

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
И ТРАНСФОРМАЦИЯ
ПУРИНОВЫХ
И ПИРИМИДИНОВЫХ
СОЕДИНЕНИЙ
МИКРООРГАНИЗМАМИ

Министерство высшего и среднего специального образования
Латвийской ССР
Латвийский ордена Трудового Красного Знамени
государственный университет имени Петра Стучки
Кафедра физиологии растений и микробиологии

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТРАНСФОРМАЦИЯ ПУРИНОВЫХ И
ПИРИМИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Межвузовский сборник научных трудов

Под ред. Х.Маурини



Латвийский государственный университет им. П.Стучки
Рига 1978

Межвузовский сборник научных трудов предназначается для студентов биологического факультета, аспирантов и преподавателей биологического факультета.

Печатается по решению редакционно-издательского совета ЛГУ им. П. Стучки от 16 июня 1978 года

© Латвийский государственный университет им. П. Стучки, 1978

И $\frac{21007-117y}{M 812(11)-78}$ 168-78

ПРЕДИСЛОВИЕ

В 1973 году вышел в свет выпуск II (том I91) Ученых записок ЛГУ им. П. Стучки. Прошедшие 4 года были очень плодотворными для коллектива кафедры. Получено много интересных оригинальных данных в рамках изучаемой проблемы. Результаты исследований освещены в статьях данного выпуска.

Предлагаемый вниманию читателей сборник характерен не только поисками новых, до сих пор не изученных направлений (работы с гнотобонтами), но и с научным кооперированием исследований.

Ряд авторов и соавторов статей данного сборника являются учеными, работающими в других научных учреждениях. Так, М. Н. Капранова и И. Б. Лецинская являются сотрудниками Казанского госуниверситета им. В. И. Ульянова, В. Т. Емцев и В. А. Бабайцева — Московской с/х академии им. К. А. Тимирязева, И. Я. Шпрунка — Института органического синтеза, а А. А. Витола, А. П. Лодзиня, Т. Н. Мидлер — Института неорганической химии АН ЛатвССР.

Авторы статей приводят данные о более глубоком проникновении в процессы метаболизма пуриновых и пиримидиновых соединений, чего не было в предыдущих выпусках. Так, впервые установлено дезаминирование экзогенных ЦМФ и ГМФ на стадии нуклеотида (И. О. Муйжниекс, М. Я. Витол); показано повышение активности нуклеолитических ферментов в процессе роста *Bacillus mesentericus* в средах, содержащих РНК и ее копонситы (М. Н. Капранова и др.). Показано взаимодействие кишечной микрофлоры с ферментативными системами макроорганизма (подопытного животного) в процессе деградации некоторых пуриновых и пиримидиновых соединений (Р. Ц. Звилна и др., А. П. Гринберг и др.). Впервые показана трансформация экзогенного АТФ в цикло-3',5' АМФ в процессе роста бактерий (А. А. Лешмане и др.).

Авторы благодарят всех студентов и технических работников, которые участвовали в разных этапах исследований.

Редколлегия

МЕТАБОЛИЗМ ОРОТОВОЙ КИСЛОТЫ ПОЧВЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ РОДОВ PSEUDOMONAS И MYCOBACTERIUM

Метаболизм оротовой кислоты, которая является предшественником всех пиримидиновых соединений клетки, широко изучен в различных организмах [8, 17, 19, 27], в том числе в аэробных и анаэробных бактериях, выделенных из почвы [20, 25, 26] и ила [21]. Установлены анаболические и катаболические пути биохимических превращений оротовой кислоты. Подробно изучены ферменты, катаболизирующие эти превращения, в особенности оротатфосфорибозилтрансфераза (пирофосфатаза) [12, 22, 23, 24], оротидилатдекарбоксилаза [22, 24, 25, 31], дигидрооротатдегидрогеназа [12, 13]. Найдены ингибиторы *de novo* биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов из оротовой кислоты, изучен, часто на бактериальной модели, механизм их действия [28]. Наиболее широко описана ингибиция ОМД-декарбоксилазы 6-азаурацилом и 6-азауридином, которые в клетке анаболизируются в 6-азаУМД [14, 28]. Установлено, что другой азааналог пиримидиновых соединений - 5-азаоротовая кислота ингибирует фосфорибозидацию оротовой кислоты [15].

Несмотря на обширный фактический материал по биохимии микробиологического превращения оротовой кислоты, отсутствуют систематические исследования по возможностям утилизации оротовой кислоты почвенными микроорганизмами. Недостаточно изучены пути трансформации оротовой кислоты с образованием урацила [3]. Гипотеза о прямом декарбоксилировании оротовой кислоты [9, 20] в этом случае не имеет достаточного экспериментального подтверждения. В данной работе представлен материал по исследованию способности бактериальной микрофлоры различных типов почв ЛатвССР утилизировать оротовую кислоту и некоторые физиологические и биохимические свойства этих бактерий.

Пробы почвы были взяты стерильными 50 мл пробирками. Метод выделения микроорганизмов, способных к утилизации оротовой кислоты в качестве единственного источника углеродного и азотного питания в жидкой среде (среда I) описан ранее [4]. Кроме того, нами использовались среды, где оротовая кислота добавлялась в 0,05% концентрации к полной синтетической среде (среда II). Средой III обозначена среда II, к которой добавлен 6-азаурацил в концентрации 0,05%. Основа синтетической среды описана ранее [4]. Используя среды II и III отбирались те накопительные культуры, где полярографически [16] было определено уменьшение концентрации оротовой кислоты. Количество бактерий, способных развиваться на полной синтетической среде и на среде I, определялось методом подсчета колоний на чашках Летри с агаризованной соответствующей средой. Оснее количество почвенных сапрофитов определялось посевом на рыбо-пептонном агаре (РПА) [6]. Полученные результаты обрабатывались статистически [1].

Для определения продуктов трансформации экзогенной оротовой кислоты, бактерии выращивались в жидкой питательной среде I, II или III в колбах Эрленмейера (100 мл среды в 0,5 л колбе или 20 мл среды в 100 мл колбе). Рост культур определялся фотоэлектроколориметрически на ФЭК-56, фильтр № 6, 3 мм кювета. Продукты трансформации идентифицировались методом бумажной хроматографии, электрофорезом, спектрофотометрией в УФ-лучах, способами, описанными ранее [2]. Продукты восстановления пиримидиновых соединений после бумажной хроматографии окрашивались п-диметиламинобензальдегидом (п-ДАБА) [11]. Были использованы следующие системы растворителей для бумажной хроматографии и буфера для электрофореза: I - изомасляная кислота:аммиак:вода - 59:4:37, II - изопропанол:аммиак:вода - 14:1:5, III - этилацетат:уксусная к-та:вода - 3:1:1, IV - бутанол:уксусная к-та:вода - 4:1:1, V - трет-бутанол:метил-

этилкетон:вода:муравьиная к-та - 44:44:11:0.26, VI -
- 0.05 М янтарная к-та:бура pH 5.0, VII - 0.05 М трис-
-гидрохлорид, pH 8.0.

Для получения бесклеточных экстрактов бактерий, выращенных в жидкой питательной среде, в конце лог-фазы роста их центрифугировали при 0°C, промывали холодным 0.1 М К-фосфатным буфером pH 7.2, содержащим 0.1 М NaCl и суспендировали в 0.02 исходного объема вышеупомянутого буфера с добавкой до 0.01 М концентрации дитиотреитола. Клеточная суспензия обрабатывалась ультразвуком на приборе УЗДН-1 (22 КГц, 0.5 МА, 7 раз по 1 мин с двухминутным интервалом). Остатки клеток и субклеточные структуры были отцентрифугированы при 105 тыс. g 40 мин при 0°C на центрифуге ВАК-60. Количество белка в супернатанте определялось методом Лоури [24].

Активность оротат- и урацилфосфорибозилтрансфераз и уридинкиназы определялась несколько модифицированными методами, описанными ранее [10,27]. Инкубационная смесь для определения активности фосфорибозилтрансфераз содержала в 0.3 мл - 30 мкМ К-фосфатного буфера pH 7.2, 30 мкМ NaCl, 6 мкМ MgCl₂, 3 мкМ дитиотреитола, 40 нМ фосфорибозилпирофосфата, 10 нМ оротовой кислоты или урацила - 2-¹⁴C и 1 мг белка бесклеточного экстракта. Инкубационная смесь для определения активности уридинкиназы содержала в 0.3 мл - 30 мкМ К-фосфатного буфера pH 7.2, 30 мкМ NaCl, 6 мкМ MgCl₂, 3 мкМ дитиотреитола, 10 нМ уридина-2-¹⁴C, 0.1 мкМ АТФ и 1 мг белка бесклеточного экстракта. Для прекращения реакции 0.1 мл инкубационной смеси переносили в 0.1 мл 2% раствора додецилсульфата натрия или в такой же объем 0.4 М ЭДТА. 0.15 мл полученной смеси наносили на хроматограмму, которую хроматографировали в системе I. После хроматографирования зоны, соответствующие пиримидиновым основаниям, нуклеотидам и нуклеозидам, были вырезаны и в них определена радиоактивность методом жидкостной сцинтилляции. Использовалась сцинтиляционная жидкость ЖС-107, измерения проводились на приборе SL - 200.

Включение оротовой кислоты $2\text{-}^{14}\text{C}$ в нуклеиновые кислоты определялось в клеточных суспензиях. Инкубационная смесь содержала в 0.2 мл - 20 мкМ K-фосфатного буфера pH 7.2, 20 мкМ NaCl, 4 мкМ MgCl_2 , 2 мкМ дигиотреитола, 10мМ оротовой кислоты 2-C^{14} и $3 \cdot 10^6 - 10^7$ бактериальных клеток. Через 5 мин инкубации смесь охлаждалась и к ней был добавлен равный объем холодной 0.8 Н HClO_4 , через 10 мин выдерживания на льду смесь центрифугировали, центрифугат 2 раза промывали в 1 мл холодной 0.4 Н HClO_4 , ресуспендировали в 0.3 мл воды, сушили на бумаге и определяли радиоактивность в кислото-нерастворимой фракции методом, описанным выше. Супернатант после первой центрифугации нейтрализовали KOH и подвергали хроматографическому анализу для определения радиоактивности в кислоторастворимых продуктах трансформации оротовой кислоты

Результаты и обсуждение

Пробы почв для количественного определения бактерий; способных утилизировать оротовую кислоту в качестве единственного источника азотного и углеродного питания, были взяты в окрестностях г. Риги и сгруппированы в 4 типа по качественным показателям. Величина pH всех проб находилась в пределах 6.2 - 8.0. Полученные результаты по разным типам почв показаны в таблице 1. Число бактерий, утилизирующих оротовую кислоту, варьирует в разных почвах, но составляет постоянную часть популяции всех бактерий, способных расти на синтетической среде (около 4.7%), которые в свою очередь составляют около 0.1% числа популяций, растущих на РПА.

Для выделения чистых культур бактерий, трансформирующих оротовую кислоту, использовали метод накопительных культур в жидких синтетических селективных средах, т.к. этим методом можно получить ферментативно более активные штаммы по сравнению с растущими на аналогичных агаризованных средах. В таблице 3, отражающей количество, систематическую принадлежность и биохими-

ческую активность полученных бактериальных штаммов не указаны типы почв, из которых те были изолированы, т.к. это не имело существенного влияния на получаемый результат. Все полученные 46 штаммов были определены до рода: всего 27 штаммов рода *Pseudomonas* и 19 штаммов рода *Mycobacterium*. 10 штаммов были определены до вида: *Pseudomonas nonliquefaciens*, 307, *P. scissa* 23, *P. fluorescens* 96, 134, 219, 227, *Mycobacterium album* 2, *M. flavum* 107, *M. lacticolum* 141, 192.

Номера после родового или видового определения штаммов были получены в ходе выделения. Среди изолированных штаммов, утилизирующих оротовую кислоту, оказались представители двух родов, немногочисленных по сравнению с родами *Bacillus*, *Bacterium*, обитающих в почве. Очевидно, что именно ферментные системы представителей родов *Pseudomonas*, *Mycobacterium* быстрее остальных микроорганизмов способны индуцироваться оротовой кислотой и пиримидиновыми соединениями вообще [4], что и обуславливает их преобладание в накопительных культурах на элективных средах. Наиболее активно оротовая кислота используется штаммами бактерий, изолированных на этом соединении в качестве единственного источника углеродного и азотного питания (Таблица 3). Изучение продуктов трансформации оротовой кислоты, которые объединены в таблице 4, показывает, однако, что эти штаммы катаболизируют оротовую кислоту по восстановительному пути. Только у двух штаммов из 26, выделенных на среде I, в присутствии экзогенной оротовой кислоты отмечено образование урацила. Более разнообразны пути трансформации оротовой кислоты в штаммах бактерий, изолированных на средах II и III (Таблица 4). Из штаммов, использующих оротовую кислоту в качестве дополнительного источника питания (среда II), 2 штамма накапливают в среде продукты только восстановительного катаболизма, а 4 - только урацил и продукты его деградации. Отмечено также образование УМФ и уридина в присутствии оротовой кислоты. Большинство штаммов бактерий, утилизирующих

оротовую кислоту в присутствии 6-азаурацила, накапливают в среде культивирования урацил. Сравнительно часто, у двух штаммов из восьми, отмечено накопление уридина. Продукты трансформации оротовой кислоты были идентифицированы по совпадению их R_f -величин в бумажной хроматографии в трех системах с соответствующим свидетелем, по их $U\lambda$ -спектрам поглощения, электрофоретической подвижности и цветным реакциям с пара-ДАБА. Физико-химическая характеристика продуктов трансформации оротовой кислоты представлена в таблице 5.

Таблица I

Количество бактерии (в тыс. на I г почвы)
выделенных на разных агаризованных питательных
средах

Тип почвы	Кол-во исслед. проб	Кол-во бак. тери, растущ. на РПА	Кол-во бактерий растущ. на агаризов. ПСС.		Кол-во бакт. раст. на агариз. среде выделения I	
			абс. числ	в %*	абс. ч	в%**
Дюнная	7	322±37	0.61±0.10	0.19	28±5 ^у	4.6
Лесная						
подзолист.	10	1543±62	1.41±0.21	0.09	71±6	5.0
Культиви- рованная подзол.	12	3271±105	29±0.33	0.09	139±9	4.7
Огородная, компост.	10	5239±112	4.8±0.35	0.09	223±12	4.6

Из каждого исследуемого разведения почвы были сделаны 3 посева на чашки Петри и для дальнейших вычислений взято среднее число выросших колоний, проценты вычислены из средних величин:

* - бактерии, растущих на РПА,

** - бактерий, растущих на ПСС,

у - число колоний на I г почвы.

Статистические расчеты проведены по описанной методике (I) .

Анализируя полученные данные о накоплении в среде культивирования продуктов трансформации оротовой кислоты, можно составить несколько схем, превращения этого соединения (Рис. I).

1	2
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , I 34, <i>Pseudomonas</i> sp. 24, 94, <i>Mycobacterium</i> sp. I 32	2
<i>Pseudomonas</i> sp. 3, II 4	3
<i>Mycobacterium</i> sp. 29, 53, I 91	4
<i>Mycobacterium</i> sp. 79	5
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 219	6
<i>Pseudomonas</i> sp. 59, <i>Mycobacterium lactico-</i> <i>lum</i> I 92	7
<i>Mycobacterium album</i> 2	8
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 227	9
<i>Mycobacterium</i> sp. 47, I 29	10
<i>Mycobacterium flavum</i> I 07, <i>Mycobacterium</i> sp. 62, I 23	11
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 96	12

Систематическая принадлежность штаммов определена по определителям Красильникова [5] и Беркли [8].

У некоторых из изученных штаммов (рис. 1) впервые показана трансформация экзогенной оротовой кислоты параллельно в дигидрооротовую кислоту и урацил. Уже ранее было описано наличие параллельных путей трансформации урацила в почвенных микобактериях [2]. В настоящей работе катаболизм урацила с образованием дигидроурацила и барбитуровой кислоты показан в одном и том же штамме представителей родов *Mycobacterium*, *Pseudomonas*. Изучение регуляции действия бактериальных ферментов в случае параллельных путей трансформации экзогенных соединений представляет интерес для дальнейшего исследования.

Использование экзогенной оротовой кислоты в качестве предшественника пиримидиновых соединений в нуклеиновых кислотах изучалось на примере трех штаммов, изолированных на различных средах. В суспензиях клеток было определено включение метки в кислотонерастворимый нуклеиновый материал из оротовой кислоты $2\text{-}^{14}\text{C}$. Результаты показаны в таблице 6. У всех штаммов, наряду с включением части радиоактивности в кислотонерастворимый материал, отмечен и параллельно протекающий процесс катаболизма оротовой кислоты $2\text{-}^{14}\text{C}$, о чем можно судить по накоплению радиоактивности в Rf зоне дигидрооротовой кислоты на бумажной хроматограмме. В пределах эксперимента увеличение концентрации оротовой кислоты

вызывало увеличение активности её катаболизма, при этом количество оротовой кислоты, включаемое в нуклеиновый материал существенно не изменялось, что косвенно свидетельствует об индуцибельности ферментов, участвующих в её деградации.

Были изучены возможности утилизации других пуриновых и пиримидиновых соединений в качестве единственных источников углеродного и азотного или только азотного питания полученными штаммами бактерий, трансформирующих оротовую кислоту. Проверялись возможности бактерий, изолированных на средах II и III, использовать оротовую кислоту в качестве единственного источника питания. Результаты объединены в таблице 7. Наивысшей ферментативной активностью, по отношению к другим пуриновым и пиримидиновым соединениям обладают штаммы, изолированные на среде I. Всеми изученными штаммами пуриновые соединения в качестве источников питания использовались на много хуже пиримидиновых. Штаммы, изолированные на средах II и III, плохо использовали и пиримидиновые соединения (включая и оротовую кислоту) в качестве единственных источников углеродного и азотного или азотного питания.

Штаммы бактерий, выделенные на среде III были резистентными к ингибции их роста 6-азаурацилом в присутствии оротовой кислоты. Была предпринята попытка выяснить механизм их резистентности. В физиологическом эксперименте было изучено влияние 6-азаурацила, 6-азауридина и 5-азаоротовой кислоты на рост этих бактерий в ПСС в присутствии и без оротовой кислоты. Результаты представлены в таблице 8. Таким образом, выделенные штаммы, резистентные к 6-азаурацилу, могут быть подразделены на несколько групп: I - резистентные к 6-азаурацилу и 6-азауридину, чувствительные к 5-азаоротовой кислоте (Табл. 8) - № 2,3,7; II - резистентные к 6-азаурацилу, чувствительные к 6-азауридину и 5-азаоротовой кислоте (Табл. 8 № 1,4,8); III - резистентные к 6-азаурацилу, 6-азауридину и 5-азаоротовой кислоте в

присутствии оротовой кислоты (Табл. 8 № 5,6).

Таблица 3

Штаммы бактерий, полученные методом накопительных культур на различных средах выделения

Среда выделения	Количество полученных штаммов	Кол-во оротовой к-ты в лаг-фазе %	Родовая принадлежность полученных штаммов
I	23	20±5	18 шт. <i>Pseudomonas</i> 8 шт. <i>Mycobacterium</i>
II	12	70±9	6 шт. <i>Pseudomonas</i> 6 шт. <i>Mycobacterium</i>
III	8	80±5	3 шт. <i>Pseudomonas</i> 5 шт. <i>Mycobacterium</i>

Количество оставшейся в среде культивирования оротовой кислоты определялось полярографически, принимая за 100% количество оротовой к-ты в начале культивирования. В среде выделения III при полярографической определении оротовой к-ты появился другой пик тока деполаризации с максимумом при 0,4-0,5 мВ соответствующий азаурацилу, который существенно не влиял на высоту пика тока деполаризации оротовой к-ты с максимумом при 0,7-0,8 мВ.

Среднее количество оротовой к-ты, оставшейся в среде культивирования определялось из показателей, полученных для отдельных штаммов после статистической проверки принадлежности этих показателей к исследуемой совокупности. Отмечено 5 случаев невыходения в исследуемую совокупность у штаммов, выделенных на среде I, два случая на среде II.

Оротовая кислота не влияла на резистентность или чувствительность к ингибиторам штаммов I и II группы. Далее была проанализирована активность оротат- и урицилфосфорибозилтрансфераз и уридинкиназы как представителей вышеуказанных групп микроорганизмов, резистентных к 6-азаурацилу. Полученные результаты представлены на рис. 2 (а, б, в). Следовательно, можно предположить, что резистентность к 6-азаурацилу и 6-азауридину штаммов I группы (представитель *Pseudomonas* sp. 114) обусловлено дефицитом ферментов, превращающих эти соединения в активную форму ингибитора - 6-азаУМФ. У штаммов II группы (представитель *M. flavum* 107) обнаружи-

вается пониженная активность урицилфосфорибозилтрансферазы, что и обуславливает их резистентность к 6-азаурацилу, в то время как 6-азауридин является активным ингибитором благодаря присутствию в штамме уридинкиназы, фосфорилирующей последнего в 6-азаУМФ.

Таблица 4

Продукты трансформации, идентифицированные в средах культивирования штаммов бактерий, утилизирующих экзогенную оротовую кислоту

Соединение	число штаммов, накапливающих данное соединение		
	I*	II	III
Дигидрооротовая к-та (Д Г О)	26	8	2
Уреидоянтарная к-та (У Я К)	4	I	I
Урацил (Ура)	3	10	7
Дигидроурацил (Д Г У)	3	5	3
-уреидопропионовая к-та (У П К)	I	2	I
Барбитуровая к-та (Б К)	I	2	3
Уридин (Уд)	-	2	2
Уридин-5-монофосфорная к-та (У М Ф)	-	I	-

* - среды, на которых выделены данные штаммы.

Не ясным остается механизм резистентности к 6-азаурацилу, 6-азауридину и 5-азаоротовой кислоте в присутствии оротовой кислоты штаммов III группы, у представителей которой (*Mycobacterium* sp. 129) обнаружена активность урицилфосфорибозилтрансферазы и сниженная активность оротатфосфорибозидилтрансферазы. Возможно, что в этом случае урацил образуется из оротовой кислоты (рис. I) путем биохимического превращения минуя стадию ОМФ. Это предположение требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

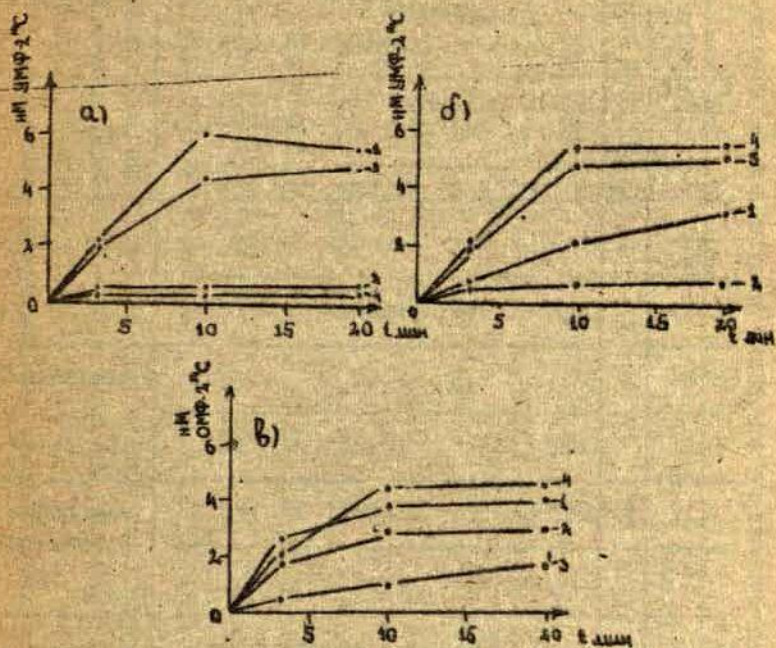


Рис. 2. Активность некоторых ферментов de novo биосинтеза пиримидиновых соединений у бактерий *Pseudomonas fluorescens* 134, (1), *Pseudomonas* sp. 114, (2), *Mycobacterium* sp. 129, (3), *Mycobacterium flavum* 104, (4).

- а) - активность урацил фосфорибозилтрансферазы.
 б) - активность уридин киназы.
 в) - активность оротат фосфорибозилтрансферазы.

Активность фермента определялась как количество $\mu\text{м}$ продукта, образованного из меченного углеродом- ^{14}C по второму атому цикла урацила, уридина и оротовой кислоты.

Некоторые физико-химические константы продуктов трансформации

оротовой кислоты.

№ п/п	СОЕДИНЕНИЕ	Р в системах					Э П*		макс. абсорбции УФ-ч. (нм)		Цвет. реакц. п-ДАБА
		I	II	III	IV	V	VI	VII	pH I	pH I4	
1.	Оротовая к-та (ОК)	0,33	0,15 ^У	0,22	0,45 ^У	0,19	+3,1	+6,8	280	286	-
2.	Дигидрооротовая к-та (ДГО)	0,43	0,05 ^У	0,39	0,53	0,58	+2,1	+5,7	-	235 ^{хУ}	Ж ^{хх}
3.	Уреидоантиарная к-та (УАК)	-	0,34 ^У	0,57	0,52	0,50	+1,4	+5,0	-	-	Ж
4.	Урацил (Ура)	0,69	0,60	0,61	0,60	0,51	-0,3	+0,5	259	284	-
5.	Дигидроурацил (ДГУ)	0,69	0,67	0,69	0,63	-	0	0	-	230 ^{хУ}	Ж ^{хх}
6.	в-уреидопропионо- вая к-та (УПК)	0,55	0,46	0,75	0,68	0,68	0	-0,5	-	-	Ж
7.	Уридин (УД)	0,52	0,55	0,40	0,38	0,43	0	0	262	262	-
8.	Уридин-5-монофос- форная к-та (УМФ)	0,41	0,10	0,12	0,20	0	+4,5	+7,2	262	261	-
9.	Барбитуровая к-та (БК)	0,48	0,42	0,59	0,50	0,47	+2,5	+6,1	-	259	0

191

Не указаны данные по мочевины, т.к. её накопление обнаруживалось и в отсутствии оротовой кислоты. Обозначения: Ж - желтый, О - оранжевый; примечание: х - электрофоретическая подвижность/ $\text{см}^2 \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1} \cdot 10^5$, хх - после обработки 0,5 нМ NaOH, У - растянутое пятно абсорбции, хУ - экстенция резко уменьшается во времени.

Включение оротовой кислоты 2-¹⁴C в кислотонерастворимую фракцию клетки и её деградация в некоторых штаммах бактерий

Штамм бактерий	Концентр. оротовой к-ты в инкубационной смеси (нМ)	Количество радиоактивности			
		в зоне ДГО		в кислотонерастворимой фракции	
		имп/мин	! в %	имп/мин	! в %
<i>Pseudomonas</i>	10	3200	3.2	28000	28.0
sp. 21	100*	12290	12.9	2240	2.2
<i>Mycobacterium</i>	10	2340	2.3	30210	30.2
sp. 62	100*	10190	10.1	3530	3.5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10	6000	6.0	21620	21.6
134	100*	19280	19.3	2000	2.0

* - 10 нМ оротовой к-ты 2-¹⁴C разведены 90 нМ немеченной оротовой к-ты.

Суммируя полученные данные можно представить общую схему биохимической трансформации экзогенной оротовой кислоты в почвенных бактериях родов *Pseudomonas*, *Mycobacterium* (рис.3).

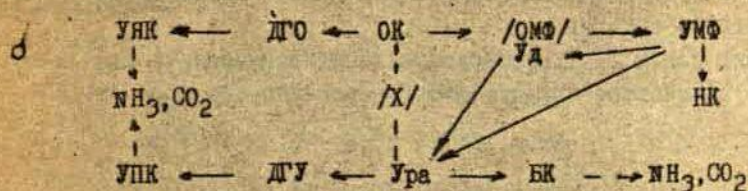


Рис. 3. Схема биохимической трансформации оротовой кислоты у почвенных бактерий.

НК - нуклеиновые кислоты.

В скобках показаны соединения, не идентифицированные в экспериментах.



Таблица 7

Утилизация пуриновых и пиримидиновых соединений в качестве единственных источников углеродного и азотного или только азотного питания штаммами бактерий, выделенных в присутствии оротовой к-ты

Соединение	Тип среды	Кол-во штаммов, утилизирующих данное соединение		
		I	II	III
Урацил	I	12 ^c	2	I
	II	20	4	2
Уридин	I	14	2	-
	II	21	3	-
У М Ф	I	13	1	-
	II	21	2	-
Цитозин	I	8	1	I
	II	21	3	I
Питидин	I	9	1	-
	II	20	4	-
Адеин	I	1	-	-
	II	3	-	-
Аденозин	I	1	-	-
	II	5	-	-
Оротовая к-та	I	26	2	I
	II	26	5	2

Тип среды I - пуриновое или пиримидиновое соединение в качестве единственного источника углеродного и азотного питания.

II Тип среды II - пуриновое или пиримидиновое соединение в качестве единственного источника азотного питания.

Таблица 8

Рост бактерий, выделенных на среде III в присутствии различных ингибиторов de novo биосинтеза пиримидиновых соединений

Состав среды Штамм бактерий	ПСС	ПСС + 6-азаурацил	ПСС + 6-азауридин	ПСС + 5-азаоротовая кислота	ПСС + оротовая кислота	ПСС + 6-азаурацил + оротовая кислота	ПСС + 6-азауридин + оротовая кислота	ПСС + 5-азаоротовая к-та + оротовая к-та
<i>Pseudomonas</i> sp. 92	+	+	-	-	+	+	-	±
<i>Pseudomonas</i> sp. 114	+	+	+	±	+	+	+	±
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> 227	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>Mycobacterium</i> sp. 403	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>Mycobacterium</i> sp. 47	+	-	-	±	+	+	+	+
<i>Mycobacterium</i> <i>album</i> 2	+	+	+	±	+	+	+	+
<i>Mycobacterium</i> sp. 129	+	-	-	±	+	+	+	±
<i>Mycobacterium</i> <i>flavum</i> 107	+	+	-	-	+	+	-	-

+ - рост через 48 часов по ФЭК выше 0.5

± - рост через 48 часов по ФЭК между 0.2 и 0.5

"-" - рост через 48 часов по ФЭК ниже 0.2

Оротовая кислота и все ингибиторы к среде культивирования добавлялись в концентрации 0.05%.

Выводы

I. Бактерии, способные утилизировать оротовую кислоту, введенную экзогенно в качестве единственного источника углеродного и азотного питания составляют около 5% от всех бактерий, вырастающих на синтетической среде в любом исследованном типе почв и принадлежат, в основном, к родам *Pseudomonas*, *Mycobacterium*.

II. Активность биохимической трансформации экзогенной оротовой кислоты и других пуриновых и пиримидиновых соединений зависит от среды, на которой были выделены соответствующие штаммы бактерий.

III. Представлена схема биохимических трансформаций экзогенной оротовой кислоты в почвенных бактериях. Установлена трансформация оротовой кислоты в дигидрооротовую кислоту и урацил в одном и том же штамме.

IV. Показано, что резистентность некоторых штаммов почвенных микроорганизмов к действию 6-азаурацила и 6-азауридина обусловлена дефицитом ферментов, катализирующих взаимопревращения пиримидиновых соединений.

Литература

1. Liepa I. *Matemātiskās metodes biologiskajos pētījumos*. R., 1971, 26, 46.
2. Витол М.Я. - В кн.: Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами. Р., 1972, 15.
3. Витол М.Я., Шапошников В.Н., Швачкин Д.П. - Докл. АН СССР, 1967, 174, 1202.
4. Витол М.Я., Яановская Б.М. - В кн.: Вопросы биологии. Р., 1969, 131.
5. Красильников Н.А. *Определитель бактерий и актиномицетов*. Л.-М., 1949.
6. Лабинская А.О. *Микробиология с техникой микробиологических исследований*. М., 1972, 399.
7. *Bergeys manual of determinative bacteriology*. 8th edition. Baltimore, William-Wilkins Company, 1975.

8. Buchowicz J., Reifer I.-Acta Biochim.Polonica, 1961, 8, 25.
9. Buchowicz J., Reifer I.-Acta Biochim.Polonica, 1962, 9, 63.
10. Čihák A., Vesely J., Šorm F.-Coll.Czech Chem. Comm., 1968, 33, 1778.
11. Fink R.M., Cline R.E., McGaughey K., Fink K.-Anal. Chem., 1956, 28, 4.
12. Friedman H.C., Vennesland B.-J.Biol.Chem., 1958, 233, 1398.
13. Friedman H.C., Vennesland B.-J.Biol.Chem., 1960, 235, 1526.
14. Handschumacher R.E.-J.Biol.Chem., 1960, 235, 2917.
15. Handschumacher R.E.-Cancer Res., 1963, 23, 634.
16. Icha F.-Pharmazie, 1959, 14, 684..
17. Hulbert R.B., Van R., Potter T.-J.Biol.Chem., 1954, 209, 1.
18. Karpoor M., Waygood E.R.-Can.J.Biochem., 1965, 43, 149.
19. Kasbekar D.K., Nagabushanam A., Greenberg D.M.-J.Biol.Chem., 1964, 239, 4245.
20. Kulhanek M., Svatek E., Tadra M.-Folia Microbiol., 1965, 10, 142.
21. Lieberman I., Kornberg A.-Fed.Proc. 1953, 12, 239.
22. Lieberman I., Kornberg A., Simms A.S.-J.Am.Chem. Soc., 1954, 76, 2854.
23. Lieberman I., Kornberg A., Simms A.S.-J.Biol.Chem., 1955, 215, 403.
24. Lowry O.M., Rossenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.-J.Biol.Chem., 1951, 193, 265.
25. Pynadath T., Fink R.M.-Arch.Biochim.,Biophys., 1967, 118, 185.
26. Reynolds E.S., Lieberman I., Kornberg A.-J.Bacteriol., 1959, 69, 250.
27. Skoldo O.-J.Biol.Chem., 1960, 235, 3277.
28. Škoda J.-Handbook Exp.Pharm., 1976, 38, 348.

29. Umezu K., Amaya T., Yoshimoto A., Tomita K.-
J. Biochem., 1971, 70, 249.
30. Wang T.P., Lampen J.O.-J. Biol. Chem., 1952, 194, 779.
31. Wolcott J.E., Ross C.-Bioch., Biophys. Acta, 1966,
182, 532.
32. Wu R., Wilson D.W.-J. Biol. Chem., 1956, 233, 195.
33. Yates R., Pardee A.B.-J. Biol. Chem., 1957, 227, 677.

Мушкниекс И.О., Витол М.Я.

ЛГУ им. П.Стучки (Рига.)

ТРАНСФОРМАЦИЯ ЭКЗОГЕННЫХ ЦИТИДИН- И ГУАНОЗИН-
5'-МОНОФОСФАТОВ ПОЧВЕННЫМИ МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ
ГРИБАМИ I

Способность дезаминировать адениловые нуклеотиды присуща представителям различных групп микроорганизмов [9, 5, 20]. Существование аналогичных реакций до сих пор не показано на примере других рибонуклеотидов, содержащих свободную аминогруппу - цитидин- и гуанозинмонофосфатов (в работе исследовались только 5'-монофосфаты). Ожидаемые продукты гидролитического дезаминирования ЦФ и ГФ - уридин- и ксантозинмонофосфаты являются естественными продуктами метаболизма любой клетки. УФ обязательный промежуточный продукт биосинтеза *de novo* всех пиримидиновых нуклеотидов [18]. Дезокси-УФ и дезокси-ЦФ могут образоваться как у бактерий [7, 10, 17], так и у эукариотов [16] путем дезаминирования дЦФ, однако аналогичные реакции на примере невозстановленных цитидиловых нуклеотидов не известны. КФ образуется в клетке в процессе биосинтеза ГФ из ИФ [3, 13, 14]. Известна реакция и негидролитического дезаминирования ГФ в ИФ [12, 15, 21]. У некоторых бактерий с нарушенным биосинтезом ГФ отмечено накопление КФ в среде культивирования [6]. Исследования по метаболизму ЦФ и ГФ в основном были проведены на мутантных микроорганизмах [7, 8, 14, 17].

I В работе использовались следующие сокращения:

ЦФ - цитидинмонофосфат, УФ - уридинмонофосфат, ИФ - инозинмонофосфат, ГФ - гуанозинмонофосфат, Ц - цитидин, У - уридин, Г - гуанозин, К - ксантозин, Цз - цитозин, Ур - урацил, Гу - гуанин, Кс - ксантин, дЦФ - дезоксицитидинмонофосфат, дУФ - дезоксиуридинмонофосфат, КФ - ксантозинмонофосфат.

В этой работе представлен материал по изучению трансформации экзогенных ЦФ и ГФ, взятых в качестве единственных источников азотного питания* в развивающихся культурах, суспензиях ГФ и экстрактах ГФ почвенных микроскопических грибов**.

Методика

КФ был приготовлен из ГФ дезаминированием с HNO_2 по методу Клейнзеллера [11]. Остальные нуклеотиды, нуклеозиды и основания - производства фирмы *Reanal*.

Способность к трансформации ЦФ и ГФ была проверена у штаммов грибов, развивающихся на минеральной среде I следующего состава: K_2HPO_4 - 0,05%, KCl - 0,3%, MgSO_4 - 0,01%, глицерин - 3 мл/л, янтарная к-та - 0,1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,1%, смесь микроэлементов - 1 мл/л. Состав смеси микроэлементов описан ранее [2]. Эти штаммы были получены путем посева разведений почвенных суспензий на чашках Петри с агаризованной средой I, содержащей 100 ед/мл стрептомициносulfата. Чистые культуры получали последующим пересевом из отдельных колбоний на аналогичную среду. Бактериальная чистота полученных штаммов грибов была проверена путем микроскопирования и посева на рыбно-пептонный агар. Систематическая принадлежность полученных штаммов была определена по описанной методике [1,4].

Первичная проверка к способности трансформировать ЦФ и ГФ полученными культурами грибов была проведена в пробирках, которые содержали 2 мл среды I, где сульфат аммония был заменен 0,05% соответствующего нуклеотида (среда У). Выращивание культур грибов всегда проводилось в термостате при 28°C . При появлении роста грибов в среде У по сравнению с контролем, которым служил посев на среду I без сульфата аммония среда II, их биомассу фильтровали и в среде культивирования проводили анализ продуктов трансформации нуклеотидов.

Для изучения продуктов трансформации ЦФ и ГФ

* - далее в тексте: трансформация ЦФ и ГФ

** - далее в тексте: грибы

в препаративных количествах и для получения больших количеств биомассы грибов, отобранные по предварительным данным штаммы выращивали в 100 мл жидкой питательной среды в 500 мл колбах Эрленмейера на лабораторной качалке (120 об/мин). В этих экспериментах варьировался состав питательной среды. В тексте варианты сред обозначены следующим образом: среда III - среда I + 0,05% ЦФ или ГФ, среда IV - среда I + 0,05% цитидина или гуанозина, среда VI - среда II + 0,05% цитидина или гуанозина.

Разделение и идентификация продуктов трансформации ЦФ и ГФ проводилась методами хроматографии на бумаге, электрофореза и УФ-спектрометрии [3]. Использовались следующие системы растворителей для бумажной хроматографии и буфера для электрофореза: I - изомасляная кислота:аммиак:вода - 59:4:37 ; н-бутанол:ледяная уксусная кислота:ацетон:аммиак:вода - 35:15:25:5:20 ; III - н-бутанол:муравьиная к-та:вода - 77:13:10 ; IV - 0,05 М янтарная к-та:бура (рН 5.0) ; V - 0,05 М трис-гидрохлорид рН 8.0.

Для получения суспензий грибных гиф отфильтрованная биомасса отмывалась 0.1 М К-фосфатным буфером рН 6.0, содержащим 0.1 М NaCl. У промытой биомассы грибов определяли влажный вес, который при использовании фильтрации с помощью вакуумного насоса, по нашим наблюдениям, достоверно коррелирует с постоянным сухим весом. Промытая биомасса была ресуспандирована в 4-6 мл того же буфера с добавкой до 0.01 М концентрации дитиотреитола. Агрегаты гиф были размельчены кратковременной обработкой ультразвуком на приборе УЗДН-1 (22 кГц, 0.4 мА, 2 мин.). Продолжительная обработка ультразвуком привела к разрушению гиф (22 кГц, 0.5 мА, 3 x 2 мин., 8°C.). Для получения экстракта гиф, остатки клеток после обработки ультразвуком были отцентрифугированы при 30.000^{об/мин} 40 мин при 0°C.

Инкубационные смеси в исследовании биохимических превращений ЦФ и ГФ в экстрактах и суспензиях гиф содержали в 0.5 мл: 6 мкМ нуклеотида, 50 мкМ К-фосфатного буфера рН 6, 50 мкМ NaCl, 10 мкМ MgCl₂, 5 мкМ дитиотреи-

тола и 0,35 мл суспензии клеток или бесклеточного экстракта. Инкубации проводились при 28°C. На 10 и 30 минуте из инкубационных смесей были отобраны пробы по 0.2 мл, которые резко охлаждали на льду, добавляли HCl до конечной концентрации 0,3 N и выдерживали 10 мин при 0°C. После того пробы нейтрализовали KOH и образовавшийся осадок центрифугировали 10 мин при 5.000 ^{об.} ~~мин.~~. Объем супернатанта составлял 0.2 - 0.25 мл, из которых 0.15 мл наносились на хроматографическую бумагу. Для проведения электрофореза использовали 0.05 мл обработанной инкубационной смеси.

Результаты

Способность трансформировать ЦФ и ГФ была проверена у 152 штаммов грибов, изолированных из почвы окрестностей г. Риги. Большинство из них оказались способными трансформировать ЦФ и ГФ с накоплением промежуточных продуктов трансформации в среде питания. Были обнаружены и штаммы грибов, которые, используя азот ЦФ и ГФ в качестве источника питания, продуктов трансформации в среде питания не накапливали. Результаты предварительного отбора штаммов грибов показаны в таблице I.

Таблица I

Трансформация ЦФ и ГФ в качестве единственного источника азотного питания в почвенных микроскопических грибах

Источник азота	Число проверенных штаммов	Из них:		Характеристика накапливаемых продуктов трансформации		
		Усваивают азот ЦФ и ГФ	Накапливают метаболиты ЦФ и ГФ	Нуклеотиды	Нуклеозиды	Основания
ЦФ	152	127	111	8	65	43
					3	
ГФ	152	134	115	5	71	38
					1	

Цифры в последней графе таблицы обозначают коли-

чество штаммов, накапливающих те или иные продукты трансформации. Отсутствие вертикальной расчленяющей линии указывает на накопление продуктов трансформации разных типов, так 65 штаммов в процессе трансформации ЦФ накапливают только нуклеозиды, а 43 штамма нуклеозиды и основания.

На этом этапе исследований не была точно установлена природа продуктов трансформации ЦФ и ГФ, а лишь определена их принадлежность к нуклеотидам, нуклеозидам или основаниям по результатам бумажной хроматографии. Для дальнейших исследований были отобраны 7 штаммов грибов наиболее активно накапливающих нуклеотиды среди продуктов трансформации ЦФ и ГФ. Для этих штаммов грибов была определена систематическая принадлежность: штаммы, трансформирующие ЦФ - *Aspergillus fumigatus* 34, *Aspergillus* sp. 63, *Penicillium* sp. II, *P. viridicatum* 7, трансформирующие ГФ - *Aspergillus* sp. 39, *A. fumigatus* 9, *Penicillium* sp. 6. Как и следовало ожидать, способ выделения чистых культур грибов на бедных синтетических средах способствовал преобладанию быстрорастущих спорообразующих представителей родов *Aspergillus*, *Penicillium* в полученном материале. Штаммы грибов, способные накапливать нуклеотиды в процессе трансформации как ЦФ, так и ГФ, обнаружены не были.

Для более точной характеристики продуктов трансформации ЦФ и ГФ отобранные 7 штаммов грибов были выращены на разных синтетических средах, содержащих ЦФ и ГФ, а также цитидин и гуанозин в качестве единственного или дополнительного источника азотного питания. Некоторые физико-химические константы, использованные в определении продуктов трансформации ЦФ и ГФ приведены в таблице 2. Полученные результаты отображены в таблице 3. Из результатов видно, что у исследованных штаммов гидролитическое дезаминирование ЦФ и ГФ происходит при культивировании на средах, содержащих эти соединения в качестве единственного источника и дополнительного источника

азотного питания. Деаминация гуанозина, судя по продуктам его трансформации, происходит у исследуемых штаммов только после дерибозидации, на стадии гуанина. Ксантозин в случаях трансформаций ГФ, очевидно, образовался из КФ, но не из гуанозина. Цитидин же деаминировался в наших опытах преимущественно на стадии нуклеозида с образованием уридина, лишь в некоторых случаях отмечена его параллельная трансформация в цитозин. Все исследованные штаммы очень слабо росли на среде II., не содержащей источников азотного питания, потребность в азоте только частично была компенсирована ЦФ и цитидином у штаммов, трансформирующих эти соединения (Табл.3).

Таблица 2

Некоторые физико-химические константы продуктов трансформации ЦФ и ГФ

№ пп	Соединение						Макс. поглощение в УФ-лучах (нм)	
		I	II	III	IV	V	ФН I	ФН II
1.	ЦФ	0.56	0.30	0.08	+2.1	+3.5	280	272
2.	Цитидин	0.80	0.56	0.26	0	+0.3	280	271
3.	Цитозин	0.93	0.78	0.35	-1.2	+0.8	274	267
4.	УФ	0.41	0.37	0.13	+4.5	+7.2	262	261
5.	Уридин	0.62	0.61	0.33	0	0	262	262
6.	Урацил	0.75	0.71	0.52	-0.3	+0.5	284	259
7.	ГФ	0.39	0.18	0.05	+1.8	+2.7	257	256
8.	Гуанозин	0.61	0.45	0.21	-0.5	+0.5	256	264
9.	Гуанин	0.76	0.55	0.27	0	-0.5	248 275	273
10.	КФ	0.32	0.14	0.09	+5.0	+7.5	263	266
11.	Ксантозин	0.50	0.35	0.24	0	0	263	278
12.	Ксантин	0.57	0.42	0.33	-0.8	+0.5	267	277
13.	Мочевая к-та	0.43	0.33	0.41	+2.7	+6.8	283	292

* - электрофоретическая подвижность.

Пробы, содержащие продукты трансформации ГФ перед хроматографией на бумаге были доведены до 0.1 концентрации NaOH. Мочевая кислота среди продуктов трансформации ГФ не была обнаружена.

Таблица 3

Рост и накопление продуктов трансформации ЦФ, ГФ
Ц и Г у некоторых штаммов грибов

штамм	I*		2		3		4		5		6		7	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
ХУ	ЦФ								ГФ					
среда I	5.6	-	8.5	-	7.4	-	8.0	-	8.0	-	1.5	-	7.5	-
среда II	5.0	-	1.0	-	1.2	-	1.2	-	0.	-	0.3	-	0.7	-
среда III	7.2	Ц У	6.8	Ц У	23.1	УФ Ц У	30.0	УГ Ц Ур	30.0	КГ Гу Кт	3.5	КФ Г К	18.	КФ Г К
среда IV	6.5	У	7.2	У Цз Ур	25.2	У Ур	11.2	Ур	28.2	Гу Кт	3.6	Гу Кт	20.0	Гу Кт
среда У	1.	УФ У Ур	5.1	УФ Ц У Ур	4.2	Ц У Ур	4.3	УФ Ц У Ур	15.0	КФ Гу Кт	3.8	Г К Гу Кт	20.5	КФ Г Кт
среда VI	1.2	Цз Ур	4.2	У Цз Ур	5.0	У Цз Ур	4.0	У Ур	16.6	Гу Кт	3.4	Гу Кт	18.6	Гу Кт

ж - обозначения штаммов: *Aspergillus* sp.63-2, *Aspergillus* sp.39-6, *A.fumigatus* 34-I, *A.fumigatus* 9-5, *Penicillium* sp.II-4, *Penicillium* sp.60-7, *P.viridicatum* 7-3.
I - влажная биомасса отфильтрованного гриба (в мг/мл среды),
II - продукты трансформации, обнаруженные в среде культивирования,
ХУ - источник азота, на котором выделен штамм.

Рост штаммов грибов, трансформирующих ГФ, был заметно усилен по сравнению с ростом на среде I, в присутствии ГФ и гуанозина как в качестве дополнительных, так и в качестве единственных источников азота. Этим исследуемые ГФ-трансформирующие штаммы непоминают мутантов, дефицитных в биосинтезе гуаниновых соединений.

Накопление промежуточных продуктов этого биосинтеза на средах I и II, как это отмечалось в случае мутации, не было обнаружено.

Эксперименты с суспензией гиф грибов подтвердили наличие УФ и КФ среди продуктов трансформации ЦФ и ГФ соответственно (Табл. 4.).

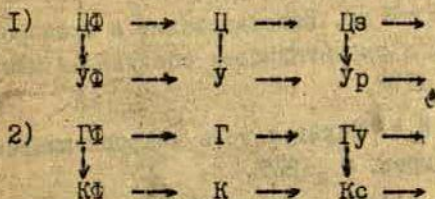
Таблица 4
Продукты трансформации ГФ и ЦФ, обнаруженные в суспензиях клеток и бесклеточных экстрактах некоторых штаммов почвенных микроскопических грибов

Источник азота при выделении штамма	Ц Ф								Г Ф							
	I		2		3		4		5		6		7			
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II		
Среда I	УФ У	Ц У	УФ У	У Ур	У Ур	У Цз	У Ур	У Ур	КФ Г	Г Гу	КФ Г	Г Гу	Г К	Г Гу		
Среда III	УФ Ц	У Ур	Ц У	Ц Ур	Ц Ур	Ц У	УФ Цз	Ур Ур	КФ К	К Г	Г К	Кт Гу	КФ К	Г Гу		
Среда IV	Ц Цз	У Ур	УФ У	Ц У	УФ У	Ц У	УФ У	Ц У	КФ К	Г Гу	КФ Г	Г Гу	Г К	Г Кт		
Среда V	Ц У	У Ур	УФ Ур	Ц У	У У	УФ Ц	У У	Г Кт	Г Кт	КФ К	Гу Кт	КФ К	Г Г	Г Кт		
Среда IV	УФ У	У У	УФ У	У У	Ц У	УФ Ц	У У	КФ Г	Г К	Г К	Г Гу	КФ Г	Г К	Г Кт		

I - суспензия гиф;
II - экстракт гиф.

Накопление дезаминированных нуклеотидов, нуклеозидов и оснований в инкубате суспензий гиф с ЦФ и ГФ было обнаружено независимо от среды культивирования, на которой выращивался штамм гриба. Трансформация нуклеотидов, судя по накопленным продуктам, не изменялась в зависимости от типа среды, на которой был выращен штамм.

Для определения конститутивности или индуцибельности ферментов, катализирующих трансформацию ЦФ и ГФ необходимы дальнейшие исследования с применением не только качественных, но и количественных методов детекции их активности. В экстрактах грибов практически не было обнаружено накопление УФ и ГФ. Здесь удалось обнаружить дезаминирование только на стадии нуклеозидов или оснований. Вероятно, объяснение этого явления в локализации ферментов, дезаминирующих нуклеотиды на клеточных мембранах. Сохранение в экстракте грибов нуклеозиддезаминирующей и потеря в нем нуклеотиддезаминирующей активности поддерживает предположение, что эти превращения катализируются двумя разными ферментами, а не одним менее специфичным ферментом. Анализ продуктов трансформации ЦФ и ГФ показывает, что у одних и тех же исследуемых штаммов грибов происходит как дезаминирование, так и дефосфорилирование нуклеотидов, как дезаминирование, так и дерибозидирование нуклеозидов, т.е. трансформация ЦФ и ГФ идет параллельными путями (см. рис.).



Пути трансформации ЦФ и ГФ у грибов

Дальнейшая трансформация оснований нами не изучалась.

Для решения вопроса о том, дезаминируется ли ЦФ и ГФ под воздействием особых дезаминаз этих нуклеотидов или за это превращения ответственны ферменты уже известных путей биохимических превращений, необходимы дальнейшие исследования. Однако, надо отметить, что цитидин и гуанозин дезаминазы, по имеющимся литературным данным, весьма специфичны и не катализируют дезаминирование нуклеотидов [19]. ЦФ может, хотя и с малой эффективностью, служить субстратом для известной уже ДЦФ дезаминазы. КФ может образоваться из ГФ через стадию ИФ путем уже

описанных биохимических превращений [12,15,21], но в наших экспериментах образование ИФ из ГФ нигде не было отмечено.

Выводы

1. У грибов *Aspergillus* sp.63, *A.fumigatus* 34, *Penicillium* sp. II, *P.viridicatum* 7 среди продуктов трансформации ЦФ доказано наличие УФ.

2. У грибов *Aspergillus fumigatus* 9, *Penicillium* sp.60, *Penicillium* sp. 9 среди продуктов трансформации ГФ доказано наличие КФ.

3. Разработаны схемы путей трансформации и показано наличие параллельных путей трансформации ЦФ и ГФ у грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium*.

Литература

1. Билая В.И. Основы общей микологии. К., 1974.
2. Вилкс С.Р. Автореф.дис. на соиск. учен. степени канд. биол. наук. Р., 1972.
3. Витол М.Я.-В кн.:Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами. В, 1972.
4. Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов. М., 1967.
5. Chung S., Aida K., Uemura T.-*J.Gen Appl.Microbiol.*, 1967, 13, 237.
6. Damein A.L.-*Appl.Microbiol.*, 1965, 13, 757.
7. Flak J.G., Cohen S.S.-*J.Biol.Chem.*, 1959, 234, 2981.
8. Gehring L.B., Magasanik B.-*J.Am.Chem.Soc.*, 1955, 77, 4685.
9. Iates M.G.-*Biochem.*, 1969, 1, 3965.
10. Keck K., Mahler H.R., Fraser D.-*Arch.Biochim.Biophys.*, 1960, 86, 85.
11. Kleinzeller A.-*Biochem.J.*, 1942, 36, 729.
12. Turemitsu H.K., Udaka S., Moyed H.S.-*J.Biol.Chem.*, 1964, 239, 3425.

13. Lagerkvist U., -J. Biol. Chem., 1958, 233, 138.
14. Magasanik B., Brook W.S., -J. Biol. Chem., 1954, 206,
83.
15. Maley G.F., Maley P., -J. Biol. Chem., 1968, 243, 4506.
16. Magasanik B., Karabian D., -J. Biol. Chem., 1960, 235,
2672.
17. Neuhard J., Thomassen E., -J. Bacteriol., 1971, 105,
657.
18. O'Donovan G.A., Neuhard J., -Bact. Rev., 1970, 34,
278.
19. Wang T.P., Sable H.Z., Lampen J.O., -J. Biol. Chem.,
1950, 184, 1727.
20. Wolfenden R., Sharpless T.K., Allan R., -J. Biol.
Chem., 1967, 242, 977.
21. Zimmerman E.F., Magasanik B., -J. Biol. Chem., 1964,
239, 293.

Витол М.Я., Вилке С.Р., Лишман А.Я.

ЛГУ им. П.Стучки (Рига)

ОБРАЗОВАНИЕ Ц-3', 5' АМФ и ДЦ-3', 5' АМФ ИЗ
ЭКЗОГЕННОГО АТФ И Д-АТФ БАКТЕРИЯМИ
PSEUDOMONAS FLUORESCENS 310

Важнейшая роль цикло-АМФ (ц-3', 5'-АМФ) в регуляции биохимических процессов всех живых организмов неоспоримо доказана [1, 2, 3]. В клетках ц-3', 5'АМФ образуется из АТФ под влиянием фермента аденилатциклазы, который выделен из тканей высших организмов и микроорганизмов.

Показана возможность использования микроорганизмов в качестве продуцентов цикло-3', 5' АМФ. Из *Brevibacterium liquefaciens* получен частично очищенный препарат аденилатциклазы, с помощью которого осуществлено превращение АТФ в ц-3', 5' АМФ, а д-АТФ - в дц-3', 5' АМФ [4, 5, 6]. Повышенное количество ц-3', 5' АМФ обнаружено в культуральной жидкости некоторых бактерий при добавлении к среде разных соединений [7, 8, 9].

Нами было обнаружено появление ц-3', 5' АМФ в культуральной жидкости *Pseudomonas fluorescens* 310 во время роста этой культуры в синтетической среде при добавлении 0,1% АТФ.

Объект и методы

Объектом исследования служили бактерии *Pseudomonas fluorescens* штамм 310, выделенный из воды реки Гауя ЛатвССР. Инкубирование проводили в условиях принудительной аэрации на качалках (100 об/мин) при 27°C в питательной среде I следующего состава (%): KH_2PO_4 - 0,05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,003, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,1, янтарная к-та - 0,1, глицерин - 0,4, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,0001, дрожжевой автолизат - 0,01, смесь микроэлементов - 1 мл/л, АТФ - 0,1. Прирост биомассы определяли турбодиметрическим методом на фотоэлектроколориметре ФЭК-М56 (510 - 550 нм), pH среды на pH-метре pH-262. В конце экспоненциальной фазы культуральную жидкость нейтрализовали до pH 7 и биомассу отделяли центрифугированием.

Для разделения пуриновых соединений культуральную жидкость препаративно разделяли хроматографированием на бумаге FN -12 в системе I. Обнаруженные метаболиты ре-хроматографировали и идентифицировали сравнением их Rf с Rf "свидетелей" в системах: 1 - н-бутанол:ацетон:ледяная уксусная к-та:-5% NH₄OH:вода - 7:5:3:3:2 ; 2 - этанол:1 М ацетат аммония - 75:30, pH 7.5 ; 3 - (NH₄)₂CO₃:изопропанол:вода - 19,6г:750:250 ; 4 - насыщенный (NH₄)₂SO₄:1 М ацетат натрия:изопропанол-80:18:2 и снятием спектров поглощения на спектрофотометре Sperecord UV-Vis.

Идентичность ц-3',5'АМФ дополнительно доказана реакцией образования 5'-АМФ и 3'-АМФ после его гидролиза в 0,2 М Ва(ОН)₂ в течение 30 мин. [II], а дц-3',5'АМФ - образованием аденина в результате гидролиза этого соединения в 1 М HCl при 100°C 3-30 мин. и устойчивостью при гидролизе в течение 2 часов при 50°C [I2].

Результаты и их обсуждение

При культивировании *P. fluorescens* 310 в указанной среде с добавлением экзогенного АТФ (0,1%) из культуральной жидкости были выделены новые У₂-поглощающие соединения А_I - А₆ (пояснения в таблице I). В идентичных условиях при добавлении экзогенного дАТФ было обнаружено образование соединений А₇ - А_{II}:

Данные по идентификации соединений А_I - А_{II} показаны в таблице I.

Как видно из таблицы I, наличие ц-3',5'АМФ в культуральной жидкости обнаружено только в присутствии АТФ, а дц-3',5'АМФ - в присутствии д-АТФ. В контрольной среде или при добавлении АМФ, аденозина и аденина образование циклофосфатов не обнаружено. Этот факт указывает на то, что у исследованного штамма *P. fluorescens* 310 экзогенный АТФ не влияет на образование ц-3',5'АМФ посредством способных проникать в клетку катаболитов - аденозина или аденина, хотя стимулирующий эффект этих соединений был установлен у бактерий *Corynebacterium murisepticum*

и *Microbacterium* sp. [7,8]. Интересным является и тот факт, что одновременно с появлением ц-3',5' АМФ в культуральной жидкости было обнаружено накопление пирофосфата. Известно, что аденилатциклаза в клетке находится близко к поверхности. Возможно, что клетки *P. fluorescens* 310 наряду с тривиальным превращением экзогенного АТФ через АДФ и АМФ способны частично циклизовать его с отщеплением пирофосфата.

Таблица I

Некоторые физико-химические константы метаболитов, полученных в результате превращения экзогенных АТФ и д-АТФ

Соединения		Rf в системах				Макс. поглощ. УФ-света	
Метаболиты	Свидетели	I*	2	3	4	pH I	pH II
A ₁	ц-3',5' АМФ	0,45	0,46	0,46	0,13	256	259
A ₂	АТФ	0,07	0,06	0	0,43	257	259
A ₃	АДФ	0,10	0,08	0	0,33	257	259
A ₄	АМФ	0,31	0,17	0,08	0,19	257	259
A ₅	Ад	0,58	0,61	0,70	0,15	257	260
A ₆	А	0,59	0,51	0,74	0,13	263	269
A ₇	д-АТФ	0,09	0,08	0	0,33	258	260
A ₈	д-АДФ	0,18	0,12	0	0,28	258	260
A ₉	д-АМФ	0,36	0,19	0	0,25	258	260
A ₁₀	дц-3',5' АМФ	0,55	0,55	0,49	0,10	257	259
A ₁₁	д-Ад	0,61	0,72	0,82	0,12	258	260
	3'	0,31	0,17	0,08	0,19	257	259

При изучении динамики роста *P. fluorescens* 310 прослежено появление метаболитов в культуральной жидкости при добавлении к среде экзогенных АТФ, д-АТФ и также АМФ, аденозина и аденина.

* - системы смотреть в методике

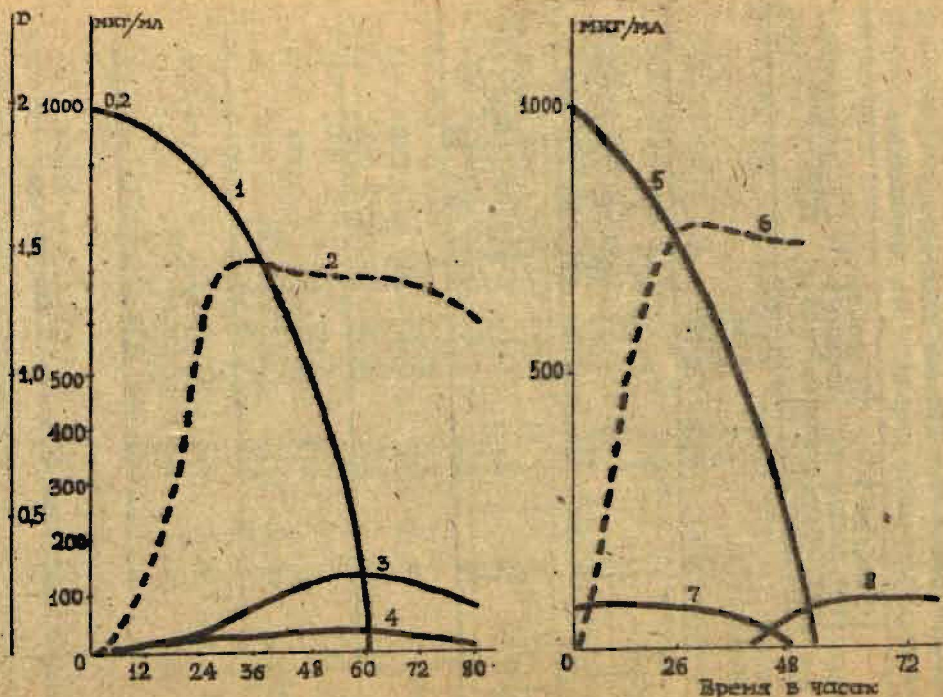
Таблица 2

Прирост биомассы, изменение pH среды и обнаруженные метаболиты в культуральной жидкости при культивировании *Pseudomonas fluorescens* 310 на средах, содержащих аденин и его производные

Среда	Продолжительность инкубирования	pH среды	Прирост биомассы (г/л)	Метаболиты
Контрольная (среда I)	0	7,2	0,05	
	24	7,5	0,33	
	48	8,3	0,60	
	72	8,3	0,51	
Среда I + + 0,1% АТФ	0	7,2	0,05	АТФ
	24	6,3	1,45	АТФ, АДФ, АМФ, ц-35АМФ
	48	7,8	1,40	АТФ, АДФ, АМФ, ц-35АМФ
	72	8,7	1,40	АМФ, Ад. А. ц-35АМФ
Среда I + + 0,1% д-АТФ	0	7,2	0,05	д-АТФ, д-АДФ, д-АМФ
	24	7,0	1,10	д-АТФ, цп-35АМФ.
	48	7,9	1,55	д-АТФ, д-АДФ, д-АМФ.
	72	8,6	1,51	цп-35АМФ, д.А.
Среда I + 0,1% АМФ	0	7,2	0,05	АМФ
	24	7,7	0,40	АМФ, Ад. А, Гкс.
	48	8,0	0,59	АМФ, Ад. А, Гкс.
	72	8,4	0,65	АМФ, Ад. А, Гкс.
Среда I + 0,1% аденозин	0	7,2	0,05	Ад
	24	7,5	0,50	Ад, А, Гкс.
	48	8,0	0,65	А, Гкс
	72	8,0	0,65	А, Гкс
Среда I + 0,1% аденин	0	7,2	0,05	А
	24	7,2	0,50	А, Гкс
	48	7,5	0,60	А, Гкс
	72	8,0	0,63	А, Гкс

Прозеженные нами бактерии *P. aurantiaca*, *P. putida* и *Bacterium agile* в идентичных условиях из АТФ циклофосфата не образуют.

Изменения концентрации исходных веществ (АТФ, д-АТФ) и образовавшихся веществ изображены на рисунке.



Накопление биомассы (2,6), содержание АТФ (1), АМФ (3),
 п-3',5'АМФ (4), д-АТФ (5), д-АМФ (7), ди-3',5'АМФ (8) в жидкости при культивировании
Pseudomonas fluorescens

Судя по литературным данным, образование и накопление α -3',5'AMP или α -дц-3',5'AMP из соответствующих пирофосфатов в культуральной жидкости развивающимися бактериями нами показано впервые. При соответствующей разработке технологии, данная способность *P. fluorescens* шт. ЗГО может быть применена для получения α -3',5'AMP (или α -дц-3',5'AMP). Получение продукта с помощью развиваемой культуры является более простым способом, чем ранее описанный метод с выделением фермента [4,5,6].

Литература

1. Sutherland E.W., Rall T.W., Menor T.-J. Biol. Chem., 1962, 237, 1220.
2. Преображенская Н.П., Дркевич А.Н. - Вопросы мед. химии, 1973, 19, 451.
3. Rickenberg H.V. - Ann. Rev. Microbiol., 1974, 28, 353.
4. Hirata H., Hayashi O. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1965, 21, 361.
5. Hirata H., Hayashi O. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1966, 24, 360.
6. Hirata H., Hayashi O. - Biochem. Biophys. Acta, 1967, 149, 1.
7. Ishiyama J., Yokotsuka T., Saito N. - Agr. Biol. Chem., 1974, 38, 3, 507.
8. Патент Japan, Kokai 7475,791, (Cl.36 (2) d 531.42), 1974.
9. Okabayashi T., Yoshimoto A., Ide M. J. Bacteriol., 1963, 86, 5, 930.
10. Липмане А.Я., Витоло М.Я. - Прикл. биохим. и микробиол., 1977, 13, I, 134.
11. Smith M., Drummond D.J., Khorana H.G. - J. Am. Chem. Soc., 1961, 83, 698.
12. Drummond G.J., Gilgan M.W., Reiner E.J., Smith M.J. - J. Am. Chem. Soc., 1964, 36, 1626.

Капранова М.Н., Лещинская И.Б.,
Витол И.Н., Ревелиня В.Р.

КГУ им. В.И. Ульянова (Казань),
ЛГУ им. П. Стучки (Рига)

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РНК И ЕЁ
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ КУЛЬТУРОЙ
BACILLUS MESPENTERICUS

Установлено, что *Bacillus mesentericus* усваивает Р.К в качестве единственного источника азота или фосфора, наблюдается значительно больший прирост биомассы, чем на среде с РНК в качестве источника азота. Исследованный штамм бактерий усваивает также ГМФ, АМФ, ЦМФ, УМФ и ИМФ в качестве источников фосфора и азота. Несколько лучше усваиваются мононуклеотиды в качестве источника фосфора, нежели азота. Пуриновые нуклеотиды являются более доступными источниками указанных элементов питания, чем пиримидиновые.

Известно, что бактерии вида *B. mesentericus* являются хорошими минерализаторами органических остатков растительного происхождения. Однако, процессы минерализации нуклеиновых кислот и их производных и усвоения их бактериями в качестве источников питания до настоящего времени недостаточно изучены [1]. Большинство работ этого плана касается способности почвенных микроорганизмов использовать пуриновые и пиримидиновые соединения [2-7].

Несмотря на то, что вид *B. mesentericus* широко описан как активный аммонификатор, в литературе почти отсутствуют экспериментальные доказательства ассимиляции азота нуклеиновых кислот и их производных этими бактериями. По некоторым данным нуклеиновые кислоты являются труднодоступным источником азота для бактерий, поэтому минерализация нуклеиновых кислот может происходить только при наличии в среде неорганических форм азота [8]. В литературе мало встречается указаний на исследование усвоения фосфора РНК и нуклеотидов.

Изучение возможности использования РНК и мононуклеотидов видом *V. mesentericus* представляет интерес для решения вопроса о путях трансформации нуклеиновых кислот среды и участия в этих процессах внеклеточных нуклеодеполимераз.

Материалы и методы

Объектом исследования служили бактерии вида *V. mesentericus* /штамм ИММА-29, полученный из коллекции чистых культур института микробиологии АН АрмССР/

Бактерии выращивали на МПА в течение 16 часов при 30°C. Затем клетки смывали с агара 0.5% раствором NaCl и ресуспендировали в синтетических средах с различными источниками азота и фосфора из расчета 0.1-0.5 единиц оптической активности на ФЭКе в красной области спектра в 1 см кювете. Контролем служила синтетическая среда следующего состава / в % /: K_2HPO_4 - 0.27, KH_2PO_4 - 0.13, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.01, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0.10, янтарная к-та - 0.10, глицерин - 0.40 / по объему /, дрожжевой автолизат - 0.01 смесь микроэлементов - 0.1 /по объему/. Смесь микроэлементов /в %/: H_3BO_4 - 0.500, NH_4MoO_4 - 0.500, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0.600, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.040, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0.004, CoSO_4 - 0.500.

В опытных средах неорганические источники азота и фосфора заменяли органическими. Источниками азота или фосфора служили РНК и мононуклеотиды. Применяли препарат РНК производства Новосибирского СКТБ БАВ, 5'-мононуклеотиды /натриевые соли/ - производства фирмы "Реанал". Указанные компоненты добавляли в количестве 0.1-0.5%. Прирост биомассы определяли по плотности клеток по показаниям на ФЭКе.

Результаты и их обсуждение

При выращивании *V. mesentericus* на средах с РНК в качестве источника основных элементов питания наблюдался хороший рост клеток, особенно на средах, в состав которых входит РНК в качестве источника фосфора. В этом случае наблюдался прирост биомассы на 30% больше, чем

на контрольной среде. При полном отсутствии в среде фосфора прирост клеток понижался на 30% по сравнению со средой, содержащей минеральный фосфор. На рис. I представлены кривые роста *V. mesentericus* на средах без фосфатов, с неорганическими фосфатами /0.8 мл/мл/ и с органическими источниками фосфора / РНК - 0.5 мг/мл фосфора, рибомононуклеотиды - 0.15 мг/мл фосфора/.

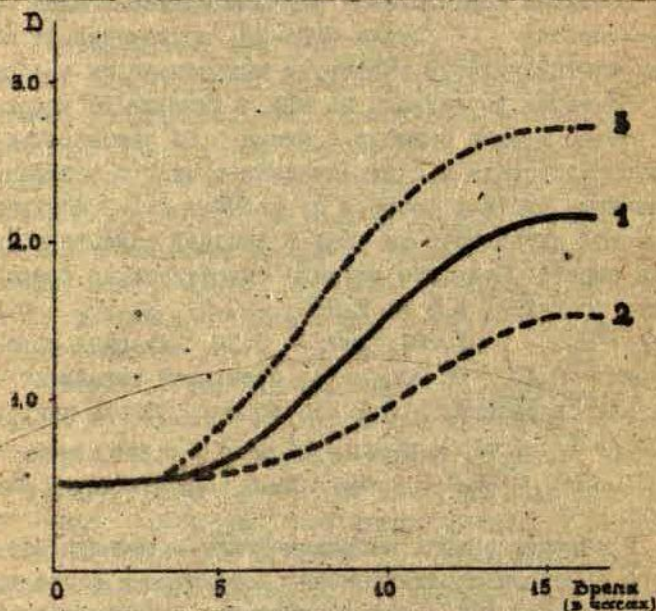


Рис. I. Динамика роста *Bacillus mesentericus* на средах с различными источниками фосфора и без фосфора. I - синтетическая среда, 2 - среда без фосфора, 3 - источник фосфора - РНК.

В среде, не содержащей азота, практически не наблюдался прирост биомассы. Когда в качестве источника азота в среду добавлялась РНК / 0.5 мг/мл азота/, количество клеток возросло на 15% по сравнению со средой с сульфатом аммония / 0.11 мг/мл азота/ (Рис.2.).

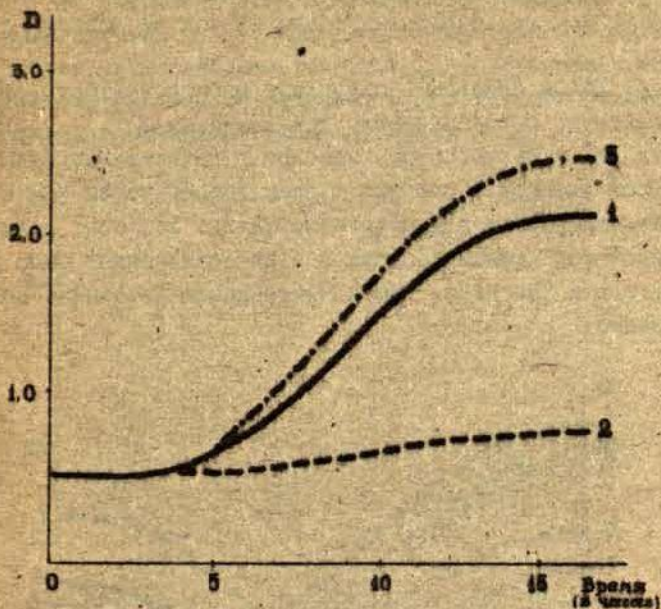


Рис. 2. Динамика роста *B. mesentericus* на средах с различными источниками азота и без азота. 1 - синтетическая среда, 2 - среда без азота, 3 - источник азота - РНК.

Эти данные свидетельствуют о том, что *B. mesentericus* хорошо усваивает как минеральные, так и органические формы азота и фосфора, и одним из органических источников азота и фосфора может использоваться РНК.

Далее проверяли возможность роста бактерий на средах с рибомононуклеотидами в качестве источников азота и фосфора. Как показано на рисунке 3, наилучшим источником фосфора является гуанозинмонофосфат. Пуриновые нуклеотиды используются как источники азота и фосфора почти также, как неорганические источники этих элементов. Значительно хуже используются пиридиновые нуклеотиды (Рис. 4.).

В таблице приведены данные по количеству биомассы, полученной на 16 час инкубации клеток на различных средах.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о способности *V. mesentericus* усваивать РНК и 5'-рибонуклеотиды в качестве основных элементов питания. Особенно хорошо используется РНК и гуанозинмонофосфат в качестве источника фосфора. Количественное содержание фосфора в этих соединениях было в 1.6 и в 5 раз ниже, чем в минеральном источнике соответственно.

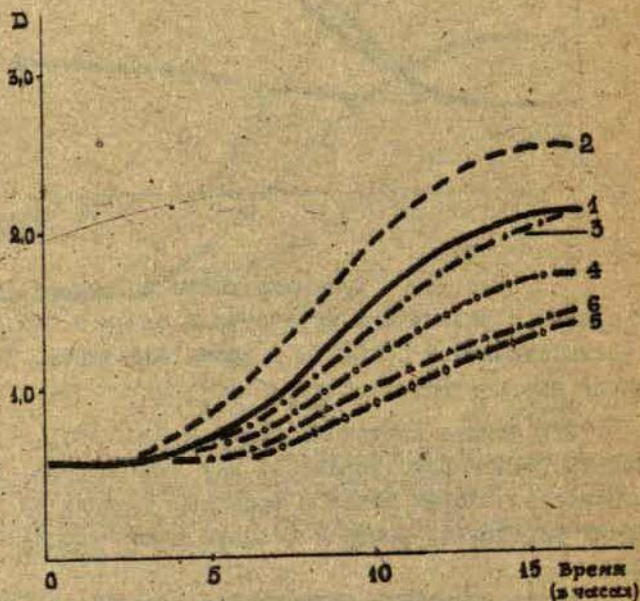


Рис. 3. Динамика роста *V. mesentericus* на средах с рибонуклеотидами в качестве источника фосфора.

- 1 - синтетическая среда, 2 - источник фосфора - АМФ,
- 3 - источник фосфора - ГМФ, 4 - 5'-ЦМФ, 5 - 5'-УМФ,
- 6 - 5'-ИМФ.

На основании этих данных можно предположить, что *B. mesentericus* как вид, широко распространенный в различных типах почв, богатых растительными остатками, принимает участие не только в минерализации белков, но и нуклеиновых кислот и, в частности, РНК.

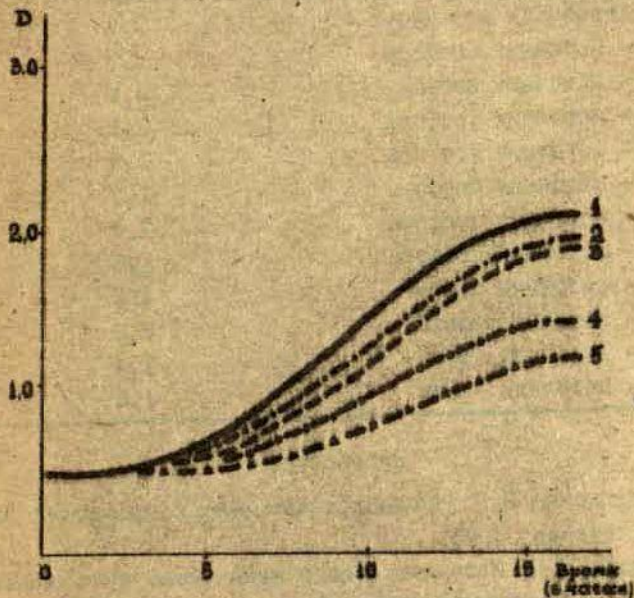


Рис. 4. Динамика роста *B. mesentericus* на средах с рибомононуклеотидами в качестве источника азота.

- 1 - синтетическая среда, 2 - источник азота - 5'-IMP,
- 3 - источник азота - 5'-AMP, 4 - источник азота 5'-UMP,
- 5 - источник азота 5'-UMP.

Таблица

Прирост биомассы *V. mesentericus* на разных средах

Варианты среды	Биомасса (в единицах оптической плотности)
синтетическая	2,1
синтетическая без фосфора	1,5
синтетическая без азота	0,7
РНК - источник фосфора	2,7
РНК - источник азота	2,4
АМК - источник фосфора	2,1
ГМК - источник фосфора	2,5
ШМК - источник фосфора	1,7
УМК - источник фосфора	1,4
ИМК - источник фосфора	1,6
АМД - источник азота	1,9
ГМД - источник азота	2,0
ШМД - источник азота	1,4
УМД - источник азота	1,2

Литература

1. Дешинская И.Б. Нуклеополимеразы сапрофитных бактерий, Казань, 1975.
2. Витол М.Я. Использование и химические превращения пиримидиновых производных аэробными почвенными микроорганизмами. Автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. М., 1967.
3. Витол М.Я., Дакша Л.В. Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами. Р., 1973.
4. Витол М.Я. и др. Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами. Р., 1972.
5. Больский В.Х. Использование и расщепление экзогенных пуриновых, и пиримидиновых соединений актиномицетами. Автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. Р., 1974.

6. Шаба Н.Х. Превращение и использование компонентов НК почвенными микроорганизмами. Автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. М., 1967.
7. Паников Н.С. Нуклеиновые кислоты почвы и их превращение микроорганизмами. Автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. М., 1976.
8. Кварцхелия М.Г., Беляева В.Л. Микробиология М., 1962.

Капранова М.Н., Лещинская И.Б.
Витол М.Я., Ревелиня В.Р.

КГУ им. В.И. Ульянова (Казань),
ЛГУ им. П. Стучки (Рига)

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ НУКЛЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ BACILLUS MESAENTERICUS В ПРОЦЕССЕ РОСТА НА СРЕДАХ С РНК И РИБОМОНОНУКЛЕОТИДАМИ

Установлено, что при культивировании *Bacillus mesentericus* ИММА-29 в РНК-содержащих средах наблюдается усиленный синтез нуклеолитических ферментов, осуществляющих ступенчатое расщепление РНК, а именно: РНКазы, фосфатазы и дезаминазы.

При культивировании *B. mesentericus* на средах, содержащих рибомононуклеотиды, РНКазная активность повышается незначительно (на 20-70%), так же, как и на среде с другим органическим компонентом - пептоном. Рибомононуклеотиды, добавленные в среду в качестве единственного источника фосфора, вызывают значительное повышение фосфатазной активности (в 5-10 раз), что свидетельствует об индуцибельном характере синтеза данного фермента. В том случае, если рибомононуклеотиды входят в состав сред в качестве единственного источника азота, они вызывают повышение в 1,5-2,0 раза дезаминазной активности.

Вопрос о способности спорообразующих бактерий минерализовать органические соединения типа РНК и её низкомолекулярных производных и роли внеклеточных нуклеолитических ферментов в этом процессе весьма актуален.

Полная минерализация РНК в чистой бактериальной культуре может быть осуществлена только при наличии у данного штамма бактерий системы ферментов, ступенчато катализирующих ферментативные реакции расщепления межнуклеотидных связей, дефосфорилирования нуклеотидов и дезаминирования пуринов и пиримидинов.

Литературные данные об использовании азота и фосфора РНК бактериями немногочисленны. Участие РНКаз, фосфотаз и дезаминаз в высвобождении из указанных соединений азота и фосфора в процессе метаболизма бактерий до сих пор не изучено.

Целью настоящей работы явилось изучение активности перечисленных ферментов при культивировании *V. mesentericus* на средах, содержащих РНК и рибонуклеотиды в качестве источников азота или фосфора.

Материалы и методы

В работе использовали *V. mesentericus* штамм ИММА-29, полученный из института микробиологии АН Армянской ССР. Бактерии предварительно выращивали до поздней экспоненциальной фазы роста клеток на синтетических средах, состав которых описан [1]. Пептон вносили в количестве, адекватном по азоту 0,5%-ному содержанию в среде РНК. В культуральной жидкости, освобожденной центрифугированием от бактериальных клеток, определяли активность РНКазы, ФМЗазы и дезаминазы.

Определение РНКазной активности [2].

Реакционная смесь имела следующий состав: 0,5 мл раствора РНК в концентрации 2 мг/мл; 0,4 мл 0,2 М трис-НСI буфера рН 8,5; 0,1 мл исследуемой культуральной жидкости.

Реакционную смесь инкубировали при 37° С в течение 15 минут, реакцию гидролиза останавливали 4%-ным раствором HClO_4 . После удаления из смеси нерастворимых продуктов путем центрифугирования, определяли содержание кислоторастворимых продуктов путем измерения поглощения раствора в односантиметровой кювете на СФ-4А при длине волны 260 нм. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое давало увеличение оптической плотности на единицу в пересчете на 1 мл исследуемой культуральной жидкости за 1 час инкубации. В качестве субстрата использовали суммарную дрожжевую РНК производства Новосибирского СКТБ БАН.

Определение ФМБазной активности [3].

Реакционная смесь содержала: 0,8 мл 0,002 М раствора паранитрофенилфосфата натрия в 0,2 М трис-НСI буфере рН 8,5; 0,2 мл исследуемой культуральной жидкости.

Инкубацию проводили в течение 1 часа при 37°C; реакцию останавливали добавлением 2 мл 0,4 н NaOH. За единицу активности принимали то количество фермента, которое вызывало увеличение оптической плотности раствора при длине волны 410 нм на единицу в пересчете на 1 мл за 1 час инкубации (опт.ед./мл/час).

Определение дезаминазной активности [4].

Реакционная смесь содержала: 0,1 мл $1,35 \cdot 10^{-3}$ М водного раствора 5-АМФ; 2,0 мл 0,2 М трис-НСI буфера рН 6,4; 0,8 мл исследуемой культуральной жидкости.

Инкубацию проводили в течение 15 минут при 37°C, затем добавляли 0,1 мл реактива Несслера и через 5 минут измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 390 нм. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое вызывает прирост поглощения на единицу в пересчете на 1 мл за 1 час инкубации. В качестве контрольных использовали:

- а) смесь указанного выше состава без раствора 5-АМФ;
- б) без исследуемой культуральной жидкости;
- в) разведенный в 30 раз 0,2 М раствором трис-НСI буфера рН 6,4 реактив Несслера. После замера оптической плотности при 390 нм делали соответствующие пересчеты.

Результаты и их обсуждение

При изучении ферментативной активности *B. pseudotuberculosis* на средах, содержащих РНК и рибомононуклеотиды, выявились следующие закономерности.

На средах, содержащих РНК, наблюдается высокая РНКазная активность. На синтетической среде и среде, содержащей пептон в качестве источника азота, также

отмечается значительная суммарная РНКазная активность к концу экспоненциальной фазы роста. Однако, пересчет РНКазной активности на единицу биомассы (удельная активность) показал, что значительное повышение удельной активности по сравнению с таковой на синтетической среде наблюдается только в том случае, если в средах содержится РНК (таблица I). Эти данные свидетельствуют об индуцибельном характере синтеза РНКазы.

Таблица I

Удельная активность щелочной РНКазы
V. mesentericus в конце экспоненциальной фазы роста на разных питательных средах

Варианты сред	Удельная активность	
	в опт. ед мл/час	в %
1. Синтетическая	150	100
2. Синтетическая без фосфатов с РНК	290	193
3. Синтетическая без сульфата аммония с РНК	350	233
4. Синтетическая среда без фосфатов и сульфата аммония с пептоном	200	134

В связи с обнаружением явления субстратной индукции РНК по отношению к РНКазе было интересно выяснить, не оказывает ли РНК аналогичного влияния на синтез других нуклеолитических ферментов, а именно - фосфатазы и дезаминазы. Результаты анализов представлены в таблице 2.

Как видно из данных, приведенных в таблице 2, РНК в среде вызывает значительное повышение фосфатазной активности (в 20 раз), если является единственным источником фосфора и повышение дезаминазной активности (в 3-6 раз), если является единственным источником азота. Таким образом, присутствие РНК в среде индуцирует синтез всех трех ферментов, вероятно, осуществля-

ших ступенчатое расщепление РНК.

Таблица 2

Удельная активность фосфатазы и дезаминазы *B. mesentericus* в конце экспоненциальной фазы роста на средах с РНК

Варианты сред	Удельная активность (на ед. биомассы)			
	Фосфатаза		дезаминаза	
	в опт. ед. мл/час	в %	в опт. ед. мл/час	в %
1. Синтетическая	0,3	100	4,6	100
2. Синтетическая без фосфатов с РНК	7,0	2330	0,0	0,0
3. Синтетическая без сульфата аммония с РНК	0,1	30	16,6	360

Дальнейшие эксперименты были направлены на выяснение влияния рибомононуклеотидов на нуклеолитическую активность *B. mesentericus*. Результаты экспериментов суммированы в таблицах 3 и 4.

Таблица 3

Удельная активность нуклеолитических ферментов *B. mesentericus* в конце экспоненциальной фазы роста на средах с рибомононуклеотидами в качестве источников фосфора

Источник фосфора в среде	Ферментативная активность в опт. ед. (1) и в % (2)					
	РНКазы		фосфатаза		дезаминаза	
	1	2	1	2	1	2
1. Неорг. анический фосфат	143	100	0,3	100	4,6	100
2. 5-ГМФ	234	164	1,4	466	0,9	20
3. 5-АМФ	187	131	2,8	932	1,4	30
4. 5-УМФ	160	112	1,8	600	0,7	10
5. 5-ЦМФ	186	130	3,5	1166	2,1	45

Как видно из цифровых данных, представленных в таблицах 3 и 4, рибомононуклеотиды, независимо от их химической природы, вызывают незначительное повышение РНКазной активности в средах, где они служат единствен-

ными источниками азота или фосфора. Повышение активности, по сравнению с таковой на синтетической среде, составляет от 10 до 70% и может объясняться не столько индуцирующим эффектом мононуклеотидов, сколько снятием ингибирующего влияния на синтез РНКазы неорганического фосфата и сульфата аммония, как в среде с пептоном (таблица 1).

Таблица 4

Удельная активность нуклеолитических ферментов *B. mesentericus* в конце экспоненциальной фазы роста на средах с рибомононуклеотидами в качестве источников азота

Источник азот в среде	Ферментативная активность в опт.ед.(1) и в % (2)					
	РНКазы		фосфатаза		дезаминаза	
	1	2	1	2	1	2
1. $(NH_4)_2SO_4$	143	100	0,3	100	4,6	100
2. 5'-ГМФ	186	130	0,4	130	9,2	200
3. 5'-АМФ	172	120	1,0	333	8,0	174
4. 5'-УМФ	243	170	0,7	233	7,7	169
5. 5'-ЦМФ	157	110	1,0	333	9,6	209

По данным анализа фосфатазной активности можно заключить, что все исследованные рибомононуклеотиды оказывают значительный индуцирующий эффект. Особенно большое увеличение фосфатазной активности наблюдается на средах, где рибомононуклеотиды служат единственными источниками фосфора. Здесь активность увеличивается в 5 - 10 раз по сравнению с таковой на среде с неорганическими фосфатами. На средах, где рибомононуклеотиды являются источниками азота и, следовательно, здесь присутствует неорганический фосфат, активирующее влияние мононуклеотидов проявляется слабее (таблица 4). Вероятно, в этом случае происходит наложение противоположного (репрессивного) действия на синтез фосфатазы неорганического фосфора.

Анализ дезаминазной активности на средах с нук-

леотидами показал, что активность этого фермента повышается на 70-100% (таблица 4) на средах, в которые рибомононуклеотиды входят в качестве единственного источника азота. При наличии в среде сульфата аммония добавление мононуклеотидов вызывает некоторое понижение дезаминазной активности (таблица 3).

Подводя итог вышеизложенному, следует отметить, что полученные данные относительно активирующего влияния органических источников фосфора и, в частности, РНК и рибомононуклеотидов на синтез фосфатазы подтверждают имеющиеся в литературе сведения об индукции щелочной фосфатазы при недостатке в среде неорганического фосфата [5, 6].

Полученные нами данные относительно того, что РНК оказывает индуцирующее влияние не только на синтез РНКазы, но также и на синтез фосфатазы и дезаминазы являются новым фактом, который заслуживает самого пристального внимания. Не исключено, что активирующее влияние на синтез фосфатазы и дезаминазы оказывает не сама РНК, а продукты её деполимеризации, образующиеся в среде под действием РНКазы.

Литература

1. Капранова М.Н. и др. Изучение способности использования РНК и рибомононуклеотидов *Bacillus mesentericus*. Настоящий сборник.
2. Nestle M., Roberts W.K. - *J. Biol. Chem.* 1969, 244, 5213.
3. Whiteley H., Oishi M. - *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1963, 13, 6.
4. Lee Ya-Pin *J. Biol. Chem.*, 1957, 227, 987.
5. Rogers D., Reithel F. - *Arch. Biochem. Biophys.* 1960, 89, 97.
6. Herpel L.A. - *J. Biol. Chem.* 1962, 237, 841.

Емцев В.Т., Бабайцева В.А., Витол М.Я.
ТСХА (Москва), ЛГУ им.П.Стучки (Рига)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПОЧВЕННЫМИ АНАЭРОБАМИ

Микробиологические превращения органических веществ в почве, в частности, гетероциклических соединений представляют собой один из важных вопросов почвенной микробиологии.

Существенное внимание в этих исследованиях уделяется изучению разложения таких гетероциклических веществ как пурины и пиримидины, а также их аналогов [7, 6].

Определенное значение в трансформации данных соединений принадлежит анаэробам рода *Clostridium*, среди представителей которого имеются специализированная группа бактерий, способная к использованию пуриновых и пиримидиновых соединений [2, 4].

Нами были проведены исследования по определению способности анаэробов, выделенных из различных почв, к использованию пуриновых и пиримидиновых соединений, а также потребности этих организмов в некоторых витаминах.

Методика

Объектом исследования являлись анаэробы, которые были выделены из почв на синтетических средах следующего состава: Среда 1 - урацил 0,1% MO; среда 2 - минеральная основа/ включает следующие компоненты /в%/: Na_2HPO_4 - 0,1; KH_2PO_4 - 0,05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05, CaCO_3 - 0,5; FeCl_3 - следы, тиогликолят Na - 0,05, нейтральный - 0,04, дрожжевой автолизат - 0,002, микроэлементы по Федорову - 1 мл/л среды, вода дистиллированная.

Биомассу исследуемых штаммов получили на среде 3 следующего состава: MO + глюкоза 0,5% + картофельно-морковный отвар 50% + урацил 0,1% + дистиллированная вода.

Инокулят готовили по методике Емцева и Дезадзамии [5]. Заражение сред проводили одной петлей инокулята. Культивирование бактерий прерывали на 3-й день инкубации, что соответствовало экспоненциальной фазе роста культуры. Культивирование проводили в высоких пробирках в толстом слое питательной среды.

Способность исследованных культур к использованию пуриновых и пиримидиновых соединений как источников азота, проверяли на среде 4 следующего состава: М0 + глюкоза 0,5%, + пуриновый или пиримидиновый компонент 0,1%; ксантин, ксантозин, гуанозин, мочевая кислота, оротовая кислота - 0,15%, нуклеотиды - аденозин-5'-монофосфат и уридин-5'-монофосфат - 0,2%.

Возможность утилизации нуклеотидов, как источников фосфора, проверяли на среде 5 следующего состава /в %/: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,05, $FeCl_2$ - следы, $CaCO_3$ - 0,5, микроэлементы по Федорову - 1 мл, тиогликолат натрия - 0,05, дрожжевой автолизат - 0,002, нейтральрот - 0,04, глюкоза - 0,5, нуклеотид - 0,2, и среде 6, которая аналогична по составу среде 5, но глюкоза заменена на смесь янтарной кислоты и глицерина в количестве 0,3% и 0,6% соответственно.

Минеральным источником азота в контроле служила соль $KH_4H_2PO_4$ - 0,3%.

Потребность в витаминах по методу Олинцовой определяли на среде 7 следующего состава: М0 + глюкоза 0,5% + $KH_4H_2PO_4$ - 0,3% + смесь витаминов в концентрации мкг/мл: биотин - 0,0002, тиамин - 0,5, пантотенат Ca - 0,25, никотиновая кислота - 0,5, пиридоксин - 0,25.

Биомассу определяли нефелометрически на ФЭК-56 с зеленым фильтром в 3 мм кюветах.

Результаты исследований

Нами были выделены на средах с урацилом из различных типов почв СССР 50 штаммов различных анаэробов. Из них были отобраны наиболее активные формы по способности к наиболее полной трансформации урацила.

Все выделенные штаммы относятся по определителю Берге /1974/ к следующим видам рода *Clostridium* - *Cl. pasteurianum*, *Cl. butyricum*, *Cl. acetobutylicum*, штамм 2200 не идентифицирован. Следует отметить его особые свойства - хороший рост на желатине и козеине.

Интересно отметить, что на среде с пиридином в северных почвах были выделены *Cl. pasteurianum*, а в южных почвах - *Cl. butyricum* и *Cl. acetobutylicum*. Эти виды *Clostridium* являются доминантными представителями анаэробной микрофлоры в данных широтах [5].

Сравнительное исследование по изучению использования различных пиридиновых соединений выделенными штаммами *Clostridium* показано (Табл. I), что пиридиновые соединения (тимин, урацил), а также дигидросоединения и оротовая кислота могут способствовать усилению роста. При этом происходит накопление биомассы бактерий в 2-3 раза по сравнению с контролем. Рост культур на средах с нуклеозидами происходит лучше, чем на средах с основаниями, что, по-видимому, можно объяснить высвобождением рибозидных остатков, которые могут служить дополнительным источником питания. Рост ацетобутиловых анаэробов на средах с тимидином и уридином в 1,5 раза превышает рост *Cl. butyricum* штамма I546, однако другой штамм *Cl. butyricum* - II может хорошо расти на указанных пиридинах (интенсивность роста превышает в 1,5-2 раза рост на среде с минеральным азотом).

Цитозин и цитидин не используются всеми культурами, а оротовая кислота - только штаммами I30, 4I, 2200. Отмечается даже ингибирование роста анаэробов указанными веществами.

Следует отметить слабое использование в качестве источников азота нуклеотидов по сравнению с нуклеозидами и основаниями.

Результаты изучения отношения анаэробных бактерий к пуриновым соединениям приведены в таблице 2.

Таблица I

Рост бактерий рода *Clostridium* на средах с пиримидиновыми соединениями
(в единицах оптической плотности D)

Источник азота в среде	<i>C. pasteurianum</i>		<i>C. butyricum</i>				<i>C. acetobutylicum</i>				<i>Clostridium</i>	
	штамм		штаммы				штаммы				вр. штамм	
	130		1546		41		2100		4115		2200	
	D	pH	D	pH	D	pH	D	pH	D	pH	D	pH
Оротовая кислота	0,11	6,1	0,20	4,7	0,09	5,4	0,19	4,7	0,26	4,6	0,11	5,6
Дигидротимин	0,18	5,0	0,15	5,0	0,23	4,5	0,15	5,0	0,24	4,4	0,27	4,4
Урацил	0,20	5,0	0,13	5,1	0,21	4,5	0,14	5,2	0,23	4,4	0,23	4,6
Цитозин	0,12	6,3	0,10	5,3	0,19	4,9	0,11	5,8	0,16	5,0	0,12	5,8
Тимин	0,24	4,6	0,20	4,8	0,26	4,4	0,21	4,6	0,26	4,3	0,26	4,6
Уридин	0,24	4,6	0,18	4,9	0,23	4,8	0,19	4,7	0,25	4,3	0,25	4,5
Цитидин	0,17	5,3	0,12	5,3	0,20	4,8	0,12	5,8	0,17	5,0	0,17	5,0
Тимидин	0,24	4,6	0,22	4,7	0,26	4,4	0,23	4,5	0,27	4,6	0,27	4,5
5' УМБ	0,10	5,9	0,11	5,4	0,09	5,3	0,13	5,7	0,14	5,0	0,16	5,1
Контроль 1/ среда 4/	0,06	6,0	0,08	6,1	0,02	7,1	0,09	6,7	0,07	6,3	0,05	6,9
Контроль 2 / $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ /	0,16	5,4	0,14	5,3	0,13	5,3	0,12	5,2	0,12	5,7	0,13	6,0

Таблица 2

Рост бактерий рода *Clostridium* на средах с пуриновыми соединениями
в единицах оптической плотности D /

Источник азота в среде	<i>C. pasteurianum</i>		<i>C. butyricum</i>				<i>C. acetobutylicum</i>				<i>Clostridium</i>	
	штамм		штамм		штамм		штамм		сп. штамм			
	130		1546	41	2100	4115	2200		D	pH		
	D	pH	D	pH	D	pH	D	pH	D	pH		
Мочевая кислота	0,10	5,0	0,09	6,1	0,18	4,8	0,11	6,3	0,16	4,9	0,21	5,0
Ксантин	0,19	4,9	0,15	5,0	0,22	4,2	0,16	4,9	0,23	4,7	0,24	4,8
Гипоксантин	0,01	5,0	0,08	6,3	0,13	5,1	0,11	6,0	0,09	5,8	0,11	5,9
Адеин	0,03	7,0	0,06	6,9	0,01	7,1	0,09	6,8	0,08	6,3	0,06	6,9
Инозин	0,11	6,3	0,09	6,4	0,16	5,0	0,11	5,9	0,12	5,6	0,13	5,5
Аденозин	0,17	5,1	0,13	5,6	0,20	4,4	0,13	5,1	0,21	4,8	0,21	4,9
Гуанозин	0,16	6,3	0,11	5,7	0,17	4,6	0,12	5,1	0,15	5,6	0,10	5,9
Ксантозин	0,21	4,7	0,18	4,8	0,35	4,0	0,17	4,8	0,38	4,5	0,28	4,6
5' АМФ	0,07	5,3	0,12	5,3	0,02	7,1	0,12	5,8	0,17	5,5	0,12	5,9
Контроль I /среда 4/	0,06	6,0	0,08	6,1	0,02	7,1	0,09	6,7	0,07	6,3	0,05	6,9
Контроль 2 / $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ /	0,16	5,4	0,14	5,3	0,13	5,3	0,12	5,2	0,12	5,7	0,13	6,0

Хороший рост всех культур *Clostridium* обеспечивают следующие пуриновые нуклеозиды: ксантозин, аденозин, меньше гуанадин, в то время как инозин не только не используется бактериями, но ингибирует рост культур. Пуриновые основания - аденин, гипоксантин, а также аденозин-5'-монофосфат не используются изученными культурами, а аденин даже подавляет рост маслянокислых, а также ацетонобутиловых бактерий. Следует отметить существенный рост анаэробов на среде с ксантином.

Использование нуклеотидов исследуемыми анаэробами проверялось в двух вариантах сред: в одном варианте нуклеотид служил источником азота и фосфора, а в другом нуклеотид вносился с дополнительным минеральным фосфором.

Как показывает таблица 3, одни нуклеотиды обуславливают слабый рост анаэробов.

Характерным для всех штаммов анаэробов является хороший рост на средах с нуклеотидами при внесении дополнительного фосфора по сравнению с вариантом, где нуклеотид был единственным источником фосфора. Такое явление наблюдается как на аденозин-5'-монофосфате, так и на уридин-5'-монофосфате, хотя на последнем соединении рост был несколько лучше. Это, видимо, можно объяснить сильным подкислением незабуференной среды при развитии анаэробных бактерий.

Интересно отметить, что на среде с янтарной кислотой и глицерином нуклеотиды могут обеспечивать рост культур, хотя и незначительный, без нуклеотидов на этой среде накопление биомассы полностью отсутствует.

Следует отметить, что ацетонобутиловые бактерии и *Cl. butyricum* лучше используют нуклеотиды, чем *Cl. pasteurianum*. Отношение изучаемых видов анаэробных бактерий к различным витаминам изучалось на среде 7, куда были добавлены все витамины, а затем исключался отдельно каждый.

Как видно из таблицы 4, все изученные культуры чутко реагируют на недостаток биотина в среде. Интен-

Таблица 3

Рост бактерий рода *Clostridium* на средах с нуклеотидами
/ в единицах оптической плотности D /

Источники фосфора в средах	<i>C. pasteurianum</i>		<i>C. butyricum</i>		<i>C. acetobutylicum</i>		<i>Clostridium</i> вр. штамм 2200
	штамм		штамм		штамм		
	130	1546	41	2100	4115		
Среда 5 /контроль 1/	0,01	0,02	0	0	0,01	0	
То же + АМФ	0,03	0,05	0,04	0,04	0,05	0,03	
То же + УМФ	0,04	0,05	0,06	0,04	0,06	0,04	
То же + АМФ + Ф	0,09	0,12	0,16	0,13	0,15	0,13	
То же + УМФ + Ф	0,10	0,13	0,16	0,14	0,16	0,13	
Среда 6 /контроль 2/	0	0	0	0	0	0	
То же + АМФ	0,01	0,03	0,02	0,02	0,03	0,05	
То же + УМФ	0,02	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	
То же + АМФ + Ф	0,02	0,04	0,03	0,02	0,05	0,04	
То же + УМФ + Ф	0,03	0,04	0,04	0,03	0,05	0,05	
Среда 5 + Ф /контр. 3/	0,05	0,08	0,09	0,07	0,09	0,09	
Среда 6 + Ф /контр. 4/	0,01	0	0	0	0	0,01	

сивность роста анаэробов уменьшается более чем в 2 раза. В отсутствии никотиновой кислоты также замедляется развитие культур *Cl. pasteurianum* и *Cl. butyricum* в меньшей мере *Cl. acetobutylicum*. Исключение из среды тиамин и пиридоксин не сказалось на росте культур *Cl. pasteurianum*. Рост культур *Cl. pasteurianum* несколько уменьшается на среде с пантотенатом Са, однако, остальные культуры не реагируют на отсутствие этого витамина.

Таким образом, установлено, что выделенные на ураниле маслянокислые и ацетобутиловые анаэробы весьма требовательны к биотину, а маслянокислые анаэробы также и к никотиновой кислоте. Такие же данные были получены ранее рядом авторов [9,3].

Таблица 4

Влияние некоторых витаминов на рост культур *Clostridium*

Витамины в среде	Оптическая плотность					
	<i>Cl. pasteurianum</i>	<i>Cl. butyricum</i>	<i>Cl. acetobutylicum</i>	<i>Cl. sp.</i>		
	Ш т а м м ы					
	130	1546	41	2100	4115	2200
Смесь витаминов по Одинцовой	0,29	0,30	0,35	0,32	0,34	0,34
Без биотина	0,10	0,11	0,15	0,14	0,15	0,10
Без никотиновой к-ты	0,18	0,19	0,24	0,25	0,28	0,25
Без пантотената Са	0,21	0,25	0,30	0,29	0,30	0,31
Без пиридоксина	0,30	0,29	0,34	0,34	0,35	0,33
Без тиамина	0,30	0,31	0,36	0,33	0,35	0,35
Контроль /среда 7/	0,12	0,12	0,09	0,09	0,10	0,05

Выводы

I. Изучена способность маслянокислых и ацетобутиловых анаэробов рода *Clostridium*, выделенных на среде с уранилом, использовать экзогенные пуриловые

и пиримидиновые соединения в качестве источника азота, а нуклеотиды - в качестве источника азота и фосфора,

2. Установлено, что нуклеозиды, имеющие экзоциклическую аммонийную группу более доступны для анаэробов, чем пуриновые основания, за исключением ксантина. Нуклеотиды плохо используются анаэробными бактериями.

3. Выявлено, что пиримидиновые соединения лучше используются анаэробными бактериями, чем пуриновые.

4. Показано, что выделенные анаэробные бактерии рода *Clostridium* требуют наличия в среде биотина, а *Cl. pasteurianum* и *Cl. butyricum* кроме биотина нуждаются и в никотиновой кислоте.

Литература

1. Одинцова М.Н. Микробиологические методы определения витаминов. М., 1959.
2. Баркер Х. Брожение азотистых органических соединений. - В кн.: Метаболизм бактерий. М., 1963, с186-199.
3. Гудков А.В. Биология споровых анаэробов, вызывающих порчу сыров. Автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. 1965.
4. Дунчис М.Э. - Научные докл. высш. шк. Биол. науки, 1972, №3, 100.
5. Емцев В.Т., Дзадзамия Т.Д. - Известия ТСХА, 1969, вып. 4.
6. Лишман А.Я. Использование нуклеиновых кислот и продуктов их деградации бактериями, выделенными из водоемов. Автореф. дисс. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. М, 1977.
7. Рубан Е.Л. - Известия АН СССР. Сер. биол., 1973, №3.
8. Lampert J.O., Peterson W.H. - Arch. Biochem., 1943, 2, 443.
9. Stolp H. - Arch. Mikrobiol., 1955, 21, 3, 273.

Шпрунка И.К.

Ин-т органического синтеза
АН ЛатвССР (Рига)

АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗА (Е.С.3.5.4.4.)

МИКРООРГАНИЗМОВ

Важное значение в процессе жизнедеятельности любого организма, в процессе развития любой клетки, имеют изменения количественных и качественных соотношений отдельных компонентов нуклеотидного пула. Особое место в этом пуле принадлежит производным аденина, которые кроме участия в структурно-функциональной организации нуклеиновых кислот, также осуществляют важнейшие энергетические и биорегуляторные функции.

В 1972 г. группой американских исследователей-клиницистов во главе с Джиблетом [1] было установлено полное отсутствие эритроцитарной аденозиндезаминазы (АДА) у ребёнка, больного общей тяжелой иммунонедостаточностью. В 1975 г. обнаружили, что такую же клиническую картину вызывает отсутствие нуклеозид-фосфоорилазы EC.2.4.2.11, осуществляющей следующий этап катаболизма, т.е. образование гипоксантина из инозина [2] (см. схему I). Вследствие этих открытий пути пуринового обмена и, в частности, физиологическая роль установления структурно-функциональной организации АДА, возможности использования знаний об этом ферменте в диагностике и в терапии различных патологических состояний стало предметом исследования многих лабораторий мира. Были предприняты попытки реставрации лимфоцитарной функции введением экзогенной АДА [3].

Ценнейшим источником ферментов для промышленных, медицинских и исследовательских целей являются микроорганизмы. Изучение структурно-функциональной организации и физиологического значения АДА у микроорганизмов позволяет глубже познать сложнейшие процессы пуринового обмена нормальных и патологических клеток млекопитающих, в том числе и человека. На основе анализа ли-

тературных данных Кори [4,5] выдвинул предположение, что присутствие АДА в крови - это механизм регуляции кровяного давления путем детоксикации сильного вазодепрессанта аденозина до относительно неактивного инозина. Поступление алиментарного аденозина в кровь отчасти определяется ферментативной активностью кишечной микрофлоры и, таким образом, естественно приводит в соприкосновение пути пиримидиновых превращений млекопитающих с пуриновым катаболизмом/метаболизмом у микроорганизмов. В тканях млекопитающих почти совсем отсутствует деградация аденозина в аденин и катаболизм протекает через инозин [6]. В пуриновом обмене млекопитающих особое значение придается активности так называемого "аденозинового цикла". Количественная суть этих процессов выпукло отражается в следующих ключевых моментах (схема I) [7-10]:

1. скорость дефосфорилирования аденилата в аденозин оценима;
2. скорость фосфорилирования аденозина меньше скорости его образования из аденилата;
3. большинство образовавшегося аденозина подлежит дезаминированию;
4. остальная часть цикла работает со скоростью, определяемой дезаминированием аденозина;
5. при 100% эффективности цикла он безвреден;
6. однако, часть образовавшегося инозината превращается в гуанилат;
7. вследствие низкой скорости, дезаминирования гуанилата в инозинат, часть его улавливается;
8. в результате этого понижается концентрация адениновых нуклеотидов и повышается концентрация гуаниновых нуклеотидов;
9. эта несбалансированность нуклеотидных концентраций вредна для клеток.

Таким образом четко определена ключевая роль АДА в формировании сбалансированного, физиологически безвредного нуклеотидного пула у млекопитающих.

На основе анализа собственных опытов и весьма об-

ширных литературных данных Кох и Велли в 1959 г. [11] выдвинули гипотезу 3-х ступенчатого дезаминирования аденозина у *E. coli*: 1) превращение аденина в аденозин; 2) дезаминирование; 3) расщепление инозина до гипоксантина (схема 2). Дальнейшие исследования [12] с применением различных мутантов *E. coli* [13, 14], дезоксиаденозина и 6-аминопурина в качестве субстрата [13] подтвердили путь превращения пуринов, представленный схемой 2. [15]. У пурин дефицитного ауксотрофа *E. coli* не удалось доказать наличие АМД-дезаминазы и адениндезаминазы, что наряду с необратимым характером синтеза АМД из инозиновой кислоты в качестве единственного места деметиламинирования 6-метиламинопурина, допускает лишь нуклеозидный уровень [12]. Недавно было определено расположение генов утилизации пуринов у *E. coli* и установлено, что они не связаны непосредственно между собой [15]. Эту же схему пуринового обмена подтверждают для семейства *Enterobacteriaceae* также исследования на прототрофе *Salmonella typhimurium* LT-2, его аденин-дефицитной аденинсукцилатлиазы недостаточного мутанта и 6-меркаптопуринрезистентного мутанта [16]. Расширенное применение мутантов в исследованиях метаболизма *S. typhimurium* [17] позволило сделать вывод, что 90% экзогенного аденозина подвергается дезаминированию, а остальные 10% превращаются в аденин при помощи пурин-нуклеозидфосфорилазы. *In vivo* этот микроорганизм не способен фосфорилировать аденозин в АМД. Если пурин-дефицитный мутант растет на аденине в присутствии гистидина, то последовательность реакции аденин \rightarrow аденозин \rightarrow инозин \rightarrow гипоксантин \rightarrow ИМФ становится фактором, лимитирующим рост культуры, при этом узким местом является синтез аденозина из аденина, испытывающий недостаток в эндогенном рибозо-1-фосфате [17]. Путем дезаминирования аденозин метаболизирует также *Bacillus cereus* [18], для *Micrococcus nodonensis* действительна схема пуринового обмена *S. typhimurium* [19]. *Bacillus anthracis* [20] дезаминирует аденозин на нуклеозидном уровне. Для *Bacillus cereus* италья-

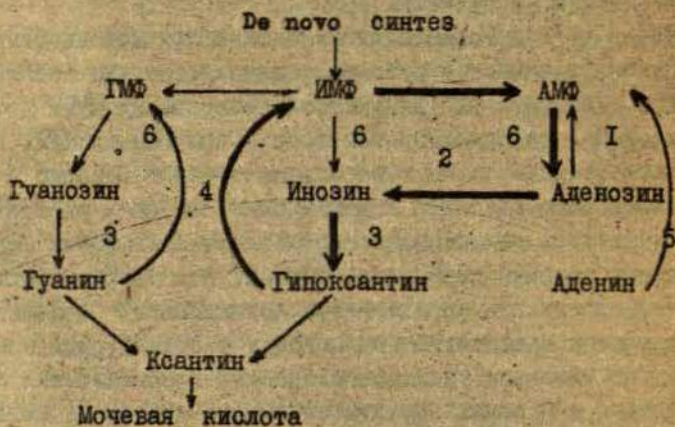
янские ученые [21] установили включение в эту схему 5'-АМФ, который под воздействием 5'-нуклеотидазы превращается в аденозин, т.е. частично реализуется "аденозинный цикл" млекопитающих [7-10]. Если до недавних исследований Дебова и сотрудников [22] в области пуринового обмена лейкозных клеток не было доказательств наличия адениндезаминазы в животных клетках, то в микроорганизмах общепринятой считается возможность альтернативного пути непосредственного дезаминирования аденина до гипоксантина на уровне оснований. Однако, в некоторых работах о наличии адениндезаминазы, например, у *E. coli*, *S. typhimurium* [23], *Pseudomonas oleovorans* [24], *Azotobacter vinelandii* [25]

судили по образованию гипоксантина при использовании аденина в качестве субстрата для клеток или бесклеточного экстракта без должного ингибирования пути дезаминирования на нуклеозидном уровне при помощи АДА. Вышерассмотренные схемы метаболизма требуют подойти с величайшей осторожностью к постановке опытов и интерпритации результатов по установлению последовательности ферментативных реакций пуринового обмена. Ход биохимических событий во многом определяется локализацией отдельных ферментов метаболической цепочки в структурных компонентах клетки и удельной скоростью проникновения субстратов и конечных продуктов сквозь клеточные мембраны. Транспорт азотистых оснований и нуклеозидов у бактерий рассмотрен в обзоре Грешановича [26] и раскрывает глубину противоречивости имеющихся в литературе данных. Свое значение не потеряли представления Коха об энергезависимости процесса транспорта пуриновых нуклеозидов [17] и наличии двух фондов аденозина у *E. coli*, один связанный с синтезом РНК, второй - с дезаминированием аденозина до инозина. Позже было показано, что ключевые ферменты превращения аденозина-АДА и нуклеотидфосфолазы локализованы в бактериальных везикулах, т.е. в мембранных структурах, и таким образом имеет место прямое взаимодействие с комплексами переноса [28]. Актив-

ная АДА содержится также в мембранных везикулах *Micrococcus sodonensis* [2]. Кинетическим методом Агарвал и Парк показали, что на мембранах эритроцитов человека АДА расположена в непосредственной близости к системе нуклеозидного транспорта [30]. Применением меченого аденозина показано отсутствие специальной транспортной системы для пуринов в конидиях *Neurospora crassa* содержащей АДА [31]. АДА расположена в экзоспории спор *Bacillus* [34, 35], а у *Azotobacter vinelandii* [32] и *Sarcina lutea* [33] *Micrococcus lysodeikticus* [36], *Vibrio cholera* [42] обнаружена цитоплазматическая АДА.

Схема I

ПУРИНОВЫЙ ОБМЕН ПЛЕКОПИТАЮЩИХ



Аденозиновый цикл

- 1 - Аденозин киназа (EC 2.7.1.20)
- 2 - Аденозин дезаминаза (EC 3.5.4.4)
- 3 - ПуринуCLEОЗИД фосфорИлаза (EC 2.4.2.1)
- 4 - Гипоксантин фосфорИбозИлтрансфераза (EC 2.4.2.8)
- 5 - Аденин фосфорИбозИлтрансфераза (EC 2.4.2.7)
- 6 - 5'-Нуклеотидаза (EC 3.1.3.5)

Фини и соавторы [21] на примере *Bacillus subtilis* выдвинули совершенно уникальное представление о том, что последовательность реакций АМФ → аденозин → инозин → гипоксантин протекает

ium [12] не индуцируется, а для *Micrococcus zobopentiv* строго доказана конститутивная природа АДА [39].

АДА у *E. coli* катаболически репрессируется глюкозой и наивысшие выходы получены при культивировании на лактате [12]. АДА *Aspergillus*, как и другие дезаминазы и дезамидазы, повышает активность при эндогенном дыхании и его образование протекает в условиях глюкозного голодания [40].

До настоящего времени отсутствуют систематические исследования о распространении АДА в микроорганизмах. Самый обширный спектр микроорганизмов на аденозиндезаминазную активность обследован японскими учеными [41] в связи с изучением дезаминирования пуринового антибиотика формицина А в формицин В. Авторы обследовали 71 штамм актиномицетов и установили, что большинство из них дезаминирует аденозин на 75-100%, но 10 штаммов дезаминировали аденозин на 0-50%. Из 57 обследованных штаммов бактерий 88-100% АДА активностью обладали *E. coli*, *Micrococcus flavus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Sarcina lutea*, *Bacterium succinicum*. Совершенно отсутствовала АДА активность у *Actinomyces metalcaligenes*, *A. viscolactis*, *Pseudomonas cruciviva*, *P. ovalis*, *Serratia indica*, *S. marcescens*. Пиккардом исследована АДА активность в 12 штаммах [39] *Micrococcus*. Этот фермент найден также у вибрионов [42, 43]. При этом *V. cholera* лучше растет и наблюдается стабилизация АДА на средах, содержащих 0,42-3,4% NaCl [43]. Из сахаров стимулирующее действие на образование АДА оказывает добавление в питательную среду мальтозы [51]. На АДА активность было испытано 13 штаммов *Mycobacterium* и установлено, что все бактерии имеют этот фермент, однако патогенные для людей штаммы обладали пониженной дезаминазной активностью [52].

Исторически первыми (1946 г.) в качестве продуцентов АДА исследованы микроскопические грибы *Aspergillus oryzae*

Neurospora crassa [44]. Выделение чистой неспецифической АДА из комплекса ферментного препарата Такадиастазы легло в основу промышленного получения АДА микроорганизмов для исследовательских целей [45]. Кроме того, АДА найдена у *Ermothecium nishiyii* [46] и *Streptomyces aureofaciens* [47, 48].

Для некоторых микроорганизмов АДА несет весьма существенную физиологическую функцию. Так у *M. sadonensis* [19, 49] этот фермент предотвращает подавление аденозином биосинтеза тиамин. Были сделаны попытки увязать авирулентную природу аденин-дефицитного мутанта *Bacillus anthracis* [20] с уровнем АДА, но оказалось, что вирулентность определяется совокупностью нескольких факторов. У *B. cereus* и *B. anthracis* установлено, что инозин более эффективно, чем аденозин стимулирует прорастание спор. Предполагается, что в биохимической системе прорастания спор АДА отведено определенное место [34]. Не исключено, что нахождение инозина в отдельных участках транспортной РНК объясняется действием АДА [53].

Важнейшей характеристикой любого фермента является его субстратспецифичность, количественную сторону которой отражает константа Михаэлиса.

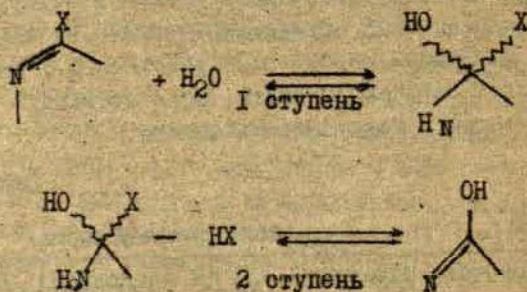
Таблица I

K_M аденозиндезаминазы

Источник фермента	K_M (M аденозина)	Литература
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	$4,0 \times 10^{-3}$	[56]
<i>Bacterium cadaveris</i>	$5,0 \times 10^{-4}$	[16]
<i>Aspergillus oryzae</i>	$3,8 \times 10^{-4}$	[55]
" "	$2,4 \times 10^{-4}$	[54]
<i>Escherichia coli</i>	$1,3 \times 10^{-4}$	[11]
<i>Bacillus anthracis</i>	$3,3 \times 10^{-5}$	[20]
Эритроциты человека	$1,2 \times 10^{-4}$	[57]

Как видно из примеров таблицы I, сродство субстрата к ферменту колеблется в пределах, отличающихся на два

порядка. Литературные данные трудно сравнимы, т.к. ферменты получены разными путями, с различной степенью очистки и применялись различные способы определения АДА активности и расчета K_M . Коммерчески широко доступный препарат АДА из *Aspergillus oryzae* является неспецифической дезаминазой [44,45], т.к. кроме аденозина и дезоксиаденозина дезаминирует также 5'-АМФ, 3'-АМФ, АДФ, АТФ, ФАД, НАД, НАДН₂, 2'-АМФ, дезоксиАМФ и дезоксиАТФ. Вольфенденем [58] было показано, что этот фермент гидролизует рибозиды 6-гидрозино-, 6-хлор-, 6-метиамино- и 6-метоксипуринов. Огромный литературный материал и собственные данные по изучению субстратоспецифичности и ингибированию АДА позволило Эвансу и Вольфендену [54] высказать предположение, что этот гидролитический фермент действует по уникальному в энзимологии механизму непосредственного присоединения - выщепления согласно схеме



Высокой избирательностью к субстрату отличается АДА *V. anthracis* [20], которая очень слабо действует даже на дезоксиаденозин. Вероятно, среди микроорганизмов можно найти продуценты АДА любой субстратоспецифичности.

Другой важной характеристикой фермента является оптимальное рН его действия, который также у микробных АДА обнаруживается в физиологических пределах (см. табл.2).

Молекулярный вес АДА *A. oryzae* методом гель-фильтрации определен 110000 [38], а у *M. sodonensis*

130000 ± 10000 [39]. Согласно представлениям Ма и Фишера [62, 63] микробный фермент ближе к В (М.В. 100000) типу тканеспецифичной АДА многоклеточных организмов, являющийся кратным от высокоактивного С типа (М.В. 35000), к которому принадлежит эритроцитарная АДА человека (М.В. 35000) [64]. Каждый из трех типов АДА характеризуется определенным соотношением $v_{\text{макс}} \text{ аденозина} / v_{\text{макс}} \text{ дезоксиаденозина}$, которым пред-а-гали пользоваться в качестве токсаномического признака [62, 63]. Однако, для микробной АДА это соотношение не исследовано.

Выделение высокоочищенного АДА из *A. oryzae* с выходом 10% [45] возможно комбинацией обыкновенных методов белковой химии, а применение афинной хроматографии [65] позволило получить 46800 X очищенную эритроцитарную АДА с особо высоким выходом (см. табл. 3) и раскрыло широкие возможности для препаративного получения и изучения АДА любого происхождения.

Таблица 2

Оптимальное рН действие аденозиндезаминаз

Источник фермента	рН	Литература
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,5	[45]
" "	6,5	[59]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7,0	[56]
<i>Escherichia coli</i>	7,5 - 8,0	[11]
" "	8,8	[60]
<i>Bacterium cadaveris</i>	6,8 - 8,3	[18]
<i>Bacillus cereus</i>	8,7	[61]

Настоящий обзор не рассматривает целый ряд таких специфических проблем энзимологии, молекулярной биологии и белковой химии аденозиндезаминаз микробиологического происхождения, как структурно-функциональная организация, ингибиторы и эффекторы, условия денатурации

и стабилизации, иммунореактивность фермента.

Таблица 3

Схема очистки АДА эритроцитов человека [65]

	МЕ/мг белка	Степень очистки	Выход %
1) Ультразвук, сырой экстракт	0,0011	-	100
2) Солевой р-р десорбции с ДЕАЕ Сефадекса в объеме	0,11	100	58
3) Колонка ДЕАЕ сефадекса	0,18	164	55
4) Сефадекс g-100 колонка	1,65	1500	35
5) Афинная колонка	525	46800	26

Из такадиастазы [45]

МЕ/мг белка

1) Экстракт порошка така- диастазы	0,64
2) Этанольный осадок	24
3) Типовая фракция колонки ДЕАЕ Сефадекса	180
4) Фракция колонки гидро- ксилапатита	533

Литература

1. Giblett E.R., Anderson J.E., Cohen E., Pollara B., Mauwissen H.J. - Lancet, 1972, 2, 1067.
2. Giblett E.R., Ammann J., Wara D., Sandmar R., Diamond L. - Lancet, 1975, 2, 1010.
3. Polmar S.H., Wetzler E., Stern C.C., Hirschorn R. - Lancet, 2, 743.
4. Cory J.G., Wienbaum G., Suhadolnik R.J. - Arch. Biochem. Biophys., 1967, 118, 428.
5. Baer H.P., Drummond G.I., Duncan E.L. - Mol. Pharmacol., 1966, 2, 67.
6. Fok I.H. - In: Combined Immunodeficiency Disease and

Adenosine Deaminase Deficiency, A Molecular Defect.
Acad. Press Inc., New-York-San Francisco-London,
1975, 45.

7. Shnoy T.S., Clifford A.J. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 411, 133.
8. Brok L.W., Henderson J.F. - *Can. J. Biochem.*, 1976, 54, 200.
9. Green H., Ishii K. - *J. Cell. Sci.*, 1972, 11, 173.
10. Chan T.S., Ishii K., Long C., Green H. - *J. Cell. Physiol.*, 1973, 81, 315.
11. Koch A.L., Vallee G. - *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 1213.
12. Love S.H., Remy Ch.N. - *J. Bacteriol.*, 1966, 91, 1037.
13. Karlström O.J. - *Bacteriol.*, 1968, 95, 1069.
14. Karlström O. - *Europ. J. Biochem.*, 1970, 17, 68.
15. Jochimsen B., Nygaard P., Vestergaard T. - *Mol. Gen. Genetics*, 143, 85.
16. Zimmerman E.F., Magasanik B. - *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 293.
17. Hoffmeyer J., Neuhard J. - *J. Bacteriol.*, 1971, 106, 14.
18. Williams V.R., MacIntyre R. - *J. Bacteriol.*, 1955, 70, 563.
19. Shobe C.R., Campbell J.N. - *Canad. J. Microbiol.*, 1977, 19, 1275.
20. Molnar J., Pragai B. - *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 1973, 20, 255.
21. Fini C., Palmerini C.A., Bicchieri G., Cercignani G. - *Boll. Soc. It. Biol. Spec.*, 1974, 50, 860.
22. Раба О.Я., Шинкаловская С.М. - *Микробиол.*, АН УССР, 1956, 18, 30.
23. Соковина Я.М., Дедов С.С. - *Вопр. мед. химии*, 1976, 23, II7.
24. Sakai T., Watanabe T., Chibata I. *Накко Kagaku Zasshi*, 1971, 49, 488; *Chem. Abstr.*, 1971, 75, 2845.
25. Кирштейн Б.С., Львов Н.П., Лубимов В.И., Кротович В.Л. - *ДАН СССР*, 1968, 181, 741.
26. Германович В.Н. - *Успехи совр. биол.*, 1977, 83, 226.
27. Peterson R.N., Koch A.L. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 126, 129.
28. Hochstadt-Ozer J. - *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 2419.
29. Pickard M.A., Phillippe L., Campbell J.V. - *Canad. J. Biochem.*, 1974, 52, 83.

30. Agarwal R.P., Parks R.E.-Biochem. Pharmacol., 1975, 24, 547.
31. Magill I.M., Spencer R.R., Magill C.W.-J. Bacteriol., 1974, 119, 202.
32. Alexander M., Wilson P.W.-Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1955, 41, 843.
33. Mathews M.M., Sistrof W.R.-J. Bacteriol., 1959, 78, 778.
34. Powell J.F., Hunter J.R.-J. Gen. Microbiol., 1955, 13, 59.
35. Berger J.A., Marr A.G.-J. Gen. Microbiol., 1960, 22, 147.
36. Vambutas V.A., Salton M.R.-Biochem. Biophys. Acta, 1970, 203, 94.
37. Mans R.J., Koh A.L.-J. Biol. Chem., 1960, 235, 450.
38. Wolfenden R., Sharpless T.K., Allen R.-J. Biol. Chem., 1967, 242, 977.
39. Pickard M.A. Canada.-J. Biochem., 1977, 53, 344.
40. Mizunuma T.-Agr. Biol. Chem., 1965, 29, 491.
41. Sawa T., Fukagawa J., Homma T., Takarnchi T., Umezawa H.-J. Antibiotics, ser. A, 1967, 20, 317.
42. Murti C.R.K.-Biochem. Biophys. Acta, 1960, 45, 243.
43. Arora K.L., Iyer S.N., Murti C.R.K.-Enzymologia, 1956, 17, 333.
44. Mitchell H.K., McElroy W.D.-Arch. Biochem., 1946, 10, 343.
45. Minato S., Tagawa T., Okanishi K.-J. Biochem., 1976, 58, 519.
46. Brown E.G., Goodwin T.W.-Biochem. J., 1958, 68, 40.
47. Hadalova M., Zelinkova E., Zelinka I.-Biologia, 1972, 27, 445.
48. Jelokova J., Zelinkova E., Zelinka I.-Biologia (Bratislava), 1974, 29, 207.
49. Shobe C.R., Campbell T.N.-Can. J. Microbiol., 1973, 19, 1083.
50. Agarwala S.R., Murti C.R.K., Shrivastava D.L., Gupta A.S.-Enzymologia, 1954, 16, 322.
51. Arora K.L., Iyer S.N.-J. Sci. Ind. Research, 1955, 14, 144.
52. Ipata P.L., Gabbrielli M.C., Cattaneo C.-Ann. Inst. "Carlo Forlanini", 1959, 19, 427. Chem. Abstr. 1961, 55, 672a.

53. Zielke G., Suelter C. - In: The Enzymes, 4, 47.
54. Evans B. E., Wolfenden R. V. - Biochemistry, 1973, 12, 392.
55. Sawa T., Fukagawa Y., Homma I., Takaeuchi T., Umezawa H. - J. Antibiotics, ser. A., 20, 227.
56. Guha S. R., Sakena R. P., Arora K. L. - J. Sci. Ind. Res., 1962, 21C, 66.
57. Agarwal R. P., Sagar S. M., Parks R. E. - Fed. Proc., 1973, 32, 1944.
58. Wolfenden R. J. - Am. Chem. Soc., 1966, 88, 3157.
59. Mitchell H. K., McElroy W. D. - Arch. Biochem., 1946, 10, 351.
60. Lutwak-Mann C. - Biochem. J., 1936, 30, 1405.
61. Powell J. F. - Congr. Inter. Biochim. Res. Commun., 3 congr., Brussels, 93; Chem. Abstr., 1957, 51, 7504g.
62. Ma P. F., Fischer J. R. - Comp. Biochem. Physiol., 1968, 27, 105.
63. Ma P. F., Fischer J. R. - Comp. Biochem. Physiol., 1969, 31, 771.
64. Edwards I. H., Hopkinson D. A., Harris H. - Genet., 1971, 35, 207.
65. Schreuder W. P., Stacey A. R., Pollara B. - J. Biol. Chem., 1976, 251, 4026.

Вилкс С.Р., Вулфа Л.Я.

ЛГУ им. П. Стучки (Рига)

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗНОЙ
СПОСОБНОСТИ СРЕДИ МИКРООРГАНИЗМОВ ОТДЕЛЬ-
НЫХ СИСТЕМАТИЧЕСКИХ И ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП

Наряду с другими ферментами пуринового метаболизма в течение последних пяти лет интенсивно изучается фермент "аденозинового цикла" - аденозиндезаминаза /аденозинаминогидролаза в.с. 3.5.4.4/. Важное значение этого фермента для нормального функционирования клеток млекопитающих и целесообразность дальнейшего его использования подробно обсуждены в обзорной статье И. Шпрунка "Аденозиндезаминаза микроорганизмов" настоящего сборника [1]. В данной статье также показана возможность использования микроорганизмов в качестве продуцентов аденозиндезаминазы для дальнейших исследований.

В научной литературе имеются данные о наличии аденозиндезаминазы у ряда микроорганизмов - отдельных видов бактерий [2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13], актиномицетов [8,14] и грибов [15,16]. Большинство этих работ ограничивается констатированием аденозиндезаминазы у отдельных видов и лишь некоторые работы, например, Сава с соавт. [8] и Пикарда [12] охватывают группы микроорганизмов.

В данной работе исследовано распространение аденозиндезаминазной способности среди различных микроорганизмов с целью выявления более перспективных систематических или экологических групп для дальнейших поисков продуцента аденозиндезаминазы. I

I В экспериментальной работе принимали участие студенты А. Цекуле, А. Гейкина, А. Озолия.

Материалы и методы

В работе использовались культуры микроорганизмов коллекции кафедры физиологии растений и микробиологии ЛГУ им. П. Стучки. Часть культур являются свежeweделенными из природных субстратов - почвы и филлосферы, некоторые ряд лет хранятся в музейных условиях.

О наличии аденозиндезаминазы у данного микроорганизма судили по образованию инозина из экзогенного аденозина. Аденозин добавляли или к питательной среде, обеспечивающей рост данного микроорганизма, или к инкубационной смеси отмытых клеточных суспензий. В первом случае аденозин добавляли к питательной среде в количестве 0,1% перед посевом культуры, для культивирования дрожжей использовалась среда Ридер, для культивирования грибов - модифицированная среда Чапека (г/л) - глюкоза - 10, NH_4NO_3 - 2, KH_2PO_4 - 1, KCl - 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5, смесь микроэлементов - 1 мл [13]. Для актиномицетов использовалась среда следующего состава (г/л) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2, янтарная к-та - 10, глицерин - 5, K_2HPO_4 - 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1, FeCl_3 - следы, смесь микроэлементов - 1 мл, дрожжевой автолизат - 0,025.

Культивирование проводилось при 27°C на качалках (режим 100 об/мин). Через определенные промежутки времени (в зависимости от интенсивности роста культуры) отбирались пробы культуральной жидкости. Клетки отделялись центрифугированием. Надосадочная жидкость подвергалась исследованию промежуточных продуктов катаболизма аденозина методами хроматографии. Использовался метод восходящей бумажной хроматографии на бумаге марки FN-11 с применением следующих систем растворителей: I - этилацетат : конц.уксусная к-та : вода - 3:1:1, II - н-бутанол : конц.уксусная к-та : вода - 2:1:1; а также метод тонкослойной хроматографии в силикогеле на пластинках Silufol UV 254 в системе н-бутанол : ацетон : конц.аммиак : вода - 50:40:3:15. Соединения обнаруживались при помощи ультрамикроскопа. Идентификация

проводилась прямым сравнением образовавшихся соединений с Rf "свидетелей". При обнаружении инозина на хроматограммах, его идентичность проверялась снятием спектра на спектрофотометре Spasord UV Vis.

Метод отмытых клеточных суспензий применялся в случае скудного роста микроорганизмов (в данном случае - бактерий) в жидких питательных средах. Бактерии выращивали на твердых средах - капустном агаре или МПА. Клетки смывали 0,5% физиологическим раствором, дважды промывали этим же раствором и центрифугировали. По возможности сухо отцентрифугированную клеточную массу добавляли к 1/15 М К Na фосфатному буферу (рН 7,0) с концентрацией аденозина 2 мкмоля/мл. Суспензия инкубировалась при 27°C на качалках (100 об/мин). Время инкубации 20 и 40 мин. После инкубации клетки отделялись центрифугированием и супернатант подвергался аналогичному анализу.

Результаты

Соотношения между количеством культур, дезаминирующих экзогенный аденозин, и всеми проверенными культурами в различных группах микроорганизмов показаны в таблице. Способность к дезаминированию аденозина констатирована почти у всех проверенных актиномицетов (у 16 из 17). Это согласуется с данным Т. Сава с соавт., показавшими аденозиндезаминазную активность у 37 из 39 проверенных культур актиномицетов. При этом надо отметить, что дезаминирование экзогенного аденозина является единственным путем его расщепления у актиномицетов, а у микроорганизмов других систематических групп часто наблюдается образование как инозина, так и аденина.

В среднем 41,7% проверенных бактерий также обладают аденозиндезаминирующей способностью. Необходимо указать, что большинство эпифитных культур, а также культур из коллекции были пигментированы.

Третья часть исследованных мицелиальных грибов дезаминирует аденозин. 5 из 6 культур, выделенных из

почвы и обладавших дезаминазной активностью по отношению к аденозину, относятся к роду *Penicillium*. Культуры грибов, выделенные из филлосферы, принадлежат виду *Aureobasidium pullulans* и аденозин не дезаминируют.

Таблица

Дезаминирование аденозина в различных группах микроорганизмов

Микроорганизмы	Источник выделения	Колич. проверенных культур	Культуры, дезаминирующие аденозин.	
			к-во	в %
Бактерии	филлосфера	14	6	42,8
	из коллекции	10	4	40,0
	Всего:	24	10	41,7
Актиномицеты	из коллекции	17	16	94,1
Мицелиальные грибы	почва	18	6	33,3
	филлосфера	4	0	0
	из коллекции	11	5	45,5
	всего:	33	11	33,3
Дрожжи	почва	40	5	12,5
	филлосфера	11	6	54,5
	Всего:	51	11	21,1

○ 54,5% дрожжей, выделенных нами из филлосферы, дезаминируют аденозин. Среди дрожжей, выделенных из почвы, дезаминирующих культур гораздо меньше - 12,5%.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что из всех проверенных экологических групп микроорганизмов эпифитные бактерии и дрожжи представляют перспективную группу для поиска продуцентов аденозиндезаминазы.

Выводы

У 125 культур микроорганизмов различных систематических и экологических групп проверена способность дезаминировать экзогенный аденозин. Наиболее перспективными для поисков продуцентов аденозиндезаминазы представляются актиномицеты и бактерии - 94,1% всех проверенных актиномицетов и 41,7% бактерий дезаминируют аденозин. Этим признаком обладает около 50% проверенных эпифитных бактерий и дрожжей, что указывает на целесообразность поиска продуцентов среди представителей эпифитной микрофлоры.

Литература

1. Шизунка И. В наст. сборнике. Р., 1978.
2. Kalckar H.M., MacNutt W.S., Hoff-Jorgenson E. - *Biochem. J.*, 1952, 50, 3.
3. Powell J.F., Hunter I.R. - *J. Gen. Microbiol.*, 1955, 13, 59.
4. Williams V.R., Mc Intyre R.T. - *J. Bacteriol.*, 1955, 70, 5, 563.
5. Arora K.L., Iyer S.M., Krishna Murti C.R. - *Enzymologia*, 1956, 17, 5/6, 333.
6. Koch A.L., Vallee G. - *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 1213.
7. Gabrielli C.M.C., Tocchini V.G.A., Cattaneo C. *Ann. Inst. "Carlo Forlanini"*, 1962, 22, 28.
8. Sawa T., Fukagawa Y., Homma L., Takeuchi T., Umezawa H. - *J. Antibiotics*, ser. A, 1967, 20, 6, 317.
9. Кирштейне Б.Э., Львов Н.П., Лубимов В.И., Кравчиц В.Л. - *ДАН СССР*, I 68, 181, 3, 741.
10. Wambutas V.A., Salton M.R. *J. Biochem. Biophys. Acta*, 1970, 203, 1, 94.
11. Hoffmeyer J., Neuhard J. - *J. Bacteriol.*, 1971, 106, 1, 14.
12. Pickard M.A. - *Can. J. Biochem.*, 1975, 53, 3, 344.
13. Лишмане А.Я., Битолс М.Я. - *Прикл. Биохим. микробиол.*, I 77, XIII, 3, 431.
14. Nadalova M., Zelinkova E., Zelinka I. - *Biologia*, 1972, 27, 6, 445.
15. Mitchell H.M., Mc Elroy W.D. *Arch. Biochem.*, 1946, 10, 351.
16. Brown E.G., Goodwin T.W. *Biochem. J.*, 1958, 68, 40.

Витол М.Я., Лишман А.Я., Вилкс С.Р.,
Витола А.А., Лопзина А.П., Миллер Т.П.

ЛГУ им. П.Стучки (Рига)

НЕКОТОРЫЕ НОВЫЕ СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ

Удельный вес микробиологической промышленности в народном хозяйстве увеличивается. В этой связи важнейшей проблемой является интенсификация роста микроорганизмов, что требует поиска и применения новых стимуляторов. Нами установлено, что наряду с диметилсульфо-оксидом [1] для микробиологической промышленности в качестве стимуляторов роста могут быть рекомендованы нуклеозиди- и трифосфаты, а также фосфоразотистые соединения.

Объект и методы

Для изучения влияния стимуляторов объектом исследования были выбраны следующие бактерии: *Mycobacterium lacticum*, *Pseudomonas fluorescens* (выделенные из водоемов ЛатвССР), *Flavobacterium suaveolens*, *Bacillus subtilis* и актиномицет *Actinomyces platensis* (музейные культуры).

В качестве стимуляторов роста изучались АТФ, ГТФ, ИТФ, ЦТФ, УТФ, АДФ и ИДФ, ГДФ, ЦДФ, УДФ (в количестве 0,1%) и фосфоразотистые соединения: нитрид фосфора P_3N_3 [2,3], оксинитрид фосфора PON [4], соединения $C_2N_2H_x$ и $P_2N_3H_x$ [5]. Все фосфоразотистые соединения применялись в количестве 0,01%. Стимуляторы добавлялись к стерильной среде перед посевом культуры в асептических условиях.

Применялись следующие среды для культивирования микроорганизмов.

Среда I (в.в.): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ - 0,05, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,03, янтарная кислота - 0,1, глицерин - 0,4, смесь микроэлементов - 1 мл на л, состав в %: H_3BO_3 -

- 0,5, NH_4MoO_4 - 0,5, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,04,
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,6, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,04, CoSO_4 -
- 0,5; дрожжевой автолизат - 0,01, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,1,
 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,0001, стимулятор роста. pH среды -
- 7,2 - 7,3.

Среда 2 (в %): $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - 0,05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -
- 0,003, сахараза - 6, пептон - 1, смесь микроэлементов
- 1 мл/л, дрожжевой автолизат - 0,001, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,1,
 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,0001, стимулятор роста, pH среды -
- 7,2 - 7,3.

Среда 3 (в %): $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - 0,05, $\text{MgSO}_4 \cdot$
 $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05, FeSO_4 - 0,001, гитарная к-та - 0,1,
 NaCl - 0,05, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,1, глицерин - 0,5, смесь
микроэлементов - 1 мл/л, стимулятор роста, pH среды -
- 6,9-7,1.

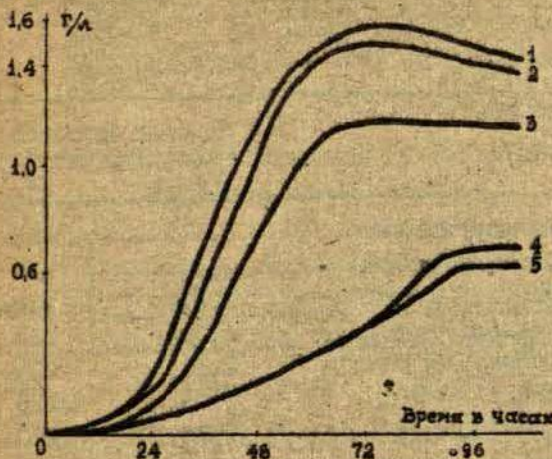
Во всех случаях контрольной средой служила соответствующая среда со стимулятором диметилсульфоксидом (ДМСО) в количестве от 100 до 500 части на миллион или среда без стимулятора роста в случае фосфоразотистых соединений. Микроорганизмы инкубировали с аэрацией на качалках (100 об/мин) при 27°C. Прирост биомассы определяли методом турбодиметрии на фотоэлектроколориметре ФЭК-М56 (510-550 нм). Количество биомассы актиномицетов контролировалось весовым методом. pH среды в ходе культивирования определяли на pH метре РН - 262. Выход биомассы во всех примерах контрольных сред принято за 100%.

Результаты и обсуждение

На рисунке показаны кривые прироста биомассы у *P. fluorescens* 310 при добавлении к среде I различных производных аденина (см. с. 85).

Самый значительный прирост биомассы по сравнению с контрольной средой (кривая 5) наблюдается при добавлении дезоксиАТФ (кривая I). Выход биомассы *P. fluorescens* 310 - 1,55 г/л, что соответствует 255% по сравнению с их биомассой в контрольной среде (0,6 г/л). В случае добавления АТФ максимальная биомасса - 1,45 г/л

(245%, кривая 2), АДФ дает прирост на 200% (1,2 г/л, кривая 3).



Влияние добавления д-АТФ (кривая 1), АТФ (2), АДФ (3), АМФ, аденозина, аденина (4) на рост *Pseudomonas fluorescens*, (контрольная среда — кривая 5).

Стимулирующим эффектом на рост культуры обладают только нуклеозидди- и трифосфаты, а добавление АМФ, аденозина и аденина (кривая 4) не оказывает стимулирующего действия. В таблице I приведены результаты стимулирующего действия нуклеозидди- и трифосфатов на выход биомассы на среде I на 4 сутки инкубирования.

Данные показывают, что в условиях эксперимента наряду с дАТФ (255%) и АТФ (245%) рост *P. fluorescens* эффективно стимулируют ЦТФ — 234%, ГТФ — 230%, и т.д. — до ГДФ — 183%. На рост остальных культур — *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium lacticolum*, *Flavobacterium suaveolens*, *Actinomyces platensis* проверено влияние экзогенной АТФ. В качестве примера данные о влиянии АТФ на рост *M. lacticolum* в двух различных средах показаны в таблице 2.

Таблица I

Стимулирующий эффект нуклеозидди- и трифосфатов на выход биомассы *P. luoogessens* 310 в среде I на четвертый день инкубирования /6/

Стимуляторы	Прирост биомассы	
	г/л	в %
Дезоксиаденозинтрифосфат	1,55	255
Аденозинтрифосфат, натрий	1,45	245
Цитидинтрифосфат, натрий	1,40	234
Гуанозинтрифосфат, натрий	1,38	230
Уридинтрифосфат, натрий	1,36	226
Инозинтрифосфат, натрий	1,35	225
Инозиндифосфат, натрий	1,32	220
Цитидиндифосфат, натрий	1,32	220
Уридиндифосфат, натрий	1,25	208
Аденозиндифосфат, натрий	1,20	200
Гуанозиндифосфат, натрий	1,10	183
Гуанозинмонофосфат, натрий	0,60	100
Уридинмонофосфат, натрий	0,61	102
Цитидинмонофосфат, натрий	0,60	100
Инозинмонофосфат, натрий	0,60	100
Аденозинмонофосфат, натрий	0,61	102
Контрольная среда с ДМСО	0,60	100

Из данных таблицы 2 видно, что стимулирующий эффект АТФ более выражен при росте культуры *M. lactis colum* на синтетической среде. В этом случае отмечается как ускорение роста, так и увеличение конечной биомассы. В более богатой питательными веществами среде стимулирующий эффект АТФ менее выражен.

Культуры *B. subtilis* и *P. suaveolens* не способны разиваться в среде I. При росте в среде 2 через 14 часов инкубирования *B. subtilis* при добавлении АТФ дает прирост биомассы на 110% по сравнению с

контрольной средой с ДМСО, а через 24 часа - на 105%. Прирост биомассы *F. suaveolens* в среде 2 на II часу - 0,43 г/л, что на 115 % больше биомассы *F. suaveolens* в контрольной среде - 0,37 г/л, а на 16 часу - 111% (1,14 г/л).

Таблица 2

Эффект стимуляции экзогенного АТФ на рост *M.lacticolum*

Стимулятор	Прирост биомассы							
	Среда 1				Среда 2			
	2 сут.		3 сут.		14 час		24 час	
	г/л	%	г/л	%	г/л	%	г/л	%
0,1% АТФ	1,2	171	1,62	160	0,16	106	1,12	115
ДМСО								
конц.100чм	0,7	100	1,01	100	0,15	100	0,97	100

Очень эффективным оказалось добавление АТФ при культивировании актиномицетов *Actinomyces platensis* - через 5 суток культивирования биомассы в среде 3 с АТФ на 218 % больше биомассы в контрольной среде.

Нами показан стимулирующий эффект на рост микроорганизмов ряда фосфоразотистых соединений. Эти данные приведены на примере *F. suaveolens* как в синтетической среде 1, так и в натуральной среде 2 (Таблица 3).

Из таблицы 3 видно, что все фосфоразотистые соединения стимулируют рост *F. suaveolens* в синтетической среде примерно на 115-136% по сравнению с контрольной средой. Наибольший стимулирующий эффект проявляет соединение $P_2N_3H_x$ - 136%. Возможно, что это связано с высокой дисперсностью данного соединения. В случае применения данного класса соединений в натуральной среде (среда 2) все они оказывают примерно одинаковый стимулирующий эффект - 120-123%. Эти соединения не оказывали стимулирующего действия на рост бактерий *B.subtilis*, *M.lacticolum*, *F.fluorescens*

и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* p.14, *S.cerevisiae* "L", *Candida tropicalis* "Slovak" в среде Ридера.

Таблица 3

Стимулирующий эффект фосфоразотистых соединений на рост *F. succinofens* в среде I (на 4 сутки) и в среде 2 (на 15 часу инкубации)

Среда	I		2	
	г/л	%	г/л	%
Стимулятор	1	2	3	4
P_3O_5	1,17	115	1,20	120
POH	1,25	123	1,10	123
$P_2H_3H_x$	1,38	136	1,10	123
PNH_x	-	-	1,10	123
Среда без стимулятора	1,01	100	1,00	100

"-" - нет стимулирующего эффекта.

Таким образом, на данных примерах показан значительный стимулирующий эффект экзогенных нуклеозидди- и трифосфатов на прирост биомассы проверенных микроорганизмов в условиях эксперимента от 183 до 250 %. Установлен также заслуживающий внимания стимулирующий эффект фосфоразотистых соединений, хотя по сравнению с действием нуклеозидди- и трифосфатов он менее выражен - от 115 до 136%.

Литература

1. Пат. США № 3558434. (CI2B 3/14) 1971.
2. Stock A., Hoffman B. Ver., 1903, В.1, 36, 314.
3. Stock A., Grüneberg H. Ver., 1907, 40, 2573.
4. Klement R., Koch O. Ver., 1954, 87, 333.
5. Лодзиня А.П., Витола А.А., Миллер Т.Н. Высокотемпературный синтез и свойства тугоплавких соединений. Р., 1978.
6. Авт. заявка № 2327303 / 28. Пол. реш. от 20.09.77.

Гринберг А.П., Вытрищак Л.Н.,
Кривевия В.А., Битол М.Я.

ЛГУ им. П. Стучки (Рига)

МЕТАБОЛИЗМ ЭКЗОГЕННЫХ ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ У ОБЫЧНЫХ И БЕЗМИКРОБНЫХ МОРСКИХ СВИНОК

Нуклеиновые кислоты и их низкомолекулярные компоненты, входящие в состав пищевых продуктов растительного и животного происхождения, в желудочно-кишечном тракте расщепляются и утилизируются под влиянием ферментов макроорганизма [1] и микроорганизмов [2] кишечника. Имеющиеся литературные данные по метаболизму экзогенных пиримидиновых нуклеозидов свидетельствуют, что интраперитонеально введенный цитидин [3] и уридин [4] являются предшественниками пиримидиновых нуклеиновых кислот в тканях млекопитающих. В литературе не найдены данные по влиянию микрофлоры желудочно-кишечного тракта на метаболизм экзогенных пиримидиновых нуклеозидов. Роль суммарной микрофлоры пищеварительного тракта в превращениях перорально введенных пиримидиновых нуклеозидов исследовалась в настоящей работе.

В опытах использовались конвенциональные, имеющие нормальную желудочно-кишечную микрофлору, и безмикробные морские свинки, трехнедельного возраста. Исследуемые стерильные соединения (уридин- 2-C^{14} или цитидин- 2-C^{14}) вводили животным перорально из расчета 10 мкКюри/100г веса животного. (Удельная радиоактивность нуклеозидов ^{14}C - 2C^{14} мкКюри/мм). Животных помещали в метаболическую камеру на 24 часа. Выдыхаемый углекислый газ улавливался при помощи моноэтаноламина в метиловом спирте [5]. Радиоактивность измерялась на счетчике Intertechnique - 200. После эксперимента стерильным физиологическим раствором тонкий кишечник освобождали от содержимого, а печень - от крови. Для определения влияния желудочно-кишечной микрофлоры на включение перорально введенных нуклеозидов - ^{14}C в РНК и ДНК тканей печени и тонкого кишечни-

ка использовался метод Кеннела [6], основанный на обработке гомогенатов тканей растворами трихлоруксусной кислоты и щелочи разных концентраций. Продукты метаболизма пириимидинов из мочи разделялись при помощи колоночной и бумажной хроматографии [5].

В исследованиях перорально введенных цитидина- 2-C^{14} и уридина- 2-C^{14} было установлено, что желудочно-кишечная микрофлора морских свинок играет важную роль в катаболизме этих нуклеозидов. Как показано в таблице 1 и таблице 2, у животных, имеющих нормальную желудочно-кишечную микрофлору, до C^{14}O_2 деградирует статистически достоверно большее количество от введенного пириимидина, чем у безмикробных животных.

Особенно выражено это после введения цитидина- 2-C^{14} . Динамика деградации экзогенных пириимидиновых соединений, отраженная на рисунке 1 свидетельствует, что у безмикробных животных половина выдыхаемого за 24 часа радиоактивного углекислого газа выделяется в течение более длительного срока (3 часа), чем у животных, имеющих нормальную микрофлору.

Таблица 1

Распределение радиоактивности в % через 24 часа после перорального введения уридина- 2-C^{14} у обычных и безмикробных морских свинок в количестве $25 \cdot 10^{-5}$ мм/100 г веса (100%)

Радиоактивность	Животные с нормальной микрофлорой	Безмикробные животные	Достоверность различий
Выдыхаемый $2\text{C}^{14}\text{O}_2$	49 ± 5	38 ± 3	+
Моча	$12,2 \pm 2,1$	$18,4 \pm 1,8$	+
Тело животных	$8,5 \pm 2,3$	$12,5 \pm 2,8$	-
Содержимое кишечного тракта	$7,8 \pm 1,9$	$3,6 \pm 0,4$	+
Фекалии	$4,1 \pm 2,1$	$7,1 \pm 1,4$	-
Суммарно определено	81,6	80,6	

+ Различия достоверны при $P < 0,05$ [9]

- Различия недостоверны

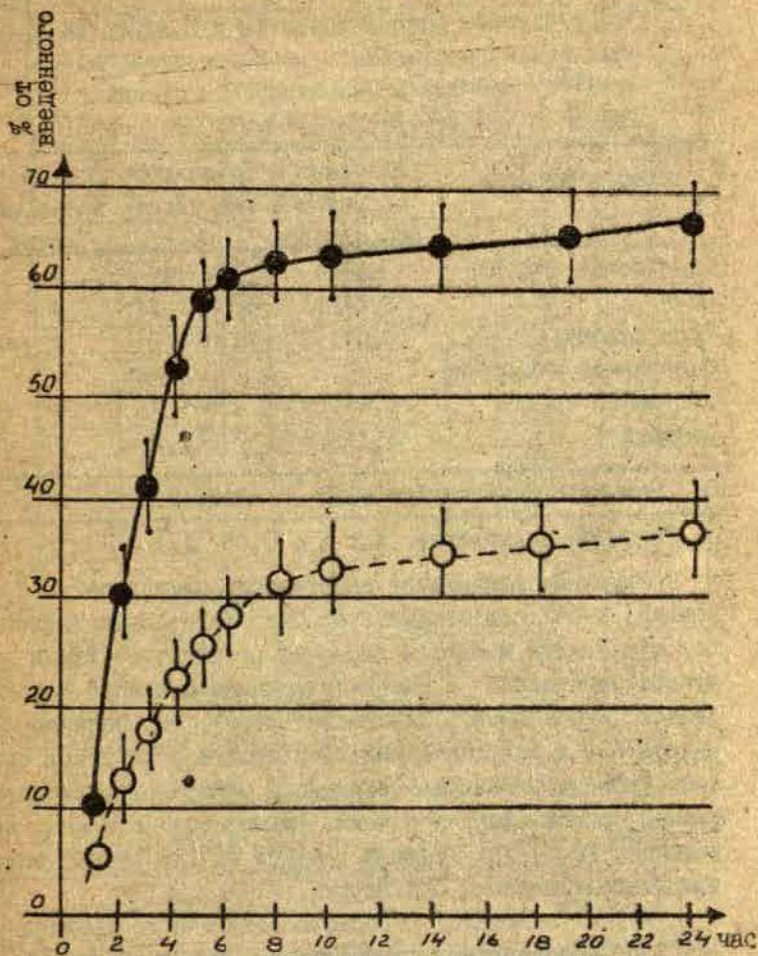


Рис. I. Динамика деградации перорально введенного цитидина $2-0^{14}$ до $2C^{14}O_2$ у обычных и безмикробных морских свинок.

Условные обозначения : — обычные животные
- - безмикробные животные

Таблица 2

Распределение радиоактивности в % через 24 часа после перорального введения цитидина- $2-C^{14}$ у обычных и безмикробных морских свинок в количестве $25 \cdot 10^{-5}$ мкг/100г веса (100%)

Радиоактивность	Животные с нормальной микрофлорой		Достоверность различий
	с микробами	без микробов	
Выдыхаемый $2-C^{14}O_2$	66 ± 4	36 ± 4	+
Моча	$9,2 \pm 1,6$	$16,8 \pm 1,1$	+
Тело животных	$9,4 \pm 1,7$	$21,7 \pm 3,1$	+
Содержимое желудочно-кишечного тракта	$8,6 \pm 1,9$	$4,9 \pm 1,7$	+
Фекалии	$3,1 \pm 1,9$	$9,8 \pm 2,3$	+
Суммарно установлено	96,3	89,2	

+ Различия достоверны при $P < 0,05$ [9]

Изучение анаболизма экзогенного цитидина- $2-C^{14}$ и уридина- $2-C^{14}$ свидетельствует, что перорально введенные нуклеозиды являются хорошими предшественниками нуклеиновых кислот в тканях кишечника и печени морских свинок. Эксперименты показали (Рис.2), что наличие микрофлоры в желудочно-кишечном тракте у животных снижает уровень включения цитидина в нуклеиновые кислоты тканей тонкой кишки и печени. Радиоактивность ДНК, выделенной из тонкой кишки в расчете на 1 г тканей выше, чем радиоактивность ДНК печени.

Изучая включение перорально введенного уридина- $2-C^{14}$ в кислоторастворимую фракцию, РНК и ДНК тканей печени и тонкой кишки у обеих групп животных, было выяснено, что нуклеиновые кислоты тканей печени безмикробных животных (на 1 г веса тканей) включает больше радиоактивного предшественника, по сравнению с обычными морскими свинками. В тонкой кишке это не наблюдалось (Рис.3). Из рисунка видно, что у животных с нормальной желудочно-кишечной микрофлорой в течение

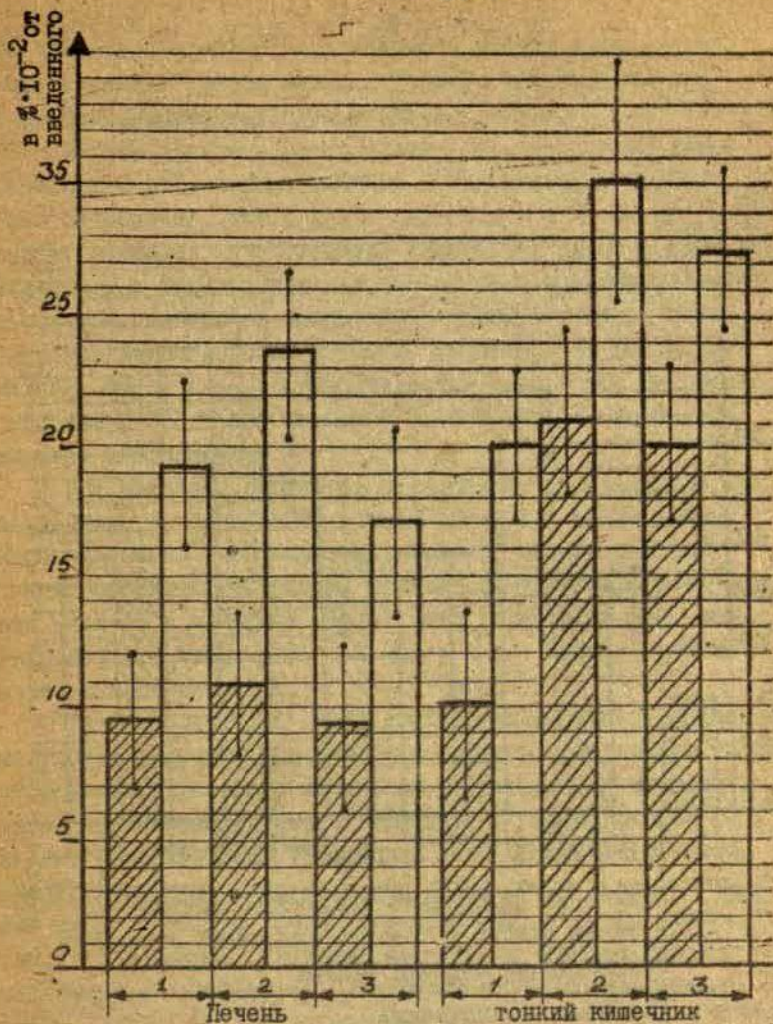


Рис. 2. Включение перорально введенного цитидина-2-С¹⁴ в ткани печени и тонкой кишки у обычных и безмикробных морских свинок.

Условные обозначения:

- | | |
|--|-------------------------|
| 1. Кислоторастворимая фракция тканей | ▨ обычные животные |
| 2. РНК тканей печени и тонкого кишечника | □ безмикробные животные |
| 3. ДНК . - " - | |

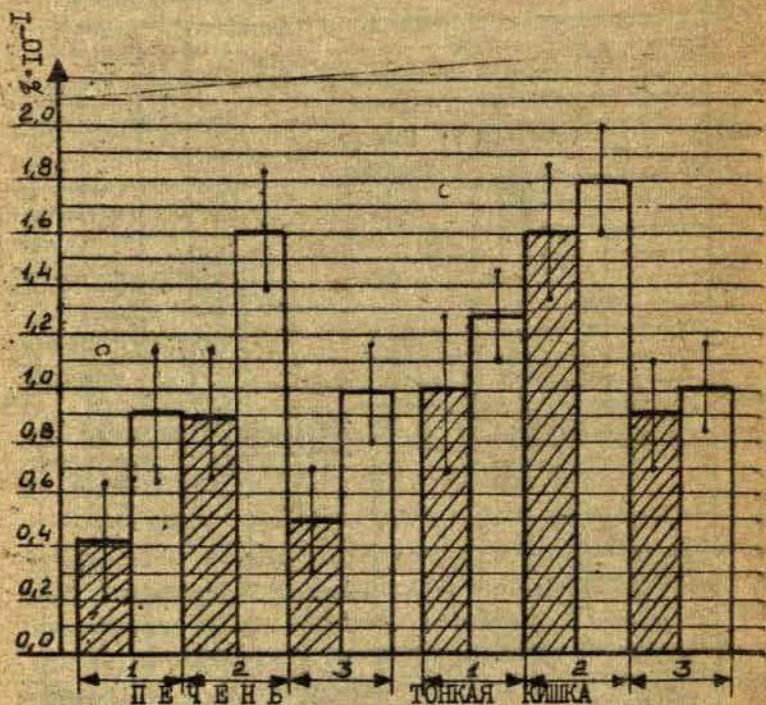


Рис.3 Включение перорально введенного уридина $-2-C^{14}$ в ткани печени и тонкого кишечника обычных и безмикробных морских свинок

Условные обозначения:

1. Кислоторастворимая фракция тканей

2. РНК тканей печени и тонкого кишечника

3. ДНК - " - " - "

▨ обычные животные

□ безмикробные животные

24 часов уридин-2- C^{14} включается в состав нуклеиновых кислот тканей тонкой кишки в большем количестве, чем в состав нуклеиновых кислот тканей печени.

Изучая продукты метаболизма перорально введенного цитидина-2- C^{14} , в моче обычных и безмикробных животных было обнаружено, что наличие микрофлоры у животных вызывает различия качественного характера. Из мочи безмикробных и обычных морских свинок были выделены следующие радиоактивные соединения: уридин, урацил, цитозин, уреидопропионовая кислота, мочевины. На Рис. 4 показано, что у безмикробных животных выделяется больше цитозина-2- C^{14} и мочевины-2- C^{14} , чем у животных с нормальной микрофлорой.

При изучении продуктов катаболизма перорально введенного уридина-2- C^{14} в моче обычных и безмикробных морских свинок были констатированы следующие радиоактивные соединения: уридин, урацил, β -уреидопропионовая кислота и мочевины. Количество мочевины в моче безмикробных животных было в среднем втрое больше, чем в моче обычных животных.

Таким образом, в наших исследованиях выяснено, что желудочно-кишечная микрофлора в большей мере влияет на деградацию перорально введенных пиримидиновых нуклеозидов до низкомолекулярных веществ, в число которых входит радиоактивный углекислый газ. Объяснить повышенный уровень включения меченных нуклеозидов в нуклеиновые кислоты тканей печени безмикробных животных можно тем, что возможно, кишечная микрофлора обычных животных быстрее деградирует нуклеозиды перед их всасыванием.

Исследование катаболизма экзогенных пиримидиновых соединений показали, что в моче безмикробных животных повышено количество мочевины, по сравнению с обычными животными. Это косвенно подтверждает данные о том, что у безмикробных животных расщепления мочевины не происходит [7]. После введения цитидина в моче безмикробных

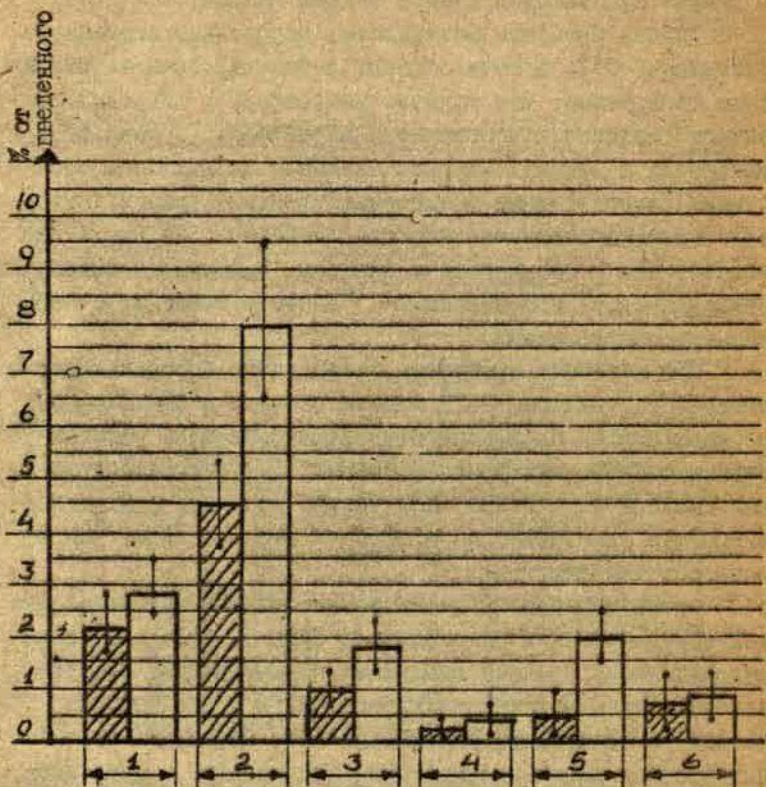


Рис. 4 Катаболиты цитидина в моче после перорального введения нуклеозида обычным и безмикробным животным

Условные обозначения:

- 1 - цитидин
- 2 - цитозич
- 3 - уридин

- 4 - урацил
- 5 - мочевина
- 6 - уреидопропионовая к-та

- ▨ - обычные животные
- - безмикробные животные

животных обнаруживается радиоактивный цитозин. Повидимому, в организме млекопитающих может происходить дезрибозидация цитидина до цитозина, который в организме безмикробных животных не расщепляется и выделяется с мочой. Этим частично можно объяснить тот факт, что после перорального введения цитидина-2- C^{14} безмикробным животным значительно меньшая часть введенного нуклеотида деградирует до $2C^{14}O_2$, по сравнению с конвенциональными животными, у которых микрофлора кишечника подвергает цитозин дальнейшему расщеплению.

Выводы

1. Желудочно-кишечная микрофлора влияет на метаболизм перорально введенных пиримидиновых нуклеотидов, ускоряя их полную деградацию.
2. У безмикробных животных анаболизируется большее количество от введенных пиримидиновых нуклеотидов, чем у обычных животных.

Литература

1. Уголев А.М. Мембранное пищеварение. М., 1972.
2. Smith R.H., McAllan A.B. - Brit. J. Nutr., 1971, 25, 181.
3. Domschke W., Keppler D., Bischoff E., Decker K.
- Hoppe-Seyler's Physiol. Chem. 1971, 352, 275.

4. Hammarsten E., Reichard P., Saluster E. - J. Biol. Chem. 1950, 183, 105.
5. Buriš L., Grinderg A., Muižnieks I., Novak F., Vitol M., Dienetbier Z. - Int. J. Radiat. Biol., 1977, 31, 161.
6. Кеннед А. Использование фильтров для разделения радиотивных ДНК, РНК и белка. - В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М., 1970, 138.
6. Levison S.M., Crowley L.V., Horwitz R.E., Molmo O.F. - J. Biol. Chem., 1959, 234, 2061.
8. Плохинокий Н.А. Биометрия. Новосибирск, 1961.

Звилна Р.Ц., Круеле М.А.,
Вытрищак Л.Н., Витол М.Я.

ЛГУ им. П. Стучки (Рига)

КАТАБОЛИЗМ АДЕНОЗИНА У КОНВЕНЦИОНАЛЬНЫХ И ГНОТОБИОЛОГИЧЕСКИХ МОРСКИХ СВИНОК

В последнее время в литературе встречается много работ по метаболизму аденозина в различных органах и тканях организма, поскольку это соединение принимает активное участие в процессе энергетического обмена как предшественник АТФ [1], в образовании ЦАМФ, в регуляции коронарного тока крови [2] и других жизненно важных процессов.

Мало известно о превращениях экзогенного аденозина в пищеварительном тракте. Имеются данные Navarro и Lagganaga [3] о включении и метаболизме аденозина в ткани кишечника новорожденных и взрослых морских свинок. В этой работе, однако, не уделяется внимания возможной роли микрофлоры, имеющей важное значение в превращениях пуриновых оснований в пищеварительном тракте млекопитающих [4]. В литературе не удалось найти данных о влиянии микрофлоры желудочно-кишечного тракта на превращение экзогенного аденозина. Это составило цель настоящей работы.

Методика

Объектом исследования служили конвенциональные и гнотобиологические морские свинки 2-3 недельного возраста весом 100 - 170 г. Гнотобионты содержались на диете № 6 [5]. Конвенциональные животные получили эту диету за неделю до опыта. Животным перорально вводили с помощью зонда 0,5 мл (10 мккюри) раствора $-C^{14}$ -аденозина (Прага, ЧССР) с удельной активностью 446 мккюри/мм. Чистота изотопа проверялась методами колоночной и бумажной хроматографии. После перорального введения изотопа животных помещали в метаболическую

камеру и проводили опыт по ранее разработанной методике [6]. В работе было использовано 5 конвенциональных и два гнотобиологических животных.

О катаболизме аденозина судили по количеству $C^{14}O_2$, выдыхаемому животными, и по накоплению продуктов его деградации в моче в течение 24 часов. Определялось также распределение радиоактивности в желудочно-кишечном тракте и в некоторых других тканях организма. Определение катаболитов в моче производилось с помощью ионообменной хроматографии на колонке с Sephadex G-10, DEAE Cellulose D 32 и бумажной хроматографией на FN 17 (ГДР) в системах растворителей: изомасляная к-та : $2N NH_4OH$ - 34:66, изопропанол : 25% NH_4OH : вода - 7:3:1, этилацетат : ледяная уксусная к-та : вода - 3:1:1, а также по спектрам поглощения на Specord UV Vis. В таблицах представлены среднеарифметические данные опытов.

Результаты и их обсуждение

После перорального введения $U-C^{14}$ -аденозина морским свинкам наблюдается выделение $C^{14}O_2$ как у конвенциональных, так и у гнотобиологических животных. Более интенсивно накопление меченного углекислого газа происходит в первые 2 - 4 часа от начала опыта (табл. I). Интересно отметить, что выделение CO_2 у конвенциональных и гнотобиологических животных происходит в почти одинаковой степени и через 24 часа у конвенциональных животных достигает 30% от общей введенной радиоактивности, у гнотобионтов - около 20%. Отсутствие резких различий в выделении $C^{14}O_2$ говорит о том, что в разложении аденозина до углекислого газа основное значение имеют ферменты самого макроорганизма. В первую очередь аденозиндезаминаза, участвующая на первой стадии катаболизма аденозина, превращая его в инозин. Так как у конвенциональных животных накопление CO_2 несколько выше, чем у гнотобионтов, можно сказать, что микроорганизмы желудочно-кишечного тракта незначительно ускоряют процесс катаболизма.

Таблица I

Динамика выделения $C^{14}O_2$ в течение 24 часов после перорального введения 10 мккюри (100%) $U-C^{14}$ -аденозина конвенциональным и гнотобиологическим морским свинкам

Активность (в %) аденозина, превращенного в $C^{14}O_2$		
Часы	Конвенц. животные	Гнотобиол. животные
0 - 1	5,03	0,58
1 - 2	7,65	1,03
2 - 3	4,09	2,86
3 - 4	1,68	5,60
4 - 5	1,39	2,09
5 - 6	1,16	1,02
6 - 7	1,04	1,50
7 - 8	0,92	0,67
8 - 24	5,85	5,15
Всего	28,78	20,52

Анализ мочи конвенциональных и гнотобиологических морских свинок показал (табл. 2), что у обеих групп животных накапливаются одни и те же продукты деградации, в почти одинаковых количественных соотношениях. Исключением является аденин, найденный в небольшом количестве только у конвенциональных животных. Присутствие аденина в моче конвенциональных морских свинок можно объяснить действием фермента нуклеозидфосфорилазы на расщепление аденозина. Поскольку у гнотобиотов аденин не был констатирован, можно сделать вывод, что за превращение аденозина в аденин ответственна микрофлора желудочно-кишечного тракта конвенциональных животных.

Остальное количество перорально введенного аденозина накапливается в организме морских свинок, составляя немного более 30 % от общей радиоактивности, введенной

с $U-C^{14}$ -аденозином (табл.3). Из полученных данных видно, что включение аденозина в различные ткани организма почти одинаково у конвенциональных и гнотобиологических морских свинок.

Таблица 2
Количество C^{14} -метаболитов аденозина в моче конвенциональных и гнотобиологических морских свинок через 24 часа после перорального введения

C^{14} -метаболиты	% от общего кол-ва C^{14} введенного в начале опыта	
	конв. животные	гнот. животные
аденозин	менее 0,3	менее 0,5
инозин	13,56	
+		23,31 *
аллантаин	10,66	
аденин	0,58	-
гипоксантин	4,56	3,74
ксантин	менее 0,3	менее 0,5
мочевая к-та	менее 0,3	менее 0,5
Всего	29,1	28,0

Примечание: * - фракция инозина + аллантаина далее не разделялась;

" - " - отсутствие катаболитов.

Исследования по катаболизму аденозина у конвенциональных и гнотобиологических морских свинок показали, что основное значение в этом процессе имеют ферменты макроорганизма. Роль микрофлоры желудочно-кишечного тракта в разложении аденозина до CO_2 незначительна. Продукт деградации аденозина - аденин обнаружен только в моче конвенциональных морских свинок.

Таблица 3

Распределение C^{14} - соединений в различных органах конвенциональных и гнотобиологических морских свинок через 24 часа после перорального введения $U-C^{14}$ -аденозина ($10,2 \times 10^6$ μ рм)

Органы	% от общего C^{14} , введенного в начале опыта		μ рм/г сырого веса	
	конв.	гнот.	конв.	гнот.
желудок	2,28	0,61	0,03	0,03
тонкая кишка	2,28	6,86	0,02	0,08
слепая + 12-перстная кишка	13,01	1,89	0,05	0,18
толстая кишка	2,11	1,27	0,03	0,08
прямая кишка	1,22	0,9	0,04	0,08
печень	2,84	1,93	0,01	0,03
почки	0,41	0,41	0,02	0,02
Всего	35,27	34,87		

Выводы

1. Разложение аденозина до CO_2 у морских свинок происходит под воздействием ферментов макроорганизма животных. Роль микрофлоры кишечника в процессе разложения незначительна.

2. За превращение аденозина в аденин ответственна микрофлора желудочно-кишечного тракта морских свинок.

Литература

1. Rappaport E., Zamesnik P.C. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 73, =, 3122.
2. Gross G.J., Warltier D.C., Hardmann H.F. - J. Pharmacol. Expt. Ther., 1976, 196, 445.
3. Navarro A.A., Battanaga M. - M.R. Arch. Farmacol. Toxicol., 1976, 2, 3, 193.
4. Витале М.Я., Лукашевич Р.Ц. Материалы II-ой Всесоюзной конференции "Гнотобионты и органичные культуры как метод лабораторных исследований". Сухуми, (в печати).
5. Чахава О.В. Гнотобиология. М., 1972.
6. Гринберг А.П., Витале М.Я., Криевиня В.Я., Вытрищак Л.Н., Риекстиня Х.П. Материалы II-ой Всесоюзной конференции "Гнотобионты и органичные культуры как метод лабораторных исследований". Сухуми, (в печати).
7. Sweetman L., Nuhari W.L. - J. Chromatography, 1968, 32, 662.

СОДЕРЖАНИЕ

1. Муляжников И.О. Метаболизм оротовой кислоты почвенными бактериями родов *Pseudomonas* и *Mycobacterium* 4
2. Муляжников И.О., Витол М.Я. Трансформация экзогенных цитидин- и гуанозин-5'-монофосфатов почвенными микроскопическими грибами 23
3. Витол М.Я., Вилко С.Р., Липман А.Я. Образование ц-3,5 АМФ и дц-3,5 АМФ из экзогенного АТФ и д-АТФ бактериями *Pseudomonas fluorescens* 310 34
4. Капранова М.Н., Лещинская И.Б., Витол М.Я., Ревелиня В.Р. Изучение способности использования РНК и ее низкомолекулярных производных культурой *Bacillus mesentericus* 40
5. Капранова М.Н., Лещинская И.Б., Витол М.Я., Ревелиня В.Р. Изучение активности нуклеолитических ферментов *Bacillus mesentericus* в процессе роста на средах с РНК и рибонуклеотидами 48
6. Емцев В.Т., Бабаццева В.А., Витол М.Я. Использование пуриновых и пиримидиновых соединений почвенными анаэробами 55
7. Шпунка И.К. Аденозиндезаминаза (Е.С.3.5.4.4) микроорганизмов 64
8. Вилко С.Р., Вулфа Л.Я. Распространенность аденозиндезаминазной способности среди микроорганизмов отдельных систематических и экологических групп 78
9. Витол М.Я., Липман А.Я., Вилко С.Р., Витола А.А., Лодзиня А.П., Миллер Т.Н. Некоторые новые стимуляторы роста микроорганизмов 83

- Ю. Гринберг А.П., Вытришак Л.Н., Криевиня В.А.,
Витол М.Я. Метаболизм экзогенных пири-
мидиновых нуклеозидов у обычных и без-
микробных морских свинок 89
- II. Звизана Р.Ц., Круеле М.А., Вытришак Л.Н., Витол М.Я.
~~Катаболизм аденозина у конвенциональных~~
и гнотобиологических морских свинок .. 98

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТРАНСФОРМАЦИЯ ПУРИНОВЫХ И
ПИРИМИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Межвузовский сборник научных трудов

Редакторы: Х.Мауриня, Р.Довгосолова
Технический редактор И.Мушниеко
Корректор И.Мушниеко

Подписано к печати 23.10. 1978. ЯТ 09713 Ф/с 60x84/16.
Бумага №1. 7,0 физ.печ.л. 5,0 уч.-изд.л. Тираж 400 экз.
Зак. № 1506. Цена 50 л.

Латвийский государственный университет им. П.Стучки
Рига 226098, С. Райниса, 19
Отпечатано на ротационте, Рига 226050, ул. Вейденбаума, 5
Латвийский государственный университет им. П.Стучки