

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

### ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ В КЛЕТКАХ СПОРОНОСНЫХ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

В последнее время с целью расшифровки химического состава и функционального значения клеточных структур все шире используется электронная микроскопия в сочетании с цитохимическими методами. Для выявления полисахаридов с помощью электронной микроскопии был применен (<sup>5</sup>, <sup>7</sup>) метод с метенамином серебра, разработанный впервые Гомори (<sup>6</sup>) для светового микроскопа. Достоинством данного метода является то, что он позволяет демонстрировать локализацию полисахаридов непосредственно *in situ*. При этом окраска на полисахариды проводится после фиксации, заливки и ультрамикрорирования объекта, в отличие, например, от выявления ферментов, активность которых определяется реакцией, проводимой до фиксации и заливки объекта, в связи с чем можно предположить, что продукт реакции может впоследствии перемещаться из первоначальных мест его образования (<sup>9</sup>).

Была изучена локализация полисахаридов в клетках бактерий с помощью «окраски» метенамином серебра (<sup>10</sup>, <sup>11</sup>). Представляет интерес использование этого метода для изучения цитохимических особенностей анаэробных спороносных бактерий, что и явилось целью нашей работы.

В качестве объектов выбраны 2 вида облигатно-анаэробных бактерий: *Clostridium taeniosporum*, штамм 1к и *Bacillus penicillus*, штамм 3к (<sup>2</sup>, <sup>3</sup>) и описанные в наших предыдущих сообщениях (Красильников и Дуда, 1969 г.). Методы выращивания культур приводятся там же.

Для электронной микроскопии спорулирующие культуры анаэробных бактерий фиксировали по стандартной методике Ритер-Келленбергера (1958 г.). В качестве заливочной среды использовали аралдит. Срезы получали на ультрамикротоме ЛКБ-4800 и просматривали на электронном микроскопе УЭМВ-100.

Для цитохимического выявления полисахаридов срезы переносили в 0,5% раствор  $\text{HJO}_4$  на 10—20 мин. Затем промывали в двух сменах дистиллированной воды и помещали в красящий раствор, состоящий из 10 мл 0,25%  $\text{AgNO}_3$ , 0,3 мг метенамина, 10 мл абсолютного этилового спирта и 10 мл дистиллированной воды. Инкубация в этом растворе проводится 2—6 час. в темноте при комнатной температуре. Далее срезы промывали в 5 сменах дистиллированной воды, переносили в 0,05%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  на 1—2 мин., затем промывали, дважды меняя дистиллированную воду, и накладывали на сетки с формваровой пленкой.

Культуры, выбранные нами в качестве объектов исследования, отличались между собой по типу спорообразования. *Cl. taeniosporum*, штамм 1к образует споры по кластридальному типу; при этом вегетативные клетки раздуваются с приобретением лимонovidной формы и накапливают большое количество гранулесы. Включения гранулесы имеют вид отдельных округлых гранул, глыбок и их скоплений. Они хорошо окрашиваются раствором Люголя и реактивом Шиффа после предварительной обработки фиксированных препаратов подной кислотой (<sup>4</sup>).

У *Bac. penicillus*, штамм 3к спорообразование протекает по бациллярному типу. Вегетативные клетки при этом не раздуваются и не накапливают гранулесы. Электронная микроскопия ультратонких срезов

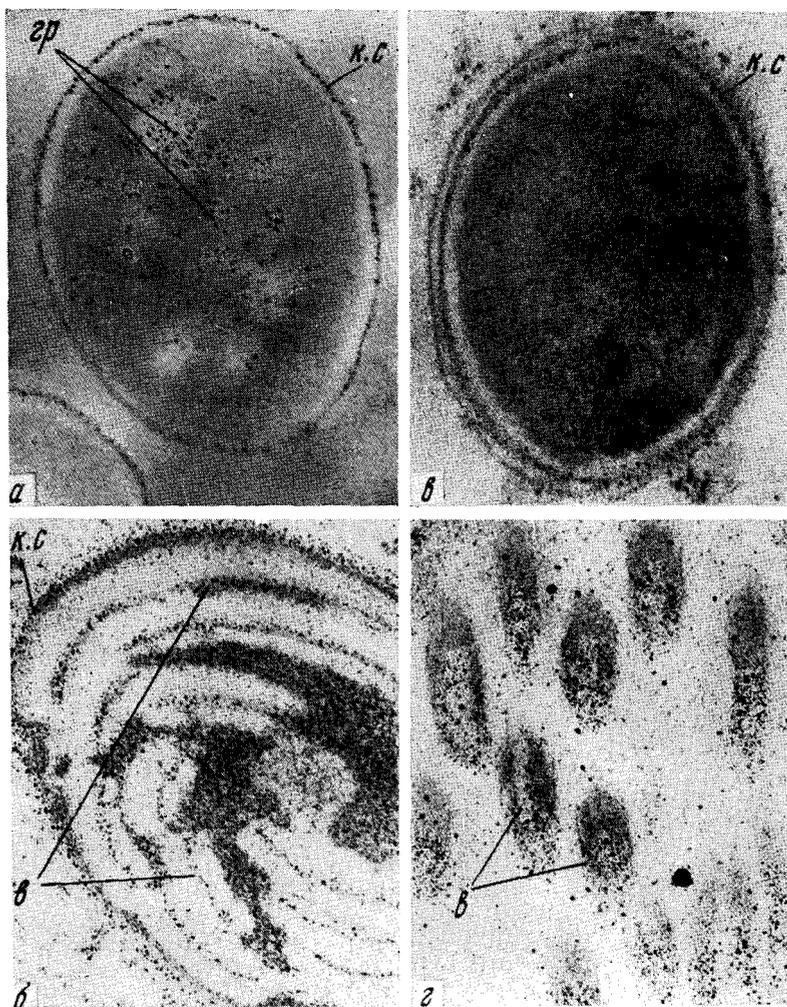


Рис. 3. Локализация полисахаридов в клетках *Clostridium taeniosporum*, 1к (а, б) и *Bacillus penicillus*, 3к (в, г). а, в — вегетативные клетки, отложения серебра на клеточных стенках и включениях гранулезы; б — отложения серебра на лентовидных и г — трубчатых выростах спор. к.с. — клеточная стенка, в — включения гранулезы, в — выросты. а, б — 39 000 ×, в, г — 60 000 ×

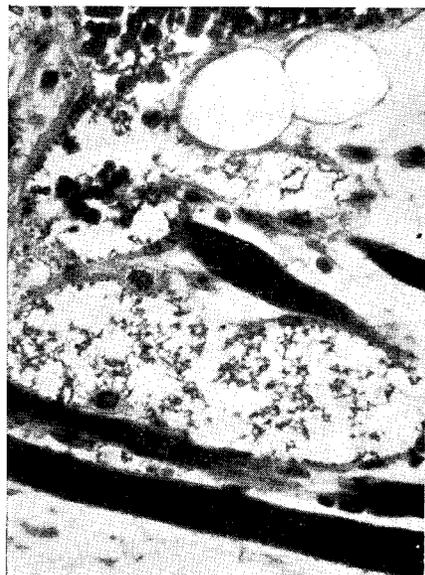
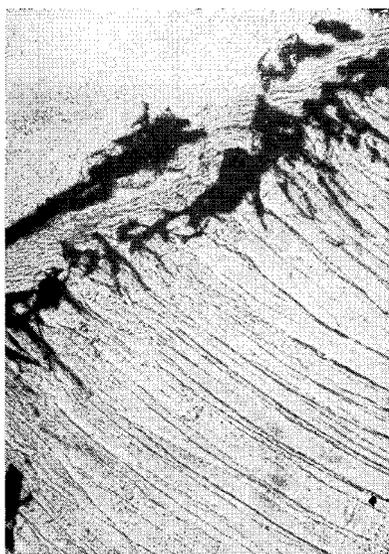


Рис. 1. Сосуды в поверхностном слое 3-дневного мышечного трансплантата. Об. 9 $\times$ , ок. 7 $\times$

Рис. 2. Разрастание сохранившихся сосудов в 6-дневном трансплантате. Об. 40 $\times$ , ок. 7 $\times$

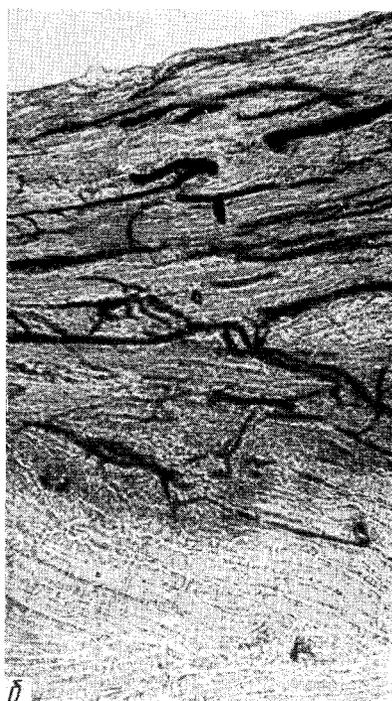


Рис. 3. Краевая зона двухнедельного трансплантата, помещенного в ложе, облученное в дозе 2500 р (А) и в дозе 5000 р (В). Об. 9 $\times$ , ок. 7 $\times$

выявила ряд различий в ультраструктуре кластридиального (штамм 1к) и бациллярного типов клеток (штамм 3к, рис. 1—3).

Клеточная стенка *Cl. taeniosporum*, 1к — толстая, от 250 до 300 Å толщиной, чаще всего выглядит однослойной. В электронноплотной цитоплазме заметно большое количество включений в виде светлых пятен шаровидной формы (рис. 1). Эти включения дают положительную реакцию на полисахариды при «окраске» срезов метенамином серебра. Электронноплотные отложения серебра обнаруживаются как в светлых участках цитоплазмы, так и на клеточной стенке. Серебро откладывается также и вдоль выростов на спорах. Выросты на спорах у этой культуры имеют вид пучка широких лент, уложенных в спорангии спирально. На срезах они выглядят в виде чередующихся светлых и темных полос,

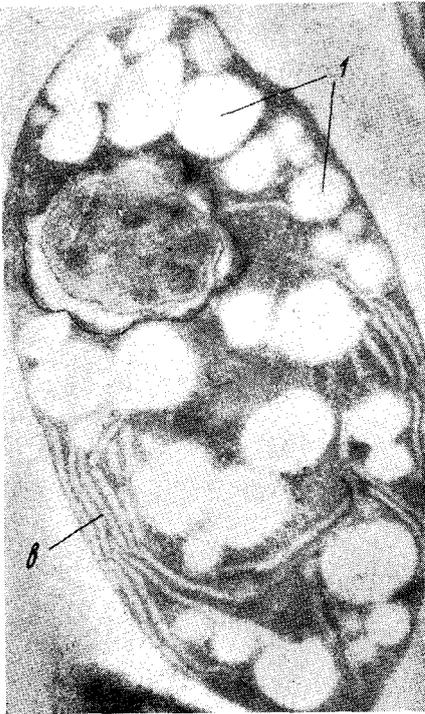


Рис. 1

Рис. 1. Спорующая клетка *Clostridium taeniosporum*. Видны светлые округлые тельца — включения гранулы (1) и выросты (2) на спорах в виде чередующихся светлых и темных полос, 42 000 ×

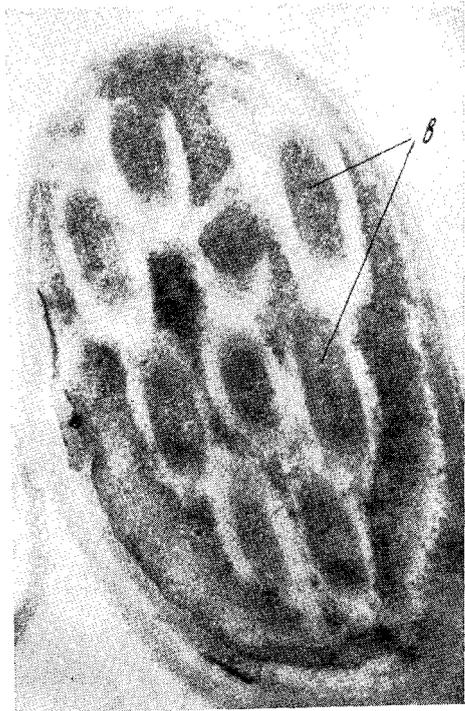


Рис. 2

Рис. 2. Поперечный срез спорующей клетки *Bacillus penicillus*, 3к. В цитоплазме заметны трубчатые выросты (2), 60 000 ×

расположенных параллельно друг другу (рис. 1). После реакции на полисахариды «окрашивается» центральная электроннооптически плотная часть выростов. В светлых промежутках цитоплазмы, разделяющих выросты, так же как и в электронопрозрачной капсуле выростов, отложений серебра не обнаруживается (рис. 3б). В основной осмиофильной цитоплазме гранулы серебра, как правило, встречаются редко. Споровые покровы, так же как и кортекс зрелых спор, не окрашивались метенамином серебра, в то же время в развивающемся кортексе на ранних стадиях спорообразования присутствовали отложения серебра.

У *Bac. penicillus*, 3к клеточная стенка выглядит тонкой (120—220 Å), трехслойной (рис. 3в). Только внутренний осмиофильный слой, приле-

гающий к цитоплазматической мембране, содержит электронноплотные гранулы после окраски срезов метенамином серебра. В цитоплазме отложения серебра отсутствуют. Никаких включений цитоплазма не содержит. На спорах штамма 3к формируются крупные трубчатые выросты. Последние на поперечных срезах имеют вид осмиофильных палочковидных или овальных телец, окруженных электроннопрозрачными зонами цитоплазмы (рис. 2). Трубки обычно заполнены веществом, сходным по структуре с цитоплазмой. Реакция на полисахариды у выростов четко положительная. В трубках выростов откладывается серебро в виде многочисленных темных гранул (рис. 3а). Реакции споровых покровов и кортекса с метенамином серебра у штамма 3к те же, что и у вышеописанного штамма 1к.

Применение электронномикроскопического метода выявления полисахаридов позволило показать, что светлые участки цитоплазмы на ультратонких срезах клостридий, ранее относимые к липидным гранулам<sup>(8)</sup>, представляют собой полисахаридсодержащее вещество. Это вещество у маслянокислых анаэробов известно под названием гранулезы. Отложения гранулезы видны в клетках *Cl. taeniosporum*, 1к и в световом микроскопе. Они дают положительную окраску при реакции ШИК и с раствором Люголя. При этом липидных гранул, метакроматина и других включений запасных питательных веществ у *Cl. taeniosporum*, 1к не обнаружено<sup>(2)</sup>.

Таким образом, данные световой микроскопии и обычных цитохимических методов полностью согласуются с результатами электронномикроскопического метода локализации полисахаридов.

У *Vac. penicillus*, 3к — представителя гнилостных анаэробов с бациллярным типом спорообразования не обнаружено включений гранулезы ни с помощью световой, ни с помощью электронной микроскопии. Отложения серебра удалось выявить тем не менее на выростах спор. Это позволяет сделать вывод о том, что в состав выростов входят полисахаридсодержащие вещества. Прямые химические анализы чистых фракций выростов спор *Cl. taeniosporum*, 1к показали, что в состав выростов входит 70—75% белков и около 10% полисахаридов (Красильников Дуда, Гончиков, не опубликовано). Данные электронной цитохимии и прямых химических анализов взаимно подтверждаются. Так как покровы спор<sup>(9)</sup> не «окрашиваются» метенамином серебра<sup>(10)</sup>, можно сделать вывод, что выросты на спорах отличаются по химическому составу от споровой оболочечки, что представляет несомненный интерес с точки зрения интерпретации функции и происхождения споровых придатков — выростов.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
28 IX 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Н. А. Красильников, В. И. Дуда, ДАН, 184, 959 (1969). <sup>2</sup> Н. А. Красильников, В. И. Дуда, Г. Е. Пивоваров, Микробиология, 37, 488 (1968). <sup>3</sup> Н. А. Красильников, Е. Д. Макарьева, В. И. Дуда, ДАН, 192, 205 (1970). <sup>4</sup> Э. Пирс, Гистохимия, 1968. <sup>5</sup> T. Churg, W. Mautner, E. Grisham, J. Biochem. Biophys. Cytol., 4, 841 (1958). <sup>6</sup> G. Gomori, J. Clin. Pathol., 16, 177 (1946). <sup>7</sup> C. Martino, Z. Zamboni, J. Ultrastruct. Res., 19, 273 (1967). <sup>8</sup> L. Rode, M. Grawford, M. Williams, J. Bacteriol., 93, 1160 (1966). <sup>9</sup> P. Walker, J. Appl. Bacteriol., 33, 1 (1970). <sup>10</sup> P. Walker, J. Short, J. Bacteriol., 98, 3, 1342 (1969). <sup>11</sup> P. Walker, J. Short, J. Gen. Microbiol., 52, 467 (1968).