

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК

КИЕВ — 198

1 объем на 1 объем среды. При этом источником углерода и азота могли служить как целые клетки дрожжей, так и их гидролизаты (табл. 3).

Итак, проведенными исследованиями установлено, что максимальный биосинтез литических ферментов всеми штаммами термофильных бацилл происходит при 45 °С в глубинной культуре на средах, содержащих в качестве источника углерода и азота дрожжевые клетки или их гидролизаты, которые могут быть заменены соевой или кукурузной мукой.

Таблица 3. Литическая активность штамма *B. licheniformis* 86 на минеральной среде с дрожжами и их гидролизатами (% ΔОП₅₄₀)

Источник углерода и азота	Тест-культуры	
	<i>Candida boidinii</i> T2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 9
БВК	19	52
Гидролизат БВК	15	50
Пекарские дрожжи	20	60
Гидролизат пекарских дрожжей	19	64

Высокая литическая активность исследованных микроорганизмов открывает возможность использования их для наработки препаратов литических ферментов, эффективных при гидролизе дрожжевой или бактериальной биомассы с целью извлечения из нее биологически активных веществ, в том числе белков, углеводов, липидов, витаминов и др.

PECULIARITIES OF BIOSYNTHESIS OF LYTIC ENZYMES BY SPORE-THERMOPHILIC BACTERIA

N. Z. Tinyanova, I. N. Pavlova, L. G. Zholner

Summary

Thermophilic strains of the genus *Bacillus* bacteria synthesize extracellular enzymes lyzing an overwhelming majority of Gram-negative bacteria as well as yeast from the genera *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodospiridium*. The qualitative and quantitative composition of the lytic enzymes' complex depends on the medium composition and producers' culture conditions. The active biosynthesis of lytic enzymes by the studied strains proceeds on the media containing one of the following carbon and nitrogen sources: yeast cells, yeast hydrolyzates, soybean meal, maize meal. The maximal yeast-lytic activity of thermophilic strains is observed at a less intensive aeration than the maximal bacteriolytic one.

1. Головина И. Г. Литические ферменты микроорганизмов // Успехи микробиологии.— 1972.— № 8.— С. 108—137.
2. Захарова И. Я., Павлова И. Н. Литические ферменты микроорганизмов.— Киев: Наук. думка, 1985.— 215 с.
3. Захарова И. Я., Павлова И. Н., Коваленко Э. А. и др. Получение и характеристика литических ферментов термофильного штамма *Bacillus* sp. 86 // Микробиол. журн.— 1984.— 46, № 3.— С. 27—30.
4. Квасников Е. И., Тиньянова Н. З. Литические свойства некоторых споровых термофильных бактерий // Микробиол. журн.— 1981.— 43, № 2.— С. 152—155.
5. Романовская В. А., Будкова Е. Н., Тиньянова Н. З. Использование вспомогательных тестов для классификации метанооксиляющих бактерий // Микробиол. журн.— 1984.— 46, № 5.— С. 20—24.
6. Тиньянова Н. З., Павлова И. Н., Квасников Е. И. и др. Влияние ряда физико-химических факторов на дрожжелитическую активность термофильных бактерий рода *Bacillus* // Микробиол. журн.— 1982.— 44, № 4.— С. 14—20.

Получено 03.02.87

ПРОТЕАЗЫ И ИХ РОЛЬ В ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТЕРМОФИЛЬНОГО ШТАММА *BACILLUS* SP. 86

Л. Г. Жолнер, И. Н. Павлова, Н. З. Тиньянова

Ин-т микробиологии и вирусологии АН УССР, Киев

Термофильный штамм *Bacillus* sp. 86 при глубинном культивировании на среде, содержащей в качестве источника углерода и азота клетки пекарских дрожжей, осуществляет биосинтез нескольких внеклеточных эндо- и экзопептидаз. Эти ферменты в комплексе гидролизуют животные и микробные белки, проявляя большее сродство к фибриллярным биополимерам, чем к глобулярным. Протеиназы также расщепляют синтетические субстраты трипсино- и химотрипсиноподобных сериновых протеиназ.

Использование ингибиторного анализа позволило получить доказательства участия экзопептидаз в литическом действии комплекса внеклеточных ферментов штамма *Bacillus* sp. 86 на клетки грамотрицательных бактерий и некоторых дрожжей.

Экзопептидазы, синтезируемые исследованным микроорганизмом, способны отщеплять свободные аминокислоты как с N-, так и с C-конца синтетических пептидов. При этом аминоклотазная активность значительно выше карбоксипептидазной.

Ранее сообщалось, что термофильный штамм *Bacillus* sp. 86, лизирующий живые клетки бактерий родов *Pseudomonas*, *Proteus*, *Acinetobacter* и ряда других грамотрицательных бактерий, а также дрожжи родов *Candida*, *Saccharomyces* и *Rhodospiridium*, синтезирует внеклеточные протеиназы [6]. Высокая протеолитическая активность обнаружена и в препарате литических ферментов, полученном из его культуральной жидкости. В литературе встречается утверждение, что именно протеиназам принадлежит основная роль в литическом процессе [10, 13].

Настоящая работа посвящена изучению качественного состава комплекса протеолитических ферментов препарата, обладающего литическим действием, из термофильного штамма *Bacillus* sp. 86, а также установлению роли протеиназ в литическом эффекте, вызываемом препаратом при действии на живые клетки ряда микроорганизмов.

Материал и методы. Продукт литических ферментов *Bacillus* sp. 86 выращивали на среде, содержащей в качестве источника питания и энергии клетки прессованных пекарских дрожжей [9].

Культивирование осуществляли глубинным способом при 45 °С на качалке (220 об/мин.) в 0,5-литровых колбах, содержащих 50 мл среды.

Препарат литических ферментов получали из фильтрата культуральной жидкости продуцента (22-часовая культура) с помощью высаливания сернохлоридом аммония при 80 % насыщения [2].

Все ферментативные активности препарата определяли в 50 мМ трис-НСl-буфере рН 9,1 при температуре 60 °С.

Общую протеолитическую (казеинолитическую) активность определяли по методу Ансона в модификации Петровой [7]. Проба общим объемом 5 мл содержала 2 %-й раствор казеина и 100 мкг препарата в буфере. Время реакции 10 мин. Активность выражали в единицах, соответствующих количеству микромолей тирозина, освобожденного из казеина при ферментативном гидролизе в условиях опыта.

Эстеразную протеолитическую активность определяли в отношении синтетических субстратов — этилового эфира N-бензоил-L-аргинина (БАЭЭ), служащего специфическим субстратом трипсиноподобных сериновых протеиназ, и метилового эфира N-бензоил-L-тирозина (БТМЭ) — специфического субстрата химотрипсиноподобных сериновых протеиназ [4]. При этом к 2 мл раствора ферментного препарата (100 мкг) в буфере добавляли 3 мл 1 мМ раствора субстрата и определяли оптическую плотность пробы при 253 нм в нулевое время и после 10-минутной инкубации пробы. Измерение проводили против контрольной пробы, не содержащей ферментного раствора. Активность выражали в единицах, соответствующих увеличению A_{253} на 0,01 ед в условиях опыта.

Эластазную активность препарата учитывали по изменению интенсивности поглощения при 515 нм продуктов гидролиза конго-рот-эластина [8]. Проба общим объемом 7,5 мл содержала 20 мг субстрата, 200 мкг ферментного препарата и буфер. Инкубацию проводили в течение 1 ч при постоянном встряхивании. Интенсивность развившейся окраски определяли после удаления негидролизованного эластина. Активность препарата рассчитывали по калибровочной кривой и выражали в единицах, соответствующих количеству миллиграммов расщепленного субстрата за 1 ч.

О фибринолитической активности в препарате судили по растворению фибринового сгустка [1]. Сгусток фибрина получали при смешивании 1 мл 0,9 %-го раствора фибриногена и 0,1 мл 3 %-го раствора тромбина в рабочем буфере с 0,1 М NaCl. Ре-

акционную смесь, содержащую сгусток фибрина и 1 мл ферментного раствора (100 мкг белка), инкубировали в течение 1 ч. Негидролизированный фибрин растворяли в 1 мл 0,1 N раствора NaOH и определяли в растворе белок по оптической плотности при 280 нм. Одна единица активности соответствовала 1 мг гидролизованного фибрина в условиях опыта.

Способность гидролизовать коллаген, желатин, бычий сывороточный альбумин и овальбумин определяли по увеличению оптической плотности пробы при 280 нм вследствие ферментативного гидролиза субстрата. Проба общим объемом 5 мл содержала 1 мг субстрата и 0,2 мл фильтрата культуральной жидкости или его соответствующего разведения. Время реакции — 10 мин. Негидролизированный белок осаждали равным объемом 10 %-й ТХУ и осадок удаляли фильтрованием. В качестве контроля использовали пробы, в которые ТХУ добавляли до внесения фермента. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое вызывало увеличение A_{280} на 0,01 ед в условиях опыта.

Активность сериновой протеиназы определяли, используя в качестве специфического субстрата бензилоксикарбонил-аланил-аланил-лейцин-*p*-нитроанилид (Z-ала-ала-лей-*p*NA) [5]. В пробу, содержащую 200 мг субстрата, вносили 50 мкл ферментного раствора (15—50 мкг белка) и инкубировали в течение 30 с при 37 °С. Интенсивность развившейся окраски определяли при 420 нм. Активность рассчитывали по формуле:

$$E = \frac{0,195 \cdot A_{420}}{t \cdot v \cdot a},$$

где t — время инкубации, мин; v — объем вносимого ферментного раствора, мл; a — количество белка, мг; 0,195 — коэффициент пересчета, полученный по калибровочной кривой.

Пептидазную активность определяли по методу Иемма и Кокинга в модификации Matheson [12]. Пробу, содержащую 0,2 мл 1 мМ раствора субстрата и 0,3 мл фермента (100 мкг белка), инкубировали в буфере на протяжении 10 мин, затем к ней добавляли 0,2 мл 5 %-й ТХУ, а через 15 мин — 1,4 мл 0,1 М цитратного буфера pH 5,0 и 1 мл комбинированного реактива. Смесь выдерживали в течение 10 мин в кипящей водяной бане, охлаждали и определяли оптическую плотность раствора при 570 нм против контроля, в который ТХУ вносили до прибавления фермента. Активность выражали в единицах, соответствующих увеличению оптической плотности за 10 мин в условиях опыта, и рассчитывали по формуле:

$$E = \frac{A_{570}}{6,55 \cdot a},$$

где a — количество белка, мг; 6,55 — коэффициент пересчета, полученный по калибровочной кривой.

При определении аминоклотидазной активности субстратом служил синтетический трипептид лейцил-лейцил-глицин, в качестве субстрата для определения карбоксипептидазной активности был избран дипептид с замещенной N-концевой аминоклотидазой — Z-глицил-глицин.

Литическую активность препарата определяли по изменению оптической плотности при 540 нм суспензии живых клеток *Candida boidinii* (дрожжелитическая активность) или *Acinetobacter calcoaceticus* (бактериолитическая активность) [3]. Проба общим объемом 2 мл содержала 200 мкг ферментного препарата, микробные клетки и буфер (исходное значение A_{540} — 0,5—0,7). Время инкубации — 30 мин. Активность выражали в процентах снижения плотности суспензии. Расчет производили по формуле:

$$E, \% = \frac{A - A_1}{A} \cdot 100,$$

где A — исходная плотность суспензии при 540 нм; A_1 — конечная плотность суспензии при 540 нм.

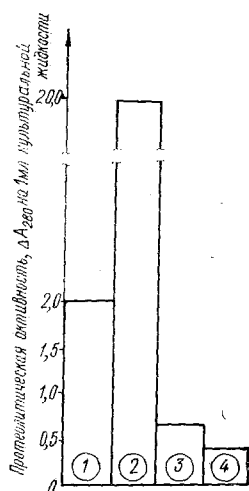
Белок определяли по методу Lowry [11].

В качестве эффекторов был исследован ряд соединений в концентрации 10^{-3} М, в том числе металлблокирующий реагент (ЭДТА), реагенты на SH-группы *n*-хлормеркурибензоат (*n*-ХМБ) и моноiodоксусная кислота (МИОК), а также ингибитор сериновых протеиназ — фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ).

Результаты и их обсуждение. Исследование протеолитической активности культуральной жидкости штамма *Bacillus* sp. 86 в отношении нескольких белковых субстратов показало, что внеклеточные ферменты этого микроорганизма осуществляют гидролиз различных белков, проявляя бóльшую активность (на порядок выше при одном и том же способе учета активности) в отношении фибриллярных белков, чем в отношении глобулярных (рисунк). Высокую протеолитическую активность проявлял также неочищенный препарат внеклеточных ферментов, синтезируемых штаммом *Bacillus* sp. 86. Препарат был получен путем осаждения белков культуральной жидкости при 80 %-м насыщении сер-

нокислым аммонием. Он гидролизует исследованные фибриллярные и глобулярные белки, синтетические эфиры аминокислот, служащие специфическими субстратами, химотрипсино- и трипсиноподобных сериновых протеиназ, синтетический хромогенный субстрат сериновых протеиназ бацилл, а также субстраты пептидаз — синтетические пептиды (табл. 1).

Широкий спектр гидролизуемых препаратом субстратов свидетельствует о наличии в нем нескольких протеолитических ферментов, одни



из которых проявляют эндопептидазное, т. е. протеолитическое, действие, другие же способны отщеплять концевые аминокислоты от небольших пептидов, т. е. являются экзопептидазами. Эндопептидазы (или эндопептидаза) проявляют как химотрипсиноподобное, так и трипсиноподобное действие. По-видимому, способность гидролизовать субстраты сериновых протеиназ трипсинового и химотрипсинового типа является свойством единственной сериновой протеиназы, синтезируемой штаммом 86, так как известно, что субтилизины (сериновые протеиназы бацилл) об-

Гидролиз белковых субстратов культуральной жидкостью *Bacillus* sp. 86. 1 — казеин; 2 — коллаген; 3 — бычий сывороточный альбумин; 4 — овальбумин.

ладают широкой субстратной специфичностью. Вероятно, фермент исследуемого штамма в этом смысле не составляет исключения.

Вместе с тем нельзя не принять во внимание и то, что штамм может осуществлять биосинтез более одной эндопептидазы. Результаты, свидетельствующие в пользу такого предположения, были получены при изучении влияния на протеолитическую активность препарата ингибиторов различных классов (табл. 2). Анализируя представленные данные, можно заключить, что кроме сериновой протеиназы, активность которой полностью подавляется ФМСФ, штамм 86 осуществляет биосинтез как минимум еще одного протеолитического фермента, так как после действия этого ингибитора препарат проявляет $\approx 50\%$ своей исходной активности. Снижение протеолитического действия препарата почти наполовину в присутствии металлблокирующего реагента указывает на то, что по крайней мере одна из протеиназ *Bacillus* sp. 86 является металлзависимым ферментом.

Полученные нами результаты свидетельствуют также о том, что исследуемый штамм термофильной бациллы осуществляет и биосинтез

Таблица 1. Гидролиз белковых и синтетических субстратов препаратом внеклеточных ферментов *Bacillus* sp. 86

Субстрат	Активность, ед* на 1 мг белка	Субстрат	Активность, ед* на 1 мг белка
Казеин	6,2	Овальбумин	9,0
Коллаген	43,4	БТМЭ	32,6
Желатин	3,1	БАЭЭ	13,9
Эластин	11,5	Z-ала-ала-лей-pNA	3,8
Фибрин	19,8	Лей-лей-гли	127,0
Бычий сывороточный альбумин	14,0	Z-гли-гли	12,0

* Единицы соответствуют указанным в разделе «Материал и методы» для каждого из субстратов.

Таблица 2. Влияние ингибиторов на протеолитическую активность ферментного комплекса

Класс ингибитора	Ингибитор	Концентрация, М	Ингибирование протеолитической активности, %
Серинный ингибитор	ФМСФ	10^{-3}	56
Металл-хелатирующий агент	ЭДТА	10^{-3}	49,7
Ингибиторы на SH-группы	<i>n</i> -ХМБ	10^{-3}	67
	МИУК	10^{-3}	0

Примечание: ФМСФ — фенилметилсульфонилфторид; *n*-ХМБ — *n*-хлормеркурибензоат; МИУК — моноiodуксусная кислота.

Таблица 3. Влияние субстратов эндо- и экзопептидаз на литическую активность ферментного препарата

Субстраты	Литическая активность, % от исходной
Клетки <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	100,0
Клетки <i>A. calcoaceticus</i> +казеин (4 мг/мл)	57,9
Клетки <i>A. calcoaceticus</i> +казеин (8 мг/мл)	40,0
Клетки <i>A. calcoaceticus</i> +БАЭЭ (10^{-3} М)	100,0
Клетки <i>A. calcoaceticus</i> +БТМЭ (10^{-3} М)	84,6
Клетки <i>A. calcoaceticus</i> +лей-лей-гли (10^{-3} М)	100,0
Клетки <i>Candida boidinii</i>	100,0
Клетки <i>C. boidinii</i> +казеин (4 мг/мл)	48,5
Клетки <i>C. boidinii</i> +казеин (8 мг/мл)	42,7
Клетки <i>C. boidinii</i> +БАЭЭ (10^{-3} М)	102,5
Клетки <i>C. boidinii</i> +БТМЭ (10^{-3} М)	87,3
Клетки <i>C. boidinii</i> +лей-лей-гли (10^{-3} М)	100,0

экзопептидаз, одна из которых проявляет специфичность аминопептидазы, другая же, менее активная, является карбоксипептидазой, так как она отщепляет от пептидов концевую аминокислоту со свободной карбоксильной группой.

Таким образом, широкий набор внеклеточных ферментов эндо- и экзопептидазного действия, очевидно, позволяет штамму термофильной споровой палочки расщеплять белковые субстраты до низкомолекулярных продуктов, в том числе до свободных аминокислот, которые могут быть затем использованы как самим продуцентом, так и другими микроорганизмами в качестве источника питания или строительного материала.

Наличие мощной протеолитической системы у штамма *Bacillus* sp. 86, характеризующегося высокой литической активностью по отношению к грамотрицательным бактериям и дрожжам, побудило нас исследовать, не участвуют ли протеиназы в литическом действии штамма. Для этого был использован ингибиторный анализ с привлечением различных субстратов эндо- и экзопептидаз в качестве конкурентных ингибиторов литической активности препарата. Полученные результаты показали, что казеин, сродство к которому протеиназ, особенно металл-зависимых, значительно выше, чем к другим белкам, в том числе к белкам клеточной стенки микроорганизмов, в значительной мере угнетал как дрожжелитическую, так и бактериолитическую активность препарата (табл. 3). Синтетический субстрат химотрипсиноподобных сериновых протеиназ был менее эффективным конкурентным ингибитором литической активности, а субстрат аминопептидазы вообще не угнетал литический процесс. Таким образом, ингибирование литической активности препарата субстратами протеиназ, особенно естественными, указывает на конкурентное их с белками клеточной оболочки тест-

культур за активные центры протеиназ и тем самым подтверждает участие протеолитических ферментов наряду с гидролазами другой специфичности в общем литическом действии препарата. Такое заключение подтверждается и тем, что вещества, угнетающие общую протеолитическую активность препарата, вызывают также некоторое снижение его литического эффекта (табл. 4).

Таблица 4. Влияние ингибиторов протеиназ на протеолитическую и литическую активности препарата

Активность	Остаточная активность, %		
	Без ингибитора	ФМСФ (10^{-3})	ЭДТА (10^{-3})
Протеолитическая	100	44	53
Дрожжелитическая	100	77	7
Бактериолитическая	100	85	52

Итак, термофильный штамм споровой палочки осуществляет биосинтез нескольких ферментов с эндо- или экзопептидазным действием. Возможно, некоторые из них обладают широкой специфичностью, что и позволяет им гидролизовать наряду с другими белковыми субстратами белки, включенные в клеточную стенку грамотрицательных бактерий и некоторых дрожжей. Точный ответ о количественном составе внеклеточного протеолитического комплекса *Bacillus* sp. 86, специфичности протеиназ, а также о литической активности отдельных ферментов этого комплекса может быть получен после выделения ферментов в индивидуальном состоянии.

PROTEASES AND THEIR ROLE IN THE LYTIC ACTIVITY OF THERMOPHILIC STRAIN *BACILLUS* SP. 86

L. G. Zholner, I. N. Pavlova, N. Z. Tinyanova

Summary

The thermophilic strain *Bacillus* sp. 86 under conditions of submerged cultivation on the medium containing the baker's yeast cells as a source of carbon and nitrogen accomplishes the biosynthesis of certain extracellular endo- and exopeptidases.

Being in a complex, these enzymes hydrolyze the animal and microbial proteins manifesting a greater affinity to fibrillar biopolymers than to globular ones. Proteinases split synthetic substrates of trypsin- and chymotrypsin- like serine proteinases as well.

The inhibitory analysis has permitted obtaining proofs of endopeptidase participation in the lytic action of a complex of extracellular *Bacillus* sp. 86 strain enzymes on cells of Gram-negative bacteria and certain yeast.

Exopeptidases synthesized by the microorganism under study are able to split off free amino acids from both N- and C- end of synthetic peptides, the aminopeptidase activity being considerably higher than the carboxypeptidase one.

1. Бондарчук А. А., Ажицкий Т. Ю. Характеристика ферментного комплекса из *Bacillus mesentericus* // Микробиол. журн.— 1981.—43, № 6.— С. 687—689.
2. Захарова И. Я., Павлова И. Н., Коваленко Э. А. и др. Получение и характеристика литических ферментов термофильного штамма *Bacillus* sp. 86 // Микробиол. журн.— 1984.—46, № 3.— С. 27—30.
3. Квасников Е. И., Тиньянова Н. З. Литические свойства некоторых споровых термофильных бактерий // Микробиол. журн.— 1981.—43, № 2.— С. 252—255.
4. Логинова Л. Г., Яковлева М. Б., Головина И. Г., Богданова Т. И. Ферменты термотолерантного актиномицета *Thermoactinomyces vulgaris*, растворяющие клеточные стенки дрожжей // Микробиология.— 1976.—45, № 2.— С. 291—297.
5. Люблянская Л. А., Якушева Л. Д., Степанов В. М. Синтез пептидных субстратов субтилизина и их аналогов // Биоорг. химия.— 1977.—3, № 3.— С. 273—279.
6. Павлова И. Н., Захарова И. Я., Квасников Е. И. и др. Ферменты протеолитического действия термофильной бактерии *Bacillus* sp. 86 // Термофильные микроорганизмы в природе и практике народного хозяйства: Тез. докл.— М., 1983.— С. 104.
7. Петрова И. С., Винцонойте М. Н. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения // Прикл. биохимия и микробиология.— 1966.—2, № 3.— С. 322—327.

8. Рассулин Ю. А., Каверзнева Е. Д. Характеристика эластолитического комплекса из *Actinomyces rimosus* — римопротелина // Прикл. биохимия и микробиология.— 1972.—8, № 1.— С. 19—26.
9. Тиньянова Н. З., Павлова И. Н., Квасников Е. И. и др. Влияние ряда физико-химических факторов на дрожжелитическую активность термофильных бактерий рода *Bacillus* // Микробиол. журн.— 1982.—44, № 4.— С. 14—20.
10. Kitamura K. Re-examination of zymolyase purification // Agr. Biol. Chem.— 1982.—46, N 4.— P. 963—969.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.— 1951.—193, N 1.— P. 265—275.
12. Matheson T. A modified Yemm and Cocking ninhydrin reagent for peptidase assay // Can. J. Biochem.— 1964.—42, N 1.— P. 95—103.
13. Okazaki H. On cell wall lytic activity produced by thermophilic actinomycetes // G. Ferment. Technol.— 1972.—50, N 9.— P. 580—599.

Получено 03.02.87

УДК 579.22

ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* 1С— ДЕСТРУКТОРА АЛКИЛСУЛЬФАТОВ

А. С. Гордиенко, И. А. Кривец, Н. И. Настоящая

Ин-т коллоидной химии и химии воды АН УССР, Киев

Методом микроэлектрофореза изучены электрокинетические свойства клеток бактерий исходного штамма и морфологических вариантов *Pseudomonas aeruginosa* 1С. Установлено, что характерным признаком популяции исходного штамма является наличие двух групп клеток.

Данные изучения рН-зависимости ζ -потенциала позволяют предположить, что наружный слой внешней мембраны клеток гладкого и нитчатого вариантов состоит в основном из липополисахарида, а поверхность шероховатого варианта включает большее количество участков, содержащих белки. Установленное различие в строении поверхности может являться одной из причин, обуславливающих разную чувствительность морфологических вариантов к додецилсульфату натрия.

Метод микроэлектрофореза получил широкое распространение в исследованиях химического строения поверхности клеток микроорганизмов [14]. Изучение рН-зависимости электрофоретической подвижности бактерий в сочетании с применением реакций блокировки ионогенных групп, а также определение изменений электрокинетических свойств клеток под воздействием специфических химических веществ и ферментов позволяют установить состав компонентов наружной части клеточной стенки микроорганизмов. Метод микроэлектрофореза используется также для определения поверхностных липидов [13], наличие которых связывают с устойчивостью клеток бактерий к различным антимикробным веществам [9, 13].

Показано [10], что додецилсульфат натрия способствует морфологической изменчивости штамма — деструктора ПАВ — *Pseudomonas aeruginosa* 1С. При этом образуются морфологические варианты, различающиеся по устойчивости к детергенту, что может быть связано с различием в строении клеточной стенки.

Цель данной работы — изучить некоторые физико-химические свойства поверхности бактерий исходного штамма *P. aeruginosa* 1С и его морфологических вариантов.

Материал и методы. Исходный штамм *P. aeruginosa* 1С выращивали на жидкой минеральной среде Бернета и Ингрэма [12], содержащей в качестве источника углерода 0,5 г/л додецилсульфата натрия (ДСН), а также на МПБ, разбавленном солевой основой минеральной среды в соотношении 1:5. Морфологические варианты *P. aeruginosa* 1С выращивали в разбавленном МПБ. Условия культивирования бактерий описаны нами ранее [10].

Электрофоретические исследования проводили на установке для микроэлектрофореза [3]. Для этого выращенные клетки бактерий дважды отмывали дистиллированной водой и один раз — соответствующим буферным раствором, в котором в дальнейшем

готовили суспензию бактерий, содержащую 10^8 клеток/мл. Определяли электрофоретическую подвижность 50—100 клеток и рассчитывали их ζ -потенциал [4].

О гидрофильности — гидрофобности поверхности бактерий судили по результатам исследований, полученных двумя методами. Для этого изучали изменение электрофоретической подвижности клеток в разбавленных растворах (10^{-6} — 10^{-4} моль/л) ДСН [13], а также определяли способность бактерий сорбироваться на жидких углеводородах [16].

Результаты и их обсуждение. Установлено, что популяция бактерий *P. aeruginosa* 1С, выращенная на синтетической среде с ДСН, при изученных рН дисперсионной среды является гетерогенной по ζ -потенциалу отдельных клеток (рис. 1). Гетерогенность чистых культур микроорганизмов, в том числе и по электрокинетическим свойствам, является установленным фактом [2, 5, 7, 8, 14]. Характерным признаком

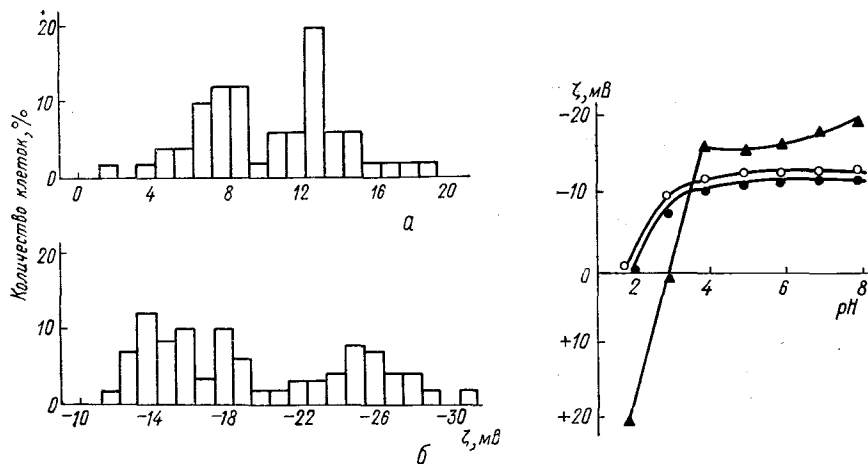


Рис. 1. ζ -потенциал клеток популяции *P. aeruginosa*, выращенных на синтетической среде с додецилсульфатом натрия при рН дисперсионной среды 2 (а) и 8 (б).

Рис. 2. Влияние рН дисперсионной среды на ζ -потенциал клеток *P. aeruginosa* 1С: морфологические варианты — R (\blacktriangle), S (\circ) и нитчатый (\bullet).

популяции *P. aeruginosa* 1С является наличие двух групп клеток. Так, в частности, при рН 2 (см. рис. 1, а) среднее значение ζ -потенциала этих условно выделенных групп бактерий составляет соответственно 6—9 и 11—15 мВ. Мы предположили, что такая структура популяции *P. aeruginosa* 1С и обнаруженное ранее [10] наличие в ее составе морфологических вариантов, индуцированных ДСН, могут быть взаимосвязаны.

Изучена рН-зависимость ζ -потенциала клеток морфологических вариантов культуры *P. aeruginosa* 1С (рис. 2). Можно видеть, что клетки нитчатого и S-варианта имеют аналогичные электрокинетические свойства. В то же время тенденция изменения ζ -потенциала в зависимости от рН среды клеток R-варианта имеет сходство с подобной зависимостью, полученной для бактерий исходного штамма. Необходимо отметить, что по электрокинетическим свойствам популяция морфологических вариантов значительно более однородна, чем таковая бактерий исходного штамма. Так, разность в значениях ζ -потенциала отдельных клеток *P. aeruginosa* может достигать 15—17 мВ (см. рис. 1), а для бактерий морфологических вариантов она не превышает 4—5 мВ. Таким образом, можно предположить, что появление в популяции исходного штамма двух групп клеток отражает процесс разделения культуры *P. aeruginosa* 1С под действием ДСН на два типа морфологических вариантов, отличающихся по электрокинетическим свойствам.

Сравнение полученных экспериментальных данных (см. рис. 2) с данными литературы [14] показывает, что бактерии R-варианта имеют смешанный (амфотерный) тип поверхности, характеризующийся наличием как кислотных, так и основных ионогенных групп. Для клеток