

И. Ш. ВАЙСМАН

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОНКОЙ МОРФОЛОГИИ СПОРООБРАЗОВАНИЯ У *CLOSTRIDIUM SEPTICUM*

(Представлено академиком С. С. Шварцем 19 II 1971)

По данным исследования, спорующий у ряда бактерий, основные этапы спорогенеза и соответствующие им морфологические изменения представляются, в общем, сходными (^{2, 5, 7, 8, 13, 15}). Однако, выявляются более или менее значительные специфические различия, что вызывает проведение дальнейших наблюдений над динамикой процесса. В настоящем сообщении приводим данные электронномикроскопического исследования спорообразования у *Clostridium septicum*. В доступной литературе подобные сведения в отношении данного вида нами не обнаружены.

Изучали 48-часовые культуры *Cl. septicum* типа А, «производственно-го» штамма 59, выращенные в анаэробе на бульоне Поупа. Эта среда благоприятствует спорообразованию больше, чем нашедшие за последнее время широкое применение среды с гидролизатами казеина (¹¹). Фиксацию проводили по Ритер и Келленбергеру (¹²), заливку в смесь мономеров бутилового и метилового метакрилатов в соотношении 9:1. Блоки раскладывали на тонкие срезы стеклянными ножами при помощи ультрамикротомы LKB 4802 и вылавливали их на медные сетки с коллодиевой пленкой — подложкой. Препараты контрастировали насыщенным водным раствором уранил-ацетата, просматривали и фотографировали в электронном микроскопе УЭМВ-100 при инструментальном увеличении 15 000—25 000 ×.

В данных условиях культивирования бактериальные клетки, образующие споры, преобладают в популяции. К избранному нами сроку оказался доступным наблюдению ряд последовательных стадий спорогенеза. На наш взгляд, наибольший интерес представляют его ранние этапы, на морфологии которых следует остановиться более подробно. Не вдаваясь в детальное описание вегетативных клеток *Cl. septicum*, необходимо отметить, что этому микробу присущи черты строения общие для грам-положительных бактерий. Бактериальная клетка окружена клеточной стенкой толщиной ~ 190 Å, в которой на удачных срезах выявляются два плотных слоя неравномерной толщины, разделенные светлым, легко проходимым для электронов промежутком. Протопласт ограничен трехслойной структурой типа unit membrane толщиной ~ 85 Å. В цитоплазме содержатся весьма плотно упакованные гранулы типа рибосом и разнообразные по форме внутрицитоплазматические мембранные структуры. Ядерные вакуоли обычного вида содержат более или менее рыхло упакованные нитевидные образования толщиной порядка 30 Å. В спорогенез оказываются вовлеченными все эти компоненты вегетативной клетки.

До образования споральной септы, бактерии типичной палочковидной формы удлиняются. Вдоль длинной оси их тела более или менее отчетливо выявляется ядерная структура также палочковидной или, чаще, волнистой, нередко змеевидной формы, из-за чего на срезах, прошедших вне плоскости центральной оси, может выявиться по нескольку ядерных вакуолей. В дальнейшем, у одного из полюсов отделяется фрагмент ядра равный примерно $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$ его объема. Одновременно появляется поперечная коль-

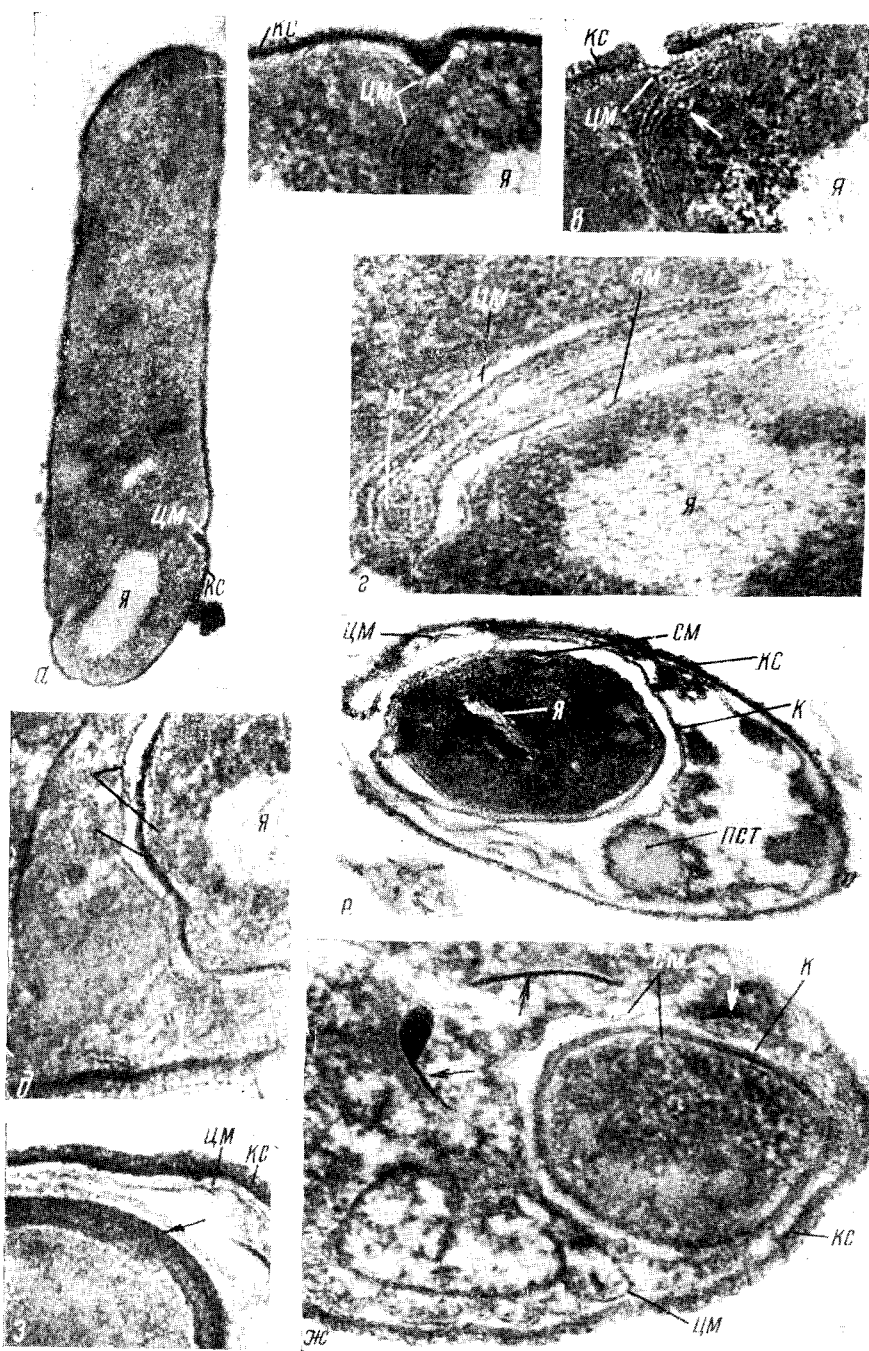


Рис. 1. *а* — продольный срез через бактериальную клетку на ранней стадии спорообразования, 36 000 \times ; *б* — клиновидное утолщение клеточной стенки на уровне формирования септы, 85 000 \times ; *в* — многократное складывание начального отрезка инвагинации цитоплазматической мембраны (стрелка) в месте формирования споральной септы, 98 000 \times ; *г* — мембранные пластинки в зоне споральной септы, 115 000 \times ; *д* — формирование кортекса между листками трехслойных мембран предспоры, 44 800 \times ; *е* — лизис структур спорангия на стадии формирования кортекса, 44 800 \times ; *ж* — осифильные линейные мембранные структуры (указано стрелками) в цитоплазме спорангия, 73 200 \times ; *з* — формирующаяся оболочка споры, 85 000 \times . я — ядро, кс. — клеточная стенка, цм — цитоплазматическая мембрана, м — мембранная структура типа мезосомы, к — кортекс, см — мембрана споры

К статье Г. .7. Трсакиной, стр. 1036



Рис. 1. Оогонии метафазы митотического деления в яичниках самок ерша, *Aserina serena* L. Ок. 5, об. 90×; Серра, железный гематоксилин Гейденгайна



Рис. 2. Ооциты премеиотического периода в яичниках самок ерша. а — стадия зиготены, б — стадия пахитены. Ок. 5, об. 90×; Серра, железный гематоксилин Гейденгайна

цевидная перетяжка, обозначающая границу будущей споры на уровне формирования споральной септы. Перетяжке соответствует клиновидное утолщение внутреннего слоя клеточной стенки. У верхушки последнего начинается впячивание цитоплазматической мембраны, ведущее к образованию септы (рис. 1а, б).

С самого начала инвагинат цитоплазматической мембраны представлен сложной структурой. У его основания обычно наблюдается многократное складывание отрезков небольшой протяженности (рис. 1в). К тому времени, когда образование споральной септы завершается, намечавшаяся ранее перетяжка тела бактерии сглаживается. По-видимому, на стадии формирования септы, соответственно последней имеет место значительное наращивание структур цитоплазматической мембраны: на препаратах выявляется по несколько параллельно ориентированных пластинок, образованных трехслойными мембранами, которые сохраняют анатомическую связь между собой. Между пластинками наблюдается неравномерное отложение аморфного вещества, плотность которого близка к таковой вещества клеточной стенки. Как правило, здесь же располагаются сложные мембранные структуры типа мезосом (рис. 1г). В это время часть ядерной вакуоли, заключенная в зоне формирующейся споры, обычно сохраняет непосредственную анатомическую связь с цитоплазматической мембраной. Затем завершается отграничение предспоры: споральная септа прогибается к центру спорангия. Одновременно происходит врастание в полярном направлении под цитоплазматическую мембрану мембранных пластинок, сформированных на уровне септы и их смыкание у полюса клетки. В итоге сложных перемещений цитоплазматической мембрана вегетативной клетки, превратившейся в спорангий, восстанавливает свою топографию. У полюса, субтерминально, предспора располагается свободно в цитоплазме спорангия. К этому времени она окружена двумя непрерывными трехслойными листками собственных мембран.

Дальнейшие изменения происходят как внутри предспоры, так и вне ее. В частности, отмечается повышение плотности гранулярного компонента споральной цитоплазмы, наряду с уменьшением объема ее ядерной вакуоли и усилением контрастности нитевидных структур, содержащихся в последней. Листки пары трехслойных мембран, окружающих предспору, расходятся на неравномерные расстояния, а между ними начинает откладываться плотное вещество кортекса, в котором местами различаются гранулярные субъединицы (рис. 1д). К наружной трехслойной мембране предспоры, со стороны цитоплазмы спорангия иногда примыкает своеобразное шаровидное образование с нежно-зернистым матриксом, типа параспорального тельца. По-видимому, некоторые бактериальные клетки претерпевают более или менее выраженные изменения аутолитического характера еще до завершения формирования предспоры; об этом свидетельствует лизис основных структур части спорангиев (рис. 1е).

Наряду с формированием кортекса, в цитоплазме спорангия по окружности споры появляются плотные полосы осмиофильного вещества различной длины, толщиной до 145 Å — закладки оболочек споры. Некоторые такие полосы причудливых очертаний, похожие на запятую и т. п., весьма напоминают так называемые осмиофильные линейные мембранные структуры (*). При большом увеличении видно, что по наружному контуру этих резко осмиофильных структур, а изредка также и по их внутреннему контуру, через светлый промежуток порядка 30 Å проходит тонкая слабо осмиофильная полоска (рис. 1ж). На этой стадии ядерная вакуоль предспоры перестает выявляться; содержимое предспоры представлено более или менее однородной зернистой массой. Далее фрагменты оболочек споры сливаются в замкнутое кольцевидное образование, плотность которого усиливается по мере снижения плотности кортекса. При просмотре некоторых препаратов создается впечатление, что вещество оболочек откладывается по ходу одного из осмиофильных слоев трехслойных мем-

бран (рис. 1з), которые являются либо отрезками внутрицитоплазматических мембранных структур спорангия, либо отрезками внешней мембраны, окружающей предспору.

По мере созревания споры, по-видимому, происходит как дальнейшее снижение плотности и истончение кортекса, так и наращивание массы ее оболочек. Последние образуют массивную плотную структуру, в которой можно различить отдельные слои, разделенные на два комплекса более осмиофильным пластинчатым образованием. На срезах зрелых спор кортекс щелевидной формы, плотность его практически равна фоновой плотности препарата; оболочки споры представлены несколькими слоями плотно упакованных высоко осмиофильных пластинчатых образований. Интересно отметить, что вследствие снижения контрастности и последующего лизиса гранулярных компонентов цитоплазмы спорангия, по периферии споры выявляются многочисленные отрезки преимущественно линейных, лишенных гранул мембранных структур типа unit membrane. Можно думать, что их сосредоточение здесь не случайно, а обусловлено высоким уровнем обменных и транспортных процессов в месте образования споры. Высвобождение спор происходит при лизисе остатков структур спорангия, завершающемся разрывом его клеточной стенки.

Как видно из изложенного, спорообразование у *Clostridium septicum* представляет собой сложный многоступенчатый процесс, который разветвляется в строгой и, очевидно, целесообразной последовательности. Вряд ли следует признать правильным мнение о спорогенезе как об особом виде деления (⁹, ¹⁰). Принципиальное различие представляется в том, что при делении все системы бактериальной клетки работают на образование двух практически равноценных и жизнеспособных организмов, могущих обеспечить продолжение вида. При спорообразовании, с момента отделения предспоры посредством споральной септы и образования двухклеточного организма (¹¹) — спорангия, вся его жизнедеятельность подчинена обеспечению морфогенетических процессов, ведущих к завершению развития лишь одной из двух клеток за счет другой, которая при этом неминуемо погибает. Известно, например, что у некоторых клостридий, как это показали Н. А. Красильников и В. И. Дуда (³), через трубчатые выросты на поверхности формирующихся спор вещества цитоплазмы спорангия буквально перекачиваются в спору, на построение которой они идут. Деление также осуществляется за счет метаболических ресурсов бактериальной клетки, однако при этом имеет место не только сохранение, но и наращивание ее структур.

При анализе событий, происходящих в ходе споруляции, с позиций функциональной морфологии представляется чрезвычайно интересным механизм регуляции столь совершенно согласованных сложных и разнообразных процессов (¹). Общая тенденция происходящей при этом внутриклеточной дифференцировки могла бы быть определена как наращивание защитных структур, призванных обеспечить выживание ядерно-цитоплазматическому комплексу споры в условиях, неблагоприятных для вегетативной клетки. В новообразовании защитных компонентов споры, с нашей точки зрения, цитоплазматической мембране и ее производным — внутрицитоплазматическим мембранным структурам, по-видимому, принадлежит главенствующая роль. Она осуществляется, конечно, под контролем генетических детерминант. В самом деле, эти мембраны выступают в качестве матрицы, места сборки, а если учесть пространственное распределение ферментных систем, то и генератора энергии для синтеза защитных структур споры из предшественников, вырабатываемых в спорангии. Так, цитоплазматическая мембрана бактериальной клетки выполняет функцию направляющей при отграничении предспоры мембранными пластинками, разрастающимися на уровне септы. Отложение вещества кортекса между листками удвоенной мембраны, окружающей предспору, равно как и наложение фрагментов оболочек по ее внешнему контуру, по всей ве-

ростности, не может осуществляться без участия процессов усиленного переноса вещества, регулируемого избирательной проницаемостью мембран; при участии последних происходит также значительное уплотнение вещества споры, накопление в ней определенных металлов, например Ca^{2+} и т. п. Это обстоятельство представляется нам весьма достойным внимания.

Пермский научно-исследовательский
институт вакцин и сывороток

Поступило
10 II 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. В. Калакуцкий, А. Н. Парийская, Усп. совр. биол., 67, 2, 273 (1969).
² Н. А. Красильников, В. И. Дуда, ДАН, 152, № 2, 454 (1963). ³ Н. А. Красильников, В. И. Дуда, ДАН, 184, № 4, 959 (1969). ⁴ Н. А. Красильников, Е. Д. Макарьева, В. И. Дуда, ДАН, 192, № 1, 205 (1970). ⁵ A. J. Aronson, P. C. Fitz-James, J. Molec. Biol., 33, 1, 199 (1968). ⁶ C. Frehel, A. Ryter, Ann. Inst. Pasteur, 117, 3, 297 (1969). ⁷ J. F. M. Hoeniger, P. F. Stuart, S. C. Holt, J. Bacteriol., 96, 5, 1818 (1968). ⁸ S. C. Holt, E. R. Leadbetter, Bacteriol. Rev., 33, 2, 346 (1969). ⁹ W. G. Murrell, Adv. Microbiol. Physiol., 1, 133 (1967). ¹⁰ D. F. Ohye, W. G. Murrell, J. Cell Biol., 14, 1, 111 (1962). ¹¹ W. E. Perkins, J. Appl. Bacteriol., 28, 1, 1 (1965). ¹² A. Ryter, E. Kellenberger, Zs. Naturforsch., 13b, 597 (1958). ¹³ A. Ryter, Ann. Inst. Pasteur, 108, 1, 40 (1965). ¹⁴ P. Schaeffer, Bacteriol. Rev., 33, 1, 48 (1969). ¹⁵ A. Takagi, T. Kawata, S. Yamamoto, J. Bacteriol., 80, 1, 37 (1960). ¹⁶ E. Young, P. C. Fitz-James, J. Cell Biol., 12, 1, 115 (1962).