

Член-корреспондент АН СССР Н. А. КРАСИЛЬНИКОВ, В. И. ДУДА,  
Г. Е. ПИВОВАРОВ, Г. ГОНЧИКОВ, Е. Д. МАКАРЬЕВА

## НОВЫЙ ТИП ОТРОСТКОВ НА СПОРАХ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

В настоящее время описано много различных морфологических типов выростов, формирующихся на спорах анаэробных бактерий. Как известно, они имеют крайне разнообразную форму у различных видов бактерий<sup>(1-3)</sup>. Самый сложный тип выростов, состоящий из ствола, петли и розетки трубчатых отростков на дистальном конце, обнаружен у *Plectridium sargogenes*. В настоящей работе описывается тонкое строение выростов на спорах *Pl. sargogenes*. Рассматривается также вопрос о влиянии состава питательной среды и условий культивирования на процесс спорообразования и строения споровых придатков — выростов.

Облигатно анаэробная бактерия — штамм *B<sub>1</sub>* выделена из дерново-луговой почвы рисовых чеков (Бирма). По определителю Прево и др. (1967) эта культура была идентифицирована как *Pl. sargogenes*.

*Pl. sargogenes*, штамм *B<sub>1</sub>* хорошо развивается на простых синтетических средах. Рост на синтетических средах активируется добавлением дрожжевого экстракта или автолизата. Для изучения морфологии вегетативных клеток и спор культуру выращивали на крахмало-аммиачном агаре с глюкозой, мясопептонном бульоне (м.п.б.) и мясопептонном агаре (м.п.а.), а также на синтетических средах: А ( $K_2HPO_4$  1 г,  $MgSO_4$  1 г,  $(NH_4)_2PO_4$  1,4 г, NaCl 1 г,  $CaCO_3$  3 г, глюкоза 10 г, дистиллированная вода 1 л) и Б ( $NaNO_3$  2,5 г,  $K_2HPO_4$  1 г,  $KH_2PO_4$  1 г,  $MgSO_4$  1 г, NaCl 1 г,  $CaCO_3$  3 г, глюкоза 10 г, дистиллированная вода 1 л). В эти среды добавляли смесь микроэлементов по Федорову (1949 г.). В качестве источников углерода, кроме глюкозы, использовали сахароза, мальтоза, лактоза, арабиноза, маннит, крахмал, а также казеиновые аминокислоты. Инкубирование посевов проводили при 28° в микроанаэростатах МИЛепЭМО с остаточным давлением воздуха 10 мм Hg. В электронном микроскопе изучали препараты оттененные окисью вольфрама и негативно контрастированные ФВК, а также ультратонкие срезы. Для получения срезов культуру фиксировали по Ритер с соавторами (1958 г.) и заливали в аралдит. Микротомирование производили на ультрамикротоме LKB-4800. Препараты просматривали и фотографировали на электронном микроскопе УЭМВ-100.

**Результаты.** Вегетативные клетки *Pl. sargogenes* штамма *B<sub>1</sub>* представляют собой мелкие перитрихально жгутикованные клетки. Перед спорообразованием они значительно увеличиваются в размерах и раздуваются на одном из полюсов, приобретая вид барабанных палочек. Споры локализуются в спорангиях терминально (рис. 1). На одном из полюсов споры формируются выросты, простирающиеся через всю материнскую вегетативную клетку (рис. 3). Клетки штамма *B<sub>1</sub>* тонкие, слабо рассеивают электроны, благодаря чему выросты обнаруживаются под электронным микроскопом в интактных клетках на тотальных препаратах, оттененных металлами, либо негативно контрастированных ФВК. На свободных зрелых спорах видно, что выросты у штамма *B<sub>1</sub>* имеют сложное строение (рис. 3А, 4). Они составлены из ствола (*c*), петли (*n*) или кольца на дистальном конце выростов и розетки трубчатых отростков (*m.o.*) — «уси́ков», отходящих от узелков (*уз*). Узелки образуются в той части ствола, которая, разветвляясь, дает структуру в виде петли. Выросты на спорах штамма *B<sub>1</sub>*

хорошо видны даже в обычном микроскопе с фазово-контрастным устройством (рис. 2). Ствол выростов имеет вид длинного, до 8–10  $\mu$  в длину, извитого тяжа, обладающего поперечной исчерченностью, что можно обнаружить как на оттененных металлом (рис. 3Б), так и на негативно контрастированных препаратах (фото 4А – Г).

Негативное контрастирование ФВК (рН 7,0) также позволило выявить, что ствол состоит из очень тонких ( $\sim 50$  Å в диаметре) продольно расположенных фибрилл. Пучки фибрилл пересекаются светлыми поперечными

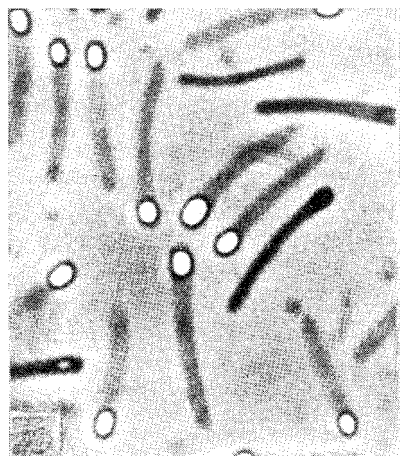


Рис. 1

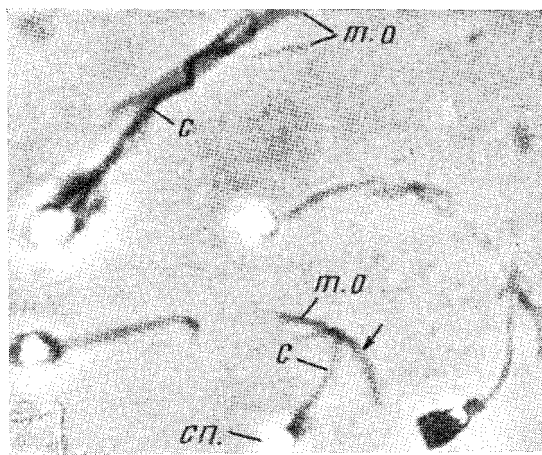


Рис. 2

Рис. 1. Спорующие клетки *Pl. saprogenes* B<sub>1</sub> под фазово-контрастным микроскопом 2000 $\times$

Рис. 2. Зрелые свободные споры *Pl. saprogenes* B<sub>1</sub> с выростами на спорах. *с* — выросты, *т.о* — трубчатые отростки — «усики», *с* — ствол, *сп.* — спора. Культура выращена на м.п.а.

пластинками, расположенными вдоль ствола с периодичностью  $\sim 430$  Å). В целом ствол напоминает трахееобразную структуру (рис. 4Б, В), и может показаться, что он представляет собой трубку. На самом деле ствол составлен из плотно упакованных фибрилл ( $\phi$ ). В некоторых случаях ствол может разломачиваться и распадаться на отдельные волокна ( $\epsilon$ ), в свою очередь состоящие из очень тонких «протофибрилл» (рис. 4Г). Отдельным волокнам также присуща поперечная исчерченность. При выращивании штамма B<sub>1</sub> на синтетических средах с минеральными источниками азота (среды А и Б, Чапека, крахмало-аммиачный агар) ствол выростов выглядит более тонким ( $D = 1000$  Å) и компактным (рис. 4Б, В), а на средах сложного состава (м.п.а., м.п.б., желатин с глюкозой) — толстым ( $D \sim 1500$ – $3000$  Å) и распадающимся на пучки волокон (рис. 4А, Г).

Тонкое строение петли сходно со строением ствола. Однако диаметр жгута, составляющего петлю, обычно в два раза меньше, чем диаметр ствола. «Усики» имеют совершенно иную структуру, чем ствол. На ультратонких срезах (рис. 4Е) они выглядят как трубчатые отростки, обладающие электронно-плотными стенками и заполненные электронно-прозрачным веществом. Негативное контрастирование выявляет, что трубчатые отростки состоят из глобулярного материала — шаровидных субъединиц с диаметром  $\sim 40$  Å (рис. 4Д). Толщина трубок составляет 500 Å. Каждый отдельный отросток имеет капсулярный слой толщиной  $\sim 100$  Å. Трубчатые отростки прикреплены к узелкам, расположенным в месте сочленения петли со стволом. Узелки имеют гранулярное строение. Количество трубчатых отростков, составляющих розетку, от 3 до 7 на споре. Длина их зависит

от состава питательной среды. На простых синтетических средах формируются короткие «усики», достигающие в длину всего 0,5–3  $\mu$ , а на средах сложного состава (м.п.а. и м.п.б. с глюкозой и дрожжевым автолизатом) «усики» — очень длинные, достигают 7–10  $\mu$  в длину. Толщина же трубок «усиков» одинакова на различных средах. Находясь внутри материнской вегетативной клетки, трубчатые отростки очевидно вызывают лизис ци-

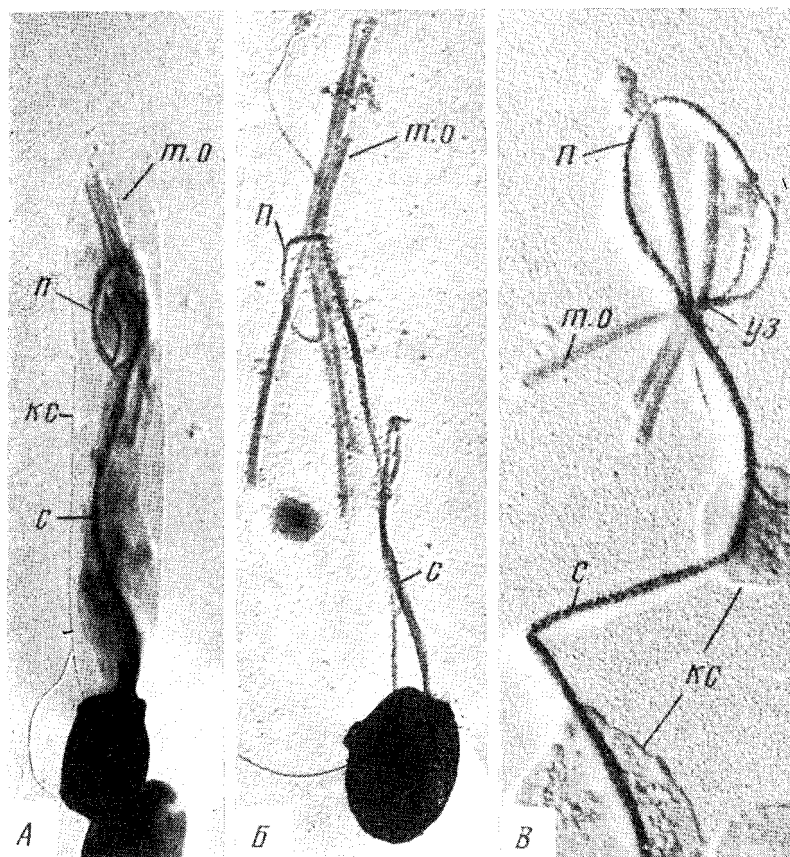


Рис. 3. Электронно-микроскопическое строение *Pl. saprogenes* Б<sub>1</sub>. Культура выращена на синтетической среде. А. *n* — петля, *yz* — узелок, *kc* — клеточная стенка. Остальные обозначения как на рис. 2. А — спорующая клетка, выросты видны внутри материнской клетки, 7200 $\times$ ; Б — свободная спора с выростом, 10 200 $\times$ ; В — отдельный вырост. Хорошо видна петля и «усики» на дистальном конце выроста, 20 000 $\times$

топлазмы. На ультратонких срезах хорошо видно, что они окружены широкими светлыми зонами, заполненными слабо плотным для электропов веществом (рис. 4Е). Эти зоны постепенно увеличиваются по мере созревания споры, а цитоплазматические участки, содержащие рибосомы, исчезают. Тонкое строение, а также способность «усиков» лизировать прилегающие к ним участки цитоплазмы сближают их с другими типами трубчатых отростков, описанными у ряда видов анаэробных бактерий. В то же время уникальным для *Pl. saprogenes* Б<sub>1</sub> является наличие и тонкое строение специального ствола, несущего розетку трубчатых отростков. Ствол состоит в основном из белков, о чем свидетельствует хорошая прокрашиваемость солями свинца. С другой стороны, образование ствола подавляется добавлением к спорующей культуре ингибитора белкового синтеза — хлорамфеникола в сублетальных концентрациях. Непосредственные химические анализы чистых фракций выростов различных типов показыва-

ли, что они действительно в основном состоят из белковых веществ (<sup>1</sup>). Поперечная исчерченность и фибриллярное строение ствола свидетельствуют о том, что он построен из фибриллярных белков типа коллагена, актина, миозина или фибрина. Фибриллярные белки, как известно, входят в состав структур, выполняющих механическую или опорную функции. Таким образом, ствол представляет собой очевидно опорную структуру, несущую на дистальном конце розетку ферментативно активных трубчатых выростов.

В строении самих спор ничего необычного не выявлено. У зрелых спор хорошо дифференцируются сердцевина, кортекс, оболочка и экзоспориум. Экзоспориум имеет на срезах вид электронно-плотного слоя толщиной ~30 Å. Очевидно, экзоспориум может легко разрушаться в процессе лизиса материнских вегетативных клеток, так как у зрелых свободных спор он встречается редко. Описанные до сих пор в литературе анаэробные бактерии с выростами на спорах являются в основном представителями протеолитических гнилостных анаэробов, требующими для своего роста и особенно спорообразования сложных по составу питательных сред. Выделенная нами культура *Pl. saprogenes* B<sub>1</sub> в этом отношении составляет исключение. Она хорошо растет и спорулирует на простых синтетических средах, что дало возможность впервые детально изучить стабильность формирования и строения выростов, а также пределы изменчивости их структуры под влиянием различных условий культивирования и состава питательной среды. В этих экспериментах за основу была взята среда А. Оказалось, что специфические розетковидные выросты у штамма B<sub>1</sub> неизменно формируются на спорах при развитии организма на всех типах сред: м.п.а., желатине, синтетических средах А и Б (с различными сочетаниями источников С и N). Выращивание культуры в жидких и плотных питательных средах в анаэростатах под вакуумом или в атмосфере N<sub>2</sub>, в средах с различным рН (от 4,5 до 8,0) и при различной температуре (от 20 до 37°) не меняет видоспецифического характера строения выростов, т. е. они всегда были построены из ствола, петли на дистальном конце выроста и розетки трубчатых отростков. Варьирование состава питательных сред и условий культивирования, не меняя видоспецифического строения выростов, все же сказывается на величине (длине и толщине) ствола, длине и количестве «усиков». На сложных по составу питательных средах, состоящих преимущественно из белков и продуктов их гидролиза, таких как м.п.б., м.п.а., пептонный агар, желатин *Pl. saprogenes*, B<sub>1</sub> дает очень скудный рост. Но выросты в этих условиях формируются очень крупные с толстыми стволами и длинными «усиками», почти равными по длине стволу. В то же время на синтетических средах А и Б с минеральными источниками азота вегетативный рост хороший, однако отростки на спорах образуются мелкие, с тонким стволом и малочисленными короткими усиками (рис. 3В). Особенно мелкими формируются споры и их придатки — выросты на средах с нитратным азотом.

Принципиально одинаковый тип выростов был свойствен 12 различным морфологическим вариантам и штаммам *Pl. saprogenes* B<sub>1</sub>, выделенным из различных типов почв СССР, Бирмы, Китая. Эти данные, с одной стороны, свидетельствуют о высокой стабильности такого признака, как выросты бактериальных спор, а с другой — подтверждают, что тип строения выростов носит видоспецифический характер и не является признаком каких-либо вариантов.

Московский государственный  
университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
23 XI 1972

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Н. А. Красильников, В. И. Дуда, А. А. Соколов, Микробиология, 33, в. 3, 454 (1964). <sup>2</sup> Н. А. Красильников, В. И. Дуда, А. А. Соколов, ДАН, 159, № 2, 434 (1964). <sup>3</sup> L. J. Rode, Crit. rev. microbiol., 1, 1 (1971). <sup>4</sup> Н. А. Красильников, В. И. Дуда и др., ДАН, 206, № 3, 726 (1972).

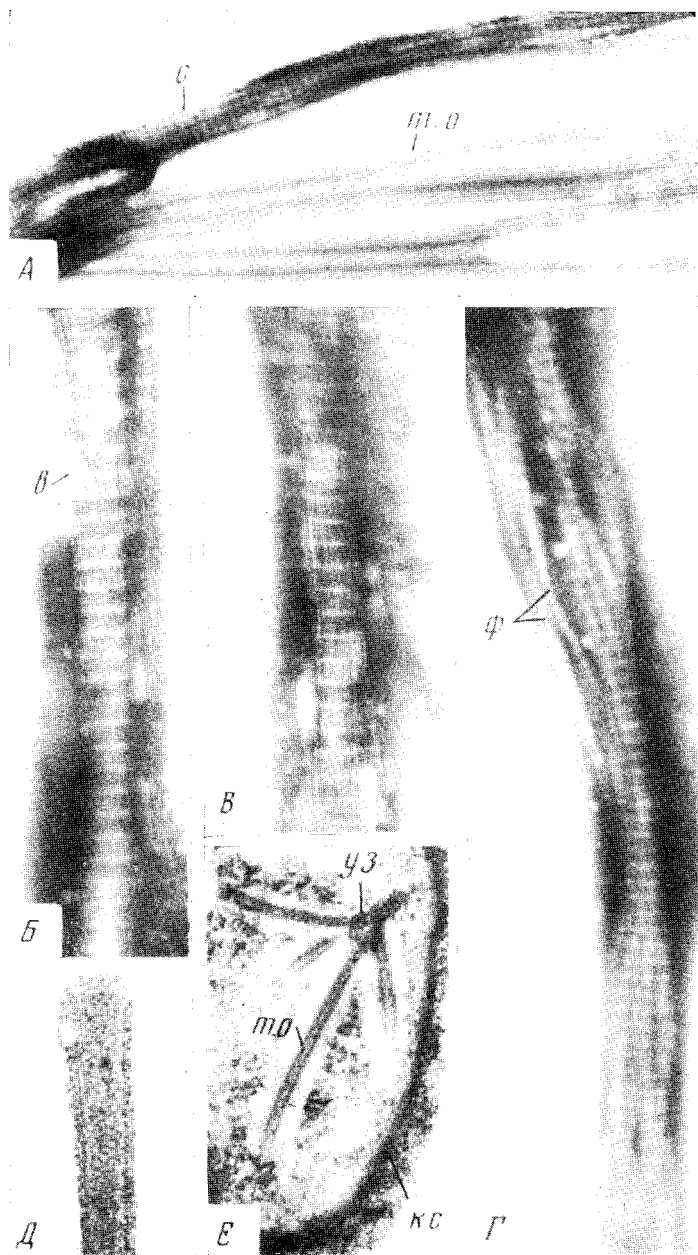


Рис. 4. Ультраструктура выростов на спорах *Pl. saprogenes* B1. А — Д — негативное контрастирование ФВК.  $\phi$  — фибриллы,  $\sigma$  — волокна; остальные обозначения как на рис. 2, 3. А — ствол и «усики», Б — Г — ствол, Д — участок трубчатого выроста («усиков»), Е — ультратонкий срез выроста в месте отхождения «усиков» от ствола. А — 36 000 $\times$ , Б, В — 63 000 $\times$ , Г — 42 000 $\times$ , Д — 110 000 $\times$ , Е — 52 000 $\times$