

В. В. ЮРКЕВИЧ, Л. С. ЛАГУТИНА

**СОРБЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕНИЦИЛЛИНАЗЫ
КАК МЕХАНИЗМ ПРИОБРЕТЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ
К ПЕНИЦИЛЛИНУ**

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 17 IV 1972)

Установлено, что клетки дрожжей, особенно в условиях брожения, сорбируют из среды различные ферментные белки (¹⁻⁴). Сорбированный белок может использоваться как источник питания (⁴). Биологическое значение сорбции ферментов состоит также в том, что связанный с клеточной поверхностью фермент частично сохраняет активность и тем самым обогащаются биохимические свойства клеток (^{2, 3}). Можно было предположить, что клетки бактерий, не имеющие собственной пенициллиназы и чувствительные к пенициллину, в случае приобретения ими пенициллиназы путем сорбции ее из среды, попав затем в среду с антибиотиком, должны будут проявить к нему устойчивость. Настоящая работа посвящена обнаружению этого явления.

Необходимо было найти среди бактерий организм, который был бы чувствительным к пенициллину и обладал бы способностью сорбировать из среды пенициллиназу.

В результате испытаний различных видов и штаммов мы остановились на молочнокислой гетероферментативной бактерии *Lactobacterium arabinosus*.

Культура этого организма, выделенная из квашеной капусты, получена нами из музея культур кафедры микробиологии Московского университета*. Бактерия поддерживалась на 10-баллинговом пивном сусле. Для опытов культуры выращивались в течение 48 час. при 30° в 50 мл среды Ридер (⁵) с 2% глюкозы и 5% и 10%-го дрожжевого экстракта. Биомасса отделялась центрифугированием и дважды промывалась водой. Высокоочищенный препарат пенициллиназы был выделен нами из культуральной жидкости *Vac. licheniformis* 749/с (⁶).

Активность фермента определялась по количеству разложенного бензилпенициллина, учитываемого подометрически (⁷). За единицу активности фермента (Е) принято количество его, которое инактивирует 10⁻⁶ мол. бензилпенициллина при 37° за 1 мин. при pH 7 (оптимум для пенициллиназы), при концентрации субстрата, обеспечивающей постоянную скорость реакции в течение времени инкубации. В данной работе активность пенициллиназы выражена в Е на 1 мл.

Прежде всего изучалась способность клеток *L. arabinosus* сорбировать из среды пенициллиназу. Оказалось, что сорбция фермента очень сильно возрастает в условиях брожения на глюкозе, так же как это известно для дрожжевых клеток (²⁻⁴). Поэтому сорбция пенициллиназы клетками *L. arabinosus* проводилась далее в условиях брожения. Биомасса, полученная на 50 мл среды, промывалась и помещалась в 10 мл водного раствора препарата фермента (0,0004%), содержащего 1% глюкозы.

* Выражаем благодарность Е. И. Козловой за предоставление культур.

О сорбции пенициллиназы клетками *L. arabinosus* можно было судить как по убыли активности раствора после их отделения, так и по активности отделенных клеток, суспендированных в воде (табл. 1). Собственная пенициллиназа у *L. arabinosus* нами не обнаружена.

Данные табл. 1 показывают способность *L. arabinosus* сорбировать пенициллиназу. Из приведенных цифр видно, что активность клеток составляет около половины той активности, которая исчезла из раствора фер-

Таблица 1

Сорбция пенициллиназы клетками *L. arabinosus* (активность фермента в Е/мл)

№ опыта	Активность исходного раствора	Активность после пребывания бактерий	Активность, исчезающая из раствора	Активность водной суспензии клеток	Активность в суспензии автолизир. клеток
1	740	66	674	363	342
2	741	93	648	336	330
3	741	64	677	352	350

мента после их пребывания там, причем дополнительную активность в клетках не удается выявить их автолизом, который мы проводили в 4 мл фосфатного буфера при pH 7 с толуолом в течение 2 суток при комнатной температуре.

Инактивацию фермента в процессе нашего опыта можно объяснить двумя причинами: 1) действием продуктов, накапливающихся в бродильной жидкости; мы нашли, что пенициллиназа, добавленная к опытному раствору после отделения клеток, сразу теряет 10% активности; 2) потеря активности фермента может происходить при сорбции на поверхности клетки вследствие изменения конформации его молекул, о чем свидетельствуют экспериментальные данные по адсорбции ферментов на биологических поверхностях (^{8, 9}).

Опыты по отмыванию адсорбированной пенициллиназы показали, что фермент от клеток не отмывается водой. В промывных водах активность пенициллиназы отсутствовала, сохраняясь в суспензии клеток. Однако оказалось, что можно подобрать условия, когда фермент будет элюироваться. Так, активная пенициллиназа может отмываться 0,15 М фосфатным буфером с pH 7, что указывает на участие непрочных связей типа полных взаимодействий в закреплении клеткой фермента.

Активность водной суспензии клеток и возможность элюции фермента говорят о поверхностной локализации сорбированной активной пенициллиназы на клетках *L. arabinosus*.

Для выяснения способности бактерий, сорбировавших пенициллиназу, размножаться на среде с пенициллином они предварительно выдерживались в растворе фермента с глюкозой в течение 15 мин., затем пять раз промывались водой в центрифуге. В контрольном опыте равная биомасса выдерживалась в растворе глюкозы без фермента и также промывалась.

Равное количество биомассы обоих вариантов помещалось в среду Ридер с глюкозой и дрожжевым экстрактом, содержащую натриевую соль бензилпенициллина в концентрации 8 ед/мл. Для большего контроля в питательную среду с бактериями, не сорбировавшими пенициллиназу, добавлялась последняя промывная вода с сорбировавших бактерий в объеме вносимой биомассы. Опыт велся в саморегистрирующем биофотометре фирмы «Жуан», в кюветах которого одновременно находились в питательной среде бактерии обоих вариантов.

Продолжительность опыта 4 часа. График, выдаваемый прибором, показывает рост биомассы, учитываемый по мутности суспензии клеток. Закономерности результатов опыта представлены на рис. 1.

Данные рис. 1 показывают, что клетки *L. arabinosus*, будучи отмыты водой и перенесены в среду с пенициллином, размножаются на этой среде, чего не наблюдается в контрольном варианте. Используемая в опыте концентрация антибиотика значительно превышает минимальную бактериостатическую концентрацию для нашего объекта, которая в тех же условиях составляет 1–2 ед/мл. Описанный опыт повторялся с учетом биомассы прямым взвешиванием и дал ту же закономерность.

Приведенные в работе результаты показывают, что клетки *L. arabinosus* способны сорбировать и удерживать на клеточной поверхности пенициллиназу, которая при этом частично сохраняет активность в течение

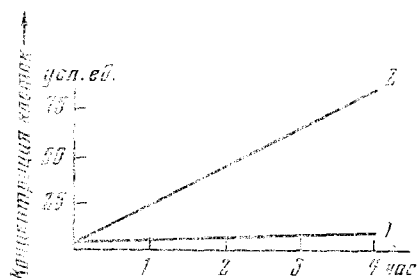


Рис. 1. Размножение *L. arabinosus* на среде с пенициллином. 1 — контрольные клетки, 2 — клетки, сорбировавшие пенициллиназу

некоторого периода времени. Клетки, сорбировавшие фермент, приобретают устойчивость к пенициллину.

Описанное явление приобретенной устойчивости к пенициллину в известной степени аналогично закономерностям действия пенициллиназы, синтезируемой самими клетками. Известна связь устойчивости клеток бактерий к пенициллину с их способностью образовывать пенициллиназу (¹⁰). У клеток с собственной пенициллиназой активный фермент имеет поверхностную локализацию (очевидно, отличающуюся от локализации приобретенной пенициллиназы) и может секретиро-

ваться в среду (¹¹). Известны также случаи перехода в раствор с поверхности клетки собственного экстрацеллюлярного фермента под влиянием буфера (¹²). В нашем случае пенициллиназа тоже связана с клеточной поверхностью, имеет в этом состоянии активность и может при некоторых условиях в той или иной степени десорбироваться в среду.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
6 IV 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Л. Курсанов, Е. Исаева, Биохимия, 9, 5, 273 (1944). ² А. И. Опарин, В. В. Юркевич, ДАН, 66, № 2, 247 (1949). ³ В. В. Юркевич, ДАН, 127, № 1, 206 (1959). ⁴ В. В. Юркевич, Е. С. Зуева, ДАН, 200, № 1, 240 (1971). ⁵ V. Reader, Biochem. J., 21, 901 (1927). ⁶ Л. Е. Могилевчик, Авт. свид. № 267013, 1965. ⁷ С. М. Чайковская, Т. Г. Венкина, Антибиотики, 5, 453 (1962). ⁸ О. М. Полтораки, Е. С. Воробьева, Вести. Московск. ун-в., сер. Химия, № 5, 41 (1967). ⁹ L. K. James, L. G. Augenstein, Adv. Enzymol., 28 (1966). ¹⁰ Н. С. Егоров, Основы учения об антибиотиках, М., 1969. ¹¹ M. R. Pollock, The Bacteria, 4, N. Y.—London, 1962. ¹² К. Тonomura, F. Futai, O. Tanabe, Agricult. and Biol. Chem., 26, № 1, 10 (1962).