

УДК 576.8.094.81

МИКРОБИОЛОГИЯ

Член-корреспондент АН СССР Н. А. КРАСИЛЬНИКОВ,  
В. И. ДУДА, Г. ГОНЧИКОВ, Т. В. КОРОНЕЛЛИ

### ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ВЫРОСТОВ НА СПОРАХ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

Целью данной работы было получение чистых фракций выростов (<sup>1-5</sup>, <sup>10-13</sup>) спор двух анаэробных бактерий и сравнительное изучение их химического состава. Для исследований использованы: *Clostridium taeniosporum*, шт. 1к, споры которого обладают крупными лентовидными выростами и *Bacillus penicillus*, шт. 3к, образующий споры с трубчатыми выростами.

Культуру *Cl. taeniosporum*, шт. 1к длительно выращивали на пластинках МПА, содержащего 0,5% глюкозы, 0,1% дрожжевого автолизата и 0,5% мела. Посевы инкубировали в микроанаэроstats марки Ми ЛенЭМО 15 суток при 28°. Споры с поверхности среды смывали дистиллированной водой. *Bac. penicillus*, шт. 3к выращивали в колбах с МПБ, содержащим 0,5% глюкозы, 0,1% дрожжевого автолизата и 0,5% мела. Инкубацию проводили в вакуумных шкафах 15 суток при 28°. Свободные споры концентрировали центрифугированием.

Для очистки спор от вегетативных клеток и детрита проводили многократное промывание дистиллированной водой путем низкоскоростного **центрифугирования**. В случае необходимости применяли кратковременную обработку суспензий спор ультразвуком для разрушения вегетативных клеток с последующим промыванием спор дистиллированной водой.

Чистые суспензии спор практически не содержали вегетативных клеток и их остатков. Потемневшие в процессе обработки споры составляли менее одного процента. Фракции покровов спор получали путем автоклавирования зрелых спор 2 часа в 0,1 N HCl при 121° для гидролиза материала, не входящего в покровы (<sup>16</sup>). Перед автоклавированием споры озвучивались для удаления выростов.

Для отделения выростов от спор суспензию спор обрабатывали ультразвуком на установке УЗДН-1 в течение 10—15 мин. при частоте колебаний 15 кгц. При таком режиме озвучивания не происходит разрушения самих спор. Затем озвученную суспензию центрифугировали, при этом споры осаждались, а выросты оставались в надосадочной жидкости. Далее выросты концентрировали и многократно промывали дистиллированной водой путем центрифугирования при 18000 об/мин. 20 мин. Чистоту фракций выростов контролировали электронномикроскопически и спектрофотометрически. У.-ф. спектры суспензий выростов сняты на спектрофотометре «Спектромом».

Общее количество белков определяли с помощью реактива Фолина, полисахариды — по методике Молиша (<sup>1</sup>). В качестве контроля использовали водную суспензию выростов без реагента. Стандартные кривые получены: для белков по альбумину; для полисахаридов (гексозы и пентозы) по глюкозе. Интенсивность окрашивания измерялась на фотозлектроколориметре ФЭК-М. Липиды экстрагировали хлороформом из кислотного гидролизата выростов спор *Cl. taeniosporum*, шт. 1к. Для разделения липидов использовали тонкослойную хроматографию в слое силикагеля марки КСК. Далее высшие жирные кислоты этерифицировали метанолом. Фракцию метиловых эфиров очищали на пластинках с силикагелем и анализировали методом газо-жидкостной хроматографии (г.ж.х.) на приборе

Хром-2. (Неподвижная фаза — полиэтиленгликольадипат, длина колонки 1,7 м, газ-носитель азот, 50 мл/мин, давление 0,48 атм., температура 190°).

Для изучения аминокислотного состава выросты гидролизovali в 6 N HCl при 107° в течение 24 час.

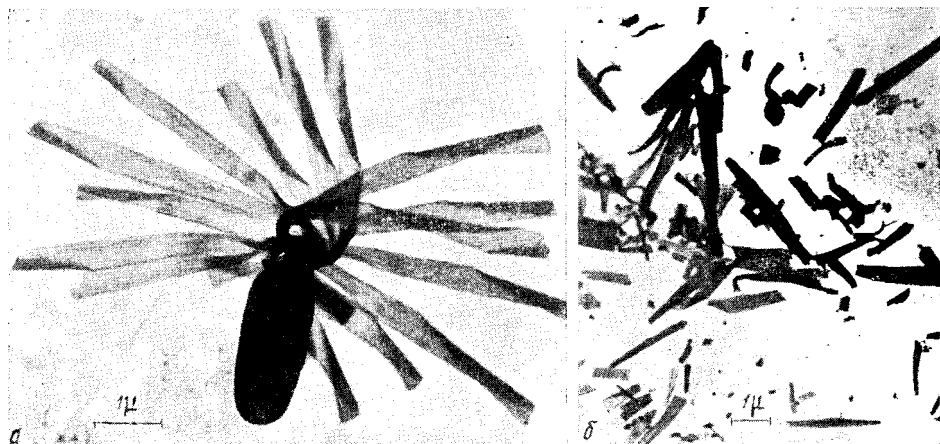


Рис. 1. Зрелая свободная спора *Clostridium taeniosporum*, шт. 1к с лентовидными отростками (а) и очищенная фракция выростов спор (б)

Электронномикроскопический контроль показал высокую степень чистоты фракций выростов (рис. 1). Фракции состояли из одиночных или собранных в пучки лентовидных (шт. 1к) или трубчатых (шт. 3к) выростов, а также из кусочков выростов различных размеров. В суспензиях выростов практически не содержалось спор и вегетативных клеток.

Кривая адсорбционного спектра обоих типов выростов в ультрафиолетовой области не имеет характерного для нуклеиновых кислот пика около 260 мμ. Это указывает, с одной стороны, на отсутствие нуклеиновых кислот в составе выростов, с другой, — на отсутствие примесей материала цитоплазмы во фракциях выростов (Станиславский, 1971 г.). На кривых поглощения в ультрафиолетовой области спектра суспензиями лентовидных и трубчатых выростов наблюдается «плато» от 260 до 290 мμ.

Осадок выростов — белый, в суспензиях наблюдается опалесценция. Оба типа выростов дают положительную цветную реакцию с реактивами Фолина и Молиша. Белки, определенные полуколичественно, составляют около 70% в лентовидных выростах и около 75% — в трубчатых выростах. Полисахариды (в глюкозных эквивалентах) составляют около 10% в лентовидных выростах и около 5% — в трубчатых.

В гидролизате лентовидных выростов спор *Cl. taeniosporum*, шт. 1к обнаружены высшие жирные кислоты и вещества, по своей хроматографической подвижности близкие к высшим жирным спиртам. Методом г.ж.х. выявлены ундекановая и пальмитиновая кислоты.

В кислотном гидролизате лентовидных выростов *Cl. taeniosporum* шт. 1к обнаружено 18 обычных аминокислот: аспарагиновая, глутаминовая кислоты, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, серин, треонин, тирозин, лизин, аргинин, цистин, цистеиновая кислота, пролин, гистидин и метионин. В трубчатых выростах *Bac. penicillus*, шт. 3к обнаружены те же аминокислоты, за исключением цистина. Таким образом, различные по морфологии и строению выросты у двух разных видов бактерий имеют одинаковый аминокислотный состав. Количественное соотношение аминокислот также сходно у обоих типов выростов.

Из рис. 2 видно, что для выростов характерно высокое содержание неполярных алифатических и ароматических аминокислот. Сумма неполяр-

ных аминокислот (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин) составляет 44% от всех аминокислот лентовидных выростов и 40,4% — трубчатых выростов. Гидроксилсодержащие аминокислоты (серин, треонин и тирозин) у лентовидных выростов составляют 20%, а у трубчатых 16,4%. Около 23% аминокислот обоих типов выростов приходится на долю кислых аминокислот. В значительных количествах в выростах содержится пролин. Доля основных аминокислот незначительна: 6,5% — у лентовидных выростов и 11% — у труб-

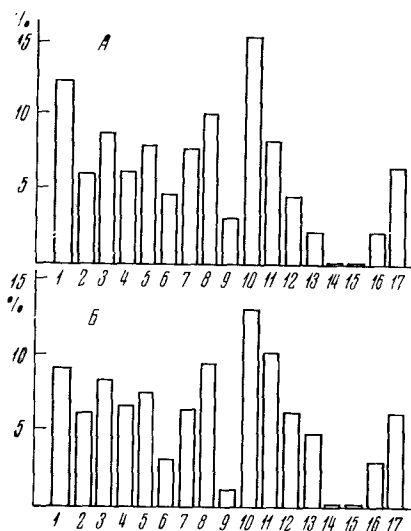


Рис. 2

Рис. 2. Аминокислотный состав выростов на спорах *Cl. taeniosporum*, шт. 1к (А) и *Bac. penicillus*, шт. 3к (В). 1 — глицин, 2 — аланин, 3 — валин, 4 — лейцин, 5 — изолейцин, 6 — фенилаланин, 7 — серин, 8 — треонин, 9 — тирозин, 10 — аспарагиновая кислота, 11 — глутаминовая кислота, 12 — лизин, 13 — аргинин, 14 — гистидин, 15 — метионин, 16 — цистеиновая кислота 17 — пролин

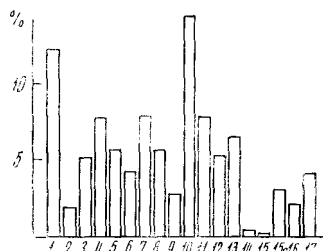


Рис. 3

Рис. 3. Аминокислотный состав покровов спор *Cl. taeniosporum*, шт. 1к. 15а — цистин. Остальные обозначения аминокислот — как на рис. 2

чатых. Серосодержащие аминокислоты имеются в малых количествах. Цистин в трубчатых выростах отсутствует, в лентовидных — содержится в следовых количествах.

Таким образом, подавляющее количество аминокислот в лентовидных и трубчатых выростах представлено неполярными гидроксилсодержащими и кислыми аминокислотами; их сумма по отношению ко всем аминокислотам у лентовидных выростов составляет 90%, а у трубчатых 85%. Белок, вычисленный как сумма аминокислотных остатков, у лентовидных выростов составлял 73,8% сухого веса, а у трубчатых 75,6%. Негидролиземый остаток выростов равнялся около 3—7%. При сравнении рис. 2 и 3 видно, что в споровых покровах значительно больше цистина и меньше аланина, чем в выростах.

Из прямых химических анализов высокоочищенных фракции выростов можно сделать вывод, что лентовидные и трубчатые придатки спор изученных анаэробных бактерий состоят в основном из белка, и в этом отношении они сходны с веществом споровых покровов. Кроме того, в состав выростов входят полисахариды и липиды. Кривые адсорбционного спектра выростов указывают на отсутствие в них нуклеиновых кислот, пуриновых и пиримидиновых оснований.

По качественному и количественному составу аминокислот белок выростов не соответствует ни одному из известных белков, описанных в работе Триста и Смита<sup>(14)</sup>. Вероятно, выросты состоят из разных индивидуальных белков или же из белка своеобразной химической природы.

Таким образом, выросты бактериальных спор являются сложными по химической природе образованиями, состоящими из разных классов химических соединений. Это находится в соответствии с данными по ультра-

тонкому строению выростов различных типов, представляющих собой также сходные образования, составленные из упорядоченно расположенных шаровидных субъединиц и микрофибрилл, которые как бы «сцементированы» аморфным материалом.

Большое сходство аминокислотного состава белковых компонентов различных морфологических типов выростов — лентовидных и трубчатых. Это указывает на то, что структурный остов разных типов состоит, вероятно, из белковых соединений идентичной природы. Поэтому функциональная роль выростов разных типов может быть сходной. Необходимо отметить, что химическому анализу подвергались выросты зрелых спор. Выросты же у преспор могут иметь несколько иное строение и химический состав (<sup>2</sup>). Особенно это необходимо иметь в виду при изучении ферментативной активности выростов. Например, у *Vac. penicillus*, шт. 3к трубки выростов преспор заполнены цитоплазматическим веществом. При этом внутри трубок происходит активная редукция теллурита калия. При созревании спор редуцирующая активность выростов затухает, а трубки выростов запустевают.

При предварительном и частичном анализе состава лентовидных выростов спор *Cl. taeniosporum*, шт. 1к (<sup>15</sup>) обнаружено 18 аминокислот. К сожалению, в этой работе, опубликованной в виде тезисов доклада, не приводятся сведений с количественном соотношении аминокислот. Авторы лишь указывают, что не нашли преобладания какой-либо аминокислоты. Гистидин и метионин обнаружены в следовых количествах. Йолтон и Роде заключают, что по составу выросты близки к оболочке бактериальных спор. При сопоставлении наших данных по составу аминокислот выростов с таковыми оболочек бактериальных спор в целом (<sup>9</sup>) мы не смогли найти между ними полного сходства. Так, цистин, находящийся в больших количествах в споровой оболочке, либо полностью отсутствует в выростах (шт. 3к), либо обнаруживается в следовых количествах. С другой стороны, выросты содержат до 10% (в пересчете на сухой вес) полисахаридов. В работах (<sup>2</sup>, <sup>6</sup>) цитохимическими методами в сочетании с электронной микроскопией было показано, что при «окраске» срезов метенамином серебра полисахариды обнаруживаются в выростах и в кортексе, но отсутствуют в споровой оболочке.

Таким образом, данные химических анализов совпадают с результатами цитохимических наблюдений. Кроме того, в трубчатых выростах (*Vac. penicillus*, шт. 3к) обнаружена повышенная активность окислительно-восстановительных ферментов, определяемая по восстановлению теллурита калия. Все эти данные свидетельствуют об особом составе и ферментативной активности выростов и, следовательно, об их специфической функциональной роли в процессе спорообразования.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
9 XII 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Д. Дише, В кн. Методы химии углеводов, 1967, стр. 21. <sup>2</sup> Н. А. Красильников, В. И. Дуда, ДАН, 179, № 4, 970 (1969). <sup>3</sup> Н. А. Красильников, В. И. Дуда, А. А. Соколов, ДАН, 152, № 3, 735 (1963). <sup>4</sup> Н. А. Красильников, В. И. Дуда, Г. Е. Пивоваров, Микробиология, 37, 3, 488 (1968). <sup>5</sup> Н. А. Красильников, В. И. Дуда, А. А. Соколов, Микробиология, 33, 3, 454 (1964). <sup>6</sup> Н. А. Красильников, В. И. Дуда, Е. Д. Макарьева, ДАН, 203, № 1 (1972). <sup>7</sup> Е. С. Станиславский, Бактериальные структуры и их антигенность, М., 1971. <sup>8</sup> W. Hodgkiss, Z. J. Ordal, J. Bacteriol., 91, 5, 2031 (1966). <sup>9</sup> W. G. Murrel, In: Bacterial Spore, London, 1969. <sup>10</sup> W. Hodgkiss, Z. J. Ordal, D. C. Cann, J. Gen. Microbiol., 47, 213 (1967). <sup>11</sup> L. Pope, D. P. Yolton, L. J. Rode, J. Bacteriol., 94, 1206 (1967). <sup>12</sup> L. J. Rode, M. A. Crawford, M. G. Williams, J. Bacteriol., 93, 5, 1160 (1967). <sup>13</sup> W. A. Samsonoff, T. Hashimoto, F. Conti, J. Bacteriol., 101, 3, 1038 (1970). <sup>14</sup> G. R. Tristram, R. H. Smith, In: Advances Protein Chem., 18, 223 (1963). <sup>15</sup> D. R. Yolton, L. J. Rode, Bact. Proceedings, 1969, p. 23. <sup>16</sup> T. W. Hunnel, Z. J. Ordal, Spores 2, Symposium, Minneapolis, Minn., U. S. A., 1960, p. 101.