

N 172

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

ИЗВЕСТИЯ

ИРКУТСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО
ПРОТИВОЧУМНОГО ИНСТИТУТА
СИБИРИ И ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

Том XVIII

УЛАН-УДЭ • 1958

нарацкий, логин, саво, оштин

Тюбинск

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

О. Косин
2018

ИЗВЕСТИЯ

ИРКУТСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО
ПРОТИВОЧУМНОГО ИНСТИТУТА
СИБИРИ И ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

Том XVIII

УЛАН-УДЭ • 1958

Всего страниц 100
1950

Редакционная коллегия:

*Домарадский И. В. (ответственный редактор),
Жовтый И. Ф. (зам. ответ. редактора), Клец Э. И.,
Некипелов Н. В., Тимофеева Л. А.*

Г. П. Апарин

О ВЛИЯНИИ МАЛАХИТОВОЙ ЗЕЛЕНИ НА РОСТ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ, ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ МИКРОБОВ

Органические красители благодаря избирательным бактериостатическим свойствам применяются для приготовления селективно-чувствительных и дифференциальных сред. В частности, генциан-виолет, подавляющий рост грампозитивных микробов и вульгарного протей, входит в состав селективно-чувствительной среды, которая часто употребляется при работе с чумным микробом.

В литературе нет сведений об использовании бактериостатических особенностей красок для дифференциальной диагностики возбудителей чумы и псевдотуберкулеза.

Проводя ориентировочные опыты по изучению действия некоторых красителей на чумные и псевдотуберкулезные палочки, мы встретились с любопытным явлением: среда, имеющая в своем составе малахитовую зелень, сравнительно слабо задерживала рост чумного микроба и сильно подавляла рост возбудителя псевдотуберкулеза. Наиболее четко это явление регистрировалось на агаре Хоттингера (РН-7, 2), содержащем малахитовую зелень в концентрации 1/12000 при засеве 0,1 мл одномиллионной микробной взвеси¹.

На этой среде при посевной дозе в 10^5 микробных тел чумные палочки давали хороший рост, а псевдотуберкулезные микробы, как правило, не росли совсем. При использовании сред с большей или меньшей концентрацией малахитовой зелени и при посеве различных доз микробов тоже удавалось обнаружить разницу в росте возбудителей чумы и псевдотуберкулеза, однако она была менее четкой. В дальнейшей работе мы придерживались по возможности указанной выше концентрации и посевной дозы и поэтому будем приводить данные только других концентраций и доз.

На среде с краской вырастают типичные по морфологии, слабо окрашенные в зеленый цвет колонии возбудителя чумы; при обильном росте на 5—7 сутки среда обесцвечивается (наступает редукция малахитовой зелени). Темп роста по сравнению с простыми средами более медленный. Наибольшее количество колоний

¹ Сухая малахитовая зелень, взятая для приготовления среды, должна иметь характерный «металлический» блеск.

чумного микроба вырастает на 3—4 сутки, однако в последующие дни вплоть до 10 суток общее количество колоний продолжает увеличиваться. Единичные колонии возбудителя псевдотуберкулеза грызунов вырастали через 3 суток.

Для характеристики бактериостатического действия среды с краской был поставлен специальный опыт.

Два штамма чумного микроба — один с наиболее обильным ростом на среде, другой с самым скромным ростом — и два штамма псевдотуберкулеза, отобранные по такому же принципу, засеивались на агар Хоттингера с краской в дозах 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 микробных тел и на обычный агар Хоттингера в дозе 10^3 микробных тел. На пятые сутки проводился подсчет колоний во всех чашках, за исключением посевов, давших густой рост.

Полученные данные пересчитывались по отношению к среде, на которую посеяно 10^5 микробных тел. Например, при посевной дозе 10^3 микробных тел штамм чумного микроба 17 дал рост в количестве 180 колоний. Логически допустимо, что этот штамм при посевной дозе 10^5 микробных тел вырос бы в количестве 18000 колоний. Интерпретируя подобным образом и другие результаты, мы получили возможность составить табл. 1.

Таблица 1

Наименование культуры		Среднее кол-во колоний на среде с малахитовой зеленью при пересчете на посевную дозу в 10^5 микробных тел	Среднее кол-во колоний на агаре Хоттингера при пересчете на посевную дозу 10^5 микробных тел	Во сколько раз снижается интенсивность роста на среде с малахитовой зеленью
Штамм чумного микроба	899	13950	34300	2,4
„ „	17	884	18000	20,3
Штамм псевдотуберкулезного микроба	1	2,5	67800	27120
„ — „	3	0,01	50800	5080000

Таблица показывает, что на среде, содержащей малахитовую зелень, колоний чумного микроба вырастает в 2,5—20 раз меньше, чем на обычном агаре Хоттингера. Что же касается псевдотуберкулезного микроба, то интенсивность его роста у 1-го штамма снизилась более чем в 27 тысяч раз, а у 3-го больше чем в 5 миллионов раз.

На среду с краской было засеяно 30 штаммов возбудителя чумы и 21 штамм возбудителя псевдотуберкулеза. Штаммы были различны по вирулентности, срокам хранения и выделены от разнообразных хозяев. Параллельно проводились посеvy на среду с малахитовой зеленью, в которую добавлялось 0,01% сухой гемолизированной крови, и на агар Хоттингера. Результаты этого опыта приведены в таблице 2.

Из таблицы следует, что 28 штаммов чумного микроба из 30 показали на среде с краской обильный рост. Из 21 штамма псевдотуберкулезных палочек 17 не выросли совсем, 4 дали несколько колоний. Не росли также два штамма возбудителя чумы (№№ 814 и 81) и субкультура ЕВ 229. Добавление крови не оказало влияния на свойство среды.

Таблица 2

Номера штаммов чумного микроба	Средний показатель роста колоний на среде с малахитовой зеленью	Средний показатель роста колоний на среде с малахитовой зеленью и с кровью	Средний показатель роста колоний на агаре Хоттингера	Номера штаммов цисдотуберкулез- ного микроба	Средний показатель роста колоний на среде с малахитовой зеленью	Средний показатель роста колоний на среде с малахитовой зеленью и с кровью	Средний показатель роста колоний на агаре Хоттингера
1	+++	+++	++++	1	25	—	++++
7	+++	++	++++	2	—	—	++++
19	+++	++	++++	3	—	—	++++
20	+++	+++	++++	4	—	—	++++
23	+++	+++	++++	5	1	3	++++
48	+++	++	++++	6	3	14	++++
64	+++	++	++++	7	—	—	++++
65	+++	++	++++	8	—	—	++++
67	+++	+++	++++	9	—	—	++++
69	+++	+++	++++	10	1	—	++++
71	+++	+++	++++	18	—	—	++++
75	+++	+++	++++	19	—	—	++++
76	+++	+++	++++	20	—	—	++++
77	+++	+++	++++	23	—	—	++++
78	+++	++	++++	24	—	—	++++
80	+++	+++	++++	25	—	—	++++
81	—	—	++++	26	—	—	++++
83	+++	+++	++++	27	—	—	++++
85	+++	+++	++++	28	—	—	++++
98	+++	++	++++	29	—	—	++++
114	+++	+++	++++	30	—	—	++++
143	+++	+++	++++				
ЕВ 229 из вакцины	+++	+++	++++				
ЕВ 229	—	—	++++				
213	+++	+++	++++				
751	+++	+++	++++				
814	—	—	++++				
815	+++	+++	++++				
890	+++	++	++++				
902	+++	+++	++++				

Условные обозначения: +++++ сплошной рост
++++ обильный рост
+++ менее обильный рост
Цифры—число колоний
— отсутствие роста

Штаммы чумного микроба, не выросшие на среде с малахитовой зеленью, подвергались подробному изучению. По своим морфологическим и культурально-биохимическим свойствам, а также по отношению к дифференциально-диагностическим средам они оказались типичными чумными микробами. Но эти штаммы обладали особенностью: не росли на среде, содержащей 0,1% генциан-виолета и 0,1% гемолизированной крови. Ккультурами возбудителя чумы 814 и 81 были заражены белые мыши. После гибели мышей их органы засеивались на агар Хоттингера и на агар Хоттингера с генциан-виолетом и гемолизированной кровью. На обычном агаре Хоттингера через сутки регистрировался обильный рост колоний чумного микроба. На агаре, содержащем генциан-виолет, только через 7 дней мы с трудом обнаружили по 1—2 колонии вокруг глыбок посевного материала, при очень густом посеве.

Дальнейшие опыты были посвящены изучению влияния среды с малахитовой зеленью на рост патогенных микробов, от которых приходится дифференцировать возбудителя чумы при исследовании полевого материала, в частности, на рост возбудителей пастереллеза, эризипелоида, листереллеза, салмонелла, а также и на рост вульгарного протей. На среду с краской одновременно с посевом 100 тыс. микробных тел чумного микроба засеивалось такое же количество одного из названных видов микробов. Контролем служили смешанные посевы на агар Хоттингера и отдельные посевы каждой культуры на среду с малахитовой зеленью.

Паратифозные микробы на среде с краской росли очень пышно и подавляли рост чумного микроба. Другие представители патогенной микрофлоры грызунов на среде с малахитовой зеленью не росли, и в смешанных посевах вырастали только колонии возбудителя чумы, в то время, как на контрольном агаре Хоттингера наряду с колониями чумной палочки вырастали колонии микробов другого вида, взятого для посева.

Вульгарный протей в первые 5 суток совсем не давал роста на среде с краской. В смешанных посевах росли только колонии возбудителя чумы. Начиная с шестых суток появлялись изолированные колонии протей, которые через 10 суток проявляли тенденцию к ползучему росту.

Среда с малахитовой зеленью, в отличие от известных в практике противочумной работы дифференциально-диагностических сред, основанных на подавлении интенсивности роста микробов (среды Майеда-Курочи, Бессоновой), сильнее сдерживает рост псевдотуберкулезного микроба, который на обычных питательных средах растет лучше, чем возбудитель чумы.

Выводы

1. Агар Хоттингера, содержащий в своем составе малахитовую зелень в концентрации 1/12000 при посевной дозе в 10^5 микробных тел сравнительно мало влияет на рост чумного микроба и резко подавляет рост возбудителя псевдотуберкулеза.

2. При засеивании на данную среду 30 штаммов чумного микроба и 21 штамма псевдотуберкулезного микроба в такой же дозе 28 штаммов возбудителя чумы дали обильный рост. Штаммы возбудителя псевдотуберкулеза не росли совсем или вырастали единичными колониями.

3. Штаммы чумного микроба, не давшие роста на среде с малахитовой зеленью, не росли на среде, содержащей 0,1% генциан-виолета и 0,1% гемолизированной крови.

4. Возбудители пастереллеза, эризипелоида, листереллеза на среде с малахитовой зеленью не растут. Культуры вульгарного протея приобретают склонность к ползучему росту лишь на десятые сутки. Малахитовая зелень в среде не подавляет роста паратифозных микробов.

В. А. Кротова

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ РАЗНОВИДНОСТЕЙ ЧУМНОГО МИКРОБА, ВЫРАЩЕННЫХ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ

Сообщение 1

Качественное исследование аминокислотного состава белков чумного микроба

Вопрос о химическом составе патогенных бактерий имеет важное значение для бактериологической практики. Несмотря на это, химический состав чумного микроба изучен совершенно недостаточно. В пользу сказанного свидетельствует отсутствие каких-либо данных о химическом составе чумного микроба в руководствах Стефенсона (1951), Кузина (1946), Гостева (1951) и Губарева (1952). Исследования Грязнова (1928), Быстренина (1940) и Ивановского (1944) посвящены в основном изучению элементарного состава чумного микроба. Так, например, Ивановский (1944) в своей работе приводит только данные о содержании общего азота, некоторых его фракций и фосфора. Даже после того, как широкодоступным стал хроматографический метод, положение не изменилось. Достаточно сказать, что совсем недавно вопрос о химическом составе чумного микроба Акименко и Алешина (1956) пытались решить путем использования качественных цветных реакций на белки и углеводы.

Целью настоящей работы являлось изучение в первую очередь аминокислотного состава нескольких разновидностей чумного микроба.

Для работы мы использовали три вакцинных штамма чумного микроба океанического (ЕВ 229 и 1) и один континентального (17) происхождения. Исследуемые штаммы выращивались на бульоне Хоттингера (рН 7,2) глубинным методом в реакторах при температуре 25—28°C. Отмытая 3 раза дистиллированной водой суспензия микробов подвергалась гидролизу в стеклянном сосуде с обратным холодильником. Гидролиз осуществлялся соляной кислотой или насыщенным раствором едкого бария. Продолжительность гидролиза с соляной кислотой — 24 часа и с раствором едкого бария — 20 часов. От избытка соляной кислоты гидролизаты освобождались выпариванием на водяной бане, от едкого бария —

обработкой гидролизатов серной кислотой. Содержание общего азота определяли после минерализации гидролизатов серной кислотой методом изотермической перегонки в парафиновых чашках; аминный азот — формольным титрованием и рН — электрометрически.

Содержание общего азота в гидролизатах колебалось в основном от 4,58 до 7,84 мг в 1 мл. Аминного азота было от 3,35 до 6,25 мг в 1 мл. рН кислотных гидролизатов лежал в пределах от 1,58 до 1,72, а щелочных — 5,89 и 7,50 (табл. 1).

Таблица 1
Характеристика гидролизатов чумного микроба

Штаммы чумного микроба	№ гидролизатов	Метод гидролиза	Количество общего азота в мг %	Количество аминного азота в мг %	рН гидролизатов
ЕВ 229	7	Концентрированной соляной кислотой	470,4	390,6	1,72
— „ —	8	— „ —	548,8	400,0	1,63
1	9	— „ —	448,0	335,0	1,61
— „ —	11	— „ —	504,0	416,6	1,61
— „ —	13	— „ —	537,6	400,0	1,58
— „ —	15	Насыщенным раствором едкого бария	235,0	112,0	5,89
17	10	Концентрированной соляной кислотой	784,0	625,0	1,63
— „ —	12	— „ —	549,8	403,2	1,68
— „ —	14	— „ —	716,8	609,7	1,63
— „ —	16	Насыщенным раствором едкого бария	224,0	124,0	7,56

Предварительно гидролизаты разводились дистиллированной водой до содержания в них 3 мг аминного азота в 1 мл.

Разделение аминокислот осуществляли методом двухмерной восходящей хроматографии. Размер капли, наносимой на бумагу, равнялся 0,006 мл, что соответствовало содержанию 18 гамм аминного азота. Исключением являлись 2 гидролизата, № 15 и № 16, содержащие меньше азотистых веществ, чем другие. Поэтому, чтобы иметь такое же количество в пробе аминного азота, приходилось брать больше гидролизата.

С целью удаления ионов меди, препятствующих получению четких результатов, бумагу подвергали предварительной обработке 0,01-процентным водным раствором железистосинеродистого калия. Растворителями служили: в первом направлении н-бутанол, насыщенный водой и уксусной кислотой (40:50:10), во втором — водонасыщенный фенол (80:20) с 0,1% аммиака. Для предотвращения быстрой порчи фенола в хроматографическую камеру помещали в отдельном сосудике 0,1 г цианистого калия, растворенного в 2 мл воды. Каждый растворитель пропускать через бумагу в течение 18 часов. Высушенную хроматограмму обрызгивали 0,1-процентным раствором нингидрина в н-бутаноле, прогре-

вали в течение 15 минут в сушильном шкафу при температуре 80—100°C и оставляли в темном месте до следующего дня. Затем определялись коэффициенты скорости движения (R_f) для пятен аминокислот в обоих растворителях. Схема расположения чистых аминокислот на двухмерных хроматограммах представлена на рис. 1. В таблице 2 приведены средние значения R_f чистых ами-

Т а б л и ц а 2

Коэффициенты скорости движения аминокислот

№№ п/п	Аминокислоты	Средние значения R_f аминокислот гидролизатов							
		н-бутанол				фенол			
		чистые аминокислоты	штамм EB 229	штамм 1	штамм 17	чистые аминокислоты	штамм EB 229	штамм 1	штамм 17
1	Аспарагиновая кислота	0,15	0,15	0,15	0,15	0,16	0,15	0,13	0,15
2	Цистеин	0,09	—	—	—	0,21	—	—	—
3	Цистин	0,07	0,06	0,06	0,06	0,25	0,23	0,22	0,22
4	Глутаминовая кислота	0,23	0,22	0,23	0,21	0,27	0,27	0,27	0,27
5	Серин	0,17	0,17	0,17	0,15	0,34	0,33	0,33	0,32
6	Глицин	0,19	0,17	0,17	0,16	0,41	0,40	0,39	0,39
7	Треонин	—	0,22	0,22	0,22	—	0,47	0,46	0,46
8	Аланин	0,30	0,28	0,28	0,27	0,58	0,57	0,57	0,57
9	Тирозин	0,42	0,38	0,38	0,40	0,58	0,59	0,57	0,58
10	Валин	0,48	0,46	0,47	0,46	0,75	0,74	0,74	0,75
11	Лейцин	0,65	0,61	0,61	0,60	0,80	0,78	0,79	0,79
12	Фенилаланин	0,61	0,58	0,57	0,59	0,80	0,81	0,80	0,81
13	Пролин	0,34	0,32	0,32	0,32	0,86	0,87	0,86	0,87
14	Аргинин	0,15	0,14	0,14	0,14	0,77	0,79	0,77	0,78
15	Лизин	0,11	0,10	0,10	0,10	0,69	0,69	0,68	0,68
16	Триптофан	0,56	—	—	—	0,74	—	—	—
17	Гистидин	0,14	—	—	—	0,67	—	—	—
18	Неидентифицированные вещества	—	0,15	0,15	0,15	—	0,16	0,14	0,15
19	— „ —	—	0,14	0,15	0,14	—	0,54	0,54	0,53
20	— „ —	—	0,14	0,15	0,15	—	0,92	0,92	0,93
21	— „ —	—	0,26	0,26	0,27	—	0,83	0,83	0,82

нокислот и аминокислот гидролизатов трех штаммов чумного микроба.

Аминокислоты идентифицировались по величине R_f и по цвету пятен. На рис. 2 представлена фотография двухмерной хроматограммы гидролизата штамма чумного микроба EB 229.

В результате исследования гидролизатов чумного микроба методом распределительной хроматографии удалось обнаружить в них наличие следующих аминокислот: аспарагиновой и глутами-

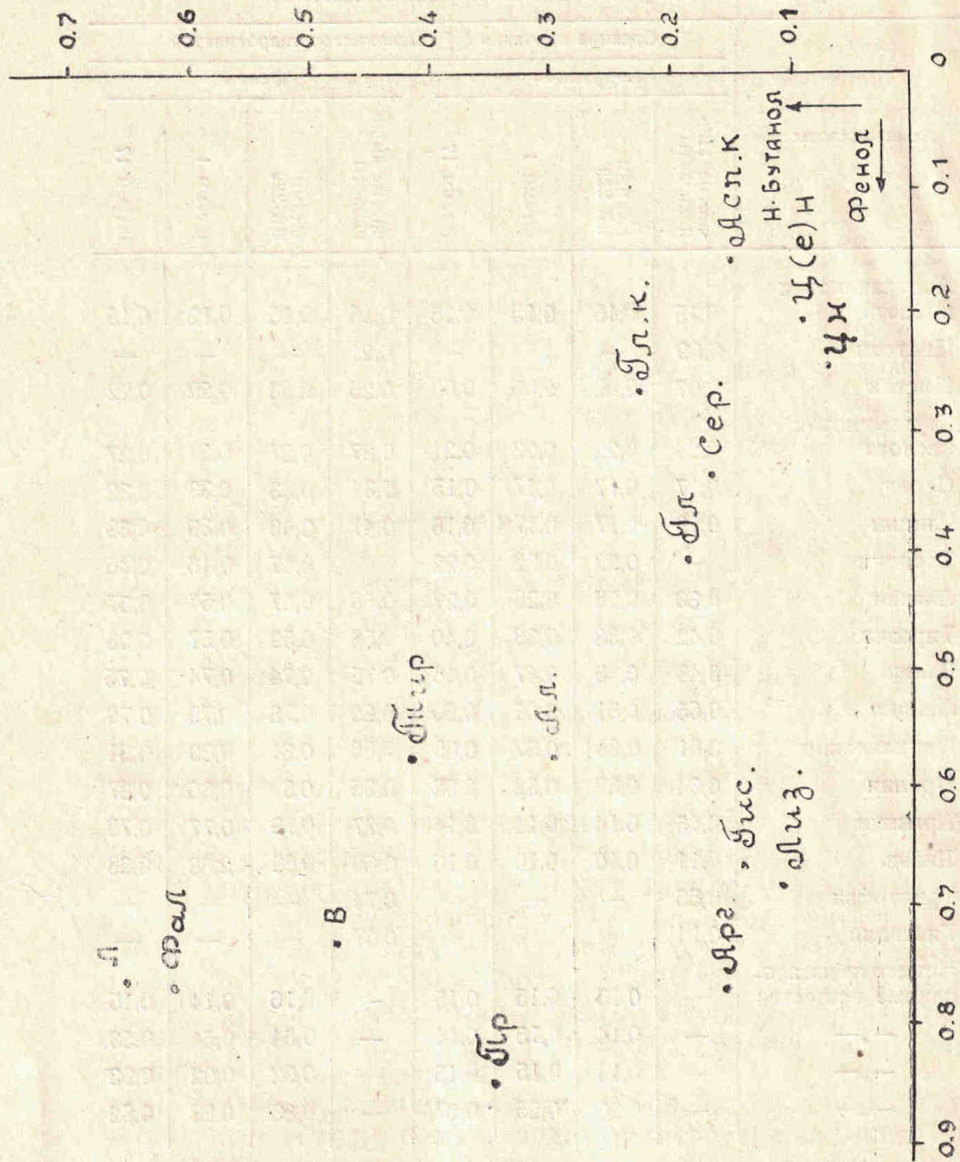


Рис. 1. Диаграмма местоположения чистых аминокислот на двухмерной хроматограмме в растворителях: 1) фенол с 0,1% аммиака 2) н-бутанол. Условные обозначения: асп. к. — аспаргиновая кислота; цн-цинтин; ц (е) н-цистеин; гл. к. — глутаминовая кислота; сер. — серин; гл. — глицин; ал. — аланин; тир. — тирозин; в — валин; фал. — фенилаланин; л. — лейцин; пр. — пролин; ар. — аргинин; гис. — гистидин; лиз. — лизин.

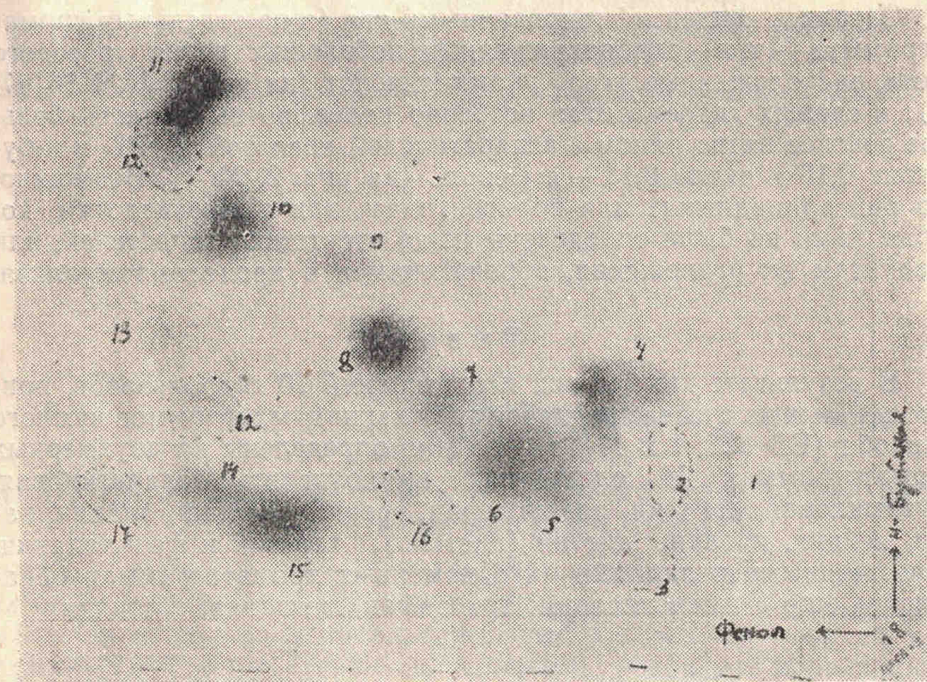


Рис. 2. Хроматограмма аминокислотного состава белков штамма ЕВ 229.

- 1) Неизвестное вещество; 2) аспарагиновая кислота; 3) цистин (цистеин); 4) глутаминовая кислота; 5) серин; 6) глицин; 7) треонин; 8) аланин; 9) тирозин; 10) валин; 11) лейцин (изолейцин); 12) фенилаланин; 13) пролин; 14) аргинин; 15) лизин (гистидин); 16, 17, 18—неидентифицированные вещества.

новой, аргинина, лизина, серина, треонина, глицина, аланина, валина, лейцина, тирозина, фенилаланина, пролина, цистина (цистеина).

Для подтверждения присутствия в гидролизатах отдельных аминокислот использовались одномерные хроматограммы, проявленные специфическими для данной аминокислоты реактивами. Так, например, после разгонки аминокислот гидролизатов в *n*-бутаноле на одномерных хроматограммах при помощи 0,2-процентного раствора изатина было подтверждено присутствие пролина; наличие триптофана в щелочных гидролизатах подтверждалось при обработке бумаги 1-процентным раствором *p*-диметиламинобензальдегида в 1 *n*. соляной кислоте, а гистидина — 1-процентным раствором диазотированной сульфаниловой кислоты и с последующим (без сушки) опрыскиванием хроматограммы 10-процентным раствором углекислого натрия. Для открытия аргинина служила реакция Сакагуши. Цистеин и метионин после разделения гидролизатов в *n*-бутаноле выявлялись на бумаге по реакции с иодистой платиной. (Блок, Лестранж и Цвейг). Три из указанных выше аминокислот — триптофан, метионин и гистидин — не были идентифицированы на двухмерных хроматограммах, так как использованные в нашей работе растворители (фенол в одном направлении и *n*-бутанол — в другом) не разделяют полностью эти аминокислоты.

Изолейцин, очень близкий по R_f к лейцину, не был обнаружен нами ни на одномерных, ни на двухмерных хроматограммах.

Остались неидентифицированными два (а на отдельных хроматограммах — три) слабоокрашенных небольших пятна розового цвета, расположенные около диаминокислот (на рис. 2, №№ 16, 17, 18); в свежих гидролизатах особенно рельефно выделялось большое розовое пятно рядом с аспарагиновой кислотой, с R_f в н-бутаноле 0,15 и около 0,15 — в феноле (на рис. 2, № 1). Возможно, что они принадлежат или полипептидам, или аминокислотам, которые нами не были определены из-за отсутствия свидетелей, или продуктам их разложения, образующимся в процессе гидролиза.

Выводы

В результате химических исследований 10 гидролизатов, приготовленных из суспензии клеток трех вакцинных штаммов чумного микроба (ЕВ 229, 1 и 17), нами были определены на двухмерных хроматограммах 14 следующих аминокислот: аспарагиновая, глутаминовая, аргинин, лизин, серин, треонин, глицин, аланин, валин, лейцин, пролин, цистин (цистеин), тирозин и фенилаланин. Качественными реакциями на одномерных хроматограммах обнаружены еще 3 аминокислоты: триптофан, метионин, гистидин.

ЛИТЕРАТУРА

Акименко В. Г., Алешина Е. Н. К вопросу о сравнительном изучении химического состава вирулентных и авирулентных штаммов чумных микробов. Труды Ростовского на Дону противочумного института, т. X, 1956.

Блок Р., Лестранж Р., Цвейг Г. Хроматография на бумаге. М., 1954.

Блок Р. и Боллинг Д. Аминокислотный состав белков и пищевых продуктов, М., 1949.

Быстренин А. И. К изучению химического состава *V. pestis*. Сообщение 1. Вестн. микр., эпид. и паразитологии, т. XIX, в. 3—4, 1940.

Гостев В. С. Биохимические основы медицинской бактериологии. Изд. АМН СССР, 1951.

Грязнов Н. И. Опыт фракционирования внутриклеточного содержимого чумной культуры. Труды Всесоюзного противочумного совещания. Саратов, 1928.

Губарев Е. М. Бактериохимия. Киев, 1952.

Ивановский Н. Н. О химическом составе чумного микроба. Распределение азота и фосфора по фракциям. Вестн. микр., эпид. и паразитологии. Сб. научных трудов, посвященный 25-му юбилею института «Микроб», Саратов, 1944.

Кузин А. М. Химия и биохимия патогенных микробов. Медгиз, 1946.

Стефенсон М. Метаболизм бактерий, М., 1954.

А. А. Токарева, П. А. Шершнев

НЕКОТОРЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ К МЕТОДИКЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ НА БУМАГЕ

Для изучения белкового состава противочумных сывороток нами был применен метод электрофореза на фильтровальной бумаге. Он относится к зональному электрофорезу и, так же как классический метод Тизелиуса, основан на различной подвижности белковых частиц в электрическом поле при определенных значениях рН и ионной силе буферного раствора.

Электрофорез на бумаге более доступен, чем классический метод Тизелиуса, так как осуществляется при помощи несложной аппаратуры, позволяет одновременно ставить несколько опытов, не требует предварительного диализа сыворотки, может проводиться при комнатной температуре. В то же время этот метод достаточно точен.

Основная цель нашей работы заключалась в изыскании лучших условий разделения белковых компонентов противочумной сыворотки электрофоретическим методом на фильтровальной бумаге. При этом мы руководствовались работами ряда авторов (Лазаров, 1955; Гурвич, 1955; Смоличев, 1956; Кравченко и др., 1955, Гендон, 1955).

Аппаратура и методика. Применяемый нами аппарат для электрофореза представляет собой закрытую камеру из плексигласа, размером 48x40x10 см. Внутренние перегородки высотой в 8 см делят камеру на четыре отсека шириной в 4 см. Угольные электроды, вмонтированные в наружные отсеки имеют в диаметре 1 см. В каждый отсек вмещается от 800 до 1000 мл буферного раствора. Для устранения сифонирования жидкости по бумаге мы уравнивали объемы буфера в отсеках камеры при помощи вставленных в их дно стеклянных сообщающихся трубок с трехходовым краном. Перед включением аппарата в электрическую сеть кран закрывался, а внешние и внутренние отсеки соединялись между собой при помощи полосок фильтровальной бумаги или марлевых фитилей длиной 12 см*. Перевод переменного тока в постоянный и регулировка напряжения в пределах от 90 до 310 вольт осуществлялись с помощью селенового выпрямителя типа ВСА-4 и реостата.

*) Это обстоятельство способствует, в частности, устранению резкого изменения рН буфера в электродных отсеках.

Опыты проводились на разных сортах фильтровальной бумаги производства Ленинградской фабрики им. Володарского.

Лучшее разделение белков сыворотки достигалось на плотных сортах фильтровальной бумаги, которая разрезалась по долевному направлению листа. Чтобы придать бумаге нужную степень плотности, нарезанные полоски ее перед опытом кипятились в растворе того же буфера, который применялся для электрофореза.

0,01—0,02 мл сыворотки наносились при помощи микропипетки каплей или в виде штриха на шероховатую сторону бумажной полосы (40x3 см), предварительно смоченной буфером. Сыворотку наносили на расстоянии 10 см от катодного конца полосы бумаги, так как при высоких значениях рН белки заряжены отрицательно и передвигаются в поле электрического тока от катода к аноду.

Нами использовались два буферных раствора с одним и тем же значением рН (8,6), но с различной ионной силой, эффективность которой оказалась в пределах от 0,05 до 0,10. Один буфер, вероналовый, готовился по Балаховскому (1953), второй, веронал-мединаловый, — по Гурвичу (1955).

Электрофорез проводился при комнатной температуре, доходившей иногда до 26°. Чтобы предохранить бумажные полосы от высыхания, рядом с ними ставили 2—4 плоские чашки с водой*).

Через пять минут после выключения тока, бумажные полосы вынимали из камеры. Для прекращения движения фракций белка вместе с жидкостью концы бумажной полосы, погруженные во время разделения в буфер, быстро просушивались между листами фильтровальной бумаги.

Дальнейшая обработка электрофореграмм заключалась в фиксации белка посредством 10—15-минутного высушивания их в сушильном шкафу при 105°.

Окраска и освобождение бумаги от избытка краски проводилась методом, описанным Гурвичем (1955), Нечаевой и др. (1956). В качестве красителя применяли бромфенол-синий и кислотно-синечерный краситель.

Количественное определение белковых фракций мы выполняли путем элюции 5 мм отрезков электрофореграмм в 0,1 н-растворе едкого натра в течение 30 минут. Интенсивность окраски определяли в калориметре ФЭК-МС—с зеленым светофильтром (550 м μ). Толщина слоя жидкости в кювете равнялась 10 мм. Общее количество найденной краски на электрофореграмме (показания оптической плотности) принимали за 100. Суммируя точки каждого пика на кривой, мы находим процентное содержание отдельных фракций белка во взятой пробе. При количественных расчетах принимали во внимание поправку на «след» альбумина, пользуясь методическими указаниями Смоличева (1956).

Результаты исследования. Первоначальные опыты проводились с буфером, имеющим ионную силу 0,1.

При низком напряжении — 2,7 в/см и продолжительности пропускания тока, равной 18 часам, четкого разделения белков сыворотки мы не получили. Увеличение напряжения до 3,4 в/см и продолжительности электрофореза до 24 часов сопровождалось лишь перемещением белка на большее расстояние от места нанесения.

*) Высыхание бумаги приводит обычно к изменению концентрации буфера и в конечном итоге отражается на качестве разделения белков.

Пятна растягивались по длине, расплывались, границы между фракциями были стерты (рис. 1, 2).

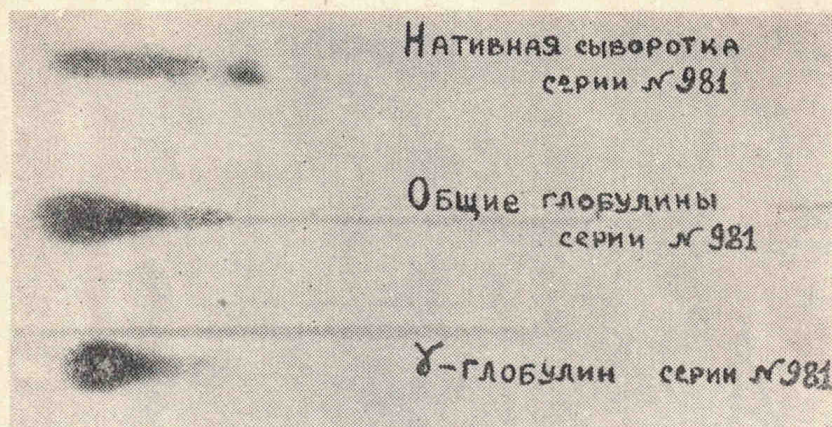


Рис. 1. Электрофореграммы фракций белков противочумной сыворотки.

Вероналовый буфер pH-3,6; и/с.-0,1; v=3,4 v/cm, J=0,1т.л. время фракционирования 24 часа.

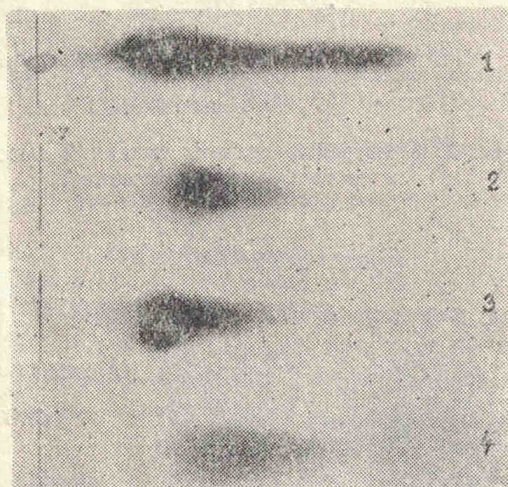
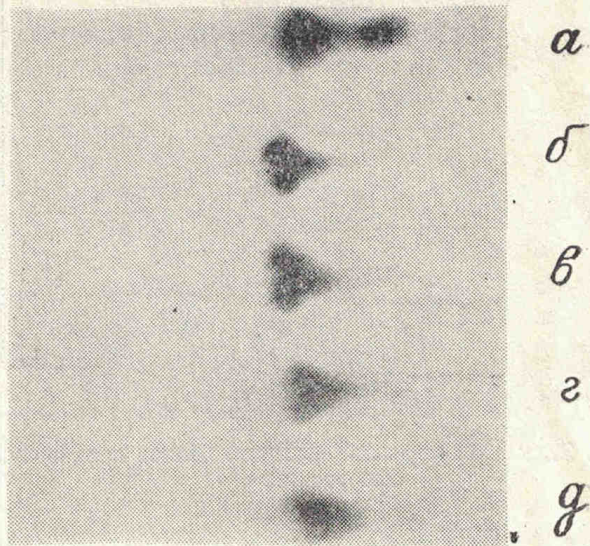


Рис. 2. Электрофореграммы нативной сыворотки и глобулиновых фракций. 1 — нативная сыворотка серии 786; 2—гамма глобулин серии 786; 3—гамма-глобулин серии 301; 4—бета-глобулин серии 786.

При увеличении напряжения до 7,2 в/см мы наблюдали еще более значительное ускорение движения белка, но хорошего разделения фракций отметить также не удалось. На электрофореграмме нативной сыворотки (рис. 3) видны только два пятна: одно соответствует альбуминам, второе — глобулинам.

Дальнейшие опыты показали, что при данном напряжении и одной и той же длительности пропускания тока степень разделения белков сыворотки на фракции является функцией ионной силы буфера. Так, например, при напряжении 3 в/см и ионной силе 0,08 в течение 21 часа было получено довольно четкое разделение белков на четыре фракции, соответствующие гамма-, бета-, альфа-глобулинам и альбуминам (рис. 4).

Вероналовый буфер $\text{pH}=8,6$; $\mu\text{c}=0,1$; $\nu=7,2$ в/см; $J=0,23$ т/А.
 время фракционирования 18 ч. сов.



а - нативная сыворотка серия 786
 б - γ -глобулины — " — 786
 в - χ -глобулины — " — 807
 г - β -глобулины — " — 786
 д - β -глобулины — " — 797

Рис. 3. Электрофореграммы нативной сыворотки и ее глобулиновых фракций.

Буфер вероналовый

$\text{pH}=8,6$; $\mu\text{c}=0,08$; $\nu=3$ в/см; время фракционирования - 21 час

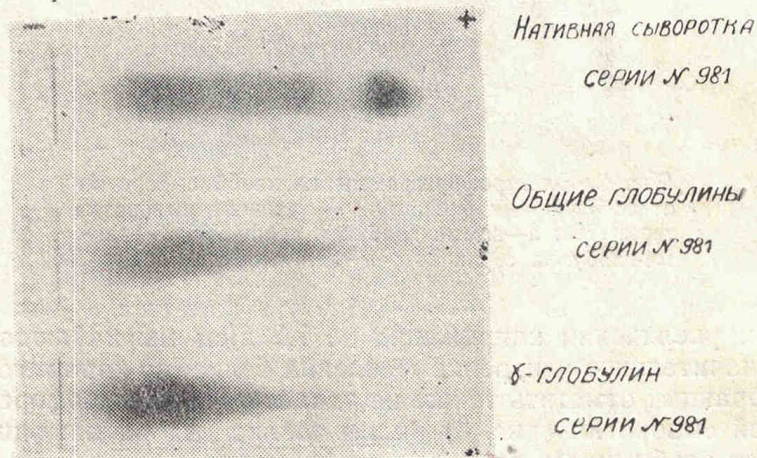


Рис. 4. Электрофореграммы нативной сыворотки и ее глобулиновых фракций.

При напряжении 7,5 в/см уменьшение ионной силы буфера до 0,08 значительно увеличивало скорость движения белка и приводило к хорошему разделению его на шесть фракций (гамма,—бета₁,—бета₂—альфа₁,—альфа₂—глобулины и отстоящие от них на довольно большом расстоянии альбумины).— рис. 5.

$pH=8,6$; $u/c=0,08$; $v=7,50$ v/cm ; $J=0,55$ mA ; ВРЕМЯ 22 ЧАСА

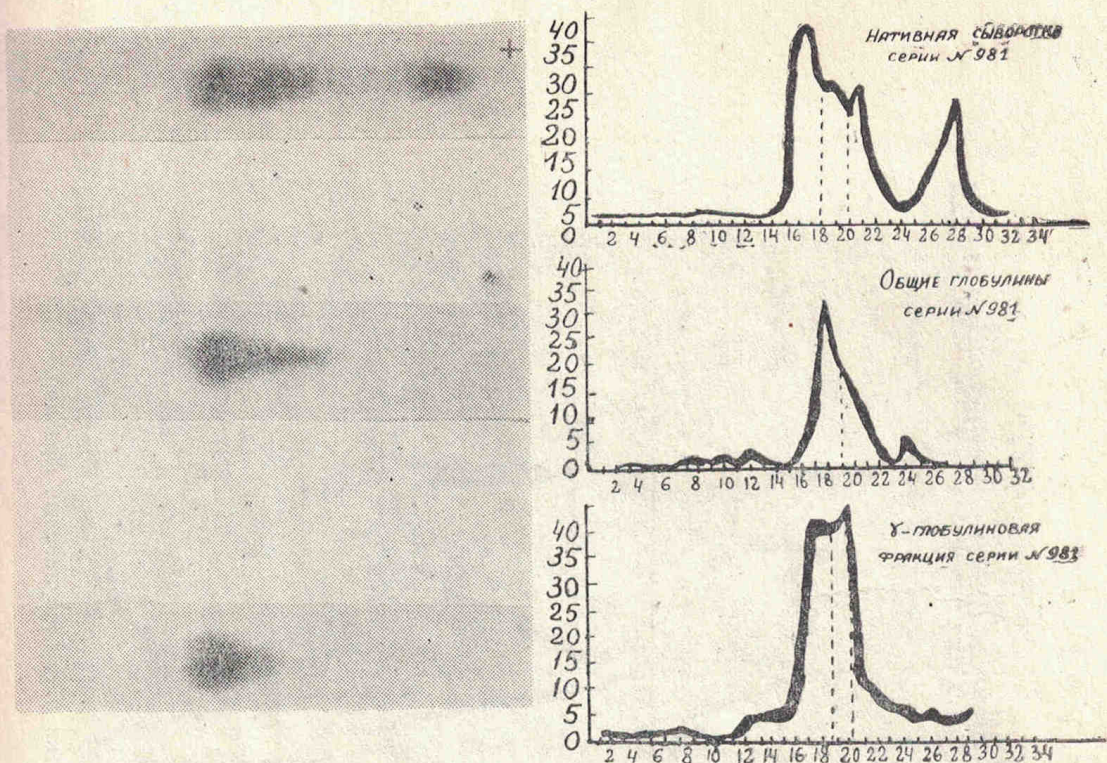
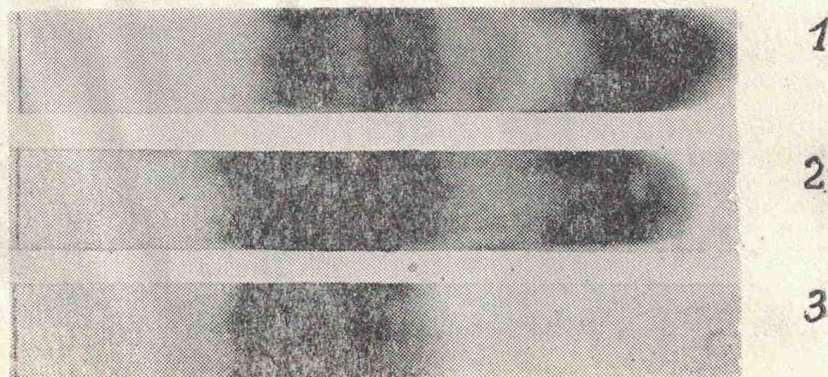


Рис. 5. Электрофореграммы нативной сыворотки и ее глобулиновых фракций.

Еще лучшие результаты получились при фракционировании белков сыворотки крови человека в буфере с ионной силой, уменьшенной до 0,05 (рис. 6).

Отрицательной стороной электрофореграмм, представленных на рис. 6, являлось слишком большое удаление всех фракций белка от места нанесения в сторону катода.

Вероналовый буфер $pH=8,6$; $u/c=0,05$; $v=7,5$ v/cm ; $J=0,78$ mA ; фракциониров. 10 ч.



- 1.- сыворотка крови человека.
- 2.- нативная сыворотка производителя „Метка“.
- 3.- То же концентрированная и очищенная.

Рис. 6. Электрофореграммы сыворотки крови человека и лошади.

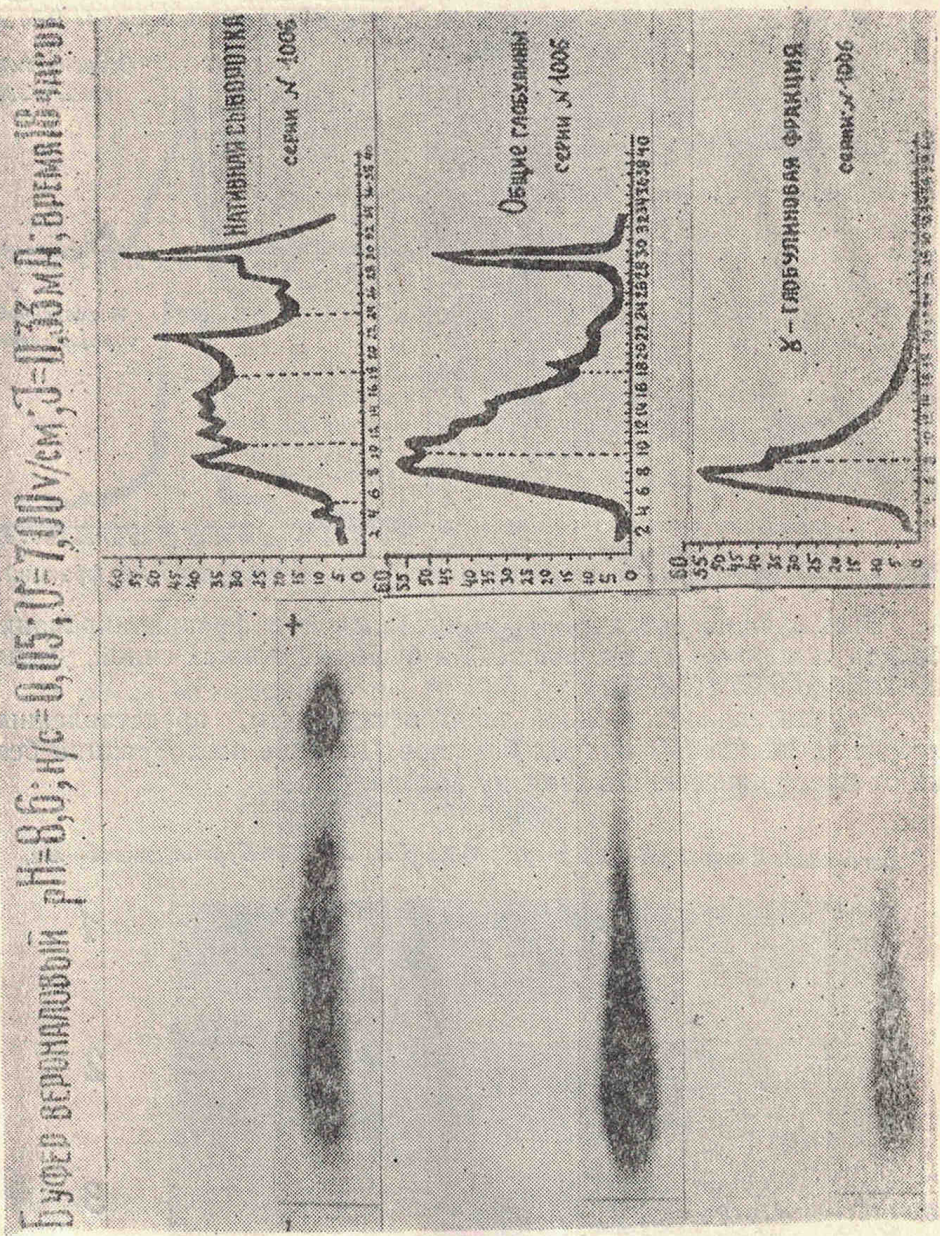


Рис. 7. Электрофореграммы нативной сыворотки и ее глобулиновых фракций.

Буфер вероналовый $pH=8,6$; $\mu/c=0,05$; $\nu=7,87 \nu/cm$; $I=0,42 mA$; ВРЕМЯ - 19 ЧАСОВ

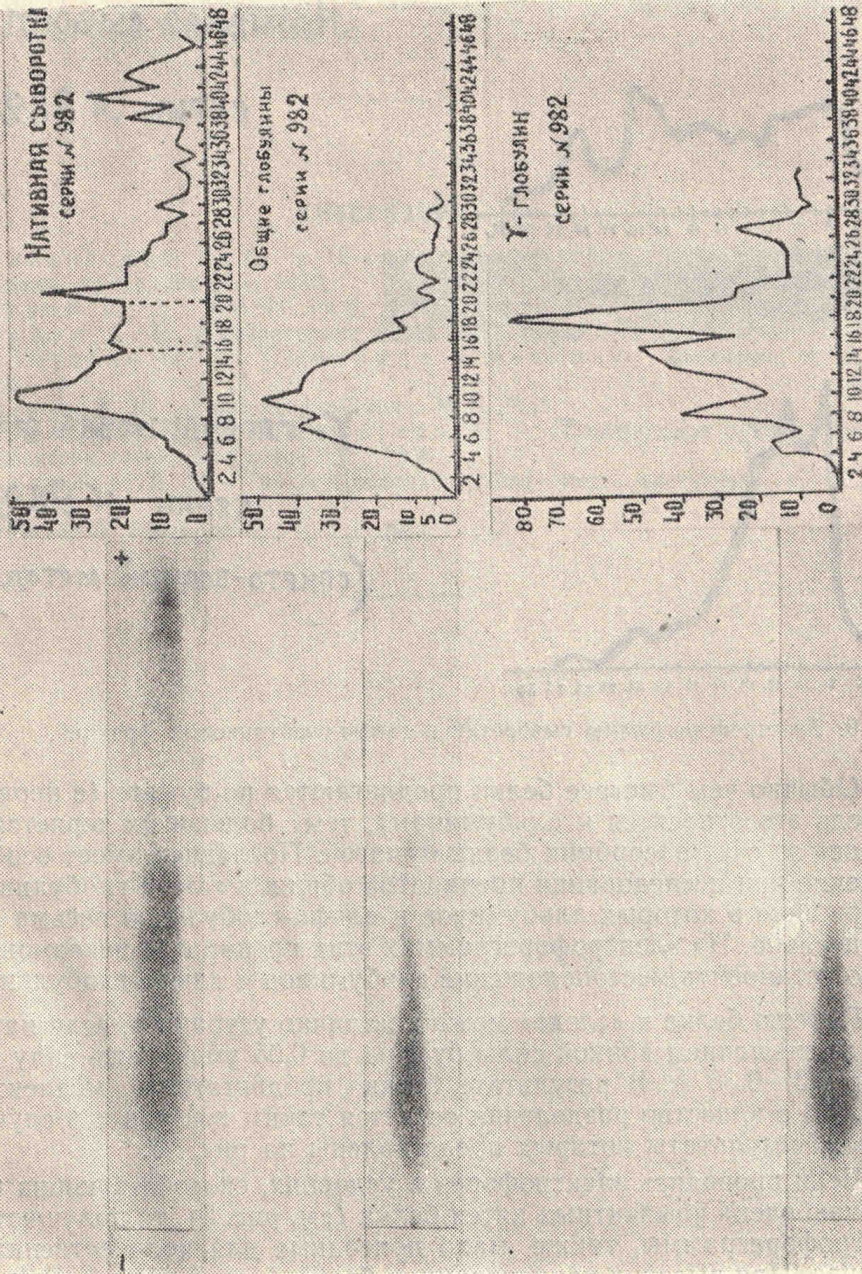
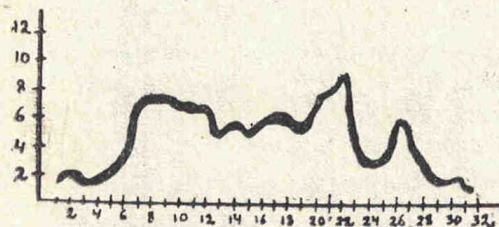


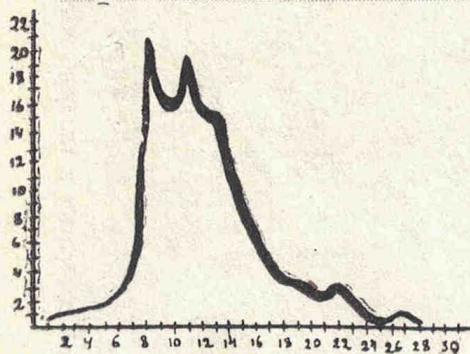
Рис. 8. Электрофореграммы нативной сыворотки и глобулиновых фракций.

Буфер веронал — медианаловый, рН = 8,6
и/с = 0,05; $v = 7,0$ в/см; $J = 0,29$ мА; время — 18 ч.



НАТИВНАЯ СЫВОРОТКА

серии № 982



Г- ГЛОБУЛИНОВАЯ ФРАКЦИЯ

серии № 982

(спирто-водный метод)

Рис. 9. Электрофореграммы сыворотки и гамма-глобулиновых фракций.

Обычно чем быстрее белки продвигаются по бумаге (в первую очередь это относится к альбуминам), тем больше их теряется в «следе» за счет адсорбции белка бумагой. Последнее имеет особое значение при исследовании препаратов общих и гамма-глобулинов, содержание в которых альбуминов и альфа-глобулинов весьма незначительно. На электрофореграммах этих препаратов невозможно точно установить местоположение альбуминов и альфа-глобулинов.

Потерю белка в «следе» можно частично устранить, если наряду с уменьшением ионной силы буфера до 0,05 уменьшить силу тока до 0,3—0,35 А. В результате белки продвигаются медленнее (рис. 7), а качество разделения остается таким же, как и в случае опытов, результаты которых представлены на рис. 6.

Если проводить электрофорез в условиях, способствующих получению очень компактных пятен белка (см. рис. 5), то получаются электрофореграммы, также мало пригодные для количественного анализа. При высоких концентрациях белка (на единицу поверхности) нарушается пропорциональность между его количеством и количеством поглощенной им краски (Хардвик, 1954; Смоличез, 1956).

Для целей количественного анализа более пригодны электрофореграммы, представленные на рис. 8.

При достаточно четком разделении фракций величина поверхности, занимаемой белком, примерно вдвое больше, чем на рис. 5. На кривой, построенной по показаниям оптической плотности, четко выявляются границы между фракциями. Интересно отметить, что до сих пор гамма-глобулиновые фракции выявлялись на электрофореграммах только одним пятном; на рис. 8 видим четыре пика. Аналогичное явление наблюдается в случае альбуминовых фракций (три пика).

Наряду с вероналовым буфером мы с успехом применяли веронал-мединаловый буфер (рис. 9).

ЛИТЕРАТУРА

- Балаховский С. Д. и Балаховский И. С. Методы химического анализа крови. Медгиз, 1953.
Гендон Ю. З. ЖМЭИ, № 9, 1956.
Гурвич А. Е. Лабораторное дело, № 3, 1955.
Кравченко Н. А., Самарина и Крицман. Биохимия, т. 18, в. 1, 1953.
Лазаров Н. Лабораторное дело, № 3, 1935.
Нечаева А. С. и Пономарева Н. А. Практическое руководство по производству гамма-глобулина, М., 1956.
Смоличев Е. П. Труды Сталинабадского мед. института, т. 21, в. 3, 1956.
Hardwicke J. Biochem. J. 57, v 1, 1954.
-

П. А. Шершнева, А. А. Токарева, А. П. Калмыкова,
Е. Д. Шкурко и Л. Е. Хунданов.

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ ПРОТИВОЧУМНЫХ СЫВОРОТОК

Данная работа была предпринята с целью проверки чистоты препаратов, полученных сывороточным отделом нашего института из иммунных лошадиных противочумных сывороток. Помимо этого, нас интересовал вопрос о качественном и количественном изменении состава белковых фракций у нативных сывороток после их очистки и концентрации.

Количественное определение общего белка и его фракций проводили по методу Вайнберга (1954). Степень чистоты белковых фракций сывороток проверяли при помощи электрофореза на бумаге. Методика электрофореза подробно описана в предыдущем сообщении*).

Из противочумных сывороток было приготовлено 15 серий гамма-глобулинов, 4 серии бета-глобулинов и 8 серий общих глобулинов. Лечебные и профилактические свойства этих препаратов были нами изучены ранее (1957).

Препараты гамма-глобулина и общих глобулинов получались осаждением белковых фракций нейтральными солями, а также различными концентрациями спирта. Бета-глобулины готовились одним — спиртовым методом.

Для освобождения нативной сыворотки от балластных белков (альбумина) все глобулиновые фракции осаждались кристаллическим сернокислым магнием (70% к объему вдвое разбавленной сыворотки). Гамма-глобулиновая фракция выделялась при помощи сернокислого аммония (17,5% соли к объему вдвое разбавленной сыворотки). Полученные осадки препаратов общих глобулинов и гамма-глобулинов подвергались общему водному диализу в вискозных мешочках в течение 3—5 суток при температуре воды в ванне 17—20°.

Второй метод получения препаратов общих глобулинов, бета- и гамма-глобулинов состоял из фракционного осаждения сывороточных белков различными концентрациями охлажденного спирта. Полученные осадки этих препаратов выделялись на суперцентрифуге (20000 оборотов в минуту), после чего они растворялись в

*) См. статью настоящего сборника: «Некоторые замечания к методике электрофореза белков сыворотки на бумаге».

физиологическом растворе и разводились им до требуемой концентрации белка (9—11%).

Для изучения физико-химических свойств нами были взяты следующие препараты: 5 серий общих глобулинов, 7 серий гамма-глобулинов и 2 серии бета-глобулинов. Были проведены также количественные исследования фракционного состава белков всех серий нативных сывороток, из которых приготавливались указанные препараты.

Суммарные данные количественных исследований белкового состава нативных сывороток и их фракций сведены в таблицу 1.

Из данных этой таблицы следует, что количество общего белка в полученных фракционных препаратах по сравнению с таковым в нативных сыворотках увеличивалось в среднем на 21%, за исключением бета-глобулиновой фракции. В этом случае процентное содержание белка уменьшалось, так как данная фракция специально не получалась, а являлась побочным продуктом при выделении гамма-глобулина.

В препаратах гамма-глобулинов и общих глобулинов содержание альбумина уменьшалось на 64%, в препарате бета-глобулина — на 33%.

Аналогичное явление отмечалось в отношении альфа-глобулинов: в препарате бета-глобулинов количество их уменьшалось на 52%, в препарате общих глобулинов — на 68% и во фракции гамма-глобулинов — на 56%.

Содержание бета-глобулиновой фракции в препаратах общих глобулинов, полученных солевым методом, уменьшалось на 29% и увеличивалось на 21% при использовании для очистки нативных сывороток спиртоводного метода. В бета- и гамма-глобулиновых препаратах происходило уменьшение бета-глобулинов на 42—48%.

Количество гамма-глобулиновой фракции увеличивалось во всех препаратах: в общих глобулинах при солевом методе — на 91%, при спиртоводном — на 57%, в гамма-глобулинах, изготовленных соловым способом — на 107%, при спиртоводном — на 79% и в бета-глобулинах — на 85%.

Таким образом, исследование количественных соотношений белковых фракций в приготовленных нами препаратах показывает, что при солевом и спиртоводном методах их получения идет перераспределение белковых фракций за счет уменьшения альбуминовой и альфа-глобулиновой фракций. Следует отметить, что в глобулиновых препаратах при большем содержании гамма-глобулиновой фракции процент бета-глобулинов бывает значительно снижен.

При изготовлении препаратов гамма- и общих глобулинов солевой метод по сравнению со спиртоводным дает повышение содержания гамма-глобулиновой фракции на 30%.

Нами были проведены также электрофоретические исследования нативных сывороток и их глобулиновых фракций. В качестве иллюстрации приводим ряд электрофореграмм.

На рис. 1 (нативная сыворотка серии 976) мы довольно ясно различаем почти одинаковые по интенсивности окраски четыре пятна, соответствующие последовательно гамма-, бета-, альфа-глобулиновым фракциям и альбуминам. Последние отличаются наибольшей подвижностью и дальше других уходят от места нанесения.

Фракция общих глобулинов характеризуется повышенной интенсивностью окраски и значительной величиной пятна.

Таблица 1

Белковый состав нативных противочумных сывороток и их фракций

Нативная сыворотка			Примененный осадитель	Очищенная и концентрированная сыворотка			Разница в % по сравнению с нативной сывороткой				Метод очистки	Полученный препарат				
Общий белок	Фракционный состав			Общий белок	Альбумин	Фракционный состав		Общий белок	Альбумин	Фракционный состав						
	Альбумин	Глобулин	Альбумин			Глобулин	Альбумин			Глобулин	Глобулин	α	β	γ		
7,84	25,88	11,17	28,87	34,08	9,45	11,72	2,66	20,41	65,21	+1,61	-14,16	-8,51	-8,46	+31,13	Солевой	Общие глобулины
8,34	23,26	14,22	27,39	35,13	9,23	6,37	5,41	33,19	55,03	+0,89	-16,89	-8,81	+5,80	+19,90	Спирто-водный	"
7,84	25,88	11,17	28,87	34,08	9,44	11,14	4,35	14,06	70,45	+1,60	-14,74	-6,82	-14,81	+36,37	Солевой	Гамма-глобулин
8,04	21,55	12,02	27,55	38,88	10,68	5,89	5,87	18,80	69,44	+2,64	-15,66	-6,15	-8,75	+30,56	Спирто-водный	"
8,09	16,70	15,91	32,80	34,59	6,69	11,27	7,66	17,12	63,95	-1,40	-5,43	-8,25	-15,68	+29,36	Спирто-водный	Бетаглобулин

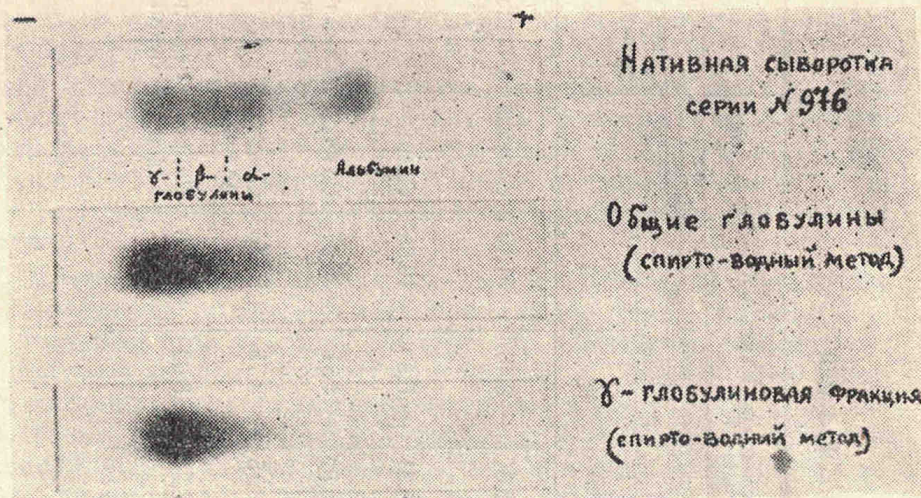


Рис. 1. Электрофореграммы противочумной сыворотки серии № 976 и ее глобулиновых фракций.

На электрофореграммах препаратов общих и гамма-глобулинов альфа-глобулины и альбумины представлены едва заметными пятнами.

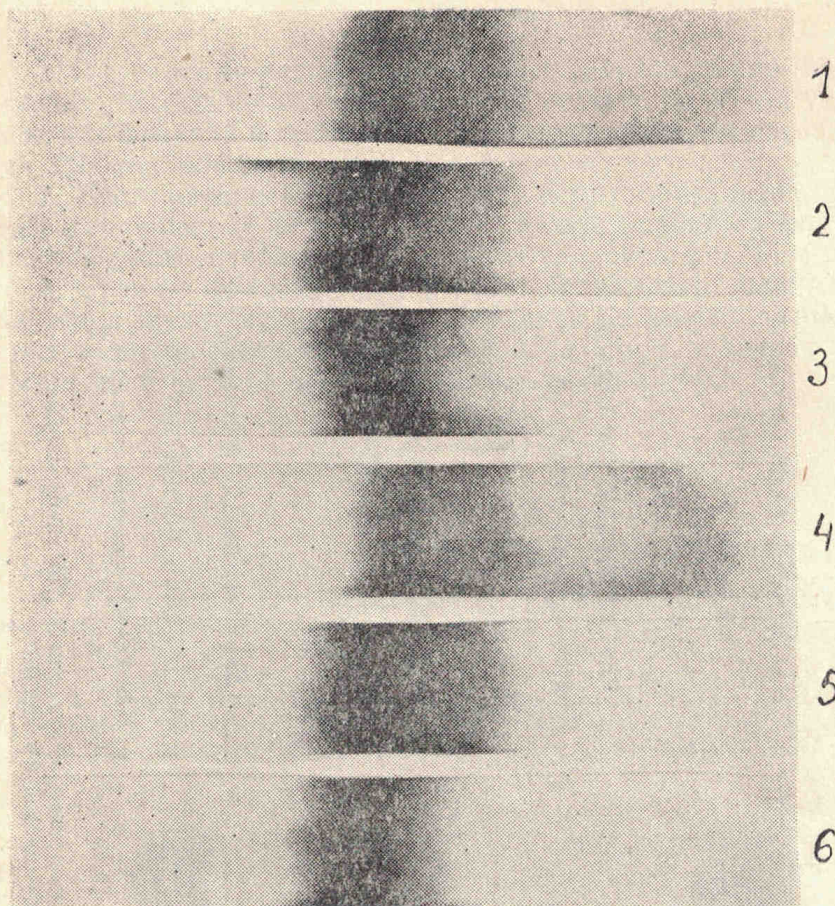
На рис. 2 дается сравнение электрофореграмм нативных сывороток серий № 981, 982 и полученных из них гамма- и общих глобулиновых препаратов. На электрофореграммах нативных сывороток проявляются три белковые фракции. Препараты общих глобулинов характеризуются двумя темными полосами, соответствующими гамма- и бета-глобулиновым фракциям; пятна альфа-глобулиновых фракций и альбуминов выражены в незначительной степени.

Препараты гамма-глобулина в основном содержат полосу гамма-глобулиновой фракции и меньшую часть их занимает бета-глобулиновая фракция. Альбуминовая и альфа-глобулиновая фракции проявляются лишь в виде слабо окрашенных штрихов.

Электрофореграммы, помещенные на рис. 3, показывают различие в белковых фракциях между нативной сывороткой серии № 797 и полученными из этой серии (спиртоводным методом) препаратами гамма- и бета-глобулинов.

Нативная сыворотка характеризуется тремя темными пятнами глобулиновых фракций и одним пятном альбуминов. Гамма-глобулиновый препарат представлен двумя довольно рельефными пятнами гамма- и бета-глобулиновых фракций. Бета-глобулиновый препарат представлен пятном веретенообразной формы, в котором более темная окраска соответствует гамма-глобулину, несколько светлее — бета-глобулиновой фракции, а слабо окрашенный конус пятна относится к альфа-глобулину.

Эти электрофореграммы (рис. 3) нативной сыворотки, гамма-глобулинов, бета-глобулинов и альбуминовой фракции (отход в процессе приготовления) наглядно характеризуют качество глобулиновых препаратов.



ОБОЗНАЧЕНИЯ: 1 — НАТИВНАЯ СЫВОРОТКА СЕРИИ № 981
 2 — ОБЩИЕ ГЛОБУЛИНЫ (СОЛЕВОЙ МЕТОД); 3 — γ -ГЛОБУЛИНЫ (СОЛЕВ. МЕТОД)
 4 — НАТИВНАЯ СЫВОРОТКА СЕРИИ № 982
 5 — ОБЩИЕ ГЛОБУЛИНЫ (СПИРТОВ. МЕТОД); 6 — γ -ГЛОБУЛИНЫ (СПИРТ. МЕТОД)

Рис. 2. Электрофореграммы противочумных сывороток серий № 981, 982 и их глобулиновых фракций, приготовленных солевым и спиртоводным методами.

При получении гамма-глобулинов в условиях наших опытов в качестве отхода остаются альбумин и в меньшем количестве альфа-глобулин.

Таким образом, полученные нами глобулиновые и гамма-глобулиновые препараты в основном освобождаются от альбуминовой и частично от альфа-глобулиновой фракций.

Препарат бета-глобулинов (как сопутствующая фракция при спиртоводном методе) фактически является плохо очищенной гамма-глобулиновой фракцией.

Как видно, получаемые нашим институтом препараты гамма-глобулина и общих глобулинов еще недостаточно очищены от балластных фракций. В связи с этим задачей последующих исследований явится разработка методов приготовления высокоочищенных гамма-глобулинов, а также препаратов глобулинов, содержащих только гамма- и бета-фракции.

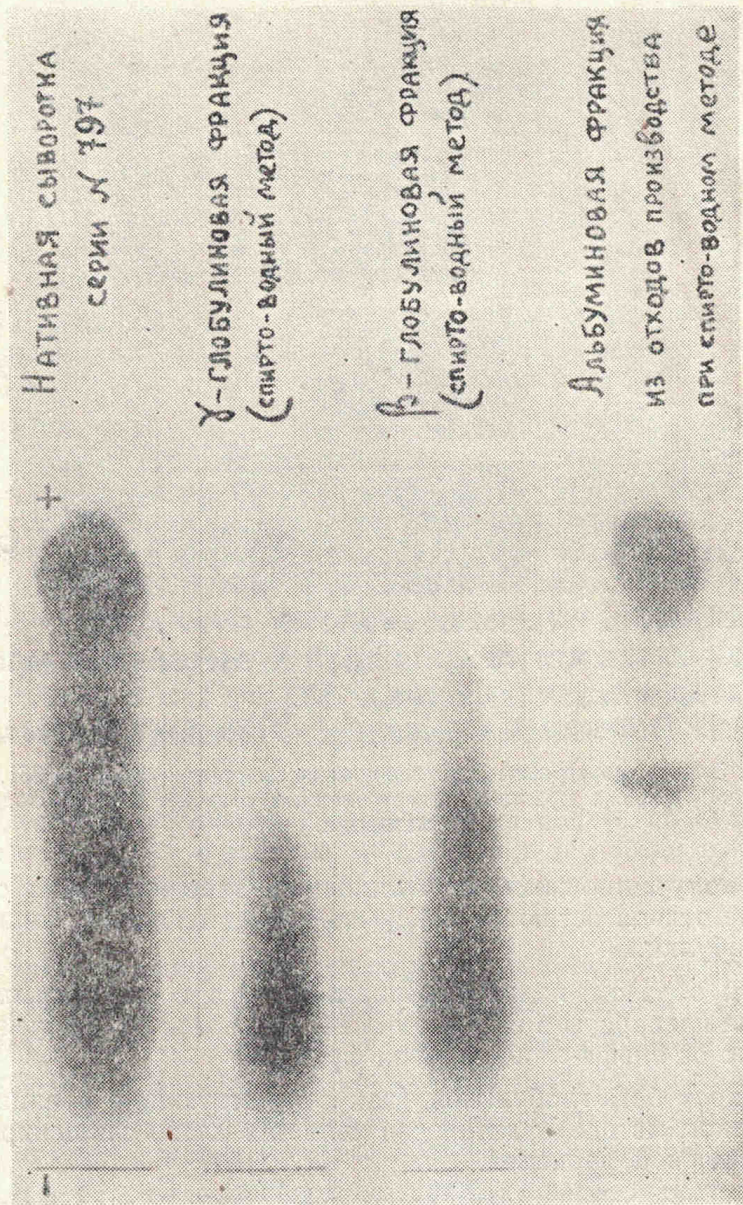


Рис. 3. Электрофореграммы противочумной сыворотки серии № 797 глобулиновых препаратов и отхода (альбуминовой фракции).

Выводы

1. Получаемые нашим институтом препараты гамма-глобулина и общих глобулинов содержат в своем составе до 20—30% других белковых фракций и не являются достаточно чистыми препаратами. Они требуют дополнительной очистки.

2. Исследованный нами препарат бета-глобулиновой фракции содержит только до 20% бета-глобулиновой фракции и фактически является плохо очищенной гамма-глобулиновой фракцией.

3. Судя по фракционному составу белка, спиртоводный метод получения препаратов гамма-глобулинов не имеет преимуществ перед методом солевого осаждения. Оба они в условиях наших опытов дают практически одинаковые результаты.

ЛИТЕРАТУРА

Вайнберг З. Ц. Количественное определение фракционного состава сыворотки. Украинский биохимический журнал, т. XXVI, № 3, 1954.

Хунданов Л. Е., Шершнева П. А., Шкурко Е. Д., Калмыкова А. П., Токарева А. А., Михалева В. Я., Лясковская Е. И. К вопросу о лечебных и профилактических свойствах отдельных фракций белков противочумной сыворотки. Тезисы докладов конференций. Иркутский гос. н.-и. противочумный институт Сибири и ДВ, в. 2, Улан-Удэ, 1957.

Л. Е. Хунданов, П. А. Шершнева, Е. Д. Шкурко,
А. П. Калмыкова, А. А. Токарева, Е. И. Ляско-
вская, В. Я. Михалева.

К ВОПРОСУ О ЛЕЧЕБНЫХ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ БЕЛКОВ ПРОТИВОЧУМНОЙ СЫВОРОТКИ

В настоящее время вопросу специфической профилактики и лечения чумы придается огромное значение, как решающему мероприятию в деле резкого снижения летальности при ней и полной ликвидации заболеваемости ею.

В связи с этим необходимо наряду с поисками новых лечебных и профилактических средств против чумы заниматься усовершенствованием существующих средств, в частности противочумной лечебной сыворотки.

Целью настоящей работы является изучение профилактических и лечебных свойств отдельных фракций белков противочумной сыворотки (общие глобулины, бета- и гамма-глобулины) в условиях эксперимента.

Для получения указанных фракций нами применялись следующие способы:

1. Осаждение глобулинов и выделение гамма-глобулинов нейтральными солями.
2. Осаждение глобулинов и выделение бета- и гамма-глобулинов этиловым спиртом на холоду.

Всего нами было получено указанными методами 15 серий гамма-глобулинов, 4 серии бета-глобулинов и 8 серий общих глобулинов.

Противочумная сыворотка и ее белковые фракции относятся к типу нетитруемых препаратов, и единственным способом определения их качества является биологическое испытание на животных. О качестве препаратов мы судили главным образом по количеству выживших животных, а также по сроку удлинения их жизни. В качестве контроля в каждом опыте нами использовались нормальные животные, не получившие испытываемых препаратов.

Для заражения животных нами были выбраны вирулентные штаммы (1435, 143), минимальная смертельная доза которых не превышала 100 микробов. Летальная доза штаммов определялась путем титрования на морских свинках и белых мышах.

При рассмотрении результатов проверки препаратов по отдельным сериям испытания, в которых употреблялись различные

заражающие дозы — от 10 до 50 D₅₀, мы убедились, что наиболее оптимальной заражающей дозой при проверке эффективности препаратов является 10 D₅₀. В связи с этим во всех наших опытах для контрольного заражения нами применялись 10 минимальных смертельных доз в 0,2—0,5 мл физиологического раствора.

Для испытания профилактических свойств препаратов последние вводились белым мышам подкожно в количестве 0,2, 0,3, 0,5 и 0,6 мл и морским свинкам — 5 мл до заражения либо одновременно с введением культуры.

Суммарные данные опытов по определению профилактических свойств препаратов на белых мышах приводятся в табл. 1.

Как видно из таблицы 1, гамма-глобулиновые фракции в опытах на белых мышах обладают отчетливо выраженными превентивными свойствами; при введении их за 24 часа или одновременно с заражением они предохраняют от 45 до 73% животных, в зависимости от дозы вводимого препарата; бета-глобулиновые фракции при тех же условиях опыта предохраняют от 5 до 30% животных; глобулиновые фракции — от 53 до 63% и нативные сыворотки тех же серий — от 26 до 51%.

Таким образом, наши опыты показали, что гамма-глобулиновые фракции по силе превентивного действия превосходят не только нативные сыворотки, но и бета-глобулины и некоторые серии общих глобулинов. В пользу лучшего эффекта от применения гамма-глобулинов говорит еще тот факт, что значительная часть животных, получивших гамма-глобулиновые фракции, дали продление жизни в сравнении с контрольными животными и животными, получившими глобулиновые и бета-глобулиновые фракции. Бактериологические исследования органов животных не позволяют установить какую-либо разницу в высеваемости бактерий от мышей, получивших нативную сыворотку и ее фракции.

Далее нами был проведен небольшой опыт по определению превентивных свойств одной серии противочумной сыворотки (1006) и ее белковых фракций на морских свинках (табл. 2).

Результаты этого опыта показывают, что из 19 свинок иммунизированных гамма-глобулиновыми фракциями, выжило 4 (21%) в то время, как контрольные животные и животные, иммунизированные глобулиновыми фракциями и нативной сывороткой, пали все. Отмечается также разница в сроках гибели животных, получивших различные препараты. Так, например, наибольший процент гибели среди животных, получивших гамма-глобулины, отмечается на 13—14-е сутки; среди животных, получивших глобулины, — на 11—12-е сутки; среди животных, получивших нативную сыворотку, — на 10—11 день. Таким образом, гамма-глобулины по иммуногенным качествам выгодно отличаются от глобулинов и нативной сыворотки. Нативная сыворотка и ее общие глобулины обеспечивают лишь продление жизни животных.

Лечебные свойства препаратов испытывались на белых мышах и морских свинках. Препараты вводились подкожно спустя 24—48 часов после заражения и в последующем через день в течение 10 дней по 0,5—0,2 мл для белых мышей и по 5—2 мл для морских свинок.

Ниже приводятся суммарные данные наших опытов на белых мышах (табл. 3).

Таблица 1

Превентивные свойства противочумных сывороток и ее белковых фракций
в опытах на белых мышах

Дозы изучаемых препаратов	Нагивная сыворотка					Глобулины					Бета-глобулины					Гамма-глобулины								
	количество исследованных сывороток	кол. животных, взятых в опыт	пало	выжило	выживаемость животных в %	средний срок жизни (в сутках)	количество исследованных сывороток	кол. животных, взятых в опыт	пало	выжило	выживаемость животных в %	средний срок жизни (в сутках)	количество исследованных сывороток	кол. животных, взятых в опыт	пало	выжило	выживаемость животных в %	средний срок жизни (в сутках)	количество исследованных сывороток	кол. животных, взятых в опыт	пало	выжило	выживаемость животных в %	средний срок жизни (в сутках)
0,6 мл	4	80	39	41	51	5,7	4	120	53	67	55	4,3	4	120	53	67	55	4,3	4	120	53	67	55	4,3
0,5 мл	13	300	183	117	39	3,5	5	140	53	87	62	4,4	5	140	53	87	62	4,4	5	140	53	87	62	4,4
0,3 мл	9	140	103	37	26	4,4	2	79	37	42	53	4,0	2	40	32	8	20	2,5	9	220	119	101	45	3,3
0,2 мл	2	40	25	15	37	5,6	—	—	—	—	—	—	2	20	19	1	5	4,5	4	60	30	30	50	5,3
Общий контроль без введения препарата	—	360	332	28	7,7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Таблица 3

Лечебные свойства противочумной сыворотки и ее белковых фракций в опытах на белых мышах

Наименование препарата	Количество исследованных серий	Количество животных, взятых в опыт	Пало	Выжило	Выживаемость животных в %	Средний срок prolongации жизни (в сутках)
Гамма-глобулины	9	160	40	120	75	3,6
Глобулины	5	100	27	73	73	5,3
Нативная сыворотка	9	160	59	101	63,1	2,4
Контроль (без введения препарата)	—	120	114	6	5	0(5,9)

Данные табл. 3 показывают, что при испытании лечебных свойств 9-ти серий гамма-глобулиновых фракций на белых мышах выживаемость животных составила 75%, продление жизни по сравнению с контрольной группой животных равнялось 3,6 суток. Пять серий глобулиновых фракций дали выживаемость 73% и продление жизни на 5,3 суток. В то же время при проверке 9-ти тех же серий нативных сывороток выживаемость животных составила 63,1%, продление жизни их равнялось 2,4 суток.

Следовательно, гамма-глобулиновые фракции по своим лечебным свойствам почти равнозначны глобулиновым фракциям и превосходят нативную противочумную сыворотку на 12%.

Результаты опыта по испытанию лечебных свойств препаратов на морских свинках приводятся в табл. 4.

Данные таблицы показывают, что гамма-глобулиновые фракции (как и в предыдущих опытах) по своим лечебным свойствам превосходят нативную сыворотку на 30% и ее глобулиновые фракции на 15%.

Резюмируя все эти данные по изучению превентивных и лечебных свойств препаратов, следует отметить, что гамма-глобулиновая фракция противочумной сыворотки практически почти во всех случаях нашего опыта по эффективности превосходит в среднем нативную сыворотку в 1,3—1,7 раза, бета-глобулиновую фракцию — в 2,1—2,2 раза и глобулиновую фракцию (некоторые серии) — в 1,2—1,3 раза. Превосходство лечебных и превентивных свойств гамма-глобулиновой фракции проявилось не только в отдалении срока гибели животных, но и в их выживаемости.

Последний раздел нашего исследования мы посвятили сравнительному изучению анафилактикогенности противочумной сыворотки и ее белковых фракций.

Для разрешения поставленной задачи нами были использованы морские свинки весом по 350—400 граммов.

Вначале был проведен ориентировочный опыт на одной группе животных. Морских свинок сенсibilизировали гамма-глобулинами, общими глобулинами и нативной противочумной сывороткой серии 982, содержащей 0,3 и 1 мг белка испытуемого препарата.

В разрешающем опыте была использована та же сыворотка с фракциями в количестве, содержавшем 0,1, 0,5, 1, 2,5 и 5 мг белка; на каждую дозу было взято по 2 морских свинки.

Лечебные свойства противочумной сыворотки и ее фракций
в опытах на морских свинках

Таблица 4

Наименование препарата	Код-во жн- вотных, взя- тых в опыт	Гибель животных по дням														Выживае- мость живот- ных в %	Средний срок продления жизни (в сут- ках)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
Гамма-глобулины серии 1006	20	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	3	35	4,3
Глобулины серии 1006	20	—	—	—	—	—	—	—	—	2	3	5	5	1	—	20	5,1	
Нативная сыворотка се- рии 1006	20	—	—	—	1	1	—	—	—	1	4	4	4	4	—	5	3,9	
Контроль (без введения препарата)	10	—	—	—	—	2	1	5	—	2	—	—	—	—	—	0	0(6,9)	

Сенсибилизирующую дозу испытуемых препаратов вводили животным подкожно в объеме 1 мл. Через 14 дней внутрикardиально в том же объеме вводилась разрешающая доза того же препарата, которым была сенсибилизирована морская свинка.

В дальнейшем дополнительно были проведены аналогичные исследования еще с двумя сериями препаратов (981, 1006), но для сенсибилизации свинок бралась только одна доза (1 мг белка) ввиду того, что результаты, полученные при испытании сенсибилизирующих доз 0,3 и 1 мг белка, почти равнозначны.

Каждая доза белка изучаемого препарата в разрешающем опыте испытывалась на 3-х морских свинках.

После введения животным разрешающей дозы симптомы анафилаксии были выражены во всех случаях, но в различной степени — от скоро проходящих явлений анафилаксии (чихание, кашель, почесывание носа, взъерошивание шерсти, учащенное дыхание, беспокойство) до тяжелого анафилактического шока, заканчивающегося смертью.

Результаты проведенных опытов приводятся в табл. 5 и 6.

Таблица 5

Анафилактогенные свойства противочумной сыворотки и ее белковых фракций

Наименование препарата	Сенсибилизирующая доза в мг белка подкожно	Разрешающая доза в мг белка внутрикardиально					Общие данные
		0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	
Нативная сыворотка 982	0,3	0/1	0/2	2/2	1/2	2/2	5/9
Глобулины 982	—, —	0/2	2/2	0/2	0/2	1/2	3/10
Гамма-глобулины 982	—, —	0/2	0/2	0/2	1/2	2/2	3/10
Нативная сыворотка 982	1	0/2	1/2	0/2	2/2	2/2	5/10
Глобулины 982	—, —	0/2	0/2	1/2	1/2	1/2	3/10
Гамма-глобулины 982	—, —	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	2/10
Нативная сыворотка 981	1	0/3	0/3	0/3	2/3	3/3	5/15
Глобулины 981	—, —	0/3	0/3	0/3	1/3	3/3	4/15
Гамма-глобулины 981	—, —	0/3	0/3	1/3	1/3	2/3	4/15
Нативная сыворотка 1006	1	0/2	0/3	1/3	2/3	2/3	5/14
Глобулины 1006	—, —	0/2	0/3	0/3	0/3	1/3	1/14
Гамма-глобулины 1006	—, —	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/15

Обозначения: числитель—количество свинок, павших от анафилактического шока;

знаменатель—количество свинок, взятых в опыт.

Данные таблиц показывают, что при испытании разрешающей дозы в 0,1 мг белка сенсибилизированных морских свинок дозой в 1 мг белка как нативная сыворотка, так и белковые фракции не дали ни одного случая анафилактического шока, но болезненные

Суммарные данные анафилактических свойств противочумной сыворотки и ее белковых фракций

Наименование препарата	Сенсибилизирующая доза в мг белка подкожно	Разрешающая доза в мг белка внутрикardиально					Общие данные
		0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	
Нативная сыворотка	1	0/7	1/8	1/8	6/8	7/8	15/39
Глобулины	—	0/7	0/8	1/8	2/8	5/8	8/39
Гамма-глобулины	—	0/8	0/8	2/8	1/8	4/8	7/40

Обозначения: те же, что и в таблице 5.

явления, наступавшие в течение 5—10 минут, наблюдались у всех животных в одинаковой степени и обычно проходили через 15—30 минут.

При введении в качестве разрешающей дозы 0,5 мг белка нативной сыворотки наблюдался один случай анафилактического шока, тогда как при применении той же дозы белковых фракций сывороток шока ни в одном случае не наблюдалось. Болезненные явления у морских свинок наступали в одинаковой мере в первые 5—7 минут и проходили в течение 30 минут и 1 часа.

При испытании разрешающей дозы в 1 мг белка нативная сыворотка дала 1 случай шока, белковые фракции также дали шок, но в более поздние сроки (общие глобулины — один случай, гамма-глобулины — два случая). Анафилактические проявления наступали в первые 3—5 минут и были более тяжелыми, чем у животных, получивших меньшую разрешающую дозу. Явления анафилаксии исчезали в течение 3-х часов.

При действии разрешающей дозы нативной сыворотки в 2,5 мг белка из 8 морских свинок пало 6 от анафилактического шока. Из 8 морских свинок, получивших такую же дозу глобулиновой фракции, те же осложнения констатировались в 2 случаях, а при введении гамма-глобулиновой фракции — в 1 случае. Проходящие явления анафилаксии также проявлялись более резко и держались более продолжительно у животных, получивших нативную сыворотку.

При введении разрешающей дозы в 5 мг белка нативная сыворотка дала 7 случаев шока из 8, глобулиновая фракция — 5 случаев из 8, гамма-глобулиновая фракция — 4 случая из 8. Обычно животные гибли в первые 2 минуты. Проходящие явления выражались в еще более тяжелом состоянии в случае введения нативной сыворотки.

Общие данные, суммированные по всем разрешающим дозам, свидетельствуют о том, что нативная сыворотка 3-х серий, испытанная на 39 морских свинок, дала 15 случаев анафилактического шока со смертельным исходом, тогда как глобулиновая фракция, изученная на 39 животных, дала 8 случаев шока, а гамма-глобулиновая фракция, проверенная на 40 свинок, — 7 случаев.

Результаты опытов свидетельствуют о том, что фракции белков противочумной сыворотки (гамма-глобулины и общие глобулины) обладают анафилактическими свойствами в значительно меньшей степени, чем нативная сыворотка.

Выводы

1. Белковые фракции противочумной сыворотки (бета- и гамма-глобулины, а также общие глобулины), введенные в организм восприимчивых к чуме экспериментальных животных, обладают профилактическими и лечебными свойствами, что наиболее отчетливо выражено у гамма-глобулиновой фракции.

2. Гамма-глобулины и общие глобулины в сравнении с нативной сывороткой обладают значительно меньшими анафилактическими свойствами, что особенно важно при применении их с терапевтической целью.

Л. Е. Хунданов, В. С. Колесник, Г. П. Плетникова

К ВОПРОСУ О СРАВНИТЕЛЬНОЙ ИММУНОГЕННОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВОЧУМНОЙ СЫВОРОТКИ И ЕЕ ГЛОБУЛИНОВЫХ ФРАКЦИЙ

Применяющиеся в настоящее время для профилактики и лечения инфекций (корь, скарлатина, полиомиелит, дифтерия) глобулины иммунных сывороток должны быть испытаны и в отношении чумы.

Ранее полученные нами экспериментальные данные по этому вопросу (1953, 1955, 1957), равно как и данные других исследователей (В. И. Кузнецова с соавторами, 1955; Г. Ф. Абрамова с соавторами, 1956; Е. Л. Семенова с соавторами, 1956; П. А. Шершнев, 1957), показывают, что глобулины противочумной сыворотки обладают против чумы довольно высокой эффективностью.

В настоящей работе ставилась задача — выяснить сравнительную устойчивость морских свинок к экспериментальной чуме в зависимости от примененного для их пассивной иммунизации препарата: специфической сыворотки и белковых продуктов ее фракционирования — общих глобулинов и гамма-глобулинов.

Работа выполнена на 80 морских свинках, разделенных на 4 группы:

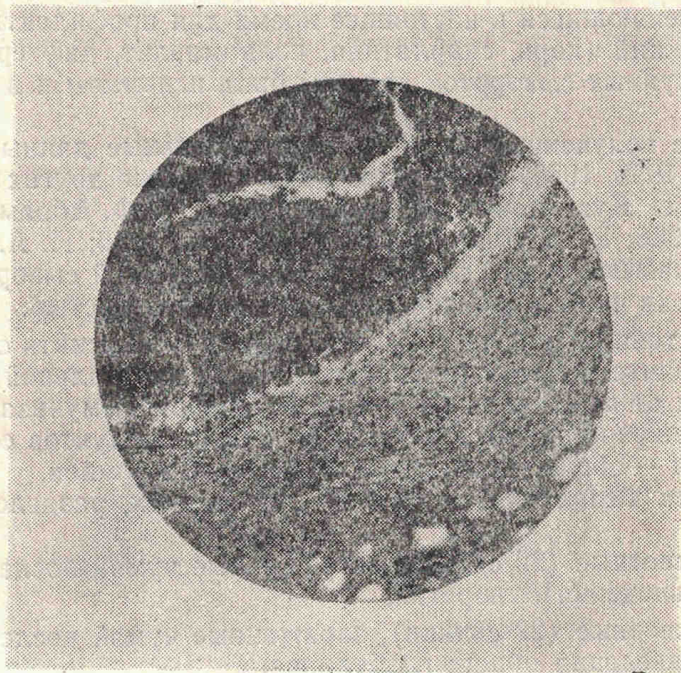
1. Животные (22 свинки), зараженные чумой после предварительного введения сыворотки.
2. Животные (22 свинки), зараженные чумой после предварительного введения общих глобулинов.
3. Животные (22 свинки), зараженные чумой после предварительного введения гамма-глобулинов.
4. Животные (14 свинок), зараженные чумой без какой-либо предварительной подготовки (контроль).

Иммунизирующие препараты вводились однократно за 20 часов до заражения по 5 мл под кожу боковой поверхности грудной части туловища. Заражение производилось подкожно (внутренняя поверхность бедра) дозой в 1000 микробов (10 D_{1m}) вирулентного чумного штамма (№ 143). На разных сроках после заражения (1, 3, 5, 7, 10, 14, 20 суток) животные убивались хлороформом (по 2 свинки из каждой иммунизированной группы и по 1 из контрольной) и немедленно вскрывались. По ходу опыта наблюдалась гибель животных, которые также подвергались вскрытию. При вскрытии животных (убитых и павших) отмечались заметные про-

стым глазом патологоанатомические изменения, производились посевы из органов и брался материал для гистологического исследования.

У убитых животных при бактериологическом исследовании материала установлено, что в группах, получивших до заражения тот или иной предохраняющий препарат, чумные микробы приблизительно с одинаковой закономерностью высеваются на довольно отдаленных сроках (начиная с 10 суток), притом почти исключительно из местных очагов (место введения культуры и регионарные лимфатические узлы) в то время, как в контрольной группе микробы высеваются из органов значительно раньше: из местных очагов — с 3-го дня после заражения, из внутренних органов — с 5 дня.

Патоморфологически в месте введения культуры отмечается воспалительное поражение тканей, которое у ранее иммунизированных животных имеет характер ограниченных очагов, иногда с наличием здесь чумных микробов; очаги представляются наиболее ограниченными у животных, получивших гамма-глобулины (см. микрофото 1); у контрольных животных установлено



Микрофото 1. Ограниченный воспалительный очаг в месте введения заражающей микробной взвеси. Увеличение 7x8. Ван-Гизон. Свинка убита на 15 сутки с момента заражения после предварительного введения гамма-глобулинов.

разлитое острое воспаление с резкой гиперемией ткани, гнойной инфильтрацией и наличием чумных микробов.

В регионарных лимфатических узлах имеет место расширение и отек синусов, незначительная гиперемия ткани, иногда — ограниченные воспалительные очаги, несколько более часто обнаруживаемые у животных, получивших перед заражением сыворотку.

В селезенке у иммунизированных животных постоянно наблюдается гиперплазия фолликулов и пульпы и инфильтрация

последней полиморфноядерными лейкоцитами; кроме того, в пульпе и внутри фолликулов наблюдается очаговая пролиферация ретикулярных клеток, более заметная у свинок, которым были введены гамма-глобулины; у контрольных животных на фоне гиперплазии фолликулов и пульпы с инфильтрацией последней полиморфноядерными лейкоцитами обнаруживаются (у 2 свинок из 4) некротические очажки, сочетающиеся с кровоизлияниями и слабо выраженной пролиферацией эпителиоидных клеток; часто такие очажки представляют собой подвергшиеся некрозу фолликулы.

В легких у иммунизированных животных довольно рано и постоянно имеет место инфильтрация межальвеолярных перегородок — за счет гистиоцитов, полиморфноядерных лейкоцитов, эпителиоидных и гигантских клеток; начиная с 7—10-х суток у некоторых свинок (чаще из числа иммунизированных сывороткой) обнаруживаются пневмонические очаги с гнойным экссудатом в альвеолах и с наличием здесь относительно немногочисленных чумных микробов; у контрольных животных на фоне неравномерной гиперемии легочной ткани встречаются очаги серозного пропитывания ее, что обычно сочетается с клеточной инфильтрацией межальвеолярных перегородок, а иногда — с наличием отчетливо выраженных пневмонических очажков.

В печени у иммунизированных животных, начиная с 5—7 суток после заражения, отмечается зернистая и жировая дистрофия паренхимных клеток, нарастающая с течением времени; при этом в группе с предварительной иммунизацией гамма-глобулинами она в общем несколько менее отчетлива, чем в группе с иммунизацией общими глобулинами, в которой она в свою очередь уступает таковой в группе с предварительным введением сыворотки; кроме того, наблюдается некоторая гиперплазия звездчатых элементов, как будто менее заметная в группе с предварительным введением сыворотки; у контрольных животных установлена зернистая и жировая дистрофия паренхимы, а у одной свинки обнаружены также воспалительные очажки с наличием в них чумных микробов.

У животных, павших от болезни, при бактериологическом исследовании материала чумные микробы более или менее закономерно выделяются из места заражения, лимфатических узлов, внутренних органов (легкие, селезенка, печень) и крови, причем в этом отношении разницы между отдельными группами животных (в том числе контрольной) отметить не удается.

Патоморфологически в месте введения культуры обнаруживаются очаги воспалительного поражения мягких тканей, содержащие множество чумных микробов и имеющие у предварительно иммунизированных животных характер ограниченных гнойников.

В регионарных лимфатических узлах у иммунизированных животных часто отмечается наличие воспалительных очагов, представляющих собой сочетание инфильтрации лейкоцитами, некроза, скопления чумных микробов и краевой клеточной пролиферации, лежащей в основе формирования фиброзной капсулы очага; у животных, получивших гамма-глобулины, эти очаги, обнаруженные у 5 свинок из 8, характеризуются относительно хорошо выраженной краевой пролиферацией клеток, обычно придающей очагу вид ограниченного гнойника; у животных, получивших

общие глобулины, в подобных очагах, обнаруженных у 3 свинок из 9, краевая пролиферация клеток выражена более слабо; у животных, получивших сыворотку, эти очаги, обнаруженные у 3 свинок из 8, в двух случаях вообще лишены четких очертаний и представляются в виде расплывчатых инфильтратов с обилием чумных микробов и очаговым некрозом; у контрольных животных во всех случаях установлена приблизительно одна и та же картина: резкая гиперемия, отек, кровоизлияния, обилие чумных микробов, разрыхление ткани узла с обилием в синусах свободных (мобилизованных) ретикулярных клеток, диффузная инфильтрация ткани узла, а также капсулы и окружающей клетчатки лейкоцитами и гистиоцитами с некрозом этих элементов и тканевых элементов узла.

В селезенке у всех иммунизированных животных отмечается прежде всего гиперплазия пульпы с явлениями мобилизации ее ретикуло-эндотелиальных элементов; у некоторых свинок обнаруживаются более или менее многочисленные септические очажки; чаще это наблюдается у животных, получивших общие глобулины, реже — у получивших сыворотку, еще реже — у получивших гамма-глобулины; у контрольных животных селезенка представляет картину резко выраженного поражения по типу сепсиса: значительная гиперемия пульпы, обильная инфильтрация ее лейкоцитами и свободными ретикулярными клетками, обилие рассеянных в пульпе чумных микробов и мелкоочаговый некроз ее.

В легких у предварительно иммунизированных животных обнаруживаются различной величины пневмонические очаги с гнойным или серозно-гнойным экссудатом, обычно содержащим значительную примесь чумных микробов; в центральной части очага клеточные элементы экссудата претерпевают некроз, кроме того, здесь представляются более густыми скопления чумных микробов; в краевой части очагов и между ними имеют место резкая гиперемия и серозное пропитывание ткани; на фоне этой гиперемии у некоторых свинок разбросаны септические очажки (см. микрофото 2), представляющие собой скопление чумных микробов в сочетании с некрозом ткани и гнойной инфильтрацией ее; септические очажки реже обнаруживаются у животных, получивших до заражения гамма-глобулины (1 свинка из 8), чаще — у получивших общие глобулины (4 свинки из 10), еще чаще — у получивших сыворотку (4 свинки из 8); кроме того, у животных, получивших гамма-глобулины, не столь глубок некроз элементов альвеолярного экссудата и не столь обильны чумные микробы в очагах; сами же пневмонические очаги у них представляются более крупными. У контрольных животных имеет место резкая гиперемия легочной ткани, серозное пропитывание ее и наличие многочисленных септических очажков или бактериальных эмболов; пневмонические же очаги встречаются весьма редко и выражены не отчетливо.

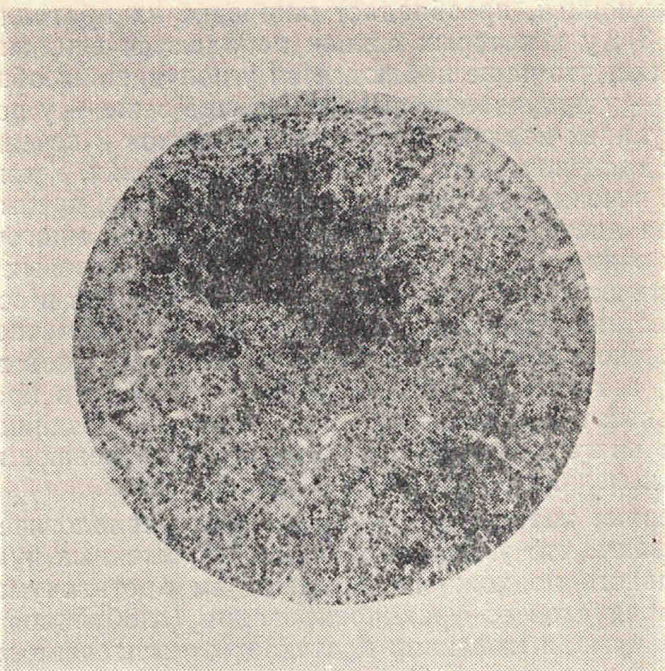
В печени постоянно имеет место зернисто-жировая дистрофия паренхимных клеток, которая наиболее резко выражена у получивших сыворотку, менее резко — у получивших общие глобулины, еще менее резко — у получивших гамма-глобулины; во всех группах животных на более ранних сроках гибели их, что обычно сочетается с преобладанием септических явлений, более резко выражена зернистая дистрофия протоплазмы печеночных клеток; на более поздних сроках гибели, что обычно сочетается с резко выра-

женной пневмонией, преобладает ожирение их протоплазмы (см. микрофото 3); у некоторых свинок попадают единичные септические очажки, что чаще наблюдается у получивших общие глобулины, реже — у получивших сыворотку, еще реже — у получивших гамма-глобулины; наличие указанных очажков в печени обычно совпадает с наличием таковых в селезенке и легких. У контрольных животных в печени установлена резкая гиперемия, преимущественно зернистая дистрофия паренхимы и наличие многочисленных септических очажков; в случаях ранней гибели животных эти очажки представляют собой скопление чумных микробов в сочетании с некрозом местных тканевых элементов; при этом отмечается наличие повсеместно разбросанных бактериальных эмболов в просвете капилляров, а также скопление чумных микробов в протоплазме эндотелиальных и звездчатых клеток; на более поздних сроках в септических очагах отмечается наличие претерпевающих некроз лейкоцитов и мелких пролиферативных элементов.

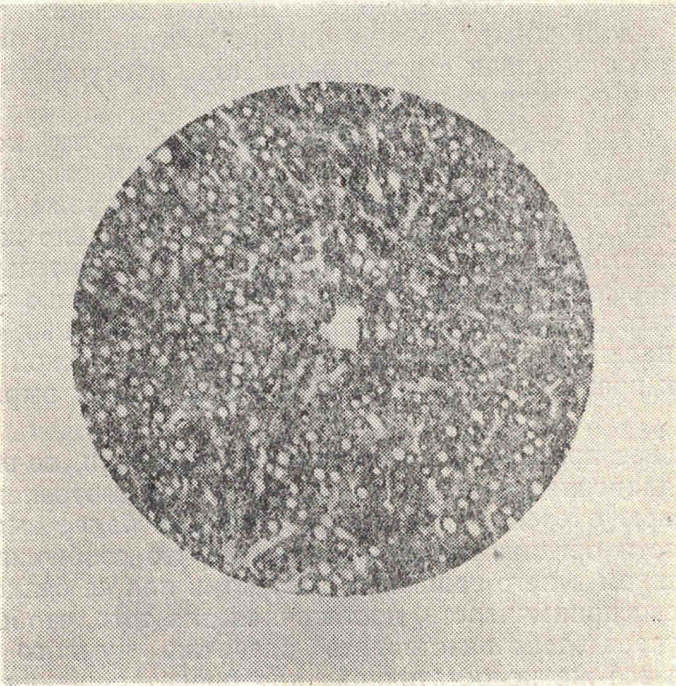
Изложенные патоморфологические и бактериологические данные показывают, что у морских свинок, зараженных чумой после предварительного подкожного введения им противочумной сыворотки или продуктов ее фракционирования (глобулинов и гамма-глобулинов) чумная инфекция протекает относительно менее злокачественно. Характерной особенностью этой инфекции является склонность к ограничению ее в области входных ворот, о чем говорит преимущественное обнаружение возбудителя в месте его введения и в близлежащих лимфатических узлах, где, как правило, обнаруживаются ограниченные, почти инкапсулированные гнойники, а не разлитое экссудативно-альтеративное воспаление, как это свойственно контрольным животным. Характерной особенностью чумной инфекции у подготовленных животных является также относительно редкое обнаружение в органах септических очагов, что находится в соответствии с отмеченной склонностью инфекции к ограничению в области ее входных ворот.

Вместе с тем обращает на себя внимание почти постоянное наличие очагов вторичной чумной пневмонии, тем отчетливее развитых, чем больше времени прошло с момента заражения животного (т. е. чем больше с момента заражения прожило животное). Подобная пневмония обычно составляет самое значительное явление в патоморфологической картине болезни, особенно у павших животных, чего нельзя сказать о контрольных животных (как убитых, так и павших), у которых в патоморфологической картине болезни, как правило, преобладают явления резко выраженного сепсиса.

Отмеченное преобладание вторичной пневмонии, по-видимому, связано с удлинением течения болезни, что у подготовленных животных, в свою очередь, является результатом более высокой сопротивляемости организма. Надо полагать, что сообщенная организму введением в него защитной сыворотки или ее белков специфическая невосприимчивость, достаточная для того, чтобы в большинстве случаев воспрепятствовать развитию чумного сепсиса, оказывается все же недостаточной для предотвращения чумной бактериемии; при этом циркулирующие в крови микробы в силу неизбежного прохождения крови через легкие оседают в большей или меньшей степени в их капиллярной сети (в результате простой эмболии или вследствие фагоцитоза со стороны капилляров эндо-



Микрофото 2. Септические очажки в легком. Увеличение 7x8. Гематоксилин—эозин. Свинка пала от болезни на 13 сутки с момента заражения после предварительного введения общих глобулинов.



Микрофото 3. Резкое ожирение протоплазмы меночных клеток. Увеличение 1x20. Толуидиновая синька. Свинка пала от болезни на 20 сутки с момента заражения после предварительного введения гамма-глобулинов.

теля). Связанные с этим дальнейшие изменения в органе, принимающие характер затяжной пневмонии, достигают тем большего развития, чем дальше будет отодвинут самый катастрофичный момент болезни — чумный сепсис, могущий, по-видимому, развиваться и на основе самой пневмонии, если таковая сама по себе не приведет болезнь к смертельному исходу.

Патоморфологические проявления чумы у предварительно иммунизированных животных несколько отличаются между отдельными группами в зависимости от введенного животному препарата, хотя результаты бактериологического исследования в этом отношении ничего определенного не дают.

У животных, получивших до заражения гамма-глобулины, значительно отчетливее выражена клеточная пролиферация в воспалительных очагах и ограниченность последних, причем в них менее обильны чумные микробы; менее значительной представляется зернистая дистрофия протоплазмы паренхимных клеток печени; наиболее редко обнаруживаются септические очаги в органах; в случаях гибели животных у последних представляются относительно более крупными пневмонические очаги, в то время как некроз элементов альвеолярного экссудата в них менее глубок, а чумные микробы менее обильны.

У животных, получивших до заражения общие глобулины, менее четко ограничены воспалительные очаги и более обильны чумные микробы в них; более часто, чем у животных, получивших гамма-глобулины, встречаются септические очажки в легких, и наиболее часто из всех трех иммунизированных групп животных подобные септические очаги встречаются в селезенке и печени.

У животных, получивших до заражения сыворотку, наиболее многочисленны и наименее четко ограничены регионарные воспалительные очаги; более часто, чем у животных, получивших гамма-глобулины, обнаруживаются септические очаги в селезенке и более часто, чем у животных, получивших общие глобулины, септические очажки попадают в легкие; наиболее отчетливо выражена дистрофия протоплазмы паренхимных клеток печени; чаще, чем в других группах животных, в этом органе встречаются лишенные видимых чумных микробов воспалительные очажки.

Таким образом, вышеприведенные данные о характере и особенностях паталогического процесса у морских свинок, зараженных чумой после предварительного подкожного введения им противочумной сыворотки или ее белковых фракций, свидетельствуют о наличии у этих животных относительной сопротивляемости организма к чумной инфекции, причем, судя по патоморфологическим данным, гамма-глобулины в этом отношении имеют преимущество перед общими глобулинами и нативной сывороткой.

Выводы

1. У морских свинок, получивших подкожно противочумную сыворотку или продукты ее фракционирования (глобулины, гамма-глобулины) и затем зараженных чумой, болезнь характеризуется ограниченностью местных воспалительных очагов и относительно слабо выраженными явлениями сепсиса.

2. Связанное с предварительной иммунизацией удлинение течения чумной инфекции нередко сочетается с развитием вторичной

чумной пневмонии, которая играет основную роль в исходе заболевания.

3. При заражении животных чумой после пассивной иммунизации их специфической сывороткой или ее белковыми фракциями (глобулины, гамма-глобулины) патоморфологические признаки доброкачественного (затяжного) течения болезни наиболее отчетливы у животных, получивших до заражения гамма-глобулины.

ЛИТЕРАТУРА

Абрамова Г. В., Карташова А. Л., Семенова Н. Л. К вопросу о напряженности иммунитета у экспериментальных животных, выздоровевших после лечения стрептомицином и сывороткой. Журн. микр., эпид. и иммунобиологии, № 1, 1956.

Семенова Е. Л., Пономарева Н. А., Толстухина Е. Н., Карташова А. Л., Абрамова Г. Ф., Лопатухина Л. Г., Дурасова М. Н. О сравнительной лечебной эффективности бактериомицина, биомицина, стрептомицина и гамма-глобулина при чуме (в эксперименте). Журн. микр., эпид. и иммунобиологии, № 2, 1956.

Кузнецова В. И., Домарадский И. В., Денисова Е. П., Мартенс Л. А., Сидорова Н. К. Сравнительная оценка различных методов очистки и концентрации противочумных сывороток и данные по изучению их гамма-глобулина. Тезисы докладов межинститутской научной конференции по вопросам микробиологии, иммунобиологии и терапии особоопасных инфекций. Саратов, 1955.

Хунданов Л. Е., Михалева В. Я., Лясковская Е. И., Калмыкова А. П. Гамма- и бета-глобулины противочумной сыворотки и изучение их эффективности. Известия Иркутского гос. н.-и. противочумного института Сибири и ДВ, т. XIV, 1957.

Хунданов Л. Е., Шершнев П. А., Шкурко Е. Д., Калмыкова А. П., Токарева А. А., Михалева В. Я., Лясковская Е. И. К вопросу о лечебных и профилактических свойствах отдельных фракций белков противочумной сыворотки. Тезисы докладов итоговой научной конференции Иркутского противочумного института, 1957.

Шершнев П. А. Сравнительная оценка различных методов очистки и концентрации противочумных сывороток. Известия Иркутского гос. н.-и. противочумного института Сибири и ДВ, т. XIV, 1957.

М. И. Анциферов, Л. И. Носкова

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АМИННОГО АЗОТА В СРЕДЕ УХАЛОВА — МИХАЛЕВОЙ НА РОСТ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

Для многих микроорганизмов питательные качества среды определяются, главным образом, наличием в ней белковых веществ и степенью их расщепления. В работах Саватеева, Плоскирева, Иванова и Битковой (1941), Бахрах, Крайновой и Михайловой (1954) показано, что гидролизаты, являющиеся основой сред, по своим питательным качествам могут отличаться друг от друга.

Известно, что степень расщепления азотистых веществ зависит от условий гидролиза (продолжительности гидролиза, количества и качества фермента, реакции среды, температуры) и варьирует в широких пределах, благодаря чему изменяется отношение общего азота к аминному азоту в конечных продуктах гидролиза.

В практике лабораторной работы, особенно в производстве бакпрепаратов, важно знать оптимальное содержание аминного азота в среде для получения интенсивного роста микробов. Зная количество аминного азота в гидролизате можно соответствующими разведениями регулировать содержание его при изготовлении питательной среды. Бахрах, Крайновой и Михайловой (1951) установлена зависимость роста чумного микроба от наличия в питательной среде азотистых веществ. При этом выяснилось, что оптимальное содержание общего азота в среде должно находиться в пределах 150—200 мг%, дальнейшее же увеличение содержания азотистых веществ в питательной среде заметного влияния на рост чумного микроба не оказывает.

Рост чумного микроба зависит от степени расщепления азотистых веществ в среде, увеличиваясь по мере увеличения содержания в питательной среде продуктов глубокого расщепления белка (аминного азота).

Выяснением оптимального содержания аминного азота в среде для культивирования туляремийного микроба занималась Олли (1953). Она показала, что для обеспечения нормального роста туляремийного микроба на плотной среде из рыбного гидролизата содержание аминного азота должно составлять 100—150 мг%. Понижение количества аминного азота в среде ухудшает рост, а повышение его концентрации до 300 мг% прекращает развитие микроба на этих средах.

Мы же поставили перед собой задачу — выяснить влияние концентрации аминного азота в среде Ухалова-Михалевой на рост туляремийного микроба. Для этой цели готовился агар с различным содержанием аминного азота: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 и 500 мг%. В качестве стимуляторов роста к среде добавлялся (разведенный физраствором 3:2) куриный желток в количестве 5% и 1% дефибрированной кроличьей крови. Контролем служил агар Ухалова-Михалевой без добавления этих ингредиентов.

На среды засеивались различные дозы 2-суточной культуры вирулентного штамма *V. tularensis* 924. Проверялась «чувствительность» к росту туляремийного микроба 3-х серий среды.

Результаты опытов сведены в табл. 1.

В опытах Олли (1953) определялась (в зависимости от содержания аминного азота) интенсивность роста туляремийного микроба на агаре из рыбного гидролизата по выходу микробной массы с 1 мл среды.

При этом оказалось, что наиболее интенсивный рост туляремийного микроба наблюдался на среде с концентрацией аминного азота 150—200 мг%.

В отличие от опытов Олли, оптимальное содержание в среде аминного азота нами определялось по «чувствительности» среды к росту туляремийного микроба при посеве различных посевных доз вирулентного штамма.

Оптимальным считалось такое содержание аминного азота в среде, когда туляремийный микроб вырастал от наименьшей посевной дозы. Как видно из таблицы 1, при содержании в среде 50 мг% аминного азота рост туляремийного микроба отсутствовал даже при посевном числе в 1 млрд. микробных тел. С увеличением же концентрации аминного азота до 100 мг% «чувствительность» среды повышается; рост становится возможным от посевной дозы в 1 млрд. микробных тел.

При концентрации аминного азота в 150 мг% туляремийный микроб вырастал от посевной дозы в 100 млн. микробных тел. Дальнейшее повышение содержания аминного азота в среде не улучшало ее качества.

Если в опытах Олли увеличение концентрации аминного азота в среде до 300 мг% задерживало рост туляремийного микроба, то в наших опытах такого явления не наблюдалось. Степень «чувствительности» среды была одинаковой как при содержании в среде 150 мг% аминного азота, так и при его более высоких концентрациях.

Отсюда, естественно, следует, что «чувствительность» среды Ухалова-Михалевой к росту туляремийного микроба находится в определенной зависимости от концентрации в ней аминного азота, содержание в среде 50 мг% аминного азота оказывается недостаточным для получения роста этого микроорганизма при посеве 1 млрд. микробных тел. При увеличении концентрации аминного азота до 150 мг% «чувствительность» среды достигает максимума; дальнейшее же повышение концентрации аминного азота не влияет на качество среды.

Таким образом, в практике изготовления среды Ухалова-Михалевой целесообразно основной гидролизат разводить так, чтобы содержание аминного азота в среде составляло 150—200 мг%.

Таблица 1

Зависимость роста туляремийного микроба от содержания
в среде Ухалова-Михалевой аминного азота

Содержание аминного азота	С р е д а	Посевные дозы										
		1 млрд.	100 млн.	10 млн.	1 млн.	100 тыс.	10 тыс.	1 тыс.	100	10	1	
50 мг %	Агар+5% желтка	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Агар+1% крови	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	(контроль)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
100 мг %	Агар+5% желтка	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
	Агар+1% крови	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
	(контроль)	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
150 мг %	Агар+5% желтка	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	Агар+1% крови	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
	(контроль)	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
200 мг %	Агар+5% желтка	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	Агар+1% крови	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
	(контроль)	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
250 мг %	Агар+5% желтка	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	Агар+1% крови	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
	(контроль)	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
300 мг %	Агар+5% желтка	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	Агар+1% крови	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
	(контроль)	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
350 мг %	Агар+5% желтка	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	Агар+1% крови	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
	(контроль)	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
400 мг %	Агар+5% желтка	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	Агар+1% крови	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
	(контроль)	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
500 мг %	Агар+5% желтка	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	Агар+1% крови	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
	(контроль)	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Из таблицы, далее, видно, что «чувствительность» среды резко возрастает при добавлении к ней стимуляторов роста — куриного желтка или кроличьей крови. Однако действие стимуляторов находится в зависимости от содержания аминного азота в среде. Так, при концентрации 50 мг⁰/₀ аминного азота в среде, несмотря на добавление стимуляторов, рост туляремийного микроба отсутствовал. С повышением же концентрации аминного азота в среде, при одновременном добавлении стимуляторов — ростовые качества среды значительно возрастают. В том случае, когда в среде концентрация аминного азота составляла 150 мг⁰/₀, добавление желтка резко повысило «чувствительность» среды, и туляремийный микроб при этом вырастал от посевной дозы в 100 микробных тел, тогда как в контроле рост наблюдался лишь от 100 млн. микробных тел.

Подобная картина наблюдалась и на среде с более высоким ⁰/₀ содержания аминного азота (200, 250, 300, 350, 400, 500 мг⁰/₀).

При использовании в качестве стимулятора роста кроличьей дефибринированной крови в количестве 1⁰/₀ «чувствительность» среды была несколько ниже по сравнению с добавлением желтка. Однако и в этом случае туляремийный микроб вырастал от посевной дозы в 100 тыс. раз меньшего, чем на контрольной среде.

Результаты проведенного опыта позволяют сделать следующие выводы:

1) Рост туляремийного микроба на среде Ухалова-Михалевой находится в определенной зависимости от содержания аминного азота в ней.

При концентрации 50 мг⁰/₀ аминного азота в среде туляремийный микроб не растет; с повышением ⁰/₀ содержания аминного азота «чувствительность» среды возрастает.

2) Повышение концентрации аминного азота в среде выше 150 мг⁰/₀ не задерживает рост туляремийного микроба, но и не улучшает ростовых качеств среды. Следовательно, в практике изготовления среды целесообразно основной гидролизат разводить до содержания в нем 150—200 мг⁰/₀ аминного азота.

3) При внесении в среду стимуляторов роста (желток или кровь) «чувствительность» среды резко повышается, благодаря чему становится возможным получать рост туляремийного микроба из минимальных посевных доз (100—10 микробных тел).

Однако стимуляторы оказывают благоприятное влияние на рост лишь при оптимальном содержании в среде аминного азота.

ЛИТЕРАТУРА

Е. Э. Бахрах, А. Н. Крайнова, А. П. Михайлова. Зависимость роста чумного микроба от наличия в питательной среде азотистых веществ. Труды института «Микроб», в. 1, 1951.

В. Д. Олли. Питательные среды для производства туляремийных бак-препаратов. Труды института «Микроб», в. 1, 1951.

А. Саватеев, Н. Плоскирев, К. Иванов, А. Биткова. Рост микробов на средах из отходов пищевой промышленности. ЖМЭИ, № 2, 1941.

И. В. Домарадский, В. С. Башева и Н. К. Сидорова

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЧУМНОГО МИКРОБА НА СРЕДАХ ИЗВЕСТНОГО СОСТАВА*

Белковый обмен чумного микроба до последнего времени продолжает оставаться мало изученным. Низкая протеолитическая активность этого микроба (Губарев, 1928), зависимость роста его от глубины расщепления белков среды и накопления в ней аминокислот (Быстренин, Липатова, Хворостухина, 1937; Бахрах, Крайнова и Михайлова, 1951; Трифонова, 1953), отношение к отдельным низко молекулярным азотистым соединениям (Ивановский и Ленская, 1944; Левин с сотрудниками, 1954) и, наконец, данные об окислении ряда аминокислот (Рао, 1940) — вот в общем и все, что нам известно по данному вопросу. Между тем проблема изменчивости, вопросы дифференциальной диагностики, разработка методов получения живых вакцин и т. д. находятся в тесной зависимости от достижений в этой области.

Настоящая работа преследовала цель изучить рост чумного микроба на средах известного состава, приготовленных из гидролизатов казеина и желатины, а также на средах из пептона, обработанных перекисью водорода, и некоторых синтетических средах.

Рост чумного микроба на средах из гидролизатов белка

Для работы мы применяли казеин, очищенный по методу Хаммарстена; желатину использовали без предварительной очистки (пищевую). Гидролиз указанных белков проводился 10-процентным раствором HCl в автоклаве при температуре 110° в течение 5 часов.

Полученные гидролизаты не давали биуретовой реакции. Отношение аминного азота, определенного «медным» способом, к общему азоту колебалось от 0,65 до 0,70. Следовательно, полученные гидролизаты представляли собой смесь свободных аминокислот, небольшого количества простейших пептидов и, по-видимому, дикетопиперазинов.

*- Эта и последующие 6 работ были выполнены в государственном научно-исследовательском институте микробиологии и эпидемиологии Юго-Востока СССР с 1950 по 1957 г., но по не зависящим от авторов причинам не были опубликованы.

Для получения питательных сред нейтрализованный гидролизат желатины (среда 1) или казеина (среда 2), содержащий 0,8—0,9 г N—NH₂, разводили до 1 литра водопроводной водой и добавляли 5,0 г NaCl, 0,40 г Na₂HPO₄·12H₂O, 0,20 г KH₂PO₄, 0,05 г MgSO₄, 0,1—1 г. глюкозы; рН среды доводили до 6,8—7,2 1 N раствором NaOH.

Для работы использовали авирулентные штаммы чумного микроба (196, 202, 205, 276, 257 и ЕВ). В качестве контроля служили бульон Мартена и беспептонный агар.

В соответствии с данными других авторов (Рао, 1939; Беркман, 1942; Сокхей, 1950 и др.) нами установлена возможность культивирования чумного микроба как в аэробных, так и в анаэробных (под маслом) условиях на жидких и твердых средах из гидролизатов желатины и казеина. Следует однако отметить, что на гидролизате казеина чумной микроб растет значительно лучше. Минимальная посевная доза его на жидкой среде из казеина равна 10³ микробных тел, на гидролизате желатины 10⁵. Последнее, очевидно, связано с большим разнообразием аминокислотного состава казеина. Желатина же наряду с богатством гликоколом содержит мало таких аминокислот, как валин, тирозин и триптофан.

Морфология чумного микроба на указанных средах остается неизменной по сравнению с контрольными средами. На жидких средах микроб растет в виде хлопьевидного осадка на дне, не мутя бульон. В мазках обнаруживаются мелкие грамтрицательные палочки, расположенные попарно и кучками, встречаются также цепочки клеток.

На твердых средах без глюкозы отмечается начальный рост чумного микроба в виде «кружевных платочков», а затем формирование колоний с зернистым центром и намечающейся фестончатой периферической зоной. S-форма микроба (штаммы 202 и 205) на этих же средах образует круглые гладкие выпуклые колонии. Добавление глюкозы к средам из гидролизатов желатины и казеина, не улучшая роста, вызывает некоторое изменение морфологии колоний и цитологии чумного микроба.

При пассажах штамма 476 чумного микроба на средах, приготовленных из гидролизатов казеина и желатины, изменений его биохимических свойств (отношение к глицерину, углеводам и т. д.) не обнаружено. Пассированные штаммы, как и исходные, лизировались чумным специфическим бактериофагом.

При выяснении вопроса о влиянии казеиновых сред на иммуногенные свойства чумного микроба мы получили гидролизаты ферментативным и щелочным перевариванием казеина по способу, предложенному Сосиной (1947). Минимальная посевная доза для жидкой казеиновой среды равнялась 5·10³ микробных тел, при меньших концентрациях рост появлялся лишь на 3—4 сутки. Макроскопически характер роста микроба на казеиновой среде вполне типичный. В мазках — слегка удлинённые палочки, иногда встречаются цепочки. В мазках из бульона Хоттингера микробы мельче, имеют овоидную форму.

На плотных средах минимальная посевная доза во всех случаях равнялась 50 микробным телам. Колонии на среде, полученной из щелочного гидролизата казеина (4), мелкие, с грубым, глыбчатым центром и хорошо выраженной периферической зоной; на среде 3 из ферментативного гидролизата казеина зона вокруг

колоний почти отсутствует. Колонии на агаре Хоттингера отличались большим размером, нежным зернистым центром и ясно выраженной периферической зоной.

Для определения выхода микробных тел 1,5 мл суспензии двухсуточной культуры чумного микроба (штамм ЕВ) засеивали на флаконы, содержащие 50 мл соответствующей среды. Посевная доза во всех случаях равнялась 10^7 микробных тел. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1
Выход микробных тел с плотных казеиновых сред

Среда	Посевная доза
Казеиновая 3	75—83x10 ⁹
Казеиновая 4	10—20x10 ⁹
Агар Хоттингера	60—75x10 ⁹

ПРИМЕЧАНИЕ: Среда 3 приготовлена из казеина, переваренного поджелудочной железой; среда 4 из щелочного гидролизата казеина.

Как видно из таблицы, наименьшее количество клеток получено с казеиновой среды 4.

Многочисленные пересевы штамма ЕВ на казеиновых средах не оказали влияния на его культуральные и биохимические свойства.

Изучение антигенных свойств проводилось после 3 и 15 пересевов штамма ЕВ на казеиновых средах. Для работы взяли 240 белых мышей весом 16—17 г каждая. Половину из них иммунизировали подкожно однократно, остальных—трехкратно с семидневными интервалами. Для однократной иммунизации брали дозу $5 \cdot 10^8$ микробных тел, а для трехкратной— $2 \cdot 10^8$, $4 \cdot 10^8$ и $6 \cdot 10^8$ микробных тел.

Через 21 день после последней иммунизации животных заражали 5 DLM-вирулентного штамма чумного микроба (708). Результаты опытов представлены в табл. 2.

Таблица 2
Иммуногенные свойства штамма ЕВ чумного микроба после пассирования его на казеиновых средах

Среда, на которой пассировался штамм	Число пассажей	Количество мышей	Иммунизация однократная		Количество мышей	Иммунизация трехкратная	
			пали	живы		пали	живы
Казеиновая 1	3	20	7	13	—	—	—
— " —	15	20	3	17	—	—	—
Казеиновая 2	3	20	10	10	30	10	20
— " —	15	20	6	14	30	7	23
Агар Хоттингера	3	20	5	15	30	6	24
— " —	15	20	8	12	30	5	25

Наши исследования показали, что субкультуры чумного микроба, выращенные на средах из казеина, обладают хорошими иммуногенными свойствами, не уступающими соответствующим свойствам субкультур штамма ЕВ, полученным с обычных сред (агар Хоттингера).

Рост чумного микроба на синтетических средах

Мы создали синтетическую среду с аминокислотным составом, качественно соответствующим казеину. Ввиду отсутствия в нашем распоряжении пролина, оксипролина, серина и треонина синтетическая среда включала четырнадцать аминокислот, растворенных в 1 литре водопроводной воды в следующих количествах: глутаминовая кислота 0,30 г, аспарагиновая кислота 0,02 г, аланин 0,30 г, гликокол 0,20, лизин 0,20, аргинин 0,10 г, цистин 0,15 г, метионин 0,10 г, валин 0,10 г, лейцин 0,10 г, фенилаланин 0,10 г, тирозин 0,04 г, триптофан 0,20 г, гистидин 0,20 г. В состав среды входили следующие соли: NaCl — 5,0 г, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ —0,40 г, KH_2PO_4 — 0,20 г, MgSO_4 —0,05 г, рН среды доводили до 6,8—7,2 едким натром (1N). В качестве источника недостающих аминокислот добавляли кровь в количестве 0,05%.

Среды стерилизовали в автоклаве при температуре 120° в течение 40 мин; содержащие глюкозу среды (0,1%) стерилизовали мелко или путем фильтрации через свечу.

Опыты показали, что эта среда пригодна для культивирования чумного микроба, хотя минимальная посевная доза его была примерно в 2,5 раза выше, чем на бульоне Мартена или на среде из гидролизата казеина.

На жидкой синтетической среде чумной микроб (штаммы ЕВ и 476) через двое суток дает рост в виде равномерной мути; в присутствии глюкозы образуется хлопьевидный осадок на дне. В мазках наблюдается полиморфизм клеток. На твердой синтетической среде с глюкозой и без нее обнаруживаются зернистые колонии; у некоторых из них намечается периферическая зона; начальный рост — типичный. Штаммы 202 и 205, находящиеся в S форме, образуют круглые гладкие колонии. В мазках — мелкие грамтрицательные палочки. Биохимические свойства культур, выросших на синтетической среде, не изменяются.

В дальнейшем мы уменьшали количество аминокислот в синтетических средах. Исключение из состава синтетической среды отдельных аминокислот приводило к резкому ухудшению роста чумного микроба. Например, на жидкой среде с глюкозой, но без метионина, лизина, аргинина и лейцина, рост на вторые сутки отмечался только при посеве 10^8 микробных тел. При посевной дозе 10^6 — 10^7 микробных тел начальный рост появляется не ранее шестых суток.

Исходя из данных Рао (1939) о незаменимости для чумного микроба пролина, фенилаланина, цистина и отчасти гликокола, мы приготовили синтетическую среду, состоящую из: NaCl — (5,0 г), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0,43 г), KH_2PO_4 (0,20 г), MgSO_4 (0,05 г), гликокола (0,20 г), фенилаланина (0,05 г), цистина (0,10 г), крови (0,1 мл), растворенных в 1 литре водопроводной воды (рН 6,8—7,2).

Однако на указанной среде даже слабый рост чумного микроба наблюдался только в присутствии 0,1% глюкозы и при условии посева большего числа микробных тел. Это и понятно, так как при отсутствии в среде источников углерода (углеводов, спиртов и др.) использование аминокислот осложняется их окислением для получения углерода и энергии. Если к тому же микробная клетка не способна к ресинтезу отдельных аминокислот, роста на такой среде не будет.

Рост чумного микроба на среде из пептона, обработанного перекисью водорода

В дальнейшем для экономии аминокислот при изучении вопроса о их влиянии на рост и морфологию чумного микроба мы использовали в качестве источника аминокислот пептон, обработанный перекисью водорода. В результате такой обработки триптофан, тирозин, цистин и метионин разрушаются, а все остальные аминокислоты сохраняются. Методика приготовления основного раствора пептона описана в работе Збарского, Мардашева и Слуцкого (1949).

Готовая среда состояла из нейтрализованного гидролизата пептона (1%) и хлористого натрия (0,5%); источником прочих солей служила водопроводная вода. Для контроля использовали пептон, не обработанный перекисью водорода. Полученные данные сведены в табл. 3.

При посеве чумного микроба на жидкую среду из пептона удавалось отметить только слабый, едва заметный рост. Добавление 10 мг тирозина не повысило ее биологической ценности. Внешение в состав указанной среды цистина или триптофана в такой же концентрации сопровождалось некоторым улучшением роста чумного микроба. Минимальная посевная доза снизилась примерно в 10 раз.

Как и следовало ожидать, лучшие результаты получены при культивировании чумного микроба на данной среде, после добавления всех недостающих аминокислот. В этом случае интенсивность роста и минимальная посевная доза микроба были такими же, как и на контрольной среде из пептона, не обработанного перекисью водорода. Добавление глюкозы (0,1%) ко всем указанным средам не оказывало заметного действия на характер роста микроба.

Не менее интересны опыты по культивированию чумного микроба на твердых средах из пептона, обработанного перекисью водорода. При посеве петли двухсуточной агаровой или бульонной культуры микроба удавалось отметить очень скудный начальный рост, при отсутствии взрослых сформированных колоний. Аналогичная картина наблюдалась на этой среде с добавлением тирозина. Добавление цистина и особенно триптофана улучшало рост чумного микроба. На агаре вырастали круглые зернистые колонии с намечающейся (в случае с цистином) и большой (в случае с триптофаном) периферической зоной.

При добавлении всех недостающих аминокислот характер роста микроба вполне типичен. В мазках из колоний обнаруживались короткие толстые палочки с зернистым включением.

Рост чумного микроба на среде из пептона, обработанного перекисью водорода

С р е д а	Время появления роста при посевной дозе микробов		
	10^8	10^7	10^6
Без добавителя	5 сутки	—	—
С тирозином и глюкозой	— „ —	—	—
С тирозином	— „ —	—	—
С цистином и глюкозой	4 сутки	5 сутки	—
С цистином	5 сутки	— „ —	—
С триптофаном и глюкозой	4 сутки	4 сутки	—
С триптофаном	5 сутки	5 сутки	—
Со всеми недостающими аминокислотами	3 сутки	3 сутки	—
Со всеми недостающими аминокислотами и глюкозой	— „ —	— „ —	—
Пептонная вода (контроль)	— „ —	— „ —	—

Обозначения: (—) — роста нет.

Природа указанной зернистости в настоящей работе не изучалась, однако можно предположить, что она обусловлена отложением в клетке волютина. В свое время Шабаев и Плетникова (1937) также отмечали образование метакроматиновых зерен у чумного микроба, выращиваемого при неблагоприятных условиях (на перегретом мясо-пептонном агаре).

Заключение

Приведенные литературные и экспериментальные данные показывают, что чумной микроб растет как на средах из гидролизатов белка (казеина, желатина), так и на синтетических средах. В то же время среды из пептона, обработанного перекисью водорода, а также синтетические среды, содержащие ограниченное число аминокислот, даже в присутствии 0,05% крови непригодны для культивирования данного микроба.

Из этого следует два вывода: во-первых, источником азота для чумного микроба являются, главным образом, аминокислоты

и, во-вторых, способность его к синтезу отдельных аминокислот, например, триптофана или цистина, весьма ограничена.

Для окончательного решения вопроса о характере белкового питания чумного микроба необходимо дальнейшее детальное исследование его аминокраммы, изучение диапазона дезаминирующей способности и постановка прямых опытов, могущих продемонстрировать синтез аминокислот из аммиака и углерода.

Сопоставление данных работы Рао с результатами наших наблюдений выявляют некоторые противоречия. Так, согласно Рао, для роста чумного микроба необходимы три аминокислоты — пролин, цистин и фенилаланин. В нашем случае культивирование этого микроба затруднено не только на среде, содержащей, помимо цистина и фенилаланина, еще гликокол и кровь, но и в присутствии девяти различных аминокислот или на пептоне, обработанном перекисью водорода.

Но методика работы Рао отличалась от нашей. Он практиковал посеvy относительно больших доз чумного микроба, причем о биологической ценности той или иной среды судил только по появлению роста и его интенсивности. Определение минимальной посевной дозы микроба и изучение влияния среды на его культуральные свойства Рао не проводил.

Если бы к решению поставленного вопроса мы подходили так же, то можно было сделать заключение о полноценности таких сред, как среда из пептона, обработанного перекисью водорода, и расхождения между нашими результатами тогда бы отсутствовали. Напомним кстати, что в одной из своих последующих работ Рао использовал синтетическую среду не из трех незаменимых, по его данным, для чумного микроба аминокислот, а более сложную, приближающуюся по своему составу к синтетической среде, составленной нами.

При обсуждении результатов наших опытов следует иметь в виду также следующее обстоятельство. Непригодность простых синтетических сред для целей культивирования микроорганизмов может зависеть не только от отсутствия необходимых аминокислот, но и от неудачного количественного соотношения их. Известно, что большой избыток одной определенной аминокислоты может конкурентно блокировать функцию других аминокислот в обмене веществ клетки.

Однако подавляющее действие одной какой-нибудь аминокислоты, чаще всего цистина, на ассимиляцию микробом других аминокислот исчезает в комплексных средах, где блокируемые источники азота присутствуют в достаточном количестве. В общем комбинации аминокислот всегда больше содействуют росту, чем отдельные аминокислоты.

Касаясь вопроса о причинах разницы в интенсивности роста чумного микроба на гидролизате казеина и синтетической среде, отметим, что и для других бактерий установлена большая биологическая ценность первого. По мнению ряда авторов, в казеиновых средах присутствуют какие-то не известные нам еще дополнительные факторы роста, не относящиеся к витаминам. Возможно, что такими активными факторами в белковых гидролизатах являются пептиды (Фостер, 1950).

Отсутствие стимуляции роста чумного микроба на гидролизате казеина глюкозой связано, по-видимому, со способностью

микроба покрывать свою потребность в углеводе за счет аминокислот.

Из приведенных выше данных видно, что среды, приготовленные из казеина различными методами (гидролиз кислотой и щелочью, переваривание поджелудочной железой), пригодны для культивирования чумного микроба. Дальнейшие исследования должны быть направлены на усовершенствование технологии приготовления казеиновых сред.

Казеин относится к числу полноценных белков, его аминокислотный состав полностью удовлетворяет потребностям чумного микроба в источниках азота. Казеин во много раз дешевле мяса и может (в сухом состоянии) храниться при любых условиях неограниченно долго.

Для производства вакцины лучше всего готовить среды из кислотных или щелочных гидролизатов казеина. При этом создается возможность использовать всегда одну и ту же серию гидролизата. Создавая нужный рН, добавляя соответствующие соли и стандартизируя другие процессы технологии, легко создать среду, вполне пригодную для длительного культивирования и хранения вакцинных штаммов. Следует отметить, что приготовление сред из кислотных или щелочных гидролизатов казеина значительно упростит работу средоварни.

Казеиновые среды могут найти применение и для других целей. Добавив необходимые ростовые факторы, их можно использовать в качестве диагностических сред при получении и очистке бактериофага или при изучении антигенной структуры микроба, в том числе при выделении токсинов.

Приготовленные по методу Хоттингера среды из казеина обеспечивают хороший выход микробных тел и являются превосходными заменителями гидролизатов мяса.

ЛИТЕРАТУРА

Бахрах Е. Э., Крайнова А. Н. и Михайлова А. П. Зависимость роста чумного микроба от наличия в питательной среде азотистых веществ. Труды института «Микроб», в. 1, 1951.

Быстренин А. И., Липатова Т. И. и Хворостухина М. М. Рост *V. pestis* на средах с различным содержанием продуктов белкового распада. Вестник микр., эпид. и паразитологии, в. 16, 1937.

Губарев Е. М. К вопросу о биологии *V. pestis*. Труды первого Всесоюзного противочумного совещания. (Саратов, 31/V—3/VI—1927), 1928.

Збарский Б. И., Мардашев С. Р. и Н. И. Слуцкий. Микробиологическое определение аминокислот. Сообщение 1. Вопросы медицинской химии, в. 1—2, 1949.

Ивановский Н. И. и Ленская Г. Н. К вопросу о дифференциальной диагностике чумного и псевдотуберкулезного микробов. Вестник микр., эпид. и паразитологии. Сб. научных трудов, посвященных 25-летию юбилею института «Микроб» (август, 1944), Саратов, 1948.

Сосина З. И. Щелочной гидролизат казеина как заменитель питательной среды для производства бактериальных вакцин. Сб. научных трудов Ставропольского института эпидемиологии и микробиологии, в. 1, 1947.

Трифонова А. А. Роль составных частей крови различных видов животных в питании чумного микроба. Диссертация, Саратов, 1953.

Шабаетов Н. и Плетникова З. Материалы к изучению цитологии чумного микроба. (Метахроматическая зернистость у *V. pestis*). Вестник микр., эпид. и паразитологии, в. 16, 1937.

Фостер Д. Химическая деятельность грибов. Изд. иностранной литературы. М., 1950.

Berkman S. Accessory growth factors requirements of the members of the genus *Pasteurella*. J. Infect. Des. 71, 201, 1942.

Levine H., Weimberg, R. Dowling, I. Evenson. M. Rockenmacher M. and Wolochow H. The oxidative dissimilation of serine by *Pasteurella pestis*. J. Bact. 67, 369, 154.

Rao S. The nutritional requirements of the plague bacillus, Ind. J. Med. Res. 27, 75, 1939.

Rao. S. Oxidations effected by the plague bacillus. Ind. J. Med. Res. 27, 617, 1940.

Sokhey S. Habbu, M. and Bharucha, K. Hydrolysate of casein for the preparation of plague and cholera vaccins Bull. World. Health Organiz, 3. 25, 1950.

И. В. Домарадский

ДЕЗАМИНИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ МИКРОБАМИ ЧУМЫ И ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА

Обмен аминокислот в культурах микроорганизмов давно уже являлся предметом исследования многих ученых, но большая часть работ, посвященных дезаминированию аминокислот, выполнена с непатогенными микробами. Обмен веществ возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных до сих пор еще продолжает оставаться мало изученным. В литературе имеется только одна работа (Рао, 1940), посвященная выяснению окислительной способности чумного микроба. Автором установлена возможность использования указанным микробом в качестве источника энергии ряда субстратов, в том числе и аминокислот. Однако данных по образованию аммиака автор не приводит. Аналогичных исследований по метаболизму микроба псевдотуберкулеза мы не нашли.

Ввиду большой важности вопроса о дезаминировании аминокислот для решения ряда проблем и были поставлены приводимые ниже опыты.

Экспериментальная часть

Для работы мы взяли штаммы *V. pestis* (ЕВ, 1, 17 и 235) и *V. pseudotuberculosis* (6 и 76). Микробы выращивались на агаре Хоттингера (рН 7,2) при температуре 28°C. Эксперименты проводили с двухсуточными культурами бактерий, трижды отмытыми от среды и суспензированными в физиологическом растворе поваренной соли. Окисление аминокислот под влиянием микроорганизмов изучалось в микрореспирометрах Варбурга в атмосфере воздуха, свободного от углекислоты («прямой» метод). Каждый сосудик в главном пространстве содержал 1 мл суспензии бактерий (20 млрд. микробных тел), 1,9 мл фосфатного буфера М/7,5 (рН 7,2) и 1 мл М/20 раствора субстрата, нейтрализованного до рН 7,0 по универсальному индикатору; во внутреннем цилиндрике — 0,1 мл 20-процентного раствора КОН; в контроль вместо кислот добавлялся 1 мл воды. Процессы окисления изучали при температуре 37°C; колебания ее не превышали $\pm 0,05^\circ$. Выбор температуры 37° вместо 27°, оптимальной для роста чумного микроба, основывался на указании Рао о том, что потребление кисло-

рода культурами в первом случае вдвое больше, чем во втором. Наблюдение за дыханием бактерий проводилось в течение 1 часа, после чего энзиматические процессы останавливались добавлением в каждый сосудик 0,5 мл 25-процентного раствора трихлоруксусной кислоты. В безбелковом фильтрате определялся азот аммиака по Конвею.

Результаты опытов представлены в табл. 1. Приводимые в ней цифры обозначают количество микролитров поглощенного кислорода или выделенного аммиака (за вычетом контрольных данных) за 1 час в пересчете на 1 мг сухого веса (Q_{O_2}). Средние величины коэффициентов Q_{O_2} рассчитаны на основании не менее 4—5 параллельных определений.

Как видно из таблицы, оба вида микроорганизмов окисляют ряд аминокислот. С наибольшей интенсивностью окисляются глутаминовая кислота, аланин, серин, треонин, пролин, аспарагиновая кислота, гликокол, цистеин; в 2—3 раза слабее — норлейцин и валин; не окисляются совсем диаминомонокарбоновые кислоты, метионин, лейцин, тирозин, триптофан, гистидин.

Окисление аминокислот сопровождается освобождением аммиака, за исключением фенилаланина, в котором окисляется, по-видимому, не боковая цепь, а ароматическое кольцо ($Q_{NH_3} = O$). Очень низкую величину Q_{NH_3} в случае пролина можно объяснить следующим. Судя по литературным данным, дезаминирование пирролидон — α — карбоновой кислоты, не содержащей свободной аминогруппы, осуществляется после разрыва цикла и превращения ее в соединение, доступное действию аминокислотооксидаз. Неспособность чумного и псевдотуберкулезного микробов к окислению другой гетероциклической аминокислоты — триптофана интересно сопоставить с хорошо известным фактом, что реакции на индол в культурах этих микроорганизмов всегда отрицательны.

Как показали расчеты, количество поглощенного кислорода на миллимоль той или иной аминокислоты значительно больше по сравнению с количеством выделившегося аммиака. Из этого следует, что распад аминокислот в условиях наших экспериментов не ограничен отщеплением аминогруппы, но влечет за собой также окисление продуктов дезаминирования. Тем не менее, при дезаминировании чумным и псевдотуберкулезным микробами серина, треонина, аланина и глутаминовой кислоты было обнаружено образование α -кетокислот (качественное определение с помощью 2,4-динитрофенилгидразина).

Вопрос о промежуточных продуктах окисления прочих аминокислот остается открытым. Отметим лишь, что превращение цистеина сопровождается выделением сероводорода. Последнее обстоятельство представляет большой интерес, так как обычно считают, что чумной микроб сероводорода не образует.

Обращает на себя внимание то, что дезаминирование аспарагина протекает в несколько раз интенсивнее, чем аспарагиновой кислоты. Это согласуется с данными о наличии у чумного микроба фермента аспарагиназы. Из табл. 1 видно также, что наименьшая скорость превращения аминокислот отмечается у штамма ЕВ.

В табл. 2 представлены сравнительные данные по дезаминированию аминокислот штаммами чумного и псевдотуберкулезного микробов.

Таблица I

Поглощение кислорода и образование аммиака при превращении
аминнокислот в культурах чумного и псевдотуберкулезного микробов

Аминокислота	Штамм чумного микроба						Штамм псевдотуберкулезного микроба					
	ЕВ		235		1		17		6		76	
	QO ₂	QN ₃	QO ₂	QN ₃	QO ₂	QN ₃	QO ₂	QN ₃	QO ₂	QN ₃	QO ₂	QN ₃
Аспарагиновая	3,1	2,3	4,7	7,0	7,8	14,9	7,9	23,3	19,1	26,8	51,2	88,8
Глутаминовая	12,8	7,7	17,9	37,2	19,1	30,8	43,0	28,1	37,0	49,2	31,9	40,1
Аланин	13,0	6,4	41,0	45,4	33,4	23,3	45,6	32,9	24,2	30,0	38,9	31,8
Гликокол	4,5	6,7	12,6	43,0	10,3	11,1	9,9	17,8	12,6	43,0	32,5	36,5
Валин	1,2	0,9	2,0	1,2	1,5	—	1,5	1,2	2,9	1,1	1,3	1,0
Лейцин	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Норлейцин	1,5	1,6	1,8	2,0	—	—	—	—	3,3	5,2	—	—
Цистеин	5,6	11,2	6,6	13,5	5,6	9,7	4,7	9,0	13,8	28,0	30,5	42,3
Метионин	0	0	0	0	—	—	—	—	0	0	—	—
Цистин	3,5	6,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Серин	19,2	15,5	39,4	32,4	—	—	—	—	40,2	26,5	—	—
Треонин	13,4	10,7	13,2	11,5	—	—	—	—	28,8	19,1	—	—
Лизин	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Аргинин	0	0	0	0	—	—	—	—	0	0	—	—
Фенилаланин	1,6	0	1,6	0	4,5	0	3,0	0	2,4	3,0	1,8	0
Тирозин	0	0	0	0	—	—	—	—	0	0	—	—
Гистидин	0	0	0	0	—	—	—	—	0	0	—	—
Пролин	13,3	4,7	33,6	4,4	—	—	—	—	32,1	9,6	—	—
Аспарагин	11,9	19,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Триптофан	0	0	0	0	—	—	—	—	0	0	—	—

Относительная скорость дезаминирования аминокислот штаммами чумного и псевдотуберкулезного микробов (активность штамма ЕВ принята за 1)

Аминокислота	Штамм чумного микроба						Штамм псевдотуберкулезного микроба			
	1		235		17		6		76	
	QO ₂	QNH ₃	QO ₂	QNH ₃	QO ₂	QNH ₃	QO ₂	QNH ₃	QO ₂	QNH ₃
Аспарагиновая	2,5	6,4	1,5	3,0	2,6	10,1	6,0	5,3	16,2	38,4
Глутаминовая	1,5	4,0	1,4	4,8	3,4	3,7	2,9	6,6	2,5	5,2
Аланин	3,6	3,6	1,8	4,7	3,5	5,0	3,2	7,1	3,0	4,9
Гликокол	2,3	1,6	2,1	1,9	2,2	2,6	2,8	6,3	7,2	5,4
Валин	1,2	—	1,6	1,3	1,2	1,3	2,4	1,2	1,1	1,1
Цистеин	1,0	0,9	1,2	1,2	0,8	0,8	2,5	1,6	10,3	7,5
Фенилаланин	2,7	0	1,0	0	1,8	0	1,4	3	1,1	0

На основании приведенных данных можно сделать следующие выводы: 1) по своей активности в отношении дезаминирования аминокислот штамм ЕВ чумного микроба уступает всем остальным изученным нами штаммам; 2) наибольшей скоростью дезаминирования отличается штамм 17; на втором месте стоит штамм 1, на третьем 235; 3) максимальная интенсивность превращения аминокислот с поглощением кислорода и выделением аммиака отмечена в культурах штамма 76 псевдотуберкулезного микроба.

Анализ литературных и собственных данных показывает, что по числу дезаминируемых аминокислот, скорости их превращения микробы чумы и особенно псевдотуберкулеза не уступают непатогенным бактериям, отличающимся значительной интенсивностью обмена веществ.

Известно, что обмен 1 — аминокислот, в каком бы направлении он ни шел, является в конечном итоге следствием воздействия на субстрат сложных ферментных систем, имеющих в своем составе, наряду с первичными акцепторами и донаторами водорода, многочисленные промежуточные переносчики его. К числу таких промежуточных переносчиков водорода, а в случае переаминирования и аминокислот, принадлежит система дикарбоновых кислот, действующих в качестве полиэнзиматических коэнзимов. По мнению Браунштейна (1949), именно этой системе дикарбоновых кислот принадлежит центральная интегрирующая роль в метаболизме азота; через нее осуществляется взаимодействие последнего с клеточным дыханием, обменом жиров и углеводов.

В связи с изложенным нас интересовал вопрос, как влияет глюкоза и продукты ее распада на процесс дезаминирования аминокислот в культурах микробов чумы и псевдотуберкулеза.

В качестве основных субстратов мы использовали аланин, аспарагиновую и глутаминовую кислоты, обычные участники реакций переаминирования, а в роли возможных акцепторов аминокислот выступали пируват натрия, щавелевоуксусная и яблочная кислоты.

Работа проводилась, как правило, с отмытыми культурами микробов чумы (штаммы ЕВ и 1) и псевдотуберкулеза (штаммы 6 и 76).

Согласно нашим данным, потребление кислорода микробами чумы и псевдотуберкулеза в присутствии аспарагиновой кислоты и глюкозы или глутаминовой кислоты и глюкозы значительно меньше, чем можно было ожидать, исходя из окисляемости каждого из этих субстратов, отдельно взятых. То же самое отмечается при окислении аланина. В случае замены глюкозы пируватом, яблочной или щавелевоуксусной кислотами картина не меняется. Однако способность чумного и псевдотуберкулезного микробов окислять яблочную кислоту выражена относительно слабо. В соответствии с этим отрицательное влияние яблочной кислоты на дыхание клеток менее заметно.

Из наших данных следует далее, что глюкоза, щавелевоуксусная кислота, пируват и яблочная кислота не оказывают существенного влияния на процесс дезаминирования аминокислот микробами. Количество образующегося при этом аммиака в одних случаях несколько меньше, в других — больше, чем в пробах, состоящих из одних аминокислот, но в общем меняется незакономерно. С другой стороны, в присутствии аланина микробы чумы окисляют больше глюкозы. Практически, после одно-двухчасовой инкубации в системе аланин+глюкоза не удается обнаружить редуцирующих веществ.

Применение метода хроматографического распределения на бумаге не выявило образования микробами чумы и псевдотуберкулеза новых аминокислот. Это позволяет предполагать, что в присутствии свободного доступа кислорода названные микробы не катализируют реакций переаминирования между аланином и щавелевоуксусной кислотой, глутаминовой кислотой и пируватом (или глутаминовой и щавелевоуксусной или яблочной кислотами). Возможно, что избыточная аэрация вызывает быстрое разрушение новообразованных аминокислот. Однако против этого говорит низкая скорость окисления глутаминовой и особенно аспарагиновой кислот в культурах чумного микроба. Кроме того, специальные исследования показали отсутствие накопления новых аминокислот и в анаэробных условиях.

Следует отметить, что в условиях анаэробноз микробы чумы и псевдотуберкулеза дезаминируют только две аминокислоты — серин и аспарагиновую (возможно еще одну — цистеин). Аланин и глутаминовая кислота не дезаминируются совсем или же количество образованного аммиака бывает крайне небольшим. Добавление глюкозы, пирувата или яблочной кислоты не оказывает заметного влияния на процесс дезаминирования, хотя глюкоза, например, сбрасывается под влиянием этих микробов в пробах с ограниченным доступом кислорода интенсивнее, чем при аэрации. С другой стороны, в присутствии метиленовой сини отмечается дегидрирование глутаминовой кислоты, аланина и серина, но не аспарагиновой кислоты. Превращение последней обусловливается, по-видимому, не окислительными ферментами, а аспартазой.

После выяснения указанных вопросов мы перешли к изучению дыхания микробов чумы и псевдотуберкулеза в присутствии не одной какой-нибудь аминокислоты, а нескольких. Можно было ожидать, что в данных условиях будет отмечаться стимуляция окисления одной аминокислоты другой. Основанием для этого предпо-

жения явилась работа Северина (1944) о повышении скорости потребления кислорода кишечной палочкой при окислении аспарагиновой кислоты в случае добавления к опытным пробам небольших количеств аланина. Причина стимулирующего действия, как предполагают, заключалась в образовании пировиноградной кислоты за счет аланина и последующем включении процесса переаминирования между пируватом и аспарагиновой кислотой (Браунштейн, 1949).

С другой стороны, мыслимы иные пути взаимодействия аминокислот в комплексных средах. Как известно, комбинация аминокислот всегда больше способствует росту, чем отдельные из них. Следовательно, в отдельных случаях относительная скорость потребления кислорода клетками может уменьшаться по мере усложнения состава среды. Те субстраты, которые в большей мере необходимы для роста микроба, будут окисляться медленнее, и возможность использования промежуточных продуктов их распада возрастает. Скорость окисления веществ, которые с трудом перестраиваются клеткой, должна, наоборот, увеличиваться. Таким образом, конечный эффект взаимодействия аминокислот будет зависеть от качественного состава среды.

Кроме того, не следует забывать об антагонизме между аминокислотами. В литературе описаны случаи антагонизма между валином и аминокислотой, треонином и серином, метионином и норлейцином и т. д. (Губарев, 1952; Вулли, 1954). Возможны однако и обратные соотношения. Например, в смесях аминокислот наблюдается синергидное действие в отношении использования углерода. В частности, при наличии в среде пролина, глутаминовой кислоты и орнитина утилизация углерода грибом *Aspergillus niger* была в четыре раза выше, чем на чистом пролине (Стайнберг, 1942; цит. по Фостеру).

Как видно, исследование влияния состава среды на дыхание бактерий действительно является актуальной и сложной проблемой. Для работы мы использовали комбинации из двенадцати аминокислот: аспарагиновой и глутаминовой кислот и аланина (основных субстратов действия аминофераз), фенилаланина, лизина, валина, триптофана и метионина (как представителей трудно или совсем не окисляемых субстратов), цистеина (окисляемой серусодержащей аминокислоты), а также гликокола, пролина и серина (в силу их значения для роста и развития чумного микроба). Опыты ставили таким образом, что к одной или двум аминокислотам последовательно добавлялись равные количества других, а также глюкозы. Наблюдения за поглощением кислорода проводили в течение двух-трех часов.

При добавлении к одной аминокислоте другой общее потребление кислорода микробами не увеличивается. Например, в системе, состоящей из трех аминокислот — аланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, количество потребленного микробами O_2 или равно сумме его, приходящегося на долю каждой из них, или несколько меньше. Больше того, при наличии в среде цистеина в комбинации с глутаминовой кислотой или пролином наблюдается значительное снижение потребления кислорода клетками. Последнее особенно заметно в случае использования сред, состоящих из многих компонентов. Аналогичные результаты получены при изучении динамики образования аммиака.

В данном случае мы сталкиваемся с явлением, напоминающим антагонистические отношения между аминокислотами в процессе роста микробов.

Добавление к сложным средам аминокислот, не окисляемых данным видом бактерий, не отражается на дыхании микроорганизма. В частности, в присутствии цистеина и пролина количество поглощенного кислорода примерно такое же, как и в случае комбинации аминокислот, называемой нами средой Рао (цистин, пролин и фенилаланин).

Таким образом, несмотря на многочисленные опыты, установить факт стимуляции окисления одной аминокислоты другой нам не удалось. Поэтому можно предполагать, что недезаминируемые аминокислоты и в сложных комплексных средах не подвергаются каким-либо превращениям. Данные хроматографического исследования подтверждают сделанный вывод: аминокислотный состав различных сред не меняется в результате 2—3-часового воздействия бактериальной суспензии. На хроматограммах пятна новых аминокислот не обнаруживаются. Добавление глюкозы к пробам, состоящим из двух и более аминокислот, сопровождается значительным снижением потребления кислорода и образования аммиака клетками. В указанных условиях бактерии поглощают кислорода намного меньше, чем можно было ожидать, основываясь на данных об окисляемости каждого из компонентов среды, отдельно взятого. На первый взгляд может создаться впечатление, что в присутствии аминокислот глюкоза не окисляется. Действительно, как при наличии, так и в отсутствии углевода количество аммиака, обнаруживаемого в среде, примерно одинаково. Однако параллельные определения редуцирующих веществ в пробках, содержащих одну глюкозу и ее же в смеси с аминокислотами, опровергают этот вывод. Следовательно, уменьшение потребления кислорода клетками при добавлении глюкозы к аминокислотам объясняется какими-то другими причинами.

По-видимому, в этих случаях имеет место неполное окисление аминокислот: они дезаминируются, но их углеродный скелет остается незатронутым и может использоваться для пластических целей. Подобное явление отмечается и при культивировании бактерий на синтетических средах. Для роста чумного микроба на средах, состоящих из аминокислот, в том числе и незаменимых, наличие глюкозы необходимо. В отсутствие глюкозы или при замене ее трудно ассимилируемым источником углерода (глицерином, лимонной кислотой) скорость роста культуры значительно снижается.

Согласно нашим данным, глюкоза не оказывает влияния только на окисление аминокислот, входящих в состав среды Рао. Общее количество кислорода, поглощаемого в системе среда Рао+глюкоза, равно суммарному количеству его, потребляемому при окислении отдельно взятых глюкозы и аминокислот указанной среды. Очевидно, это объясняется своеобразием механизма дезаминирования двух аминокислот среды — цистина и пролина.

Все сказанное выше в равной мере относится как к микробам чумы, так и псевдотуберкулеза. Качественных отличий в этом отношении между ними установить не удалось.

Известный интерес представляют данные наших опытов по выяснению влияния арсенита на дыхание микробов чумы и псевдотуберкулеза. Арсенит угнетает окисление всех испытанных суб-

стратов. Особенно сильно его влияние сказывается на потреблении кислорода в присутствии пирувата и щавелевоуксусной кислоты. Продукция аммиака также резко снижается.

Наличие в среде значительных количеств преобразованного аммиака (0,25М) не препятствует окислению аминокислот микробами чумы и псевдотуберкулеза.

Скорость дезаминирования аминокислот в аэробных условиях несколько выше в культурах неотмытых бактерий. Однако интенсивность эндогенного дыхания в этом случае намного выше, чем у «покоящихся» микробов.

Витамины РР, В₁ и гемин не оказывают заметного влияния на дыхание микробов чумы и псевдотуберкулеза. Не стимулируют они также потребления кислорода и образования аммиака клетками в присутствии аланина и глутаминовой кислоты.

Скорость потребления микробами кислорода зависит от концентрации субстрата, присутствующего в среде (ввиду большей интенсивности дыхания у псевдотуберкулезного микроба опыты проводились со штаммом 6). Количество потребляемого кислорода резко возрастает по мере увеличения концентрации глутаминовой кислоты от 1×10^{-4} до $2,5 \times 10^{-3}$ — $2,5 \times 10^{-2}$ М; в случае с аспарагиновой кислотой — в пределах всех испытанных концентраций. Максимальное потребление кислорода клетками отмечается при наличии в среде $2,5 \times 10^{-3}$ М глюкозы.

Количество аммиака, обнаруживаемого в процессе дезаминирования аминокислот микробами ложного туберкулеза грызунов, также находится в прямой зависимости от концентрации субстрата. Что касается отношения количества кислорода к аммиаку, то оно крайне непостоянно. Определенной зависимости между количеством потребленного кислорода и освобожденного аммиака установить не удается. По-видимому, причина этого кроется в том, что мы работали с целыми клетками, но не с изолированными ферментными системами.

Расчеты показывают, что в условиях наших опытов ни один из субстратов не окисляется полностью. Полного окисления аминокислот не удавалось отметить также в случае удлинения времени проведения опытов до 4—5 часов.

Выводы

1. Наиболее интенсивному превращению с поглощением кислорода и отщеплением аммиака в культурах чумного и псевдотуберкулезного микробов подвергается глутаминовая кислота, аланин, серин, треонин и пролин. Слабее дезаминируются аспарагиновая кислота, гликокол, цистеин, валин, норлейцин и фенилаланин. Не подвергаются дезаминированию и не окисляются тирозин, триптофан, метионин, гистидин, лейцин и диаминомонокарбоновые кислоты.

2. По своей способности дезаминировать аминокислоты штаммы чумного и псевдотуберкулезного микробов можно расположить в следующей последовательности: *B. pseudotuberculosis* 76, *B. pseudotuberculosis* 6, *B. pestis* 17, *B. pestis* 1, *B. pestis* 235, *B. pestis* EB.

3. Потребление кислорода суспензиями чумного и псевдотуберкулезного микробов, взвешенными в среде, содержащей аланин,

аспарагиновую или глутаминовую кислоты, в присутствии глюкозы снижается. Аналогичный эффект достигается при замене глюкозы пируватом (в случае с аспарагиновой и глутаминовой кислотами) или яблочной и щавелевоуксусной кислотами (при наличии в среде аланина и глутаминовой кислоты).

4. На продукцию аммиака глюкоза, пируват, яблочная и щавелевоуксусная кислоты влияния не оказывают.

5. В анаэробных условиях чумной и псевдотуберкулезный микробы дезаминируют только серин и аспарагиновую кислоту.

6. Стимуляции окисления одной аминокислоты другой установить не удается. Напротив, цистеин угнетает окисление пролина и глутаминовой кислоты. Добавление к сложным средам аминокислот, не окисляемых данным видом бактерий, не отражается на дыхании клеток.

7. Добавление глюкозы к пробам, состоящим из двух или более аминокислот, сопровождается значительным снижением потребления кислорода и образования аммиака микробами. На окисление глюкозы аминокислоты не влияют.

8. Новообразование аминокислот в условиях опытов не обнаружено.

9. Арсенит угнетает окисление всех испытанных субстратов.

10. Наличие в среде значительных количеств предобразованного аммиака (до 0,25 М) не препятствует окислению аминокислот микробами чумы и псевдотуберкулеза.

11. Витамины РР, В₁ и гемин не оказывают заметного влияния на эндогенное дыхание микробов и на дезаминирование ими аланина и глутаминовой кислоты.

12. Скорость дезаминирования глутаминовой и аспарагиновой кислот и окисление глюкозы зависит от концентрации субстрата, присутствующего в среде.

ЛИТЕРАТУРА

Браунштейн А. Е. Биохимия аминокислотного обмена. Изд. АМН СССР, 1949.

Вулли Д. Учение об антиметаболитах. Изд. иностр. литературы, 1954.

Губарев Е. М. Бактериохимия. Медгиз УССР, 1952.

Северин В. А. О механизме окислительного обмена в присутствии аминокислот. Биохимия, т. 9, 1944.

Фостер Д. Химическая деятельность грибов. Изд. иностр. литературы, 1950.

Rao, S. Oxidations effected by the plague bacillus Ind. J. Med. Res, 27, 617, 1940.

И. В. Домарадский

ДАЛЬНЕЙШИЕ НАБЛЮДЕНИЯ НАД СПОСОБНОСТЬЮ МИКРОБОВ ЧУМЫ И ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА К ДИССИМИЛЯЦИИ АМИНОКИСЛОТ

Помимо дезаминирования аминокислот, весьма важную роль в жизнедеятельности бактериальной клетки играет другой тип превращения указанных кислот — их декарбоксилирование. В настоящее время оба эти процесса нельзя изучать вне связи одного с другим.

Данные, полученные главным образом советскими исследователями, показывают, что декарбоксилирование является промежуточным звеном в белковом обмене микробов. Дезаминирование и декарбоксилирование следует рассматривать с этой точки зрения как два пути, приводящие в конечном итоге к одной и той же цели — разрушению одних и построению новых аминокислот.

В настоящем исследовании мы ставили цель выяснить, обладают ли микробы чумы и псевдотуберкулеза способностью декарбоксилировать аминокислоты.

Материал и методика

Для работы мы взяли два штамма (ЕВ и 235) чумного и один штамм (6) псевдотуберкулезного микробов. Опыты ставили с двухсуточными культурами бактерий, трижды отмытыми от среды физиологическим раствором.

Для выяснения способности указанных микроорганизмов к декарбоксилированию аминокислот использовали «прямой» метод Варбурга, основанный на вычислении количества CO_2 по разнице давлений газов в сосудах со щелочью и без нее. Ретенция CO_2 не учитывалась. Все исследования проводились в атмосфере воздуха, при рН среды 5,6.

Избыток выделившейся двуокиси углерода или поглощенного кислорода в опыте по сравнению с контролем выражался в виде коэффициентов Q_{O_2} и Q_{CO_2} . Наряду с этим в приведенных ниже таблицах представлены данные, показывающие отношение углекислого газа к кислороду. В отдельных случаях нами определялся аммиак по Конвею.

Наши исследования

Первоначально решено было выяснить, образуют ли декарбоксилазы аминокислот микробы чумы и псевдотуберкулеза при

культивировании их на средах с оптимальным для роста рН, в условиях неограниченного доступа кислорода и в отсутствии сбраживаемых углеводов. Для этого бактерии выращивали на агаре Хоттингера с рН 7,0—7,2. Результаты опытов представлены в табл. 1.

Как видно из приведенных данных, в присутствии ряда аминокислот дыхание обоих видов микроорганизмов сопровождается выделением CO_2 . Однако в большинстве случаев величина отношения углекислого газа к кислороду лишь незначительно отличается от 1. Следовательно, первичными источниками CO_2 являются не аминокислоты, а продукты их дезаминирования. В пользу этого говорит тот факт, что в указанных условиях в результате распада ряда аминокислот (серина, глутаминовой кислоты, аланина, цистеина) происходит накопление в среде большого количества аммиака.

Образование CO_2 при дезаминировании аминокислот, как и при окислении углеводов, известно уже давно, причем в ряде случаев отношение CO_2 к O_2 может достигать весьма больших величин (3, 4, 5 и более). Но в опытах с целыми клетками бактерий окисление многих субстратов (не только аминокислот) оказывается неполным, а промежуточные продукты не всегда могут быть обнаружены. Поэтому без соблюдения особых условий (в частности, без учета ретенции) трудно бывает вывести реакцию распада соответствующих соединений. Тем не менее отношение углекислого газа к кислороду можно рассматривать как весьма ценный показатель, характеризующий происходящие процессы, и там, где это возможно, его следует измерять: Отметим также, что выделение CO_2 при дезаминировании аминокислот обусловлено деятельностью не декарбоксилаз, а других ферментов, в частности тех, в состав протектической группы которых входят производные тиамина.

Неудача попыток установить наличие декарбоксилаз у чумного и псевдотуберкулезного микробов при культивировании их на агаре Хоттингера заставила нас поставить новые опыты. На этот раз мы выращивали микроорганизмы на бульоне Хоттингера с рН 7,0—7,2, содержащем 0,2% глюкозы.

В данном случае следовало бы увеличить концентрацию углеводов в среде по крайней мере до 1—2% или рН ее довести до 5,0—5,5. Однако, как известно, чумной микроб плохо растет (или рост отсутствует совсем) на средах, рН которых значительно ниже оптимального. Поэтому среды, обычно рекомендуемые для получения культур бактерий, обладающих высокой декарбоксилазной активностью, мы не смогли использовать. Остановившись на указанной выше прописи среды, мы надеялись создать более мягкие условия для культивирования данных микроорганизмов. Действительно, благодаря оптимальной для них начальной реакции бульона и незначительной концентрации глюкозы смещение рН до критической величины, препятствующей дальнейшему росту бактерий, отмечалось не ранее, чем через 24 часа после посева.

Необходимость замены твердых сред жидкими диктовалась двумя обстоятельствами. Во-первых, с твердых сред, даже содержащих всего 0,2% глюкозы, не удается получить достаточного количества микробных тел; во-вторых, бульон позволяет выращивать микробы чумы и псевдотуберкулеза в условиях относительного анаэробноза, благоприятствующих образованию аминов. Исследо-

Таблица 1

Потребление O_2 , образование CO_2 и NH_3 микробами чумы и псевдотуберкулеза, выращенными при pH 7,2

Аминокислоты	Штамм чумного микроба						Штамм 6 псевдотуберкулезного микроба					
	ЕВ			235			ЕВ			235		
	QO_2	QCO_2	$\frac{CO_2}{O_2}$	QNH_3	QO_2	QCO_2	$\frac{CO_2}{O_2}$	QNH_3	QO_2	QCO_2	$\frac{CO_2}{O_2}$	QNH_3
Аспарагиновая	—	—	—	—	1,0	4,3	4,3	—	30,8	34,4	1,1	33,7
Глутаминовая	4,2	3,2	0,76	—	11,0	12,5	1,1	16,4	49,4	63,1	1,3	41,4
Гликокол	—	—	—	—	3,2	11,0	1,3	—	18,4	28,2	1,5	—
Аланин	13,0	12,1	0,90	10,5	12,8	14,8	1,1	8,0	30,0	27,1	0,9	46,5
Валин	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Лизин	0	0	—	—	0	0	—	—	0	0	—	—
Аргинин	0	0	—	—	0	0	—	—	0	0	—	—
Гистидин	0	0	—	—	0	0	—	—	0	0	—	—
Фенилаланин	0	0	—	—	0	0	—	—	0	0	—	—
Триптофан	0	0	—	—	0	0	—	—	0	0	—	—
Серин	20,4	15,0	0,7	11,8	27,6	36,4	1,3	22,8	33,4	43,0	1,3	25,6
Треонин	10,0	8,5	0,8	7,4	7,1	7,9	1,1	10,4	27,3	21,4	0,8	18,3
Цистеин	5,6	7,6	1,4	3,7	2,9	2,9	1,0	2,7	4,6	9,2	2,0	10,0
Пролин	13,5	2,3	0,2	—	14,7	8,9	0,6	—	35,8	27,5	0,8	—

Таблица 2

Потребление O_2 , образование CO_2 и NH_3 микробами чумы и псевдотуберкулеза, выращенными в присутствии глюкозы

Аминокислота	Чумной микроб ЕВ				Псевдотуберкулезный микроб № 6			
	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	$\frac{CO_2}{O_2}$	Q_{NH_3}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	$\frac{CO_2}{O_2}$	Q_{NH_3}
Аспарагиновая	0,9	1,4	1,6	—	2,0	4,0	2,0	—
Глутаминовая	1,5	1,4	0,9	5,7	10,7	10,4	1,0	11,4
Гликокол	2,0	1,7	0,8	—	1,5	2,2	1,5	—
Аланин	0,5	1,2	0,6	—	4,8	4,1	0,8	4,4
Лизин	0	0	—	—	0	0	—	—
Аргинин	0	0	—	—	0	0	—	—
Гистидин	0	0	—	—	0	0	—	—
Фенилаланин	0	0	—	—	0	0	—	—
Триптофан	0	0	—	—	0	0	—	—
Серин	5,8	7,2	1,2	11,7	17,0	18,4	1,1	19,1
Треонин	1,5	1,5	1,0	—	—	—	—	—
Цистеин	3,8	4,5	1,2	4,6	6,0	4,1	0,7	5,4
Пролин	1,4	1,5	1,1	—	10,0	8,3	0,8	—

вание проводилось со штаммом ЕВ чумного и штаммом 6 псевдотуберкулезного микробов.

Результаты опытов сведены в табл. 2. Из приведенных в ней данных видно, что даже выращенные на средах с глюкозой, в условиях относительного анаэробнозиса микробы чумы и псевдотуберкулеза не обладают способностью декарбоксилировать аминокислоты. И в этом случае превращение последних сопровождается, помимо поглощения кислорода и выделения CO_2 , образованием аммиака. Попытка обнаружить продукты декарбоксилирования аминокислот с помощью метода распределительной хроматографии на бумаге (в случае с аспарагиновой и глутаминовой кислотами) или качественными пробами не увенчалась успехом.

Таким образом, с полным основанием можно утверждать, что в условиях наших опытов главным типом превращения аминокислот под влиянием чумного и псевдотуберкулезного микробов является дезаминирование.

Обращает на себя внимание следующее обстоятельство. Как видно из табл. 1 и 2, скорость распада аминокислот значительно меньше в культурах микроорганизмов, выращенных на жидкой среде с 0,2% глюкозы. Особенно наглядно это отличие выступает в случае с такими субстратами, как аланин, глутаминовая кислота и серин. Кроме того, культивирование бактерий чумы и псевдотуберкулеза в указанных условиях сопровождается резким снижением интенсивности их эндогенного дыхания. Так, эндогенное дыхание микробов чумы (штамм ЕВ), выращенных на агаре Хоттингера с рН 7,0—7,2, характеризуется следующими средними величинами: $Q_{O_2}=10,3$; $Q_{CO_2}=10,4$; для субкультур штамма ЕВ, полученных на жидкой среде с глюкозой, средние значения Q_{O_2} и

CO_2 в отсутствие субстрата соответственно равняются 2,5 и 2,8. То же — в случае псевдотуберкулезного микроба. Субкультуры псевдотуберкулезного микроба, полученные с твердой среды, поглощают в 3 раза больше кислорода и выделяют в 2,5 раза больше CO_2 .

Аналогичные результаты получены Стефенсон и Гэл (1937) при работе с кишечной палочкой. Образование дезаминаз гликокола, аланина, глутаминовой кислоты, серина, аспарагиновой кислоты и аденозинтрифосфата в опытах этих авторов подавлялось на 95% при введении в культуральную среду 2% сбраживаемого углевода.

Данное явление можно объяснить тем, что при выращивании бактерий на жидкой среде с глюкозой происходит перестройка их ферментативного аппарата, одним из выражений которой является, в частности, повышение бродильной способности микроорганизмов. Известно, например, что в анаэробных условиях океанические штаммы чумного микроба приобретают способность разлагать глицерин. С другой стороны, Джапаридзе (1953) удалось показать значительное снижение активности пероксидазы микробов чумы и псевдотуберкулеза при культивировании их на средах с глюкозой при пониженном парциальном давлении кислорода. Создается впечатление, что в этих случаях бактерии становятся более выраженными анаэробами.

Возможно поэтому предположить, что изменение типа дыхания микробов чумы и псевдотуберкулеза в сторону большего анаэробизма, происходящее в процессе культивирования на жидкой среде с глюкозой, и является одной из причин незначительной скорости поглощения ими кислорода или выделения CO_2 .

Однако опыты Эпса и Гэла (1942) заставляют подойти к решению поставленного вопроса с иных позиций. Судя по их данным, предположение о том, что образование дезаминаз подавляется вследствие анаэробизма, было опровергнуто с помощью прямого сравнения: активность дезаминаз оказалась одинаковой как на бульоне с глюкозой в условиях аэрации, так и без нее.

К сожалению, механизм влияния глюкозы (углеводов) на образование бактериями ферментов, несмотря на многочисленные работы, еще далеко не изучен.

В заключение подчеркнем, что по способности дезаминировать аминокислоты два близких вида микроорганизмов — микробы чумы и псевдотуберкулеза — качественно не различаются.

Выводы

1. В условиях наших опытов выделение CO_2 при распаде аминокислот в культурах микробов чумы и псевдотуберкулеза сопровождается поглощением кислорода и освобождением аммиака.

2. Полученные данные позволяют утверждать, что единственным типом превращения аминокислот под влиянием этих микробов является дезаминирование.

3. Культивирование микробов чумы и псевдотуберкулеза на жидкой среде в присутствии 0,2% глюкозы сопровождается резким угнетением дезаминазной активности и эндогенного дыхания.

ЛИТЕРАТУРА

Джапаридзе М. Н. Каталазная и пероксидазная активность чумного и псевдотуберкулезного микробов. Диссертация, Саратов, институт «Микроб», 1953.

Epps H. a. Gale E. The influence of the presence of glucose of *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, 36, 619, 1942.

Stephenson M. a. Gale, E. Factors influencing bacterial deamination. *I, Biochem. J.*, 31, 1316, 1937.

В. Д. Егорова и И. В. Домарадский

К ВОПРОСУ О ДИССИМИЛЯЦИИ НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЧУМНОГО И ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗНОГО МИКРОБОВ

Наряду с аминокислотами, легко окисляемыми микробами чумы и псевдотуберкулеза, имеются и такие аминокислоты, которые ими не окисляются и не дезаминируются. К числу их относятся: лейцин, тирозин, гистидин, лизин, аргинин, метионин и триптофан.

Возникает вопрос, подвергаются ли вообще неокисляемые и недезаминируемые аминокислоты каким-либо превращениям в культурах обоих видов микроорганизмов? Для решения поставленной задачи необходимо было изучить судьбу каждой из указанных выше аминокислот, используя единственно доступные в наших условиях химические методы их определения и хроматографический анализ.

Помимо аминокислот, перечисленных выше, для работы использовался также фенилаланин. Последний окисляется очень слабо ($Q=1,6$) только чумным микробом, и при этом никогда не удается уловить освобождения аммиака.

Методика и результаты исследования

Работа проводилась со штаммом ЕВ чумного микроба и штаммом 6 псевдотуберкулезного микроба.

Бактерии выращивались при 28°C на агаре Хоттингера (рН 7,0—7,2). Взвесь двухсуточной культуры микроорганизмов дважды промывалась физиологическим раствором, аэрировалась в течение получаса, снова промывалась и ресуспензировалась в физрастворе.

Опыты ставились по следующей схеме. К 2 мл фосфатного буфера рН 7,2 ($M/7,5$) добавлялся раствор соответствующей аминокислоты (от 40 до 60 μ м) и 1 мл промытой взвеси бактерий (13—19 мг сухого веса); общий объем пробы составлял 4 мл. Контролем служили пробы без бактерий.

Для ограничения доступа кислорода воздуха содержимое опытных и контрольных пробирок заливалось слоем вазелинового масла («анаэробные» условия); аэробные условия создавались

благодаря тому, что все растворы наливались тонким слоем в колбы Эрленмейера и периодически встряхивались.

Пробы помещались в термостат и инкубировались при 28°C в течение 3-х или 24-х часов*). После этого к каждой из них добавлялся 1 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты. В фильтрате определялась концентрация соответствующей аминокислоты.

Метионин определялся по методу Мак-Карти и Салливана (1941), фенилаланин — по методу Каплера-Адлера, видоизмененному Куном и Денюэлем (1937), гистидин — реакцией с сульфаниловой кислотой по Паули, видоизмененной Макферсоном (1942), аргинин — реакцией с нафтолгипобромидом по Веберу (1930) и триптофан — альдегидным методом (Белозерский и Проскураков, 1951).

Измерение цветности осуществлялось при помощи фотоэлектроколориметра ФЭК-М.

В качестве растворителя для хроматографии использовался фенол, смешанный с водой в отношении 80 : 20.

Согласно полученным данным, независимо от продолжительности инкубации и условий проведения опытов сколько-нибудь значительного изменения концентрации использованных для работы аминокислот установить не удается. В подавляющем большинстве случаев колебания концентрации аминокислот в опыте по сравнению с содержанием их в контрольных пробах лежат в пределах точности методов колориметрического определения аминокислот.

При помощи хроматографии распределения на бумаге показано также, что превращения одной аминокислоты в другую не происходит.

Следовательно, в условиях опыта с промытыми суспензиями микробов чумы и псевдотуберкулеза триптофан, метионин, аргинин, гистидин и фенилаланин не подвергаются процессам диссимиляции. Этот вывод находится в соответствии с результатами наших исследований, проведенных ранее, когда о распаде той или иной аминокислоты мы судили по увеличению потребления микробами кислорода и образованию аммиака.

ЛИТЕРАТУРА

- Белозерский А. Н. и Проскураков Н. И. Практическое руководство по биохимии растений. Госиздат «Советская наука». М., 1951.
- Kuhn R. und P. Desnuelle. Über die Aminosäuren des gelben Ferments. Ber. dtsh. chem. Ges., 70, 1907, 8/9, 1937.
- Macpherson H. Modified procedures for the colorimetric estimation of arginine and histidine. Biochem. J., 36, 59, 1942.
- MacCarthy T. and M. Sullivan. New and highly specific colorimetric test for methionine. J. Biol. Chem. 141, 871, 1941.
- Weber C. A modification of Sakaguchi's reaction for the determination of arginine. J. Biol. Chem. 86, 217, 1930.

*) Для предотвращения испарения жидкости пробирки или колбы закрывались резиновыми колпачками.

И. В. Домарадский, Е. В. Бунтин, Г. А. Захарова

ДЕГИДРАЗЫ МИКРОБОВ ЧУМЫ И ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА

Настоящая работа имела целью исследовать способность микробов чумы и псевдотуберкулеза к дегидрированию отдельных субстратов и выяснить влияние различных условий культивирования данных микробов на их дегидразную активность, поскольку эти вопросы до сих пор изучены еще очень мало.

Известна неодинаковая способность этих микроорганизмов к редукации тионина, метиленовой сини, янусгрюна, индиго, нейтраль-рота, лакмуса и малахитгрюна (Коробкова, 1929). Различие в скорости гидрирования метиленовой сини некоторые авторы предлагали использовать для дифференциальной диагностики микробов чумы и псевдотуберкулеза (Коробкова, 1929; Ивановский и Сасыкина, 1930; Туманский, 1946). Способность чумного и псевдотуберкулезного микробов к нитрификации установлена Коноваловой (1930). Однако указанные работы не стали той основой, на которой должны были бы развернуться исследования биохимиков по изучению дегидраз. В данной работе при изучении дегидраз микробов чумы и псевдотуберкулеза в качестве субстратов служили: 1—аспарагиновая и d—глутаминовая кислоты, d, l—аланин, гликокол, d, l—валин, d, l—норлейцин, l—цистин, d, l—серин, d, l—лизин, d,—аргинин, l—триптофан, d, l—фенилаланин, l—гистидин и d, l—пролин.

Дегидразную активность определяли по видоизмененному методу Тунберга. В обычную пробирку диаметром 8—10 мм вносили: 0,5 мл (10 млрд. микробных тел) суспензии бактерий, 0,5 мл метиленовой сини (1:1000) и 1 мл М/50 раствора субстрата. Все растворы, как и взвеси микробных тел, готовили на фосфатном буфере М/50 (рН 7,0). После перемешивания содержимое пробирок заливали вазелиновым маслом. Контролями служили те же смеси без суспензии бактерий и те же смеси, но без субстрата. Недостающие компоненты в контрольных пробирках заменяли соответствующим количеством фосфатного буфера.

Пробы инкубировали при температуре 37°C; отмечали время начала и конца обесцвечивания краски — индикатора в опытных пробирках, свидетельствующего о способности бактерий к дегидрированию соответствующих субстратов.

В качестве объектов исследования были взяты пять штаммов (ЕВ, 1, 17, 74 и 476) чумного микроба и три штамма (2, 6 и 36), псевдотуберкулезного.

Т а б л и ц а 1

Дегидрирование аминокислот чумным микробом

Субстрат	Время обесцвечивания краски (в минутах) штаммом				
	ЕВ	1	74	17	476
Аланин	39—51	25—50	19—30	18—32	27—43
Аргинин	0	—	0	0	—
Аспарагиновая кислота	0	0**	0	23—41*	0
Валин	0	0	0	0**	0
Гистидин	0	0	0	0**	0
Гликокол	0	0	0	0	0
Глутаминовая кислота	40—47	23—63	23—37	14—27	30—45
Лизин	0	0	0	0	0
Норлейцин	0	0	0	0	0
Пролин	0	—	—	0	—
Серин	11—33	—	—	10—23	—
Триптофан	0	0	0**	0	0
Фенилаланин	0	0	0**	0	0
Цистин	0	43—57*	0	16—31*	0
Глюкоза	12—79	5—19	14—26	7—17	8—21

ПРИМЕЧАНИЕ: В таблицу внесены средние показания из нескольких определений. (0)—обесцвечивание краски не наблюдалось. (—) опыт не проводился. Первая цифра обозначает начало обесцвечивания краски, вторая—полное обесцвечивание.

*) В отдельных случаях обесцвечивание краски не наблюдалось.

**) В отдельных случаях отмечалось обесцвечивание краски в поздние сроки.

Из приведенных в табл. 1 данных видно, что штаммы чумного микроба с большим постоянством дегидрируют глюкозу, аланин, серин и глутаминовую кислоту и не дегидрируют гликокол, лизин, аргинин, норлейцин и пролин.

Наибольшая способность к дегидрированию аминокислот отмечается у штамма 17 чумного микроба.

Данные о дегидрировании кислот штаммами псевдотуберкулезного микроба представлены в табл. 2.

Полученные нами результаты в основном подтверждают известный факт о большей напряженности окислительно-восстановительных реакций у микроба ложного туберкулеза грызунов. В то же время они показывают, что дегидразная активность в отношении аминокислот может колебаться у различных штаммов. Аналогичное явление отмечено нами при изучении аэробного окисления аминокислот. Объяснение колебаний в активности окислительно-восстановительных процессов у разных штаммов и генераций следует искать в изменчивости микробов, так как любое изменение

Т а б л и ц а 2

Дегидрирование аминокислот псевдотуберкулезным микробом

Субстрат	Время обесцвечивания краски (в мин.) штаммом		
	2	6	36
Аланин	10—32	37—51	16—34
Аргинин	0	—	0
Аспарагиновая кислота	13—37	25—49	14—26
Валин	0**	67—91	0
Гистидин	0**	60—82	28—53
Гликокол	31—47*	45—85*	0
Глутаминовая кислота	12—21	22—35	13—25
Лизин	0	0	0
Норлейцин	0**	0**	0
Пролин	0	—	0
Серин	7—13	—	9—26
Триптофан	0	45—75	0
Фенилаланин	20—50	65—92*	0
Цистин	0	0**	0
Глюкоза	8—15	19—35	13—20

Условные обозначения те же, что в табл. 1.

условий существования вызывает качественное и количественное изменения ферментативной активности бактериальной клетки. Эти изменения в отдельных случаях могут оказаться стойкими и сохраняться в последующих генерациях, а в других — носить временный, явно обратимый характер.

В связи со сказанным необходимо подчеркнуть еще раз, что дифференциация двух близких друг к другу видов бактерий возможна только на основании совокупности признаков, характеризующих каждого из них.

Сопоставление способности микробов чумы и псевдотуберкулеза к окислению и дезаминированию отдельных субстратов в аэробных условиях к их анаэробному дегидрированию приводит к выводу о наличии между этими процессами известного параллелизма. Оба вида микроорганизмов с наибольшим постоянством дегидрируют те аминокислоты, которые хорошо окисляются ими при доступе кислорода — аланин, серин и глутаминовую кислоту. Трудно окисляемые аминокислоты — норлейцин, фенилаланин или не дегидрируются совсем или только в отдельных случаях штаммом и 17 чумного микроба и псевдотуберкулезным микробом. Исключение составляют пролин, цистин, триптофан и гистидин. Первые два субстрата резко повышают интенсивность дыхания микробов чумы и псевдотуберкулеза в аэробных условиях, но не восстанавливают метиленовую синь в анаэробных; два вторых претерпевают какие-то изменения, по-видимому, только при отсутствии доступа кислорода. Более детальное обсуждение полученных нами

данных станет возможным после изучения механизма синтеза и распада аминокислот в культурах чумного и псевдотуберкулезного микробов.

Как уже указывалось, Коноваловой впервые была установлена способность микробов чумы и псевдотуберкулеза к денитрификации. В дальнейшем ее данные нашли подтверждение в работах Савино, Альдао и Анчесар (цит. по Туманскому, 1946), Дэвинья и Буавена (1951). К сожалению, механизм этой реакции остался не изученным.

Для выяснения вопроса о наличии у чумного и псевдотуберкулезного микробов нитратазы и способности их к восстановлению нитратов в нитриты за счет дегидрирования аминокислот были поставлены соответствующие опыты. Методика работы в основном аналогична указанной выше, только вместо метиленой сини к реагирующим смесям добавляли 0,5 мл 0,6-процентного раствора KNO_3 .

Предварительными исследованиями установлено, что трижды отмытые от среды микробы чумы и псевдотуберкулеза не дают реакции с реактивом Грисса.

В качестве донатора водорода мы использовали хорошо дегидрируемые субстраты — глутаминовую кислоту и глюкозу. Пробы инкубировали при температуре 28°C . Реакцию на нитриты ставили через 15, 30, 45 и 60 мин. Наблюдения за контрольными пробами (без субстрата) вели в течение 1,5—2 часов.

Как показали наши данные, оба вида микроорганизмов обладают способностью восстанавливать нитраты в нитриты в присутствии глутаминовой кислоты и глюкозы. Положительная реакция на нитриты отмечается в культурах в среднем через 20 мин. При этом наибольшей интенсивности окраска с реактивом Грисса достигает у штамма 17 чумного микроба.

Таким образом, в анаэробных условиях как чумной, так и псевдотуберкулезный микроб обладают способностью использовать в качестве акцептора водорода нитраты.

Изучение влияния условий культивирования на дегидразную активность проводилось на штамме ЕВ чумного микроба и штамме 6 микроба псевдотуберкулеза.

Для решения поставленной задачи мы использовали бульон Хоттингера. Бактерии выращивали при температуре 28° :

а) в условиях неограниченного доступа кислорода, в колбах Эрленмейера, в которые наливали тонкий слой бульона, при периодическом встряхивании;

б) в относительно анаэробных условиях, во флаконах под слоем стерильного вазелинового масла;

в) на среде с 1% глюкозы и г) на той же среде, но приготовленной на фосфатном буфере М/15.

На первых двух средах микробы чумы и псевдотуберкулеза дают вполне типичную (для R формы) картину роста: хлопьевидный придонный осадок, бульон не мутят. Однако при пассажах в относительно анаэробных условиях отмечается постепенное ослабление роста, причем для каждого последующего посева требуется все возрастающая посевная доза. Всего в течение полутора месяцев на бульоне под слоем вазелинового масла проведено 9 пассажей штамма 6 псевдотуберкулезного микроба и 10 пассажей (за два месяца) штамма ЕВ чумного микроба.

Значительно хуже оба вида микроорганизмов растут на средах с глюкозой. На последних макроскопически видимый рост появляется только при посевной дозе, превышающей $1 \cdot 10^4$ микробных тел на 1 мл среды. Для получения достаточного выхода микробных тел необходимы еще большие посевные дозы ($5 \cdot 10^4$ — $1 \cdot 10^5$ на 1 мл). При пассажах на средах с глюкозой отмечается диссоциация культуры псевдотуберкулезного микроба. Длительно культивировать микроорганизмы на бульоне с глюкозой, приготовленном на фосфатном буфере, нам до сих пор не удалось.

Схема постановки опытов оставалась прежней. Однако вместо 11 аминокислот мы использовали всего 4, которые дегидрируются микробами чумы или псевдотуберкулеза. Помимо аминокислот, в качестве субстрата брали глюкозу и другие соединения, играющие важную роль в обмене веществ бактерий. Конечная концентрация всех субстратов в пробе составляла 1/100М.

Двухсуточную культуру исследуемых микробов пятикратно отмывали от среды физиологическим раствором поваренной соли и аэрировали в течение 30 мин. с целью удаления всех легко окисляющихся составных частей клеток. Приготовленные таким образом суспензии «покоящихся» бактерий не восстанавливали метиленовую синь в отсутствие дегидрируемых субстратов в течение нескольких часов. Первоначально изучали дегидразную активность микробов чумы и псевдотуберкулеза, выращенных на бульоне Хоттингера в условиях свободного доступа кислорода и под слоем вазелинового масла. Результаты опытов представлены в табл. 3 и 4.

Как видно из табл. 3, «аэробная» культура штамма 6 псевдотуберкулезного микроба обладает способностью в короткое время дегидрировать глюкозу и кислоты: пировиноградную, молочную, глутаминовую. Помимо того, она примерно с одинаковой скоростью дегидрирует гликокол, аспарагиновую, яблочную и янтарную кислоты. Как показывают наши данные, у микроба псевдотуберкулеза отсутствует дегидрогеназа муравьиной кислоты.

Штамм ЕВ чумного микроба дегидрирует те же субстраты, за исключением аспарагиновой кислоты и гликокола (табл. 4), но несколько медленнее. Интересно, что агаровая культура этого микроба не восстанавливает метиленовую синь в присутствии яблочной и янтарной кислот.

С другой стороны, скорость дегидрирования всех субстратов значительно ниже в культурах микробов, выращенных на бульоне Хоттингера под слоем вазелинового масла. Наиболее значительно падает активность дегидраз яблочной и янтарной кислот в случае чумного микроба; гликокола, яблочной и аспарагиновой кислот—в случае штамма 6 псевдотуберкулезного микроба.

Длительные пересевы культур указанных микроорганизмов в анаэробных условиях приводят к следующим результатам. Дегидразная активность штамма 6 возбудителя ложного туберкулеза грызунов продолжает снижаться. Как видно из таблицы 3, микроб теряет способность дегидрировать гликокол и аспарагиновую кислоту; время обесцвечивания метиленовой сини в присутствии остальных субстратов увеличивается примерно в 3—4 раза по сравнению со временем, необходимым для их обесцвечивания в культурах микробов, выращенных на среде с неограниченным доступом кислорода. Высев пассированной на бульоне под маслом культуры микроба псевдотуберкулеза (штамм 6) на аэри-

Т а б л и ц а 3
Дегидрирование субстратов культурами штамма 6 псевдотуберкулезного микроба, выращенными в различных условиях

Условия выращивания	Время дегидрирования (в мин.)									
	аланин	аспарагино- вая кислота	гликокол	глутамининовая кислота	молочная кислота	муравьиная кислота	пиридинорад- ная кислота	яблочная кислота	янтарная кислота	глюкоза
На бульоне при встряхивании	23—45	44—60	42—57*	13—18	10—14	0**	14—21	57—64*	34—47	12—15
На бульоне под маслом	59—73	107—129*	0**	25—30	17—22	0	24—32	0**	58—86	15—19
Пассирование на бульоне под маслом	94—28	0	0	34—42	25—32	0	44—55	0	121—170	25—29
На бульоне после пассирования под маслом	46—60	79—113	0	24—31	18—23	0	26—38	0**	54—102	20—25
На бульоне с 1% глюкозы	0	0	0	77—86	0	0	0	0	0	56—68
Пассирование на бульоне с 1% глюкозы	0	0	0	70—00	49—00	0	0	0	0	25—30
На бульоне без глюкозы после пассирова- ния на среде с глюкозой	0	0	0	60—80	36—52	0	0	0	0	26—30
На бульоне с 1% глюкозы, приготовлен- ном на фосфатном буфере	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Условные обозначения те же, что и в табл. 1

Таблица 4

Дегидрирование субстратов культурами штамма EB чумного микроба, выращенными в различных условиях

Условия выращивания	Время дегидрирования (в мин.)										
	валанин	аспарагино- вая кислота	глицерол	глутаминовая кислота	молочная кислота	мравьиная кислота	пировиноград- ная кислота	ялочная кислота	янтарная кислота	ялочная кислота	глюкоза
На агаре	45—57	0	0	50—65	30—40	0	22—32	0	0**	0	27—35
На бульоне при встряхивании	41—53	0	0	73—87	22—30	0	20—27	30—43	30—42	30—43	23—28
На бульоне под маслом	67—80	0	0	73—87	34—36	0	47—50	0	0**	0	35—42
Пассирование на бульоне под маслом	38—56	0	0	77—104	25—34	0	21—31	0	0**	0	24—31
На бульоне после пассирования под маслом	28—42	0	0	54—72	19—27	0	18—28	63—82	34—47	63—82	19—27
На бульоне с 1% глюкозы	0	0	0	0**	64—81	0	0	0	0	0	49—59
Пассирование на бульоне с 1% глюкозы	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50—57
На бульоне без глюкозы после пассирования на среде с глюкозой	27—37	0	0	0	42—47	0	41—54	32—39	26—56	32—39	26—33
На бульоне с 1% глюкозы, приготовленной на фосфатном буфере	0	0	0	0**	33—43	0	0	0**	42—58	0	22—28

Условные обозначения те же, что в табл. 1.

руемую среду сопровождается частичным восстановлением ее дегидразной активности. В частности, вновь появляется способность к дегидрированию аспарагиновой кислоты.

Иначе обстоит дело при пассировании в анаэробных условиях штамма ЕВ. Скорость дегидрирования пассированным штаммом аланина, глутаминовой, пировиноградной и молочной кислот примерно такая же, как и исходным, однако попрежнему отсутствует способность к восстановлению метиленовой сини в присутствии яблочной и янтарной кислот.

Дегидразная активность «анаэробного» штамма ЕВ резко возрастает при однократном пересеве его на среду с неограниченным доступом кислорода, превышая даже активность этого штамма до культивирования его на бульоне под маслом.

Исследования с культурами, выращенными на средах с глюкозой, показали, что длительное культивирование штамма ЕВ на бульоне с глюкозой сопровождается полным подавлением способности микроба дегидрировать все субстраты, за исключением глюкозы. В присутствии последней скорость восстановления метиленовой сини вдвое меньше под влиянием пассированного штамма, чем исходного.

Аналогичные результаты получены после однократного выращивания чумного микроба на среде с глюкозой. Однако в этом случае у него сохранялась также способность к дегидрированию молочной кислоты.

Высев пассированной на среде с глюкозой культуры штамма ЕВ на среду без глюкозы приводит к восстановлению ее дегидразной активности в отношении всех субстратов, за исключением глутаминовой кислоты. Та же самая закономерность отмечалась при культивировании на среде с глюкозой штамма 6 возбудителя ложного туберкулеза грызунов. Из данных табл. 3 следует, что после однократного выращивания или длительного культивирования на средах с глюкозой штамм 6 указанного микроорганизма теряет способность дегидрировать все субстраты, за исключением глюкозы и глутаминовой кислоты. Однако высев пассированной культуры штамма 6 на бульон без глюкозы не приводит к восстановлению его дегидразной активности. Появляется лишь способность к восстановлению метиленовой сини в присутствии молочной кислоты.

Подобная же закономерность обнаруживается при аэробном окислении аминокислот субкультурами, пассированными на средах с глюкозой. Результаты опытов не отличаются по существу от тех, которые приведены выше. Характерно, что аминокислоты, не окисляемые обоими видами микроорганизмов при обычных условиях, не окисляются и субкультурами, пассированными в присутствии глюкозы (табл. 5).

Из изложенного выше можно сделать вывод, что изменение условий культивирования влияет на чумной микроб в меньшей степени, чем на возбудителя псевдотуберкулеза грызунов. Ферментативный комплекс последнего претерпевает более глубокие изменения при пассажах микроба на средах под слоем вазелинового масла или на бульоне с глюкозой. Возвращение к исходному типу обмена веществ также осуществляется значительно медленнее.

Известно, что среды с глюкозой вследствие накопления в них продуктов брожения неблагоприятны для культивирования микро-

Таблица 5

Окисление аминокислот культурами бактерий, выращенными на средах без глюкозы и пассированными на бульоне с глюкозой (в μM).

Субстрат	Q	Штамм ЕВ чумного микроба		Штамм 6 псевдотуберкулезного микроба	
		на бульоне без глюкозы	пассированный на бульоне с глюкозой	на бульоне без глюкозы	пассированный на бульоне с глюкозой
Аланин	O_2	4,0	0,5	7,6	0,8
	NH_3	4,4	0	8,1	следы
Аспарагиновая кислота	O_2	0,7	0	6,3	1,4
	NH_3	следы	0	7,4	0,9
Гликокол	O_2	1,9	0	3,8	—
	NH_3	2,1	0	3,5	—
Глутаминовая кислота	O_2	4,1	0	8,0	1,9
	NH_3	4,5	0	7,6	—
Триптофан	O_2	0	0	0	0
	NH_3	0	0	0	0
Серин	O_2	4,9	1,5	7,1	2,4
	NH_3	5,2	1,1	6,4	1,6
Лизин	O_2	0	0	0	0
	NH_3	0	0	0	0

бов чумы и псевдотуберкулеза. Именно поэтому в целях устранения вредного влияния на рост все возрастающей концентрации H^+ -ионов мы приготовили бульон с глюкозой на фосфатном буфере М/15 с рН 7,2. Но, как было указано выше, на забуференных средах оба вида микроорганизмов росли также плохо. Соответственно этому культура штамма 6 псевдотуберкулезного микроба, полученная с забуференной среды, не дегидрировала ни один из испытанных нами субстратов; культура чумного микроба сохранила способность только к дегидрированию глюкозы, янтарной и молочной кислот.

Одновременно мы ставили опыты для выяснения вопроса о степени ферментации глюкозы микробами чумы и псевдотуберкулеза в процессе их роста на двух последних средах.

Данные, представленные в табл. 6, показывают, что в культурах чумного и особенно псевдотуберкулезного микробов через 48 часов после засева отмечается значительная убыль глюкозы.

Таким образом, в настоящей работе получены новые данные, иллюстрирующие подавление ферментативной активности бактерий в процессе их культивирования на средах с глюкозой. Этот факт не зависит от изменения рН, вызванного кислотами, которые образуются в процессе брожения. Иначе культуры микробов чумы и псевдотуберкулеза, полученные с забуференных сред, должны были бы обладать более выраженной способностью к дегидрированию по сравнению с культурами указанных микроорганизмов, выращенными на бульоне с глюкозой без буфера.

Но сбрасывается ли на забуференных средах глюкоза? При-

Ферментация глюкозы чумным и псевдотуберкулезным микробами

	Время определения	Количество глюкозы в мг/мл	
		на бульоне с глюкозой	на бульоне с глюкозой, при- готовленной на фосфатом буфере
Чумной микроб штамм ЕВ	До роста	10,20	10,20
	После 2 суток роста	7,92	7,29
Псевдотуберкулезный микроб штамм 6	До роста	10,20	10,20
	После 2 суток роста	7,04	5,43

веденные в табл. 6 данные ясно показывают, что убыль глюкозы, превышающая убыль ее на среде без буфера, имеет место в процессе роста как микробов чумы, так и псевдотуберкулеза. Причем большая убыль глюкозы в процессе роста микроба псевдотуберкулеза сопровождается максимальным угнетением его дегидразной активности.

Аналогично этому плохой рост обоих видов микроорганизмов на среде с глюкозой нельзя объяснить одним лишь снижением рН. По-видимому, главную причину данного явления следует искать в изменении окислительно-восстановительного потенциала среды. Опытами Юдкина (1935) установлено, что добавление глюкозы к анаэробной культуре бактерий в 1/20М буфера при рН 7,0 вызывает быстрое падение потенциала почти до — 350 mv. Оптимальный же уровень окислительно-восстановительного потенциала для начала роста чумного микроба лежит около — 100mv при рН 7,1—7,2 (Бахрах, 1951).

Таким образом, на средах с глюкозой создаются, очевидно, условия выраженного анаэробноза, препятствующего нормальному развитию культур чумного и псевдотуберкулезного микробов. Однако наличие в среде сбраживаемых углеводов значительно сильнее влияет на обмен веществ аэробных бактерий, чем условия относительного анаэробноза.

Необходимо подчеркнуть еще одно обстоятельство. Выращивание возбудителя ложного туберкулеза грызунов на средах с глюкозой относительно быстро (уже через 9—10 пассажей) приводит к диссоциации культуры. При этом, по мере увеличения числа пересевов, в конце концов, удается получить чистую S форму псевдотуберкулезного микроба. При высеве на твердую среду (агар Хоттингера без глюкозы) культура реверсирует не сразу и в течение 5—6 пассажей сохраняет основные черты S формы (круглые гладкие колонии без зернистости и ободка на агаре и равномерная муть на бульоне). Аналогичным образом ведут себя другие штаммы указанного возбудителя (например, 2 и 36). В противоположность этому даже при длительном культивировании штаммов чумного микроба (ЕВ и 1) на бульоне с глюкозой выделить S форму его не удается.

Факт диссоциации культуры микроба псевдотуберкулеза при пассажах ее на средах с глюкозой явился основанием для сравни-

тельного изучения ферментативной активности S и R вариантов данного вида микроорганизма.

Для этой цели мы использовали культуры штамма 6 возбудителя псевдотуберкулеза грызунов после 14—17 пассажей на бульоне Хоттингера с 1% глюкозы (каждый пересев проводили через 5 дней). С бульона бактерии высевали на чашки с агаром Хоттингера с рН 7,2 без глюкозы. После тщательного макро- и микроскопического изучения колоний последние снимали петлей, клетки суспензировали в физиологическом растворе хлористого натрия, тщательно отмывали и аэрировали. Описанный прием удобнее по сравнению с высевом культуры на флаконы с агаром. В последнем случае трудно иметь уверенность в однородности популяции.

Обычно для опыта мы брали S формы возбудителя ложного туберкулеза грызунов после 4, 5 и 6 пересевов на твердой среде. Контролем служила типичная R форма штамма 6 этого микроба. Несколько опытов было поставлено со «смешанными» формами микроба (популяция содержала, наряду с типичными гладкими вариантами, единичные шероховатые колонии).

Результаты изучения дегидразной активности S и R форм микробов псевдотуберкулеза, представленные в табл. 7, показы-

Т а б л и ц а 7

Дегидрирование субстратов S и R —формами штамма 6 псевдотуберкулезного микроба

Субстрат	Время обесцвечивания краски (в мин.)			
	S форма	S формы 98—99% R формы 1—2%	S формы 90—93% R формы 7—10%	R форма
Аланин	0	0	55—64	38—47
Аспарагиновая кислота	0	0	70—87	40—51
Гликокол	0	0	0	79—98
Глутаминовая кислота	79—97	50—60	28—36	17—21
Молочная кислота	68—82	37—50	17—23	14—19
Муравьиная кислота	0	0	0	0**
Пировиноградная кислота	0	40—45	28—35	17—23
Яблочная кислота	0	0	0**	57—63*
Янтарная кислота	0	0	61—76	29—40
Глюкоза	14—21	20—25	14—18	11—17

Условные обозначения те же, что и в таблице 1.

вают, что гладкие варианты микроба характеризуются крайне низкой дегидразной активностью. Способность восстанавливать метиленовую синь у них сохраняется лишь в присутствии глутаминовой и молочной кислот. В то же время скорость дегидрирования глюкозы близка к скорости дегидрирования этого субстрата шероховатой формой. Последнее особенно интересно, если учесть, что культура возбудителя ложного туберкулеза грызунов, выращен-

ная на бульоне с глюкозой, дегидрирует последнюю примерно вдвое медленнее, чем исходная.

Появление в популяции примерно 1—2% R формы микроба псевдотуберкулеза сопровождается повышением активности дегидраз глутаминовой и молочной кислот; помимо этого, отмечается восстановление метиленовой сини в присутствии пировиноградной кислоты.

По мере дальнейшего усиления диссоциации микроб начинает дегидрировать аланин, аспарагиновую и янтарную кислоты, правда, несколько слабей, чем исходный штамм. По-прежнему отсутствует способность дегидрировать гликокол и яблочную кислоту.

Эти данные лишней раз свидетельствуют о большей ферментативной активности R формы микроба псевдотуберкулеза.

Параллельно с исследованием дегидразной активности мы ставили опыты по изучению окислительной способности S вариантов микробов в аэробных условиях. Были использованы интенсивно окисляемые R формами микроба субстраты — глюкоза, аланин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, гликокол.

Результаты опытов сводятся к следующему: 1) под влиянием R формы возбудителя ложного туберкулеза грызунов максимальное поглощение кислорода отмечается в присутствии всех субстратов; 2) гладкие варианты микроба не окисляют (не дезаминируют) аспарагиновую кислоту и аланин; скорость окисления ими глутаминовой кислоты и гликокола примерно вдвое меньше, чем у шероховатых; 3) появление в популяции шероховатых вариантов микробов сопровождается повышением скорости окисления всех испытанных субстратов; 4) аналогичные данные получены при определении аммиака (в случае с гликоколом и аспарагиновой кислотой); 5) интенсивность эндогенного дыхания наиболее велика у R формы и минимальна у S формы микробов.

Заключение и выводы

Анализируя полученные данные, мы можем отметить, что изменение аминокислотного состава среды, применяемой для выращивания микробов чумы и псевдотуберкулеза, не оказывает заметного влияния на физиологические отправления указанных микроорганизмов. В то же время потребность в аминокислотах несколько отличается у отдельных штаммов.

Способность к ассимиляции аминокислот или синтезу новых находится в зависимости от ряда физико-химических факторов, в том числе и от температуры выращивания клеток. Добавление к средам ростовых факторов (за исключением гемина) не является необходимым.

С другой стороны, согласно данным Ивановского (1951), отклонения от нормального типа обмена веществ микробов чумы и псевдотуберкулеза легче всего наблюдать при изменении кислородного режима среды. Фактический материал, иллюстрирующий сказанное, имеется в работах Урюпиной (1953) и Джапаридзе (1953). Наши наблюдения согласуются в основном с наблюдениями указанных авторов.

Помимо кислородного режима, на характер обмена веществ микробной клетки большое влияние оказывает наличие в среде сбраживаемых углеводов. Например, культивирование микробов

чумы и псевдотуберкулеза на средах с глюкозой сопровождается изменением скорости окисления ими аминокислот и потерей способности дегидрировать ряд субстратов. Особенно интересно, что падение активности указанных ферментных систем не компенсируется появлением у клетки декарбоксилаз аминокислот.

Настоящее исследование показывает, что влияние глюкозы на ферментную активность микробной клетки нельзя сводить исключительно к процессам диссоциации культуры.

Глюкоза в равной мере подавляет дегидразные системы чумного и псевдотуберкулезного микробов. В то же время образование гладких вариантов удается уловить только в случае длительного культивирования на средах с глюкозой возбудителя ложного туберкулеза грызунов.

Изложенное позволяет сделать следующие выводы:

1. Чумной микроб обладает способностью дегидрировать аланин, серин, глутаминовую кислоту, глюкозу и кислоты: пировиноградную, молочную, яблочную и янтарную. Микроб псевдотуберкулеза сверх того дегидрирует аспарагиновую кислоту и гликокол. У обоих видов микроорганизмов отсутствует дегидрогеназа муравьиной кислоты.

2. Микробы чумы и псевдотуберкулеза способны восстанавливать нитраты в нитриты в присутствии глутаминовой кислоты и глюкозы.

3. Дегидразная активность микробов чумы и псевдотуберкулеза меняется в зависимости от методов их выращивания. Максимальная скорость восстановления метиленовой сини в присутствии всех субстратов отмечается в культурах указанных микроорганизмов, выращенных на агаре или на бульоне при аэрации. Анаэробные условия культивирования приводят к подавлению дегидразной активности.

Дегидразная активность резко снижается (или отсутствует совсем) у бактерий, выращенных на средах, содержащих 1% глюкозы. Деаминирование аминокислот также нарушается. Действие глюкозы на образование ферментов не связано с изменением pH среды в процессе роста.

4. Высев культуры чумного микроба (штамм ЕВ), пассированной на среде с глюкозой, на среду без сахара приводит к восстановлению ее дегидразной активности в отношении всех субстратов, за исключением глутаминовой кислоты. В этих же условиях штамм 6 псевдотуберкулезного микроба вновь приобретает способность дегидрировать только молочную кислоту.

5. Шероховатые варианты штамма 6 микроба псевдотуберкулеза обладают большей дегидразной активностью по сравнению с гладкими вариантами. Появление в популяции гладкого варианта штамма 6 шероховатых форм колоний сопровождается восстановлением способности микроба обесцвечивать метиленовую синь в присутствии ряда субстратов. Максимальная скорость окисления всех субстратов в аэробных условиях отмечается под влиянием R форм возбудителя псевдотуберкулеза грызунов.

6. Изменение условий культивирования влияет сильнее на микроб ложного туберкулеза грызунов, чем на чумной микроб. Последний медленнее перестраивает свой обмен веществ, и следовательно, труднее адаптируется к новым для него условиям существования.

7. В связи с использованием микробами чумы и псевдотуберкулеза в качестве акцептора водорода различных субстратов можно думать, что, подбирая соответствующие условия (краски с различной величиной E_h , рН среды и т. д.), удастся применить метод Тунберга для решения ряда практических задач.

ЛИТЕРАТУРА

Бахрах Е. Э. Зависимость роста чумного микроба от окислительно-восстановительного состояния питательной среды. Труды института «Микроб», в. 1, Саратов, 1951.

Джапаридзе М. Н. Каталазная и пероксидазная активность чумного и псевдотуберкулезного микробов. Диссертация. Саратов, институт «Микроб», 1953.

Ивановский Н. Н. Общая характеристика обмена веществ чумного микроба. Труды института «Микроб», в. 1, 1951.

Ивановский Н. Н. и Сасыкина Т. Реакция Шардингера в применении к дифференциальной диагностике *B. pestis* и *B. pseudotuberculosis* rod. Pfeiffer'a. Вестник микр., эпид. и паразитологии, в. 9, 1930.

Коробкова Е. И. К изучению *B. pestis* и *B. pseudotuberculosis* rod. Pfeiffer'a. Там же, 1929.

Коновалова С. Ф. Нитрозная реакция с культурами *B. pestis* и *B. pseudotuberculosis* rod. (Pfeiffer'a) Вестник микр., эпид. и паразитологии, в. 9, 1930.

Туманский В. М. Микробиология чумы. Диссертация, Саратов, институт «Микроб», 1946.

Урюпина Н. В. Изменение некоторых свойств чумного микроба под влиянием условий культивирования. Диссертация, Саратов, институт «Микроб», 1953.

Devignat, et Boivin. A. Sur la biochimie des couches centroafricaines de peste Congo—Belge. Bull. soc. Path. exot., 1951, 44, 279.

Yudkin, I., Hydrogenlyases. II. Some factors concerned in the production of the enzymes. Biochem. J., 1932, 26, 1059.

И. В. Домарадский

О СИНТЕЗЕ АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ И АЛАНИНА МИКРОБАМИ ЧУМЫ И ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА

Вопрос о синтезе аминокислот в культурах микробов чумы и псевдотуберкулеза до сих пор еще остается вне поля зрения исследователей. В то же время ряд данных, главным образом советских ученых, свидетельствует о том, что указанные микроорганизмы используют для построения своих белков соли аммония и безазотистые компоненты среды. Это подтверждают и наши данные о возможности культивировать чумной микроб на синтетических средах, состоящих всего лишь из нескольких незаменимых аминокислот и глюкозы. Способность же подавляющего большинства штаммов псевдотуберкулезного микроба к росту на среде Майеда нашла даже практическое применение.

До недавнего времени основное внимание уделялось образованию аминокислот за счет восстановительного аминирования и переаминирования. Наибольшее число исследований выполнено с тканями животных. Лишь относительно недавно в литературе появились сообщения о новообразовании аминокислот у микроорганизмов.

Большое количество противоречий и неясностей по вопросу синтеза аминокислот заставляет с осторожностью подойти к оценке результатов, изложенных в настоящей работе. Мы далеки от окончательных выводов. Однако вызывает сомнение не сам по себе факт новообразования аминокислот микробами чумы и псевдотуберкулеза, а возможность уловить их накопление в среде и объяснить механизм реакций.

Материал и методика исследования

Работа проводилась с различными штаммами чумного и псевдотуберкулезного микробов. Бактерии выращивали в течение 24—48 часов на агаре Хоттингера. В опыт брали неотмытые или трижды отмытые от среды физиологическим раствором поваренной соли суспензии бактерий. Густота суспензий колебалась в значительных пределах, но во всех пробах одного и того же опыта была совершенно одинаковой. Чаще всего концентрация микробных тел равнялась 80—100 млрд. на пробу, что соответствовало 22—30 мг сухого веса.

Эксперименты проводились в маленьких колбочках (50 мл) или в пробирках, содержавших, помимо бактерий, 0,1—0,25 М нейтрализованный раствор субстрата аминирования, 1 М раствор хлористого аммония и фосфатный буфер с рН 7,2, конечной концентрации М/15. В отдельных случаях добавлялась также глюкоза. Контролем служили пробы или без добавления субстратов аминирования, или без хлористого аммония. Инкубация проводилась при температуре 37°C; длительность ее была различна — от 30 мин. до 2—3 суток. Энзиматические процессы останавливались добавлением трихлоруксусной кислоты до конечной концентрации 3—4%. В некоторых опытах белки осаждались 10-кратным объемом холодного 96% этанола, после чего фильтрат упаривали до нужного объема в вакууме на водяной бане.

О наличии процессов аминирования мы судили по убыли аммиака, определяемого по методу Конвея, и главным образом на основании данных метода распределительной хроматографии на бумаге.

Необходимо отметить, что основным условием получения четких пятен аминокислот на бумаге является хорошее качество последней. Обычно для этой цели используются различные номера фильтровальной бумаги Ватмана. Однако дефицитность такой бумаги препятствует широкому внедрению метода распределительной хроматографии в практику научных исследований. После долгих поисков нам удалось подобрать один из сортов фильтровальной бумаги отечественного производства, вполне пригодный для получения отчетливых хроматограмм. Наша бумага достаточно плотная (водонасыщенный фенол за 17—18 часов продвигается на 23—25 см), однородная (не имеет большой «облачности» на просвет) и относительно чистая (дает небольшое количество темного экстрактивного материала в феноле). После предварительного вымывания загрязнений водонасыщенными органическими растворителями бумагу можно использовать и для двухмерной хроматографии.

При выполнении хроматограмм на лист фильтровальной бумаги, отступая 5 см от края по горизонтальной линии, наносили безбелковый фильтрат исследуемой жидкости (0,025—0,05 мл). Если раствор предварительно не упаривали, то ввиду недостаточной концентрации аминокислот в таком объеме капли наносили повторно по 4—5 раз в каждую точку; каждую последующую каплю помещали на бумагу только после полного подсыхания предыдущей. Край бумаги, на который были нанесены капли исследуемого вещества, погружали в растворитель, налитый на дно большой стеклянной банки; противоположный конец листа закрепляли сверху сосуда.

Растворителями служили или свежеперегнанный фенол, содержащий 20% воды с добавлением 0,1% NH_3 , или *n*-бутанол, уксусная кислота и вода, смешанные в отношении 50:10:40 по объему. Развитие хроматограммы продолжалось 16—18 часов при температуре 20—22°C. Затем полоску бумаги вынимали из банки, отмечали фронт растворителя, и бумагу высушивали при температуре 105—110°C в течение 1,5—2 часов (в случае *n*-бутанола — 30 мин.). Сухой лист равномерно опрыскивали из пульверизатора 0,1% раствором нингидрина в водонасыщенном *n*-бутаноле и проявляли при температуре 90—100°C (5—7 мин.).

Идентификация аминокислот проводилась с помощью «свидетелей», путем усиления пятен и определения R_f . Следует отметить, что полученные нами значения R_f несколько отличались от приводимых в литературе. Особенно значительно R_f отклонялся в сторону увеличения в бутаноле.

Оба метода, использованные нами для выяснения способности микробов чумы и псевдотуберкулеза к синтезу аминокислот (определение связывания аммиака и хроматография), неоднократно применялись уже для решения подобных вопросов.

Наши исследования

Основанием для проведения настоящей работы явились данные об обратимости процессов дегидрирования и дезаминирования некоторых аминокислот.

Учитывая результаты наших наблюдений о наличии у микробов чумы и псевдотуберкулеза высокоактивного комплекса ферментов-амидаз, было решено заняться в первую очередь изучением синтеза аспарагиновой кислоты в культурах указанных микроорганизмов.

Как известно, аспарагиновая кислота образуется за счет fumarовой, щавелевоуксусной или яблочной кислот. Для этого необходимо наличие в среде достаточной концентрации субстратов аминирования и создание других условий, препятствующих обращению реакции. Обычно эксперименты проводятся с суспензиями «покоящихся» бактерий в анаэробных условиях и в присутствии ингибиторов восстановительных процессов (толуола, пропилового спирта). Однако нами было установлено (так же как и Першиным, 1952), что нет необходимости в строгом соблюдении анаэробноза: достаточно добавления антисептика, чтобы равновесие в системе было устойчивым.

Первоначальные исследования проводились с штаммом 235 чумного микроба. В «покоящихся» суспензиях этого штамма образование аспарагиновой кислоты удается уловить уже после нескольких часов инкубации. Но наиболее отчетливые пятна на хроматограммах обнаруживаются при удлинении срока инкубации до 24—72 часов.

Максимум связывания аммиака отмечается через сутки в пробах с неограниченным доступом кислорода. В дальнейшем количество аммиака почти не меняется. Синтез аспарагиновой кислоты идет в присутствии как толуола, так и 2% пропилового спирта.

Аналогичные данные получены и при работе с другими штаммами чумного микроба, в том числе и вирулентными (708, 751). Исключение составляют штаммы EB и I, которые или не образуют аспарагиновую кислоту совсем, или дают на хроматограммах только очень слабые пятна. В соответствии с этим у штаммов EB и I отсутствует связывание аммиака.

Исключительно интенсивный синтез аспарагиновой кислоты наблюдался в суспензиях бактерий возбудителя ложного туберкулеза грызунов (штаммы 6 и 76). Следует напомнить, что в отличие от чумного микроба указанный возбудитель обладает способностью катализировать анаэробный распад этой моноаминодикарбоновой кислоты и со значительно большей скоростью дезаминирует ее в аэробных условиях.

Под влиянием данных микроорганизмов синтез аспарагиновой

кислоты осуществляется легче всего за счет аминирования яблочной кислоты. В присутствии фумаровой кислоты и особенно щавелевоуксусной реакция протекает намного медленнее.

До сих пор нам не удалось установить влияние глюкозы на процесс образования аспарагиновой кислоты.

За счет самой глюкозы в отсутствие других субстратов аминирования аспарагиновая кислота также не образуется.

Учитывая литературные данные о способности микроорганизмов ассимилировать CO_2 , мы поставили ряд опытов для решения вопроса о том, не может ли в наших условиях синтез аспарагиновой кислоты осуществляться за счет фиксации двуокиси углерода пировиноградной кислотой с последующим аминированием щавелевоуксусной кислоты. Методика опытов отличалась от описанной выше лишь тем, что вместо фосфатного буфера использовался кребс-рингербикарбонатный раствор с рН 7,2, а в качестве субстрата — пируват натрия.

Однако подобным образом не удается обнаружить образования аспарагиновой кислоты ни в пробах, инкубированных различное время (от 25 мин. до 24 час.) в аэробных условиях, ни в среде без доступа кислорода. Такие же результаты получены при работе с неотмытыми суспензиями микробов чумы и псевдотуберкулеза.

Дальнейшие наши исследования были направлены на выяснение наличия у микробов чумы и псевдотуберкулеза способности к синтезу других аминокислот, в первую очередь аланина. Эксперименты проводили в аэробных условиях при рН 7,2 и 8,2. В отдельных случаях к пробам добавляли арсенит натрия в конечной концентрации М/1000—М/500, подавляющий окисление α -кето-кислот.

Несмотря на то, что постановка опытов полностью соответствовала постановке опытов других авторов, аминирования пировиноградной кислоты под влиянием чумного и псевдотуберкулезного микробов не отмечено.

Безуспешность наших попыток обнаружить синтез аланина могла зависеть от отсутствия в среде донаторов водорода, необходимого для восстановительного аминирования пировиноградной кислоты. Однако добавление к пробам, помимо пирувата натрия и хлористого аммония, 10 мг глюкозы не приводило к желаемой цели.

На основании изложенного не трудно было сделать вывод об отсутствии у микробов чумы и псевдотуберкулеза способности к синтезу аминокислот.

В литературе имеются данные о том, что новообразование ряда соединений (мочевины, гипоксантина и др.) идет интенсивнее за счет глутамина или аспарагина.

Учитывая это, мы решили попытаться уловить синтез аланина под влиянием микробов чумы и псевдотуберкулеза в системе, состоящей из пировиноградной кислоты и аспарагина. Последний, как показали наши исследования, указанными микробами интенсивно ферментируется с образованием значительных количеств аммиака. Особый интерес вызывает то, что поглощение кислорода суспензиями микробов чумы и псевдотуберкулеза намного меньше в присутствии аспарагиновой кислоты, чем ее амида.

Для опытов использовали неотмытые односуточные культуры этих микробов. Пробы инкубировали при температуре 37°C в тече-

ние 3 часов в аппарате для встряхивания, после чего белки осаждали 10 объемами охлажденного до -4°C этанола. Прозрачный фильтрат упаривали в вакууме на водяной бане до 0,5 мл.

Как показали наши исследования, в указанных условиях синтез аланина действительно удается обнаружить, но только в суспензиях штамма 6 псевдотуберкулезного микроба. Однако на хроматограммах пятна, соответствовавшие аланину, были очень слабые. Поэтому пришлось прибегнуть к их усилению для получения достоверных результатов. Наличие аланина подтверждено также с помощью «свидетеля». Синтез аланина сопровождался образованием аспарагиновой кислоты и накоплением аммиака.

Заключение

Проведенные исследования показывают, что у микробов чумы и псевдотуберкулеза закономерно удается обнаружить синтез аспарагиновой кислоты. Субстратом аминирования является главным образом яблочная кислота. Новообразование аспарагиновой кислоты осуществляется как в анаэробных, так и в аэробных условиях; в последнем случае необходимо добавление ингибиторов восстановительных процессов — толуола или пропилового спирта. Отсутствие образования аспарагиновой кислоты за счет аммиака и пировиноградной кислоты в бикарбонатном буфере не может говорить против возможности фиксации CO_2 указанными микроорганизмами. Этот вопрос должен решаться с помощью изотопного метода в сочетании с хроматографией распределения на бумаге.

Новообразование аланина из пировиноградной кислоты и аспарагина констатировано только в неотмытых суспензиях одного штамма возбудителя ложного туберкулеза грызунов. Обусловлена ли эта реакция аминированием пировиноградной кислоты за счет аммиака амидной группы аспарагина или она является следствием переаминирования между аспарагином и пировиноградной кислотой, сказать трудно. Для решения поставленного вопроса необходимо в дальнейшем особое внимание уделить способности микробов чумы и псевдотуберкулеза катализировать реакции переаминирования и возможности аминирования α -оксикислот.

Пока же можно предположить, что синтез аминокислот тесно связан с процессами роста указанных микробов, причем наличие в среде антисептиков подавляет интересующие нас реакции. Исключение составляет лишь аспарагиновая кислота, образование которой, по данным Виртанена с сотрудниками (1932) и Гэла (1938), возможно даже под влиянием бесклеточных препаратов, полученных из *Bacterium fluorescens liquefaciens* или *B. Coli*.

ЛИТЕРАТУРА

- Першин Г. Н. Влияние химиотерапевтических веществ на бактериальные ферменты. Медгиз, М., 1952.
Gale, E. Factors influencing bacterial deamination. III Aspartase. II. Biochem. J, 32, 1938.
Virtanen, A. и I. Tarnanen. Die enzymatische Spaltung und Synthese der Asparaginsäure, Biochem. Z., 250, 193, 1932.
-

Домарадский И. В. и Егорова В. Д.

ОБ ОБМЕНЕ ЦИСТЕИНА В КУЛЬТУРАХ ЧУМНОГО МИКРОБА

В одной из работ (Домарадский и Иванов, 1957) нами указывалось, что цистеин и метионин необходимы для роста чумного микроба. Было установлено также (Домарадский, 1955; Егорова и Домарадский, 1958), что наряду с аминокислотами, легко окисляемыми микробом, имеются и такие аминокислоты, которые им не окисляются и не дезаминируются. В частности, к их числу относится метионин. В то же время, по нашим данным, цистеин в процессе роста чумного микроба на искусственных питательных средах превращается в метионин. Превращение цистеина в метионин носит необратимый характер (Домарадский, 1957).

Согласно исследованиям Инглесберга штамм А 1122 чумного микроба в присутствии метионина и при добавлении к среде сульфита или сульфида может обходиться без цистеина. Последний факт служит косвенным указанием на возможность синтеза цистеина за счет неорганических источников серы. Однако пути синтеза цистеина, равно как и механизм его распада, в культурах чумного микроба остаются до сих пор невыясненными. Целью настоящего исследования являлась детализация одной стороны вопроса — диссимилиации цистеина *V. pestis*.

Методика

Объектом исследования служил штамм ЕВ чумного микроба. Бактерии выращивали в матрацах на агаре Хоттингера рН 7,2 при 37°C в течение 48 часов. Культуру смывали физиологическим раствором поваренной соли, дважды отмывали от среды и аэрировали 30 мин. для удаления всех легко окисляющихся составных частей клеток; проаэрированную культуру отмывали еще один раз и в виде густой суспензии «покоящихся» клеток использовали при постановке опытов.

Обработку отмытых бактерий ацетоном производили по методике, описанной Герхардтом и сотрудниками (Gerhardt, Macgregor, Marr, Olsen, Welton, 1953). Ацетоновые препараты высушивали в вакууме над серной кислотой.

Для учета интенсивности дыхания чумного микроба мы применяли микрореспирометры Варбурга. Эксперименты проводили в атмосфере воздуха, свободного от углекислоты. Каждый сосудик в главном пространстве содержал: 1 мл суспензии бактерий (или

взвеси ацетонового препарата), 2 мл фосфатного или боратного буфера, соответствующего рН и 0,1 мл нейтрализованного раствора (10 μ м) цистеина. Содержимое сосудика доводили до объема 4 мл физраствором NaCl. Контролем служили пробы без субстрата. В тех случаях, когда изучалось влияние ингибиторов на процесс дисимилиации цистеина, их растворы добавляли с таким расчетом, чтобы общий объем пробы не превышал 4 мл.

Для создания анаэробных условий пробирки, содержащие необходимые компоненты реакции в указанных выше соотношениях, заливали слоем стерильного вазелинового масла.

Все опыты проводили при 37°C. Продолжительность инкубации варьировала от 1 часа до одних — двух суток, но в большинстве случаев она не превышала 2—3 часов.

Энзиматические процессы останавливали добавлением в каждый сосудик (или пробирку) 1 мл 20-процентного раствора трихлоруксусной кислоты. В безбелковом фильтрате определяли аммиак методом изотермической перегонки, пировиноградную кислоту — по Фридману и Хаугену (Friedmann, Haugen, 1943) и цистеин — при помощи реакции Винтерштейна — Фолина, видоизмененной Блоком и Боллингом (1949). В последнем случае предварительно удалялся сероводород путем 15-минутного пропускания тока азота через аликвотную часть трихлоруксусного фильтрата.

Результаты всех определений выражены в μ м в пересчете на 100 мг сухого веса клеток за 1 час опыта*.

Экспериментальная часть

В таблице 1 представлены данные о влиянии рН на потребление кислорода чумным микробом в присутствии цистеина.

Из таблицы видно, что потребление кислорода имеет место в широком диапазоне рН как в фосфатном, так и в боратном буфере. Оптимального значения рН установить не удалось**. Последнее обстоятельство свидетельствует, по-видимому, в пользу внутриклеточного расположения фермента, катализирующего распад цистеина (Дюбо, 1948; Гэл, 1943). Косвенные указания на внутриклеточное расположение цистеиндесульфгидразы *Escherichia coli* имеются также в работе Метаксас и Делидж (Metaxas, Delwiche, 1955).

Арсенит натрия (конечная концентрация 4×10^{-3} М) и 2,4 — динитрофенол (конечная концентрация 5×10^{-3} М) резко уменьшают потребление кислорода чумным микробом (см. табл. 2).

Интересно отметить, что арсенит натрия особенно заметно угнетает дыхание чумного микроба при наличии в среде цистеина; в отсутствие последнего влияние иона трехвалентного мышьяка выражено значительно слабее. В противоположность этому 2,4 — динитрофенол подавляет дыхание чумного микроба как в присутствии цистеина, так и без него.

* Предварительными исследованиями было установлено, что сухой вес 1 мл 20 млрд. трижды отмытой суспензии клеток равен $9,3 \pm 1,0$ мг. Относительно большая величина среднего квадратичного отклонения зависит от недостаточной точности определения концентрации микробных тел по оптическому стандарту.

** В связи с этим все дальнейшие исследования проводились в среде фосфатного буфера с рН 7,2, при котором отмечается наилучший рост чумного микроба.

Таблица 1

Влияние рН на потребление кислорода чумным микробом в присутствии цистеина и без него

Буфер	рН	Без субстрата	С цистеином	Разность
Фосфатный	3,76	26,8	27,4	0,6
	5,49	26,2	33,0	6,8
	6,67	25,7	33,0	7,3
	6,72	27,4	32,6	5,2
	6,80	33,0	39,6	6,6
	6,82	22,0	31,1	9,1
	7,51	30,5	37,0	6,5
	7,62	33,5	42,4	8,9
	7,99	30,1	42,7	12,6
	8,00	33,4	41,4	8,0
Боратный	7,78	17,3	29,2	11,9
	7,88	20,8	36,1	15,3
	8,07	16,5	26,0	9,5
	8,80	26,8	40,3	13,5
	8,85	27,6	35,4	7,8
	9,02	23,8	33,5	9,7

ПРИМЕЧАНИЕ: В двух случаях при рН 5,50 в фосфатном буфере и один раз при рН 7,06 в боратном буфере поглощение кислорода в присутствии цистеина было меньше, чем в пробах без субстрата.

Таблица 2

Влияние ингибиторов на потребление кислорода чумным микробом в присутствии цистеина и без него

П р о б а	Без субстрата	С цистеином
Без ингибитора	27,8	53,0
С арсенитом	22,6	10,1
Без ингибитора	23,4	35,6
С арсенитом	21,0	7,2
Без ингибитора	15,3	20,1
С 2,4—динитрофенолом	9,1	11,1
Без ингибитора	25,8	37,8
С 2,4—динитрофенолом	8,7	8,0

По данным Каллио и Портера (Kallio, Porter, 1950), цистеиндесульфгидраза *Proteus vulgaris* и *Proteus morganii* относится к числу ферментов, активность которых значительно возрастает при выращивании бактерий на средах, содержащих соответствующий субстрат. В пользу адаптивной природы цистеиндесульфги-

дразы *E. coli* свидетельствуют также результаты исследований Денюэля и Фромажо (Desnuelle 1939, Desnuelle, Fromageot, 1939), а также Липсиц (1956). Исключением является цистеиндесульфгидраза *Propionobacterium pentaseaceum*, представляющая собой конститутивный фермент (Desnuelle, Wooku, Fromageot, 1940).

Влияние цистеина на активность фермента, катализирующего разложение этой аминокислоты чумным микробом, до сих пор изучено не было. Для решения указанного вопроса мы исследовали культуры чумного микроба, выращенные на средах с повышенным содержанием цистеина. Цистеин добавлялся к агару Хоттингера в количестве 0,1% непосредственно перед посевом микроба, контролем служили суспензии отмытых клеток чумного микроба, полученных со сред без добавленного извне цистеина*.

Результаты опытов представлены в таблице 3.

Т а б л и ц а 3

Изменение ферментативной активности чумного микроба после культивирования его на средах с повышенным содержанием цистеина

Число пересевов (пересевы производились через 48 часов)	Культура со среды	Поглощение кислорода	Убыль цистеина	Образование аммиака
1	С цистеином	29,6	—	—
	Без цистеина	23,5	—	—
7	С цистеином	17,8	23,8	14,4
	Без цистеина	10,3	20,8	9,0
8	С цистеином	13,3	25,5	9,0
	Без цистеина	8,8	16,2	7,2
9	С цистеином	9,6	25,1	10,8
	Без цистеина	6,4	20,8	5,4
10	С цистеином	18,3	29,1	12,6
	Без цистеина	10,3	21,8	7,2

Как видно, даже однократный посев культуры чумного микроба на среду с цистеином сопровождается некоторым повышением активности фермента, катализирующего разложение этой аминокислоты. При увеличении числа пересевов активность фермента (если судить по потреблению кислорода) возрастает в среднем на 63%. О большей активности фермента у субкультуры чумного микроба, подвергшейся многократным пересевам на средах с цистеином, можно также составить впечатление по данным об убыли цистеина и образовании аммиака (см. таблицу 3). Совершенно очевидно, что результаты были бы более наглядными, если бы чумной микроб культивировался не на агаре Хоттингера, а на синтетических средах. К сожалению, на синтетических средах без цистеина

* В переварах Хоттингера содержание цистеина обычно относительно невелико. Об этом говорит: 1) отсутствие роста туляремийного микроба, который становится возможным при добавлении к среде цистеина и 2) отрицательная реакция на сероводород при культивировании на агаре Хоттингера большинства штаммов чумного микроба. По-видимому, в процессе длительного автоклавирования среды цистеин частично разрушается (Wynn, Cott, 1956).

чумной микроб растет очень плохо и достаточного выхода микробных тел пока что получить не удастся (Домарадский и Иванов, 1957).

Разложение цистеина чумным микробом имеет место не только в аэробных, но и в анаэробных условиях. Однако в отсутствие кислорода реакция протекает с меньшей скоростью (см. таблицу 4).

Т а б л и ц а 4

Разложение цистеина в аэробных и анаэробных условиях отмытыми суспензиями чумного микроба

Условия	Убыль цистеина	Образование аммиака
Аэробные	23,2	5,8
Анаэробные	14,3	5,8
Аэробные	19,7	9,6
Анаэробные	15,2	4,3
Аэробные	17,9	9,0
Анаэробные	—	5,4

Полученные нами данные согласуются в общем с результатами исследований других авторов, работавших с *E. coli*, *Str. faecalis* и *Bact. proteus*. В то же время следует отметить, что у отдельных видов микроорганизмов, например, *Mycobacterium tuberculosis*, разложение цистеина может осуществляться только в аэробных условиях.

В противоположность этому кишечная палочка, очевидно, располагает двумя ферментными системами, десульфуряющими цистеин: одна из них, подобно энзиму чумного микроба, активна в аэробных и анаэробных условиях; вторая отличается потребностью в таких акцепторах водорода, как O_2 или нитрат (Tamia, 1954 (а), 1954 (б)).

Помимо поглощения кислорода и выделения двуокиси углерода (Домарадский, 1955), разложение цистеина чумным микробом сопровождается освобождением сероводорода (последний определялся только качественно при помощи уксусноокислого свинца) и аммиака (см. табл. 3 и 4). При использовании для работы суспензии живых отмытых клеток накопления в среде пировиноградной кислоты установить не удалось даже в присутствии арсенита натрия. По-видимому, пировиноградная кислота по мере образования ее в процессе десульфирования цистеина подвергается окислительному декарбонированию. Добавление к среде арсенитингибитора окислительного декарбонирования α -кетокислот (Krebs, 1935) в нашем случае подавляет также разложение цистеина, вследствие чего становится невозможным и образование пировиноградной кислоты.

Наличие пировиноградной кислоты удавалось обнаружить лишь при работе с бактериями, убитыми толуолом или ацетоном (см. таблицы 5 и 6)*. Десятиминутная обработка толуолом отмы-

* Идентичность 2,4—динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты, образованной чумным микробом за счет цистеина с 2,4—динитрофенилгидразоном синтетического препарата, была подтверждена спектрофотометрически.

Т а б л и ц а 5

Влияние толуола на разложение цистеина отмытыми клетками чумного микроба

Бактерии встряхивались до опыта в течение 10 минут	Поглощение кислорода	Образование аммиака	Убыль цистеина	Образование пировиноградной кислоты
Без толуола	11,9	5,4	22,8	0
С толуолом	0	9,0	20,8	4,0
Без толуола	11,7	7,2	22,4	0
С толуолом	0	6,2	23,3	4,3
Без толуола	12,5	7,2	23,2	0
С толуолом	6	7,5	18,9	4,8
Без толуола	8,5	7,4	23,2	0
С толуолом	0	8,8	18,9	—
Среднее без толуола	11,1	6,8	23,4	0
С толуолом	0	7,9	20,5	4,0

Т а б л и ц а 6

Разложение цистеина ацетоновыми препаратами чумного микроба

Убыль цистеина	Образование пировиноградной кислоты	Образование аммиака	Поглощение кислорода
6,3	4,6	3,3	1,1
4,9	3,8	2,7	0,6
4,9	3,5	2,4	1,0
4,3	3,2	2,1	0,4
5,0	3,1	2,1	0,4
5,2	—	2,1	0,8
3,5	2,9	2,1	—
3,6	2,1	1,4	—
Среднее			
4,7	3,3	2,2	0,7*)

*) В пределах ошибки опыта

тых суспензий бактерий (Kallio, Porter, 1950), сопровождаясь полным угнетением дыхания клеток, незначительно влияет на количество образовавшегося аммиака и убыль цистеина.

Опыты с бактериями, убитыми толуолом, показывают, что разложение цистеина чумным микробом не является окислительным процессом. Потребление кислорода при десульфировании связано только с окислением пировиноградной кислоты. Отметим кстати, что факт торможения 2,4—динитрофенолом дыхания чумного микроба в присутствии цистеина, очевидно, непосредственного отношения к его распаду не имеет. В то же время подобное влияние 2,4—динитрофенола говорит об участии процессов фосфорилирования в обмене пировиноградной кислоты.

Ацетоновые препараты чумного микроба обладают меньшей ферментативной активностью по сравнению с живыми клетками. Они так же, как и бактерии, обработанные толуолом, не потребляют кислорода, но катализируют распад цистеина с образованием аммиака и накоплением в среде пирувата. В среднем на один моль утилизированного цистеина образуется 0,7 моля пировиноградной кислоты и около 0,5 моля аммиака. В идеальном случае следовало бы ожидать накопления в среде такого количества продуктов распада, которое эквивалентно убыли цистеина. Однако десульфирование сопровождается, по-видимому, какими-то побочными реакциями, возможно синтезом новых аминокислот, зависящими от использования пирувата и NH_3 . Из литературы известно, например, что такой синтез легко осуществляется ацетоновыми препаратами из *Bact. brevis* (Коникова, Крицман, Якобсон и Самарина, 1949).

Обсуждение результатов

Полученные данные о распаде цистеина под влиянием чумного микроба указывают на то, что этот процесс катализируется ферментом, сходным с типичной цистеиндесульфгидразой бактерий и животных тканей. От энзима, описанного Тамия (Tamia, 1954, а, 1954, б), а также Бернгеймом и Детерком (Bernheim, Deturk, 1953), его отличает относительно высокая активность в анаэробных условиях. Против окислительного механизма десульфирования цистеина чумным микробом с достаточной убедительностью свидетельствуют результаты опытов с бактериями, обработанными толуолом или ацетоном. По всей вероятности, цистеиндесульфгидраза чумного микроба, подобно таковой *E. Coli*, *Proteus morgani* и *Str. faecalis* (Metaxas, Delwiche, 1955; Азарх и Гладкова, 1952; Kallio, 1951), представляет собой протеид фосфопиридоксаля. Однако для окончательного решения этого вопроса необходимы дополнительные исследования.

Выводы

1. В присутствии цистеина потребление кислорода чумным микробом имеет место в широком диапазоне значений рН (от 5,49 в фосфатном до 9,02 — в боратном буфере) и резко снижается при наличии в среде арсенита натрия или 2,4—динитрофенола; последний угнетает также эндогенное дыхание клеток. Десульфирование цистеина осуществляется как в аэробных, так и анаэробных условиях.

2. Культивирование чумного микроба на средах с повышенным содержанием цистеина сопровождается увеличением активности фермента, катализирующего распад этой аминокислоты.

3. Помимо сероводорода, продуктами распада цистеина являются аммиак и пировиноградная кислота. Пировиноградная кислота улавливается только при работе с бактериями, убитыми толуолом или ацетоновыми препаратами клеток чумного микроба.

ЛИТЕРАТУРА

Домарадский И. В. и Иванов В. А. Некоторые данные по культивированию чумного микроба на синтетических средах. Журн. микр., эпид. и иммунобиол., 1957, № 2.

Домарадский И. В. Аминокислотный обмен микробов чумы и псевдотуберкулеза. Диссертация, Саратов, 1955.

Егорова В. Д. и Домарадский И. В. К вопросу о диссимилации некоторых аминокислот под влиянием чумного и псевдотуберкулезного микробов. Настоящий сборник.

Домарадский И. В. К вопросу об обмене серосодержащих аминокислот в культурах микробов чумы. Журн. микр., эпид. и иммунологии, № 6, 1957.

Englesberg E. The irreversibility of methionine synthesis from cysteine in *Pasteurella pestis*. J. Bacteriol., 1953, 65, 581.

Gerhardt P., Mac-Gregor D. R., Marr A. G., Olsen C. R., Wilson J. B. The metabolism of brucellae: the role of cellular permeability. J. Bacteriol., 1953, 65, 581.

Friedmann T., Haugen G. Piruvic acid. III. The determination of keto-acids in blood and urine. J. Biol. Chem., 1943, 147, 415.

Блок Р. и Боллинг Д. Аминокислотный состав белков и пищевых продуктов. Изд. иностр. литературы, М., 1948.

Дюбо Р. Бактериальная клетка. Изд. иностр. литературы, М., 1948.

Gale E. Faktors influencing the enzymis activities of bacteria. Bact. Revs. 1943, 7, 139.

Metaxas M., Delwiche E. The L-cysteine desulphhydrase of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 1955, 70, 735.

Kallio R., Porter J. The metabolism of cystine and sustine by *Proteus vulgaris* and *Proteus morganii*. J. Bacteriol., 1950, 60, 607.

Désnuelle p. La decomposition anaerobie de la cysteine par *E. coli*. II. Son role dans la degradation de la cystine. Enzymologia, 1939, 6, 387.

Desnuelle P., Fromageot C. La decomposition anaerobie de la cysteine par *E. coli* I. Existence d'une cysteinase, ferment d'adaptation. Enzymologia, 1939, 6, 80.

Липсиц Д. В. Значение сероводорода в возникновении восстановительного потенциала экскрементов. Вопросы медицинской химии, 1956, в. 2, 182.

Desnuelle P., Wooky E., Fromageot C. Sur la degradation anaerobie de la cysteine et de la cystine par *Propionibacterium pentosaceum*. Enzymologia, 1940, 8, 225.

Wynn E., Gott C. Effect of cysteine on growth of streptococcus faecalis in over-autocloved media. J. Bacteriol., 1956, 71, 122.

Азарх Р. М. и Гладкова В. Н. Цистиндесульфгидраза бактерий и животных тканей—протеид фосфопиродоксаля. Доклады АН СССР, т. XXXI, 1952, 173.

Tarr H. The anaerobic decomposition of L-cystine by washed cells of *Proteus vulgaris*. Biochem. J. 1953, 27, 759.

Bernheim F., Deturk W. Enzymologia, 1953, 16, № 2, 69.

Tamia N. Studies on aerobic desomosition of cysteine by *Escherichia coli* I. J. Biochem., 1954(a), 41, № 2.

Tamia N. Studies on aerobic decomposition of cysteine by *Escheriahi-coli*. II. J. Biochem., 1954(0), 41, № 3, 287.

Krebs H. Metabolism of amino acids. III. Deamination of amino acids. Biochem. J. 1935, 29, 1620.

Конникова А., Крицман М., Якобсон Л. и Самарина О. Синтез индивидуальных аминокислот из аммиака и кетокислот у различных видов бактерий. Биохимия, т. 14, 223, 1949.

Kallio R. Function of pyridoxal phosphate in desulphhydrase systems of *proteus morganii*. J. Biol. Chem, 1951, 192, 371.

Л. И. Носкова, Н. З. Трофименко, В. С. Михно

МЯСО-КИСЛОТНЫЙ ГИДРОЛИЗАТ ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ ХОЛЕРНОГО И ЧУМНОГО МИКРОБОВ

В качестве питательных сред обычно применяют перевары Хоттингера и Мартена, для приготовления которых служат ферменты животного происхождения. Питательные свойства бульонов Мартена и Хоттингера, как правило, выше, чем питательные свойства мясо-пептонного бульона. Поэтому эти среды чаще применяются для культивирования микроорганизмов, обладающих незначительными протеолитическими свойствами (Шайн Д. А.).

Однако для производства больший интерес представляют такие методы расщепления белка, которые основаны на применении не ферментов, а кислот или щелочей.

Настоящее исследование проводилось с целью выяснения пригодности сред из мясо-кислотных гидролизатов для выращивания чумного микроба и холерного вибриона.

При изготовлении мясо-кислотного гидролизата мы исходили из тех же соотношений белкового сырья, которые предусматриваются способом Хоттингера (1:2). Вместо фермента поджелудочной железы мы использовали соляную кислоту, конечная концентрация которой составляла 2%.

Переваривание проводили в автоклаве при температуре, соответствующей 1,5 и 2 атмосферам, в течение 30 минут, 1-го и 2-х часов.

Наблюдения за ходом гидролиза осуществляли путем определения концентрации аминного азота и свободного триптофана. После окончания переваривания кислотный гидролизат нейтрализовался до рН — 7,0.

В готовых гидролизатах мы определяли: общий азот по методу Кьельдаля, аминный азот по методу Зеренсена; триптофан — по Пешкову; хлористый натрий — по Фольгарду.

Химические показатели гидролизатов, взятых нами в опыт, представлены в табл. 1.

Полученные данные показали, что наибольший процент расщепления белковой молекулы получается при переваривании мяса в течение 2-х часов при давлении в 2 атмосферы.

Помимо цельного фарша, в качестве сырья для приготовления питательных сред мы использовали отжатый фарш, остающийся после приготовления мясной воды, так как при этом утилизируется

Химические показатели гидролизатов

№№ п/п	Метод приготовления гидролизатов	Показа- ния манометра (атмосф)	Продол- жит. гид- ролиза (в часах)	Общий азот (мг %)	Аминный азот (мг %)	Поварен. соль (%)	$\frac{\text{NH}_2}{\text{N}}$ (%)
1	Кислотный	2	1/2	1520	462	3,5	30,3
2	"	2	1	1300	430	3,09	33,0
3	"	2	2	1000	429	3,0	42,9
4	"	1,5	1/2	1100	275	4,0	25
5	"	1,5	1	1010	233	3,5	23
6	"	1,5	2	1060	290	3,6	27,3
7	По Хоттингеру (контроль)*			1050	690	—	65,7

*) Содержание триптофана в гидролизате Хоттингера—180 мг %.

только до 10% белков мяса, а 90% белков остается не использованными (Бабич, 1947).

Мясо-кислотный гидролизат, приготовленный из отжатого фарша, по своему химическому составу не уступает гидролизату, приготовленному из цельного фарша: общий азот—1200 мг%, аминный азот—460 мг%, хлористый натрий—3,4%.

Для выращивания штаммов ЕВ чумного микроба готовили питательные среды из указанных выше гидролизатов. Содержание аминного азота колебалось в пределах от 50 до 250 мг%. Для контроля применяли твердые и жидкие питательные среды на гидролизате Хоттингера с таким же содержанием аминного азота, как и среды из кислотного гидролизата. рН сред устанавливали 7,2.

Вначале посевная доза для всех сред равнялась 10, 50, 100, 500 и 1000 микробных клеток. Посевы выращивали в термостате при 28°C в течение 5 суток. Предварительный учет результатов на твердых средах производили на вторые сутки, а окончательный подсчет выросших колоний—на 5 сутки.

За ростом чумного микроба в бульоне наблюдали ежедневно в течение 5 суток.

Результаты опытов показали, что на твердых и жидких питательных средах, приготовленных из мясо-кислотного гидролизата, рост чумного микроба отсутствовал при высеве из всех указанных выше доз.

На контрольных средах рост чумного микроба отмечался при посеве даже 10 микробных клеток независимо от содержания аминного азота в среде.

Дальнейшие исследования показали, что на средах из мясо-кислотных гидролизатов рост чумного микроба появлялся только при посеве 1 млрд. микробных клеток. Однако и при такой посевной дозе выход микробных клеток был в 3—4 раза меньше, чем со сред Хоттингера.

При выращивании на питательных средах из мясо-кислотного гидролизата свойства чумного микроба резко изменились. В частности, в мазках с агара и из бульона микробы были представлены в виде грубых крупных палочек, среди которых встречалось большое количество разрушенных клеток.

Для холерного вибриона мы готовили жидкие и твердые питательные среды на мясо-кислотном гидролизате (из цельного и отжато́го фарша) с содержанием аминного азота от 25 до 200 мг%. В качестве контрольных питательных сред употребляли мясо-пептонный агар и бульон Мартена. рН сред был 7,7.

В период проведения работы нам стал известен рецепт питательной среды, применяемый Харьковским институтом для производства холерной вакцины. В среду добавляется овсяная и мясная воды и пептон Мартена.

Среду, приготовленную по этому рецепту, мы использовали в качестве второго контроля. Концентрация аминного азота 90—112 мг%. Испытываемые и контрольные среды засеивали односубочной агаровой культурой холерного вибриона в дозах 5, 10, 50 и 100 микробных клеток.

Посевы выращивали в термостате при 37°C в течение 20 часов.

Результаты опытов показали, что рост холерного вибриона наблюдается при посевах из всех посевных доз независимо от содержания аминного азота в питательной среде (табл. 2).

Таблица 2

Результаты учета роста колоний холерного вибриона на агаровых средах из мясо-кислотного гидролизата с различным содержанием аминного азота

Концентрация аминного азота (%)	Среда из отжато́го фарша				Среда из цельного фарша			
	Посевные дозы							
	5	10	50	100	5	10	50	100
25	3,5*	7,8	32,5	76,3	4,3	7,8	39,3	85
50	3,7	8,5	42	92,5	4,8	8	23,7	89,8
75	3,4	7	40,8	93	5	9,5	46	90,2
100	4	10,5	46,8	82,8	4	8,5	41,2	91
125	4	10	50,8	95,4	3	6,1	44,5	84
150	3,3	9	49,8	85	3,4	7,3	42,5	87,3
175	3,1	8	24	77	1	3,7	17,1	41,5
200	2,1	7,2	15,6	52,6	2,1	1,3	12,8	20,3
1. Мясо-пептонный агар (контроль)					3,4	5,6	42,5	74

*) Среднее количество колоний, выросших на 8—12 чашках.

Рост микробов на мясо-кислотном агаре (из цельного и отжато́го фарша) с содержанием аминного азота от 50 до 150 мг% был обильным; при содержании же аминного азота 175—200 мг% выход микробных клеток значительно снижался.

Наблюдения за посевами в течение 72 часов показали, что колонии увеличивались в размерах, а морфология микробов не изменялась. Образование бактериофага и явлений диссоциации мы не отмечали.

На жидких питательных средах с содержанием аминного азота 25, 50 и 75 мг%, приготовленных на мясо-кислотном гидролизате,

отмечался рост холерного вибриона из всех посевных доз с наличием нежной пленки на поверхности бульона.

При содержании аминного азота 100 мг% и выше рост был очень обильным.

Морфология холерного вибриона на жидких питательных средах оставалась типичной.

Последующие опыты были поставлены в целях определения выхода микробной массы холерного вибриона. Для этого скошенный агар во флаконах засеивали суспензией односуточной агаровой культуры холерного вибриона в дозе 500 млн. микробных клеток. Флаконы помещали в термостат при 37°C на 20 часов.

Результаты опыта по определению выхода клеток холерного вибриона представлены в таблице 3.

Таблица 3

Выход микробных клеток холерного вибриона (в миллиардах) со сред, приготовленных из кислотного гидролизата

Концентрация аминного азота (мг %)	Среда из отжато-го фарша	Среда из цель-ного фарша
25	10,5	10
50	19	17,7
75	25	20,5
100	25	23,7
125	24	24,5
150	28	28
175	23,2	22,5
200	21,5	21,0

ПРИМЕЧАНИЕ: На контрольных средах—мясо-пептон ном агаре—22,6 млрд; агар по рецепту Харьковского института—21,5 млрд.

Как видно из таблицы, наибольший выход микробных клеток при одной и той же посевной дозе в 500 млн. наблюдался на агаре, приготовленном на мясо-кислотном гидролизате (из цельного и отжато-го фарша) с содержанием аминного азота от 75 до 150 мг%.

Культурально-морфологические, биохимические и серологические свойства холерного вибриона, выращенного на агаре, приготовленном на мясо-кислотном гидролизате, не изменялись.

Иммуногенные свойства холерного вибриона мы имели возможность проверить только на белых мышах. Для этой цели служили три серии вакцины, приготовленные из культур холерного вибриона, выращенных:

1) на среде из кислотного гидролизата цельного фарша (вакцина I); 2) на среде из кислотного гидролизата отжато-го фарша (вакцина II) и 3) на среде из мясо-кислотного агара (вакцина III).

Указанными вакцинами подкожно, трехкратно, дозами 200, 400 и 400 миллионов микробов с интервалами в 6 дней мы иммунизировали белых мышей (вес 18—20 грамм). На каждый опыт было взято по 10 белых мышей. Заражение вакцинированных животных проводили через 12 дней после вакцинации. Белых мышей заража-

Иммунные свойства вакцин

Животные иммунизировались вакциной	Результат заражения вакцинированных животных	
	1 DCL	1 ¹ / ₂ DCL
I	7/10	5/10
II	8/10	8/10
III	5/10	4/10
Контроль	0/10	0/10

ПРИМЕЧАНИЕ: Числитель—число белых мышей, оставшихся живыми после контрольного заражения.

Знаменатель—число белых мышей, взятых в опыт.

ли 1 и 1,5 смертельными дозами вирулентного штамма холерного вибриона.

Контролем служили невакцинированные мыши. Результаты опыта сведены в таблице 4.

Наши исследования показали, что иммуногенные свойства вакцин, приготовленных из культур холерного вибриона, выращенных на питательных средах из мясо-кислотного гидролизата, не снижаются.

Полученные данные показывают, что питательные среды, приготовленные на мясо-кислотном гидролизате (из цельного и отжато-го фарша), не изменяют морфологических, серологических, биохимических и иммуногенных свойств холерного вибриона и могут быть рекомендованы для производства противохолерной вакцины. Использование мясо-кислотного гидролизата значительно снижает себестоимость продукции (в 8—10 раз).

В ы в о д ы

Мясо-кислотные гидролизаты, приготовленные по указанной выше методике, для выращивания чумного микроба в настоящее время не могут быть использованы. Но они пригодны для выращивания холерного вибриона, наиболее благоприятный рост которого наблюдался на средах с содержанием аминокислот от 50 до 150 мг %.

Культивирование холерного вибриона на питательных средах, приготовленных из мясо-кислотного гидролизата (из цельного и отжато-го фарша), показало, что культурально-биохимические, серологические и иммуногенные свойства микробов не изменяются.

Среды, изготовленные из мясо-кислотного гидролизата, можно рекомендовать для производства холерной вакцины.

Л И Т Е Р А Т У Р А

Б а б и ч М. А. Гидролизные среды для изготовления вакцин и антигенов. Научный отчет контрольного института ветеринарн. препаратов. М., 1947.

Б а б и ч М. А. Сравнительная оценка качества биопрепаратов на гидролизатных и других средах. Труды гос. научно-контрольного института ветеринарн. препаратов, т. IV, Юбилейный, XX, 1953.

Ш а й н Д. А. Производственное использование мясо-гидролизных сред в производстве биопрепаратов. Труды гос. научно-контрольного института ветеринарн. препаратов, т. IV, Юбилейный, XX, 1953.

Трофименко Н. З., Васильева З. И., Кротова В. А.

ИЗМЕНЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ПРИ ГЛУБИННОМ ВЫРАЩИВАНИИ ЧУМНОГО МИКРОБА

С О О Б Щ Е Н И Е 1.

Обменом веществ патогенных микроорганизмов стали заниматься сравнительно недавно. В этом одна из причин очень медленного внедрения в практику имеющихся уже достижений биохимии микробов.

Изменчивость бактерий под влиянием окружающей среды служила предметом многочисленных исследований. Но изменчивости их в производственных условиях до сих пор уделялось мало внимания.

Еще больше отстает у нас в вакцинном производстве изучение вопроса об изменении среды под влиянием микроорганизмов. Именно поэтому задачей настоящей работы являлось изучение некоторых химических изменений, происходящих в питательной среде при глубинном выращивании вакцинных штаммов 1 и 17 чумного микроба. Особое место в работе было отведено исследованию качественного и количественного состава аминокислот среды до и после культивирования на ней микроба.

Методика работы

Мы использовали среды, приготовленные по методу Хоттингера из мясного фарша. Основные гидролизаты содержали 600—750 мг% аминного азота и 1200—1300 мг% общего азота. Отношение аминного азота к общему составляло 50—60%. Для приготовления среды основной гидролизат разводился водопроводной водой до концентрации 250 мг% аминного азота.

Выращивание чумного микроба проводили в реакторах при аэрации. Посевная доза варьировала в пределах от 500 млн. до 1 млрд. микробных тел в 1 мл среды.

Через 24 часа после посева бульон отделяли от микробной массы фильтрацией его через бактериальные свечи Шамберлена. Химические показатели питательной среды определялись следующими методами: общий азот по Кьельдалю, аминокислоты по Зеренсену, концентрацию водородных ионов (рН) — колориметрически, окислительно-восстановительный потенциал (Еh) — электрометрически.

Более подробно остановимся на использованных нами методиках качественного и количественного исследования аминокислотного состава питательной среды.

Разделение аминокислот мы осуществляли на фильтровальной бумаге Ленинградской фабрики им. Володарского методом двумерной восходящей хроматографии.

В качестве растворителя для первого направления применяли водонасыщенный *n*-бутанол.

n-бутанол — вода — уксусная кислота смешивались в соотношении 40:50:10; использовался только верхний слой. Растворителем для второго направления служил водонасыщенный фенол (80 частей фенола и 20 частей воды) с добавлением 0,1% аммиака.

Пробы исследуемой питательной среды наносились на бумагу в количестве 0,06 мл.

Для удаления растворителей хроматограммы оставляли при комнатной температуре до полного их высушивания.

Окончательно следы растворителя удалялись высушиванием хроматограмм при температуре 80—100°.

В предварительных опытах для определения значения R_f мы наносили каждую аминокислоту в отдельности, а также смесь из них на фильтровальную бумагу и разгоняли в указанных растворителях. Местоположение аминокислот выявляли путем обработки хроматограмм 0,1-процентным раствором нингидрина в водонасыщенном *n*-бутаноле. Распределение аминокислот на контрольных двумерных хроматограммах видно из рис. 1.

Количественный анализ некоторых аминокислот производился по несколько видоизмененному нами методу Резниченко с соавторами (1956).

Вырезанные из хроматограмм пятна аминокислот помещали в пробирки, в которые для экстракции наливали по 4 мл 96-процентного этилового спирта. Через 30 минут для усиления окраски раствора добавляли по одной капле 0,5-процентного раствора сернокислой меди. Интенсивность окраски измерялась при помощи фотоэлектроколориметра ФЭК-МС с зеленым светофильтром (550 $m\mu$).

Толщина слоя жидкости в кювете составляла 5 мм. Для построения градуировочных кривых служили хроматограммы растворов чистых аминокислот, которые наносились на бумагу в количестве от 1 до 50 гамм. Эти хроматограммы обрабатывали по вышеописанной методике. Оптическая плотность окраски стандартных растворов аминокислот откладывалась на графике по оси абсцисс, а концентрация аминокислот — по оси ординат.

Результаты исследования

Нами было исследовано более 20 серий бульона Хоттингера до посева и через 24 часа после посева двух вакцинных штаммов чумного микроба (1 и 17).

По нашим данным после одностороннего роста бактерий в бульоне наблюдалось уменьшение содержания аминного и общего азота.

К сожалению, формольный метод Зеренсена не давал возможности точно судить об изменении аминокислотного состава среды во время роста чумного микроба, так как наряду с аминным азотом этим методом определяется аммиак, количество которого в среде увеличивается в процессе жизнедеятельности чумного микроба.

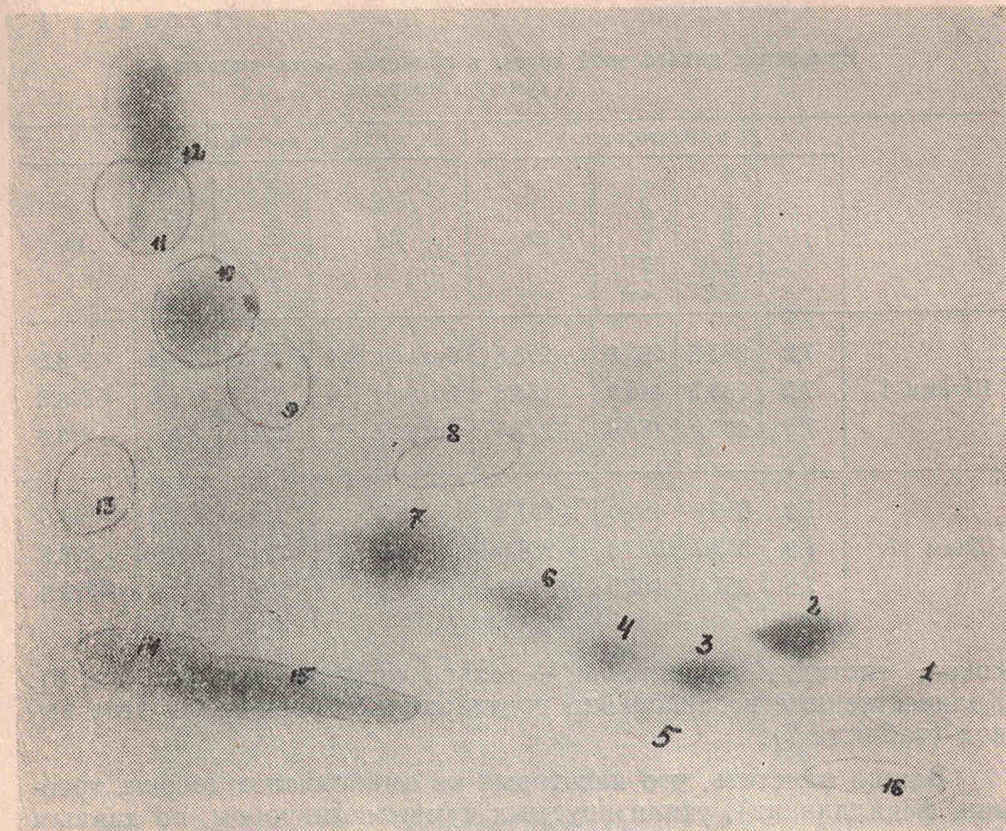


Рис. 1. Хроматограмма смеси чистых аминокислот. 1. Аспарагиновая кислота. 2. Глутаминовая кислота. 3. Серин. 4. Гликокол. 5. Аспарагин. 6. Треонин. 7. Аланин. 8. Тирозин. 9. Триптофан. 10. Валин. 11. Фенилаланин. 12. Лейцин. 13. Пролин. 14. Аргинин. 15. Лизин. 16. Цистин.

Уменьшение в среде содержания общего азота являлось показателем потребления азотистых веществ среды микробной клеткой в процессе роста.

Изменения питательной среды в процессе роста приведены в таблице 1.

Реакция среды изменялась в щелочную сторону. Окислительно-восстановительный потенциал в условиях аэрации изменялся незначительно. По-видимому, поступающий в реактор воздух поддерживает потенциал среды на высоком уровне*.

Анализ двухмерных хроматограмм показал, что бульон Хоттингера содержит следующие аминокислоты: аспарагиновую и глутаминовую, серин, треонин, гликокол, аланин, тирозин, валин, триптофан, лейцин, фенилаланин, лизин, аргинин, пролин, гистидин и аспарагин. Наличие цистина, цистеина и метионина установлено на одномерных хроматограммах при использовании в качестве проявителя иодистой платины.

При сравнении хроматограмм бульона Хоттингера до и после культивирования в нем двух штаммов чумного микроба выяснилось, что такие аминокислоты, как глутаминовая кислота, серин, треонин и пролин, исчезают из среды совсем, а фенилаланин, гли-

* В противоположность этому при росте чумного микроба на питательных средах без аэрации Бахрах и Башева (1951 г.) наблюдали заметное снижение окислительно-восстановительного потенциала.

Изменение питательной среды в процессе роста штаммов чумного микроба

	До культивирования				После культивирования			
	pH	азот аминный мг %	Азот общий мг %	Eh	pH	азот аминный мг %	азот общий мг %	Eh
Штамм 1	7,2	377,5	598,8	+263,8	больше 8,4	230	583,8	+203,8
	7,2	238,7	448,0	+251,8	больше 8,4	225	352,0	+238,8
	7,2	230,0	480,0	+273,8	больше 8,4	224	352,0	+218,8
Штам 17	7,2	256,2	480,0	+287,8	8,2	200	432,0	+188,0
	7,2	386,7	579,0	+258,8	8,1	321	540,0	+208,8
	7,2	251,0	416,0	+273,8	8,3	236	320,0	+218,8

кокол, гистидин и триптофан — только частично (см. рис. 2 и 3). Количественные исследования подтвердили и расширили этот вывод (таблица 2).

Важно отметить, что некоторые из аминокислот (серин, треонин, фенилаланин), утилизируемых чумным микробом, по данным Домарадского и Иванова (1957), относятся к числу незаменимых. В отсутствие их культивирование чумного микроба на простых синтетических средах невозможно. К сожалению, мы не смогли

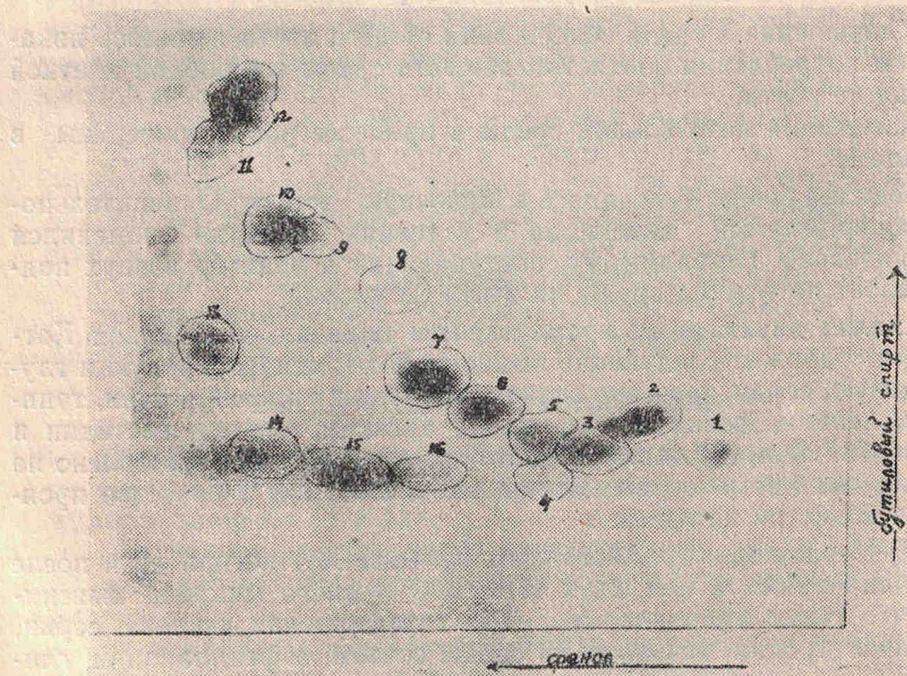


Рис. 2. 1. Аспарагиновая кислота. 2. Глутаминовая кислота. 3. Серин. 4. Аспарагин. 5. Гликокол. 6. Треонин. 7. Аланин. 8. Тирозин. 9. Триптофан. 10. Валин. 11. Фенилаланин. 12. Лейцин. 13. Пролин. 14. Аргинин. 15. Лизин. 16. Гистидин.

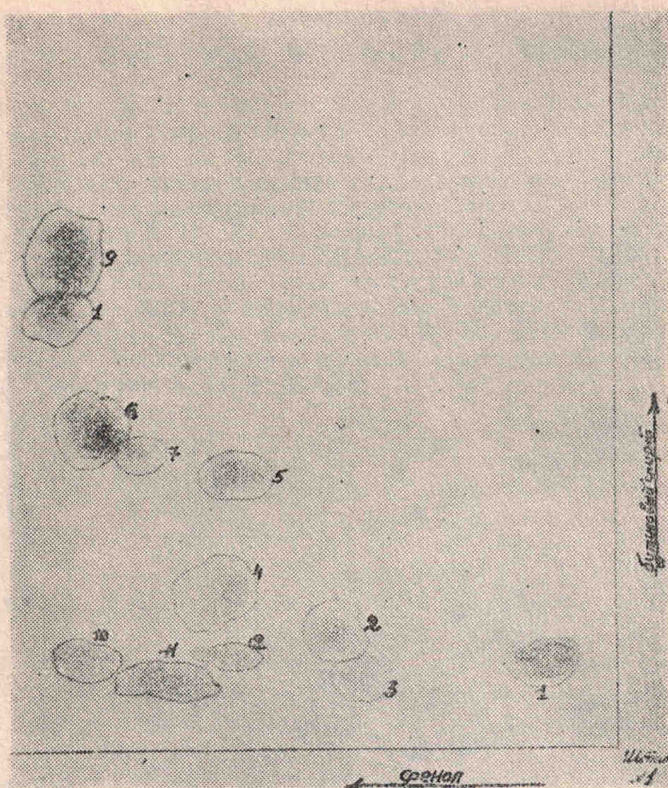


Рис. 3. Хроматограмма аминокислотного состава бульона Хоттингера, после культивирования на нем штамма 1 чумного микроба.
 1. Аспарагиновая кислота. 2. Гликокол. 3. Аспарагин. 4. Аланин.
 5. Тирозин. 6. Триптофан. 7. Валин. 8. Фенилаланин. 9. Лейцин.
 10. Аргинин. 11. Гистидин. 12. Лизин.

изучить динамику концентрации еще двух незаменимых аминокислот — метионина и цистеина.

Не меньший интерес представляют наши данные о способности чумного микроба утилизировать гликокол. Исследования, прове-

Таблица 2

Аминокислотный состав сред до и после культивирования чумного микроба (в %).

Аминокислоты	Бульон Хоттингера до выращивания	Бульон Хоттингера после выращивания	
		штамм 1	штамм 17
Аспарагиновая кислота	6,3	6,6	4,1
Глутаминовая кислота	13,3	0	0
Серин	6,4	0	0
Гликокол	5,8	2,3	4,2
Треонин	8,4	0	0
Аланин	7,8	5,3	5,7
Тирозин	3,6	2,2	2,7
Пролин	5,6	0	0

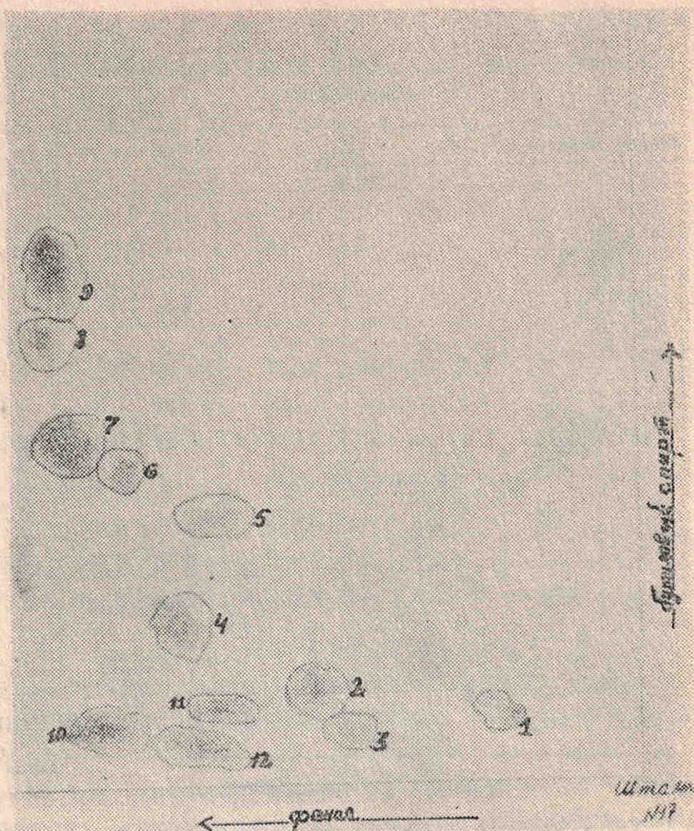


Рис. 4. Хроматограмма аминокислотного состава бульона Хоттингера после культивирования на нем штамма 17 чумного микроба.
 1. Аспарагиновая кислота. 2. Гликокол. 3. Аспарагин. 4. Аланин.
 5. Тирозин. 6. Валин. 7. Триптофан. 8. Фенилаланин. 9. Лейцин.
 10. Аргинин. 11. Лизин. 12. Гистидин.

денные с меченым гликоколом (Домарадский и Семенушкина, 1957) показали, что этот микроорганизм использует указанную аминокислоту для многочисленных реакций синтеза, протекающих в его протоплазме. Кроме того, гликоколу принадлежит большая роль в повышении токсигенности микроба.

Выводы

1. Установлено, что в процессе роста чумного микроба в среде происходит уменьшение содержания общего и аминного азота; реакция среды становится более щелочной. В условиях аэрации окислительно-восстановительный потенциал среды меняется незначительно.

2. В бульоне Хоттингера обнаружено 19 аминокислот: аспарагиновая и глутаминовая кислоты, серин, аланин, треонин, валин, лейцин, пролин, триптофан, фенилаланин, гликокол, лизин, аргинин, гистидин, цистеин, цистин, метионин, тирозин и аспарагин.

3. После выращивания чумного микроба из среды полностью исчезают глутаминовая кислота, серин, треонин, пролин и уменьшается содержание аланина, гликокола, тирозина, фенилаланина и гистидина. В случае штамма 17 отмечено также уменьшение концентрации аспарагиновой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

Блок Р., Лестранж Р., Цвейг Г. Хроматография на бумаге. 1954.

Бахрах Е. Э. и Башева Р. С. Окислительно-восстановительный потенциал в культуре чумного микроба. Труды института «Микроб», 1951.

Домарадский И. В. и Иванов В. А. Опыт использования синтетических сред для культивирования чумного микроба. Тезисы докладов меж-институтской научной конференции. Саратов, 1955.

Домарадский И. В. К вопросу об обмене серосодержащих аминокислот в культурах микробов чумы. ЖМЭИ, № 6, 1957.

Домарадский И. В. и Семенушкина А. Ф. Некоторые данные об усвоении гликокола чумным микробом. Вопросы мед. химии, 1957, № 1.

Резниченко М. С., Колосов В. М., Полотнова Л. И., Чубачина Н. А. Исследования в области структуры и химического состава проламинов. Биохимия, т. 21, в. 2, 1956.

Я. Л. Бахрах.

МЕТОД ПРЕПАРАТИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ ЦИСТИНА

подавляющее большинство существующих методов препаративного получения цистина дает весьма невысокий выход последнего (Folin, 1910, Гаврилов, 1927, Гортнер и Гофман, 1932, Беленький, 1949). Методы, предложенные Morner (1901) и Buchtala (1907), дают достаточно высокий процент выхода цистина на абсолютно сухое вещество, однако отрицательным моментом этих методов является длительность процесса получения цистина, что значительно удорожает его стоимость.

Исходя из вышеизложенного, мы поставили своей задачей усовершенствовать метод препаративного получения цистина.

Сущность предложенного нами метода заключается в следующем: сырье тщательно отделяется от механических примесей и промывается 3-процентным мыльно-содовым раствором, многократно водопроводной и 2—3 раза дистиллированной водой, после чего сушится в термостате до воздушно-сухого состояния. Навеска высушенного образца сырья помещается в стеклянную круглодонную колбу с двукратным по весу количеством химически чистой соляной кислоты ($d=1,19$) и гидролизуется на электровоздушной бане при температуре 110—115°C в течение 5 часов до отрицательной биуретовой пробы.

Для равномерного кипения гидролизата мы применяли капилляры, а в ряде опытов и бусинки.

Полученная в результате гидролиза и остывания вязкая, густая масса фильтруется на фарфоровой воронке Бухнера, и образовавшийся черный липкий осадок тщательно промывается дистиллированной водой во избежание могущих произойти потерь при выделении препарата цистина.

Соединенные вместе порции гидролизата (основной фильтрат и промывные воды) обесцвечиваются высокоактивным осветляющим торфяным углем.

Осветляющая способность примененного нами адсорбента равняется 392 единицам по патоке. Уголь обильно промывается дистиллированной водой, и промывные воды соединяются вместе с основным фильтратом. В результате проведенного обесцвечивания темный гидролизат становится почти бесцветным со слегка зеленой опалесценцией. Обесцвеченный гидролизат нейтрализуется 40-процентным раствором едкого натра до слабо кислой реакции на кон-

го-рот при охлаждении и тщательном помешивании жидкости. При этих условиях начинается кристаллизация цистина.

После шестичасового пребывания на холоде выпавший осадок цистина отфильтровывается на воронке Бухнера, подвергается двукратной перекристаллизации и высушивается в термостате до получения влажности, не превышающей 0,5%.

Ниже приводятся сравнительные данные выхода цистина из роговой стружки, конского волоса, овечьей шерсти (грубошерстной и тонкорунной) и людского волоса — отбросов парикмахерских.

Т а б л и ц а 1

Виды сырья	Выход цистина по данным различных авторов						Наши данные
	Гаврилов	Folin	Гортнер и Гофман	Morner	Buchtala	Беленький	
Роговая стружка	—	—	—	6,8%	—	—	7,14%
Конский волос	—	—	—	7,98%	—	—	10,25%
Овечья шерсть	—	6%	—	—	—	—	11% (грубошерстная) 11,8% (тонкорунная)
Волос-отбросы парикмахерских	3%	до 8%	5,3%	11%	12,98%	8%	15,08%
					14,03%		
					14,5%		

ЛИТЕРАТУРА

Беленький В. Г. Препаративное получение цистина. Труды Морской военно-медицинской академии, в. 6, 1949.

Гаврилов Н. И. Получение цистина. Практикум по биохимии, 1927.

Гортнер и Гофман. Получение цистина, Синтез органических препаратов, т. I, 1932.

Folin O. Preparation of Cystine. The Journ. of Biological Chemistry v. VIII, т. 10, 1910.

Morner H. N. Cystin ein Spaltungsprodukt der Hornsubstanz, Ztschr. physiol. Chemie, 1901.

Buchtala H. Uber das Mengeverhältnis in verschiedenen Hornsubstanzen. Ztscher. physiol. Chemie, 1907.

Е. Э. Бахрах, Е. И. Коробкова и А. Ф. Шалаева

О ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ И СЕРОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДОСОДЕРЖАЩЕЙ ФРАКЦИИ ЧУМНОГО МИКРОБА*

Среди серологически активных веществ микроорганизмов большая роль принадлежит специфическим полисахаридам. Они имеют огромное значение в вопросах инфекции и иммунитета. Иммунологическая специфичность бактериальных углеводов определяется их химическим строением. Вот почему за последние годы так возрос интерес к изучению химической природы полисахаридов.

Особый интерес представляет выяснение химической природы специфического полисахарида чумного микроба.

У большинства исследованных до настоящего времени микробов (пневмококки, микробы кишечного-паратифозной группы, туляремийный микроб, бруцеллы и др.) специфические полисахариды образуют прочный комплекс с липоидом и белком, известный в литературе под названием полного антигена. Этот глицидо-липидо-протеиновый комплекс выделяется из бактерий разнообразными методами. Наиболее широкое распространение из них получил метод экстракции его трихлоруксусной кислотой (метод Буавена).

В очищенном виде антиген сохраняет все специфические, токсические и иммуногенные свойства соответствующих микробов. При этом входящие в состав его компоненты теряют некоторые присущие им в свободном состоянии качества. Так, липоид не может быть извлечен из антигенного комплекса эфиром, белок, входящий в его состав, не осаждается трихлоруксусной кислотой и т. д. Выделить составные части антигена можно только после разрушения его с помощью кислотного гидролиза. Подобным образом и были получены из полных антигенов многих микробов их специфические полисахариды.

Оказалось, что в этом отношении чумной микроб отличается от всех исследованных микроорганизмов, даже от близкого к нему вида — микроба псевдотуберкулеза грызунов.

Как показали работы Жирара (1941), Коробковой, Котельникова, Быстренина и Урода (1944) и в дальнейшем Коробковой, Кузнецовой, Бахрах и Шалаевой (1951), полный антиген из чумно-

*) Доложено на научной конференции института «Микроб» в мае 1952 г.

го микроба не может быть выделен экстракцией трихлоруксусной кислотой.

Это говорит о своеобразном строении антигенного комплекса чумного микроба, характеризующегося необычной формой связи между полисахаридом, белком и липоидом.

Изучение химической природы специфических полисахаридов может помочь установить разницу в структуре и химической природе антигенных комплексов чумного и псевдотуберкулезного микробов, что чрезвычайно важно. В конечном итоге самыми существенными признаками, по которым определяются микроорганизмы, являются их антигенные свойства, так как лишь антигенная структура может характеризовать наследственное основание микроба.

Наряду с выделением специфических полисахаридов из полных антигенов, существуют методы непосредственного получения их из бактериальных клеток.

В работах Бахрах и Дроздовского (1950), Коробковой, Кузнецовой, Бахрах и Шалаевой (1951) показано, что из штамма ЕВ чумного микроба с помощью гидролиза бактериальной массы уксусной кислотой можно непосредственно выделить специфическую полисахаридосодержащую фракцию, в дальнейшем называемую специфическим полисахаридом. Незначительное количество полученных тогда препаратов не позволило очистить их и изучить физико-химические свойства. Мешало и то, что авторы проводили гидролиз неотмытой взвеси микробных тел.

В настоящей работе при получении больших количеств полисахарида, необходимых для очистки и анализа препарата, мы центрифугировали микробные клетки, промывали их дважды дистиллированной водой, после чего подвергали гидролизу 0,1 N уксусной кислотой.

В отдельных опытах отмытые микробные тела промывали спиртом, обезжиривали несколько раз эфиром и высушивали в термостате при 45°C. Из сухих микробных тел полисахарид извлекали также экстрагированием 0,1 N уксусной кислотой при нагревании (на 8 г сухих бактерий — 100 мл 0,1 N CH_3COOH). Экстракция повторялась три раза. Установлено, что 60—70% полисахарида извлекается при первой экстракции, около 30% — при второй и менее 5% — при третьей. Отмечено также, что специфичность препарата, извлеченного при второй экстракции, незначительно, а при третьей значительно ниже, чем у полученного в результате первой экстракции.

Выход неочищенного полисахарида из сухих микробных тел чумного штамма ЕВ составлял 10—11%. Если он извлекался из отмытой, но не высушенной микробной массы, то выход препарата равнялся 200—240 мг на 100 мл 100-миллиардной взвеси культуры чумного микроба.

Полученные неочищенные препараты специфических полисахаридов представляют собой порошки от белого до светло-кремового цвета; содержат значительное количество нерастворимых примесей. Водные растворы приобретают желтый цвет. Препараты содержат 20% золы, около 7% азота.

Положительные реакции с трихлоруксусной и сульфасалициловой кислотами свидетельствуют о наличии в препарате белка. Резко положительная реакция Молиша и накопление редуцирующих веществ при гидролизе децинормальной серной кислотой с 8 до

23% позволяют считать, что препараты содержат полисахарид. Они дают реакцию преципитации с противочумной сывороткой в разведении 1:1000000.

Для очистки полученных препаратов от зольных элементов, примесей белка и других веществ мы проводили фракционированное осаждение спиртом.

Неочищенный полисахарид растворяли в дистиллированной воде (на 1 г полисахарида 10 мл воды). Нерастворимый осадок отделяли центрифугированием, промывали спиртом, эфиром и высушивали в вакуум-эксикаторе. К центрифугату добавляли один объем спирта. Выпавший осадок отделяли центрифугированием в вакуум-эксикаторе, промывали спиртом и эфиром, высушивали (фракция 1). После удаления первой фракции к центрифугату добавляли 5 объемов спирта. Осадок опять центрифугировали, промывали и высушивали (фракция 2).

Установлено, что 25—30% выделенного препарата составляют нерастворимые примеси, 20—25% — первая фракция, 30—33% — вторая фракция, до 20% препарата теряется в процессе обработки.

Для дальнейшей очистки препаратов проводилось фракционированное осаждение обеих фракций спиртом описанным выше способом 2—3 раза. Первая из них содержит значительное количество нерастворимых примесей. Удаление их и переосаждение воднорастворимой части препарата спиртом с последующей сушкой не приводит к получению препарата, полностью растворимого в воде. Это позволяет считать, что образование нерастворимых примесей в первой фракции является результатом изменения физико-химических свойств препарата в процессе обработки. Препарат обладает серологической активностью, дает реакцию преципитации с противочумной сывороткой в разведении 1:10000.

Препараты второй фракции полностью растворимы в воде; фракционированное осаждение спиртом позволяет освободить их от примеси первой фракции, зольных элементов и других веществ.

Таблица 1

Сравнительная характеристика некоторых физико-химических и серологических свойств фракций

Препарат	Цвет порошка	Зола (в %)	Азот (в %)	Фосфор (в %)	% редуцирующих веществ		Титр реакции преципитации с п/ч сывороткой	Реакция на белок
					до гидролиза	после гидролиза		
Неочищенный полисахарид	Светло-кремовый	20,0	6,7	1,5	8,3	23,4	1:120000	+
Нерастворимый осадок	Серовато-белый	40,0	5,5	1,7				
1 фракция	Желто-коричневый	8,2	8,0	0,32	9,0	10,7	1:10000	+
2 фракция	Светло-кремовый	1,0	4,0	0,29	9,3	40,2	1:100000	—

В табл. 1 представлены результаты анализа препаратов второй фракции разной степени очистки. Определение азота проводилось гипобромитным способом. Редуцирующие сахара определялись методом Хагедорн-Иенсена и пересчитывались на глюкозу.

Приведенные данные показывают, что почти полное освобождение препарата второй фракции от зольных элементов и других примесей лишь незначительно снижает его серологическую активность. Выход очищенного препарата составляет около 20% от неочищенного полисахарида, или примерно 2% от сухих микробных тел чумного микроба ЕВ.

Сравнительная характеристика некоторых физико-химических и серологических свойств разных фракций, выделенных из неочищенного полисахарида чумного микроба ЕВ, приведена в табл. 2.

Таблица 2

Серологические свойства полученных препаратов и наличие в них ацетилированного гексозамина

Штамм	Характер полисахарида	Выход полисахарида в мг на 100 мл 100-мл. рдной взвеси микробных тел	Н. пети-лигованной гексозамина	Титр реакции преципитации с	
				п/чумной сывороткой	п/псевдотуберкулезной сывороткой
ЕВ, выросший на обычной среде	Соматический	59	+	1:100000	1:500
	Капсульный	19	+	1:10000	—
ЕВ, выросший на среде с гликоколом	Соматический	130	++	1:100000	1:500
	Капсульный	81	+++	1:10000	—

Представленные в ней данные позволяют считать, что специфический полисахарид чумного микроба в основном сосредоточен во второй фракции. Препарат этой фракции в отличие от первой почти не содержит золы, не дает обычных реакций на белок, дает при гидролизе увеличение количества редуцирующих веществ с 9 до 40%, серологически более активен. Он представляет собой пушистый порошок светлокремового цвета. Хорошо растворим в воде, образует прозрачные растворы, бесцветные в малых и светложелтого цвета — в больших концентрациях.

В целях дальнейшего изучения химической природы специфического полисахарида мы поставили качественные пробы с 0,5% раствором его на содержание белков, аминокислот и отдельных сахаров.

Полученные результаты можно суммировать следующим образом. Пробы с трихлоруксусной и сульфосалициловой кислотами на наличие белка дали отрицательный результат. Слабоположительная биуретовая проба, положительные ксантопротеиновая реакция и реакция Миллона свидетельствовали о наличии в препарате аминных групп и пепидных связей. Положительная реакция Биала с орцином при отрицательной реакции с анилином позволила заключить, что препарат содержит уроновые кислоты, но не содержит пентоз. Отсутствие фруктозы показала реакция Селиванова. Появление при постановке этой реакции через некоторое время слаборозового окрашивания свидетельствовало о наличии гексозальдоз. Реакция Морган-Эльсона на ацетилованный гексозамин дала положительный результат. Таким образом, в выделенной специфической полисахаридосодержащей фракции чумного микроба определяются качественными пробами гексозы, ацетилованный гексозамин и уроновые кислоты.

Для выяснения природы сахаров, входящих в состав специфического полисахарида, был применен метод получения озонов. Для этого препарат гидролизовали в течение 4 часов в 1N серной кислоте. После нейтрализации содой и соответствующей обработки раствора фенолгидразином и уксусной кислотой был получен желтый кристаллический озон в виде сноповидных игл. Подобные озоны образуют манноза и глюкоза. Но в отличие от глюкозы манноза формирует кристаллы озона на холоду. Отсутствие последних позволяет считать выделенный озон, как озон глюкозы. Кристаллы его, увеличенные в 240 раз, представлены на рис. 1.



Рис. 1.

Следует указать, что Сил (1951) выделил из полисахарида чумного микроба озон арабинозы, Деви (1956) в выделенном им специфическом липополисахариде чумного микроба установил наличие глюкозы, глюкозамина и неидентифицированного сахара (альдогептозы). При хроматографическом исследовании полисахаридосодержащей фракции чумного микроба, полученной указанным выше методом, И. В. Домарадский и В. Д. Егорова (1957) также отметили появление трех пятен; два из них были идентифицированы как глюкоза и глюкозамин, а третье свидетельствовало о наличии еще одного углевода, природа которого не была установлена.

Учитывая, что входящие в состав капсулы чумного микроба полисахариды и мукополисахариды, в частности гиалуроновая кислота, хорошо растворяются в воде, мы попытались отдельно получить капсульный и соматический препараты. Для этого микробные тела после смыва их с агаровой среды отделяли центрифугированием и дважды промывали дистиллированной водой. Отмытые клетки и промывные воды отдельно подвергались гидролизу

0,1 N уксусной кислотой, после чего спиртом осаждали полисахаридосодержащие фракции.

Таким образом были получены неочищенные препараты, содержащие полисахарид, из микробных клеток и капсульного вещества штамма ЕВ чумного микроба, выросшего на обычной среде и среде с гликоколом (среде Коробковой). Были исследованы серологические свойства полученных препаратов и определено наличие в них ацетилированного гексозамина (методом Моргана и Эльсона). К сожалению, отсутствие стандартного препарата гексозамина не дало возможности провести количественное определение.

Сравнительные данные, приведенные в табл. 2, показывают, что выращивание штамма ЕВ на среде с гликоколом приводит не только к увеличению общего содержания специфического полисахарида, но и к изменению соотношения между капсульным и соматическим полисахаридами в сторону увеличения первого. Так, отношение капсульного полисахарида к соматическому у штамма ЕВ, выращенного на обычной среде, составляет 32%, а у выращенного на среде с гликоколом—61%. Соматический полисахарид реагирует с противочумной сывороткой в разведении 1:100000 и с противопсевдотуберкулезной в разведении 1:500, в то время как капсульный дает реакцию преципитации с первой в разведении 1:10000 и совсем не реагирует со второй. Таким образом, полисахарид, содержащийся в капсуле чумного микроба, определяет его видоспецифичность.

В работе Бахрах и Дроздовской (1950) отмечалось, что ацетилированный гексозамин содержит в заметных количествах лишь препараты, выделенные из штамма ЕВ чумного микроба, выросшего на среде с гликоколом.

В настоящей работе установлено, что и в препаратах, полученных из культуры чумного микроба, выросшей на обычной среде, также содержится ацетилированный гексозамин, правда, в значительно меньших количествах, чем в препаратах из культуры, выросшей на агаре с гликоколом. Этим и объясняется то, что в предыдущей работе при анализе очень малых количеств полученных препаратов и плохой их очистке гексозамин удавалось ясно обнаруживать лишь в тех препаратах, в которых он содержится в больших количествах.

Таким образом, культура чумного микроба, выросшая на среде с гликоколом и обладающая, по данным Коробковой (1951), Коробковой и Желтенкова (1956), более высокими иммуногенными свойствами, содержит больше ацетилированного глюкозамина, чем обычно. При этом особенно богат им капсульный полисахарид, полученный из указанной культуры. Это вполне соответствует данным работы Коробковой и Бахрах (1951), установивших наличие в капсуле чумного микроба гиалуроновой кислоты — мукополисахарида, состоящего из эквивалентных количеств ацетил-глюкозамина и глюкуроновой кислоты.

Выводы

1. Установлено наличие в чумном микробе двух полисахаридов: один связан с капсулой клетки — оболочечным веществом, другой — с сомой клетки микроба. Оба они отличаются серологически. Полисахарид, входящий в состав тела бактерий, приципитируется противочумной сывороткой, приготовленной путем имму-

низации лошадей живыми культурами в разведении 1:100000 и противопсевдотуберкулезной сывороткой в разведении 1:500. Полисахарид, входящий в состав капсульного вещества чумного микроба, преципитируется первой из этих сывороток в разведении 1:10000 и не реагирует со второй.

2. Химически капсульный полисахарид отличается от соматического большим содержанием ацелированного гексозамина.

3. Специфическая полисахаридосодержащая фракция, выделенная из чумного микроба после соответствующей очистки, содержит меньше 1% золы, около 4% азота, дает отрицательные реакции на белок и слабоположительные — на содержание аминных кислот и полипептидных связей, при гидролизе дает накопление редуцирующих веществ до 40%. Качественными реакциями показано, что в состав полисахарида входят гексозы, уроновые кислоты, ацелированный глюкозамин. После гидролиза полисахарида в 1N H₂SO₄ был получен озазон глюкозы.

ЛИТЕРАТУРА

Бахрах Е. Э. и Дроздовская Ф. К. Выделение специфической полисахаридосодержащей фракции из чумного микроба. Настоящий сборник.

Коробкова Е. И. и Бахрах Е. Э. Фактор распространения в чумном микробе. Сообщение 3. Труды института «Микроб», в. 1, Саратов, 1951.

Коробкова Е. И. и Желтенков А. И. Действие гликокола на чумной микроб. Сообщение 2. Там же, в. 2, 1957.

Коробкова Е. И., Кузнецова В. И., Бахрах Е. Э. и Шалаева А. Ф. О полисахаридном комплексе чумного микроба. Там же, в. 1, 1951.

Коробкова Е. И., Котельников Г. Ф., Урода Л. А. и Быстренин А. И. О полном антигене чумного и псевдотуберкулезного микробов. Журнал микр., эпид. и иммунологии, № 12, 1944.

Girard D., c. R. Soc. Biol., Paris, 135, 1941.

Seal, S. C., Proc. Soc. exp. Biol., № V, 77, 1951,

Davies A. L., Biochem. J. № 63, № 1, 1956.

Е. Э. Бахрах, Ф. К. Дроздовская.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПОЛИСАХАРИДОСОДЕРЖАЩЕЙ ФРАКЦИИ ИЗ ЧУМНОГО МИКРОБА*

Настоящая работа включает в себя опыты по выделению полисахаридосодержащей фракции из чумного микроба разными способами.

Прежде всего была сделана попытка выделить полисахарид из осадка, образующегося при прибавлении к бактериальной массе уксусной кислоты, используя метод, применяемый для выделения мукополисахарида из синовиальной жидкости. К бактериальной взвеси чумного микроба в физрастворе немедленно после смыва добавляли уксусную кислоту в таком количестве, чтобы конечная концентрация ее составляла 1%. Вязкий осадок промывали водой, растворяли в 0,5% растворе соды, затем снова осаждали уксусной кислотой, растворяли в соде и осаждали спиртом, подкисленным уксусной кислотой. Осадок растворяли в 0,5% растворе соды и после установления рН 9 подвергали триптическому перевариванию. Полученный в результате переваривания раствор, уже не дававший преципитации с уксусной кислотой, освобождали от белка добавлением 10-процентной трихлоруксусной кислоты. После фильтрования, диализа, нейтрализации КОН и концентрации под вакуумом до небольшого объема в раствор добавляли 5 объемов спирта и осадок высушивали в вакуум-эксикаторе.

Полученная фракция чумного микроба представляла собой белый порошок, хорошо растворимый в воде; давала резко положительную реакцию Молиша и отрицательные реакции на белок (ксантопротеиновая, реакция Миллона, биуретовая, реакции на осаждение кислотами — пикриновой, трихлоруксусной). Гидролиз выделенного препарата с разведенной серной кислотой дал увеличение количества редуцирующих веществ (определялись методом Хагедорн-Иенсена). При действии солянокислым фенилгидразином получен характерный озазон. Раствор выделенного полисахарида давал реакцию кольцепреципитации с противочумной сывороткой. Все это позволило заключить, что полученный нами препарат содержит специфический полисахарид чумного микроба.

Подобным методом полисахарид был выделен из двух штаммов чумного микроба: вирулентного — 202 и авирулентного — ЕВ,

*) Работа выполнена в 1950 г.

выращенных на среде с гликоколом, предложенной Е. И. Коробковой. Эта среда дает возможность получить культуры чумного микроба с большим содержанием гиалуроновой кислоты.

В процессе наших опытов было отмечено, что для выделения полисахаридосодержащей фракции из чумного микроба должен быть предварительно разрушен комплекс гиалуроновой кислоты с протеином. Это показало параллельно проведенное осаждение уксусной кислотой бактериальной взвеси живой культуры чумного микроба немедленно после смыва той же культуры, но убитой нагреванием при 58°C в течение часа. В первом случае весь полисахарид оказывался в осадке, о чем можно было судить по отрицательной реакции Молиша в фильтрате. Во втором случае значительная часть полисахарида обнаружена в фильтрате. Об этом свидетельствовала резко положительная реакция Молиша, а также и то, что полисахарид чумного микроба был выделен из осадка и из фильтрата.

Подобный же результат был получен и тогда, когда смыв культуры чумного микроба хранился длительное время в холодильнике (2 месяца), что привело к значительному аутолизу клеток. Результаты этих опытов приведены в табл. 1.

Таблица 1
Результаты выделения полисахарида из живой и убитой культур чумного микроба

Штаммы	Предварительная обработка культуры	Реакция Молиша в фильтрате после осаждения белков уксусной кислотой	Результат выделения полисахарида из:	
			осадка	фильтрата
202	Живая культура	Отрицательная	+	—
202	Убитая культура	Резко положительная	+	+
ЕВ, выращенный на среде с гликоколом	Живая культура	Слабо положительная	+	—
Тоже	Убитая культура	Резко положительная	+	+
Тоже	После длительного хранения	Положительная	+	+

Условные обозначения: (+)—полисахарид выделен, (—)—полисахарид не выделен.

По внешнему виду препараты, выделенные из фильтратов и осадков, не различались между собой. Оба они давали те же реакции, которые указаны выше. Очень малые количества их не дали возможности провести более полный анализ.

Несмотря на то, что описанная методика выделения полисахарида чумного микроба из преципитата, полученного в результате прибавления уксусной кислоты, дала положительные результаты, она имела ряд недостатков. Среди них следует отметить длительность процесса, громоздкость и, наконец, неполный гидролиз при триптическом переваривании. Последнее может быть объяснено тем, что перед перевариванием протеинополисахаридный ком-

плекс осаждается спиртом, который неполностью отмывается и в дальнейшем инактивирует фермент.

Поэтому для выделения полисахарида из чумного микроба мы решили использовать и другие методы, прежде всего метод Топли и Райстрика для получения полного антигена. Проводили триптическое переваривание бактерийной взвеси. Перевар освобождали от белков путем осаждения их трихлоруксусной кислотой, а от низко-молекулярных соединений — диализом. Полученный после диализа раствор концентрировали под вакуумом. Полный антиген из этого раствора осаждали спиртом.

Выделенный таким способом из чумного микроба препарат подвергали гидролизу разбавленной уксусной кислотой. Полученный раствор полисахарида отделяли от выпавших в осадок белков фильтрованием, а от липоидов — встряхиванием с эфиром. После диализа и упаривания полисахарид осаждали спиртом.

Используя этот метод, мы выделили препараты из двух культур чумного микроба ЕВ, из которых одна выращивалась на обычной среде, другая — на среде с гликоколом.

Для проведения данного опыта культуру чумного микроба ЕВ засеивали на матрасы с указанными средами и выращивали при одинаковых прочих условиях. После смыва культуры физиологическим раствором учитывали объем каждой бактериальной взвеси и по оптическому стандарту устанавливали концентрацию микробных тел. Обе бактериальные массы подвергали триптическому перевариванию до прекращения накопления аминного азота в переварах, после чего выделяли полисахариды описанным выше методом. Выделенные препараты несколько отличались между собой. Порошок, полученный со среды с гликоколом был более темного цвета и хуже растворялся в воде, давал слегка опалесцирующие вязкие растворы. Было учтено количество выделенного препарата, определено количество редуцирующих сахаров и нарастание их в результате кислотного гидролиза, поставлены качественные реакции на глюкозамин и уроновые кислоты.

Оказалось, что из культуры чумного микроба, выросшей на среде с гликоколом и содержащей большое количество гиалуроновой кислоты, выход препарата значительно больше, чем из этой же культуры, но выросшей на обычной среде. Оба препарата дали отрицательные реакции на белки. Качественная реакция на глюкозамин выявила заметное наличие его только в культуре, полученной со специальной среды. Испытание специфичности выделенных полисахаридов показало, что оба они давали реакцию коагуляции с противочумными сыворотками. Полисахарид, полученный из культуры чумного микроба, выращенной на среде с гликоколом оказался токсичным для белых мышей в дозе 2 мг; препарат, выделенный из обычной культуры, оказался в этих концентрациях для них не токсичным.

Все это позволяет предполагать, что в чумном микробе, наряду с мукополисахаридом-гиалуроновой кислотой, имеется еще один или несколько специфических полисахаридов. Подтверждением сказанному является тот факт, что из культур чумного микроба, не содержащих в заметных количествах гиалуроновой кислоты, удается получить указанным выше методом, специфическую полисахаридо-содержащую фракцию, а также непосредственно выделить ее из

бактерийной взвеси гидролизом уксусной кислотой по методу Уайта.

С этой целью к взвеси чумных микробов в дистиллированной воде добавляли уксусную кислоту в таком количестве, чтобы концентрация ее была 0,1N; смесь нагревали с обратным холодильником 1 час на кипящей водяной бане. Суспензию охлаждали и центрифугировали. После выпаривания жидкости под вакуумом до небольшого объема полисахарид осаждали абсолютным спиртом. Такой метод наиболее прост и удобен для выделения полисахаридосодержащей фракции из чумного микроба.

Сравнительная оценка указанных методов в отношении количества и чистоты полученного препарата, сохранения им в процессе выделения специфических свойств, а также изучение химического состава и природы специфических полисахаридов чумного микроба являются задачей дальнейшей работы.

М. Н. Джапаридзе

ПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЧУМНОГО И ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗНОГО МИКРОБОВ

Настоящее сообщение является результатом исследования пероксидазной активности чумного и псевдотуберкулезного микробов.

Важность биологической роли пероксидазы в живой природе стала очевидной в связи с созданием А. Н. Бахом известной перекисной теории медленного окисления. Основной путь биологического окисления, по современным представлениям, лежит через активирование молекулярного кислорода, либо посредством цитохромной системы, либо оксигеназно-пероксидазной системы Баха. У многих высших растений и микроорганизмов последняя является преобладающей. В настоящее время принимается как общая схема, что у строгих анаэробов пероксидаза отсутствует, у всех же остальных микроорганизмов этот фермент имеется, за редким исключением. Так, пероксидаза не обнаружена у некоторых видов стрептококков и туберкулезного микроба человеческого типа.

В отношении чумного и псевдотуберкулезного микробов ко времени начала нашей работы в литературе имелись указания об отсутствии пероксидазы у этих бактерий, что даже считалось одним из дифференциальных отличий их от туляремийного микроба (Синай, 1940). Учитывая достаточно выраженный аэробный тип дыхания, особенно чумного микроба, и большую роль пероксидазы в биологическом окислении, мы считали необходимым проверить подобное утверждение.

Поэтому нами вначале были поставлены опыты для качественного определения присутствия пероксидазы у 10 штаммов чумного и 10 штаммов псевдотуберкулезного микробов.

Двухсуточную культуру, выращенную на агаре Хоттингера (рН 7,1) при 28°C, смывали физиологическим раствором и микробную взвесь трижды отмывали центрифугированием. С этой бактериальной взвесью проделаны и оказались положительными пробы на присутствие пероксидазы: пурпурмалиновая, с гваяковой смолой и бензидиновая.

Далее нами было изучено влияние специфических для всех пероксидаз ингибиторов — цианистого калия, сероводорода и гидроксиламина — на пероксидазную деятельность исследуемых штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов. Добавление этих

соединений к бактериальной взвеси во всех случаях вызвало угнетение реакции.

Таким образом, чумной и псевдотуберкулезный микробы содержат фермент, окисляющий перекисным кислородом полифенолы, и ароматический амин, действие которого угнетается специфическими ингибиторами пероксидазы. Следовательно, можно считать установленным наличие пероксидазы у этих бактерий.

Определив качественно присутствие пероксидазы у чумного и псевдотуберкулезного микробов, мы перешли к количественному изучению особенностей их пероксидазной активности. В литературе мы не встретили ни одного метода точного измерения активности пероксидазы бактерий. Поэтому для работы был использован с некоторыми изменениями метод Бояркина (1951), предложенный им для растительной пероксидазы. Этот метод основан на электрофотоколориметрическом определении р-хинондиимида, окрашенного в синий цвет соединения, которое образуется из бензидина под действием пероксидазы. Активность фермента высчитывалась по формуле, предложенной автором.

Количественная характеристика активности пероксидазы чумного и псевдотуберкулезного микробов, естественно, обуславливается величиной активности фермента различных штаммов этих бактерий. Учитывая влияние внешней среды на состояние обмена веществ исследуемых микроорганизмов, а следовательно, и на ферментативную деятельность их, мы изучали и сравнивали пероксидазную активность штаммов, выращенных при однородных условиях (обычных в лабораторной практике). Однако, прежде чем перейти к определению величины активности пероксидазы различных штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов, мы установили пределы постоянства этого признака у отдельных штаммов при обычном методе их культивирования.

В опыт были взяты три штамма чумного (ЕВ, 476 и 74) и два штамма псевдотуберкулезного (6 и 2) микробов. Опыты ставили в течение четырех месяцев, 1—2 раза в неделю.

Результаты этих наблюдений показали, что активность пероксидазы штаммов, выращенных в одинаковых условиях, изменяется в небольших пределах (наибольшая относительная ошибка наблюдения 4,6%).

Следовательно, мы могли в дальнейшем сравнивать между собой ряд штаммов микробов обоих видов, выращенных в однородных условиях, и считать найденную величину активности пероксидазы характерной для данного штамма при выбранных условиях.

Результаты определения величины активности пероксидазы 26 штаммов чумного и 30 штаммов псевдотуберкулезного микробов, представленные в табл. 1, показывают, что активность пероксидазы различных штаммов одного вида микроба неодинакова. У чумных микробов величина активности фермента колеблется от $25,5 \cdot 10^{-4}$ до $3,75 \cdot 10^{-4}$, а псевдотуберкулезных—от $5,58 \cdot 10^{-4}$ до 0. Однако у преобладающего большинства штаммов (22 из 26) чумного микроба величина активности пероксидазы выше, чем у псевдотуберкулезного. Если рассчитывать среднюю величину активности пероксидазы для обоих видов микробов, то для первого она составляет $10,51 \cdot 10^{-4}$ для второго—всего лишь $2,27 \cdot 10^{-4}$.

Значительные колебания величины активности пероксидазы у различных штаммов исследованных бактерий являются, по нашему

Таблица 1

Активность пероксидазы чумного и псевдотуберкулезного микробов

Чумной микроб		Псевдотуберкулезный микроб	
№ штамма	Активность пероксидазы $A=0,003$, $E \cdot 10^{-4}$	№ штамма	Активность пероксидазы $A=0,003$, $E \cdot 10^{-4}$
ЕВ	13,00	1	5,22
42	8,49	2	4,47
46	8,38	3	3,57
52	14,85	4	1,74
74(50)	11,86	5	0,88
98	5,17	6	5,58
102	12,23	7	0,72
159	11,31	10	1,38
160	3,93	12	3,24
205	4,33	15	0,54
213	7,92	18	0,81
173	10,86	21	1,53
232	7,44	22	1,30
351	4,85	23	2,01
469	8,49	34	2,07
476	25,50	45	4,56
586	10,41	46	4,29
697	15,69	48	0,42
1	11,01	49	1,52
2	8,04	50	0,96
724	9,70	53	0,00
725	10,56	54	1,08
727	12,10	55	1,15
751	8,49	56	3,66
758	6,90	57	5,64
784	22,35	58	0,66
		67	0,00
		74	5,13
		76	2,28
		66	0,39

Примечание: E—экстинкция опытной смеси в конечный момент реакции (через 5 мин.)

мнению, проявлением непрерывно идущего процесса изменчивости чумного и псевдотуберкулезного микробов под влиянием различных воздействий внешней среды.

Известно, что процесс изменчивости у чумного микроба направлен в сторону его скачкообразного перехода в псевдотуберкулезный. Поэтому естественно было наблюдать внутри вида чумного

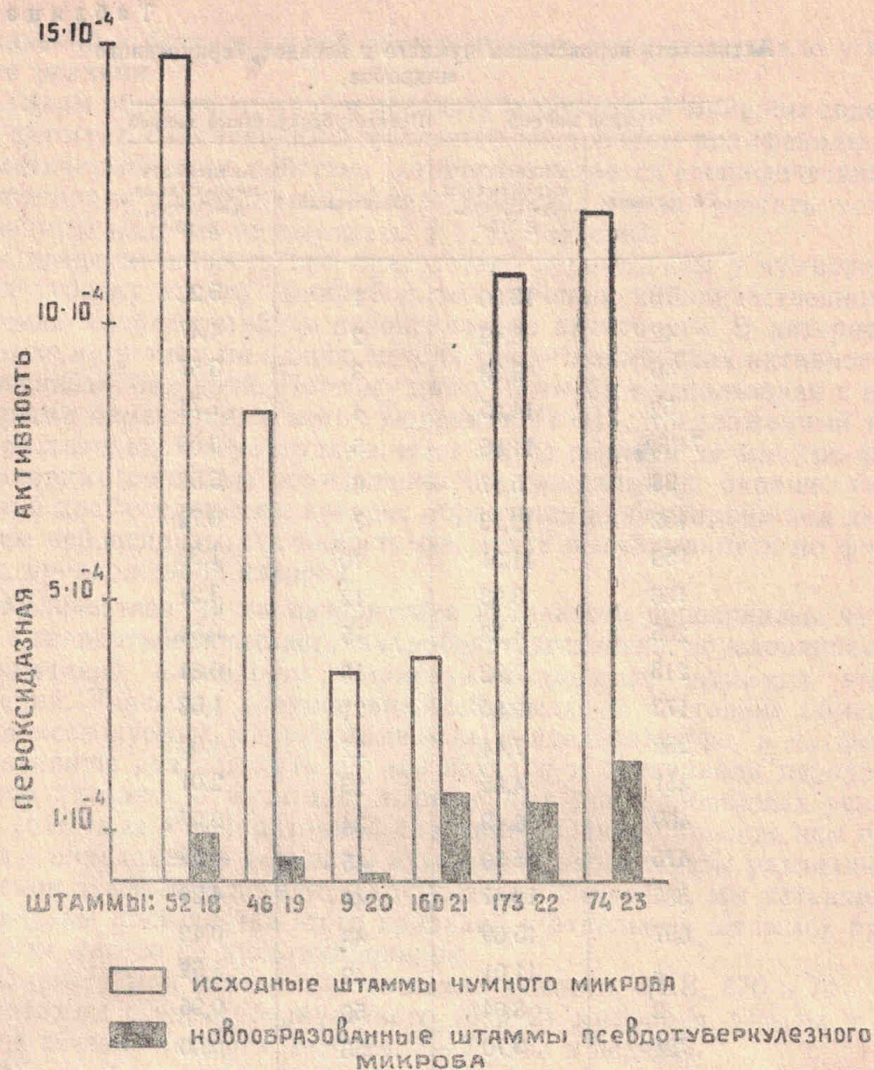


Рис. 1.

микроба постепенные, не решающие количественные изменения ряда признаков, приводящие в конце концов эти штаммы к скачкообразному переходу в другой вид—псевдотуберкулезный микроб. Было установлено (Ленская, 1946), что именно такими количественными изменениями у чумного микроба являются, например, изменения биохимической активности штаммов: различная способность ощелачивать среду Оттена, разлагать рамнозу, глицерин, различная степень редуционных свойств штаммов, уреазной активности. Различная степень проявления признаков сходства чумных штаммов с псевдотуберкулезными объясняется разным этапом непрерывно идущего процесса изменчивости, на котором находится данный штамм. К этой категории признаков относится и высокая пероксидазная активность чумного микроба по сравнению с псевдотуберкулезным.

Особенно наглядно подтвердился неслучайный характер приведенных результатов при параллельном исследовании пероксидазной активности шести штаммов (52, 46, 9, 160, 173, 74) чумного

и шести новообразованных из них штаммов (18, 19, 20, 21, 22, 23) псевдотуберкулезного микробов.

Мы предполагали, что при таком сравнительном изучении наиболее четко выяснится направление, в котором меняется количество фермента у бактерий в процессе межвидовой изменчивости.

Результаты указанных опытов приводятся на рис. 1.

Как видно из этих данных, подтвердилось наше первое наблюдение. В процессе видообразования величина активности пероксидазы во всех случаях значительно снизилась.

Таким образом, в результате исследования можно считать установленным: во-первых, присутствие у чумного и псевдотуберкулезного микробов активной пероксидазы, поддающейся достаточно точному количественному измерению методами, предложенными для пероксидазы высших растений и животных (с некоторой модификацией).

Во-вторых, обнаружено, что активность пероксидазы чумного микроба выше, чем псевдотуберкулезного, то есть, что в процессе эволюции у чумного и псевдотуберкулезного микробов выработались разные соотношения ферментных систем, что в обменных процессах чумного микроба окислительная система А. Н. Баха (пероксидаза является ее компонентом) играет преобладающую роль по сравнению с ее ролью у псевдотуберкулезного микроба.

Использование отличий в пероксидазной активности чумного и псевдотуберкулезного микробов для дифференциально-диагностических целей затрудняется существованием отдельных штаммов *V. pestis* с невысокой активностью фермента. Однако известно, что именно биохимические методы исследования дают возможность уловить первые сдвиги в обмене веществ клетки, которые могут в дальнейшем повлечь за собой глубокие коренные изменения ее признаков. Поэтому метод количественного определения пероксидазы можно применить наряду с другими методами для определения глубины процесса изменчивости чумного и псевдотуберкулезного микробов.

ЛИТЕРАТУРА

- Бояркин А. Н. Биохимия. Т. 16, в. 4, 1951.
Джапаридзе М. Н. «Каталазная и пероксидазная активность чумного и псевдотуберкулезного микробов». Диссертация. Саратов, ин-т «Микроб», 1954.
Ленская Г. Н. Изменчивость чумного микроба. Диссертация. Саратов, ин-т «Микроб», 1946.
Синай Г. Я. Туляремия. В кн. Микробиологические методы исследования при инфекционных заболеваниях, под. ред. Г. Я. Синай и О. Г. Биргера, М., Медгиз, 1949.
-

М. И. Анциферов, Л. И. Носкова

ВЛИЯНИЕ КРОВИ И ЕЕ СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ НА РОСТ БАКТ TULARENSE

Ряд исследователей — Пфейфер (1892), Бернгоф, Грудинская, Саватеев (1936) и другие — доказали стимулирующее действие крови на рост бактерий кишечного-тифозной группы, палочек дифтерии, пневмококков, стрептококков и многих других микроорганизмов.

В работах Бессоновой (1936), Коробковой (1936), Ящук (1939), Сокжея (1939), Туманского (1943), Трифионовой (1953) показано, что кровь в значительной степени повышает «чувствительность» среды к росту чумного микроба.

Известно много работ, в которых рассматриваются вопросы влияния крови на рост чумного микроба. Но исследований о значении крови для выращивания туляремийного микроба крайне мало. Между тем туляремийный микроб имеет некоторые сходные с чумным микробом признаки.

Возбудитель туляремии, так же как и чумной микроб, в организме восприимчивого животного быстро распространяется по лимфатическим и кровеносным сосудам, усиленно размножается в некоторых внутренних органах, в крови и вызывает гибель животного. Являясь ярко выраженным паразитом, туляремийный микроб обладает слабой ферментативной активностью и поэтому чрезвычайно требователен к питательному субстрату.

Организм восприимчивого к туляремии животного является, таким образом, естественной, биологической средой для туляремийного микроба и обеспечивает существование его как вида в природе.

Исследованиями Френсиса (1923), Вольферц (1927, 1935), Хатеневера (1942, 1943), Емельяновой (1951), Даунс и Бонд (1935), Тамура и Джибби (1943), Олли (1953) и других доказана исключительно важная роль цистина в культивации возбудителя туляремии.

По данным Астанина (1947), цистин, эта незаменимая аминокислота для роста туляремийного микроба, содержится, помимо тканей животного, также и в белках крови.

Отсюда, естественно, возникла мысль использовать кровь в качестве одного из компонентов питательной среды для улучшения роста туляремийного микроба.

В 1923 г. Френсис предложил для выращивания туляремийного микроба цистиновый агар с кровью, который по мнению зарубежных исследователей считается наилучшей питательной средой для обычной культивации *V. tularensis*.

Веренинова (1938), Миллер (1935), Дорофеев (1954), Емельянова (1951) также использовали кровь или сыворотку крови как составную часть питательной среды для улучшения роста туляремийного микроба.

Из литературных данных видно, что кровь улучшает качество питательной среды, повышает ее «чувствительность» к росту туляремийного микроба; тем не менее среды с кровью не получили широкого применения в бактериологической работе с возбудителем туляремии.

Следует указать, что вопрос о влиянии крови на рост туляремийного микроба, по существу, совершенно не изучен как с теоретической, так и с практической точек зрения. Для бактериологической практики важно знать оптимальное содержание крови в среде для получения на ней роста туляремийного микроба. В литературе мы не встретили работ, посвященных выяснению этого вопроса. Указания отдельных авторов о добавлении к среде 5—10% крови являются произвольными и не отражают оптимальных соотношений между средой и количеством крови в ней. Вероятно, оптимальное процентное содержание крови одного и того же вида животного будет находиться в зависимости от состава питательной среды; чем полноценнее среда, тем меньший процент крови создаст благоприятные условия для роста микроба туляремии.

Изучение влияния крови восприимчивых и резистентных видов животных на рост и сохранение биологических свойств туляремийного микроба имеет практическое значение и теоретический интерес. Несмотря на это, специальных исследований в этом направлении не проводилось. Следовательно, роль крови различных видов животных и человека в питании туляремийного микроба остается не изученной.

Кровь, как известно, имеет сложный состав. Априори можно утверждать, что не все компоненты крови равнозначны по своему влиянию на рост туляремийного микроба, а выяснение их роли имеет важное значение как для рационального конструирования питательных сред, так и для познания процессов обмена у туляремийного микроба.

Исходя из этого, мы поставили перед собой задачу — изучить влияние крови человека и животных, восприимчивых и резистентных к туляремийной инфекции, и ее составных частей на рост туляремийного микроба.

Для выяснения стимулирующего действия крови животных и человека на рост *V. tularensis* нами была испытана дефибринированная кровь человека, морской свинки, кролика, барана, лошади и собаки, а из составных частей крови изучалось влияние неотмытых и отмытых эритроцитов, сыворотки и безбелкового фильтрата сыворотки.

Методика и результаты исследований

Кровь для опытов бралась стерильно у человека из *V. mediana cubiti*, у морской свинки и кролика — из сердца (без тотального кро-

вопускания), у лошади и барана — из *V. jugularis externa* и у собаки — из сердца при тотальном кровоупускании.

Взятая кровь дефибрировалась путем встряхивания в дефибринаторе в течение 15 минут. Затем часть дефибрированной крови мы использовали для приготовления питательных сред, а из другой части получали эритроциты, сыворотку и безбелковый фильтрат сыворотки следующим образом: в стерильные центрофужные пробирки разливалась стерильно дефибрированная кровь и центрифугировалась 20 минут при 2800 оборотах в минуту, при этом сыворотка отделялась от эритроцитов.

Часть эритроцитов промывалась стерильным физиологическим раствором 7—9 раз до получения бесцветных промывных вод. Полученные таким способом неотмытые и отмытые эритроциты использовались для приготовления питательных сред.

Сыворотка делилась на 2 части, одну из которых добавляли к питательным средам, а из другой получали безбелковый фильтрат. Для получения последнего сыворотку разбавляли равным объемом физиологического раствора, подкисляли уксусной кислотой до слабо кислой реакции и нагревали в кипящей водяной бане в течение 20 минут.

Выпавший осадок отфильтровывали через бумажный фильтр, а затем пропускали через стерильный фильтр Зейтца. Приготовленный безбелковый фильтрат сыворотки использовали для добавления к питательной среде.

Составные части крови получались нами по методике, описанной Трифионовой (1953).

В качестве основы для приготовления сред с кровью и ее составными частями мы использовали агар Ухалова-Михалевой, на котором туляремийный микроб вырастает только от больших посевных доз. Контролем служил агар Ухалова-Михалевой без добавления крови и ее дериватов.

Питательные среды готовились следующим образом: к растопленному и охлажденному до 45—50° агару добавляли дефибрированную кровь (указанных видов животных и человека) в количестве 1%, а эритроциты, сыворотку и безбелковый фильтрат сыворотки — в количестве 0,5%. Колориметрическим методом Михаэлиса устанавливался рН=7,2—7,25. Среда разливалась в пробирки, скашивались и контролировались на стерильность. После этого среды засеивались 2-суточной культурой туляремийного микроба. Во всех опытах применялся вирулентный штамм *B. tularensis* 924.

Посевное число в наших опытах составляло от 1 микробного тела до 1 млрд. микробных тел. Каждая посевная доза засеивалась на 3 пробирки в объеме по 0,5 мл в каждую пробирку. Посевы указанными дозами на среды повторялись 3 раза. Пробирки с посевами помещались в термостат при 37° и выдерживались в течение 10 суток; ежедневно регистрировались результаты роста.

Пользуясь описанной методикой для изучения роли крови и ее составных частей на рост туляремийного микроба, мы поставили 18 опытов, сводные результаты которых представлены на рисунках 1—6. Все данные, приведенные на рисунках, представляют среднее из 3-х повторных посевов.

На рис. 1 приводятся результаты опытов по изучению влияния крови человека на рост туляремийного микроба.

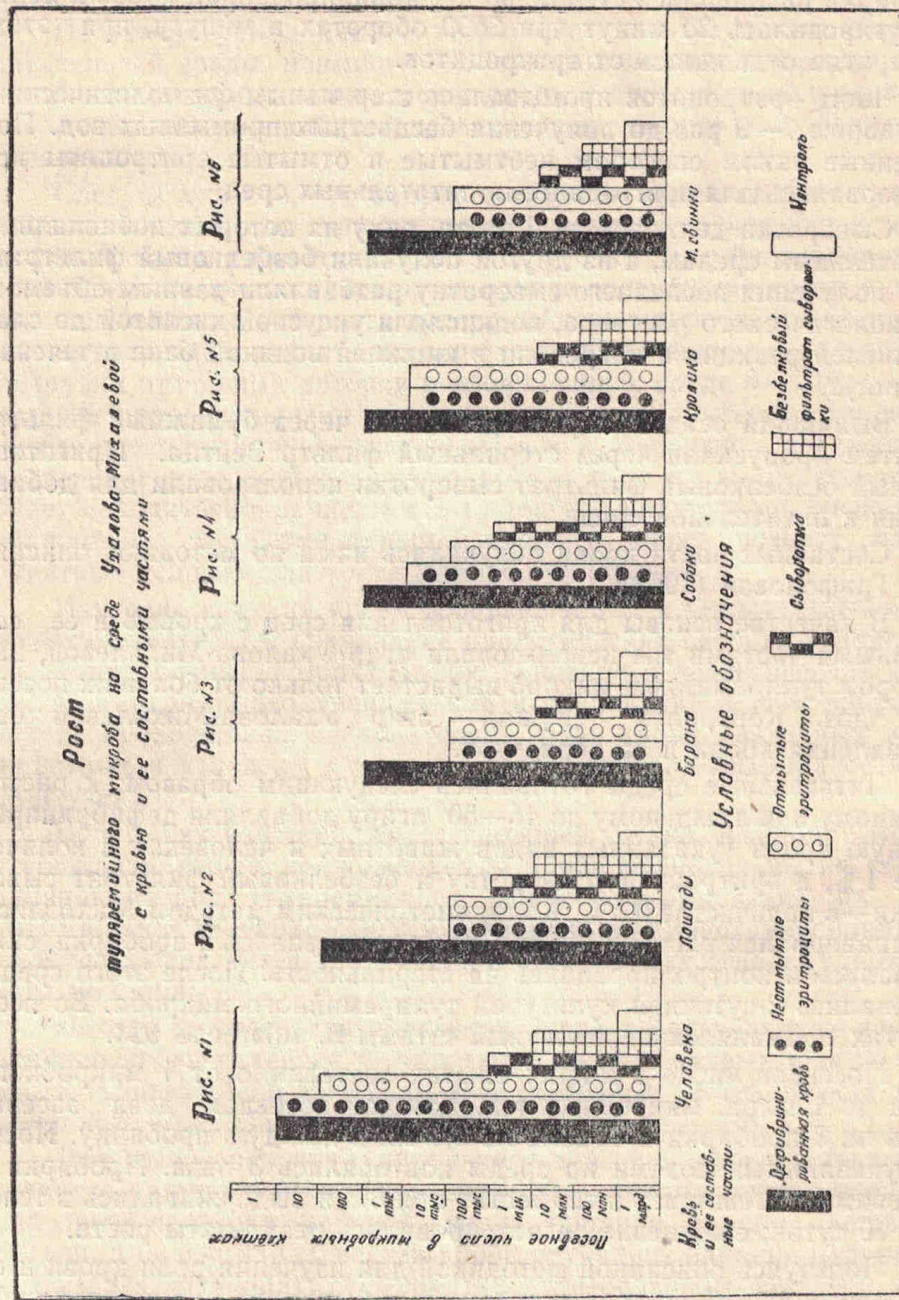


Рис. 1.

Из рис. 1 видно, что внесение в среду 1% дефибринированной крови человека, а также 0,5% неотмытых и отмытых эритроцитов резко повышает ее «чувствительность» к росту туляремийного микроба; при этом минимальное посевное число (от которого получен рост) было равным 10 микробам, тогда как в контроле рост получен лишь от 1 млрд. микробных тел. Следовательно, «чувствительность» среды при добавлении к ней дефибринированной крови, неотмытых и отмытых эритроцитов оказалась весьма высокой, рост на среде с этими ингредиентами появлялся от посевных доз, в 100—10 млн. раз меньших, чем на контрольной среде.

На среде с 0,5% сыворотки крови человека туляремийный микроб давал рост от посевной дозы в 1 млн. микробных тел, тогда как на контрольной среде рост получен от посевного числа в 1 млрд. микробных тел.

Безбелковый фильтрат сыворотки крови человека оказывает незначительное влияние на рост туляремийного микроба. На среде с 0,5% безбелкового фильтрата сыворотки рост получен при посеве 10 млн. микробных тел.

Таким образом, кровь человека и ее составные части по степени положительного действия на рост туляремийного микроба можно расположить в следующем порядке: дефибринированная кровь, неотмытые и отмытые эритроциты, сыворотка, безбелковый фильтрат сыворотки.

Результаты экспериментов показывают, что по степени влияния на рост туляремийного микроба лошадиная кровь и ее составные части располагаются в таком же порядке (см. рис. 2). Лучший эффект получен в том случае, когда в среду вносилась дефибринированная кровь. При этом рост наступал от посевной дозы в 100 микробных тел, тогда как на контрольной среде минимальное посевное число составляло 1 млрд. микробов.

Следовательно, на среде с добавлением дефибринированной крови лошади рост туляремийного микроба наблюдался от посевного числа, в 10 млн. раз меньшего, чем на среде без добавления крови. Влияние отмытых и неотмытых эритроцитов лошади было одинаковым.

Рост на средах с отмытыми и неотмытыми эритроцитами лошади появлялся от одной и той же посевной дозы — 100 тыс. микробных тел, что в 1 тысячу раз меньше, чем на контрольной среде.

Сыворотка крови лошади тоже оказывает стимулирующее влияние, но менее выраженное по сравнению с кровью или эритроцитами.

На среде с сывороткой рост туляремийного микроба наблюдался при посеве 1 млн. микробных тел, т. е. от посевной дозы в 100 раз меньшей, чем в контроле.

На среде с безбелковым фильтратом сыворотки рост микроба туляремии получен от посевной дозы в 10 млн. микробных тел.

Данные о влиянии крови барана и ее составных частей на рост туляремийного микроба представлены на рис. 3.

Они показывают, что степень стимулирующего действия крови и ее составных частей не равнозначна. Лучший эффект получен на среде с дефибринированной кровью; при этом рост наблюдался от посевной дозы в 1 тыс. микробных тел, т. е. от посевного числа, в 1 млн. раз меньшего, чем на контрольной среде.

Эритроциты барана, бесспорно, оказывают положительное влияние на рост микроба. Степень их действия оказалась одинаковой, а именно: на среде с отмытыми и неотмытыми эритроцитами туляремийный микроб вырастал от посевной дозы в 100 тыс. микробных тел; по сравнению с контрольной средой для получения роста на среде с эритроцитами требовалась посевная доза в 1 тыс. раз меньшая. Сыворотка крови барана при добавлении к питательной среде повышает ее «чувствительность», благодаря чему рост получался от посевной дозы в 10 млн. микробных тел. Посевное число на среде с сывороткой барана в 100 раз меньше, чем в контроле. Безбелковый фильтрат сыворотки оказывает незначительное влияние на рост туляремийного микроба; при посеве на среду с безбелковым фильтратом посевное число по сравнению с контролем уменьшается в 10 раз.

Итак, кровь барана и ее составные части по своим стимулирующим свойствам располагаются в том же порядке, что и кровь человека и лошади.

На рис. 4 приводятся данные о влиянии крови собаки и ее составных частей на рост туляремийного микроба. Минимальное посевное число на среде с дефибринированной кровью составляло 1 тыс. микробных тел и было в 1 млн. раз меньше посевной дозы на контрольной среде. Туляремийный микроб на среде с неотмытыми эритроцитами вырастал от 10 тыс., а с отмытыми эритроцитами от 100 тыс. микробных тел, т. е. посевное число было в 1—10 тыс. раз меньше, чем на контрольной среде.

Сыворотка крови собаки по своему стимулирующему действию уступает дефибринированной крови и эритроцитам, но и она дает определенный положительный эффект. Для получения роста на среде с сывороткой требуется посевная доза в 100 раз меньшая, чем на контрольной среде.

Безбелковый фильтрат сыворотки на повышение «чувствительности» среды к росту туляремийного микроба существенного влияния не оказывает.

Таким образом, и в данном случае кровь и ее составные части по степени стимулирующего действия располагаются так: дефибринированная кровь, неотмытые и отмытые эритроциты, сыворотка, безбелковый фильтрат сыворотки.

Данные о влиянии крови кролика на рост туляремийного микроба (см. рис. 5) позволяют считать, что общая картина роста туляремийного микроба на средах с кровью кролика и ее составными частями аналогична росту на средах с кровью различных животных, ранее исследованных.

То же можно сказать о крови морской свинки и ее составных частях (см. рис. 6). В итоге изучения влияния крови и составных частей крови человека и животных на рост туляремийного микроба мы приходим к следующему заключению.

Общая картина роста туляремийного микроба на среде Ухалова-Михалева, к которой добавлялась дефибринированная кровь и ее составные части от человека и различных видов животных, качественно одинакова.

На первом месте по «чувствительности» к росту туляремийного микроба стоят среды с дефибринированной кровью, затем среды с неотмытыми и отмытыми эритроцитами, далее среды с сывороткой и безбелковым ее фильтратом.

Анализ стимулирующего действия крови (и ее составных частей) человека и животных на рост микроба туляремии показывает одну общую закономерность, а именно: степень стимулирующего влияния дефибрированной крови человека и животных оказалась почти одинаковой (рост наблюдался от минимальной посевной дозы в 10—1000 микробных тел), то же относится к влиянию неотмытых и отмытых эритроцитов и сыворотки. Безбелковый фильтрат сыворотки существенного влияния на рост туляремийного микроба не оказывает.

Таким образом, видно, что на среде Ухалова-Михалевой, к которой добавлялась кровь или ее составные части от человека и различных видов животных, — величина минимального посевного числа почти не зависит от вида животного, кровь которого прибавлялась к агару.

Туляремийный микроб для своего роста использует в одинаковой степени как кровь человека и восприимчивых к туляремийной инфекции видов животных (морская свинка, кролик), так и кровь устойчивых к данной инфекции видов (баран, лошадь, собака). Следовательно, видовые различия крови существенного влияния на рост туляремийного микроба не оказывают.

Одновременно с изучением стимулирующего действия крови и составных частей крови человека и животных на рост туляремийного микроба нами проведено наблюдение за сроками появления роста на испытываемых средах.

Результаты этих наблюдений отчетливо показывают зависимость между сроками появления роста и величиной посевной дозы, а именно: чем больше посевная доза вносилась, тем быстрее наступал рост, независимо от видового состава крови, вносимой в питательную среду.

Как правило, при посеве на среды с дефибрированной кровью человека и животных больших посевных доз (1 млрд., 100 млн. микробных тел) рост наступал на 2—3 сутки, тогда как при уменьшении посевной дозы (1 тыс. микробов) сроки появления роста удлинялись до 4—6 суток.

Подобная же закономерность в сроках наступления роста наблюдалась и на средах с составными частями крови человека и животных, однако на некоторых из этих сред рост наступал в более отдаленные сроки, чем на средах с дефибрированной кровью.

Так, на среде с безбелковым фильтратом сыворотки человека, с сывороткой и ее безбелковым фильтратом морской свинки, безбелковым фильтратом сыворотки кролика, лошади и собаки при посеве 1 млрд. микробных тел появление роста отмечалось в сроки от 4 до 5 суток.

На контрольной среде (агар Ухалова-Михалевой) туляремийный микроб вырастал на 4—5 сутки от посевной дозы в 1 млрд. микробных тел.

В предыдущих опытах было выяснено равнозначное стимулирующее действие крови человека и животных на рост туляремийного микроба.

Анализ полученных данных показывает, что сроки появления роста на средах с кровью и ее дериватами также не зависят от видового состава крови, а определяются величиной посевного числа микробных тел.

Выводы

1. Общая картина роста туляремийного микроба на агаре Ухалова—Михалевой с кровью или ее отдельными составными частями качественно одинакова и не зависит от вида животного, кровь которого добавлена к питательной среде. По стимулирующему действию на рост туляремийного микроба кровь и ее составные части располагаются в следующем порядке: дефибринированная кровь, неотмытые и отмытые эритроциты, сыворотка и безбелковый фильтрат сыворотки.

2. Добавление к агару Ухалова—Михалевой дефибринированной крови человека, морской свинки, кролика, барана, лошади и собаки улучшает качество среды, резко повышает ее «чувствительность» к росту туляремийного микроба. Минимальное посевное число, от которого получается рост на средах с кровью, в 1 млн. — 100 млн. раз меньше, чем на среде без добавления крови.

3. Лучшее стимулирующее влияние на рост туляремийного микроба нами наблюдалось при добавлении к среде дефибринированной крови человека, затем лошади; тождественные между собой результаты получены при внесении в среду дефибринированной крови морской свинки, кролика, барана и собаки. Однако резкой разницы в стимулирующем влиянии крови человека и животных на рост *B. tularensis* не наблюдалось; следовательно, различная видовая принадлежность крови по своему действию является равнозначной.

Кровь человека и восприимчивых к туляремийной инфекции видов животных (морская свинка, кролик), равно как и кровь резистентных видов (баран, лошадь, собака), оказывает почти идентичное влияние на рост туляремийного микроба.

4. Из составных частей крови лучший рост *B. tularensis* наблюдался на средах с эритроцитами (отмытыми и неотмытыми), но их влияние менее эффективно по сравнению с кровью. Минимальное посевное число на этих средах было в 10—100 тыс. раз меньше по сравнению с контрольной средой.

Сыворотка крови человека и животных, особенно безбелковый фильтрат сыворотки, оказывают слабое влияние на рост туляремийного микроба.

Закономерность тождественного влияния на рост *B. tularensis* крови животных, восприимчивых и устойчивых к туляремийной инфекции, остается в силе и при испытании стимулирующего действия эритроцитов, сыворотки и безбелкового фильтрата сыворотки человека и животных.

5. Добавление к среде Ухалова-Михалевой 1% дефибринированной крови человека или морской свинки, кролика, барана, лошади, собаки позволяет получить диагностическую среду для выращивания туляремийного микроба и использовать ее в практике бактериологических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- П. П. Астанин. Биохимия. Огиз-Сельхозгиз, М.-Л., 1947.
А. А. Бессонова. Метод получения переходного шероховатых (OR) вариантов *B. pestis*. Вестн. микр., эпид. и паразитологии, т. XV, в. 2, 1936.

- Р. Г. Бернгоф, Е. Г. Грудинская, А. И. Саватеев. Среда Филдса для выращивания *Haemophilus influenzae*. Вестник микр., эпид. и паразитологии, т. XV, в. 3—4, 1936.
- А. А. Вольферц. Туляремия (обзор). Вестн. микр., эпид. и паразитологии, т. VI, в. 1, 1927.
- А. А. Вольферц. Туляремия (обзор). Вестн. микр., эпид. и паразитологии, т. XIV, в. 2, 1935.
- Н. К. Веренинова. К культуральной характеристике *B. tularensis*. Вестн. микр., эпид. и паразитологии, т. XVII, в. 12, 1938.
- К. А. Дорофеев. Туляремия животных. Сельхозгиз, 1951.
- Downs and Bond. Studies of the cultural characteristics of *pasteurella tularensis*. Journ. Bact., v. 30, № 5, 1935.
- О. Е. Емельянова. Микробиология туляремии. Издательство АМН СССР, М., 1951.
- Е. И. Коробкова. К биологии *Pasteurella pestis* 1. Жизнеспособность, вирулентность и вариабильность *b. pestis* при длительном их хранении без посева на искусственных питательных средах. II. Вариабильность чумных культур после длительного их хранения без посева. Вестн. микр., эпид. и паразитологии, т. XV, в. 2, 1936.
- А. А. Миллер. Туляремия и новое в ее эпидемиологии. Советская врачебная газета, № 8, 1935.
- В. Д. Олли. Культивирование туляремийного микроба на искусственных питательных средах. Диссертация. Саратов, ин-т «Микроб», 1953.
- R. Pfeiffer. Zschr. Hyg., 13, 357, 1892.
- S. S. Sokhev. Experimental studies in plague. The Indian Journ of Medical, Res., v. 27, № 2, 1939.
- В. М. Туманский. Микробиология чумы. Диссертация (рукопись). Саратов, ин-т «Микроб», 1943.
- А. А. Трифонова. Роль составных частей крови различных видов животных в питании чумного микроба. Диссертация, институт «Микроб», Саратов, 1953.
- Tamura and Gibby. Cultivation of *Bact. tularensis* in Simplified liquid media. Journ. Bact., v. 45, № 4, 1943.
- E. Francis. The amino-acid cystine in the cultivation of *Bact. tularensis*. Public Health Reports, v. 38, № 25, 1923.
- Л. М. Хатеневер. Туляремия и ее профилактика. Медгиз, 1942.
- Туляремийная инфекция, под. ред. Л. М. Хатеневера. Медгиз, 1953.
- А. П. Ящук. Подбор оптимальных сред для выращивания *b. pestis*. Среда Филдса и ее применение. Вестн. микр., эпид. и паразитологии, т. XVIII, в. 1—2, 1939.

И. В. Домарадский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ ЧУМНОГО МИКРОБА

Биохимия патогенных микробов, в частности их обмен веществ, изучен еще очень слабо. В наибольшей мере сказанное относится к возбудителям особо опасных инфекций.

До недавнего времени нам были известны лишь те стороны обмена веществ чумного микроба, которые обычно привлекали внимание бактериологов и могли использоваться ими для чисто практических целей (дифференциальная диагностика, получение вакцин, конструирование питательных сред и т. д.). Только за последние годы стали появляться единичные сообщения об исследовании отдельных сторон питания и метаболизма чумного микроба.

Полученный материал требует соответствующего анализа и обобщения. Однако в доступной нам литературе мы не смогли найти ни одной более или менее полной сводки по биохимии чумного микроба. Даже в таких больших руководствах по чуме, как книги Поллитцера (1954) или Туманского (1948), эти разделы представлены очень кратко.

Последний, очень неполный обзор, составленный без учета данных мировой литературы, был опубликован Ивановским еще в 1951 г. (а).

В настоящей статье, помимо литературных источников, использованы данные автора и сотрудников биохимического отдела института микробиологии и эпидемиологии Юго-Востока СССР («Микроб»).

Чумной микроб является факультативным анаэробом. Отношение чумного микроба к кислороду служило предметом многочисленных исследований. Тем не менее, отмеченная рядом авторов противоположность между положительным влиянием аэробных условий на рост чумного микроба в жидких средах и необходимостью пониженного атмосферного давления для роста на твердых средах, при небольшой посевной дозе и в отсутствие крови, гемина или восстановителей, не нашла еще исчерпывающего объяснения. В жидких средах чумной микроб хорошо развивается при нормальном напряжении кислорода, соответствующем содержанию его в атмосферном воздухе (Жирар, Нель, Шевелье, 1946). При аэрации, осуше-

ствляемой путем непрерывного встряхивания культур или путем продувания стерильного воздуха, выход микробных тел увеличивается (Смитс и Филлипс, 1943; Дэвинья и Шетт, 1942). Последнее является следствием насыщения среды кислородом, так как встряхивание культур в разреженном пространстве или пропускание пузырьков азота не улучшает роста (Дэвинья и Шетт, 1942).

На твердых средах при парциальном давлении кислорода, превышающем в отсутствие крови или восстановителей 1% (Райт, 1934), микробы быстро погибают. Аналогичные данные о положительном влиянии пониженного напряжения кислорода на аэробный рост чумного микроба на твердых синтетических средах получены Роккенмахером, Джемсом и Эльбергом (1952).

Так или иначе, но в аэробных условиях небольшие посевные дозы микроба на твердой среде не дают того количества колоний, которое получается с жидких сред (Дреннан и Тиг, 1917; Самсонов, 1935; Мейер и Бетчельдер, 1928; Шютце и Хассанеин, 1929; Райт 1934; Сокхей, 1939; Герберт, 1949).

Причины, обуславливающие различия в поведении микробов чумы на жидких и твердых средах, в значительной мере вскрыты Бахрах.

Оптимальный уровень окислительно-восстановительного потенциала для начала роста чумного микроба лежит около — 100mv при pH 7,1—7,2 (Бахрах и Шушерова, 1951). Таким образом, способность чумного микроба произрастать на искусственных средах, при прочих равных условиях, определяется окислительно-восстановительным состоянием среды (уровнем Eh и окислительно-восстановительной емкостью). Для начала роста культуры на твердых средах из единичных клеток необходимо добавление восстановителей, например, сульфита натрия или пониженное парциальное давление кислорода; при отсутствии указанных условий требуется значительная посевная доза микроба, способная снизить окислительно-восстановительный потенциал среды до нужной величины. По данным Бахрах (1950, 1951), Бахрах и Башевой (1951), при выращивании чумного микроба (штамма ЕВ) на бульоне Хоттингера снижение потенциала с $rH=21-26$ до $rH=8-10$ отмечается через 24 часа при посеве 10^8 микробных тел. При уменьшении концентрации посевного материала указанный уровень потенциала достигается только на 2—3 сутки; соответственно этому задерживается рост чумного микроба.

Согласно данным Ивановского и Башевой (1951a), чумной микроб при росте на средах, даже не содержащих углеводов, образует редуцирующие вещества (0,03% в пересчете на глюкозу). То же было показано Коробковой (1929).

Среди веществ, которые восстанавливаются чумным микробом, особо следует отметить нитраты (Коновалова, 1930; Савино, Альдао и Анчесар, 1939; Туманский, 1946; Дэвинья, 1951; Урюпина, 1953).

В качестве донаторов водорода могут выступать глюкоза, аланин и кислоты: глутаминовая, пировиноградная, молочная, яблочная и янтарная.

Дегидразная активность чумного микроба меняется в зависимости от методов их выращивания: а) максимальная скорость восстановления метиленовой сини в присутствии всех субстратов отмечается в культурах, выращенных на агаре или на бульоне при аэрации; б) анаэробные условия культивирования приводят к подавлению дегидразной активности; в) дегидразная активность рез-

ко снижается (или отсутствует совсем) у бактерий, выращенных на средах, содержащих 1% глюкозы (Домарадский, Бунтин и Захарова, 1958).

Как представитель факультативных анаэробов чумной микроб обладает каталазой и пероксидазой. При неизменных, обычных для лаборатории условиях существования чумного микроба величина каталазной и пероксидазной активности является достаточно постоянным признаком. Однако, как и в случае с дегидразами, она меняется с переменной кислородного режима среды. Так, например, выращивание штаммов чумного микроба в относительно анаэробных условиях вызывает уменьшение активности каталазы на 43—53%, а пероксидазы—86—98%.

Оптимум действия для каталазы наблюдается при нейтральной реакции среды, для пероксидазы — при щелочной (рН 8,2).

Скорость реакции разложения перекиси водорода прямо пропорциональна концентрации каталазы. Аналогичная зависимость наблюдается между активностью пероксидазы и концентрацией полифенола или H_2O_2 . Специфические для всех каталаз и пероксидаз ингибиторы подавляют активность соответствующих ферментов чумного микроба (Джапаридзе, 1953).

Чумной микроб не обладает протеолитическими свойствами. Он не разжижает желатины и свернутой сыворотки. Наличие внеклеточных протеаз не удалось установить и в опытах с отмытыми или неотмытыми суспензиями клеток, при использовании в качестве субстрата яичного белка (Домарадский, 1955).

По данным Быстренина, Липатовой и Хворостухиной (1937), интенсивность роста чумного микроба зависит от содержания в питательной среде продуктов гидролитического распада белков. Чем больше относительное количество продуктов гидролитического распада, тем обильнее рост. Подобные же результаты получены Бахрах, Крайновой и Михайловой (1951), а также Трифионовой (1953).

Столь же слабо выражена гидролитическая способность чумного микроба в отношении крахмала, гликогена и инулина (Туманский, 1946; Савино, Альдао и Анчесар, 1939; Вурлу, 1908 и др.). Им не ферментируется также сахароза, лактоза (очень слабо), трегалоза, и лишь мальтоза используется достаточно интенсивно.

Механизм использования полисахаридов (в тех случаях, когда оно имеет место) или ферментируемых дисахаров детально не изучен. Однако на основании работ Кагана, Ляткера и Цфасмана (1942), Табакова (1948) и др. можно предполагать участие в этом процессе не только гидролитических энзимов, но и фосфорилаз.

Своеобразное отношение чумного микроба к сложно-построенным соединениям — белкам, полипептидам, полисахаридам, наблюдаемое в опытах *in vitro*, является, по-видимому, следствием приспособления его к условиям существования в организме животных и их эктопаразитов.

Из числа моносахаридов, содержащих в своем составе шесть атомов углерода, чумной микроб, помимо глюкозы, легко окисляет галактозу, маннозу, фруктозу, сорбозу, а из пентоз — ксилозу.

После того, как Безсонова (1929) предложила среду с рамнозой для дифференциальной диагностики микробов чумы и псевдотуберкулеза, вопрос об отношении первого микроорганизма к этой пентозе явился предметом многочисленных исследований (Бончи-

нелли и Арадас, 1933; Коробкова, 1936; Берлин и Борзенков, 1938; Туманский, 1939; Ленская 1946; Урюпина, 1953; Крайнова, 1939).

Анализируя имеющиеся в литературе данные, а также собственные наблюдения, Ивановский и Башева (1951б) пришли к выводу, что чумной микроб обладает способностью разлагать рамнозу, причем это свойство является его видовым признаком, который в процессе адаптации микроба значительно усиливается и становится легко обнаруживаемым с помощью методики, обычно применяемой в бактериологии.

Одно—двух—четырёх—и пятиатомные спирты чумным микробом не окисляются. Исключение составляют маннит, сорбит и дульцит, генетически близкие к гексозам.

Особый интерес представляет отношение чумного микроба к глицерину. Как известно, по этому признаку различают две разновидности чумного микроба — глицеринонегативную и глицеринопозитивную.

В подавляющем большинстве случаев глицеринонегативные варианты выделяются в тех районах, где хранителями чумы являются крысы и их блохи («океанические» штаммы). Чаще всего они встречаются в районах тропической Африки и Юго-Восточной Азии.

Глицеринопозитивные варианты чумного микроба обычно выделяются от сусликов, сурков и песчанок (и их блох). В связи с этим распространение глицеринопозитивной разновидности связано географически с ареалом указанных видов грызунов («континентальные» штаммы).

Таким образом, отношение чумного микроба к глицерину до известной степени характеризует происхождение штаммов.

Надо отметить также, что «океанические» штаммы отличаются от «континентальных» не только отношением к глицерину. Они характеризуются несколько иной антигенной структурой, очень редко ферментируют рамнозу и среди них чаще встречаются уреазонегативные варианты; «океанические» штаммы более требовательны к набору питательных веществ (в частности, аминокислот).

Внешняя среда контролирует и обуславливает определенный тип обмена веществ микробной клетки. Для чумного микроба внешней средой является организм грызуна или блохи, в которых он паразитирует. Естественно поэтому, что многие исследователи пытались объяснить причину («генез») появления глицеринопозитивных штаммов, исходя из особенностей метаболизма их козяина. Теория Туманского (1951), например, объясняет появление у чумного микроба способности разлагать глицерин временным пребыванием его в организме зимоспящих грызунов, которые играют большую роль в поддержании очаговости чумы в ряде районов СССР, Монголии и Китая.

К моменту залегания в спячку в организме грызунов откладывается большое количество жира. В результате утилизации макроорганизмом жира в качестве промежуточного продукта его распада образуется глицерин. Если в этот период чумной микроб попадает в организм грызуна, он длительное время сохраняется в среде, богатой глицерином и приобретает способность его ферментировать.

Однако теория Туманского имеет два больших недостатка. Во-первых, она не объясняет причины сохранения у чумного микроба способности к ферментации глицерина в тех случаях, когда он через посредство блохи (или в экспериментальных условиях) попа-

дает в организм незимоспящих грызунов. Во-вторых, согласно нашим данным, у всех штаммов чумного микроба отсутствует липаза, поэтому даже в организме спящего грызуна он может использовать только глицерин, образующийся в результате деятельности ферментов самого хозяина. Но трудно предположить, чтобы в организме спящего грызуна концентрация глицерина была намного выше той, которая имеется в активный период жизни животного или у незимоспящего грызуна.

Несколько иначе к решению вопроса подходит Ивановский (1951б). Он считает, что отношение чумного микроба к глицерину зависит от типа дыхания грызуна-носителя. Спячка грызуна сопровождается (или обуславливается) снижением интенсивности обмена веществ. Возникает явление гипоксии. Следовательно, чумной микроб в организме спящего грызуна находится в условиях недостаточного притока кислорода. Результатом этого является повышение «активности броидильных процессов», в том числе и в отношении к глицерину. В организме незимоспящих грызунов, интенсивно дышащих, чумной микроб, по мнению Ивановского, отличается более аэробным типом дыхания и пониженной броидильной активностью; отсюда неспособность его ферментировать глицерин.

Теория Ивановского также не дает ответа на вопрос о причине наличия у чумного микроба способности разлагать глицерин при условии существования его в организме незимоспящих грызунов; не объясняет она и обратное явление, а именно, негативное отношение к глицерину глицеринонегативных штаммов, выделенных от сурков и сусликов, погибших от экспериментальной чумы. Кроме того, остается неясной причина выделения от незимоспящих грызунов одновременно глицеринонегативных и глицеринопозитивных штаммов чумного микроба.

Что касается механизма разложения моносахаридов, то он лучше всего изучен на глюкозе.

В аэробных условиях чумной микроб разлагает примерно вдвое меньше глюкозы, чем в анаэробных. Наибольшая скорость процесса отмечается в пределах рН от 7 до 8 (Дроздовская, 1951). Количество поглощенного кислорода, связанное с диссимиляцией глюкозы, равно 4 микромолям в пересчете на 1 мг сухого веса бактерий за один час при конечной концентрации сахара 0,25%. Интенсивность поглощения кислорода отмытой культурой зависит от концентрации субстрата и от количества микробных тел, возрастая с увеличением их. Оптимум рН для поглощения кислорода в присутствии глюкозы лежит в щелочной среде (рН 8—9), резко отличаясь от значения рН, оптимального для роста чумного микроба (Дроздовская, 1952).

Окисление глюкозы в незначительной степени стимулируется козимазой, никотиновой кислотой, гемином (Рао, 1940б), а также инсулином (Левин, 1950). Влияние инсулина на окисление глюкозы изучено совершенно недостаточно; механизм его остается неясным.

Согласно результатам исследования Дудорова (1943), главным продуктом аэробного распада глюкозы и маннита под влиянием чумного микроба является пировиноградная кислота. В анаэробных условиях образуется молочная кислота, уксусная кислота и этанол; в малых количествах обнаружены пировиноградная, янтарная, муравьиная кислоты и CO_2 , а также следы ацетилметилкарбинола.

Характерно, что соотношение количества двууглеродных и одноуглеродных компонентов необычно велико ($\frac{2C}{1C}=3,2$). Последнее можно объяснить или своеобразием ферментации углеводов чумным микробом, или недостаточно полным определением всех одноуглеродных соединений.

Данные о влиянии на дыхание чумного микроба спиртов, углеводов и продуктов их распада, полученные Рао (1940а), представлены в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Степень окисления чумным микробом некоторых субстратов

Субстрат	QO ₂	Субстрат	QO ₂
Манноза	36,1	Лимонная кислота	3,21
Глюкоза	35,8	Лактоза	2,73
Фруктоза	34,6	Этиловый спирт	2,61
Галактоза	31,5	Тартроновая кислота	2,52
Лактоза	29,1	Рамноза	2,43
Гексозодифосфат	28,5	Ксилоза	1,59
Мальтоза	27,4	Сахароза	1,56
Пировиноградная кислота	21,6	Дульцит	1,19
Маннит	18,1		
Уксусная кислота	11,0	Раффиноза	0
Фумаровая кислота	10,3	Сорбит	0
Малоновая кислота	9,85	Капроновая кислота	0
Янтарная кислота	7,3		
Арабиноза	4,90		
Глицерин	0		
Муравьиная кислота	0		
Пропионовая кислота	0		
Масляная кислота	0		

При окислении чумным микробом основного промежуточного продукта обмена углеводов в аэробных условиях — пировиноградной кислоты — образуется уксусная кислота (Левин, Ваймберг, Доулинг, Ивенсон, Роккенмахер и Волохов, 1954). Однако при работе с отмытыми суспензиями образование уксусной кислоты уловить не удастся. Последнее возможно только при использовании бесклеточных препаратов оксидазы пировиноградной кислоты, освобождающейся при лизисе бактерий.

В присутствии 2,4—динитрофенола препараты оксидазы (декарбоксилазы) катализируют распад пировиноградной кислоты согласно уравнению:



Добавление ионов Mn^{++} или кокарбоксилазы, вопреки данным Стилла (1941) и Штумпфа (1945), почти не влияет на скорость реакции: кокарбоксилаза увеличивает ее всего на 22%. Следова-

тельно, указанный микроорганизм обладает способностью к синтезу кофермента. Этим-то, по-видимому, и объясняется низкая эффективность тиамин в опытах по окислению глюкозы, отмеченная Рао (1940б).

Под влиянием неразрушенных клеток чумного микроба пировиноградная кислота окисляется до углекислоты и воды.

Отмытые суспензии чумного микроба (штамм А 1122) окисляют также все остальные ди- и трикарбоновые кислоты, входящие в цикл Кребса.

Сантеру и Айлу (1954) удалось получить бесклеточные препараты аконитазы и дегидразы изолимонной кислоты и показать обратимость их действия в присутствии углекислоты. Последнее свидетельствует о возможности фиксации CO_2 чумным микробом. В данном случае имеет место реакция типа $\text{C}_5 + \text{CO}_2$.

При окислении ацетата, меченого в метильной группе по углероду, наличие C^{14} установлено в составе янтарной, лимонной и α -кетоглутаровой кислот, причем вся углекислота оказалась радиоактивной.

Представители цикла Кребса выделены из состава чумного микроба.

На основании всего сказанного следует вывод: чумной микроб обладает комплексом ферментов, необходимых ему для полного окисления углеводов до CO_2 и H_2O .

К сожалению, вопрос о начальных этапах распада углеводов, как видно из изложенного выше, изучен очень слабо. Исходя главным образом из общебиологических представлений, можно утверждать, что принципиальных отличий в механизме обмена углеводов между чумным микробом и другими бактериями не существует.

До сих пор отсутствуют также убедительные данные о роли фосфорной кислоты в этих процессах.

Из числа ферментов, принимающих участие в обмене фосфорной кислоты, исследована лишь фосфатаза чумного микроба (Сагар, Агарвала и Шривастава, 1956б). Максимальная активность фермента в отношении β -глицерофосфата отмечается в вероналовом буфере при рН 8,0; при низких значениях рН скорость реакции минимальна. Оптимум температуры лежит при $37,5^\circ\text{C}$. Процесс расщепления глицерофосфата чумным микробом—реакция второго порядка.

Чумной микроб дезаминирует ряд аминокислот. Наиболее интенсивному превращению с поглощением кислорода и отщеплением аммиака подвергаются глутаминовая кислота, аланин, серин, треонин и пролин. Слабее дезаминируются аспарагиновая кислота, гликокол, цистеин, валин и норлейцин. Не подвергаются дезаминированию и не окисляются тирозин, триптофан, метионин, лейцин и диаминомонокарбоновые кислоты (Домарадский, 1958).

В анаэробных условиях чумной микроб дезаминирует только серин, цистеин и аспарагиновую кислоту; превращение глутаминовой кислоты или аланина осуществляется лишь при наличии в среде соответствующего акцептора водорода. По-видимому, возможности микроба для утилизации аминокислот при затрудненном доступе кислорода весьма ограничены.

Немотя на ряд попыток, нам не удалось установить способности чумного микроба к образованию декарбоксилаз аминокислот.

Углекислота, которая выделяется при дезаминировании, обязана своим происхождением окислительному декарбоксилированию

продуктов распада аминокислот. Количество ее обычно невелико, а величина дыхательного коэффициента незначительно отличается от единицы (Домарадский, 1958).

Дезаминазная активность чумного микроба находится в зависимости от среды, на которой он выращивается. Так, например, клетки, полученные с жидкой среды, обладают более активной системой дезаминаз, чем бактерии, выращенные на агаризованной среде (Сагар, Агарвала, Шривастава, 1956а). Культивирование чумного микроба на жидкой среде в присутствии 0,2% глюкозы сопровождается резким угнетением дезаминазной активности и эндогенного дыхания. Действие глюкозы на образование ферментов не связано с изменением рН среды во время роста (Домарадский, 1958).

Оптимум дезаминирования некоторых аминокислот лежит при рН 7,0—7,5, совпадая с значениями рН, оптимальными для роста микроба. Максимальная скорость дезаминирования наблюдается при 37,5°C (Сагар, Агарвала, Шривастава, 1956а).

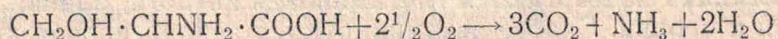
Более подробно в настоящее время изучен метаболизм только трех аминокислот — цистеина, серина и гликокола.

В присутствии цистеина потребление кислорода чумным микробом имеет место в широком диапазоне значений рН (от 5,5 в фосфатном до 9,0 в боратном буфере) и резко снижается при наличии в среде арсенита натрия или 2,4—динитрофенола; последний угнетает также эндогенное дыхание клеток. Десульфирование цистеина осуществляется как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

Культивирование чумного микроба на средах с повышенным содержанием цистеина сопровождается увеличением активности фермента, катализирующего распад этой аминокислоты.

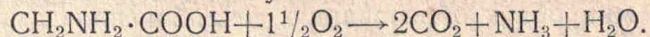
Помимо сероводорода, продуктами распада цистеина являются аммиак и пировиноградная кислота. Последняя легко улавливается при работе с убитыми толуолом бактериями или ацетоновыми препаратами клеток чумного микроба (Домарадский и Егорова, 1958).

По данным Левина, Ваймберга, Доулинга, Ивенсона, Роккенмахера и Волохова (1954), отмытые суспензии чумного микроба окисляют только 1—изомер серина; если используется d, 1—серин, скорость реакции уменьшается вдвое. В случае добавления 2,4—динитрофенола к пробам, содержащим серин, потребление кислорода клетками резко возрастает. В присутствии этого яда 1—серин дезаминируется согласно уравнению



Реакция идет через стадию образования пировиноградной кислоты, выделенной и идентифицированной с помощью 2,4—динитрофенилгидразина. Однако образование пировиноградной кислоты удается показать только при соблюдении условий, препятствующих ее окислению (при наличии в среде арсенита натрия и рН 9,1). Максимальное потребление кислорода чумным микробом в присутствии серина имеет место при рН 6,8.

В процессе роста чумного микроба при аэробных условиях или под влиянием суспензий «покоящихся» клеток гликокол окисляется с образованием аммиака и углекислоты:



Чумной микроб также способен утилизировать гликокол при росте на таких сложных средах, какими являются перевары Хот-

тингера. При этом радиоактивный углерод гликокола используется, по-видимому, для синтеза разнообразных компонентов протоплазмы клетки. В частности, наличие C^{14} показано в составе белков микроба. Превращение гликокола в другие аминокислоты с достоверностью установить не удалось. Особенно интересно, что способностью утилизировать гликокол обладают не только растущие или «покоящиеся» клетки, но и их суспензии, обработанные ацетоном. Однако в процессе роста микроба на сложных синтетических средах возможность использования им гликокола ограничена; об этом можно судить по тому, что присутствие в среде легко усваиваемых источников углерода и азота подавляет внедрение C^{14} (из гликокола) в клетку (Домарадский и Семенушкина, 1957).

Ни глюкоза, ни шавелевоуксусная кислота, ни яблочная кислота или пируват, если они добавляются к пробам, содержащим аланин, глутаминовую или аспарагиновую кислоты—обычные субстраты реакций переаминирования, не увеличивают поглощение кислорода чумным микробом. Содержание аммиака также меняется не закономерно.

Недезаминируемые аминокислоты не влияют на процесс поглощения кислорода чумным микробом даже при наличии в среде легко окисляемых субстратов. Следовательно, они и в сложных средах не вовлекаются в процессы дезаминирования.

На основании сказанного можно исключить тот тип стимуляции окисления аминокислот в культурах чумного микроба, который был установлен Севериным (1944) у кишечной палочки.

Эти, а также специальные исследования при помощи распределительной хроматографии, проведенные в свое время с учетом каждого компонента реакции, заставили нас (Домарадский, 1955) сделать вывод о неспособности чумного микроба катализировать те реакции переаминирования, при которых в качестве акцепторов аминокислоты использовались шавелевоуксусная кислота и пируват. По существу аналогичные результаты были получены Саксенем, Агарвала и Шривастава (1957). Реакции переаминирования им удавалось наблюдать только тогда, когда в качестве акцепторов аминокислот применялась α -кетоглутаровая кислота*. В роли донаторов аминокислот могли выступать I-изомеры аланина, аспарагиновой кислоты, лейцина, изолейцина, норлейцина, фенилаланина, валина, метионина, норвалина, а также I-аспарагин.

Максимальная скорость переаминирования отмечалась при рН 8. Добавление пиридоксала оказалось необходимым лишь для переноса аминокислоты с аланина на α -кетоглутаровую кислоту. Из числа 14 ядов, испытанных авторами, наибольший эффект на реакции переаминирования оказывали ионы двухвалентной ртути.

Интересно отметить, что, за исключением аланина и аспарагиновой кислоты, все остальные аминокислоты, вступающие в реакцию переаминирования, не дезаминируются чумным микробом совсем или дезаминируются очень слабо.

При работе с отмытыми клетками чумного микроба установлена способность их к синтезу аспарагиновой кислоты, который легче всего констатируется при наличии в среде яблочной кислоты и аммиака (Домарадский, 1958). Реакция протекает в аэробных и анаэробных условиях, в присутствии пропилового спирта или то-

* Указанные авторы работали с бесклеточными препаратами бактерий.

луола, и катализируется, по-видимому, ферментом аспартазой. Бесклеточные препараты аспартазы обладают высокой специфичностью и действуют только на аспарагиновую кислоту.

Попытка уловить новообразование аланина путем прямого аминирования соответствующей α -кето- или оксикислоты окончилась неудачей, несмотря на то, что в пробах всегда отмечалось уменьшение содержания остаточного азота, аммиака и увеличение азота в микробных телах.

После выращивания чумного микроба на среде с $\text{CH}_3\text{C}^{14}\text{OON}$ около 45% всей радиоактивности белковой фракции бактерий было обнаружено в составе моноаминодикарбоновых кислот, 37% C^{14} оказалось связано с моноаминомонокарбоновыми кислотами и только 18% — с основными аминокислотами.

Оба компонента фракции дикарбоновых кислот — глутаминовая и аспарагиновая были мечены по углероду одной из карбоксильных групп. Концентрация C^{14} в глутаминовой кислоте была примерно на $\frac{1}{3}$ выше, чем в аспарагиновой кислоте (Домарадский и Семешкина, 1958).

Приведенные нами данные служат лишним доказательством роли переаминирования и аминирования в новообразовании аминокислот чумным микробом.

В связи с этим большой интерес представляет вопрос о потребностях чумного микроба в аминокислотах.

Одна из первых работ по определению аминокислот чумного микроба принадлежит Рао (1939, 1940б). Им установлено, что на жидких синтетических средах культивирование вирулентного штамма возможно в присутствии аланина, лейцина, гликокола, пролина, фенилаланина, лизина, аргинина и цистина. Исключение из состава среды аланина, лейцина, лизина или аргинина не оказывало влияния на рост. В противоположность этому пролин, фенилаланин и цистин относятся к числу незаменимых аминокислот. Гликокол является дополнительным фактором роста, оказывающим существенное влияние на развитие чумного микроба.

По данным Дудорова (1943), фенилаланин в концентрации 0,0002% поддерживает рост авирулентного штамма, хотя микроб можно «приучить» обходиться без него. Потребности неадаптированных штаммов в фенилаланине не удовлетворяются фенилуксусной кислотой, тирозином, триптофаном или индолуксусной кислотой. С другой стороны, цистеин заменим сульфитом, тиосульфатом, гомоцистеином, но не метионином.

При наличии в среде цистеина и фенилаланина микроб использует в качестве источника углерода аланин или пролин.

В работе Инглесберга (1952) показана возможность культивирования чумного микроба на жидких и твердых синтетических средах, содержащих, помимо глюкозы, лишь фенилаланин, метионин, а также валин, изолейцин и тиосульфат натрия. Как и предыдущий автор, Инглесберг особое внимание уделил аминокислотам, содержащим серу.

В присутствии тиосульфата только d,l-гомоцистеин или l-цистатинин заменяли метионин, тогда как сульфат, сульфид, сульфит и l-цистеин не поддерживали роста микроба. При наличии в среде d,l-метионина, тиосульфат мог быть заменен сульфитом, сульфидом и l-цистеином, но не сульфатом или d,l-гомоцистеином.

В результате адаптации чумного микроба к росту на среде, содержащей в качестве единственного источника серы тиосульфат, Инглесбергом получен атипичный штамм. Последний не удавалось культивировать, если единственным источником серы в среде служил метионин или гомоцистеин.

Исследования Инглесберга говорят о возможности превращения цистатионина и гомоцистеина в метионин под влиянием чумного микроба и о необратимости этого процесса. Новообразование цистеина осуществляется за счет сульфита, тиосульфата или сульфида, но не сульфата или гомоцистеина. В то же время в условиях опытов Дудорова (1943) гомоцистеин, отличающийся от метионина отсутствием метильной группы в γ -положении, полностью покрывал потребности чумного микроба в цистеине. Интересно, что оба автора работали с одним и тем же штаммом A1112.

Эксперименты, проведенные с $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ подтвердили вывод Инглесберга об отсутствии у чумного микроба способности утилизировать сульфаты. Так же точно подтвердилось положение о неспособности его превращать метионин в цистеин. Однако, вопреки утверждению американского автора, мы вынуждены допустить, что реакция цистеин \rightarrow цистатионин, в результате которой, в конечном итоге, образуется метионин, катализируется чумным микробом. Иное объяснение появлению радиоактивного метионина в составе белков бактерий при выращивании их на среде, содержащей лишь S^{35} в виде цистина, сейчас дать трудно (Домарадский, 1957).

Указанные особенности обмена цистеина и метионина характерны не только для чумного микроба, но и для других микроорганизмов, например, отдельных штаммов кишечной палочки (Симондс, 1948), молочнокислых бактерий (Хифт и Уолес, 1949) и грибка *Neurospora* (Горовитц, 1947). Последний организм синтезирует метионин путем цепи реакций, обратной процессу образования цистеина из метионина у животных.

Согласно Хиллсу и Спарру (1952) для выращивания чумного микроба при температуре 32° или более низкой оптимальная среда должна содержать в качестве источника азота, кроме аммиака, фенилаланин, валин, изолейцин, цистеин и метионин. При более высокой температуре к среде необходимо добавлять аланин, лейцин, серин и треонин.

По нашим данным, чумной микроб хорошо растет на жидких синтетических средах, содержащих в качестве источников азота различные комбинации из 17 аминокислот. Но для обеспечения роста чумного микроба в средах должны присутствовать, как минимум, фенилаланин, метионин, цистеин, серин и треонин. Без фенилаланина и метионина длительное культивирование чумного микроба на простых синтетических средах невозможно. Для океанических штаммов к числу незаменимых аминокислот, по-видимому, также относится тирозин. Остальные аминокислоты несущественны (Домарадский и Иванов, 1957).

Из вышесказанного можно сделать только один вывод: достоверно установлено, что чумной микроб нуждается в фенилаланине и аминокислотах, содержащих серу. Вопрос о потребностях его в других аминокислотах требует уточнения. При этом следует учесть, что потребности бактерий в аминокислотах определяются составом среды, т. е. качественным разнообразием аминокислот и их количественным соотношением. Кроме того, большое значение имеет происхождение штаммов, длительность их сохранения на

искусственных питательных средах и ряд других факторов (см. работы Снелла, 1949; Хегстеда и Уордвелла, 1944; Шенкмана, 1943; Мак-Магана и Снелла, 1944). Небезынтересным должен явиться также следующий факт. Все аминокислоты, необходимые для роста чумного микроба, под его влиянием подвергаются процессам переаминирования или дезаминирования (см. выше), т. е. служат источником углерода и аммиака. Кетокислоты образуются или за счет самих аминокислот, или из глюкозы, присутствующей в составе синтетических сред.

Для более полной характеристики чумного микроба необходимо осветить его отношение к мочеvine.

Большинство штаммов чумного микроба не обладает уреазой и только некоторые из них весьма слабо разлагают мочеvinу при выдерживании в термостате до семи суток и более (Ивановский и Ленская, 1944). Однако, по данным Ленской (1944, 1946), изменчивость чумного микроба сопровождается повышением активности уреазы, в силу чего представляется возможность все штаммы разделить на «уреазонегативные» и «уреазопозитивные». Различная активность уреазы может служить показателем степени накопления в штамме видообразующих признаков в процессе его изменчивости.

Уреаза чумного микроба, по-видимому, относится к числу адаптивных энзимов. Индуктором ее служит не только мочеvin, но и некоторые другие соединения, в частности, гликокол. Последнее обстоятельство не должно вызывать недоумения, если помнить, что соединения, образующиеся в результате одной ферментативной реакции, служат обычно субстратом для других ферментативных реакций. Следовательно, повышение скорости одного какого-нибудь процесса (например, распада гликокола) вызывает усиление всей системы, в том числе и той, от которой зависит гидролиз мочевины («цепная индукция» или «последовательная адаптация», Кон и Моно, 1956).

Многие штаммы чумного микроба, преимущественно «океанического» происхождения, обладают способностью образовывать нитриты при отсутствии нитратов (Коновалова, 1930; Петраньяни, 1937; Дэвинья и Буавен, 1951; Урюпина, 1953). На зависимость процесса нитрификации от условий существования чумного микроба впервые указал Жирар (1940). Согласно его данным, образование нитритов усиливается при выращивании чумного микроба на средах с глицерином.

Нитрификация является аэробным процессом; легче всего ее наблюдать на средах, богатых продуктами глубокого распада белков (Урюпина, 1953).

Основываясь на отношении чумного микроба к глицерину, нитратам и аммиаку, Туманский (1957) предложил новую классификацию штаммов данного микроорганизма (см. табл. 2).

В отличие от классификации Дэвинья (1951), классификация Туманского отражает существование определенной связи между систематической принадлежностью хозяина и особенностями метаболизма выделенной от него разновидности чумного микроба. Однако и последнюю классификацию следовало бы дополнить новыми признаками (потребность в аминокислотах, отношение к мочеvine и т. д.), более глубоко отражающими особенности обмена веществ возбудителя чумы.

В настоящей работе мы ставили перед собой цель обобщить имеющийся материал по биохимии чумного микроба. Многие еще не ясно, целый ряд вопросов, поднятых нами, предстоит решить в дальнейшем, отдельные положения спорны и требуют соответствующего уточнения или проверки. Тем не менее, изложенные данные свидетельствуют о том, что обмен веществ чумного микроба обладает рядом признаков, присущих всем микроорганизмам. По своей ферментативной активности он мало уступает непатогенным видам микробов, таким как *B. brevis*, *B. coli*, *B. proteus* и т. д. Последнее обстоятельство интересно сопоставить с условиями обитания чумного микроба в природе. Казалось, паразитический образ жизни должен был бы в большей степени отразиться на чумном микробе. Действительно, многие патогенные грамположительные

Т а б л и ц а 2

Разновидности	Характеристика разновидностей		
	ферментация глицерина	нитрификация	денитрифика- ция
<i>Bact. pestis</i> var. <i>ratti</i>	—	+	+
<i>Bact. pestis</i> var. <i>marmotae</i>	+	+	+
<i>Bact. pestis</i> var. <i>citelli</i>	+	—	—

кокки, бруцеллы или туляреминый микроб, носителями которых также являются млекопитающие и насекомые, утратили ряд ферментных систем, необходимых им для существования вне организма. Однако изменчивость чумного микроба направлена в сторону возбудителя ложного туберкулеза грызунов, отличающегося еще большей автотрофностью. В результате эволюционного развития микроба отсутствие у него истинного токсина компенсировалось повышением интенсивности обмена веществ, позволяющего клетке (возможно, за счет неспецифических токсических веществ) дезинтегрировать деятельность энзимов хозяина.

ЛИТЕРАТУРА

Бахрах Е. Зависимость роста чумного микроба от окислительно-восстановительного состояния питательной среды. Диссертация. Библ. ин-та «Микроб», Саратов, 1950.

Бахрах Е. Окислительно-восстановительный потенциал в культуре чумного микроба. Сообщение 2. Труды ин-та «Микроб», в. 1, Саратов, 1951.

Бахрах Е. и Башева В. Окислительно-восстановительный потенциал в культуре чумного микроба. Сообщение 1. Труды ин-та «Микроб», в. 1, Саратов, 1951.

Бахрах Е., Крайнова А. и Михайлова А. Зависимость роста чумного микроба от наличия в питательной среде азотистых веществ. Труды ин-та «Микроб», в. 1, Саратов, 1951.

Бахрах Е. и Шущерова Н. Зависимость роста чумного микроба от окислительно-восстановительного потенциала питательной среды. Труды ин-та «Микроб», в. 1, Саратов, 1951.

Безсонова А. Пептонная вода с рамнозой как дифференциальная среда для *B. pestis* и *B. pseudotuberculosis* rod. Pfeiffer'a, Вестн. микр., эпид. и паразитологии, в. 8, 1929.

Берлин А. и Борзенкова А. Ферментативная характеристика монгольских штаммов *V. pestis*. Вестн. микр., эпид. и паразитологии, в. 17, 1938.

Быстренин А., Липатова Т. и Хворостухина М. Рост *V. pestis* на средах с различным содержанием продуктов белкового распада. Вестн. микр., эпид. и паразитологии, в. 16, 1937.

Джапаридзе М. Каталазная и пероксидазная активность чумного и псевдотуберкулезного микробов. Диссертация. Библ. ин-та «Микроб», Саратов, 1953.

Домарадский И. В. Аминокислотный обмен микробов чумы и псевдотуберкулеза. Диссертация. Саратов, 1955.

Домарадский И. В. Дезаминирование аминокислот микробами чумы и псевдотуберкулеза. Настоящий сборник.

Домарадский И. В. Дальнейшие наблюдения над способностью микробов чумы и псевдотуберкулеза к диссимиляции аминокислот. Настоящий сборник.

Домарадский И. В. О синтезе аспарагиновой кислоты и аланина микробами чумы и псевдотуберкулеза. Настоящий сборник.

Домарадский И. В. К вопросу об обмене серосодержащих аминокислот в культурах микробов чумы. ЖМЭИ, № 6, 1957.

Домарадский И. В., Бунтин Е. В., Захарова Г. А. Дегидразы микробов чумы и псевдотуберкулеза. Настоящий сборник.

Домарадский И. В. и В. Д. Егорова. Об обмене цистеина в культурах чумного микроба. Настоящий сборник.

Домарадский И. В. и В. А. Иванова. Некоторые данные по культивированию чумного микроба на синтетических средах. ЖМЭИ, № 2, 1957.

Домарадский И. В. и А. Ф. Семенушкина. Некоторые данные об усвоении гликокола чумным микробом. Вопросы медицинской химии, т. III, в. 1, 1957.

Домарадский И. В. и А. Ф. Семенушкина. Фиксация радиоактивного углерода уксусной кислоты чумным микробом. Вопросы медицинской химии, т. IV, в. 1, 1958.

Дроздовская Ф. Окисление глюкозы чумным микробом. Рукопись. Библ. ин-та «Микроб», Саратов, 1951.

Дроздовская Ф. К вопросу об аэробном окислении глюкозы чумным микробом. Рукопись. Библ. ин-та «Микроб», Саратов, 1952.

Ивановский Н. Общая характеристика обмена веществ чумного микроба. Труды ин-та «Микроб», в. 1, Саратов, 1951а.

Ивановский Н. Изменчивость углеводного обмена чумного микроба. Труды ин-та «Микроб», в. 1, Саратов, 1951б.

Ивановский Н. и Башева В. Химическая природа кислот, образующихся при росте чумного микроба на бульоне с d — глюкозой. Труды ин-та «Микроб», в. 1, Саратов, 1951а.

Ивановский Н. и Башева В. Наблюдения над сравнительной интенсивностью разложения рамнозы чумным микробом и микробом ложного туберкулеза грызунов. Труды ин-та «Микроб», в. 1, Саратов, 1951б.

Ивановский Н. и Ленская Г. К вопросу о дифференциальной диагностике чумного и псевдотуберкулезного микробов. Вестн. микр., эпид. и паразитологии. Сб. научн. трудов, посвящ. 25-летию юбилею ин-та «Микроб», в. 1, Саратов, 1944.

Каган Б., Ляткер Ш., Цфасман Э. Фосфоролит сахарозы культурами *Leuconostoc mesenteroides*. Биохимия, в. 7, 1942.

Кон М. и Ж. Мон о. Специфическое угнетение и индукция биосинтеза ферментов. Адаптация у микроорганизмов. Изд. иностр. литер., 1956.

Коновалова С. Нитрозная реакция с культурами *V. pestis* и *V. pseudotuberculosis* rod. (Pfeiffer). Вестн. микр., эпид. и паразитологии, в. 9, 1930.

Коробкова Е. К изучению *V. pestis* и *V. pseudotuberculosis*. Вестн. микр., эпид. и паразитологии, в. 8, 1929.

Коробкова Е. К биологии *Pasteurella pestis* 1. Жизнеустойчивость, вирулентность и вариабельность *V. pestis* при длительном хранении их без пересева на искусственных питательных средах. Вестн. микр., эпид. и паразитологии, в. 15, 1936.

Крайнова А. К вопросу о значении рамнозы для дифференциального диагноза *V. pestis* и *V. pseudotuberculosis* rod. Pfeiffera. Вестн. микр., эпид. и паразитологии, в. 19, 1939.

- Ленская Г. О биохимических критериях изменчивости чумного микроба. Уреазаположительные и уреазоотрицательные штаммы чумного микроба. Вестн. микр., эпид. и паразитологии. Сб. научн. трудов, посвящ. 25-летнему юбилею ин-та «Микроб». Саратов, 1944.
- Ленская Г. Изменчивость чумного микроба. Диссертация. Саратов, 1946.
- Самсонов Ф. Влияние некоторых гидролизатов на рост *V. pestis*. Вестн. микр., эпид. и паразитологии, в. 14, 1935.
- Северин В. О механизме окислительного обмена *V. coli* в присутствии аминокислот. Биохимия, в. 9, 1944.
- Снэлл Х. Микробиологические методы анализа аминокислот. Химия белка. Сб. статей. Изд. иностр. литер., 1940.
- Табачков П. Фосфоролит у бактерий. XIII научн. сессия Саратовского мед. ин-та, 1948.
- Трифорова А. Роль составных частей крови различных видов животных в питании чумного микроба. Диссертация. Библ. ин-та «Микроб», Саратов, 1953.
- Туманский В. Микробиология чумы. Диссертация. Библ. ин-та «Микроб», Саратов, 1946.
- Туманский В. Отношение *V. pestis* и *V. pseudotuberculosis* rod. Pf к рамнозе и об оценке среды с рамнозой для дифференциальной диагностики этих микробов. Вестн. микр., эпид. и паразитологии, в. 18, 1939.
- Туманский В. Микробиология чумы. Медгиз; 1948.
- Туманский В. О классификации разновидностей чумного микроба. ЖМЭИ, № 6, 1957.
- Туманский В. и Соколова Н. Об отношении чумного микроба к глицерину. Труды ин-та «Микроб», в. 1, 1951.
- Урюпина Н. Изменение некоторых свойств чумного микроба под влиянием условий культивирования. Диссертация. Библ. ин-та «Микроб», Саратов, 1953.
- Boncinelli, U. e. Aradas, A. Sui rapporti tra *P. pestis* e *V. pseudotuberculosis* rodentium I. Balore di alcuni mezzi culturali di differenziazione; saggi di agglutinazione aspecifica su stipiti normali. Bol. del Inst. Sierot. Milan, 1933, 12, 346.
- Devignat, R. et Schoette M. Le bacille de Iersin en milieus dire. Rec. Travaux Sci. Med., Congo Belge Leopoldville, 1942, 1, 161.
- Devignat, R. Varieties de l' espece *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothese. Bull. World Health Organization, 1951, 4, 247. Цитировано по Trop. Dis. Bull., 49, 45, 1952.
- Devignat, R. et Boivin, A. Sur la biochimie des souches centroafricaines de peste du Congo Belge. Bull. Soc. Path. Exot., 1951, 44, 279.
- Doudoroff, M. Studies on the nutrition and metabolism of *Pasteurella pestis*. Proc. Soc. Exptl. Med., 1943, 53, 73.
- Drennan, J. a. Teague, O. A selective medium for the isolation of *Bacillus pestis* from contaminated plague lesions and observations on the growth of *P. pestis* on autoclaved nutrient agar. J. Med. Research. 1917, 36, 519.
- Englesberg, E. The irreversibility of methionine synthesis from cysteine in *Pasteurella pestis*. J. Bact., 1952, 63, 675.
- Girard, G. La reaction des nitrites pour la differenciation du bacille de la peste et du bacille de la pseudotuberculose. Compt. Rend., 19 0, 133, 244; цитировано по ЖМЭИ, № 4, 149, 1941.
- Girard, G., Neal, R. a Chevalier, A. Le comportement du bacille pesteux ensemence en anaerobiose et ses applications pratiques. Ann. Inst. Pasteur, 1946, 72, 862.
- Hegsted, M. a. Wardwell, E. On the purity of synthetic d, l—leucine. J. Biol. Chem., 1944, 1953, 167.
- Herbert, D. Studies on the nutrition of *Past. pestis*, and factors affecting the growth of isolated on an agar surface. Brit. J. Exptl. Path. 1949, 30, 509. Цитировано по Tropical Dis. Bull., 1950, 47, 1195.
- Hift, H. a. Wallace, G. A study on the synthesis of cystine by some lactic acid bacteria. J. Biol. Chem., 1949, 177, 927.
- Hills, G. a. Spurr, E. The effect of temperature on the nutritional requirements of *Past. pestis*. J. General Microbiology, 1952, 5, 64. Цитировано по Trop. Dis. Bulletin, 1952, 49, 509.
- Horowitz, N. Methionine synthesis in *Neurospora*: The isolation of cystathionine. J. Biol. Chem., 1947, 171, 255.

- Levine, H. The influence of insulin on the rate of glucose oxidation by *Past. pestis*. *J. Gener. Physiol.*, 1959, 34, 161. Цитировано по *Bull. Inst. Pasteur*, 1952, 50, 35.
- Levine, H., Weimberg, R., Dowling, J., Evenson, M., Rockenmacher, M. a. H. Wolochow. The oxidative dissimilation of serine by *P. pestis*. *J. Bact.*, 1954, 67, 369.
- MacMahan, J. a. Snell, E. The microbiological determination of amino acids. I. Valine and arginine. *Journal. Biol. Chem.*, 1944, 152, 83.
- Meyer, K. a. Batchelder, A. Selective mediums in the diagnosis of rodent plague. *J. Infect. Dis.*, 1928, 39, 370.
- Petragnani, G. Le diagnostic de la peste chez les rats. *Off. Inst. d'Hyg. publ.*, 1937, 29, 2522.
- Pollitzer, R. *Plague*. Geneva, 1954.
- Rao, S. The nutritional requirements of the plague bacillus. *Ind. J. Med. Res.*, 1939, 27, 75.
- Rao, S. Oxidations effected by the plague bacillus. *Ind. J. Med. Res.*, 1940a., 27, 617.
- Rao, S. Further studies on the nutrition of the plague bacillus; the role of hematin and other compounds. *Ind. J. Med. Res.*, 1940 b, 27, 833.
- Rockenmacher, M. Relationship of catalase activity to virulence in *Past. pestis*. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1949, 71, 99.
- Rockenmacher, M. James, H. a. Elberg, S. Studies on the nutrition and physiology of *Past. pestis*. I. A chemically defined culture medium for *Past. pestis*. *J. Bact.*, 1952, 63, 785.
- Santer, M. a. Ayl, S. Metabolic reactions of *Past. pestis*. I. Terminal oxidation. *J. Bact.*, 1954, 67, 379.
- Sagar, P., Agarwala S., Shrivastava D. Studies in the enzyme make up of *Past. pestis*. Part I. Deamination of amino acids by virulent and avirulent strains. *Ind. J. Med. Res.*, 1956a, 44, 3, 385.
- Sagar, P., Agarwala S., Shrivastava, D. Studies in the enzyme make up of *Pasteurella pestis*. Part II. Phosphatase activity of virulent and avirulent strains. *Ind. J. Med. Res.*, 1956b, 44, 4.
- Savino, E., Aldao, A., Anchezar, B. Los microorganismos del genero *Pasteurella*. I. Los caracteres de cultivo. *Rev. del Inst. Bact. del Dep. Nac. de Hig.*, 1939, 9, 110.
- Saxena, K. C., Sagar, P., Agarwala, S. A., Shrivastava, D. Studies in the enzyme make up of *Past. pestis*. Part IV. Transamination reactions of virulent and avirulent strains. *Ind. J. Med. Res.*, 1957, 45, 2.
- Shankman, S. Amino acids nutrition of *Lactobacillus arabinosus*. *J. Biol. Chem.*, 1943, 150, 305.
- Simmonds, S. Utilization of sulfur-containing amino acids by mutant strains of *E. coli*. *J. Biol. Chem.*, 1948, 174, 717.
- Smith, L. a. Phillips, R. The growth of *Pasteurella pestis* on a casein digest medium. *J. Franklin Institute*, 1943, 235, 536.
- Sokhey, S. Experimental studies in plague II. The solid medium of choice, and the growth of the plague bacillus. *Ind. J. Med. Res.*, 1939, 27, 321.
- Srikantan, T. N., Agarwala, S. C., Shrivastava, D. L. Studies in the enzyme make up of *Past. pestis*. Part III. Oxidative metabolism of virulent and avirulent strains. *Ind. J. Med. Res.*, 1957, 45, 2.
- Still, J. Pyruvic dehydrogenase of *Bacterium coli*. *Biochem. J.*, 1941, 35, 380.
- Stumpf, P. Pyruvic oxidase of *Proteus vulgaris*. *J. Biol. Chem.*, 1945, 159, 529.
- Vourloud, A. Action de quelques bacteries sur les hydrates de carbon et le lait tournesole. *Cbl. Bact. I. Abt. Orig.*, 1908, 45, 193.
- Wright, H. The cultivation of the plague bacillus. *J. Path. Bact.*, 1934, 39, 381.

СОДЕРЖАНИЕ:

	Стр.
Г. П. Апарин. О влиянии малахитовой зелени на рост возбудителей чумы, псевдотуберкулеза и некоторых других микробов.	3
В. А. Кротова. Аминокислотный состав разновидностей чумного микроба, выращенных при различных условиях	9
А. А. Токарева и П. А. Шершнев. Некоторые замечания к методике электрофореза белков сыворотки на бумаге	15
П. А. Шершнев, А. А. Токарева, А. П. Калмыкова, Е. Д. Шкурко и Л. Е. Хунданов. Изучение белковых фракций противочумных сывороток	25
Л. Е. Хунданов, П. А. Шершнев, Е. Д. Шкурко, А. П. Калмыкова, А. А. Токарева, Е. И. Лясковская, В. Я. Михалева. К вопросу о лечебных и профилактических свойствах отдельных фракций белков противочумной сыворотки	33
Л. Е. Хунданов, В. С. Колесник, Г. П. Плетникова. К вопросу о сравнительной иммуногенной эффективности противочумной сыворотки и ее глобулиновых фракций	43
М. И. Анциферов, Л. И. Носкова. Влияние концентрации аминного азота в среде Ухалова-Михалевой на рост туляремийного микроба	51
И. В. Домарадский, В. С. Башева, и Н. К. Сидорова. Культивирование чумного микроба на средах известного состава.	55
И. В. Домарадский. Дезаминирование аминокислот микробами чумы и псевдотуберкулеза	65
И. В. Домарадский. Дальнейшие наблюдения над способностью микробов чумы и псевдотуберкулеза к диссимиляции аминокислот.	75
В. Д. Егорова и И. В. Домарадский. К вопросу о диссимиляции некоторых аминокислот под влиянием чумного и псевдотуберкулезного микробов	81
И. В. Домарадский, Е. Б. Бунтин, Г. А. Захарова. Дегидразы микробов чумы и псевдотуберкулеза	83
И. В. Домарадский. О синтезе аспарагиновой кислоты и аланина микробами чумы и псевдотуберкулеза	97
И. В. Домарадский и Егорова В. Д. Об обмене цистина в культурах чумного микроба	103
Л. И. Носкова, Н. З. Трофименко, В. С. Михно. Мясо-кислотный гидролизат для выращивания холерного и чумного микробов	111
Н. З. Трофименко, З. И. Васильева, Кротова В. А. Изменение аминокислотного состава питательной среды при глубинном выращивании чумного микроба	117
Я. Л. Бахрах. Метод препаративного получения цистина	125
Е. Э. Бахрах, Е. И. Коробкова и А. Ф. Шалаева. О химической природе и серологических свойствах специфической полисахаридосодержащей фракции чумного микроба	127
Е. Э. Бахрах, Ф. К. Дроздовская. Выделение полисахаридосодержащей фракции из чумного микроба	135
М. Н. Джапаридзе. Пероксилазная активность чумного и псевдотуберкулезного микробов	139
М. И. Анциферов, Л. И. Носкова. Влияние крови и ее составных частей на рост <i>Bact. tularensis</i>	145
И. В. Домарадский. Общая характеристика обмена веществ чумного микроба	155

Известия Иркутского государственного научно-исследовательского
противочумного института Сибири и Дальнего Востока

Редактор *А. И. Степанченко*

Техн. редакция *И. А. Астахов и С. Н. Барер*

Сдано в набор 8/III-1958 г. Подписано к печати 15/VII-1958 г.

Печ. листов 14,75. Уч.-изд. листов 13,38. Бумага 70x108¹/₃₂

Тираж 1100. Зак № 1719. HE-01961

г. Улан-Удэ. Типография Министерства культуры БурАССР

Стр.	Строка	Напечатано	Следует читать
6	19 сверху	салмонелла	салмонеллеза
9	11 снизу	три вакцинных штамма	два вакцинных штамма
12	рис. 1, 4 строчка	глуматиновая	глутаминовая
12	рис. 1, 5 строчка	фенилалалин	фенилаланин
13	13 снизу	кислоты и с последующим	кислоты, с последующим
26	22 снизу	соловым	солевым
48	Микрофото 3	меночных клеток	печеночных
52	8 сверху	ингридиентов	ингредиентов
58	21 сверху	содержащие глюкозу среды (0,1%)	среды, содержащие глюкозу (0,01%)
61	1 снизу	казенина	казеина
91	Заголовок к таблице 5	с глюкозой (в мм)	с глюкозой
91	19 снизу	субстатов	субстратов
96	4 снизу	сoughes	soughes
104	2 снизу в примечании	буфета	буфера
105	1 снизу в примечании	Cott	Gott
110	9 сверху	sys	cys
110	25 сверху	Desnuelle p.	Desnuelle P.
11	11 снизу	desomosition	decomposition
113	таблица 2, 1 столбец	концентрация аминного азота (%)	концентрация аминного азота (мг %)
115	Табл. 4	жикотных	животных
115	Табл. 4	иммунные	иммуногенные
128	17 сверху	Дроздовского	Дроздовской
129	2 сверху	преципитации	преципитации
140	3 снизу	второго	второго
140	23 сверху	ществ	веществ
151	4 сверху	дефибрированной	дефибрированной
152	16 сверху	дефибрирован	дефибрированной
153	16 снизу	in plage	in plague
153	9 снизу	Cultivaion	Cultivation
168	5 сверху	белкового	белкового
171	6 снизу	пероксилазная	пероксидазная