.
480. Takeda R. *Pseudomonas* pigments. IV. The structure of pyoluteorin // Bull. Agr. and Chem. Soc. Jap.—1959.—23, N 3.—P. 165—171.
481. Tamaoka J., Ha D.-M., Komagata K. Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. with an emended description of the genus *Comamonas* // Int. J. Syst. Bacteriol.—1987.—37, N 1.—P. 52—59.
482. Tanaka Y., Yoshida H., Nakayama K. Production of *l*-DOPA by *Pseudomonas melanogenum* // Agr. and Biol. Chem.—1974.—38, N 2.—P. 455.
483. Teintze M., Hossain M. B., Barnes C. L. et al. Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas* // Biochemistry.—1981.—20, N 22.—P. 6446—6462.
484. Thomashow L. S., Weller D. W. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* // J. Bacteriol.—1988.—170, N 8.—P. 3499—3508.
485. Tomita K., Hoshino Y., Uenoyama Y. et al. Sorbistin, a new aminoglycoside antibiotic complex of bacterial origin. II. Isolation and taxonomy of sorbistin producing organism // J. Antibiot.—1976.—29, N 11.—P. 1147—1151.
486. Toohy J. J., Nelson C. D., Krotkov G. Isolation and identification of two

- phenazines from a strain of *Pseudomonas aureofaciens* // *Can. J. Bot.*—1965.—43, N 9.—P. 1055—1062.
487. *Toohy J. I., Nelson C. D., Krotkov G.* Toxicity of phenazine-carboxylic acids to some bacteria, algae, higher plants and animals // *Ibid.*—P. 1151.
488. *Torres L., Perez-Ortin J. E., Tordera V., Beltran J. P.* Isolation and characterization of an Fe (III) — chelating compound produced by *Pseudomonas syringae* // *Appl. and Environ. Microbiol.*—1986.—52, N 1.—P. 157—160.
489. *Townsley C. C., Atkins A. S.* Comparative coal fines desulfurisation using the iron-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during simulated froth flotation // *Proc. Biochem.*—1986.—21, N 6.—P. 188—191.
490. *Tsukiura H., Hanada M., Saito K. et al.* Sorbistin, a new aminoglycoside antibiotic complex of bacterial origin. I. Production, isolation and properties // *J. Antibiot.*—1976.—29, N 11.—P. 1137—1146.
491. *Ursing J.* Similarities of genome deoxyribonucleic acids of *Pseudomonas* strains isolated from meat // *Curr. Microbiol.*—1986.—13, N 1.—P. 7—10.
492. *Vanderbergh P. A., Gonzales C. F., Wright A. M., Kunka B. S.* Iron-chelating compounds produced by soil pseudomonads: Correlation with fungal growth inhibition // *Appl. and Environ. Microbiol.*—1983.—46, N 1.—P. 128—132.
493. *Van Niel C., Allen M. B.* A note on *Pseudomonas stutzeri* // *J. Bacteriol.*—1952.—64, N 3.—P. 413—421.
494. *Van Pée K. H., Salcher O., Fischer P. et al.* The biosynthesis of brominated pyrrolinitrin derivatives by *Pseudomonas aureofaciens* // *J. Antibiot.*—1983.—36, N 12.—P. 1735—1742.
495. *Van Veen A. G., Mertens W. K.* Die Gifstoffe der sogenannten Bongkrekvergiftungen auf Java // *Rec. trav. chim.*—1934.—58, N 2.—P. 257—266.
496. *Vidaver A. K.* Prospects for control of phytopathogenic bacteria by bacteriophages and bacteriocins // *Ann. Rev. Microbiol.*—1976.—14.—P. 451—465.
497. *Vidaver A. K.* Bacteriocins: The lure and the reality // *Plant Disease.*—1983.—67, N 5.—P. 471—475.
498. *Vidaver A. K., Mathys M. L., Thomas M. E., Schuster M. L.* Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinae* and *P. phaseolicola* // *Can. J. Microbiol.*—1972.—18, N 6.—P. 705—713.
499. *Volk W., Salomonsky N. L., Hunt D.* *Xanthomonas sinensis* cell wall lipopolysaccharide // *J. Biol. Chem.*—1972.—247, N 12.—P. 3881—3887.
500. *Von Graevenitz A.* Ecology, clinical significance and antimicrobial susceptibility of infrequently encountered glucose-nonfermenting gram-negative rods // *Nonfermentative gram-negative rods*, 1985.—P. 181—223.
501. *Wahba A. H.* Pyorubin-producing *Ps. aeruginosa* // *Appl. Microbiol.*—1965.—13, N 2.—P. 291.
502. *Wakisaka Y., Koizumi K.* A selection isolation procedure for *Pseudomonas* bacteria // *J. Antibiot.*—1982.—35, N 5.—P. 622—628.
503. *Ward A., Campoli-Richards D. M.* Mupirocin—A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use // *Drugs.*—1986.—32.—P. 425—444.
504. *Weckesser P., Mayer H.* Different lipid types in LPS of phototrophic and related nonphototrophic bacteria // *FEMS Microbiol. Revs.*—1988.—54, N 1.—P. 143—154.
505. *Welch D. F., Muszynki M. J., Pai C. H. et al.* Selective and differential medium for recovery of *Pseudomonas cepacia* from respiratory tracts of patients with cystic fibrosis // *J. Clin. Microbiol.*—1987.—25, N 9.—P. 1730—1734.
506. *Weller D. M.* Colonization of wheat roots by a fluorescent *Pseudomonad* suppressive to take-all // *Phytopathology.*—1983.—73, N 11.—P. 1548—1553.
507. *Weller D. M., Cook R. J.* Control of take-all of wheat with fluorescent pseudomonads // *Ibid.*—1981.—71, N 9.—P. 1007.
508. *Weller D. M., Cook R. J.* Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent *Pseudomonads* // *Ibid.*—1983.—73, N 3.—P. 463—469.
509. *Weller D. M., Rovira A. D.* Suppression of take-all of wheat in South Australian soils by fluorescent pseudomonads // *Ibid.*—1984.—74, N 7.—P. 806.

510. Wells I. C. Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Syntheses of Pyo Ib, Pyo Ic and Pyo III // *J. Biol. Chem.*—1952.—196, N 1.—P. 331—345.
511. Wells J. C., Trejto W. H., Principe P. A., Sykes R. B. Obafluorin, a novel  $\beta$ -lactone produced by *Pseudomonas fluorescens* // *J. Antibiot.*—1984.—37, N 7.—P. 802—804.
512. Wendenbaum S., Demange P., Dell A. et al. The structure of pyoverdine Pa, the siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* // *Tetrahedron Lett.*—1983.—24.—P. 4877—4880.
513. Wen-Yen Ch., Echandi E. Bacteriocin production and semiselective medium for detection, isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum* in Soil // *Phytopathology.*—1982.—72, N 3.—P. 310—313.
514. Whitaker R. J., Byng G. S., Cherna R. L., Jensen R. A. Diverse enzymological patterns of phenylalanine biosynthesis in pseudomonad bacteria are conserved in parallel with DNA/DNA homology groupings // *J. Bacteriol.*—1981.—147, N 2.—P. 526—534.
515. Wick M. M. L-DOPA methyl ester: Prolongation of survival of neuroblastoma-bearing mice after treatment // *Science.*—1978.—199, N 4330.—P. 775—776.
516. Wilkinson S. G. The sensitivity of pseudomonads to ethylenediaminetetra-acetic acid // *J. Gen. Microbiol.*—1967.—47, N 1.—P. 67—76.
517. Wilkinson S. G. Cell walls of *Pseudomonas* species sensitive to ethylenediaminetetraacetic acid // *J. Bacteriol.*—1970.—104, N 3.—P. 1035—1044.
518. Wilkinson S. G. Composition and structure of the ornithine-containing lipid from *Pseudomonas rubescens* // *Biochim. et biophys. Acta.*—1972.—270, N 1.—P. 1.
519. Wilkinson S. G., Galbraith L. Polar lipids presence of a heptosyldiacylglycerol // *Ibid.*—1979.—575, N 2.—P. 244—254.
520. Wilkinson S. G., Galbraith L., Lightfoot G. A. A cell wall lipids and lipopolysaccharides of *Pseudomonas* species // *Eur. J. Biochem.*—1973.—33, N 1.—P. 158—174.
521. Wilkinson S., Gaudwell O. Lipid composition and Chemotaxonomy of *Pseudomonas putrefaciens* // *J. Gen. Microbiol.*—1980.—118, N 2.—P. 329—341.
522. Wingender J., Winkler U. K. A novel biological function of alginate in *Pseudomonas aeruginosa* and its mucoid mutants: stimulation of exolipase // *FEMS Microbiol Lett.*—1984.—21, N 1.—P. 63—69.
523. Winslow C. E., Broadhurst J., Buchanan R. E. et al. The family and genera of the bacteria. Preliminary report of the society of american bacteriologists on characterization and classification of bacterial types // *J. Bacteriol.*—1917.—2, N 5.—P. 505—566.
524. Woese C. R., Stackerbrandt E., Macke T. J., Fox G. E. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa // *Syst. Appl. Microbiol.*—1985.—6, N 1.—P. 143—151.
525. Woese C. R., Stackerbrandt E., Weisburg W. G. et al. The phylogeny of purple bacteria the alfa subdivision // *Ibid.*—1984.—5.—P. 315—326.
526. Wolfrum T., Gruner G., Stolp H. Nucleic acid hybridization of pink-pigmented facultative methylotrophs and pseudomonads // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1986.—36, N 1.—P. 24—28.
527. Wong P. T. W., Baker R. Control of wheat take-all and *Ophiobolus* patch of *Agrostis turfgrass* by fluorescent pseudomonad from a *Fusarium* wilt-suppressive soil // *Phytopathology.*—1981.—71, N 9.—P. 1008.
528. Woolford M. K. The semi large-scale production, extraction, purification and properties of an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens* atrain 175 // *J. Appl. Bacteriol.*—1972.—35, N 2.—P. 221.
529. Wu-Kuang Y., Durham D. R., Pletcher P., Ornston L. N. Evolutionary relationships among  $\gamma$ -carboxymuconolactone decarboxylases // *J. Bacteriol.*—1981.—146, N 1.—P. 233—238.
530. Xu G. W., Gross D. C. Field evaluations of the interactions of among fluorescent pseudomonads *erwinia carotovora* and potato yields // *Phytopathology.*—1986.—76, N 4.—P. 423—430.
531. Xu G. W., Gross D. C. Selection of fluorescent *Pseudomonas* antagonists

- to *Erwinia carotovora* and Suppressive of potato seed piece decay // *Ibid.*—1986.—76, N 4.—P. 414—422.
532. *Yamada Y., Seki N., Kitahara T. et al.* Structure and synthesis of aeruginosic acid 2-(O-hydroxyphenyl)-4-thiazolecarboxylic acid // *Agr. and Biol. Chem.*—1970.—34, N 5.—P. 780—783.
533. *Yamada Y., Takinami-Nakamura H., Tahara Y. et al.* The ubiquinone systems in the strains of *Pseudomonas* species // *J. Gen. and Appl. Microbiol.*—1982.—28, N 1.—P. 7—12.
534. *Yano I., Jabuuchi E., Shimogawa M. et al.* Lipids and fatty acids of *Pseudomonas* species and their application to chemotaxonomy // *Proc. jpn. conf. biochem. lipid.*—1976.—18.—P. 51—54.
535. *Yokota Sh., Kaya Sh., Sawada S. et al.* Characterization of a polysaccharide component of LPS from *Pseudomonas aeruginosa* D 1008 (ATCC 27584) as D—rhamnan // *Eur. J. Biochem.*—1987.—167, N 1.—P. 203—209.
536. *Yoshida H., Tanaka Y., Nakayawa K.* Production of 3,4-dihydroxyphenyl-l-alanine ( $\alpha$ -DOPA) and its derivatives by *Vibrio tyrosinaticus* // *Agr. and Biol. Chem.*—1973.—37, N 9.—P. 2121—2126.
537. *Yoshikawa M.* Biogenesis of multiple cellulase components of *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa* // *J. Biochem.*—1974.—75, N 3.—P. 531—535.
538. *Young H. O., Chao F., Turnbull C., Philpott D. E.* Ultrastructure of *Pseudomonas saccharophila* at early and late log phase of growth // *J. Bacteriol.*—1972.—109, N 2.—P. 862—868.
539. *Zierdt C. H.* *Pseudomonas aeruginosa*: Serology, phase, pyocin // *Nonfermentative gram-negative rods.*—New York; Basel, 1985.—P. 283—241.
540. *Zolg W., Ottow J. G.* *Pseudomonas glathei* sp. nov., a new nitrogen-scavenging rod isolated from acid lateric relicts in Germany // *Zeitschr. für Allg. Microbiol.*—1975.—15, N 4.—P. 287—299.



# ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение . . . . .	3
Глава 1	
Краткий очерк истории классификации бактерий рода <i>Pseudomonas</i>	6
Глава 2	
Строение ДНК и систематика . . . . .	10
Глава 3	
Диагноз рода и некоторые биологические особенности видов псевдомонад	18
Морфологические и цитологические свойства . . . . .	20
Особенности азотного и углеродного питания . . . . .	21
Глава 4	
Некоторые ферменты бактерий рода <i>Pseudomonas</i> и их роль в таксономии	29
Глава 5	
Хемотаксономические признаки . . . . .	43
Система убихинонов . . . . .	43
Липиды . . . . .	44
Липополисахариды и гопаны . . . . .	53
Экзополисахариды . . . . .	58
Глава 6	
Чувствительность бактерий рода <i>Pseudomonas</i> к антибиотикам и другим антимикробным соединениям . . . . .	62
Глава 7	
Численные исследования в систематике бактерий рода <i>Pseudomonas</i>	73
Глава 8	
Антибиотические вещества, образуемые бактериями рода <i>Pseudomonas</i>	84
Антибиотики ациклического строения . . . . .	84
Антибиотики ароматического строения . . . . .	92
Антибиотически активные пигменты группы феназина . . . . .	100
Другие антибиотики гетероциклической природы, аминогликозиды и монобактамы . . . . .	111
Глава 9	
Бактериоциноподобные вещества бактерий рода <i>Pseudomonas</i> . . . . .	121

## Глава 10

Использование антибиотических свойств бактерий рода *Pseudomonas* для борьбы с заболеваниями сельскохозяйственных растений . . . . . 134

## Глава 11

Таксономическая структура и идентификация микроорганизмов флюоресцирующей группы рода *Pseudomonas* . . . . . 152

Разжижающие желатин сапрофитные виды . . . . . 152

*Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 — типовой вид рода *Pseudomonas* . . . . . 154

Другие разжижающие желатин флюоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas* (*Pseudomonas aurantiaca* Nakhimovskaya, 1948 — с. 159; *Pseudomonas aureofaciens* Kluuver, 1956 — с. 165; *Pseudomonas chloraphis* (Guignard and Sauvegeau, 1894) Bergey, Harrison, Breed, Hammer and Huntoon, 1930 — с. 166; «*Pseudomonas lemonnieri*» (Lasseur) Breed, 1948. — с. 167; биовары I, III, V, *Pseudomonas fluorescens* — с. 169; биовар VI *Pseudomonas fluorescens*. — с. 172; «*Pseudomonas fluoro-violaceus*» Kiprianova. Boiko, 1972 — с. 175;

Не разжижающие желатин флюоресцирующие сапрофитные виды (*Pseudomonas putida* (Trevisan), 1889 Migulaa, 1895 — с. 176; *Pseudomonas taetrolens* Haynes 1957 и *Pseudomonas lundensis* Molin, Tornstrom and Ursing, 1986 — с. 180) . . . . .

Фитопатогенные флюоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas* — с. 184

Внутреннее подразделение и номенклатура микроорганизмов флюоресцирующей группы . . . . . 185

## Глава 12

Классификация и идентификация нефлюоресцирующих бактерий I секции рода *Pseudomonas* . . . . . 188

(*Pseudomonas alcaligenes* Monias, 1928 — с. 188; *Pseudomonas pseudoalcaligenes* Stanier, 1966 — с. 188; *Pseudomonas stutzeri* (Lehmann and Neumann, 1896) Sijderius, 1946 — с. 192; *Pseudomonas mendocina* Palleroni, 1970 — с. 194; *Pseudomonas fragi* (Eichholz, 1902) Cruber, 1905 — с. 195; «*Pseudomonas denitrificans*» Bergey et al., 1923 — с. 200; «*Pseudomonas rathonis*», Gray and Thornton, 1928 — с. 201)

## Глава 13

Виды других секций рода *Pseudomonas* . . . . . 204

*Pseudomonas ceracia* (ex Burkholder, 1950) Palleroni and Holmes, 1981 . . . . . 204

Микроорганизмы III и IV секций рода *Pseudomonas* . . . . . 212

## Глава 14

Некоторые практические рекомендации для выделения и идентификации бактерий рода *Pseudomonas* . . . . . 221

Заключение . . . . . 230

Summary . . . . . 233

Список литературы . . . . . 235

# CONTENTS

Introduction . . . . .	3
Chapter 1	
A brief essay on the history of classification of bacteria of the <i>Pseudomonas</i> genus . . . . .	6
Chapter 2	
The structure of DNA and systematics . . . . .	10
Chapter 3	
The genus diagnosis and some biological peculiarities of <i>Pseudomonads</i>	18
Morphological and cytological properties . . . . .	20
Peculiarities of nitrogen and carbon nutrition . . . . .	21
Chapter 4	
Certain enzymes of <i>Pseudomonads</i> and their taxonomic significance . . . . .	29
Chapter 5	
Chemotaxonomic characters . . . . .	43
The ubiquinone system . . . . .	43
Lipids . . . . .	44
Lipopolysaccharides and hopanes . . . . .	53
Exopolysaccharides . . . . .	58
Chapter 6	
Sensitivity of bacteria of the <i>Pseudomonas</i> genus to antibiotics and other antimicrobial compounds . . . . .	62
Chapter 7	
Numerical studies in systematics of <i>Pseudomonads</i> . . . . .	73
Chapter 8	
Antibiotic substances produced by the bacteria of <i>Pseudomonas</i> genus	84
Antibiotics of acyclic structure . . . . .	84
Antibiotics of aromatic structure . . . . .	92
Antibiotically active pigments of the phenazine group . . . . .	100
Other heterocyclic antibiotics, aminoglycosides and monobactams . . . . .	111
Chapter 9	
Bacteriocin-like substances of Bacteria of the <i>Pseudomonas</i> genus . . . . .	123

Chapter 10	
<b>The use of antibiotic properties of Pseudomonads for biological control of plant Diseases</b> . . . . .	134
Chapter 11	
<b>The taxonomic structure and identification of the fluorescent group microorganisms of the genus Pseudomonas</b> . . . . .	152
The saprophytic species which liquefy gelatin . . . . .	152
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter 1872) Migula 1900 — the type species of the genus . . . . .	154
Other fluorescent Pseudomonads which liquefy gelatin ( <i>Pseudomonas aurantiaca</i> Nakhimovskaya 1948 — p. 159; <i>Pseudomonas aureofaciens</i> Kluyver 1956 — p. 165; <i>Pseudomonas chlororaphis</i> (Guignard and Sauvegeau 1894) Bergey, Harrison, Breed, Hammer and Huntton 1930 — p. 166; « <i>Pseudomonas lemonnieri</i> » (Lasseur) Breed 1948 — p. 167; biovars I, III, V of <i>pseudomonas fluorescens</i> — p. 169; biovar VI of <i>Pseudomonas fluorescens</i> — « <i>Pseudomonas fluoro-violaceus</i> » Kiprianova, Boiko 1972 — p. 175) . . . . .	
The fluorescent saprophytic species which do not liquefy gelatin ( <i>Pseudomonas putida</i> (Trevisan) Migula 1895 — p. 176; <i>Pseudomonas taetrolens</i> Haynes 1957 and <i>Pseudomonas lundensis</i> Molin, Ternstrom and Ursing 1986 — p. 180) . . . . .	
Phytopathogenic fluorescent bacteria of the genus <i>Pseudomonas</i> . . . . .	184
Internal subdivision and nomenclature of the fluorescent group microorganisms . . . . .	185
Chapter 12	
<b>Classification and identification of nonfluorescent bacteria of section I of the genus Pseudomonas</b> . . . . .	188
( <i>Pseudomonas alcaligenes</i> Monias, 1928.— c. 188; <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> Stanier, 1966.— c. 188; <i>Pseudomonas stutzeri</i> (Lehmann and Neumann, 1896) Sijderius, 1946.— c. 192; <i>Pseudomonas mendocina</i> Palleroni, 1970.— c. 194; <i>Pseudomonas fragi</i> (Eichholz, 1902) Gruber, 1905.— c. 195; « <i>Pseudomonas denitrificans</i> » Bergey et al., 1923.— c. 200; « <i>Pseudomonas rathonis</i> » Gray and Thornton, 1928.— c. 201)	
Chapter 13	
<b>Species of other sections of the genus Pseudomonas</b> . . . . .	204
<i>Pseudomonas cepacia</i> (ex Burkholder, 1950) Palleroni and Holmes, 1981	
Microorganisms of sections III and IV of the genus <i>Pseudomonas</i>	
Chapter 14	
<b>Certain practical recommendations for isolation and identification of Pseudomonads</b> . . . . .	221
Conclusion . . . . .	230
Summary . . . . .	233
References . . . . .	235

НАУЧНОЕ ИЗДАНИЕ

СМИРНОВ ВАЛЕРИЙ ВЕНИАМИНОВИЧ  
КИПРИАНОВА ЕЛЕНА АНДРЕЕВНА

БАКТЕРИИ РОДА  
PSEUDOMONAS

Оформление художника *Г. Н. Балюна*  
Художественный редактор *Р. И. Калыш*  
Технический редактор *А. М. Капустина*  
Корректоры *С. И. Кримец,*

ИБ № 10854

Сдано в набор 07.12.89. Подп. в печ. 13.09.90. Бум, тип, № 1. Формат 60x90/16. Лит. гарн. Выс. печ: Физ. печ. л. 16,5. Л. 0,56 вкл. на мел. бум. Усл. печ. л. 17,0. Усл. кр.-отт. 17,5. Уч.-изд. л. 20,8. Тираж 800 экз. Заказ 9—4160. Цена 4 р. 50 к.

Издательство «Наукова думка»  
252601 Киев 4. ул. Репина, 3

Отпечатано с матриц головного предприятия республиканского производственного объединения «Полиграфкнига». 252057, Киев, ул. Довженко, 3 в Нестеровской городской типографии. 292310, Нестеров, Львовской области, ул. Горького, 8, зак. 3610.

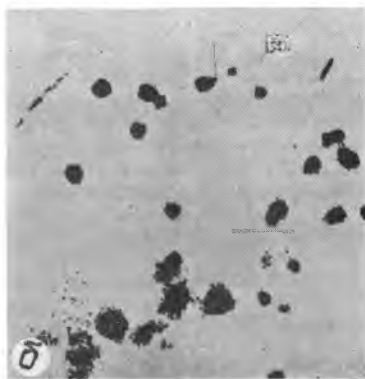
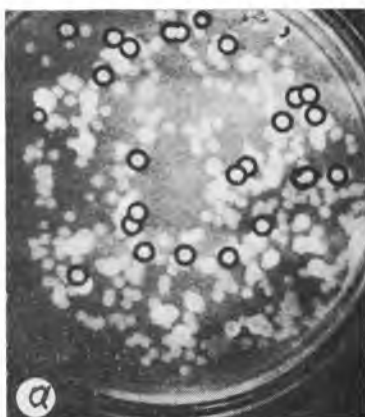


Рис. 3. Гибридизация колоний в смешанной культуре с помощью плазмиды рHF 360 [177].

Клетки *Pseudomonas fluorescens*, *P. diminuta* и *P. testosteroni* высеяны на фильтр с нитроцеллюлозой в чашке Петри: *a* — вид чашки после инкубации в течение ночи (флуоресцирующие колонии *P. fluorescens* обведены черными кругами), *b* — ауторадиограмма фильтра после гибридизации (только колонии *P. fluorescens* дают положительный сигнал)

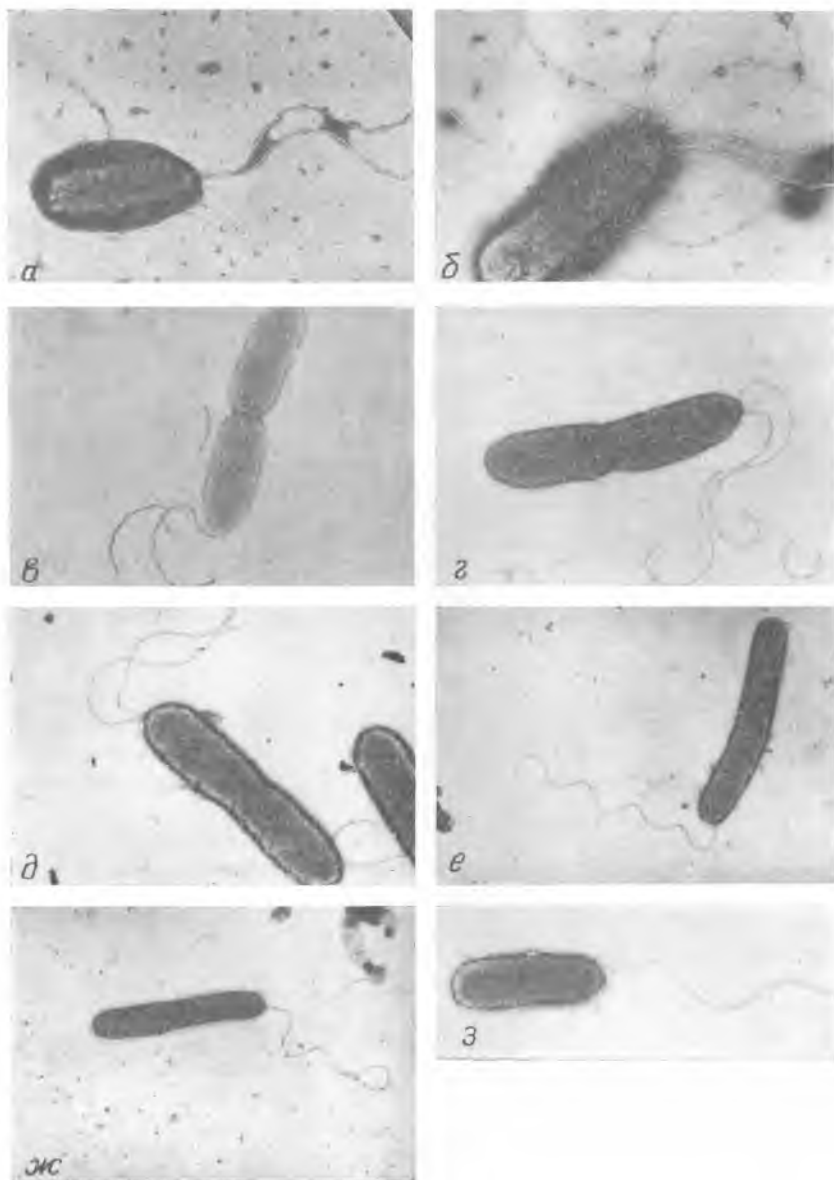


Рис. 4. Жгутики бактерий рода *Pseudomonas* и некоторых близких им родов: а — «*P. fluorescens*» ИМВ 1152,  $\times 15\ 000$ ; б — *Comamonas acidovorans* ИМВ 2863,  $\times 15\ 000$ ; в-д — *Xanthomonas maltophilia* ИМВ 103,  $\times 15\ 000$ ; е — *P. pseudoalcaligenes* ИМВ 2523,  $\times 12\ 500$ ; ж — *P. alcaligenes* ИМВ 3099,  $\times 12\ 500$ ; з — *P. stutzeri* ИМВ 1979,  $\times 20\ 000$

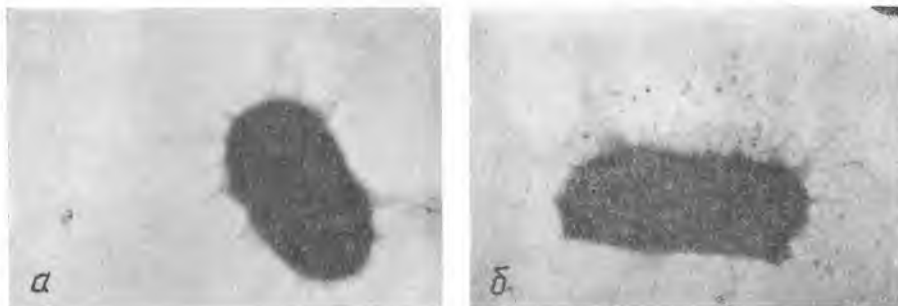


Рис. 5. Фимбрии *P. ceracia* ИМВ 3189 (а) и *Pseudomonas* species (б),  $\times 16\,000$



Рис. 6. Мезосомы *P. stutzeri* ИМВ 3000,  $\times 30\,000$

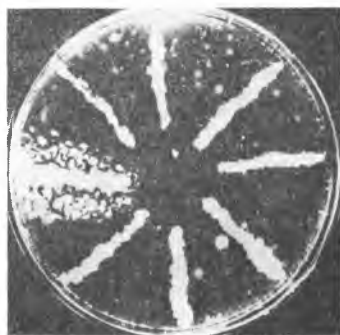
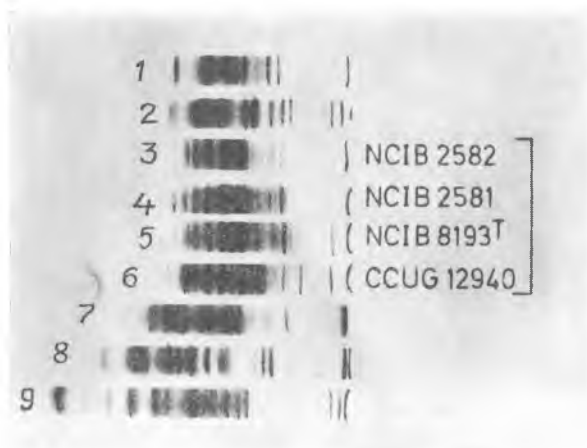


Рис. 9. Зона гидролиза холестеринного эфира оленевой кислоты, образованная активным штаммом *Pseudomonas*

Рис. 10. Электрофореграмма белков, свидетельствующая о значительном сходстве между четырьмя штаммами *Comamonas terrigena* NCIB 2582, NCIB 2581, NCIB 81931 и CCUG 12940 (3—6) и их отличиях от штаммов *C. acidovorans* ATCC 15668 (1), *C. testosteroni* NCTC 10698 (2), «*C. compransoris*», DSM 1231 (7), «*V. alcaligenes*» NCTC 92 39 (8), «*V. cyclospites*» ATCC 1435 (9) [106].





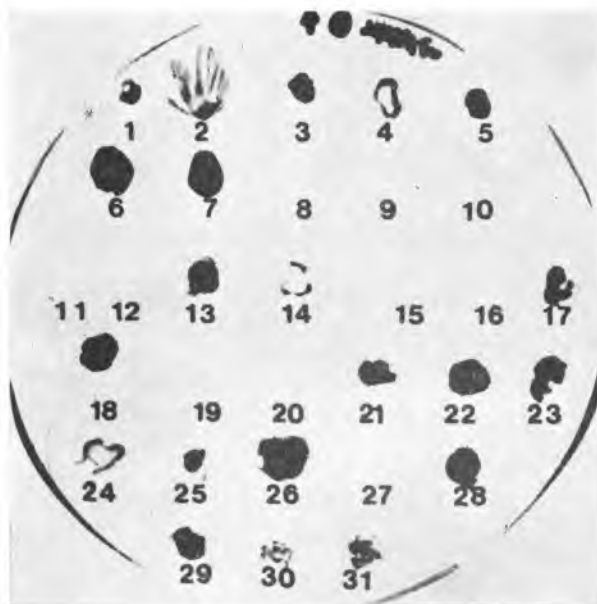


Рис. 11. Иммуноблоттинг колоний [396].

Взаимодействие моноклональных антител (МА), специфичных для белка H2 *P. aeruginosa*, со штаммами *P. aeruginosa* P1 неслизистый (1), *P. aeruginosa* P1 слизистый (2), *P. fluorescens* ATCC 949 и ATCC 13 525 (соответственно 3 и 4), *P. aeruginosa* PAO1, H103 (5), *P. aeruginosa* C1 слизистый (6), *P. aeruginosa* C1 неслизистый (7), *Escherichia coli*, штаммы CGSC 6041, CGSC 6044 и PC 0479 (8–10), *P. pseudomallei* ATCC 23343 (11), *P. solanacearum* ATCC 11696 (12), *P. putida* ATCC 4359 и ATCC 12633 (13, 14), *Salmonella typhimurium* LT2, штаммы SGSC 206 и SGSC 227 (15, 16), *P. aeruginosa* ATCC 8689 (17), *P. aeruginosa* PAO1, H103 (17), *P. chlororaphis* ATCC 9446 (21), *P. aeruginosa* ATCC 19305 (22), *P. aeruginosa* Z6 (23), *P. aureofaciens* ATCC 13985 (24), *P. syringae* ATCC 19310 (25), *P. aeruginosa* 349 (26), *X. maltophilia* ATCC 13637 (27), *P. stutzeri* ATCC 17588 (28), *P. aeruginosa* H223 (29), *P. aeruginosa* AK 1012 и AK 1282 (30, 31)



Рис. 14. Действие света на антибиотическую активность дихлорфлюоресцеина в отношении бактерий рода *Pseudomonas*:

*a* — чашка с необлученным красителем, *б* — с облученным; 1 — *P. aeruginosa* ИМВ 4000, 2 — *P. fluorescens* ИМВ 1602, 3 — *P. aurantiaca* ИМВ 31, 4 — «*P. fluoro-violaceus*» 2698, 5 — *P. fluorescens* ИМВ 19, 6 — *P. aureofaciens* ИМВ 2116, 7 — «*P. lemonieri*» ИМВ 2693, 8 — *P. putida* ИМВ 1608, 9 — *P. syringae* ИМВ 1950, 10 — *P. ceracia* ИМВ 4137, 11 — *P. stutzeri* ИМВ 4136, 12 — *P. mendocina* ИМВ 4128

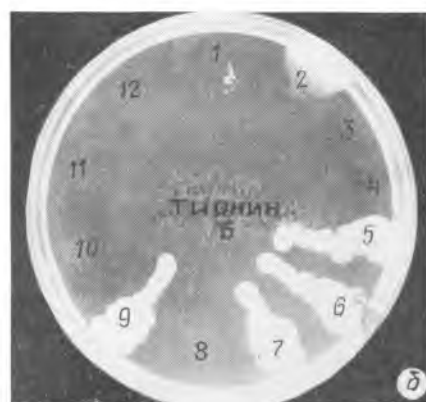
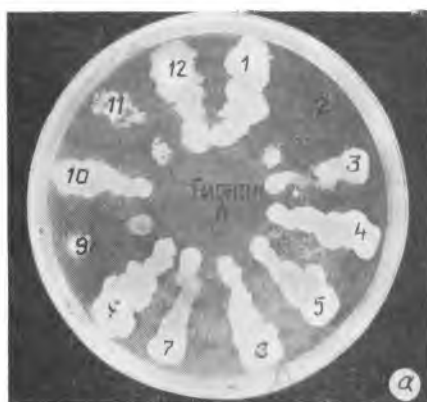


Рис. 15. Действие света на антибиотическую активность тионина в отношении бактерий рода *Pseudomonas*.

Условные обозначения те же, что на рис. 14.

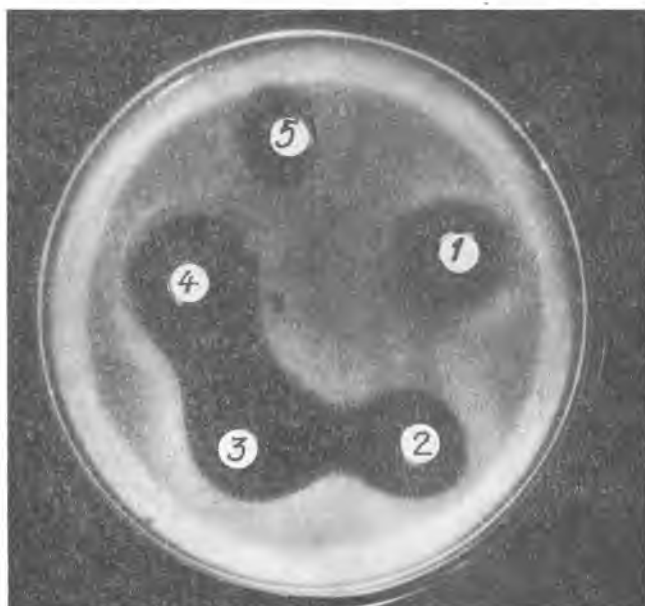


Рис. 22. Зоны угнетения роста *P. aurantiaca* ИМВ 387, вызываемые бактериоциноподобными веществами *P. taetrolens* ИМВ 4006. (1), *P. fragi* ИМВ 4002 (2), *P. fluorescens* ИМВ 4125 и 2612 (3, 4), *P. mendocina* ИМВ 4128 (5)



Рис. 23. Зона угнетения роста *X. maltophilia* ИМВ 424, образованная бактериоциноподобными веществами *X. maltophilia* ИМВ 4131.

Неактивны *P. fluorescens* ИМВ 4125, ИМВ 2303, «*P. lemonnieri*» ИМВ 2111, ИМВ 2088, *P. stutzeri* ИМВ 4005, *P. pseudoalcaligenes* ИМВ 4134 и 2523 (в центре)



Рис. 24. Действие трипсина на активность сепацицина 5798. Видны «мостики» — участки, где находились смоченные трипсином полоски фильтровальной бумаги и наблюдается хороший рост индикаторной культуры