

612  
0-570

АКАДЕМИЯ НАУК КАЗАХСКОЙ ССР

ОБЪЕДИНЕННЫЙ УЧЕНЫЙ СОВЕТ ИНСТИТУТОВ ЗООЛОГИИ  
И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ

---

На правах рукописи

Ж. К. ОМАРОВ

НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ  
РОСТА И ТОКСИНООБРАЗОВАНИЯ  
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS  
ТИПА Д

(СПЕЦИАЛЬНОСТЬ 093 — БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ)

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Алма-Ата — 1969

577-5  
0-570

На правах рукописи

Ж. К. ОМАРОВ

НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ  
РОСТА И ТОКСИНООБРАЗОВАНИЯ  
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS  
ТИПА Д

(СПЕЦИАЛЬНОСТЬ 093 — БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ)

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Алма-Ата — 1969



76967

2

Работа выполнена в лаборатории биохимии Научно-исследовательского ветеринарного института Министерства сельского хозяйства КазССР. Директор — кандидат ветеринарных наук **Л. Д. ПАНКРАТОВ**.

Научный руководитель — заведующий лабораторией биохимии КазНИВИ, доктор биологических наук **В. М. КРАСОВ**.

Диссертация изложена на 190 страницах машинописного текста и состоит из разделов: введение и обзор литературы — 37 стр., материал и методы исследования — 22 стр., собственные исследования — 81 стр., обсуждение результатов исследований, заключение, выводы и библиографический указатель — 50 стр.

Список используемой литературы содержит 232 отечественных и 87 иностранных источников.

Работа иллюстрирована 17 рисунками и 21 таблицей.

#### **Официальные оппоненты:**

1. Доктор биологических наук, профессор **М. М. РЕМЕНЦОВА**.

2. Кандидат биологических наук, доцент **У. Т. ТАШМУХАМЕТОВ**.

Ведущее предприятие — Алма-Атинский зооветеринарный институт, кафедра биохимии.

Автореферат разослан «        » августа 1969 г.

Защита диссертации состоится «        » сентября 1969 г. на заседании Объединенного ученого совета институтов зоологии и экспериментальной биологии Академии наук Казахской ССР.

С содержанием диссертации можно ознакомиться в библиотеке института.

*Отзывы на автореферат (в двух экземплярах с заверенной подписью) просим присылать по адресу: г. Алма-Ата, 72, проспект Абая, 38, Институт экспериментальной биологии, Ученому секретарю совета.*

Ученый секретарь совета,  
доктор биологических наук

**А. М. МУРЗАМАДИЕВ.**

В постановлении ЦК КПСС и Совета Министров СССР от 9 января 1963 года «О мерах по дальнейшему развитию биологической науки и укреплению ее связей с практикой» указывается, что основными задачами биологической науки является выяснение сущности явлений жизни, вскрытие биологических закономерностей развития органического мира, изучение физики, химии и живого, разработка различных способов управления жизненными процессами, в частности, обменом веществ, наследственностью и изменениями организмов. Среди указанных направлений биологической науки должное место отведено биологической химии и в связи с тем, что в последнее время научные исследования в области биологии, физиологии, микробиологии и некоторых областях промышленности в значительной степени развиваются благодаря достижениям биохимии.

Как известно, основной характеристикой жизни организма является метаболизм. При изучении его биохимических аспектов исследователи руководствуются принципом единства и эволюционной преемственности живых форм. Сравнительный метод исследования дает возможность понимать биохимию не только примитивных, но и высокоорганизованных существ. Это видно из того, что многие биохимические процессы, происходящие в организме людей и животных, были впервые успешно расшифрованы при помощи постановки биохимических опытов на модели микробной клетки (А. М. Кузин, 1946; В. С. Гостев, 1951; В. Н. Шапошников, 1960; Е. М. Губарев, 1961; Л. Месробяну и П. Пэунеску, 1963). В связи с этим изучение биохимии микроорганизмов представляет не только большой теоретический, но и практический интерес, особенно для медицинской и ветеринарной микробиологии, перед которыми поставлена ответственная задача по разработке и изготовлению эффективных профилактических биопрепаратов против инфекционных заболеваний людей и животных.

Большой урон развитию животноводства в Казахстане причиняет инфекционная энтеротоксемия овец, основным этиологическим фактором которой является воздействие на организм бактериальных токсинов *Clostridium perfringens* типа С (бета-токсин) и типа Д (эпсилон-токсин). Работами советских исследователей (М. Д. Польшковский, Ф. М. Каган и А. В. Ляушкин, 1958; В. И. Леньков, 1961; В. С. Анисимов и А. К. Кунанбаев, 1961, 1963) установлено, что на территории Казахстана преобладает инфекционная энтеротоксемия овец, вызываемая возбудителем *Cl. perfringens* типа Д.

Для профилактики инфекционной энтеротоксемии овец широкое применение получила активная иммунизация животных (М. Д. Польшковский, Я. Р. Коваленко, 1954; А. А. Волкова и Т. Н. Толстоулакова, 1957; П. И. Кабанов, 1957; Ф. И. Каган и А. И. Колесова, 1958; В. И. Леньков, 1961; В. С. Анисимов, 1963; В. С. Анисимов и др., 1968; Н. М. Черноусов, 1969; И. А. Барабанов, 1969). Однако существенным препятствием при получении постоянных по активности препаратов являются затруднения, связанные с изысканием стандартных питательных сред, предназначенных для выращивания микробов и получения токсина, от активности которого в значительной степени зависят иммуногенные свойства того или иного биопрепарата (А. В. Пономарев, 1959; П. В. Павлов и А. Г. Леонов, 1961; Н. Pivnick a. A. H. W. Nauschild, 1965; и другие).

Литературные данные указывают на то, что существуют определенные и достаточно специфичные требования микробов к источникам питания, температурному режиму, инициальному рН и окислительно-восстановительному потенциалу среды, от которых зависят направление и темпы метаболических процессов, деятельность ферментов, диссоциация промежуточных продуктов и пути их дальнейших превращений и т. д. (М. Д. Иерусалимский, 1949, 1963; В. С. Гостев, 1951; О. П. Самарина, 1953; Е. Д. Вышепан, 1953; И. Л. Работнова, 1957; К. И. Матвеев, 1959; И. Н. Моргунов, 1959; И. Н. Виноградова, 1959, 1962; Е. М. Губарев, 1961, 1964; Л. С. Диневич, 1961; Я. М. Коляков, 1961; М. А. Бабич, 1962; Л. Месрбяну и Э. Пэунеску, 1963; А. Крамли и Л. И. Воробьева, 1964; З. М. Волкова и др., 1964; Н. И. Шапиро, 1964, 1965; Л. Г. Иванова и др., 1965; В. С. Самсонова и др., 1965; И. П. Майорова и др., 1965; В. А. Благовещенский, 1966; В. Г. Петровская, 1967; и многие другие).

В связи с изложенным, нами были предприняты исследо-

вания процесса токсинообразования *Cl. perfringens* в зависимости от степени расщепления белкового субстрата среды, некоторых показателей ее азотистого и углеводного состава, рН и окислительно-восстановительного потенциала среды. Определение этих показателей среды в динамике роста изучаемых микробов явились основными методическими приемами исследования отдельных сторон обмена веществ, питательных потребностей и оптимальных условий их культивирования.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика штаммов *Cl. perfringens*. Объектом исследования служила культура *Cl. perfringens* типа Д, штамм № 213 и штамм № 29. Оба штамма были получены из лаборатории по изучению инфекционных болезней овец КазНИВИ.

Штамм № 213 был выделен Вейнбергом во Франции и прислан в Советский Союз в 1954 г. Согласно паспортных данных, микробы указанного штамма при выращивании на среде панкреатического перевара мяса наиболее постоянно проявляют токсинообразующие свойства в пределах 2000—4000 Длм/мл.

Штамм № 29 был выделен сотрудниками лаборатории по изучению инфекционных болезней овец КазНИВИ в 1956 г. из трупа овцематки, павшей от инфекционной энтеротоксемии и принадлежавшей хозяйству им. Мынбаева Джамбулского района Алма-Атинской области. По данным этой лаборатории, микробы штамма № 29 (КазНИВИ) при выращивании на панкреатическом переваре мяса обладают способностью образовывать эспирон-токсин активностью до 2000 Длм/мл.

Исследования зависимости токсинообразования *Cl. perfringens* от показателей азотистого, углеводного состава среды и ее окислительно-восстановительного потенциала были проведены на панкреатическом переваре мяса и предложенной нами комбинированной полусинтетической среде с основой шептона.

Посевным материалом служила 6—8-часовая культура указанных штаммов, выращенная на панкреатическом переваре мяса при 37—38°. Количество посевного материала, внесенного в питательные среды, зависело от численности микробной популяции в раскладке, которая определялась турбодиметрическим методом М. А. Таркова, Л. С. Диневица и М. Г. Бранда (1963).

Для обнаружения эpsilon-токсина в центрифугате культуры использовали принятый в лаборатории по изучению инфекционных болезней овец КазНИВИ метод активации протоксина сухим панкреатином. Активность полученного эpsilon-токсина определяли методом титрования на белых мышах.

Электрометрические методы исследования. Для определения концентрации водородных ионов использовали рН-метр типа ЛПУ-01. Измерительными электродами служили стеклянные электроды типа 5579, предназначенные для измерения рН растворов с температурой от 15 до 100°. Для определения рН в культуре *Cl. perfringens* погруженный в питательную среду стеклянный электрод соединяли с каломельным (электродом сравнения) электролитическим агаровым мостиком.

Активную реакцию (рН) в культуре регулировали с помощью добавления к ней стерильного 15% раствора едкого натра и ее размешивания электромагнитной мешалкой до окончательного установления показания рН-метра.

Измерение окислительно-восстановительного потенциала проводили на рН-метре типа 2518/s, который имеет шкалу для определения рН и шкалу для измерения потенциала (Eh). Для этих целей, по рекомендации И. Л. Работновой (1957), использовали платинированные платиновые электроды. Электродом сравнения служил также каломельный электрод.

Стерилизацию стеклянных электродов проводили путем обработки перекисью водорода (G. A. Dabson a. J. J. Bullen, 1964) с последующей тиндализацией. Платиновые электроды и электролитические агаровые мостики стерилизовали путем автоклавирования.

Методика определения окислительно-восстановительного потенциала ( $\text{rH}_2$ ) сводилась к следующему: через 30 минут после погружения стеклянного электрода в стерильную среду определяли рН и Eh исходной питательной среды, затем производили посев культуры, которую выращивали в течение 24 часов при температуре 37—38°. Через 30 минут, через час, полтора, два, а затем через каждый час после засева измеряли потенциал и рН среды. По величине найденной электродвижущей силы в милливольтгах (Eh) и рН по формуле Нернста определяли  $\text{rH}_2$ , предварительно сделав поправку к показанию прибора на потенциал каломельного электрода (+250 мв).

Методы химического контроля состава питательной среды. В среде и в пробах культуральной жидкости (после центрифугирования при 10 000 об./мин. для освобождения от микробных клеток) определяли:

общий, остаточный и полипептидный азот по методу микрокельдаля;

процентное содержание пептона модифицированным нами методом Перфильева;

количественное содержание свободных аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге; глюкозу по методу А. Lepolard (1965), основанному на реакции с О-толуидином и спектрофотометрировании при 630 мμ;

редуцирующие вещества по методу Хагедорн-Иенсена; аминный азот по Зеренсену — Гаврилову.

Отбор проб для исследований проводили в следующие сроки:

для определения количества общего, остаточного, полипептидного, аминного азота, пептона и аминокислотного состава — через 8 и 24 часа роста культуры;

для определения редуцирующих веществ, глюкозы, количества микробных клеток, силы токсина (Dlм/мл) и микроскопирования культуры — через 2, 4, 6, 8, 10, 12 и 24 часа роста.

Полученные цифровые данные подвергались обработке методом вариационной статистики. Дозировка посевного материала и не менее 4—6-кратное повторение опытов позволили получать статистически достоверные результаты, которые приводятся в диссертации в виде графических кривых и таблиц.

### **Сравнительное испытание некоторых питательных сред, используемых для выращивания и получения токсина *Cl. perfringens***

Накопившийся к настоящему времени опыт показывает, что синтез эpsilon-токсина *Cl. perfringens* лучше всего получается на средах, содержащих продукты ферментативного расщепления мяса и казеина. С учетом этого были проведены опыты по сравнительному испытанию некоторых питательных сред, в которых исследовалась токсигенная популяция *Cl. perfringens* (штамм № 213).



Предварительные опыты позволили отобрать для сравнительного испытания следующие среды: ферментативный (панкреатический) гидролизат казеина, грибной гидролизат казеина, казеиново-печеночная среда с мартеновским бульоном, полный перевар мяса по Хоттингеру, печеночный бульон по Хоттингеру, панкреатический перевар мяса, аминокептид и нативный экстракт печени, изготовленный по методике, разработанной в ГНКИ.

Лучшей средой для культивирования изучаемых микробов и получения эpsilon-токсина оказалась среда панкреатического перевара мяса, на которой отмечается токсинообразование в пределах 4000 D<sub>10</sub>. При добавлении к этой среде в оптимальных количествах фосфатов, комплекса витаминов В, никотиновой и пантатеновой кислот, микроэлементов (меди, кобальта, цинка, молибдена) выход токсина повышался до 8000 D<sub>10</sub> (Л. Д. Панкратов, В. М. Красов, Е. О. Метельская, Л. М. Грудина, Ж. К. Омаров, 1966).

Одним из критериев оценки качества и пригодности среды для культивирования микробов является ее азотистый состав. Поэтому для установления оптимальных (по азотистому составу) пределов ферментативного переваривания мяса панкреатином этот процесс регулировали под контролем количества аминного и общего азота. Для этих целей были приготовлены и испытаны 45 вариантов среды панкреатического перевара мяса. Результаты исследований показали, что при использовании разных образцов мясных субстратов крайне трудно получить показатели аминного и общего азота в узких оптимальных пределах, способствующих лучшему токсинообразованию изучаемых микробов, так как оптимальная концентрация аминного азота находится в пределах 100—200 мг%, а общего азота — 250—500 мг%.

Исходя из полученных данных, наиболее объективным показателем следует считать степень расщепления азотистых веществ среды (аминный азот  $\frac{\%}{\%}$  общий азот), колебания которого лежат в пределах 0,36—0,44. Соблюдение указанного соотношения аминного и общего азота при изготовлении панкреатического перевара мяса позволяет в большинстве случаев получать более оптимальные варианты сред. Лучшими можно считать среды следующего химического состава: аминного азота должно быть 140—180 мг%, общего азота — 400—500 мг%, пептона — 2,5—3,0%, азота полипептидов, 120—

140 мг%, белкового азота — допускается наличие следов, редуцирующих веществ — 250—350 мг%, из них глюкозы 150—200 мг%.

### **Динамика изменения окислительно-восстановительного потенциала, азотистого и углеводного состава питательной среды при выращивании *Cl. perfringens* на панкреатическом переваре мяса**

Исследования проводились комплексно: одновременно изучалась динамика размножения, токсинообразования, изменения морфологических свойств культуры, динамика изменения окислительно-восстановительного потенциала, азотистых и углеводных компонентов среды.

Из приводимых в таблице 1 данных видно, что после внесения посевного материала в среду наблюдается резкое снижение исходного потенциала среды ( $Eh = 170-180$  мв,  $rH_2 = 21$ ), который через 2—3 часа роста культуры достигает самого низкого значения (от  $-400$  до  $-420$  мв.  $Eh$  или  $rH_2 = 0$ ). Это снижение окислительно-восстановительного потенциала происходит в период лаг-фазы, когда бактериальные клетки еще не делятся и только претерпевают морфологические изменения (стадия длинных нитей и гигантских клеток) и лишь отчасти на начало активной фазы размножения микробов, которая начинается несколько раньше установления предельного потенциала среды при  $Eh = -380$ —( $-400$ ) мв и  $rH_2 = 2-3$ . После достижения предельного значения  $rH_2$  стабилизируется и удерживается на одном уровне до конца инкубирования культуры.

Динамику размножения и токсинообразования несколько лучше отображают рН и  $Eh$  среды, так как изменение этих величин происходит синхронно размножению микробов в течение всего периода выращивания. При сопоставлении этих данных было установлено, что максимум накопления эпсилон-токсина (2000—3000 DIm) приходится на конец логарифмической — начало стационарной фазы размножения бактерий (4,6—4,9 млрд/мл микробных клеток).

Определенный интерес представляет сам факт установления предельного потенциала в культуре *Cl. perfringens*. Хорошая воспроизводимость этой величины в повторных опытах свидетельствует об однотипности происходящих метаболиче-

Динамика изменения окислительно-восстановительного потенциала (Еh, Cl. perfringens при культивировании

Часы роста	Панкреатический перевар. мяса—контроль					Панкре
	Еh(мв)	pH	rH <sub>2</sub>	количество микробных клеток (млрд/мл)	содержание токсинов в ДПт/мл	Еh(мв)
Исходная среда	+172 ±9,3	7,39 ±0,046	20,5	—	—	+29 ±6,16
Среда после засева	+41 ±31,8	7,38 ±0,038	15,9	0,58 ±0,013	—	—85 ±25,7
Через 1/2	—180 ±69	7,38 ±0,038	8,8	0,58 ±0,013	—	—235 ±22,0
“ 1	—295 ±42	7,38 ±0,027	4,9	0,58 ±0,013	—	—350 ±28,9
“ 1 1/2	—	—	—	—	—	—410 ±5,05
“ 2	—421 ±19,4	7,31 ±0,120	0,2	0,70 ±0,01	200	—428 ±4,97
“ 3	—401 ±6,6	7,00 ±0,085	0	—	—	—418 ±2,47
“ 4	—387 ±4,3	6,72 ±0,16	0	0,95 ±0,008	300	—416 ±6,75
“ 5	—378 ±5,6	6,31 ±0,16	0	—	—	—423 ±3,18
“ 6	—370 ±5,3	6,20 ±0,17	0	2,9 ±0,06	1000	—421 ±1,34
“ 7	—365 ±4,7	6,13 ±0,18	0	—	—	—418 ±4,57
“ 8	—360 ±6,7	6,10 ±0,18	0	4,9 ±0,4	250	—418 ±3,38
“ 9	—358 ±4,8	6,06 ±0,20	0	—	—	—418 ±3,22
“ 10	—358 ±5,2	6,03 ±0,20	0	4,7 ±0,36	1800	—420 ±2,87
“ 11	—358 ±5,2	6,02 ±0,20	0	—	—	—420 ±0,95
“ 12	—358 ±5,2	6,02 ±0,20	0	4,5 ±0,37	1500	—418 ±3,03
“ 24	—345 ±4,1	6,15 ±0,17	0,8	4,0 ±0,3	1500	—405 ±5,72

**pH и гН<sub>2</sub>), размножения и токсинообразования  
на различных питательных средах**

атический перевар мяса с глucoseй и фосфатами (рН—6,7—7,0)				Полусинтетическая среда (рН—6,7—7,0)				
рН	гН <sub>2</sub>	количество микробных клеток (млрд/мл)	содержание токсина Dlм/мл	Eh(мв)	рН	гН <sub>2</sub>	количество микробных клеток (млрд/мл)	содержание токсина в Dlм/мл
7,38	14,9	—	—	—120	7,4	10,8	—	—
±0,023				±30,2	±0,33			
7,37	11,9	0,59	—	—180	7,38	8,7	0,55	—
±0,03		±0,048		±10,7	±0,029		±0,028	
7,37	6,9	0,59	—	—285	7,38	5,2	0,55	—
±0,03		±0,058		±9,0	±0,026		±0,028	
7,32	2,6	0,64	—	—378	7,35	2,0	0,6	—
±0,008		±0,29		±3,16	±0,22		±0,018	
7,11	0,5	0,88	—	—425	7,29	0,4	0,65	—
±0,04		±0,21		±7,75	±0,021		±0,026	
6,89	0	1,6	700	—438	7,1	0	0,85	1000
±0,018		±0,16		±10,9	±0,063		±0,047	
6,85	0	—	—	—430	6,78	0	—	—
±0,018				±3,2	±0,032			
6,87	0	±0,29	2500	—425	6,82	0	3,8	3000
±0,018				±0	±0,025		±0,25	
6,86	0	—	—	—420	6,82	0	—	—
±0,015				±1,44	±0,025			
6,86	0	6,9	4000	—425	6,83	0	7,1	4500
±0,015		±0,18		±1,25	±0,013		±0,085	
6,86	0	—	—	—425	6,82	0	—	5300
±0,015				±2,5	±0,032			
6,87	0	7,3	4250	—425	6,85	0	7,3	5000
±0,027		±0,29		±3,5	+0,020		±0,1	
6,86	0	—	—	—424	6,83	0	—	—
±0,022				±2,4	±0,018			
6,88	0	7,2	3800	—422	6,82	0	6,8	3500
±0,015		±0,15		±1,75	±0,015		±0,1	
6,9	0	—	—	—422	6,81	0	—	—
±0				±1,75	±0,024			
6,9	0	6,7	3000	—420	6,81	0	6,6	3500
±0,004		±0,32		±1,75	±0,024		±0,052	
6,85	0,2	5,1	3000	—412	6,78	0	5,8	3000
±0,009		±0,29		±4,27	±0,03		±0,336	

ских процессов в развивающейся культуре (И. Л. Работнова, 1957). Отсюда следует, что окислительно-восстановительный потенциал питательной среды является лабильным показателем не только для оценки кинетики размножения микробов и образования токсина, но также для характеристики общей напряженности обменных процессов, протекающих в культуре.

При изучении динамики изменения некоторых азотистых компонентов среды было установлено, что для изучаемых бактерий при выращивании на панкреатическом переваре мяса характерным следует считать постоянство количества общего азота, увеличение количества аминного азота (от 180 до 240 мг%) и коэффициента расщепления субстрата среды (от 0,39 до 0,5), значительное уменьшение количества пептона (от 2900 до 2600 мг%) и полипептидов (от 140 до 93 мг%) после 8 часов роста микробов и сравнительно незначительное уменьшение этих же показателей в последующие часы выращивания (пептона от 2600 до 2500 мг%, полипептидов от 93 до 83 мг%). Это указывает на некоторый параллелизм между интенсивностью использования пептона и полипептидов и фазами роста *Cl. perfringens*.

Хроматографическое исследование изменения аминокислотного состава среды позволило отметить, что на общем фоне увеличения содержания аминокислот в среде (после 8 и 24 часов роста), происходящего в результате протеолитической деятельности микробов, заметно уменьшение количества только отдельных аминокислот, потребление которых происходит более интенсивно, чем протеолиз субстрата среды. К этим аминокислотам относятся цистеин (цистин), гистидин, аргинин, серин и тирозин, количество которых уменьшается уже после первых 8 часов роста микробов. Однако в дальнейшем концентрация этих аминокислот, за исключением серина, также начинает увеличиваться и в процессы метаболизма вовлекаются другие аминокислоты (аспарагиновая и глутаминовая кислоты, фенилаланин, изолейцин-лейцин).

При изучении динамики изменения редуцирующих веществ среды было установлено, что усвоение этих веществ идет в основном за счет глюкозы, которая используется микробами более чем на 50%. Потребление ее начинается сразу с началом размножения бактерий и практически заканчивается к концу логарифмической фазы, т. е. к 8 часам роста культуры.

## Влияние глюкозы, фосфатов и регулируемого рН на размножение, токсинообразование *Cl. perfringens* и окислительно-восстановительный потенциал среды

Опыты по культивированию *Cl. perfringens* проводились на улучшенном варианте среды: панкреатический перевар мяса, к которому добавлены в оптимальной концентрации глюкоза (0,5%) и фосфаты ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  — 1,0—1,2% и  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,12—0,14%); активная реакция (рН) в среде поддерживалась в пределах 6,7—7,0 (А. Н. В. Hauschild, 1965).

Сделанные нами добавления к среде, а также непрерывное регулирование рН явились факторами, которые значительно стимулируют рост и токсинообразование микробов. Из данных таблицы 1 видно, что после 6—8-часового инкубирования культура содержит максимальное количество микробных клеток (7,0—7,5 млрд/мл) и токсин активностью 4000—5000 Dlm, тогда как на контрольной среде накопление клеток перфрингенс и токсина происходит менее интенсивно (4,6—4,9 млрд/мл микробных клеток и 2000—3000 Dlm токсина) и в более поздние сроки.

Интересно отметить, что длительность сохранения максимальных титров токсина в культуре на разных средах оказалась не одинаковой. Так, если на контрольной среде токсин, содержащий 2000—3000 Dlm, сохраняет этот титр на протяжении 4 и более часов, то токсин, полученный на среде с глюкозой и содержащий 3000—4000 Dlm, начинает ослабевать через 2—3 часа; в условиях же регулирования рН на среде с глюкозой удается получать более сильный токсин, активностью 4000—5000 Dlm, и сохранять его на протяжении 4—5 часов. Из этих данных можно заключить, что величина рН среды является важным фактором как для активизации образования токсина, так и длительности его сохранения в культуре.

Выяснилось, что активизация процессов роста и образования токсина на улучшенном варианте панкреатического перевара мяса зависит не только от увеличения концентрации фосфатов и энергетических ресурсов, но и в равной мере от снижения (в результате проявления редуцирующих свойств глюкозы) исходного окислительно-восстановительного потенциала среды, который в 1,5 раза ниже потенциала контрольной среды ( $E_h = 30$  мв. и  $r_{\text{H}_2} = 15$  против  $E_h = 180$  мв. и  $r_{\text{H}_2} = 22$ ). Такое снижение начального потенциала среды способствовало сокращению лаг-фазы, в результате чего фаза логарифмического размножения микробов начиналась на  $1/2$ —1 час раньше и про-

текала более интенсивно. Это приводило к сокращению срока максимального накопления бактериальных клеток и токсина, продукция которого шла параллельно фазам роста микробов.

Биохимические исследования показали, что усиление роста и токсинообразования изучаемого микроба на улучшенном варианте среды происходит за счет более интенсивного использования пептона и полипептидов. В частности, если на обычной среде панкреатического перевара мяса микробы используют около 300 мг% пептона и 50 мг% полипептидов, то на улучшенном варианте этой среды микробами используется уже более 500 мг% пептона и 75 мг% полипептидов. Характерно, что эта активизация усвоения питательных веществ происходит в связи с добавлением к среде глюкозы, которая в этом случае расходуется полностью и в 7 раз интенсивнее, чем на контрольной среде. Более того, в условиях регулирования рН среды сокращается срок ферментации углеводов микробами. Разница в скорости потребления редуцирующих веществ среды начинается проявляться с первых часов размножения микробов и к концу логарифмической фазы их развития (к 6—8 часам выращивания) достигает наибольшего значения (100—150 мг%). Полученные данные согласуются с результатами изучения морфологических свойств культуры, динамикой размножения бактериальных клеток и образования токсина. Установлено, что использование редуцирующих веществ микробами идет почти пропорционально кинетике размножения клеток и синтезу токсина.

Тенденцию в изменении динамики усвоения отдельных компонентов панкреатического перевара мяса можно отнести также к аминокислотному составу среды. Исследования показали, что регулирование рН и введение в состав среды дополнительного количества глюкозы и фосфатов несколько изменяет мозаику содержания аминокислот в среде при росте микробов. Различие прежде всего проявляется в более энергичном использовании цистеина (цистина) в период всего процесса выращивания культуры, вовлечении в процессы обмена лизина, содержание которого варьирует аналогично цистину и треонину. Последний используется культурой во все исследуемые сроки. Равномерно происходит накопление глютаминовой кислоты, метионина и валина.

На фоне этих изменений отмечается значительная убыль (после логарифмического размножения) аспарагиновой кислоты с последующей стабилизацией ее содержания и незначительные изменения количества фенилаланина. Следует отме-

тить энергичное накопление (в период с 8 до 24 часов выращивания культуры) гистидина, уменьшение аргинина, серина с глицином, аланина, тирозина и особенно изолейцина.

### **Влияние «магнитной» среды на токсинообразование *Cl. perfringens***

Настоящие исследования предприняты в связи с необходимостью исключить неблагоприятное воздействие магнитного поля мешалки ММ-2, которая использовалась при регулировании рН среды в процессе выращивания данных бактерий. При этом исходили из того, что по литературным данным омагниченная вода обладает биологической активностью, которая в зависимости от экспозиции воздействия магнитного поля может оказывать различное влияние на живые организмы (Н. Непримеров и др., 1965; В. Лисин, 1968; М. П. Травкин, 1968; В. Лебедев, 1968; и другие). С учетом этого мы провели ряд опытов, в которых питательную среду обрабатывали путем пропуска ее через магнитное поле в приборе, сконструированном в лаборатории укрупненных установок Института металлургии и обогащения АН КазССР. Результаты исследований показали, что слабое воздействие магнитного поля, получаемого от мешалки ММ-2, не оказывает заметного влияния на размножение и токсинообразование микробов. При более сильном (оптимальном) воздействии «магнитная» среда приобретает новые свойства и в определенных пределах может стимулировать синтез эpsilon-токсина (В. М. Красов, Ж. К. Омаров, Э. С. Тасбулатов, 1967).

### **Токсинообразование *Cl. perfringens* на полусинтетической среде**

На основании выявленных особенностей обмена веществ изучаемых микробов была составлена комбинированная полусинтетическая среда, прототипами которой являлись среды L. G. Jayko a. H. C. Lichstein (1959), M. Tsukamoto et al. (1963) и A. H. W. Hauschild (1965). Основными компонентами этой среды были ферментативный пептон, декстрин и микроэлементы. Испытание показало, что по характеру роста и интенсивности токсинообразования микробов полусинтетическая среда почти идентична улучшенному варианту панкреатического перевара мяса, но способствует несколько большему проявлению токсигенных свойств культуры (4000—6000 Dlm токсина при содержании 7,1—7,3 млрд/мл микробных клеток). Анало-



гия проявляется и в отношении динамики изменения окислительно-восстановительного потенциала сред, с той лишь разницей (см. таблицу), что если добавление к панкреатическому перевару мяса 0,5% глюкозы способствует снижению исходного потенциала среды с  $rH_2=22$  ( $Eh=180$  мв) до  $rH_2=15$  ( $Eh=30$  мв), то в результате наличия в составе полусинтетической среды веществ, обладающих более сильными восстановительными свойствами, создается потенциал среды  $rH_2=11$  ( $Eh=-120$  мв), который в 2 раза ниже исходного потенциала контрольной среды панкреатического перевара мяса и почти в 1,5 раза ниже потенциала среды с глюкозой. Вследствие этого лаг-фаза при выращивании микробов на полусинтетической среде становится короче по времени и поэтому процесс размножения клеток и образования токсина на этой среде начинается в более ранние сроки. Другими словами, на полусинтетической среде с более низким исходным потенциалом создаются лучшие условия для размножения микробов и образования эпсилон-токсина.

Необходимость изучения обмена полипептидов для определения связи между токсинообразованием и метаболическими особенностями *Cl. perfringens* подтверждается тем, что на фоне качественного сходства в изменении азотистых компонентов сред (панкреатический перевар мяса, улучшенный вариант этой среды и полусинтетическая среда), происходящих в процессе развития микробов, вполне четко вырисовывается количественное различие в использовании пептона и полипептидов, по усвоению которых в ряде случаев можно отдифференцировать токсинообразующую способность микроорганизмов. Это косвенно подтверждается также данными по приросту количества аминного азота и коэффициента расщепления субстрата сред. По всем этим показателям полусинтетическая среда превосходит обе сравниваемые среды панкреатического перевара мяса.

Не меньший интерес представляют данные, полученные при изучении изменения аминокислотного состава полусинтетической среды. Результаты анализа показали, что для первых 8 часов роста культуры на полусинтетической среде характерным является очень интенсивное потребление цистеина (цистина), концентрация которого снижается с 33 до 6,2 относительного %, уменьшение более чем в 2 раза количества треонина и появление в большом количестве гистидина (до 24,8%). Значительно увеличивается содержание аспарагиновой кислоты, серина и глицина, глютаминовой кислоты, аланина и ме-

тионина с валином. Более умеренно происходит накопление в среде лизина, фенилаланина и лейцина.

В период с 8 часов и до конца культивирования бактерий происходит изменение мозаики усвоения и накопления аминокислот в среде. Из всех 15 определяемых аминокислот после 24-часового выращивания культуры в среде отмечалось только значительное увеличение количества гистидина (с 24,8 до 33,9%) и менее выраженное увеличение тирозина и треонина (соответственно с 5,9 до 6,7% и с 2,3 до 2,7%). Количество остальных аминокислот было уменьшено, отмечено почти полное исчезновение цистеина (цистина) и аргинина.

После проведения основных модельных опытов с французским штаммом № 213 определенный интерес представляли и испытания местного штамма КазНИВИ № 29.

В результате проведения опытов установлено, что для штамма № 29 на улучшенном варианте панкреатического перевара мяса и полусинтетической среде проявляется та же зависимость в токсинообразующей способности, что и у штамма № 213. Более того, токсинообразующие свойства микробов штамма КазНИВИ на полусинтетической среде оказались несколько выше, чем у французского штамма № 213. В связи с этим существовавшее разграничение штамма № 213 как токсигенного и штамма № 29 как слаботоксигенного нужно считать понятием относительным.

Полученные данные говорят о том, что рекомендуемая нами для выращивания *Sl. perfringens* типа Д полусинтетическая среда способствует большей реализации потенциальной токсигенности данных микробов, чем применяемая до сих пор среда панкреатического перевара мяса.

Опыт работы лаборатории по изучению инфекционных болезней овец КазНИВИ с культурой *Sl. perfringens*, а также собственные наблюдения показали, что существует определенная корреляция между формой клетки и ее способностью продуцировать токсин (И. А. Барабанов, 1964; Л. Д. Панкратов, В. М. Красов, Е. О. Метельская, Л. М. Грудина, Ж. К. Омаров, 1966). Установлено, что при внесении в питательную среду микробов в споро-вегетативной форме, в протессе выращивания, как правило, отмечается более сильное токсинообразование, чем при выращивании микробов в вегетативной форме. В своих дальнейших исследованиях (Ж. К. Омаров, 1969) мы пришли к убеждению, что активизация процесса образования токсина связана не столько с формой посевного материала, сколько со спорообразованием микробов, которое несколько

19697

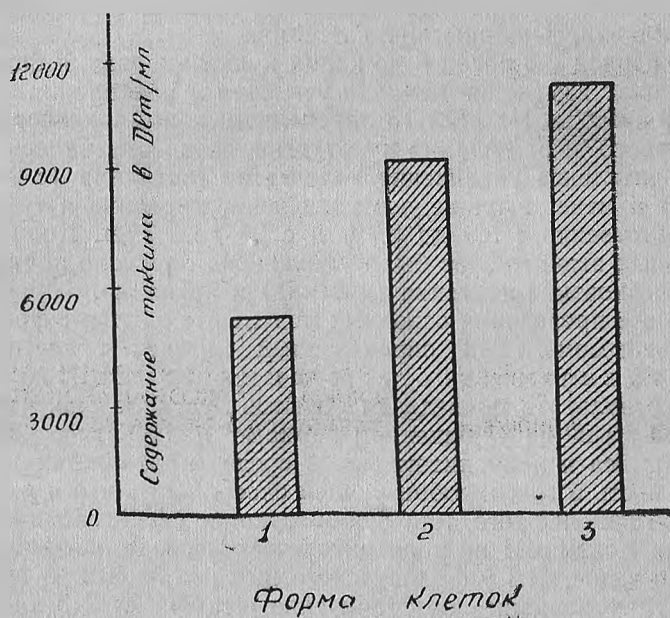


Рис. 1. Споро- и токсинообразование *Cl. perfringens*

1 — вегетативная форма клеток; 2 — клетки в подготовительной и предспоровой стадии спорообразования; 3 — клетки в стадии образования оболочек и созревания спор.

изменяет механизм токсиногенеза, в результате чего значительно повышается выход токсина (рис. 1).

Обращает на себя внимание то, что активность синтезированного при этом токсина находится в зависимости от состава среды, используемой для выращивания микробов. В частности, если на панкреатическом переваре мяса спорообразование усиливает продукцию токсина с 2000—4000 до 8000 Dlm, то в этих же условиях на полусинтетической среде (где спорообразование происходит более постоянно и лучше) штаммами № 213 и № 29 синтезируется токсин с титром 10000—12000 Dlm.

Мы полагаем, что природа усиления продукции токсина при спорообразовании микробов, очевидно, связана с происходящими структурными изменениями в бактериальной клетке (А. А. Имшенецкий, 1962; Л. Мяробяну и П. Пэунеску, 1963; Н. Д. Красильников, В. И. Дуда, 1963, 1964; В. М. Кушнарв, Т. А. Смирнова и И. М. Михайлова, 1968, 1969).

Приведенные выше данные свидетельствуют о наличии «дополнительного» фактора токсигенности у *Cl. perfringens*, который, вероятно, является присущим и для других патогенных микроорганизмов, например, для *Cl. tetani* (Т. В. Аристовская и Т. В. Углова, 1959). Правда, исследования, проведенные П. С. Барабан (1963) и М. Драгановым с соавторами (1965), дают возможность отметить, что связь между структурными изменениями в клетке и токсинообразованием микробов может проявляться в несколько иной форме, очень близкой по своей природе к отмеченному нами явлению. В частности, параллелизм между степенью продукции токсина и количеством капсульных форм в популяции *Coq. diptheriae* или, например, интенсивное образование токсина в связи с появлением в среде кокковидных грамотригативных форм *Cl. perfringens*.

В связи с полученными данными и большой ролью полипептидов в токсинообразовании *Cl. perfringens* (И. Н. Виноградова, 1962; В. С. Самсонова, 1962; И. П. Майорова, 1965; А. Н. W. Nauschild, 1965 и другие) были проведены опыты по выявлению зависимости токсинообразования данных микробов от содержания в полусинтетической среде различных продуктов пептидной природы (Ж. К. Омаров, 1969). Для разделения этих компонентов использовали метод равновесного диализа, с помощью которого были получены две фракции: недиализуемая высокомолекулярная полипептидная и диализуемая низкомолекулярная, содержащая пептиды и свободные аминокислоты. На основе этих фракций были приготовлены два варианта полусинтетической среды. Результаты испытания показали, что обе фракции значительно отличаются по стимулирующему действию на токсиногенез *Cl. perfringens* (штаммы № 213 и № 29). Из двух фракций стимулирующим действием обладали низкомолекулярные пептиды, которые обеспечивали синтез токсина активностью 12000—14000 Dlm, против 6000—8000 Dlm на полипептидной фракции. В равной мере стимулирующее действие пептидной фракции отражалось и на росте изучаемых микробов. Эти данные показывают, что для роста микробов и синтеза токсина на полусинтетической среде наиболее необходимы низкомолекулярные пептиды и свободные аминокислоты.

Таким образом, изучаемые микробы являются подвижными биологическими организмами, у которых можно подавить или, наоборот, выявить потенциальные токсигенные свойства. В основе этих явлений могут лежать биохимические, физико-химические и морфологические изменения, связанные с раз-

личными условиями существования бактерий в среде. Из этих условий большое значение имеют источники азотистого и углеводного питания, которые могут быть доступными для бактерий лишь при строго определенных физико-химических показателях среды ( $pH$ ,  $Eh$ ,  $\gamma H_2$ ).

Эти положения были учтены нами при составлении комбинированной полусинтетической среды, на которой *Cl. perfringens* типа Д, штамм № 213 и № 29 при соблюдении разработанных условий посева и культивирования образует токсин в 3—4 раза больше (до 10 000—12 000 Dlm), чем на контрольной среде панкреатического перевара мяса (2000—3000 Dlm).

## ВЫВОДЫ

1. Благоприятными для токсинообразования *Cl. perfringens* являются питательные среды, содержащие продукты неполного ферментативного распада белка с определенным коэффициентом расщепления субстрата среды (0,36—0,44).

2. Размножение и токсинообразование *Cl. perfringens* находится в зависимости от напряженности как азотистого, так и углеводного обмена:

- кинетика использования глюкозы идет пропорционально скорости размножения бактериальных клеток и образованию токсина;
- добавление к среде углеводов (глюкозы или декстрина) приводит к усилению роста микробов и продукции эpsilon-токсина за счет активизации процесса использования пептона и полипептидов;
- для роста и токсинообразования микробов наиболее необходимы низкомолекулярные соединения (пептиды) и свободные аминокислоты;
- количественное различие в использовании отдельных аминокислот питательных сред дает основание предположить наличие зависимости между интенсивностью этих изменений и токсинообразованием *Cl. perfringens*.

3. Индикатором для оценки интенсивности размножения и токсинообразования *Cl. perfringens* являются показатели редокс-потенциала среды,  $pH$  и  $Eh$ . Изменение этих величин происходит синхронно стадиям развития культуры; размножение микробов и образование токсина осуществляются в узких пределах  $\gamma H_2 = 0—3$  или  $Eh = -400—(-420)$  мв. При этом

на средах с более низким исходным окислительно-восстановительным потенциалом создаются лучшие условия для развития и проявления токсигенных свойств *Cl. perfringens*.

4. Регулирование рН среды в пределах 6,7—7,0 способствует сохранению оптимальных для размножения *Cl. perfringens* окислительно-восстановительных условий в течение всего периода выращивания культуры и является важным фактором для оптимальной продукции эpsilon-токсина и его длительного сохранения в культуре.

5. Синтез эpsilon-токсина тесно связан с кинетикой размножения клеток *Cl. perfringens*. Максимум накопления эpsilon-токсина в культуре приходится на конец логарифмической и начало стационарной стадии размножения бактерий.

6. Получены данные, указывающие на определенную корреляцию между споро- и токсинообразованием *Cl. perfringens*. Установлено, что при соответствующей подготовке посевного материала и выращивании культуры на полусинтетической среде спорогенез в 2—3 раза усиливает продукцию эpsilon-токсина и позволяет получать его активностью 10 000—12 000 D<sub>1m</sub>.

7. Составленная нами комбинированная полусинтетическая среда способствует большей реализации потенциальной токсигенности *Cl. perfringens*, чем среда панкреатического перевара мяса. По токсинообразующим свойствам на этой среде *Cl. perfringens* штамма КазНИВИ № 29 не уступает французскому штамму № 213.

8. Предложенный рецепт комбинированной полусинтетической среды можно рекомендовать для использования в лабораторных и производственных условиях с целью получения активного токсина *Cl. perfringens* типа Д из штаммов № 213 и № 29.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Испытание некоторых питательных сред и изучение влияния микроэлементов, стимулирующих веществ и витаминов на рост и токсинообразование *Кл. перфрингенс* (в соавторстве с Л. Д. Панкратовым, В. М. Красовым, Е. О. Метельской и Л. М. Грудиной). Труды КазНИВИ, т. 12, 1966.
2. Изучение характера влияния магнитного поля на состав питательной среды и токсинообразование *Кл. перфрингенс* типа Д (в соавторстве с В. М. Красовым и Э. С. Тасбулатовым). Первая конференция биохимиков республик Средней Азии и Казахстана. Алма-Ата, октябрь, 1966.
3. Характер влияния магнитного поля на состав питательной среды и токсинообразование *Кл. перфрингенс* типа Д (в соавторстве с В. М. Красовым и Э. С. Тасбулатовым). Труды 1-й конференции биохимиков Средней Азии и Казахстана. Ташкент, 1967.
4. Токсинообразование *Кл. перфрингенс* на полусинтетической среде. Тезисы конференции молодых биологов г. Алма-Аты, 1969 (в печати).
5. К вопросу споро- и токсинообразования *Кл. перфрингенс* типа Д. Вестник сельскохозяйственной науки, № 6, 1969, Алма-Ата.
6. Влияние различных фракций полусинтетической среды на рост и токсинообразование *Кл. перфрингенс* типа Д. Вестник сельскохозяйственной науки, № 7, 1969, Алма-Ата.

### Материалы диссертации доложены:

1. На 1-й конференции биохимиков Средней Азии и Казахстана 3—7 октября 1966 г., Алма-Ата.
2. На юбилейной научной конференции молодых ученых КазНИВИ, 1968 г., Алма-Ата.
3. На Ученом совете КазНИВИ, 6 мая 1969 г., Алма-Ата.