

Л. Д. ШАФОРОСТОВА, И. И. ИВАНОВА, И. Л. РАБОТНОВА

**ИЗМЕНЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА КЛЕТОК В СВЯЗИ
С НЕРАВНОМЕРНОСТЬЮ РОСТА В ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНОЙ
ФАЗЕ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ *VAC. MEGATERIUM***

(Представлено академиком А. А. Имшенецким 5 I 1971)

Установилось мнение, что в период самого быстрого роста в экспоненциальной фазе бактерии размножаются с постоянной скоростью ⁽¹⁾ при постоянном соотношении полимеров, содержащихся в клетке ⁽²⁾. В последнее время появились лишь единичные сообщения о разнокачественности клеток в период экспоненциального роста ⁽³⁾. Ранее нами было показано, что культура *Vac. megaterium* при выращивании на синтетической среде растет с неравномерной скоростью в экспоненциальной фазе ⁽⁴⁾. Это явилось причиной для изучения содержания основных полимеров клетки *Vac. megaterium* по ходу роста.

Культура выращивалась на синтетической среде следующего состава (в %): 0,3 лимоннокислого натрия; 0,05 K_2HPO_4 ; 0,1 NH_4Cl , 0,02 $NaCl$; 0,02 $MgSO_4$; 10 мг/л $CoCl_2$; 15 мг/л $MnSO_4$. Перед опытом культура в течение 3 дней пересеивалась дважды в день. Посевной материал вносился в бутылки с 10 л среды, тщательно перемешивался и плотность суспензии доводилась средой до 0,1 по показаниям нефелометра. Затем культура быстро разливалась по колбам по 250 мл (общей емкостью 750 мл) и ставилась на качалку, обеспечивающую аэрацию 0,5 г O_2 / л·час по сульфитному числу. Все операции проводились в термостате при $t = 28^\circ$. Пробы для анализов отбирались каждый час и в них определяли: оптическую плотность на нефелометре ФЭК-57 с фильтром 10, в кювете с толщиной слоя 1 см, pH — на потенциометре ЛП-58. В культуральной жидкости определяли содержание α -кетоглутаровой кислоты по Фридеману ⁽⁵⁾, пировиноградной кислоты — по видоизмененному методу Умбрайт — Ивченко ⁽⁶⁾, уксусной кислоты — методом паровой отгонки по Фролову-Багрееву ⁽⁷⁾. В биомассе определяли количество РНК — спектрофотометрически и ДНК — по методу Дине в модификации Бартона ⁽⁸⁾, общее содержание полисахаридов по реакции с антроном ⁽⁹⁾, белок по Лоури ⁽¹⁰⁾, сумму липидов без поли- β -оксимасляной кислоты по Фольчу ⁽¹¹⁾, поли- β -оксимасляную кислоту — по методу Лау ⁽¹²⁾. Капсулы наблюдались в препарате живых клеток с тушью с последующим подсушиванием их на воздухе, фиксированием 10 мин. в этаноле и подкрашиванием фуксином.

Как видно из рис. 1, колебания удельной скорости роста сопровождались изменениями в содержании основных полимеров клетки в расчете на единицу биомассы. Наиболее стабильным полимером оказалась ДНК. Содержание РНК в биомассе увеличивалось параллельно скорости роста и описывалось кривой с двумя пиками. Динамика содержания белка была отличной от динамики РНК. В момент нарастания скорости роста перед первым пиком μ происходило сокращение количества белка, а перед вторым — возрастание. Переход культуры в стационарную фазу сопровождался уменьшением содержания белка в биомассе. До конца экспоненциальной фазы роста динамика содержания полисахаридов в клетках не отличалась от динамики синтеза белка. В периоды ускорений скорости роста (первый и второй пик μ) количество их значительно уменьшалось. При переходе культуры в стационарную фазу роста наблюдалось повторное накопление полисахаридов в биомассе. Синтез липидов и поли- β -оксимасляной кислоты проходил также неравномерно. После первого пика μ и перед вторым содержание липидов было наибольшим. Меж-

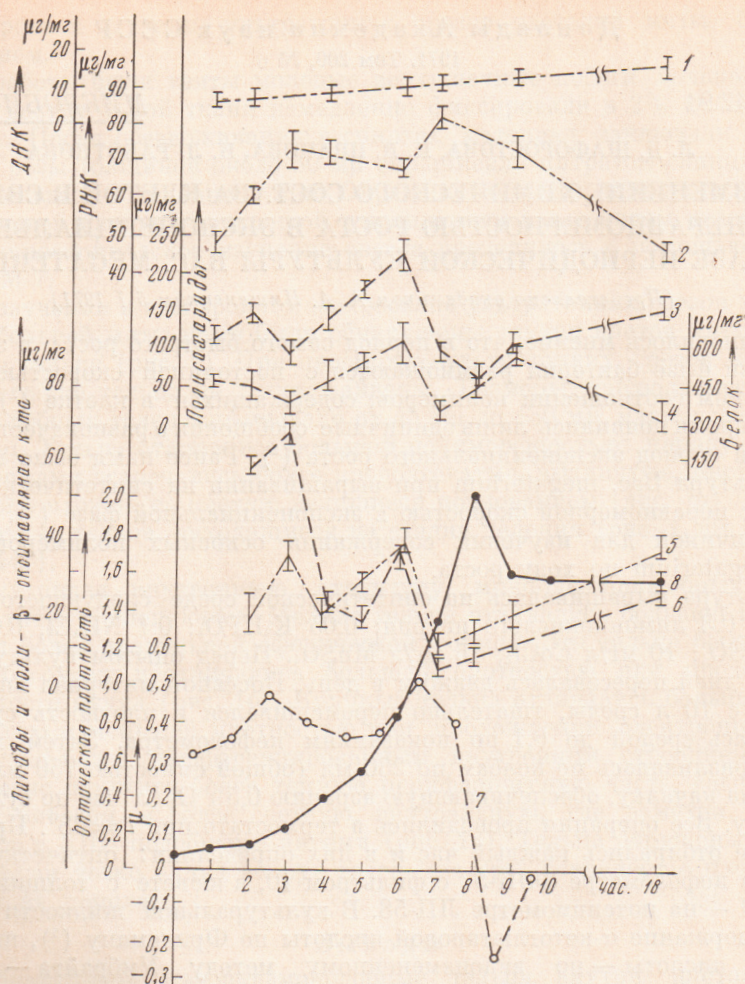


Рис. 1. Динамика синтеза основных полимеров клетки *Bac. megaterium* в расчете на единицу биомассы. 1 — ДНК, 2 — РНК, 3 — полисахариды, 4 — белок, 5 — липиды, 6 — поли- β -оксимасляная кислота, 7 — μ (удельная скорость роста), 8 — оптическая плотность

ду максимумами μ количество липидов уменьшалось. Содержание поли- β -оксимасляной кислоты изменялось параллельно остальным липидам. В стационарной фазе содержание обоих полимеров возрастало. В культуральной жидкости из органических кислот были обнаружены только уксусная, пировиноградная и α -кетоглутаровая кислоты (рис. 2). В самом начале роста интенсивно потреблялась лимонная кислота, что сопровождалось выделением уксусной, пировиноградной и α -кетоглутаровой кислот. В этот период роста количество кислот в среде в расчете на единицу биомассы было максимальным. По ходу дальнейшего роста культуры потребление лимонной кислоты происходило неравномерно, а выделение кислот резко сокращалось. Таким образом, если первый пик μ совпадал с активным образованием и потреблением кислот, то во время второго пика участие их в обмене веществ сократилось до минимума. Второму пику μ предшествовало накопление резервных полимеров в биомассе, а затем их быстрое потребление, совпадающее со вторым ускорением роста. При микроскопировании клеток с тушью вокруг цепочек и отдельных бактерий обнаружены зоны, не прокрашивающиеся фуксином и не допускающие тушь к клеткам (рис. 3).

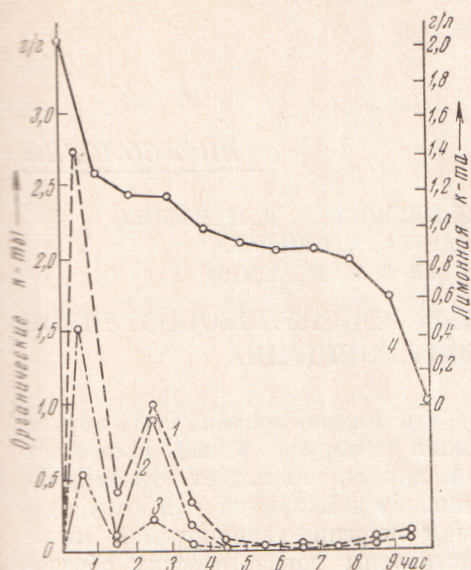


Рис. 2

Рис. 2. Динамика образования органических кислот *Bac. megaterium* в культуральной жидкости. 1 — уксусная кислота, 2 — пировиноградная кислота, 3 — α -кетоглутаровая кислота, 4 — остаточная лимонная кислота



Рис. 3

Рис. 3. Образование капсул у *Bac. megaterium*

В отличие от бактериальных капсул, эти зоны не имели постоянной формы. Цепочки клеток занимали то центральное, то периферическое положение. По мере роста культуры изменялись размеры зон, длина и форма цепочек клеток. Положение отдельных клеток и цепочек внутри капсул свидетельствует о том, что вещество капсул не является плотным. После промывания дистиллированной водой с pH 8,5 размер зон увеличился, при pH 1,0 и 3,0 сократился по сравнению с контролем (промывание водой).

Таким образом, экспоненциальная фаза роста *Bac. megaterium* отличается от классического образца, описанного Моно. Она представляет собой многостадийный процесс с определенной последовательностью синтеза и потребления основных полимеров клетки. Ускорение и замедление роста в экспоненциальной фазе связаны с изменением характера обмена веществ. Первый максимум μ совпадает в основном с потреблением лимонной кислоты и образовавшихся из нее органических кислот. Затем синтезируются резервные вещества. Второй максимум μ совпадает с потреблением накопившихся ранее полимеров клетки: белка, полисахаридов, липидов и поли- β -оксимасляной кислоты.

Институт микробиологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
5 I 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. Monod, Recherches sur la croissance des cultures bactériennes, 1942.
- ² J. Mandelstam, K. McQuillen, Biochem. of Bacterial Growth, Oxford — Edinburgh, 1968.
- ³ A. Castelli, G. Barbaresi et al., Italian J. Biochem., **18**, № 2, 91 (1969).
- ⁴ Л. Д. Шафоростова, И. И. Иванова, И. Л. Работнова, Микробиология, **40**, № 3, 397 (1971).
- ⁵ Т. Е. Friedemon, G. Е. Naugen, J. Biol. Chem., **147**, 415 (1943).
- ⁶ Г. М. Ивченко, О. Д. Кушманова, Руководство к практическим занятиям по биологической химии, 1966, стр. 163.
- ⁷ А. М. Фролов-Багреев, Г. Г. Агабальянц, Химия вина, 1951, стр. 327.
- ⁸ K. Barton, Biochem. J., **62**, 315 (1956).
- ⁹ Г. Н. Зайцева, Т. П. Афанасьева, Биохимия, **22**, 1037 (1957).
- ¹⁰ O. H. Lowry, N. J. Rosengroph et al., Biol. Chem., **193**, 265 (1961).
- ¹¹ J. Folch, M. Less, C. G. Stanleys, J. Biol. Chem., **226**, 497 (1957).
- ¹² J. H. Law, R. A. Slepceky, J. Bacteriol., **82**, № 1, 33 (1961).