

МИКРОБИОЛОГИЯ

М. Н. МЕЙСЕЛЬ и Н. А. ПОМОЩНИКОВА

**ПРИМЕНЕНИЕ РАДИОИЗОТОПОВ ДЛЯ УСКОРЕННОГО  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНОВ**

*(Представлено академиком А. И. Опариным 15 V 1953)*

Для количественного определения многих водорастворимых витаминов, аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований в настоящее время с успехом применяются микробиологические методы. Эти методы более просты и значительно менее трудоемки, чем биологические методы, связанные с использованием специально подготовленных авитаминозных животных.

Вместе с тем они характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью. Микробиологические методы определения витаминов основаны либо на учете темпов размножения специальных культур микробов, нуждающихся в получении извне тех или иных витаминов, либо на определении скорости химических изменений в питательной среде, в которой эти микробы размножаются; эта скорость коррелирует с темпами размножения культуры. В свою очередь темпы и пределы размножения индикаторной на определенный витамин микробной культуры зависят, при прочих оптимальных условиях, от количественного содержания этого витамина в среде (в известном интервале его концентраций).

Наращение массы микробной культуры во времени, особенно при недостатке в среде необходимого этой культуре витамина, происходит сравнительно медленно. Для того чтобы получить микробные суспензии, достаточные для весового или нефелометрического определения, приходится наращивать культуральную массу в течение 24 час., а чаще всего даже 48 или 72 часов. Столь длительное определение витаминов зачастую нежелательно, особенно в условиях производственного контроля, физиологических и медицинских исследований. Естественным поэтому является стремление ускорить определение витаминов. Одним из путей решения этой задачи, как нам представляется, может быть использование радиоизотопов.

Рост и размножение микробов, как и любых других организмов, происходит в результате обмена веществ, приводящего к биосинтезу компонентов их протопласта. Синтетическая активность микроорганизмов связана с усвоением из внешней среды и ассимиляцией питательных веществ. Чем энергичнее идут процессы ассимиляции, тем быстрее растут и размножаются микробы. Совершенно очевидно, что если пометить радиоактивными изотопами определенные ассимилируемые микробами вещества, то можно легко определить скорость ассимиляции этих веществ, и, если эта скорость отражает, в конечном счете, скорость роста микробной культуры, то ее можно использовать для суждения о темпе роста этой культуры, а следовательно, и для количественного определения витаминов.

Наши исследования показали, что в определенных условиях скорость включения радиоактивного фосфора в тела размножающихся дрожжевых клеток воспроизводит в первые часы развития культуры скорость роста и размножения клеток, предваряя на несколько часов эти процессы. На рис. 1 представлены кривые, характеризующие нарастание культуры и усвоение ею фосфора в первые 10 час. развития. В то время как наиболее энергичное нарастание массы микробных клеток только начинается через 4—6 час. после посева, усвоение фосфора из среды уже на 5—6-й час достигает своего максимума.

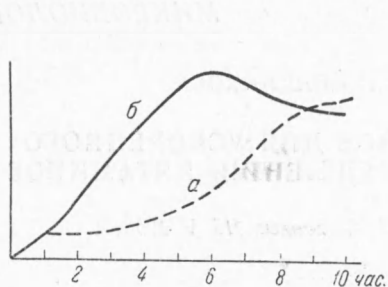


Рис. 1. Соотношение между скоростями размножения и поглощения  $P^{32}$  дрожжевой культурой *Saccharomyces ludwigii*. *a* — темп размножения, *б* — поглощение  $P^{32}$

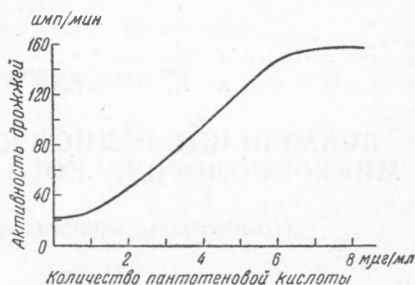


Рис. 2. Стандартная кривая для определения пантотеновой кислоты по поглощению  $P^{32}$  дрожжевой культурой *Saccharomyces ludwigii*

Для того чтобы решить, в какой мере по возрастанию радиоактивности культуры можно судить о количестве содержащегося в среде и подлежащего количественному определению витамина, мы испытали две дрожжевые культуры, являющиеся индикаторами на пантотеновую кислоту и на пиридоксин (витамин  $B_6$ ). Для количественного определения пантотеновой кислоты мы предложили в свое время дрожжевую культуру *Saccharomyces ludwigii* (1). По первоначально описанному нами методу для такого определения требовалось 40—48 час. Применение радиоактивного фосфора позволило ускорить определение в 7—8 раз.

Таблица 1

Радиоактивность дрожжевой культуры в зависимости от концентрации пантотеновой кислоты в среде (активность 0,1 мл суспензии в имп/мин)

Колич. пантотеновой к-ты в $\mu\text{г/мл}$	Начальная активность среды 6000 имп/мин·мл	Начальная активность среды 12000 имп/мин·мл
0 (контроль)	25	80
0,001	29	200
0,002	43	320
0,004	92	630
0,006	149	1150
0,008	155	1160
0,01	155	1190

Индикаторную культуру необходимо предварительно подготовить к опыту. Для этого она выращивается в течение 2 суток при  $28^\circ$  на сахаро-минеральной среде Ридер, содержащей нормальные количества необходимых витаминов, кроме пантотеновой кислоты. Последняя прибавляется в ничтожном количестве (0,004  $\mu\text{г/мл}$ ), чтобы получить особенно чувствительную к этому витамину культуру. Полученная таким способом культура

отфильтровывается от среды, промывается 3 раза стерильной водопроводной водой, отпрессовывается и по весу добавляется в опытные колбы для определения витамина. В каждую колбу на 100 мл среды вносится 100 мг отпрессованных дрожжей, от 1 до 2,5  $\mu\text{CNa}_2\text{HP}^{32}\text{O}_4$  и различные количества пантотеновой кислоты. Колбы помещаются на 6 час. на качалку при  $27-28^\circ$ . Затем дрожжи отделяются от среды центрифугированием, 4 раза промываются водопроводной водой и суспен-

Радиоактивность дрожжевой культуры в зависимости от концентрации витамина В<sub>6</sub> в среде (активность 0,1 мл суспензии в имп/мин)

Начальная активность среды в имп/мин·мл	Количество витамина В <sub>6</sub> в мкг/мл						
	0 (контроль)	0,001	0,01	0,02	0,04	0,08	0,1
9100	36	58	95	125	157	178	198
11500	57	77	135	216	280	310	342

дируются в 10 мл воды. 0,1 мл суспензии просчитывается при помощи счетчика Б-2. Результаты определений представлены в табл. 1.

На основании данных табл. 1 может быть вычерчена стандартная кривая для количественного определения пантотеновой кислоты по радиоактивности дрожжевой суспензии (рис. 2).

Для определения пиридоксина (витамина В<sub>6</sub>) мы применили в качестве индикаторной дрожжевую культуру *Saccharomyces carlsbergensis* 4228. Культура выращивается 2 суток в сахаро-минеральной среде Ридер, в которую добавляется минимальное количество витамина В<sub>6</sub> (0,0001 мкг/мл). Остальные необходимые для этой культуры витамины и аминокислоты вводятся в среду в виде их естественного источника — дрожжевого автолизата, освобожденного предварительного от пиридоксина облучением под кварцевой лампой в течение 6 час. Методика получения такого автолизата описана нами ранее (2). Автолизат добавляется в количестве 1 мл на 50 мл среды. Постановка опыта такая же, как и для определения пантотеновой кислоты, с той только разницей, что результаты учитываются через 4 часа (табл. 2).

Дополнительное введение в среду необлученного автолизата на фоне максимального количества витамина В<sub>6</sub> не оказывает влияния на радиоактивность культуры. На основании данных, полученных при начальной радиоактивности среды в 11 500 имп/мин·мл, составлена стандартная кривая (рис. 3).

Таким образом, полученные нами данные указывают на возможность и целесообразность применения радиоизотопов для количественного определения витаминов микробиологическим путем. Применение изотопов позволяет значительно ускорить время определения, доведя его до 4—6 час.

Институт микробиологии  
Академии наук СССР

Поступило  
21 III 1953

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> М. Н. Мейсель, Н. А. Помощникова, Н. П. Трофимова, Биохимия, 14, в. 4, 361 (1949). <sup>2</sup> М. Н. Мейсель, Н. А. Помощникова, Биохимия, 17, в. 5, 593 (1952).

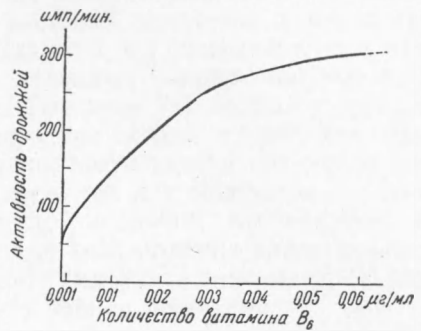


Рис. 3. Стандартная кривая для определения витамина В<sub>6</sub> по поглощению Р<sup>32</sup> дрожжевой культурой *Saccharomyces carlsbergensis*