

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXVII, 9

SECTIO C

1972

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Mikrobiologii Ogólnej

Wincenty DROŻAŃSKI, Danuta DROŻAŃSKA,
Bogumiła KNOT

**Liza morfologicznych mutantów *Rhizobium trifolii* pod wpływem
enzymów bakteriolitycznych**

Лизис морфологических мутантов *Rhizobium trifolii* под влиянием
бактериолитических энзимов

Lysis of Morphological Mutants of *Rhizobium trifolii* by Bacteriolytic Enzymes

Kształt bakterii oraz ich oporność na działanie czynników zewnętrznych są uwarunkowane budową ściany komórkowej (21, 22). Podstawą struktury ściany, wspólną dla wszystkich organizmów prokariotycznych, jest wielkocząsteczkowy polimer, określany terminem mukopeptyd (11, 16), glukopeptyd (24), glukozaminopeptyd (22), peptydoglukan (17) lub mureina (27). Naruszenie całości struktury ściany komórkowej, głównie jej elementu szkieletowego — mureiny przez działanie specyficznych enzymów bakteriolitycznych (25) lub antybiotyków (3, 20) prowadzi do lizy bakterii lub do powstania form nieobłonionych.

Bakterie gramoujemne ze względu na wielowarstwową budowę ściany komórkowej, w której element szkieletowy jest osłonięty od zewnątrz warstwą lipopolisacharydową i lipoproteinową są bardziej odporne na działanie enzymów bakteriolitycznych w porównaniu z bakteriami gramododatnimi (1, 2, 8, 14, 19). Działanie enzymów litycznych na bakterie gramoujemne można jednak zwiększyć, stosując jednocześnie czynniki naruszające integralność zewnętrznych warstw ściany komórkowej (7, 15, 18).

W ostatnich latach ukazały się liczne prace (9), wskazujące, że mutacje typu S-R u bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* związane są z degradacją składu chemicznego frakcji lipopolisacharydowej ściany komórkowej.

Celem tej pracy było zbadanie wrażliwości mutantów morfologicznych *Rhizobium trifolii* na lityczne działanie enzymu wyosobnionego z *Acanthamoeba castellanii* i lizozymu oraz wpływu kwasu etylenodwuaminoczwerooctowego, soli sodowej siarczanu dodecyłu, butanolu, chloroformu, trypsyny i pH jako kofaktorów bakteriolizy.

MATERIAŁ I METODY

Organizmy: Do badań użyto mutantów morfologicznych *Rhizobium trifolii* szczepu 24 XSM (24 RF, 24 GR, 24 AR) oraz jako bakterii kontrolnych — *Escherichia coli* K 12 i *Micrococcus lysodeikticus* nr 564. Mutanty morfologiczne *R. trifolii* uzyskano przez naświetlanie szczepu 24 XSM promieniami UV (10).

Enzymy bakteriolityczne: Jako czynników bakteriolitycznych użyto lizozymu z białka jaja 3-krotnie krystalizowanego (Sigma chem. comp. 30 000 j/mg) oraz muramidazę wyosobnioną z *Acanthamoeba castellanii* (4, 5).

Hodowla bakterii oraz przygotowanie zawiesiny komórek *R. trifolii* namażano na pożywce nr 4 o składzie: K_2HPO_4 — 3,6 g, KH_2PO_4 — 0,4 g, $MgSO_4$ — 50 mg, NaCl — 0,5 g, cytrynian żelazowo-amonowy — 5 mg, kwaśny hydrolizat kazeiny — 3 g, glukoza — 10 g, H_2O do 1000 ml, pH = 7,6. *E. coli* oraz *M. lysodeikticus* hodowano na bulionie odżywczym. Po 18 godz. hodowli na wytrząsarce bakterie odwirowywano i osad przemywano dwukrotnie wodą redestylowaną. Zawiesinę bakterii w wodzie rozlewano do probówek po 2 ml i przechowywano w stanie zamrożonym.

Pomiar lizy bakterii. Proces lizy bakterii podano w procentach, mierząc zmiany gęstości optycznej (OD) zawiesiny komórek poddanych działaniu czynników litycznych.

$$\text{Procent lizy} = \frac{\text{OD początkowe} - \text{OD końcowe}}{\text{OD początkowe}} \times 100$$

Przed pomiarem wrażliwości na enzymy lityczne zawiesinę bakterii odmrażano i rozcieńczano buforem fosforanowo-cytrynianowym lub buforem Tris/HCl o odpowiednim pH do gęstości optycznej 0,50. Gęstość optyczną mierzono w fotokolorymetrze przy długości fali świetlnej 590 nm. Stężenie lizozymu oraz muramidazy z *A. castellanii* podano w jednostkach enzymatycznych. Za jednostkę przyjęto tę ilość enzymu, która powoduje spadek gęstości optycznej zawiesiny *M. lysodeikticus* o 0,01/min. w temp. 25° w 10-krotnie rozcieńczonym buforze fosforanowo-cytrynianowym McIlvaina o pH 5,0 dla enzymu i pH 6,6 dla lizozymu.

SYSTEMY LITYCZNE

1. Uwrażliwianie bakterii na lityczne działanie enzymów metodą Nakamury (12). Zawiesinę bakterii w wodzie doprowadzano 0,01 N HCl do pH 3,5, dodawano enzymu z *A. castellanii* lub lizozymu w stężeniu końcowym 200 j/ml i inkubowano w temp 45° przez 1 godz. Po inkubacji zawiesinę doprowadzano do pH 10,0, dodając 0,1 N NaOH. OD mierzono na początku i po 60 min. inkubacji w pH kwaśnym oraz po ustaleniu pH zasadowego.

2. Uwrażliwianie bakterii na lityczne działanie lizozymu metodą Repaske (18). Do zawiesiny bakterii w buforze Tris-HCl (pH=8,0, stężenie końcowe 0,05 M) dodawano 200 µg/ml soli sodowej kwasu etylenodwuami-

noczteroocetowego (EDTA) i lizozymu w stężeniu 200 j/ml. Gęstość optyczną zawiesiny bakterii mierzono na początku doświadczenia i po 60 min. inkubacji w temp. 45°.

3. Modyfikacja metody Repaske. Ze względu na niskie pH, w którym zachodzi optymalna liza bakterii pod wpływem enzymu z *A. castellanii*, zawiesiny poszczególnych szczepów preinkubowano w 0,05 M buforze Tris-HCl o pH 8,0 w obecności EDTA (200 µg/ml). Preinkubację prowadzono przez 60 min. w temp. 45°, następnie bakterie płukano 2-krotnie wodą redestylowaną i inkubowano w buforze o pH 5,0 z dodatkiem 200 j/ml enzymu z *A. castellanii* lub w buforze o pH 6,6 z dodatkiem lizozymu 200 j/ml. OD mierzono po 15, 30 i 60 min. inkubacji.

4. Uwrażliwianie bakterii butanolem i trypsyną wg Nollera i Hartsella (14). Zawiesinę bakterii w 0,02 M buforze fosforanowym o pH 7,0 inkubowano przez 1 godz. w temp. 45° w obecności trypsyny (50 µg/ml), 5% butanolu i lizozymu (200 j/ml). Stosowano również modyfikację tej metody. Bakterie preinkubowano w buforze fosforanowym o pH 7,0 z dodatkiem 5% n-butanolu lub 50 µg/ml trypsyny oraz w obecności obu czynników równocześnie. Po 1 godz. preinkubacji w temp. 45° bakterie odwirowywano oraz inkubowano w buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,0 zawierającym enzym z *A. castellanii* (200 j/ml) lub w buforze o pH 6,6 z dodatkiem lizozymu w stężeniu 200 j/ml.

5. Ekstrakcja chloroformem. Zawiesiny poszczególnych szczepów bakterii wytrząsano przez 15 min. z chloroformem (0,5 ml chloroformu na 2,0 ml zawiesiny bakterii o gęstości optycznej 1,0). Po odparowaniu chloroformu badano wrażliwość zabitych bakterii na lityczne działanie obu enzymów bezpośrednio albo po uprzedniej preinkubacji z trypsyną.

6. Wpływ soli sodowej siarczanu dodecyłu (SDS) na lizę bakterii. Zawiesinę bakterii w buforze McIlvaina (10-krotnie rozcieńczonym) inkubowano w obecności czynnika powierzchniowo aktywnego (SDS) w stężeniach 0,025, 0,05 i 0,1% oraz w obecności tych samych stężeń SDS i enzymów w ilości 100 j/ml. Przebieg lizy mierzono przez 30 min., odczytując OD w odstępach 5-minutowych.

WYNIKI

Wyniki doświadczeń wstępnych (tab. 1) wskazywały, że pełne, nie-naruszone komórki *E. coli* K 12 i *R. trifolii* są mało wrażliwe na bakteriolityczne działanie lizozymu i enzymu wyosobnionego z *A. castellanii*. Liza bakterii gramujemnych poddanych działaniu obu enzymów w stężeniu 200 j/ml przez 1 godz. wahała się w granicach 10—20%. W tych samych warunkach doświadczenia zawiesina komórek *M. lysodeikticus* ulegała całkowitej lizie pod wpływem 50-krotnie mniejszych stężeń enzymów w czasie krótszym od 15 min.

Badając efekt lityczny lizozymu i muramidazy z *A. castellanii* na bakterie gramujemne techniką Nakamury, uzyskano wyraźny spadek gęstości optycznej. Kontrolne zawiesiny bakterii, inkubowane w środowisku kwaśnym po alkalizacji do pH 10,0, ulegały również częściowej lizie. Procent lizy bakterii pod wpływem enzymów (tab. 1) obliczano odejmując od ogólnego procentu lizy procent zlizowanych bakterii na

Tab. 1. Liza bakterii kontrolnych i uczulonych metodą Nakamury
Lysis of intact bacteria and of those treated according to Nakamura's technique

Bakterie Bacteria	Kontrola Control		Metoda Nakamury Nakamura's technique	
	Procent lizy — Per cent of lysis			
	Enzym z <i>A. castellanii</i> <i>A. castellanii</i> bacteriolytic enzyme 200 j/ml, pH 5,0	Lizozym Lysozyme 200 j/ml pH 6,6	Enzym z <i>A. castellanii</i> <i>A. castellanii</i> bacteriolytic enzyme 200 j/ml, pH 5,0	Lizozym Lysozyme 200 j/ml pH 6,6
<i>R. trifolii</i> 24 XSM . . .	8	3	44	35
<i>R. trifolii</i> 24 RF . . .	10	6	60	51
<i>R. trifolii</i> 24 GR . . .	11	6	62	56
<i>R. trifolii</i> 24 AR . . .	13	7	74	66
<i>E. coli</i>	19	16	80	70
<i>M. lysodeikticus</i> . . .	96	94	--	—

Tab. 2. Wpływ preinkubacji bakterii z EDTA na lityczne działanie enzymów
Effect of preincubation of bacteria with EDTA on the lytic action of bacteriolytic enzymes

Bakterie Bacteria	Preinkuba- cja z EDTA w pH 8,0 Preincuba- tion with EDTA at pH 8.0	Inkubacja — Incubation		Jednoczesna inkubacja: lizozym+EDTA Simultaneous incubation: lysozyme+EDTA 200 j/ml, pH 8,0
		Enzym z <i>A. castellanii</i> <i>A. castellanii</i> enzyme 200 j/ml, pH 5,0	Lizozym Lysozyme 200 j/ml, pH 6,6	
Procent lizy — Per cent of lysis				
<i>R. trifolii</i> 24 XSM . . .	6	21	15	30
<i>R. trifolii</i> 24 RF . . .	9	28	20	38
<i>R. trifolii</i> 24 GR . . .	10	32	24	42
<i>R. trifolii</i> 24 AR . . .	13	37	29	43
<i>E. coli</i>	25	58	46	64

skutek alkalizacji środowiska. W metodzie Nakamury najbardziej wrażliwa na działanie lityczne enzymów była pałeczka okrężnicy, a z mutantów morfologicznych *R. trifolii* — szczep 24 AR. Najbardziej oporny na działanie enzymów był szczep dziki 24 XSM, wytwarzający znaczne ilości polisacharydów otoczkowych.

Bakterie brodawkowe poddane litycznemu działaniu enzymów po preinkubacji w buforze Tris-HCl (pH 8,0), zawierającym czynnik chelatujący (EDTA) jony dwuwartościowe, ulegały lizie w większym procencie aniżeli bakterie kontrolne (tab. 2). Największą jednak lizę bakterii gramujemnych zawieszonych w buforze Tris-HCl o pH 8,0 uzyskano pod wpływem równoczesnego działania EDTA i lizozymu. Wrażliwość poszczególnych szczepów bakterii traktowanych EDTA przedstawia się podobnie jak w doświadczeniach, w których stosowano metodę Nakamury.

Tab. 3. Wpływ butanolu i trypsyny na bakteriolityczne działanie lizozymu
Effect of butanol and trypsin on the bacteriolytic action of lysozyme

Bakterie Bacteria	Butanol 5% Butanol 5% pH 7,0	Lizozym Lysozyme pH 7,0 200 j/ml	Trypsyna Trypsin pH 7,0 50 $\mu g/ml$	Butanol lizozym Butanol lysozyme	Trypsyna lizozym Trypsin lysozyme	Butanol trypsyna lizozym Butanol trypsin lysozyme
Procent lizy — Per cent of lysis						
<i>R. trifolii</i> 24 XSM	0	5	5	24	24	57
<i>R. trifolii</i> 24 RF	0	3	8	28	25	60
<i>R. trifolii</i> 24 GR	0	8	9	29	28	64
<i>R. trifolii</i> 24 AR	0	10	10	30	29	65
<i>E. coli</i>	0	16	20	38	37	87

Szczepy *R. trifolii* inkubowane w środowisku zawierającym oprócz lizozymu (200 j/ml) 5% n-butanolu ulegały lizie w większym stopniu niż w doświadczeniach kontrolnych, w których bakterie były traktowane wyłącznie lizozymem. Działanie enzymu proteolitycznego i lizozymu (tab. 3) również powodowało zwiększenie lizy bakterii. Największy spadek gęstości optycznej uzyskiwano jednak przy równoczesnym traktowaniu bakterii butanolem, trypsyną i lizozymem (tab. 3).

W drugiej części doświadczeń nad wpływem butanolu i trypsyny na uwrażliwianie bakterii na działanie enzymów bakteriolitycznych (tab. 4) wykazano, że wstępna inkubacja bakterii w obecności czynników naru- szających zewnętrzne warstwy ściany komórkowej ułatwia penetrację enzymów działających na wiązania glikozydowe mureiny, co w konsekwencji prowadzi do zwiększonej lizy bakterii. Najmniejszy spadek gęsto- ści optycznej szczepu dzikiego *R. trifolii* był prawdopodobnie spowodowa- ny obecnością dużej ilości śluzu zewnątrzkomórkowego.

Tab. 4. Wpływ preinkubacji bakterii z butanolem i trypsyną na bakteriolityczne działanie enzymów
Effect of preincubation of bacteria with butanol and trypsin on the lytic action of bacteriolytic enzymes

Bakterie Bacteria	Preinkubacja Preincubation	Inkubacja — Incubation				
		Enzym z <i>A. castellanii</i> <i>A. castellanii</i> enzyme pH 5,0		Lizozym Lysozyme		
		Procent lizy — Per cent of lysis				
		1	2	1	2	
<i>R. trifolii</i> 24 XSM	butanol	0	10	10	7	7
	trypsyna	4	19	23	10	14
	butanol + trypsyna	6	32	38	24	30
<i>R. trifolii</i> 24 RF	butanol	0	17	17	10	10
	trypsyna	7	22	29	12	19
	butanol + trypsyna	10	42	52	31	41
<i>R. trifolii</i> 24 GR	butanol	0	16	16	10	10
	trypsyna	8	24	32	13	21
	butanol + trypsyna	10	46	56	35	45
<i>R. trifolii</i> 24 AR	butanol	0	18	18	11	11
	trypsyna	13	25	38	14	27
	butanol + trypsyna	14	48	62	38	52
<i>E. coli</i>	butanol	0	26	26	16	16
	trypsyna	22	29	51	19	41
	butanol + trypsyna	24	65	89	48	72

Objaśnienia: 1 — procent lizy bakterii w czasie inkubacji, 2 — procent całkowitej lizy.

Explanation: 1 — per cent of lysis of bacteria during incubation, 2 — per cent of total lysis.

Obserwacje w mikroskopie kontrastowo-fazowym bakterii inkubowanych w układzie zawierającym butanol i trypsynę, a następnie poddanych działaniu lizozymu lub enzymu z *A. castellanii* wykazały, że zarówno komórki mutantu 24 AR, jak też szczepu wyjściowego 24 XSM były całkowicie zlizowane. Wyniki tych doświadczeń potwierdzają spostrzeżenie, że obserwowane różnice w spadku gęstości optycznej pomiędzy poszczególnymi szczepami są przynajmniej częściowo związane z obecnością lub brakiem śluzu zewnątrzkomórkowego.

Bakterie brodawkowe po ekstrakcji chloroformem były w porównaniu z kontrolą bardziej wrażliwe na bakteriologiczne działanie enzymu z *A. castellanii* i lizozymu. Jeszcze większą wrażliwość na działanie enzymów bakteriologicznych stwierdzono, kiedy bakterie zabite chloroformem inkubowano przez 1 godz. z trypsyną (tab. 5).

Tab. 5. Działanie enzymów bakteriologicznych na bakterie zabite chloroformem i preinkubowane z trypsyną
Action of bacteriolytic enzymes on the bacteria killed with chloroform and preincubated with trypsin

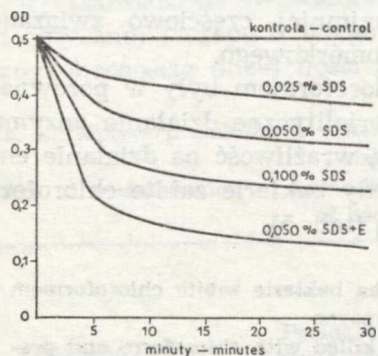
Bakterie Bacteria	Preinkubacja w obecności trypsyny Preincubation with trypsin 50 µg/ml, pH 7,0	Inkubacja — Incubation			
		Enzym z <i>A. castellanii</i> <i>A. castellanii</i> enzyme 200 j/ml, pH 5,0		Lizozym Lysozyme 200 j/ml, pH 6,6	
Procent lizy — Per cent of lysis					
		1	2	1	2
<i>R. trifolii</i> 24 XSM	11	17	18	9	28
<i>R. trifolii</i> 24 RF	23	24	36	13	47
<i>R. trifolii</i> 24 GR	23	26	38	15	49
<i>R. trifolii</i> 24 AR	25	29	45	20	54
<i>E. coli</i>	29	45	66	37	74

Objaśnienia patrz tab. 4. — For explanation see Tab. 4.

Wyniki doświadczeń (tab. 3, 4 i 5) wskazują, że częściowa delipidacja bakterii butanolem lub chloroformem ułatwia enzymom bakteriologicznym wnikanie w głębsze warstwy ściany komórkowej. Kontakt enzymów litycznych z mureiną był jeszcze bardziej ułatwiony, jeśli bakterie poddane działaniu butanolu lub chloroformu były następnie trawione trypsyną.

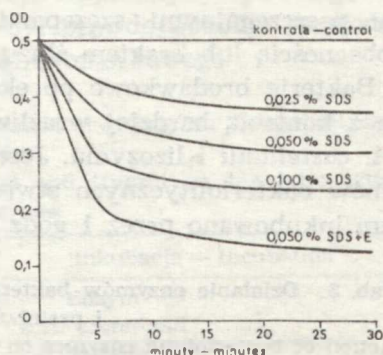
Komórki bakterii brodawkowych poddane działaniu czynnika powie-

rzchniowo czynnego (SDS) i enzymów bakteriolytycznych ulegały dezintegracji (ryc. 1 i 2). W tym układzie litycznym proces rozpadu komórek był najszybszy. Nie obserwowano wyraźnych różnic pomiędzy poszczególnymi szczepami, występowała natomiast zależność pomiędzy szybkością lizy bakterii a stężeniem SDS.



Ryc. 1. Liza komórek *Rhizobium trifolii* szczepu 24 XSM pod wpływem SDS i lizozymu

Dissolution of *Rhizobium trifolii* strain 24 XSM by SDS and lysozyme



Ryc. 2. Liza komórek *Rhizobium trifolii* szczepu 24 AR pod wpływem SDS i enzymu z *Acanthamoeba castellanii*

Dissolution of *Rhizobium trifolii* strain 24 AR by SDS and *Acanthamoeba castellanii* enzyme

DYSKUSJA

Bakterie brodawkowe bezpośrednio po wyosobnieniu z systemu korzeniowego roślin motylkowych rosną na podłożach stałych w postaci typowych kolonii gładkich. Szczepy *Rhizobium* pasażowane przez dłuższy okres na pożywkach zawierających glukozę lub mannitol dają również prawie wyłącznie kolonie typu S. Charakteryzują się one wytwarzaniem dużej ilości śluzów zewnątrzkomórkowych. Mutanty morfologiczne *Rhizobium* otrzymane przez Lorkiewicza (10) tworzą na podłożach stałych kolonie typu R, prawie całkowicie pozbawione śluzu. Wyniki przedstawione w tej pracy wskazują na wyraźne różnice we wrażliwości form S i R bakterii brodawkowych na poszczególne układy lityczne. Różnice w składzie chemicznym frakcji lipopolisacharydowej form S i R *Rhizobium* są obecnie badane (Lorkiewicz i Russa — inform. ustna).

Zmiany morfologiczne komórek *Rhizobium* i ich większą kruchość (fragilność) można uzyskać na podłożach pozbawionych jonów metali dwuwartościowych (28). Kationy Ca^{++} i Mg^{++} można usunąć ze ścian komórkowych, działając na bakterie EDTA. W obecności czynnika che-

latującego (EDTA) zachodzi też uwalnianie do środowiska lipopolisacharydów ścian komórkowych, co w konsekwencji prowadzi do naruszenia całości osłon okrywających mureinę, a zatem do większej podatności bakterii na działanie enzymów litycznych.

Uczulające działanie butanolu i chloroformu na bakterie gramoujemne związane jest z dysocjacją frakcji lipoproteinowej ścian komórkowych bakterii (13). Właściwości lipofilne i hydrofilne butanolu powodują, że działa on na sympleksy lipoproteinowe jak detergent. Naruszenie całości struktury zewnętrznej warstwy lipoproteinowej ściany komórkowej przez rozpuszczalniki organiczne, a następnie trawienie białek trypsyną odsłania mureinę leżącą w głębszych warstwach ściany i umożliwia enzymom bakteriolitycznym skuteczniejsze działanie. Rozpad komórek bakteryjnych pod wpływem działania czynników ułatwiających enzymom bakteriolitycznym penetrację w głębsze warstwy ściany komórkowej może być również, przynajmniej częściowo, spowodowany zniszczeniem błony cytoplazmatycznej. Uzyskane efekty lizy bakterii pod wpływem czynników zwiększających lizę nie są jednak spowodowane wyłącznie wyciekaniem składników wewnątrzkomórkowych przez uszkodzoną błonę cytoplazmatyczną, ale głównie przez rozpuszczenie makromolekuł wchodzących w skład ściany komórkowej bakterii (6).

Wyniki uzyskane w tej pracy wskazują, że mutanty morfologiczne *Rhizobium* są bardziej podatne na lizę niż szczep wyjściowy. Pozwala to przypuszczać, że podobnie jak *Eubacteriales*, utraciły one zdolność syntezy pełnego sympleksu lipopolisacharydowego albo, że większa wrażliwość form szorstkich *Rhizobium* na enzymy lityczne jest związana z brakiem śluzów zewnątrzkomórkowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Becker M. E., Hartsell S. E.: Factor Affecting Bacteriolysis Using Lysozyme in Dual Enzyme Systems., Arch. Biochem. Biophys. 53, 402 (1954).
2. Becker M. E., Hartsell S. E.: The Synergistic Action of Lysozyme and Trypsin in Bacteriolysis. Arch. Biochem. Biophys. 55, 257 (1955).
3. Dienes L., Weinberger H. J.: The L Forms of Bacteria. Bact. Rev. 15, 245 (1951).
4. Drożański W.: Bacteriolytic Enzyme Produced by *Acanthamoeba castellanii*. Acta Microbiol. Polon. 1 (18), 155 (1969).
5. Drożański W.: Enzymatic Mode of Action of Bacteriolytic Enzyme Produced by *Acanthamoeba castellanii*. Acta Microbiol. Polon. 21 (3) (1972).
6. Drożański W., Drożańska D., Grzybowska T., Russa R.: Izolacja i chemiczna analiza ścian komórkowych *Rhizobium*. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C, 27, 113—122 (1972).
7. Eugon R. G., Carson K. J.: Lysis of Cell Walls and Intact Cells of *Pseudomonas aeruginosa* by Ethylenediamine Tetraacetic Acid and by Lysozyme. Can. J. Microbiol. 11, 193 (1965).

8. Kellenberger E., Ryter A.: Cell Wall and Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli*. J. Biophys. Biochem. Cytol. **4**, 323 (1958).
9. Kotełko K.: Immunochemia wielocukrów bakteryjnych. Postępy Mikrobiologii. **7**, 2 (1968).
10. Lorkiewicz Z., Dusiński M.: The Antigenic Structure of *Rhizobium trifolii* Mutants. Acta Microbiol. Polon. **12**, 119 (1963).
11. Mandelstam J., Rogers H. J.: The Incorporation of Aminoacids into the Cell Wall Mucopeptide of *Staphylococci* and the Effect of Antibodies on the Process. Biochem. J. **72**, 654 (1959).
12. Nakamura O.: Ueber Lysozymwirkungen. Z. Immunitätsforsch. **38**, 422 (1923).
13. Noller E. C., Hartsell S. E.: Lysozymic Bacteriolysis with Organic Solvent and Trypsin. Bacterial. Proc. **39** (1960).
14. Noller E. C., Hartsell S. E.: Bacteriolysis of *Enterobacteriaceae*. I. Lysis by Four Lytic Systems Utilizing Lysozyme. J. Bacteriol. **81**, 482 (1961).
15. Noller E. C., Hartsell S. E.: Bacteriolysis of *Enterobacteriaceae*. II. Pre- and Co-lytic Treatments Potentiating the Action of Lysozyme. J. Bacteriol. **81**, 492 (1961).
16. Perkins H. R., Rogers H. J.: The Products of the Partial Acid Hydrolysis of the Mucopeptide from Cell Walls of *Micrococcus lysodeikticus*. Biochem. J. **72**, 647 (1959).
17. Petit J. F., Munoz E., Ghuyssen J. M.: Peptide Cross-links in Bacterial Cell Wall Peptidoglucans Studied with Specific Endopeptidases from *Streptomyces albus* G., Biochemistry **5**, 2764 (1966).
18. Repaske R.: Lysis of Gram-negative Organisms and the Role of Versene. Biochim. Biophys. Acta. **30**, 225 (1958).
19. Salton M. R. J.: The Lysis of Microorganisms by Lysozyme and Related Enzymes. J. Gen. Microbiol. **18**, 481 (1958).
20. Salton M. R. J., Shafa F.: Some Changes in the Surface Structure of Gram-negative Bacteria Induced by Penicillin Action. Nature **181**, 1321 (1958).
21. Salton M. R. J.: The Anatomy of the Bacterial Surface. Bact. Rev. **25**, 77 (1961).
22. Salton M. R. J.: The Bacterial Cell Wall. Elsevier Publishing Co, Amsterdam—London—New York 1964.
23. Shafa F., Salton M. R. J.: Disgregation of Bacterial Cell Wall by Anionic Detergents. J. Gen. Microbiol. **22**, 137 (1960).
24. Strominger J. L.: Biosynthesis of Bacterial Cell Walls [w:] The Bacteria **3**, 413. Academic Press. New York, London 1962.
25. Strominger J. L., Ghuyssen J. M.: Mechanism of Enzymatic Bacteriolysis. Science **156**, 213 (1967).
26. Weidel W., Frank H., Martin H. H.: The Rigid Layer of the Cell Wall of *Escherichia coli* Strain B. J. Gen. Microbiol. **22**, 158 (1960).
27. Weidel W., Pelzer H.: Bagshaped Macromolecules—a New Outlook on Bacterial Cell Walls. Advanc. Enzymol. **26**, 193 (1964).
28. Vincent J. M., Colburn J. R.: Cytological Abnormalities in *Rhizobium trifolii* Due to a Deficiency of Calcium and Magnesium. Austr. J. Sci. **23**, 269 (1961).

РЕЗЮМЕ

Исследовали чувствительность *Rhizobium trifolii* на литическое действие лизозима и мурамидазы, полученной из *Acanthamoeba castellanii*.

Для исследований использовали *R. trifolii* 24 XSM и три морфологических мутанта: 24 FR, 24 GR, 24 AR, растущие в фазе R. Бактерии сенсibilizировали на литическое действие энзимов: 1) методом Накамуры, 2) ЕДТА в буфере Tris-HCl с pH-8,0, 3) бутанолом и трипсином, 4) хлороформом и трипсином, 5) натриевой солью сульфата додецила. Установили, что как полные клетки *R. trifolii* гладкого штамма (24 XSM), так и мутанты R резистентны на действие обоих энзимов. Однако бактерии, инкубированные в соответствующих литических системах, поддавались лизису (табл. 1—5). Обнаружили разницу в чувствительности штаммов на литическое действие энзимов: штамм 24 XSM был более резистентным, а штамм 24 AR более чувствительным к лизису.

SUMMARY

Studies on the bacteriolysis of *Rhizobium trifolii* strains by lysozyme and muramidase isolated from *Acanthamoeba castellanii* were carried out. *R. trifolii* strain 24 XSM and its three morphological mutants 24 FR, 24 GR and 24 AR were used throughout these studies. The following pre- or co-lytic treatments stimulating the action of bacteriolytic enzymes were applied: 1) Nakamura's technique, 2) versene in Tris-HCl buffer, pH 8.0, 3) butanol and trypsin, 4) chloroform and trypsin, 5) sodium dodecyl sulphate.

It was shown that the intact cells of S form of *R. trifolii* as well as its rough mutants were resistant to bacteriolysis. However, after pre- or co-lytic treatments the bacteria underwent lysis (Tables 1—5). Differences were observed between the strains in their sensitivity to lytic action of bacteriolytic enzymes. The strain 24 XSM was found to be most resistant to lysis and the strain 24 AR most sensitive.

WYKONANIE PRACY WYKONAWCZYCH

WYKONANIE PRACY WYKONAWCZYCH W PRACOWNIACH WYKONAWCZYCH... WYKONANIE PRACY WYKONAWCZYCH W PRACOWNIACH WYKONAWCZYCH... WYKONANIE PRACY WYKONAWCZYCH W PRACOWNIACH WYKONAWCZYCH...

SUMMARY

SUMMARY... WYKONANIE PRACY WYKONAWCZYCH W PRACOWNIACH WYKONAWCZYCH... WYKONANIE PRACY WYKONAWCZYCH W PRACOWNIACH WYKONAWCZYCH... WYKONANIE PRACY WYKONAWCZYCH W PRACOWNIACH WYKONAWCZYCH...