

Таким образом, полученные в результате проведенного исследования данные свидетельствуют о том, что препараты иммобилизованного окситиамина оказывают более значительное в сравнении с немодифицированным соединением канцеростатическое действие на АРЭ у мышей. Наибольшую эффективность данные препараты проявляют в начальный и интенсивный периоды роста опухоли. Отличительными особенностями противоопухолевого действия препаратов иммобилизованного окситиамина в сравнении с другими известными производными данного антивитамина и самим окситиамином является их эффективность при однократном применении и более высокая избирательность действия. Установлено, что АТ-10-4 превосходит по активности другие изученные соединения и оказывает пролонгированное канцеростатическое действие в отношении АРЭ. Под влиянием данного препарата подавляется процесс деления опухолевых клеток, возрастает количество поврежденных и погибших онкоцитов, эффективно тормозится рост опухоли и в 2,5 раза увеличивается по сравнению с контролем среднее время жизни животных, что позволяет сделать заключение о перспективности дальнейшего углубленного изучения АТ-10-4 в качестве противоопухолевого средства.

Список литературы

1. Дьячкова Л. В., Шамаева Е. М., Платонова Г. Н. и др. // *Вопр. мед. химии*. 1968. № 4. С. 408.
2. Требухина Р. В. Особенности метаболизма тиамина в организме при росте злокачественных опухолей: Автореф. ... д-ра биол. наук. Мн., 1984.
3. Зиматкина Т. И., Островский Ю. М., Зиматкин С. М. и др. // *Докл. АН БССР*. 1985. Т. 29. № 7. С. 655.
4. Дьячкова Л. В., Шамаева Е. М., Платонова Г. Н. и др. // *Вопр. мед. химии*. 1974. № 2. С. 203.
5. Островский Ю. М., Зиматкина Т. И., Величко М. Г. // *Весті АН БССР. Сер. біял. навук*. 1984. № 1. С. 69.
6. Зиматкина Т. И., Опарин Д. А., Величко М. Г. и др. // *Докл. АН БССР*. 1986. Т. 30. № 9. С. 850.
7. Зиматкина Т. И., Зиматкин С. М., Опарин Д. А. и др. // *Эксп. онкология*. 1986. Т. 8. № 2. С. 68.
8. Забродская С. В., Величко М. Г., Зиматкин С. М. и др. // *Докл. АН БССР*. Т. 34. № 5. С. 470.
9. Зиматкина Т. И., Опарин Д. А., Юркштович Т. Л. и др. // *Вопр. мед. химии*. 1989. № 6. С. 143.
10. Коноплев В. П. // *Модели и методы экспериментальной онкологии* / Под ред. А. Д. Тимофеевского. М., 1960. С. 144.
11. Чернов В. А. // *Методы экспериментальной химиотерапии* / Под ред. Г. Н. Першина. М., 1971. С. 375.
12. Эмануэль Н. М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. М., 1977.
13. Ойвин И. А. // *Патофизиология*. 1960. № 4. С. 76.
14. Софьина З. П. Первичный отбор противоопухолевых препаратов. М., 1980.
15. Ивлева Т. С., Беляева И. Д. // *Эксп. онкология*. 1983. Т. 5. № 4. С. 3.

УДК 579.8

Н. П. МАКСИМОВА

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕТАНОЛУТИЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ PSEUDOMONAS SP. M

Ранее из промышленных стоков был выделен штамм факультативных метилотрофных бактерий, отнесенный к сапрофитным флуоресцирующим бактериям и на основании родовых признаков обозначенный как *Pseudomonas sp. M* [1]. Бактерии этого штамма наряду с полиуглеродными субстратами способны утилизировать также одно- и двууглеродные соединения (метанол, этанол, ацетат и др.), что позволило рассматривать их в качестве потенциальных продуцентов биологически активных соединений при выращивании клеток на дешевых источниках углерода. На основании приведенного предположения у бактерий *Pseudomonas sp. M* изучена регуляция биосинтеза ароматических ами-

нокислот [2—4], определены механизмы увеличения продукции триптофана [5] и получены продуценты данной аминокислоты [6].

Сапрофитные флуоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas* включают два основных вида: *P. putida* и *P. fluorescens*, клетки которых характеризуются определенными физиолого-биохимическими и иммунологическими свойствами, а также гомологией ДНК — ДНК [7, 8]. Вместе с тем идентификация этих видов сопряжена с известными трудностями, обусловленными сложностью их внутривидовой структуры. Так, например, вид *P. fluorescens* объединяет пять биотипов, а *P. putida* — два [7, 8], четкие таксономические критерии которых в настоящее время еще окончательно не определены.

В представляемой работе приводится подробная физиолого-биохимическая характеристика бактерий *Pseudomonas* sp. M, аргументирующая их видовую принадлежность.

Материал и методика

Объектом исследования служили бактерии *Pseudomonas* sp. M, выделенные из сточных вод Минского завода медпрепаратов, а также бактерии других родов и видов (*Pseudomonas*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Sarcina*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Staphylococcus*), применявшиеся для выявления антибактериальных свойств изучаемого микроорганизма. Для этих же целей использовали ряд эталонных штаммов флуоресцирующих *Pseudomonas*, полученных из Всесоюзной коллекции микроорганизмов (г. Москва); *P. putida* (7 штаммов), *P. fluorescens* (12 штаммов) и *P. aeruginosa* (15 штаммов).

Бактерии выращивались в жидкой и агаризованной среде М9 [9], а также полноценной питательной среде Кинг В [10].

Физиолого-биохимические свойства бактерий изучали общепринятыми методами [7, 11, 12]; окраску жгутиков осуществляли стандартным способом [13]. Способность бактерий утилизировать органические соединения (углеводы, спирты, аминокислоты и др.) изучали при 30 °С. Концентрация источника углерода соответствовала 0,1—0,2 %.

Продукция флуоресцирующего пигмента определялась спектрофотометрически при длине волны 400 нм после выращивания клеток в течение 24 ч в жидкой минимальной среде, содержащей сукцинат (0,4 %). Выделение и очистку пигмента осуществляли по описанной ранее методике [14]; антибактериальную активность определяли методом «отсроченного антагонизма» [15].

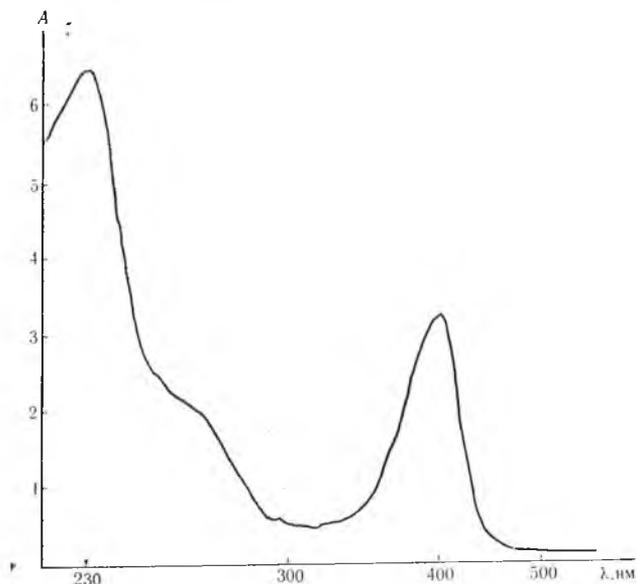
Результаты и их обсуждение

Морфологические и культуральные признаки. Грамотрицательные клетки изучаемого штамма имеют форму прямых палочек размером 0,6—2—3 м с округленными концами, обладают 2—4 монополярно располагающимися жгутиками, спор и капсул не образуют.

На агаризованных питательных средах клетки формируют гладкие, плоские, круглые с ровным краем колонии серовато-белого цвета, достигающие через 24 ч выращивания 2—3 мм в диаметре. При посеве уколочным рост регистрируется в основном на поверхности среды; в жидких средах образуется интенсивное помутнение. В дополнительных факторах роста не нуждаются. Являются облигатными аэробами, оптимальная температура роста 28—30 °С, при 4 и 41 °С рост отсутствует, оптимум рН среды в пределах 6,8—7,3.

Пигменты. Бактерии изучаемого штамма продуцируют желто-зеленый флуоресцирующий пигмент (пиовердин P_M), обнаруживаемый при выращивании на среде Кинг В либо на минеральной среде с сукцинатом. Максимальная продукция пигмента отмечается при 28—30 °С и рН в пределах 6,5—8,0. Спектральные характеристики пиовердина P_M (рисунок) аналогичны характеристикам флуоресцирующих пигментов *P. putida* и

P. fluorescens [14, 16], однако по аминокислотному составу пиовердин P_M существенно отличается от всех синтезируемых указанными выше бактериальными штаммами пигментов [14, 16, 17].



Спектр поглощения пиовердина P_M бактерий *Pseudomonas* sp. M (в очищенном от Fe^{3+} -ионов виде, pH раствора 7,0)

Таблица 1

Спектр антибактериальной активности *Pseudomonas* sp. M

Штаммы	Количество штаммов	
	проверенных	чувствительных
<i>Pseudomonas</i>	251	245
<i>Citrobacter</i>	1	1
<i>Escherichia</i>	1	1
<i>Klebsiella</i>	1	1
<i>Erwinia</i>	239	226
<i>Bacillus</i>	4	4
<i>Staphylococcus</i>	1	1
<i>Sarcina</i>	1	1
Всего	499	480 (96,2%)

Таблица 2

Антибактериальная активность *Pseudomonas* sp. M в отношении представителей *Pseudomonas* флуоресцирующей группы

Штаммы <i>Pseudomonas</i>	Количество штаммов		
	проверенных	чувствительных	%
<i>putida</i>	7	7	100,0
<i>fluorescens</i>	12	11	91,6
<i>aeruginosa</i>	15	15	100,0

Пиовердин P_M проявляет антибактериальную активность не только в отношении бактерий других родов и видов (табл. 1), но и подавляющего большинства близкородственных *Pseudomonas* флуоресцирующей группы (табл. 2). Рядом авторов [18, 19] было установлено, что антибактериальная активность флуоресцирующих пигментов *Pseudomonas* проявляется только в отношении представителей других таксономических групп, в то время как пиовердин P_M подавляет рост всех испытываемых культур *Pseudomonas* независимо от их видовой принадлежности. Исходя из этого можно предположить, что изучаемый штамм либо принадлежит к новому виду флуоресцирующих бактерий *Pseudomonas*, либо син-

тезируемый его клетками пиовердин Р_М отличается от всех описанных ранее пигментов этого ряда. В любом случае необходимо отметить, что спектр антибактериального действия флуоресцирующего пигмента бактерий *Pseudomonas* sp. М не может служить удовлетворительным таксономическим критерием, определяющим видовую принадлежность.

Таблица 3

Характеристика питательных потребностей бактерий *Pseudomonas* sp. М и клеток типовых штаммов *Pseudomonas*

Группы	Субстрат	Тип реакции			
		<i>Pseudomonas</i> sp. М	<i>P. putida</i>		<i>P. fluorescens</i> биотип V-5*
			биотип А*	биотип Б*	
1	ацетат, сукцинат, фумарат, лактат, глутарат, цитрат, пируват, глицерин, п-оксибензоат, глюкоза, фруктоза, бутанол, этанол, L-аспарат, L-глутамат, L-аргинин, L-пролин, L-тирозин, L-фенилаланин, L-аланин, L-лейцин, L-изолейцин, L-валин, L-орнитин, L-гистидин, L-лизин	+	+	+	+
2	сорбит, целлобиоза, дульцит, лактоза, рамноза, п-инозит, L-треонин, L-норлейцин	—	—	—	—
3	малонат	+	±	+	±
	маннит	—	—	±	—
	D-ксилоза	—	—	+	—
	L-арабиноза	—	—	+	—
	сахароза	—	—	±	—
	D-манноза	—	—	+	—
	D-галактоза	—	—	+	—
	метанол	+	—	—	—
	изобутанол	—	+	+	+
	креатин	—	+	±	—
	ацетамид	—	±	+	—
	никотинат	—	+	—	—
	триптами	—	+	+	—
	бензиламин	+	+	+	—
	антранила	—	—	+	—
глицин	+	+	+	—	
L-серин	—	±	+	—	
L-триптофан	—	—	+	—	

Примечания: характеристика штаммов *P. putida* биотип А и биотип Б, а также *P. fluorescens* биотип V-5 взята из опубликованных работ [7, 20]; * — знак «+» обозначает положительную реакцию более чем у 75 % штаммов; знак «—» — отрицательную реакцию менее чем у 25 % штаммов; знак «±» указывает, что признак варьирует менее чем у 75 % штаммов, но более чем у 25 % штаммов.

Физиолого-биохимические признаки. В качестве источника азота бактерии *Pseudomonas* sp. M способны утилизировать соли аммония, мочевины и нитраты. Реакция на оксидазу и каталазу положительная; реакция Фогес — Проскауэра отрицательная. Индол и сероводород не образуют. Выделяют аммиак. При росте на средах, содержащих 5 %-й раствор сахарозы, леван не образуют. Тест на анаэробную денитрификацию отрицательный. Лецитиназная активность отсутствует. Аргининди-гидролазная реакция положительная. Не гидролизуют крахмал, желатин, Твин-80. Расщепление катехольного кольца при утилизации ароматических соединений осуществляется по орто-пути. Перечисленные выше признаки характерны для бактерий *Pseudomonas*, относящихся к видам *P. putida* и биотипу V-5 *P. fluorescens* (биотип V-5 соответствует биотипу G этого же вида по классификации Стениера [7]). Для окончательной видовой идентификации изучаемых бактерий исследовалась их способность утилизировать в качестве источников углерода различные органические соединения с последующим сравнением определяемых питательных потребностей с потребностями типовых штаммов (табл. 3). Как видно из таблицы, по характеру утилизации субстратов клетки штамма *Pseudomonas* sp. M отличаются от сравниваемых типовых штаммов лишь утилизацией веществ, входящих в третью группу. Сопоставляя характер потребления субстратов данной группы, обнаруживаем сходство изучаемых бактерий с бактериями *P. putida* биотипа A и *P. fluorescens* биотипа V-5, причем с последними в наибольшей степени.

Следует отметить, что систематическое положение бактерий, относящихся к *P. fluorescens* биотипу V-5, в настоящее время еще окончательно не определено, поскольку входящие в него представители по ряду признаков очень близки как к виду *P. putida*, так и к *P. fluorescens* [20]. В частности, клетки этого биотипа отличаются от *P. putida* биотипа A только отсутствием способности утилизировать никотинат, триптами, бензиламин и глицин, а от известных бактерий *P. fluorescens* — отрицательной реакцией на анаэробную денитрификацию, а также вариабельностью характера роста при 4 °C и разжижения желатины. В силу большого сходства представителей биотипа V-5 *P. fluorescens* и бактерий *P. putida* Баррет с соавторами [20] предложили отнести их к виду *P. putida*, выделив их в новый биотип C.

Основываясь на указанных выше рекомендациях и учитывая идентичность большинства признаков бактерий изучаемого штамма с клетками биотипа V-5 *P. fluorescens*, бактерии *Pseudomonas* sp. M целесообразно идентифицировать как *P. putida* биотип C, а поскольку клетки этого штамма обладают способностью утилизировать метанол, назвать его *P. putida* M. В свое время метанолутилизирующие бактерии *P. putida*, относящиеся к флуоресцирующей группе *Pseudomonas*, были уже описаны ранее Ямада с соавторами [21].

Необходимо отметить, что особое таксономическое положение бактерий *P. putida* M в сравнении с широко распространенными сапрофитными флуоресцирующими *Pseudomonas*, по-видимому, и обуславливает характер выявленного спектра антибактериальной активности синтезируемого ими пигмента (пиовердина P_M), подавляющего рост не только представителей *P. putida*, но также и большинства бактерий, относящихся к виду *P. fluorescens*.

Список литературы

1. Желдакова Р. А., Максимова Н. П., Кульба А. М., Фомичев Ю. К. // Молекул. генетика, микробiol. и вирусол. 1985. № 1. С. 22.
2. Олехнович И. Н., Максимова Н. П., Фомичев Ю. К. // Генетика. 1985. Т. 21. № 10. С. 1627.
3. Олехнович И. Н., Максимова Н. П., Фомичев Ю. К. // Там же. 1987. Т. 23. № 3. С. 414.
4. Максимова Н. П., Олехнович И. Н., Фомичев Ю. К. // Биохим. и физиол. метилотрофов. Пушкино, 1987. С. 77.

5. Максимова Н. П., Олехнович И. Н., Фомичев Ю. К. // Генетика. 1986. Т. 22. № 2. С. 194.
6. А. с. 1206306 СССР, МКИ⁴ С12 Р13/22, 1985.
7. Stanier R. Y., Palleroni N. J., Doudoroff M. // Journ. Gen. Microbiol. 1966. V. 43. P. 159.
8. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1984. № 1. P. 141.
9. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976. С. 391.
10. King E. O., Ward M. K., Raney D. E. // Journ. Lab. Clin. Med. 1954. V. 44. P. 301.
11. Скворцова И. Н. Методы выделения и идентификации почвенных бактерий рода *Pseudomonas*. М., 1981. С. 75.
12. Методы общей бактериологии. М., 1984. Т. 3. С. 8.
13. Norris J. R., Ribbons D. W. // Methods in Microbiol. 1971. V. 5A. P. 151.
14. Meyer J. M., Abdallah M. A. // Journ. Gen. Microbiol. 1978. V. 107. P. 319.
15. Fredericq P. // Annu. Rev. Microbiol. 1957. V. 11. P. 7.
16. Teintze M., Hossain M. B., Barnes C. L. et al. // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 6446.
17. Максимова Н. П., Блажевич О. В., Лысак В. В. // Тез. докл. «Новые направления биотехнологии». М., 1990. С. 44.
18. Hohnadel D., Meyer J. M. // Journ. of Bacteriol. 1988. V. 170. № 10. P. 4865.
19. Barbahaiya H. B., Rao K. K. // FEMS Microbiol. Lett. 1988. V. 51. P. 169.
20. Barret E. L., Solanes R. E., Tang J. S., Palleroni N. J. // Journ. Gen. Microbiol. 1986. V. 132. P. 2709.
21. Yamada S., Nabe K., Wada M., Chibata I. // Journ. Ferment. Technol. V. 55. № 5. P. 436.

УДК 597.554.3

Е. С. ЮРОЧКО

УРАВНЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ВРЕМЕНИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ КАРПА (*CYPRINUS CARPIO*) ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ ВОДЫ

Для организмов, не способных к саморегуляции температуры тела, такие важнейшие проявления жизнедеятельности, как развитие и рост, возможны лишь в определенном диапазоне температур среды обитания. Наличие нижнего и верхнего температурных порогов говорит о достаточно сложной форме зависимости темпов развития и роста таких организмов от температуры среды, хотя для ограниченного диапазона температур эту зависимость можно удовлетворительно описать даже уравнением прямой линии.

Изучать анализируемую зависимость лучше всего в эмбриональном периоде развития и роста, так как в этом случае исключается влияние другого мощного фактора — пищевого.

Естественно, что наиболее полные данные по влиянию температуры на пойкилотермные организмы можно найти для хозяйственно ценных видов, каким является важнейший объект рыбоводства — карп. Обобщенные данные по влиянию температуры воды на длительность периода эмбрионального развития карпа приведены в виде эмпирической вогнутой кривой в монографии В. Штеффенса [1]. Так, при температуре воды 15 °С длительность этого периода составляет в среднем 9,3 сут., при 20 °С — 4,1, при 30 °С — 1,5 сут.

Если вместо длительности периода эмбрионального развития (D , сут) на графике представить величину скорости развития ($v = 1/D$) от температуры (T), то получится S-образная кривая с точкой перегиба выше 1/2 максимальной скорости развития ($v_{\max} = 1/D_{\min}$). Такая зависимость в общем виде может быть описана 4-параметрической функцией логистического роста организмов [2], имеющей, применяя соответствующие обозначения, следующий вид:

$$\frac{1}{D} = \frac{1/D_{\min}}{(1 + Ce^{-aT})^n}, \quad (1)$$

где D — время эмбрионального развития, T — температура воды, n , a и C — константы, e — основание натуральных логарифмов.