

## PORÓWNANIE AMINOKWASOWEGO SKŁADU BIOMASY PACIORKOWCÓW WRAŻLIWYCH I OPORNYCH NA DZIAŁANIE NIZYNY

E. LIPIŃSKA, J. TOMASZEWSKA

Zakład Mikrobiologii i Biochemii — Instytut Przemysłu Mleczarskiego Warszawa

### I. WSTĘP

W toku wywoływania oporności bakterii fermentacji mlekowej na działanie nizyny przekonano się, że antybiotyk ten może powodować różne typy oporności (6); bakterie mogą wytwarzać enzym, nizynazę (10). Zaobserwowano też typ oporności, któremu nie towarzyszyło enzymatyczne niszczenie antybiotyku.

Badania dotyczące mechanizmu działania nizyny oraz nizynooporności są nieliczne. Najpełniejszą próbą poznania tych zjawisk są prace Ramseiera (11) prowadzone na bakteriach kwasu masłowego. Doprowadziły one autora do wniosku, że działanie nizyny na komórki bakteryjne jest typowe dla antybiotyków polipeptydowych, oraz związków powierzchniowo-czynnych. Ma ono polegać na atakowaniu błony cytoplazmatycznej z towarzyszącym mu wydaleniem do otoczenia składników komórki m. in. związków absorbujących światło w ultrafiolecie. Teoria Ramseiera nie stanowi podstawy, także zdaniem jej autora, do wyjaśnienia mechanizmu nizynooporności, któremu nie towarzyszy enzymatyczne niszczenie antybiotyku.

Podjęte przez nas badania miały na celu wykrycie niektórych różnic w składzie komórek bakteryjnych, wrażliwych i opornych na nizynę, drogą określenia jakości i ilości ich wolnych aminokwasów.

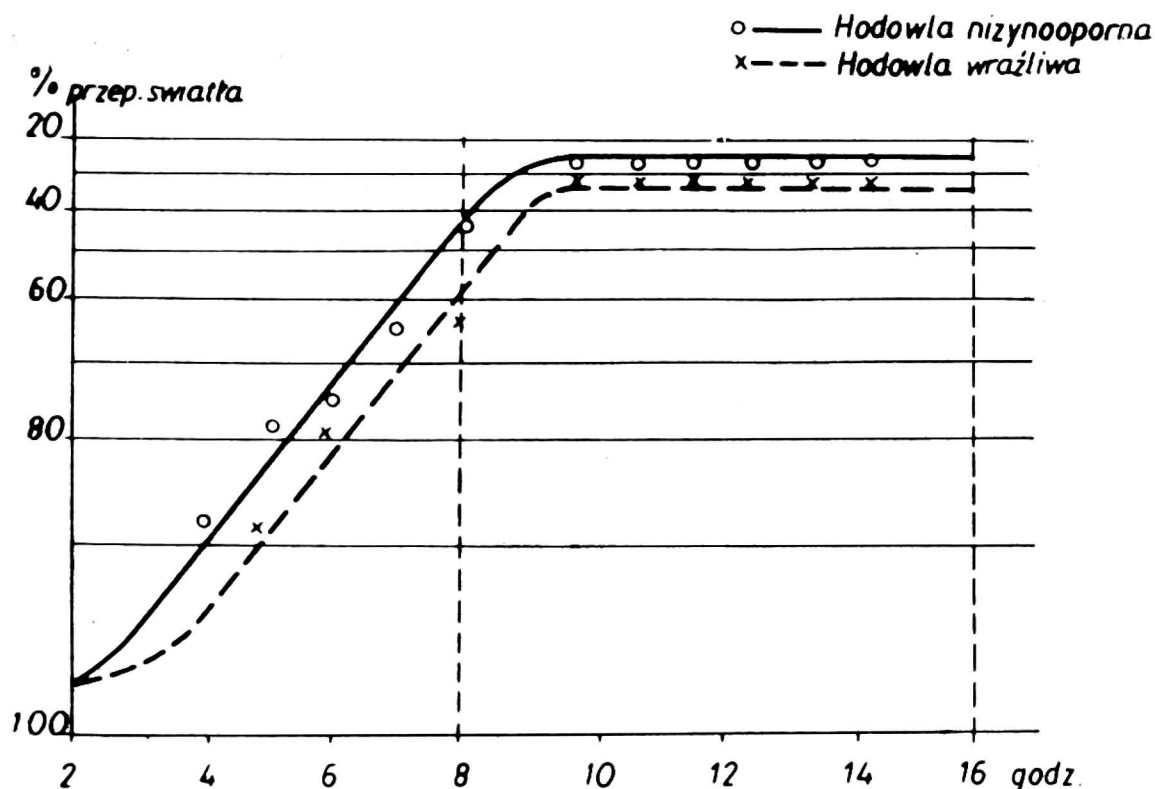
### II. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

#### 1. Metody, podłoża i szczepy użyte do badań

Poddano badaniom hodowle wrażliwe i odporne na 320 j/ml nizyny szczepu *Str. lactis* 2a<sub>3</sub> uprzednio scharakteryzowanego serologicznie i częściowo biochemicznie (7). Hodowle nizynooporne uzyskane zostały

drogą przeszczepiania w podłożach o wzrastającym stężeniu antybiotyku. W czasie trwania doświadczeń hodowle wrażliwe i nizynooporne przeszczepiano codziennie na świeże podłoże, którym było mleko odtłuszczone. Zawartość aminokwasów oznaczano w hodowlach 4-krotnie pasażowanych w bulionie<sup>1</sup> z 1% glikozy i 1% ekstraktu drożdżowego (pH — 7,35).

Badaniom poddano hodowle 8-godzinne (logarytmiczna faza rozwoju) i 16-godzinne (faza zastoju). Faza wzrostu hodowli określano fotokolorymetrem „Unicam” przy długości fali 608 mμ (filtr czerwony). Szybkość wzrostu hodowli wrażliwych i nizynoopornych różniła się nieco w logarytmicznej fazie rozwoju (rys. 1).



Rys. 1

Zawartość aminokwasów oznaczano metodą chromatografii bibułowej kwaśnych wyciągów z komórek bakteryjnych według metody Matticka i innych (9), w modyfikacji Mabbit i Gregory (8), ponadto do identyfikacji aminokwasów stosowano 0,2% roztwór izatyny i odczynnik według Dalghish'a (2).

Do ilościowej interpretacji plam uzyskanych na paskach bibuły zastosowano metodę wagową. Wykresy otrzymane na densytometrze „Vari-cord” odpowiadające plamom poszczególnych aminokwasów i standardów, były przerysowywane na kalkę techniczną, wycinane i ważone. Powierzchnie plam wywołanych przez substancje nie zidentyfikowane wy-

<sup>1</sup> Produkcja Wytwórni Surowic i Szczepionek (Warszawa).

rażono w przeliczeniu na standard kwasu glutaminowego. W skład wartości liczbowych oznaczających substancję nazwaną peptydem A wliczono także punkt naniesienia wyciągu z komórek bakteryjnych, ponieważ plamy odpowiadające tej substancji były umiejscowione tak blisko punktu naniesienia, iż ich oddzielenie na wykresach było niemożliwe. Średni błąd tak stosowanej metody wynosił  $15,2 \pm 6,9\%$  (16).

## 2. Wyniki doświadczeń

Ogółem wykonano 8 doświadczeń. W każdym doświadczeniu poddawano ekstrakcji 2 niezależne hodowle szczepu w badanej fazie rozwoju. Wyniki wszystkich doświadczeń zestawiano w tabeli 1. W celu sprawdzenia jednorodności 4 wyników liczbowych uzyskanych dla każdej z wykrytych substancji, zastosowano „test  $\chi^2$ ” (16). Na podstawie testu statystycznego potwierdzono jednorodność wyników, co pozwalało na obliczenie średnich zawartości substancji ekstrahowanych z komórek bakteryjnych.

W tabeli 2 przedstawiono średnie z czterech oznaczeń (wraz z obliczonymi przedziałami ufności na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ ) zawartości poszczególnych wolnych aminokwasów i peptydów w wyciągach z komórek bakteryjnych wrażliwych i nizynoopornych *Str. lactis* 2a<sub>3</sub> w obydwu badanych fazach wzrostu.

Dane zawarte w tabeli 2 wykazują, że wszystkie badane wyciągi bakteryjne zawierały te same ninhydrynododatnie substancje, jednak w różnych ilościach. Osiem spośród jedenastu związków zidentyfikowano jako aminokwasy: lizyna, kwas asparaginowy, seryna, glicyna, kwas glutaminowy, treonina, alanina, walina. Trzy substancje niezidentyfikowane nazwano peptydami A, B, C.

Można było zaobserwować trzy kierunki zmian w zawartości poszczególnych aminokwasów w wyciągach bakteryjnych, w obydwu badanych fazach rozwoju:

— peptydy B i C, lizyna, seryna, glicyna, kwas glutaminowy i alanina występowały w mniejszych ilościach w ekstraktach z nizynoopornych komórek bakteryjnych, w porównaniu do ekstraktów z komórek bakteryjnych wrażliwych;

— kwas asparaginowy, treonina i walina występowały w większych ilościach, względnie miały tendencje do wzrostu (jak wynika z obliczonych przedziałów ufności) w ekstraktach z nizynoopornych komórek bakteryjnych, w porównaniu do wyciągów z wrażliwych komórek;

— peptyd A występował w wyciągach bakteryjnych w ilościach różnych, w zależności od fazy rozwoju hodowli; ekstrakty z 8-godzinnych komórek nizynoopornych zawierały większe ilości peptydu, zaś ekstrakty z 16-godzinnych komórek nizynoopornych, mniejsze ilości tego związku

Tabela 1

Zawartość wolnych aminokwasów i peptydów w wyciągach z komórek wrażliwych i nizinooopornych *Str. lactis* 2a<sub>3</sub> w  $\mu\text{g}$  na 10 ml standaryzowanej zawiesiny bakteryjnej<sup>1</sup>

Lp. plam	Rodzaj hodowli	Wrażliwa 8-godzinna				Nizinoooporna 8-godzinna				Nizinoooporna 16-godzinna				Wrażliwa 16-godzinna																			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4																
Nr doświadczenia:		2				3				4				5				6				7				8							
Aminokwasy i peptydy		Ilość powtórzeń oznaczeń																															
1	2	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
1	Peptyd A <sup>3</sup>	3,49	2,94	2,52	2,90	2,74	3,54	6,97	5,23	5,24	4,59	5,24	4,82	6,37	6,82	6,54	5,01	3,97	3,01	4,66	6,00	5,12	6,17	7,47	5,58	7,41	5,85	6,03	6,33	3,09	2,92	3,51	2,61
2	Peptyd B	5,73	7,16	4,49	5,22	3,00	3,36	4,32	4,12	4,77	4,27	4,77	6,19	8,02	6,54	7,18	5,61	4,49	2,19	2,20	2,34	2,12	2,21	2,01	1,87	2,37	3,35	1,81	1,86	3,16	4,64	3,21	2,12
3	Lizyna	9,63	8,55	10,76	12,09	4,17	5,43	6,21	4,62	7,30	6,17	7,30	7,14	12,17	10,18	12,11	11,87	2,18	2,18	3,57	3,90	1,30	1,64	2,81	1,95	2,49	2,46	2,79	2,91	2,42	3,95	2,58	1,79
4	Kwas asparagi- nowy	12,15	8,91	11,55	12,62	6,30	6,10	10,04	5,16	3,13	2,56	5,69	4,53	7,02	7,15	7,26	5,41	3,97	3,01	4,66	6,00	5,12	6,17	7,47	5,58	7,41	5,85	6,03	6,33	3,09	2,92	3,51	2,61
5	Seryna	4,49	2,19	2,20	2,34	2,12	2,21	2,01	1,87	2,37	3,35	1,81	1,86	3,16	4,64	3,21	2,12	4,49	2,19	2,20	2,34	2,12	2,21	2,01	1,87	2,37	3,35	1,81	1,86	3,16	4,64	3,21	2,12
6	Glicyna	2,96	2,18	3,57	3,90	1,30	1,64	2,81	1,95	2,49	2,46	2,79	2,91	2,42	3,95	2,58	1,79	2,96	2,18	3,57	3,90	1,30	1,64	2,81	1,95	2,49	2,46	2,79	2,91	2,42	3,95	2,58	1,79
7	Kwas glutaminowy	12,15	8,91	11,55	12,62	6,30	6,10	10,04	5,16	3,13	2,56	5,69	4,53	7,02	7,15	7,26	5,41	12,15	8,91	11,55	12,62	6,30	6,10	10,04	5,16	3,13	2,56	5,69	4,53	7,02	7,15	7,26	5,41
8	Treonina	1,33	0,75	1,39	1,69	0,97	1,28	1,38	1,34	2,77	2,34	2,87	2,74	0,88	1,54	1,34	0,73	1,33	0,75	1,39	1,69	0,97	1,28	1,38	1,34	2,77	2,34	2,87	2,74	0,88	1,54	1,34	0,73
9	Peptyd C	13,47	10,73	14,09	15,20	8,93	9,76	11,56	8,44	8,93	8,18	12,66	14,11	13,97	12,52	15,23	8,43	13,47	10,73	14,09	15,20	8,93	9,76	11,56	8,44	8,93	8,18	12,66	14,11	13,97	12,52	15,23	8,43
10	Alanina	5,19	4,21	5,22	4,70	1,89	1,97	4,17	3,62	3,07	2,37	3,95	3,99	4,71	6,60	4,85	2,11	5,19	4,21	5,22	4,70	1,89	1,97	4,17	3,62	3,07	2,37	3,95	3,99	4,71	6,60	4,85	2,11
11	Walina	1,64	1,16	0,46	1,08	5,91	6,71	6,20	6,27	11,54	12,39	11,59	15,71	ślady	0,0	ślady	0,0	1,64	1,16	0,46	1,08	5,91	6,71	6,20	6,27	11,54	12,39	11,59	15,71	ślady	0,0	ślady	0,0

<sup>1</sup> Sucha masa 100 ml standaryzowanej zawiesiny wynosiła 0,041 g.

<sup>2</sup> Substancje wykryte w ekstraktach podane są w kolejności w jakiej występowały na chromatogramach

<sup>3</sup> Zawartość peptydów A, B, C, przeliczono na standard kwasu glutaminowego.

Tabela 2

Srednie zawartości wolnych aminokwasów i peptydów w wyciągach z 8-godzinnych i 16-godzinnych hodowli wrażliwych i nizynoopornych *Str. lactis* 2a<sub>3</sub> (w  $\mu\text{g}$  na 10 ml standaryzowanej zawiesiny baterijnej<sup>1</sup>)

L.p. plam <sup>2</sup>	Rodzaj hodowli	Wrażliwa 8-godzinna		Nizynooporna 8-godzinna		Wrażliwa 16-godzinna		Nizynooporna 16-godzinna	
		$\mu\text{g}$	prze-dział ufności <sup>4</sup>	$\mu\text{g}$	prze-dział ufności	$\mu\text{g}$	prze-dział ufności	$\mu\text{g}$	prze-dział ufności
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Peptyd A <sup>3</sup>	2,96	±0,54	4,62	±2,60	6,18	±1,09	4,97	±0,38
2	Peptyd B	5,65	±1,54	3,70	±0,88	6,83	±1,41	5,04	±1,20
3	Lizyna	10,26	±2,10	5,11	±1,24	11,58	±0,82	7,08	±0,91
4	Kwas asparaginowy	4,41	±1,73	6,08	±1,40	4,03	±2,09	6,40	±0,95
5	Seryna	2,81	±1,61	2,55	±0,40	3,28	±1,42	2,96	±0,98
6	Glicyna	3,15	±1,01	1,92	±0,89	2,69	±1,32	2,66	±0,30
7	Kwas glutaminowy	11,31	±2,11	6,90	±2,95	6,71	±1,19	3,97	±1,94
8	Treonina	1,29	±0,55	1,24	±0,26	1,12	±0,52	2,90	±0,32
9	Peptyd C	13,37	±2,86	9,67	±2,04	12,53	±4,07	10,97	±3,92
10	Alanina	4,83	±0,58	2,91	±1,59	4,57	±2,04	3,34	±0,81
11	Walina	1,08	±0,58	6,27	±0,46	ślady		12,81	±2,75
		61,12		50,47		59,52		62,50	

<sup>1</sup> Sucha masa 100 ml standaryzowanej zawiesiny wynosiła 0,041 g.

<sup>2</sup> Substancje wykryte w ekstraktach podane są w kolejności w jakiej występowały na chromatogramach

<sup>3</sup> Zawartość peptydów A, B, C przeliczono na standart kwasu glutaminowego

<sup>4</sup> Na poziomie istotności = 0,05

w porównaniu do wyciągów z wrażliwych na nizynę komórek bakteryjnych.

Stwierdzić wreszcie należy, że mimo różnic w zawartości poszczególnych aminokwasów, całkowita ilość badanych substancji była tego samego rzędu wielkości dla wyciągów z 8-godzinnych i 16-godzinnych komórek wrażliwych na nizynę, oraz z 16-godzinnych komórek nizynoopornych. Tylko wyciągi z 8-godzinnych komórek nizynoopornych były znacznie uboższe w badane związki.

### III. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Różnice w zawartości wolnych aminokwasów i peptydów jakie zostały zaobserwowane w komórkach wrażliwych i nizynoopornych mogły być wyrazem zmian wywołanych w wrażliwych komórkach bakteryjnych na skutek działania suboptymalnych ilości nizyny, które dodawane były do podłoża w toku indukowania nizynooporności. Jeżeli chodzi o amino-

kwasy i peptydy, które występowały w mniejszych ilościach w komórkach nizynoopornych, to zjawisko zubożenia komórek bakteryjnych w podobne związki na skutek działania antybiotyków polipeptydowych zostało już zaobserwowane przez Gale i Taylor'a (5), którzy uwalniali z komórek *Str. faecalis* kwas glutaminowy i lizynę przez działanie tyrocydyny<sup>1</sup>. Większa zawartość waliny, treoniny i kwasu asparaginowego w wyciągach z paciorkowców nizynoopornych mogła również być związana ze zmianami wywołanymi w komórce bakteryjnej przez działanie suboptymalnych ilości nizyny. Zmiany te mogły stanowić wyraz dostosowania metabolicznego (4) komórki bakteryjnej do obecności antybiotyku. Walina i treonina są niezbędnym budulcem białka cytoplazmatycznego komórki bakteryjnej. Zaś kwas asparaginowy, który w naszych badaniach był trzecim z aminokwasów występujących w większych ilościach w nizynoopornych paciorkowcach, to zgodnie z wynikami badań Abelsona i innych (1) oraz Delluvy (3), może on być prekursorem treoniny i stanowić pośrednie ogniwo biosyntezy białka cytoplazmatycznego.

W świetle uzyskanych przez nas wyników dostosowanie metaboliczne komórki bakteryjnej do obecności nizyny może polegać m. in. na większej aktywności w zakresie syntezy białka cytoplazmatycznego. Siedliskiem zmian, ewentualnie części zmian w komórce bakteryjnej, jakie wiązałyby się z nizynoopornością, byłaby więc substancja cytoplazmatyczna komórki. Doszukując się przyczyn postulowanej większej intensywności syntezy białka cytoplazmatycznego w komórkach opornych niż w komórkach wrażliwych na działanie nizyny, można założyć, że jest ona spowodowana przez zmiany w przepuszczalności błony cytoplazmatycznej, którą suboptymalne ilości nizyny częściowo uszkadzają. Tylko ta część populacji bakteryjnej, która okazałaby się zdolna do wyrównania strat substancji cytoplazmatycznej (wynikających z częściowego uszkodzenia błony cytoplazmatycznej komórki przez antybiotyk), intensywniejszą syntezą m. in. białka cytoplazmatycznego byłaby zdolna przeżyć i rozmnażać się w obecności nizyny, stając się tym samym oporną na działanie tego antybiotyku.

Można uznać za potwierdzenie hipotezy o zależności między zawartością waliny i treoniny w komórce bakteryjnej, a intensywnością syntezy białka cytoplazmatycznego, badania Toennisa i Shockmana (14), Shockmana (12), Toennisa, Balaya i Shockmana (15) oraz Shockmana i innych (13), które wykazały, że wyczerpanie niektórych aminokwasów a szczególnie waliny i treoniny w podłożu powodowało dalszy wzrost

<sup>1</sup> Zaznaczyć jednak należy, że hodowle *Str. faecalis* były uprzednio prowadzone w podłożach szczególnie bogatych w omawiane aminokwasy.

hodowli, charakteryzujący się głównie przyrostem ścian komórkowych, przy zmniejszonym przyroście substancji cytoplazmatycznej komórki.

Zoabserwowany przez nas podobny kierunek zmian w zawartości badanych substancji w hodowlach w logarytmicznej fazie rozwoju i w fazie zastoju pozwala przypuszczać, że mechanizm obrony komórki bakteryjnej przed działaniem nizyny jest jednakowy w obydwu fazach wzrostu hodowli.

Zaznaczyć wreszcie należy, że obserwacje i oparta na nich próba wyjaśnienia nizynooporności paciorkowców, której nie towarzyszy enzymatyczne niszczenie antybiotyku dotyczy tylko komórek bakteryjnych o nabytej oporności.

Dalsze badania powinny wyjaśnić, czy podane różnice w zawartości wolnych aminokwasów oraz innych składników komórki bakteryjnej dają się zaobserwować w paciorkowcach o naturalnej oporności na nizynę.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Abelson P. H., Bolton E. T., Aldons E.: *J. Biol. Chem.* **198**, 173 (1952).
2. Dalghish C. E.: *Nature* **166**, 1076 (1950).
3. Delluva A. M.: *Arch. Bioch. Bioph.* **45**, 443 (1953).
4. Dobrzański W. T.: *Post. Higj. Med. Dośw.* **13**, 667 (1959).
5. Gale E. F., Taylor S. E.: *J. Gen. Microbiol.*, **1**, 77 (1947).
6. Lipińska E., Strzałkowska M.: *XV Międz. Kongr. Mlecz. Londyn* **2**, 572 (1959).
7. Lipińska E.: *Prace Inst. Przem. Mlecz.* **8**, 1 (1961).
8. Mabbit L. A., Gregory M.: *Bioch. Bioph. Acta* **37**, 139 (1960).
9. Mattick A. T. R., Cheesman G. C., Berridge N. J., Botazzi V.: *J. Appl. Bact.* **19**, 310 (1956).
10. Pette J. W., Kooy J. S.: *XIII Międz. Kongr. Mlecz. Haga*, **3**, 1172 (1953).
11. Ramseier H.: *Arch. Microbiol.* **37**, 57 (1960).
12. Shockman G. D.: *J. Biol. Chem.* **234**, 2340 (1959).
13. Shockman G. D., Philips M. P., Riley S. L., Conever J. M., Kolb J. J.: *J. Bact.* **81**, 36 (1961).
14. Toennis G., Shockman G. D.: *Arch. Bioch. Bioph.* **45**, 447 (1953).
15. Teonnis G., Bakay B., Shockman G. D.: *J. Biol. Chem.* **234**, 3269 (1959).
16. Weber E.: *Erführung in der statistische Matematik* — Jena 1961.

#### DYSKUSJA

*Prof. dr J. Janicki, WSR, Poznań*

Doniesienie jest bardzo interesujące ze względu na możliwość wpływania na skład aminokwasowy różnych mikroorganizmów przy pomocy antybiotyków. Mogłoby to być jedną z dróg przygotowania mikroorganizmów do biosyntezy białek, które by miały określony skład chemiczny. Jak wykazano w pracy, nizynooporne

mikroorganizmy mają np. mniej lizyny. W związku z tym interesuje mnie czy badano tylko skład samych komórek bakteryjnych i czy aminokwasy przechodziły do roztworu.

*Dr E. Lipińska, Instytut Przemysłu Mleczarskiego, Warszawa*

Badane były ekstrakty z komórek bakteryjnych, oddzielonych od podłoża i wymytych ze składników podłoża. Komórki były ekstrahowane 10% kwasem octowym przez 4 godziny. Tak uzyskany kwaśny roztwór aminokwasów i peptydów był наносzony na chromatogram. W niniejszej pracy nie badano zmian zawartości aminokwasów i peptydów w podłożu po zadziałaniu antybiotykiem na hodowlę bakteryjną.