

В.В. Шепелевич, Е.А. Киприанова, Л.В. Ярошенко, Л.В. Авдеева

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, ДО3680, Украина

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* К АНТИБИОТИКАМ И ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Изучение чувствительности 10 штаммов трёх подвидов *Pseudomonas chlororaphis* к 54 антибиотикам показало, что все исследованные представители *P.chlororaphis* subsp. *chlororaphis*, *P.chlororaphis* subsp. *aureofaciens* и *P.chlororaphis* subsp. *aurantiaca* были чувствительны к антибиотикам-аминогликозидам и препаратам группы фторхинолона. Лишь часть испытанных штаммов были чувствительны к некоторым β-лактамным антибиотикам, имипенему и меропенему. В отличие от представителей двух других подвидов, оба штамма *P.chlororaphis* subsp. *chlororaphis* оказались чувствительными к хлортетрациклину и цефепиму, что позволяет рассматривать это отличие как дифференцирующий признак. Все изученные штаммы *P.chlororaphis* были резистентными к химическим фунгицидам (Скор и Свитч) и регуляторам роста насекомых (Матч, Люфокс, Энжио, Актеллик). Устойчивость бактерий к этим гербицидам свидетельствует о возможности их совместного применения.

Ключевые слова: *Pseudomonas chlororaphis*, чувствительность к антибиотикам, синтетическим фунгицидам и регуляторам роста насекомых.

Описанный ещё в 1894 г. вид *Pseudomonas chlororaphis* включает в настоящее время три подвида – *P.chlororaphis* subsp. *chlororaphis*, *P.chlororaphis* subsp. *aureofaciens* и *P.chlororaphis* subsp. *aurantiaca*. Все они были ранее описаны как самостоятельные виды псевдомонад, однако в связи с генетической близостью и фенотипическим сходством объединены под одним видовым названием [5].

Несмотря на более чем столетнюю историю исследований, до сих пор в биологии *P.chlororaphis* не всё пока выяснено. Набор признаков, дифференцирующих подвиды, крайне ограничен. Не охарактеризована их чувствительность к антибиотикам и другим химическим агентам, которая (в случае отличий между подвидами) могла бы служить дополнительным критерием для их дифференциации.

Вопрос об отношении штаммов *P.chlororaphis* к различным по своему строению биологически активным веществам имеет и другой, чисто прикладной аспект. Штаммы *P.chlororaphis* subsp. *aureofaciens* являются перспективными агентами для биологического контроля заболеваний сельскохозяйственных растений [4]. Примером таких препаратов может служить био-препарат гаупсин [1, 6], созданный на основе двух штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* и обладающий наряду с антифунгальной и антибактериальной значительной энтомопатогенной активностью. А поскольку для борьбы с возбудителями заболеваний и насекомыми-вредителями широко используются химические средства защиты растений, актуальным является выяснение вопроса о чувствительности к ним штаммов *P.chlororaphis*, от чего зависят возможности их совместного использования.

Целью нашей работы было изучение чувствительности штаммов *P.chlororaphis* к антибиотикам и применяемым в практике сельского хозяйства химическим средствам защиты растений.

Материалы и методы. Объектом исследований служили 10 штаммов *P.chlororaphis*, поддерживаемых в Украинской Коллекции Микроорганизмов (УКМ), в том числе типовые штаммы двух подвидов *P.chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106^T (ATCC 9446^T) и *P.chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-108^T (ATCC 13985^T), штаммы, изолированные нами ранее из различных источников: *P.chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-107 (ризосфера банана), *P.chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-109, В-110, В-111 (почва), В-306 (ризосфера капусты), В-112 (ATCC 13986) а также штаммы *P.chlororaphis* subsp. *aurantiaca* (полученные ранее из Всесоюзной Коллекции Микроорганизмов как *P.aurantiaca*) УКМ В-113 (ВКМ В-548) и В-361 (ВКМ В-14). При испытании их чувствительности к антибиотикам для сравнения использовали типовой штамм *P.aeruginosa* В-1^T (ATCC 10145^T).

© В.В. Шепелевич, Е.А. Киприанова, Л.В. Ярошенко, Л.В. Авдеева, 2012

Чувствительность бактерий к антибиотикам исследовали на среде Мюллера-Хинтона диффузионным методом с использованием стандартных дисков фирмы HiMedia Labs Ltd с бензилпенициллином, оксациллином, ампициллином, амоксиклавом, карбенициллином, азлоциллином, пиперациллином, амоксициллином, тикарциллином, стрептомицином, неомицином, канамицином, гентамицином, тобрамицином, сизомицином, амикацином, нетилмицином, олеандомицином, эритромицином, азитромицином, кларитромицином, рокситромицином, линкомицином, клиндамицином, тетрациклином, доксициклином, хлортетрациклином, цефазолином, цефалексином, цефуросимом, цефтибутеном, цефаклором, цефотаксимом, цефтриаксоном, цефоперазоном, цефтазидимом, цефомандолом, цефепимом, фурадониним, фуразолидоном, нитроксилином, рифампицином, левомицетином, ванкомицином, тейкопланином, налидиксовой кислотой, офлоксацином, ципрофлоксацином, норфлоксацином, левофлоксацином, спарфлоксацином, пefлоксацином, имипенемом, меропенемом. Чувствительность либо устойчивость бактерий к антибиотикам оценивали согласно стандартам NCCLS [7].

Для изучения действия на бактерии химических инсекто- и фунгицидов использовали препараты фирмы «Сингента» (Швейцария), предлагаемые в Украине для защиты растений от возбудителей заболеваний и насекомых-вредителей: фунгициды Скор и Свитч и регуляторы роста насекомых Матч, Люфокс, Энжио, Актеллик. Препараты разводили в стерильной дистиллированной воде и вносили в расплавленный мясо-пептонный агар из такого расчета, чтобы их концентрация в питательной среде соответствовала максимальной концентрации растворов, используемых на практике, а также была в 2, 5 и 10 раз ниже. В качестве контроля в среду вносили дистиллированную воду. Приготовленные таким образом чашки засеивали суспензиями суточных культур бактерий (1×10^9 клеток в мл по стандарту Мак-Ферлайна). Опыты учитывали после 18 часов инкубации при 28 °C.

Результаты и их обсуждение. Изучение действия на штаммы *P.chlororaphis* 54 антибиотиков и синтетических лекарственных веществ различного химического строения показало, что представители этого вида высоко устойчивы к антимикробным агентам. В их числе пенициллин и ряд его полусинтетических производных (табл. 1). Карбенициллин, эффективный в отношении типового штамма *P.aeruginosa*, не действует на испытанные штаммы *P.chlororaphis*. Интересно, что штамм В-111, входящий в состав биопрепарата гаупсин, устойчив к азлоциллину и пиперациллину, в то время как второй компонент препарата – штамм В-306 – слабо чувствителен к первому антибиотику и чувствителен ко второму, что позволяет отличать эти штаммы один от другого и определять их соотношение в популяции в процессе ферментации.

Таблица 1

Чувствительность к антибиотикам штаммов различных подвидов *Pseudomonas chlororaphis*

Антибиотик	№№ исследованных штаммов <i>P. chlororaphis</i> subsp.									
	<i>chlororaphis</i>		<i>aureofaciens</i>					<i>aurantiaca</i>		
	106 ^г	107	108 ^г	109	110	111	306	112	113	361
	Зона задержки роста (мм)									
Азлоциллин	20 ^с	18 ^с	10 ^р	18 ^с	19 ^с	- ^р	17 ^р	15 ^р	16 ^р	23 ^с
Пиперациллин	28 ^с	27 ^с	18 ^с	23 ^с	24 ^с	13 ^р	18 ^с	20 ^с	17 ^р	27 ^с
Тикарциллин	25 ^с	20 ^с	0 ^р	12 ^р	15 ^р	- ^р	12 ^р	- ^р	- ^р	- ^р
Стрептомицин	20 ^с	10 ^р	- ^р	- ^р	11 ^р	- ^р	12 ^р	15 ^р	- ^р	- ^р
Неомицин	19 ^с	20 ^с	19 ^с	17 ^р	20 ^с	20 ^с	20 ^с	16 ^р	18 ^р	19 ^с
Канамицин	21 ^с	23 ^с	22 ^с	23 ^с	25 ^с	28 ^с	25 ^с	25 ^с	21 ^с	24 ^с
Гентамицин	21 ^с	20 ^с	19 ^с	17 ^с	19 ^с	25 ^с	22 ^с	19 ^с	17 ^с	17 ^с
Тобрамицин	21 ^с	21 ^с	20 ^с	21 ^с	20 ^с	26 ^с	26 ^с	19 ^с	17 ^с	19 ^с
Сизомицин	21 ^с	22 ^с	20 ^с	17 ^с	19 ^с	23 ^с	25 ^с	19 ^с	18 ^с	19 ^с
Амикацин	21 ^с	20 ^с	20 ^с	20 ^с	21 ^с	25 ^с	28 ^с	25 ^с	17 ^с	23 ^с
Нетилмицин	22 ^с	20 ^с	15 ^с	15 ^с	17 ^с	22 ^с	21 ^с	16 ^с	14 ^р	15 ^с
Тетрациклин	17 ^г	17 ^г	9 ^р	8 ^р	11 ^р	11 ^р	15 ^р	12 ^р	11 ^р	10 ^р
Доксициклин	15 ^г	17 ^с	9 ^р	10 ^р	9 ^р	14 ^р	10 ^р	9 ^р	10 ^р	10 ^р
Хлортетрациклин	20 ^с	19 ^с	10 ^р	12 ^р	12 ^р	13 ^р	15 ^г	10 ^р	13 ^р	12 ^р

Продолжение табл. 1

Цефотаксим	30 ^S	12 ^R	- ^R	10 ^R	12 ^R	- ^R	- ^R	10 ^R	- ^R	13 ^R
Цефтриаксон	25 ^S	10 ^R	- ^R	- ^R	- ^R	- ^R	- ^R	9 ^R	- ^R	- ^R
Цефоперазон	28 ^S	19 ^I	20 ^I	15 ^R	16 ^I	20 ^I	15 ^R	15 ^R	18 ^I	20 ^I
Цефтазидим	25 ^S	16 ^I	16 ^I	14 ^R	20 ^S	10 ^R	10 ^R	15 ^I	18 ^S	20 ^S
Цефепим	27 ^S	19 ^S	12 ^R	12 ^R	16 ^I	- ^R	14 ^R	11 ^R	17 ^I	14 ^R
Рифампицин	10 ^R	15 ^R	- ^R	- ^R	12 ^R	12 ^R	15 ^R	- ^R	9 ^R	9 ^R
Налидиксовая к-та	19 ^S	12 ^R	- ^R	- ^R	11 ^R	10 ^R	12 ^R	9 ^R	9 ^R	10 ^R
Офлоксацин	25 ^S	25 ^S	24 ^S	21 ^S	22 ^S	25 ^S	25 ^S	22 ^S	25 ^S	26 ^S
Ципрофлоксацин	26 ^S	25 ^S	25 ^S	26 ^S	30 ^S	30 ^S	30 ^S	25 ^S	28 ^S	30 ^S
Норфлоксацин	24 ^S	22 ^S	28 ^S	25 ^S	24 ^S	30 ^S	30 ^S	22 ^S	30 ^S	30 ^S
Левифлоксацин	24 ^S	25 ^S	28 ^S	20 ^S	25 ^S	26 ^S	25 ^S	22 ^S	30 ^S	30 ^S
Спарфлоксацин	24 ^S	27 ^S	22 ^S	20 ^S	26 ^S	22 ^S	25 ^S	20 ^S	23 ^S	26 ^S
Пефлоксацин	23 ^S	24 ^S	23 ^S	22 ^S	25 ^S	28 ^S	24 ^S	23 ^S	24 ^S	27 ^S
Имипенем	31 ^S	14 ^I	16 ^S	17 ^S	18 ^S	27 ^S	14 ^I	29 ^S	14 ^I	20 ^S
Меропенем	33 ^S	10 ^R	15 ^I	12 ^R	17 ^S	28 ^S	11 ^R	25 ^S	11 ^R	20 ^S

Примечание: S (sensitive) – чувствительные; I (intermediate) – промежуточные;
R (resistant) – устойчивые; - – зона угнетения роста отсутствует.

Все штаммы устойчивы: к пенициллину, оксациллину, ампициллину, карбенициллину, амоксициллину, амоксиклаву, олеандомицину, эритромицину, азитромицину, кларитромицину, рокситромицину, линкомицину, клиндамицину, цефазолину, цефалексину, цефуроксиму, цефтибутену, цефаклору, цефомандолу, фурадонину, фуразолидону, нитроксолону, хлорамфениколу, ванкомицину, тейкопланину.

Представители всех трех подвидов *P.chlororaphis* резистентны и к большинству антибиотиков цефалоспориновой группы. Только на единичные культуры действовали цефтриаксон, цефотаксим, цефоперазон. Неэффективными в отношении этого вида бактерий были макролиды и многие другие антибиотики и синтетические антимикробные препараты. Высокую антимикробную активность в отношении всех штаммов *P.chlororaphis* проявляли антибиотики-аминогликозиды (кроме стрептомицина) и препараты группы фторхинолонов (от офлоксацина до пефлоксацина включительно).

Таким образом, *P.chlororaphis* – высоко резистентный к антибиотикам вид, сходный по своим антибиограммам с синегнойными бактериями. На этом фоне обращают на себя внимание штаммы *P.chlororaphis* subsp. *chlororaphis*, которые с одной стороны, отличались более высокими уровнями чувствительности к антибиотикам в целом, чем остальные изученные культуры. С другой стороны представители этого подвида (в отличие от штаммов двух других подвидов) оказались чувствительными к хлортетрациклину и цефепиму.

Для окончательных выводов необходимо испытание на более широком наборе культур, однако полученные данные свидетельствуют о возможности пополнить немногочисленный перечень отличий между подвидами *P.chlororaphis* их чувствительностью к хлортетрациклину и цефепиму (табл. 2).

Таблица 2

Фенотипические отличия между подвидами *P.chlororaphis**

Признак	<i>P.chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i>	<i>P.chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i>	<i>P.chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>
Пигменты-производные феназина: хлорорафин	+	-	-
феназин-карбоксилат	-	+	+
Денитрификация	+	-	-
Ассимиляция: l-арабинозы	-	+	+
5-кетоглюконата	+	+	-
Чувствительность к тетрациклину	+	-	-
цефепиму	+	-	-

* по данным [3, 5] и настоящей работы

Представители подвидов «*aureofaciens*» и «*aurantiaca*» не отличались своими антибиограммами.

Целью наших исследований было также выяснение отношения штаммов *P.chlororaphis* к химическим средствам защиты растений.

Все 10 изученных нами штаммов различных подвидов хорошо росли в присутствии высоких доз фунгицидов: 25–250 мкг/мл дифеноксазола и 180–1800 мкг/мл ципродинила в комбинации с 120–1200 мкг/мл флудиоксонила. Не ингибировали их рост и регуляторы роста насекомых: люфенурон (60–600 мкг/мл), феноксикарб (150–1500 мкг/мл), лямбда-цигалотрин и тиаметоксам (3,8–38 мкг/мл и 5–50 мкг/мл, соответственно), метилпиримифос (100–1000 мкг/мл).

Полученные данные касались всех исследованных нами штаммов *P.chlororaphis*. Более детально мы сосредоточимся на двух из них – компонентах препарата гаупсин.

Из таблицы 3 видно, что активность гаупсина направлена против широкого спектра возбудителей заболеваний и насекомых-вредителей. Большинство этих патогенов и вредителей являются и мишенью действия химических средств защиты растений.

Таблица 3

**Спектр биологической активности гаупсина
и некоторых химических средств защиты растений**

Название препарата	Активные компоненты, входящие в состав препарата	Характер биологической активности	Грибные заболевания и насекомые-вредители, чувствительные к препарату
Гаупсин	Штаммы <i>P.chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> УКМ В-111, УКМ В-306	Инсекто-фунгицид	Оидиум, мильдью, черная пятнистость, серая гниль, мучнистая роса, аскохитоз, вертициллез, септориоз, фузариоз, фитоспороз, макроспориоз, пероноспороз и др. грибные инфекции; многие виды листоверток, тлей, пядениц, огневков, плодожеров, яблоневая моль, колорадский жук и др.
Скор	Дифеноксазол	Фунгициды	Парша, мучнистая роса, альтернариоз, фитофтороз, серая гниль, белая и бурая пятнистость, плодовые гнили при хранении
Свитч	Ципродинил+ Флудиоксонил		
Матч	Люфенурон	Регуляторы роста насекомых	Чешуекрылые, плодожеры, листовертки, клещи, моли, щитовки, тли, пыльщики, трипсы, колорадский жук, долгоносики и др.
Люфокс	Феноксикарб + Люфенурон		
Энжио	Лямбда-цигало-трин + Тиаметоксам		
Актеллик	Метилпиримифос		

Расход гербицидов для защиты яблоневого сада (взятого в качестве примера) составляет 7,5–9,0 кг инсектицидов и 12–14 кг фунгицидов за сезон на каждом гектаре [1]. По-видимому их совместное применение с гаупсином (о возможности которого свидетельствует устойчивость штаммов *P.chlororaphis* subsp. *aureofaciens* – компонентов биопрепарата гаупсин – к средствам химической защиты растений) могло бы привести к суммарному полезному эффекту, а с другой стороны – к сокращению расхода химических препаратов, существенному уменьшению пестицидного пресса на биоценозы и получению урожая, свободного от вредных химикатов.

Это предположение подтверждается сообщениями о попытках успешного применения гаупсина в комбинации с химическими средствами защиты растений в виде смесей для обработки садов и виноградников [2], причем штаммы, входящие в состав гаупсина, были несовместимы только с бордосской жидкостью и препаратами, содержащими медь. Таким образом, выводы, полученные в настоящей работе, находятся в соответствии с результатами работы садоводов-практиков, полученными эмпирическим путём.

В.В.Шепелевич, О.А.Кіпріанова, Л.В.Ярошенко, Л.В.Авдєєва

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
Київ*

**ЧУТЛИВІСТЬ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS*
ДО АНТИБІОТИКІВ І ХІМІЧНИХ ЗАСОБІВ ЗАХИСТУ РОСЛИН**

Резюме

Дослідження чутливості 10 штамів різних підвидів *Pseudomonas chlororaphis* до 54 антибіотиків показало, що всі досліджені представники *P.chlororaphis* subsp. *chlororaphis*, *P.chlororaphis* subsp.

aureofaciens і *P.chlororaphis* subsp. *aurantiaca* були чутливі до антибіотиків-аміноглікозидів та препаратів групи фторхінолону. Лише частина досліджених штамів були чутливими до деяких β – лактамних антибіотиків, імпенему і меропенему.

На відміну від представників двох інших підвидів обидва штами *P.chlororaphis* subsp. *chlororaphis* виявилися чутливими до хлор- тетрацикліну і цефепіму, що дозволяє розглядати цю відміну як диференціюючу ознаку.

Всі досліджені штами *P.chlororaphis* були резистентними до хімічних фунгіцидів (Скор і Світч) і регуляторам росту комах (Матч, Люфокс, Енжіо, Актеллік). Стійкість бактерій до цих гербіцидів свідчить про можливість їх спільного застосування.

К л ю ч о в і с л о в а : *Pseudomonas chlororaphis*, чутливість до антибіотиків, синтетичних фунгіцидів і регуляторів росту комах

V.V.Shepelevich, E.A.Kiprianova, L.V.Yaroshenko, L.V.Avdееva

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

SENSITIVITY OF *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* TO ANTIBIOTICS AND CHEMICAL TOOLS OF PLANT PROTECTION

S u m m a r y

Examination of sensitivity of 10 *Pseudomonas chlororaphis* strains belonging to different subspecies to 54 antibiotics has shown that all studied representatives of *P.chlororaphis* subsp. *chlororaphis*, *P.chlororaphis* subsp. *aureofaciens* and *P.chlororaphis* subsp. *aurantiaca* were sensitive to aminoglycoside antibiotics and fluoroquinolones derivatives. Only part of studied strains has shown sensitivity to some β-lactam antibiotics, imipenem and meropenem.

In contrast to representatives of two other subspecies both strains of *P.chlororaphis* subsp. *chlororaphis* proved to be sensitive to chlortetracycline and cefepime that allows to consider this difference as the characteristic useful for differentiation.

All studied *P.chlororaphis* strains were resistant to chemical fungicides (Scor and Switch) and the insect growth regulators (Match, Lufox, Engio, Actellik). Resistance of bacteria to these herbicides gives evidence that their combined use is possible.

The paper is presented in Russian.

К e y w o r d s : *Pseudomonas chlororaphis*, sensitivity to antibiotics, synthetic fungicides and insect growth regulators.

The author's address: Shepelevich V.V., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Гораль В.М., Ланна Н.В., Гораль С.В., Гарагуля А.Д., Киприанова Е.А., Омелянец Т.Г., Смирнов В.В. Инсектофунгицидный препарат гаупсин на основе штаммов *Pseudomonas aureofaciens* // Прикл. Биохим. Микробиол. – 1999. – 35, № 5. – С. 596–598.
2. Гриценко А. Н. Биологический лекарь наших садов и виноградников // Сад, виноград і вино України. – 2004. – № 5–6. – С. 42–43.
3. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. – Киев: Наук. думка, 1990. – 263 с.
4. Miller S.H., Mark G.L., Franks A., O.Gara F. *Pseudomonas* – Plant Interactions : *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen, Cell Factory / Ed. by B.H.Rehm. – Weinheim :Wiley-VCH Verlag, 2008. – P. 353–370.
5. Peix A., Valverde A., Rivas R., Igual J., Ramirez-Bahena M., Mateos P., Santa-Regina I., Rodrigues-Barrueco C., Martinez-Molina E., Velazquez E. Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* as a synonym of *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P.chlororaphis* subsp.*chlororaphis* subsp. nov., *P.chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov., comb. nov. and *P.chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov., comb. nov. // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – 57. – P.1286–1290.
6. Патент України № 73682 АО ІN 63/00 С 12 N 1/20. Инсектофунгицидный препарат гаупсин для борьбы із шкідниками і хворобами сільськогосподарських культур / О.А. Кіпріанова, С.В. Гораль. – Опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8.
7. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth Informational Supplement // Clinical and Laboratory Standards Institute. – 2005. – 25, N 1. – P. 87–151.

Отримано 10.02.2012