

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXVII, 10

SECTIO C

1972

Institut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Mikrobiologii Ogólnej

Wincenty DROŻAŃSKI, Danuta DROŻAŃSKA,
Teresa GRZYBOWSKA, Ryszard RUSSA

Izolacja i chemiczna analiza mureiny ścian komórkowych *Rhizobium*

Изоляция муреина из клеточных стенок *Rhizobium* и его химический анализ

Isolation and Chemical Analysis of the Murein of *Rhizobium* Cell Walls

Struktura oraz budowa chemiczna ścian komórkowych bakterii była badana w ostatnich latach bardzo intensywnie (10, 16, 17, 18). Wykazano, że ściany komórkowe bakterii gramujemnych mają budowę wielowarstwową złożoną z sympleksów lipoproteinowych, lipopolisacharydowych, białka i mureiny (4, 6, 11, 21), która jest strukturą wspólną dla ścian komórkowych wszystkich bakterii. Mureina zbudowana jest z pasm glukonowych, podjednostek peptydowych oraz peptydowych mostków poprzecznych. Kowalencyjnie związane komponenty polisacharydowo-peptydowe mureiny tworzą nieropuszczalną, trójwymiarową, o silnej konstrukcji wewnętrznej strukturę, niewrażliwą na działanie wielu czynników chemicznych i charakteryzującą się dużą opornością mechaniczną. Dzięki swej sztywności mureina nadaje komórce charakterystyczny dla danego gatunku kształt. Ogólny schemat budowy mureiny jest wspólny, ale nie identyczny u wszystkich bakterii, również jej skład chemiczny może być różny u poszczególnych grup (5).

Celem pracy było otrzymanie mureiny z *Rhizobium trifolii* oraz *Rhizobium meliloti*, określenie jej składu chemicznego oraz wrażliwości na lityczne działanie enzymów bakteriolitycznych.

MATERIAŁ I METODY

Bakterie. Do badań użyto trzy szczepy bakterii brodawkowych: *Rhizobium meliloti* szczep L5, *Rhizobium trifolii* szczep gładki, oznaczony symbolem

24 XSM, oraz jego mutantu morfologicznego 24 AR, rosnącego w fazie R. Szczep zmutowany został otrzymany pod wpływem działania promieni UV (8).

Pożywki. Dla uzyskania masy bakteryjnej szczep *R. trifolii* namnażano na pożywce nr 4 (3). *R. meliloti* hodowano na pożywce płynnej nr 79 o składzie: mannitol 10 g, K_2HPO_4 0,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g, NaCl 1 g, $CaCO_3$ 30 mg, wyciąg drożdżowy Difco 1 g, H_2O do 1000 ml, pH 7,4.

Otrzymywanie masy bakteryjnej. Pożywkę zaszczepiano 24-godzinną hodowlą bakterii w stosunku 20:1 i inkubowano stale napowietrzając w temp. 28° przez 24 do 36 godz. Czystość hodowli sprawdzano w mikroskopie kontrastowo-fazowym oraz przez posiewy na stałe podłoże Thorntona. Osad bakteryjny uzyskany przez odwirowanie 50 l hodowli każdego szczepu przemywano dwukrotnie wodą redestylowaną i przechowywano w temp. — 20°.

OTRZYMYWANIE MUREINY ZE ŚCIAN KOMÓRKOWYCH RHIZOBIIUM

Izolację elementu szkieletowego mureiny ze ścian komórkowych bakterii brodawkowych prowadzono dwoma metodami: a) metodą opisaną przez Mandelstama (9), stosowaną również przez Wanga i Landgrena (20) oraz b) metodą opracowaną przez Weidela i współprac. (21) w modyfikacji własnej.

Metoda „b”

10 g suchej masy bakterii zawieszano w 200 ml H_2O redestylowanej i wlewano ostrym strumieniem do 4% wrzącego roztworu soli sodowej siarczanu dodecylu (SDS). W wyniku dezintegracji bakterii pod wpływem SDS zawiesina stawała się galaretowata, trudna do odwirowania. Dodanie do ostudzonego dezintegratu 1 mg dezoksyrybonukleazy redukowało prawie całkowicie lepkość dezintegratu już po 2 godz. inkubacji w temp. 37°. Dezintegrat odwirowywano przy 18 000×g przez 1 godz. Ciemnobrązowy płyn z nad osadu odrzucano a osad zawieszano w 500 ml H_2O , dodawano SDS do stężenia końcowego 2% i gotowano na łaźni wodnej przez 1 godz. Następnie zawiesinę wirowano przy 18 000 x g przez 30 min., lekko żółty supernatant zlewano, a osad zawieszano w 1% SDS i wytrząsano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej. Po ostatnim traktowaniu solą sodową siarczanu dodecylu resztki komórek bakteryjnych zawierające głównie elementy ściany komórkowej odwirowywano przy 18 000 x g i przemywano 500 ml H_2O redestylowanej. Czynność tę powtarzano 16 razy. Uzyskany kremowy osad zawieszano w 300 ml 0,035 M buforze Tris-HCl o pH 7,8 i wytrząsano na mieszadle magnetycznym. Po odwirowaniu osad ponownie zawieszano w tej samej ilości buforu Tris-HCl i inkubowano przez 10 godz. w temp. 60° w obecności 5 mg pronazy. Po trawieniu pronazą ściany komórkowe przemywano wodą i 0,1 M buforem fosforanowym o pH 7,2, a następnie trawiono trypsyną w obecności 500 j penicyliny i 500 µg streptomycyny na ml, w temp. 37° przez 12 godz. Uzyskany po odwirowaniu osad ekstrahowano przez 24 godz. mieszaniną chloroformu z metanolem (1:1) w celu usunięcia polimeru kwasu β-hydroksymasłowego (22). Ekstrakcję mieszaniną chloroformu z metanolem powtarzano 2-krotnie. Osad przemywano 6-krotnie roztworem EDTA w stężeniu 5×10^{-4} M oraz kilka razy wodą redestylowaną. Otrzymaną mureinę przemywano acetonem i suszono.

Analiza składu chemicznego otrzymanych murein

10 mg mureiny zawieszano w 5 ml 6 n HCl i hydrolizowano w zatopionych ampulkach w 100° przez 20 godz. Hydrolizaty sączono przez bibułę Whatmana nr 1, odparowywano w próżni w obecności NaOH i H₂SO₄, a następnie rozpuszczano w 1 ml H₂O. Skład jakościowy uzyskanych hydrolizatów mureiny badano chromatograficznie. Jako nośnika użyto bibuły Whatmana nr 1 oraz płytek pokrytych żelalem krzemionkowym G (Kieselgel G, Stahl, Merck). Na chromatogramy наносono 5 lub 10 µl hydrolizatu mureiny. Chromatogramy rozwijano metodą zstępującą jedno- lub dwukierunkową w następujących układach rozpuszczalników:

a) n-butanol — kwas octowy — woda (4:1:5); chromatogramy rozwijano w fazie organicznej (po uprzednim nasyceniu bibuły przez kilka godzin parami fazy wodnej);

b) pirydyna — woda (4:1);

c) n-butanol — pirydyna — kwas octowy — woda (6:4:0,3:3).

Aminokwasy i aminocukry wykrywano na chromatogramach 0,3% roztworem ninhydryny w acetonie. Cukry redukujące wykrywano roztworem azotanu srebra wg Traveylena, a aminocukry po uprzedniej acetylacji metodą Elson-Morgana w modyfikacji Smitha (3).

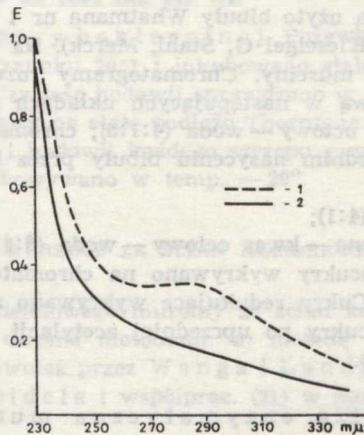
Analiza enzymatyczna mureiny

Uzyskane preparaty mureiny trawiono lizozymem (Reanal, Budapest 10 000 j/ml) oraz muraminidazą wyosobnioną z *Acanthamoeba castellanii* (2). 10 mg mureiny zawieszano w 2 ml 0,02 M buforu octanowo-amonowego o pH 6,4 przy działaniu lizozymu i pH 5,0 enzymu z ameb i dodawano 0,5 ml roztworu odpowiedniego enzymu (w stężeniu końcowym 20 µg enzymu/ml). Inkubację prowadzono przez 20 godz. w temp. 40°. Po różnych czasach inkubacji pobierano próbki w ilości 5, 10 i 20 µl w celu określenia ilości uwolnionych grup redukujących oraz acetyloaminocukrów. Grupy redukujące wykrywano metodą Nelsona (12), a acetyloaminocukry metodą Elson-Morgana wg Reissinga i współprac. (15). Wzorcem na cukry redukujące i acetyloaminocukry była N-acetyloglukozamina (Koch-Light Lab. LTD).

WYNIKI I DYSKUSJA

Zastosowane metody izolowania mureiny pozwoliły na oddzielenie elementu szkieletowego ścian komórkowych bakterii brodawkowych od materiału cytoplazmatycznego jak też i od pozostałych makromolekuł wchodzących w skład ściany komórkowej *Rhizobium*. Szczególnie dobre wyniki uzyskano stosując metodę Weidela (7, 21) w modyfikacji własnej. Działając na gorąco solą sodową siarczanu dodecyłu, usunięto ze ścian komórkowych warstwę lipopolisacharydową oraz zniszczono błonę cytoplazmatyczną, co w konsekwencji spowodowało wypłynięcie składników wewnątrzkomórkowych. Obecne w dezintegratach bakterii kwasy nukleinowe powodowały dużą lepkość preparatów i uniemożliwiały oddzielenie ścian od rozpuszczalnych składników komórkowych. Depolimeryzację kwasu dezoksyrybonukleinowego uzyskano działając na preparaty DNA-za. Ściany komórkowe otrzymane przez działanie solą so-

domą siarczanu dodecyłu i dezoksyrybonukleazą zawierały jeszcze znaczne ilości białka (ryc. 1). Obecność białka w preparatach ścian komórkowych wykrywano metodą spektrofotometryczną, mierząc przebieg absorpcji promieni świetlnych w zakresie 230—320 m μ . Preparaty mureiny



Ryc. 1. Spektrum absorpcji promieni ultrafioletowych; 1 — ściana komórkowa po działaniu SDS, 2 — mureina

Ultraviolet absorption spectrum; 1 — cell wall after SDS treatment 2 — murein

całkowicie oczyszczone z białka otrzymano przez trawienie ich enzymami proteolitycznymi (ryc. 1). Polimery kwasu β -hydroksymasłowego, występujące w dużych ilościach w komórkach *Rhizobium*, widoczne były w mikroskopie kontrastowo-fazowym jako ziarnistości silnie załamujące światło. Ziarnistości te zniknęły po ekstrakcji preparatów mieszaniną chloroformu z metanolem. Z 10 g suchej masy bakterii po ostatnim etapie oczyszczania otrzymano od 120 do 180 mg mureiny. Analiza chromatograficzna kwaśnych hydrolizatów wykazała, że otrzymane preparaty mureiny *Rhizobium* zbudowane są z dwóch aminocukrów — glukozaminy i kwasu muraminowego oraz z trzech aminokwasów — alaniny, kwasu glutaminowego i kwasu 2,6-dwuaminopimelinowego. Podobne składniki zostały wykryte w elementach szkieletowych ścian komórkowych innych bakterii gramujemnych (7, 19, 20, 21).

W chromatogramach jednokierunkowych, rozwijanych w układzie butanol — kwas octowy — woda, wykryto po wywołaniu ninhydryną pięć plam odpowiadających wzorcom: alaniny, kwasu glutaminowego, kwasu muraminowego, glukozaminy, kwasu 2,6-dwuaminopimelinowego oraz bardzo słabą plamę szóstą, której R_f pokrywał się z lizyną (tab. 1). Równoczesna obecność w hydrolizatach mureiny *Rhizobium* dwóch za-

Tab. 1 Składniki mureiny *Rhizobium* reagujące z ninhydryną
 Ninhydrin positive constituents of *Rhizobium*

Aminokwasy i aminocukry Aminoacids and aminosugars		R_f	Intensywność zabarwienia Intensity of the colour
Kwas muraminowy Muramic acid	(KM)	0,30	++
Alanina Alanine	(Ala)	0,29	++++
Kwas glutaminowy Glutamic acid	(Glu)	0,24	+++
Glukozamina Glucosamine	(GA)	0,16	++
Kwas dwuaminopimelinowy Diaminopimelic acid	(DAP)	0,06	+++
Lizyna Lysine	(Liz)	0,10	+

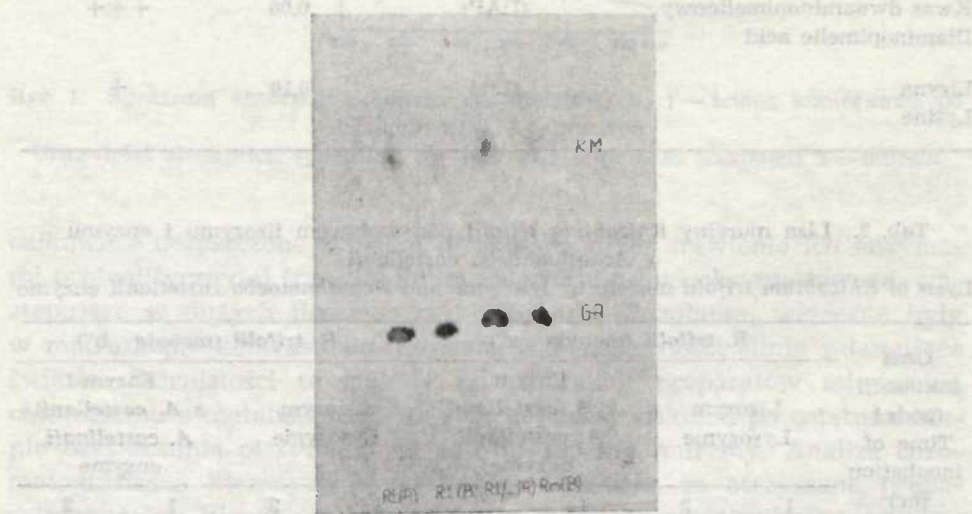
 Tab. 2. Liza mureiny *Rhizobium trifolii* pod wpływem lizozymu i enzymu
 z *Acanthamoeba castellanii*
 Lysis of *Rhizobium trifolii* murein by lysozyme and *Acanthamoeba castellanii* enzyme

Czas inkubacji (godz.) Time of incubation (hr)	<i>R. trifolii</i> (metoda „a”)				<i>R. trifolii</i> (metoda „b”)			
	Lizozym Lysozyme		Enzym z <i>A. castellanii</i> <i>A. castellanii</i> enzyme		Lizozym Lysozyme		Enzym z <i>A. castellanii</i> <i>A. castellanii</i> enzyme	
	1	2	1	2	1	2	1	2
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1/2	140	60	190	130	210	90	180	130
1	260	110	320	290	350	160	290	270
2	430	200	570	480	580	330	520	450
4	680	260	840	680	800	420	700	630

Objaśnienia: 1 — μg grup redukujących, 2 — μg acetyloaminocukrów.
 Explanation: 1 — μg of reducing sugars, 2 — μg of acetyloaminosugars.

sadowych aminokwasów (lizyny i kwasu 2,6 dwuaminopimelinowego) występujących w zbadanych dotąd mureinach wymiennie, nie została w tej pracy całkowicie wyjaśniona. Mało prawdopodobne jest, żeby oba te aminokwasy występowały jednocześnie w podjednostkach peptydowych mureiny. Obecna na chromatogramach plama lizyny mogła powstać w wyniku dekarboksylacji kwasu dwuaminopimelinowego w trakcie hydrolizy mureiny kwasem solnym, podobnie jak zostało to stwierdzone w przypadku mureiny z *Escherichia coli* (14). Małe ilości lizyny obecne w kwaśnych hydrolizatach mureiny mogły pochodzić też z sympleksu lipoproteinowego kowalentnie związanego z mureiną (1). Występowanie sympleksów mureino-lipoproteinowych w ścianach komórkowych *Rhizobium* oraz sposób ich rozrywania przez enzymy proteolityczne są obecnie badane.

Na chromatogramach jednokierunkowych wywołanych azotanem srebra, odczynnikiem Ehrlicha lub ftalanem aniliny uzyskano dwie intensywnie wybarwione plamy (ryc. 2) odpowiadające glukozaminie i kwa-

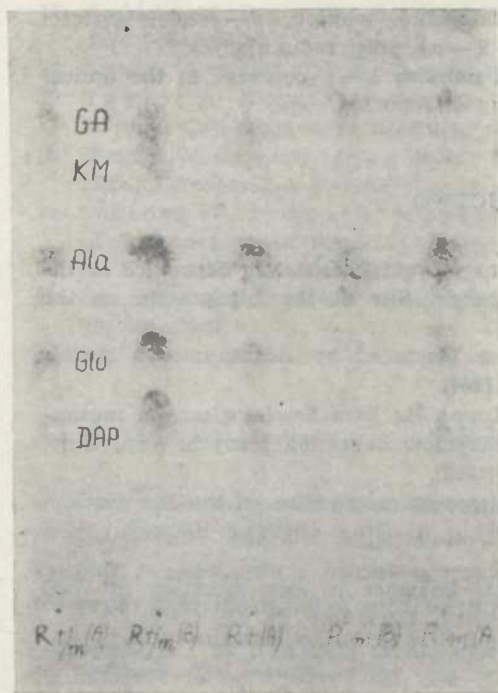


Ryc. 2. Jednokierunkowy chromatogram hydrolizatu mureiny *Rhizobium* rozwijanego w układzie „a” i wywołany roztworem azotanu srebra wg Travelena. One-dimensional chromatogram of *Rhizobium* murein hydrolyzate developed in a solvent containing n-butanol-acetic acid-water (4:1:5). The spots were detected for reducing sugars

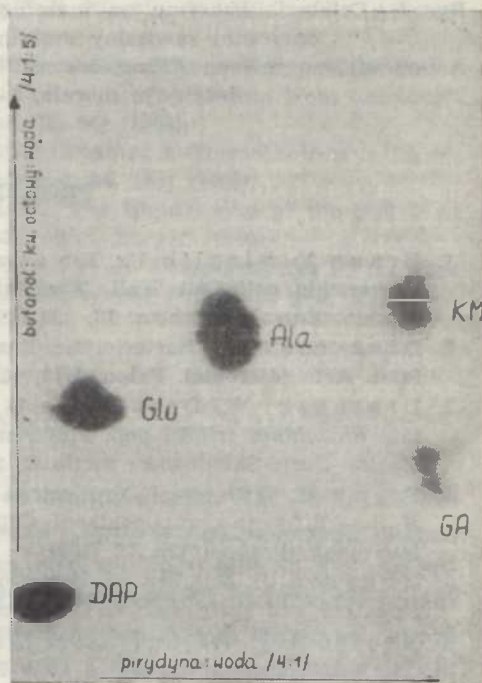
sowi muraminowemu. Na chromatogramach jednokierunkowych w układzie butanol — kwas octowy — woda, kwas muraminowy i alanina migrowały prawie z tą samą szybkością. W celu rozdzielenia alaniny i kwasu muraminowego wykonano dodatkowe chromatogramy dwukierunkowe oraz cienkowarstwowe na żelu krzemionkowym. Uzyskane wyniki (ryc.

3 i 4) potwierdziły, że składnikami mureiny *Rhizobium* są: alanina, kwas glutaminowy, kwas dwuaminopimelinowy oraz glukozamina i kwas mureaminowy.

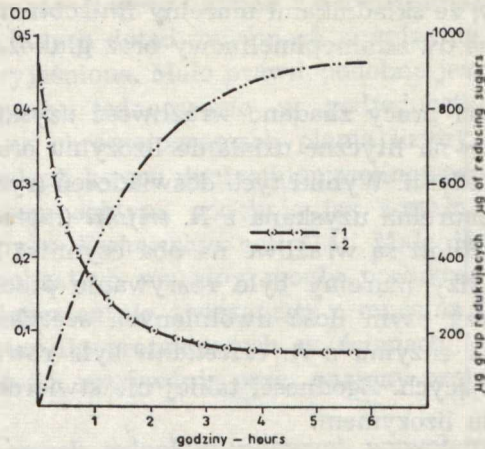
W drugiej części pracy zbadano wrażliwość uzyskanych preparatów mureiny *Rhizobium* na lityczne działanie lizozymu oraz enzymu wyso-bnionego z *A. castellanii*. Wyniki tych doświadczeń (ryc. 5 i tab. 2) wska-zują, że zarówno mureina uzyskana z *R. trifolii* (metodą „a” i „b”), jak też mureina *R. meliloti* są wrażliwe na oba czynniki lityczne. Wykaza-no, że przyczyną lizy mureiny było rozrywanie przez enzymy wiązań glikozydowych, przy czym ilość uwolnionych acetyloaminocukrów pod wpływem działania enzymu z *A. castellanii* była równa ilości uwolnio-nych grup redukujących. Zgodności takiej nie stwierdzono w przypadku trawienia substratu lizozymem.



Ryc. 3. Chromatogram cienkowarstwowy hydrolizatów mureiny *Rhizobium* wywo-łany 0,3% ninhydryną w acetonie
Thin-layer chromatogram on silica gel G of *Rhizobium* murein hydrolysis developed in a solvent containing n-butanol-pyridine-acetic acid-water (6:4:0.3:3). The spots were detected with 0.3% ninhydrin in acetone



Ryc. 4. Chromatogram dwukierunkowy hydrolizatu mureiny *Rhizobium trifolii*. Plamy wywołane roztworem ninhydryny w acetonie
Two-dimensional chromatogram of the murein hydrolysis of *Rhizobium trifolii*. The spots were detected with ninhydrin in acetone



Ryc. 5. Działanie lizozymu na mureinę *Rhizobium meliloti*; 1—spadek gęstości optycznej zawiesiny mureiny, 2— μg grup redukujących
 Action of lysozyme on *Rhizobium meliloti* murein; 1—a decrease in the optical density of murein, 2— μg of reducing sugar

PIŚMIENNICTWO

1. Braun V., Sieglin U.: The Covalent Murein-Lipoprotein Structure of the *Escherichia coli* Cell Wall. The Attachment Site of the Lipoprotein on the Murein. *Eur. J. Biochem.* **13**, 333 (1970).
2. Drożański W., Bacteriolytic Enzyme Produced by *Acanthamoeba castellanii*. *Acta Microbiol. Polon.* **1/18**, 155 (1969).
3. Drożański W., Drożańska D., Knot B.: Liza morfologicznych mutantów *Rhizobium trifolii* pod wpływem enzymów bakteriolytycznych. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C*, **27** (1972).
4. Frank H., Dekegel D.: Electron Microscopical Studies on the Localization of the Different Components of Cell Walls of Gram-negative Bacteria. *Folia Microbiol. (Prague)* **12**, 227 (1967).
5. Ghuysen J. M.: Use of Bacteriolytic Enzymes in Determination of Wall Structure and their Role in Cell Metabolism. *Bact. Rev.* **32**, 425 (1968).
6. Keeler R. F., Ritchie A. E., Bryner J. H., Elmore J.: The Preparation and Characterization of Cell Walls and the Preparation of *Flagella* of *Vibrio fetus*. *J. gen. Microbiol.* **43**, 439 (1966).
7. Kolenbrander P. E., Ensign J. C.: Isolation and Chemical Structure of the Peptidoglycan of *Spirillum serpens* Cell Walls. *J. Bacteriol.* **95**, 201 (1968).
8. Lorkiewicz Z., Dusiński M.: The Antigenic Structure of *Rhizobium trifolii* Mutants. *Acta Microbiol. Polon.* **12**, 119 (1963).
9. Mandelstam J.: Preparation and Properties of the Mucopolysaccharides of Cell Walls of Gram-negative Bacteria. *Biochem. J.* **84**, 294 (1962).
10. Martin H. H.: Biochemistry of Bacterial Cell Walls. *Ann. Rev. Biochem.* **35**, 457 (1966).

11. Murray R. S. E., Steed P., Elson H. E.: The Location of the Mucopolysaccharide on Sections of the Cell Wall of *Escherichia coli* and other Gram-negative Bacteria. *Can. J. Microbiol.* **11**, 547 (1965).
12. Nelson N. [cyt. za:] Colowick S. P., Kaplan N. O.: *Methods in Enzymology*, 3, Academic Press, Inc. New York 1957, 85.
13. Neuberger A., Marshall R. D.: *Methods for the Qualitative and Quantitative Analysis of the Component Sugars. [w:] Glycoproteins their Composition, Structure and Function.* Ed. Gottschalk A, Elsevier, Publ. Comp. Amsterdam—London—New York 1966.
14. Primosigh J., Pelzer H., Mass D., Weidel W.: Chemical Characterization of Mucopolysaccharides Released from the *E. coli* B Cell Wall by Enzymic Action. *Biochim. Biophys. Acta.* **46**, 68 (1961).
15. Reissing J. L., Strominger J. L., Leloir L. F.: A Modified Colorimetric Method for the Estimation of N-acetyloaminosugars. *J. Biol. Chem.* **217**, 959 (1955).
16. Rogers H. J., Perkins H. R.: *Cell Walls and Membranes.* FN Spon LTD, London 1968.
17. Salton M. R. J.: *The Bacterial Cell Wall.* Elsevier Publishing. Co. Amsterdam 1964.
18. Stolp H., Starr M. P.: Bacteriolysis. *Ann. Rev. Microbiol.* **19**, 79 (1966).
19. Taylor A., Kwiatkowski B., Antadze I.: The Murein from *Salmonella typhi* Cell Wall. *Acta Biochem. Polon.* **16**, 341 (1969).
20. Wang W. S., Lundgren D. G.: Peptidoglycan of a Chemolithotrophic Bacterium, *Ferrobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **95**, 1851 (1968).
21. 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).
22. Vincent J. M., Humphrey B., North R. J.: Some Features of the Fine Structure and Chemical Composition of *Rhizobium trifolii*. *J. gen. Microbiol.* **29**, 551 (1962).

РЕЗЮМЕ

При помощи химических методов из стенок клеток *Rhizobium trifolii* и *Rhizobium meliloti* выделили муреин. Хроматографический анализ кислых гидрализатов муреина показал, что он построен из 2-х аминокислот: глюкозамина и мураминовой кислоты и из 3-х аминокислот: аланина, глутаминовой кислоты и 2,6-диаминопимелиновой кислоты. Одной из добавочных аминокислот, выступающей в большом количестве, был лизин. Полученные препараты муреина были чувствительны на литическое действие лизоцима и энзима, выделенного из *Acanthamoeba castellanii*.

SUMMARY

The murein of *Rhizobium trifolii* and *Rhizobium meliloti* cell walls was isolated from intact cells after various chemical treatments. The

results of chemical analysis of acid hydrolyzed mureins showed two aminosugars (glucosamine, muramic acid) and three major aminoacids (alanine, glutamic acid, 2,6-diaminopimelic acid). Lysine was the only minor aminoacid found in significant quantities. The final murein was sensitive to the action of the two bacteriolytic enzymes studied, namely lysozyme and enzyme isolated from *Acanthamoeba castellanii*.