

И. Х. ТОРДЖЯН, Л. Н. КАЦ

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ ДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В КЛЕТКАХ ОБЛИГАТНО АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

(Представлено академиком А. И. Опариным 8 IV 1970)

В предыдущем исследовании (<sup>1</sup>) мы описали хорошо развитую систему внутрицитоплазматических мембран у облигатных анаэробов. У аэробных бактерий мембраны являются основным местом локализации окислительных ферментов (<sup>2-7</sup>). Данные по анаэробным бактериям в этом плане немногочисленны и противоречивы. Так, при помощи биохимических методов показано, что у анаэробов основная активность дегидрогеназ распределена в растворимой части цитоплазмы (<sup>8, 9</sup>). Цитохимические методы, напротив, свидетельствуют о том, что основная активность дегидрогеназ локализована в мембранных структурах (<sup>10, 11</sup>). Именно поэтому представляло интерес изучение локализации дегидрогеназ методом ультраструктурной цитохимии у облигатно анаэробных бактерий. Это и составляло задачу настоящего исследования.

Для исследования были взяты два штамма облигатно анаэробных бактерий: штамм № 324 Cl. sporogenes и штамм № 198 Cl. oedematiens тип С. Условия культивирования см. (<sup>1</sup>).

Клетки из культуры суточного роста отделяли центрифугированием и однократно промывали  $1/15$  M фосфатным буфером pH 7,2. При цитохимических исследованиях в качестве искусственных акцепторов водорода использовали два индикатора дегидрогеназной активности: тетранитросиний тетразолий (ТНСТ) «Sigma» и теллурит калия, — так как они дают наилучшие результаты (<sup>12</sup>). Осадок ресуспендировали в инкубационной среде, содержащей 0,05% ТНСТ или теллурита калия.

Инкубацию проводили в течение 5—10 мин. при 37° в бескислородной среде. После инкубации клетки фиксировали 1% раствором глutarового альдегида на фосфатном буфере pH 7,2 в течение 30 мин.; трехкратно отмывали тем же буфером, затем обезвоживали в спиртах и заключали в метакрилат. Методы приготовления препаратов и условия микрофотографирования см. (<sup>1</sup>).

Контролем для настоящего исследования служили клетки, которые выдерживали в инкубационной среде, не содержащей индикаторов. При использованном методе фиксации клетки имели ультраструктуру, описанную в предыдущем сообщении (<sup>1</sup>). Мембранные структуры обладали отчетливо двухконтурным строением и не отличались по электронно-оптической плотности от цитоплазматической мембраны.

При исследовании ультратонких срезов клеток Cl. sporogenes, инкубированных в среде, содержащей ТНСТ, повышался контраст внутрицитоплазматических мембран структур и цитоплазматической мембраны (рис. 1а). Продукт восстановления обнаруживался в мембранных структурах, связанных с нуклеоидом и расположенных в зоне формирования перегородки. В некоторых клетках восстановленный индикатор имел вид иглоподобных кристаллов, расположенных между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной, а также на внутрицитоплазматических мембранах. Особенно отчетливо подобный характер восстановления виден

в протопластах (рис. 1б). В таких клетках кристаллы диформаза на основании «онираются» на поверхность цитоплазматической мембраны и как «спицы» выступают над нею. При этом если цитоплазма разрежена, то формаза обнаруживается в ней в виде свободно лежащих игловидных кристаллов, равномерно распределенных по всей клетке. В тех клетках, где цитоплазма достаточно плотная, формаза выявляется в виде равномерно распределенных глыбок (рис. 1в). Обращает на себя внимание тот факт, что в клетках с разрыхленной цитоплазмой и большим количеством переходящих одно в другое вакуолеподобных образований, расположенных в центре клетки, восстановление индикатора происходит преимущественно в цитоплазме и на цитоплазматической мембране. Однако в самих вакуолях и на мембранных структурах продукты восстановления не обнаруживаются. Часто можно наблюдать, как из таких вакуолизованных клеток через разрывы в цитоплазматической мембране и клеточной стенке выбрасывается наружу осмиофильное вещество, содержащее кристаллы диформаза. Кристаллы диформаза обнаруживаются также и на поверхности клеточной стенки (рис. 1г). Хорошо видно, что восстановленный индикатор приурочен к осмиофильному веществу, находящемуся на поверхности клеточной стенки и напоминающему микрокапсулу. По-видимому, вся поверхность клеточной стенки покрыта этим веществом, и формаза, делая его контрастнее, позволяет выявить характер его распределения. Можно наблюдать, что конгломераты кристаллов диформаза находятся на некотором расстоянии от клеточной стенки и связаны с последней посредством узких мостиков вещества такой же электронно-оптической плотности, что и клеточная стенка (рис. 1е) (рис. 1 см. вкл. к стр. 957).

В некоторых клетках под клеточной стенкой или в цитоплазме встречаются осмиофильные образования вытянутой или округлой формы («сферолиты»), обрамленные более контрастным осмиофильным контуром. Как оказалось при изучении мембран лизированных клеток, эти образования представляют собой плотно упакованные мембраны (рис. 1ж). Обычно они сферической формы и полые; заключены они в общую сеть внутрицитоплазматических мембран и таким образом, что на их поверхности начинаются и заканчиваются элементарные мембраны. На трехслойных элементарных мембранах восстановление тетразолия происходит на обоих осмиофильных профилях. В сферических образованиях восстановление индикатора можно наблюдать только на внешнем профиле, а на внутреннем только в том случае, когда сфера полая (рис. 1з). Внутренние плотно соприкасающиеся профили мембран в сферических образованиях не восстанавливают тетразолия.

При исследовании ультратонких срезов *Cl. oedematiens* (более чувствительного к кислороду, чем *Cl. sporogenes*), инкубированных с теллуридом калия, в мембранных структурах продукт восстановления практически не обнаружен. Лишь единичные гранулы индикатора изредка встречаются в мембранных структурах. Продукты восстановления теллурита отмечены преимущественно в цитоплазме, вне видимой связи с мембранными структурами, равномерно распределяясь в ней и изредка образуя более плотные скопления (рис. 1д). Иногда в цитоплазме на периферии можно наблюдать крупные кристаллы теллурита, расположенные группами по 4 или 5 параллельно друг другу. Интенсивное восстановление индикатора происходит во внешнем слое клеточной стенки, который вследствие этого теряет целостность и как бы слущивается с клетки.

Таким образом, у облигатно анаэробной бактерии *Cl. sporogenes* восстановление индикатора происходит преимущественно в цитоплазме вне связи с мембранными структурами. Несколько менее интенсивное восстановление индикатора наблюдается в мембранных структурах и цитоплазматической мембране. У другого, более строгого, анаэроба — *Cl. oedematiens* восстановление индикатора происходит исключительно в цитоплазме, вне связи

с мембранными структурами, и, следовательно, в отличие от *Cl. sporogenes*, здесь, по-видимому, мембранные структуры почти не участвуют в организации дегидрогеназ, выявляемых при помощи использованных индикаторов.

Институт эпидемиологии и микробиологии  
им. Н. Ф. Гамалеи  
Академии медицинских наук СССР  
Москва

Поступило  
26 III 1970

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. А. Авакян, И. Х. Торджян, А. И. Опарин, ДАН, 193, № 6 (1970).  
<sup>2</sup> W. Leene, W. van Ieterson, J. Cell. Biol., 27, 237 (1965). <sup>3</sup> A. W. Sedar, R. M. Burde, J. Cell. Biol., 27, 53 (1965). <sup>4</sup> A. W. Sedar, R. M. Burde, J. Cell. Biol., 24, 285 (1965). <sup>5</sup> М. Н. Малатян, В. И. Бирюзова, ДАН, 160, 1182 (1965).  
<sup>6</sup> И. Х. Торджян, Л. Н. Кац, Микробиология, 37, 1039 (1968). <sup>7</sup> И. Х. Торджян, Л. Н. Кац, ДАН, 186, 1492 (1969). <sup>8</sup> H. A. Cole, D. E. Hughes, J. Gen. Microbiol., 40, 85 (1965). <sup>9</sup> А. И. Опарин, Е. Ф. Харатьян, Н. С. Гельман, ДАН, 157, 211 (1964). <sup>10</sup> J. P. Brown, M. R. Edwards, J. P. van Demark, Canad. J. Microbiol., 14, 823 (1968). <sup>11</sup> Н. А. Красильников, В. И. Дуда, ДАН, 184, 959 (1969). <sup>12</sup> И. Х. Торджян, ДАН, 181, 473 (1968).