

А. Н. БЕЛОЗЕРСКИЙ, В. Б. КОРЧАГИН и Т. И. СМИРНОВА

## ИЗМЕНЕНИЕ В ХИМИЧЕСКОМ СОСТАВЕ БАКТЕРИИ ДИФТЕРИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА КУЛЬТУРЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 9 I 1950)

Изучение изменений в химическом составе бактериальной клетки в зависимости от возраста культуры представляет большой интерес в связи с морфологическими и физиологическими изменениями, происходящими в жизненном цикле микробной клетки. В предыдущей работе одним из нас (1) были представлены данные, свидетельствующие о значительных колебаниях в содержании нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов у ряда бактерий в зависимости от возраста культуры. Эти колебания вполне закономерны и находятся в тесной связи с физиологическим состоянием микробной клетки.

В настоящей работе в качестве объекта для исследования была взята культура бактерий дифтерии (*Corynebacterium diphtheriae* штамм *gravis*).

Данный объект представлялся интересным потому, что в нем происходят значительные морфологические возрастные изменения. Молодые клетки дифтерии характеризуются наличием зерен волютина, которые, как известно, являются одним из важнейших диагностических признаков при определении этих микробов. При старении культуры количество волютина уменьшается, а затем исчезает совсем. Таким образом, изучение возрастных изменений в составе клеток дифтерии прежде всего интересно с точки зрения познания природы волютина.

Бактерии выращивались на мартеновском бульоне в течение 1, 2, 6 и 10 суток, отфильтровывались, промывались физиологическим раствором и фиксировались в спирте. Бактериальная масса каждого возраста многократно обрабатывалась спиртом, затем эфиром и высушивалась в вакуум-эксихаторе. В сухой бактериальной массе различных возрастов определялись: общий азот, общий и нерастворимый фосфор, азот пуриновых оснований и пентозы. Общий азот определялся по Кьельдалю, общий фосфор по Эмбдену, нуклеиновый фосфор по Эмбдену в остатке бактериальной массы после предварительной обработки ее 5% раствором трихлоруксусной кислотой на холоду, азот пуринов определялся по Маколлу и Графе и пентозы по Юнгбургу в модификации А. Н. Белозерского (2). На основании этих определений и соответствующих расчетов составлялось представление о количествах и типах нуклеиновых кислот и белковых веществ и их изменениях в зависимости от возраста культуры. При расчетах нуклеиновых кислот употреблялись следующие переводные коэффициенты: для расчета нуклеиновых кислот по нуклеиновому фосфору коэффициент 10,3; по пентозам 2,48; по азоту пуринов 9,12; для расчета суммарного количества белков и нуклеиновых кислот, т. е. «нуклеопротеидов», коэффициент 6,25.

Полученные нами аналитические данные, выраженные в процентах на абсолютно сухой вес бактериальной массы, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Возраст культуры	Общий азот	Общий фосфор	Нуклеиновый фосфор	Растворимый фосфор	Пентозы	Азот пуринов	Количество «нуклеопротеида»	Количество нуклеиновых кислот			Количество белка
								по фосфору	по пуринам	по пентозам	
1-суточная	13,80	2,14	1,55	0,59	6,41	—	86,25	15,96	—	15,89	70,29
2-суточная	12,70	1,73	1,20	0,53	5,32	1,45	79,37	12,36	13,22	13,19	67,01
6-суточная	12,80	0,65	0,45	0,20	3,34	0,54	80,00	4,63	4,92	8,28	75,37
10-суточная	12,80	0,66	0,38	0,28	3,45	0,46	80,00	3,91	4,19	8,56	76,09

Из табл. 1 следует, что бактерии дифтерии характеризуются высоким содержанием полинуклеиновых кислот. Реальность такого высокого содержания полинуклеотидов вытекает как из определений нуклеинового фосфора, так и из определений пуринового азота. Из этих же данных вытекает, что химический состав клеток бактерий дифтерии сильно изменяется в зависимости от возраста культуры. Эти изменения особенно заметны для нуклеиновых кислот. Так, суммарное количество последних в 10-суточной культуре почти в 4 раза меньше, чем в 1-суточной. Из нуклеиновых кислот особенно резким количественным колебаниям подвержены пентозополинуклеотиды. Этот вывод вытекает как из аналитических данных, так и в равной мере из данных препаративной работы. Таким образом, мы здесь сталкиваемся с общей закономерностью, которая ранее была иллюстрирована одним из нас <sup>(1)</sup> на целом ряде бактериальных форм, а именно, что накопление значительных количеств пентозополинуклеотидов свойственно молодым клеткам, старение сопровождается резким снижением в протоплазме клетки количества пентозополинуклеотидов.

Из представленных в табл. 1 аналитических данных следует, что пентозы, содержащиеся в клетках бактерий дифтерии, относятся не только к пентозонуклеиновым кислотам, но также и к веществам другого характера, вероятнее всего, к полисахаридам. Этот вывод вытекает из того, что количество полинуклеотидов, рассчитанное по пентозам, превышает количество полинуклеотидов, рассчитанное по нуклеиновому фосфору. Такое несоответствие особенно сильно заметно у 6- и 10-суточных культур. В последних содержится около 2% тимонуклеиновой кислоты, которая была определена нами по Дише. Таким образом, в действительности в культурах двух последних возрастов содержатся пентозополинуклеотиды в количестве не более 1—1,5%, а не 8,5%, как это следует из расчета нуклеиновых кислот по пентозам. Однако те пентозы, которые изменяются в зависимости от возраста культуры, должны быть целиком отнесены за счет пентоз пентозополинуклеотидов. Это следует из того факта, что при переходе от 2- к 6-суточной культуре происходит снижение количества пентозополинуклеотидов, рассчитанного по пентозам, на 6% от сухой бактериальной массы, и действительно, это лишнее количество пентозополинуклеотида в 2-суточной культуре может быть выделено в виде фракции свободной пентозополинуклеиновой кислоты.

В зависимости от возраста культуры происходит также и изменение в количественном содержании белков. При старении культуры количество белка несколько повышается. Можно думать, что увеличение ко-

личества белков происходит за счет азота распадающихся пентозополинуклеотидов, так как содержание общего азота в культурах различных возрастов остается без существенных изменений. Уместно будет отметить, что аналогичный рост белков в зависимости от возраста культуры наблюдался нами и на других бактериальных формах.

Кроме аналитической работы с бактериями дифтерии различных возрастов, нами была проведена и некоторая препаративная работа с культурами 2- и 6-суточного возраста. Эти две культуры для препаративной работы были выбраны потому, что в них, с одной стороны, наблюдаются наиболее резкие изменения в химическом составе, и с другой — резкое различие с цитологической стороны.

Бактериальная масса 2- и 6-суточных культур обрабатывалась 0,2% раствором едкого натра. Из щелочного экстракта выделялся сначала нуклеопротеид путем подкисления раствора уксусной кислоты до изоэлектрической точки и затем из фильтрата выделялась фракция свободной нуклеиновой кислоты путем добавления к фильтрату спирта и соляной кислоты до появления реакции на конго.

Из 2-суточной культуры было выделено около 8% от сухого веса бактериальной массы нуклеопротеида с содержанием 16,2% азота, 2,19% фосфора и 8,67% пентоз и около 6% фракции свободной нуклеиновой кислоты с содержанием 14,89% азота, 8,32% фосфора и 30,79% пентоз. Если исходить из азота, фосфора и пентоз, то нужно считать, что фракция свободной нуклеиновой кислоты представляет собой почти чистый пентозополинуклеотид дрожжевого типа. Из 6-суточной культуры был выделен только нуклеопротеид в количестве около 4% с содержанием 1,17% фосфора. Этот нуклеопротеид содержал также пентозы. Фракции свободной нуклеиновой кислоты из 6-суточной культуры не удалось выделить совсем.

Аналитические данные, а также изучение продуктов гидролиза и их идентификация показали, что нуклеиновые кислоты как в выделенных нуклеопротеидах, так и во фракции свободной нуклеиновой кислоты являются нуклеиновыми кислотами типа дрожжевого пентозополинуклеотида. Тимонуклеиновая кислота остается в остатке неизвлеченной и количество ее остается без существенных изменений в 2- и 6-суточных культурах, достигая величины в 2% на сухой вес бактерий. Что касается белкового компонента этих нуклеопротеидов, то он, видимо, является высшим белком, так как дает все качественные реакции, в том числе и реакцию на триптофан.

Из результатов препаративной работы и сопоставления их с аналитическими данными мы делаем прежде всего вывод о том, что в бактериях дифтерии пентозополинуклеотиды находятся в двух состояниях — в связанном виде с белками и в свободном от белка виде. Первая форма достигает величины в 1—1,5% и остается без существенных изменений в течение всего жизненного цикла микроба, тогда как вторая, свободная форма подвержена резким количественным колебаниям, вплоть до полного исчезновения. В молодых клетках содержание ее доходит до 8%, а в старых совсем исчезает. Эти данные находятся в полном соответствии с теми представлениями, которые ранее были развиты одним из нас (1) на основании исследования других бактерий.

Микроскопическое исследование показывает, что клетки 2-суточной культуры богаты волютином, в то время как клетки 6-суточных культур почти совсем лишены волютина. Анализ и препаративная работа показывают, что из 2-суточных культур можно выделить значительное количество фракции свободной нуклеиновой кислоты, тогда как из 6-суточных культур ее выделить нельзя. Кроме того, микроскопическое исследование бактериальных клеток 2-суточных культур, предварительно обработанных слабой щелочью, показывает, что после такой обработки клетки полностью лишаются волютина. При сопоставлении всего

этого напрашивается вывод о том, что фракция свободной нуклеиновой кислоты соответствует волютину и, очевидно, основой дифтерийного волютина является пентозополинуклеотид дрожжевого типа. Аналогичная картина в свое время наблюдалась одним из нас при исследовании культуры *Spirillum volutans* (2); разница состояла только в том, что основой волютина спириллы была нуклеиновая кислота, характеризующаяся гораздо большей нагрузкой фосфора, чем обычная дрожжевая кислота. Что касается дифтерии, то в ней, как показывают аналитические данные, представленные выше, основой волютина является нуклеиновая кислота, очень близкая к обычной дрожжевой кислоте. В последнее время Виам (3) развивает представление о том, что основой волютина является не нуклеиновая кислота, а гексаметафосфаты. Не отрицая в принципе, что разные волютины могут иметь различную природу, мы все же считаем, что основой бактериального волютина являются не гексаметафосфаты, а пентозополинуклеотиды дрожжевого типа.

Здесь следует указать, что, по данным Виам, гексаметафосфаты, если бы они были в дифтерии и являлись основой волютина, должны были бы быть во фракции нерастворимого фосфора. Между тем, из наших данных вытекает, что нерастворимый фосфор целиком является фосфором нуклеиновых кислот.

В заключение приносим глубокую благодарность Ю. В. Соловьевой за предоставление нам бактериальной массы для исследования.

Научно-исследовательский институт ботаники  
Московского государственного университета  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
12 XII 1949

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. Н. Белозерский, Вестн. МГУ, № 2, 125 (1949). <sup>2</sup> А. Н. Белозерский, Микробиология, 10, 135 (1941). <sup>3</sup> J. M. Wiame, Bull. Soc. Chim. Biol., 28, 552 (1946); Journ. Am. Chem. Soc., 69, 3146 (1947); Rev. ferment. et industr., 3, 83 (1948).