Доклады Академии наук СССР
1974. Том 217, № 3

УДК 576.8.095.38:593.171.4.086.3

МИКРОБИОЛОГИЯ

Б. В. ГРОМОВ, Д. В. ОСИПОВ, К. А. МАМКАЕВА

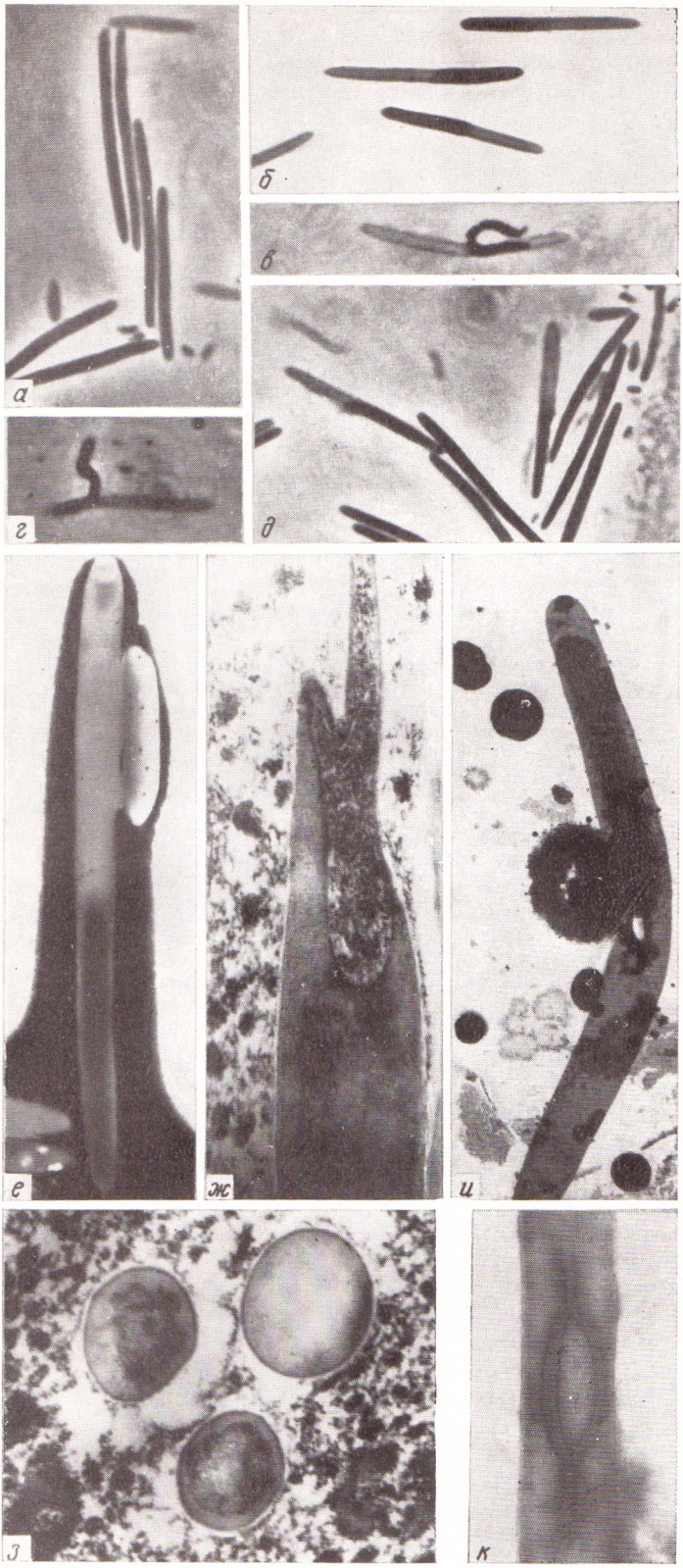
ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ НА ЭКСТРЕМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ pH УДЛИНЕННЫХ КЛЕТОК-«СПОР» СИМБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ МАКРОНУКЛЕУСА PARAMECIUM CAUDATUM

(Представлено академиком А. А. Имшенецким 15 IV 1974)

Недавно ([1], [2]) описаны новые бактерии — симбионты макронуклеуса инфузории Paramecium caudatum. Согласно принятой в протозоологической литературе традиции — обозначать симбионтов простейших буквами греческого алфавита ([3], [4]), эти бактерии были названы йота-частицами. Бактерии строго локализованы в макронуклеусе и не обнаруживаются в микронуклеусе или цитоплазме. Инфицированные парамеции в полной мере сохраняют способность к клеточным делениям. В макронуклеусе бактерии проходят закономерный цикл развития — вегетативная стадия представлена короткими палочками (длиной 2,0–2,5 мкм), делящимися за счет образования перетяжки. Часть таких клеток перестает делиться, они растут и превращаются в длинные (15–18 мкм) палочки, которые никогда не делятся (рис. 1*а*). После деления макронуклеуса большое число таких клеток остается в остаточном теле и тем самым выводится из ядра и, видимо, в дальнейшем из организма инфузории ([1]); они, очевидно, служат для распространения бактерии и заражения новых инфузорий, и, в этом смысле, могут рассматриваться как своеобразные «споры». Хотя эти образования далеко не тождественны эндоспорам бактерий, мы условно применяем к ним этот термин, имея в виду необходимость дальнейших исследований для уточнения их строения и функции.

Удлиненные клетки не обладают светопреломлением, характерным для термоустойчивых бактериальных спор и отличаются от последних отношением к принятым в бактериологии красителям. При наблюдении в фазовом контрасте содержимое таких клеток кажется плотным и гомогенным, но при окрасках основными красителями, например метиленовой синей, окрашивается только половина клетки, тогда как другая часть при наблюдении в светлом поле кажется оптически пустой (рис. 1*б*). Аналогичным образом выглядят окрашенные клетки и при их наблюдении в фазовом контрасте, т. е. содержимое части клетки при окраске сокращается или теряется. У негативно констрастированных бактерий при их наблюдении в электронном микроскопе также удается различить две

Рис. 1. Симбиотические бактерии макронуклеуса инфузории в световом микроскопе (2000×) (*а – д*) и в электронном микроскопе (*е – к*). *а* – удлиненные клетки-«споры» в фазовом контрасте, видна также вегетативная клетка; *б* – удлиненные клетки-«споры» после окраски метиленовой синей, светлое поле; *в – д* – удлиненные клетки-«споры» после воздействия HCl, фазовый контраст; *е* – бактерии негативно контрастированные фосфоровольфрамовой кислотой, слева удлиненная клетка-«спора», справа – вегетативная клетка,14 000×; *ж, з* – ультратонкие срезы удлиненных клеток-«спор»; *ж* – косой срез, 50 000×, *з* – поперечный срез, 42 000×; *и* – выход бактерии из оболочки «споры», окраска фосфоровольфрамовой кислотой, 18 000×; *к* – оболочка «споры» после выхода тела бактерии, окраска фосфоровольфрамовой кислотой, 40 000×



Зак. 679, т. 217, № 3, Б. В. Громов и др.

К статье З. А. Бутенко, стр. 703

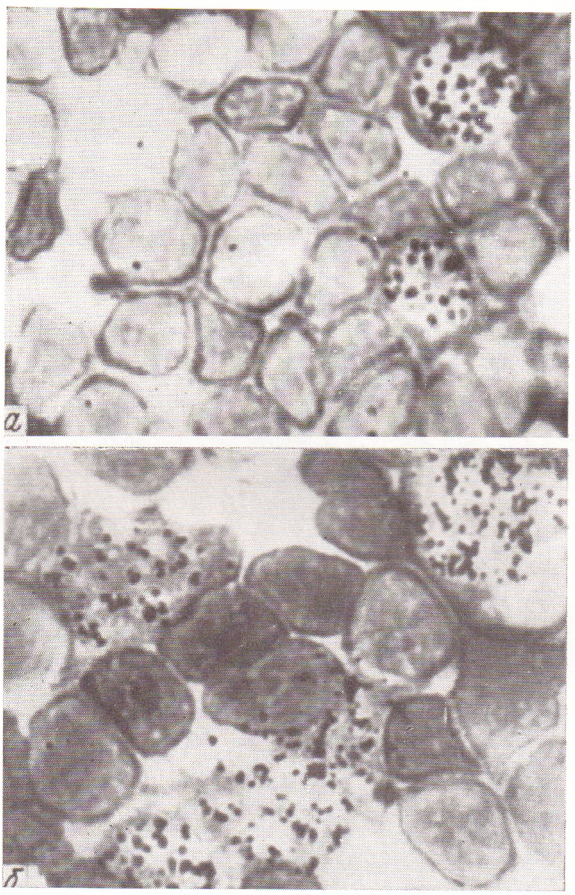


Рис. 1. Интенсивность включения H^3-тимидина в бластные клетки селезенки мышей на 2 сутки после заражения вирусом Раушера. 1200×, окраска по Романовскому. *а* — контроль, *б* — опыт

половины — более и менее плотную (рис. 1*е*). На продольных и поперечных срезах клеток, фиксированных глютаровым альдегидом с последующей фиксацией осмием также видна дифференцировка клетки на более светлую гомогенную и более плотную структурированную части (рис. 1*ж*, *з*). Кроме того, на срезах видно, что клеточная стенка таких спор не обладает сколько-нибудь сложной организацией, она сравнительно тонкая и одинаковая у обеих частей клетки.

Прорастания или какого-либо изменения «спор» (также как и вегетативных клеток) при их помещении в органические питательные среды, в том числе в гомогенаты почек и печени курицы, сыворотку крови, или при наблюдениях за симбионтами в ядрах раздавленных инфузорий в камере Пешкова, наблюдать не удалось. Следует отметить, что и другие бактерии — симбионты ядер простейших пока не были получены в чистых культурах.

Проникновение «спор» в организм нового хозяина происходит, по всей видимости, за счет заглатывания их животными. При этом они попадают в пищеварительные вакуоли, содержащие богатый набор гидролитических ферментов и имеющие различное значение pH на разных стадиях их функционирования ([5]). Исходя из этого, представляло интерес выяснить реакцию «спор» на изменения pH раствора. С этой целью с помощью раствора ([6]) выделяли интактные ядра инфузорий и из лизированных макронуклеусов получали суспензию симбионтов. Бактерии помещали в растворы HCl или NaOH разной концентрации. В растворах 0,05—0,25 *M* HCl наблюдается своеобразная реакция части «спор» — мгновенный выход из оболочки в окружающую среду тела, очевидно соответствующего окрашивающейся части споры. При этом тело бактерии целиком выходит из оболочки или частично остается с ней связанным, принимая характерную изогнутую форму (рис. 1*в*, *г*,). Число «спор», у которых наблюдается выход содержимого, в различных опытах колеблется в широких пределах — от нескольких до 70—80%. У некоторых «спор» при наблюдениях в фазовом контрасте в присутствии кислоты становится четко видимой дифференцировка на плотную и прозрачную части, но процесс выхода содержимого задерживается на начальной стадии (рис. 1*д*).

На электронно-микроскопических препаратах, окрашенных фосфоровольфрамовой кислотой, видно, что выход содержимого «споры» осуществляется через пору, имеющую правильную форму и расположенную приблизительно в средней части споры (рис. 1*к*). К сожалению, в процессе приготовления таких препаратов вышедшее из «споры» тело бактерии деформируется. После выхода бактерии остается пустая оболочка «споры». На фотографиях видно, что эта оболочка тонкая и одинаковая на всем протяжении «споры» (рис. 1*г*, *д*). Бактерия гомогенно окрашивается основными красителями, тогда как сброшенная оболочка не окрашивается. После пастеризации (5 мин. при 80°) или высушивания «споры» перестают реагировать на HCl, хотя в присутствии хлороформа выход наблюдается. HCl высокой концентрации (1 *M*) не вызывает выхода содержимого «споры». При воздействии на «споры» 0,05 *M* NaOH или NaOH более высокой концентрации содержимое «споры» выбрасывается из оболочки и тут же лизируется. Различные органические растворители, ЭДТУ, липаза и лизоцим не оказывают на «споры» заметного действия, в 25% SDS при нагревании происходит лизис содержимого «споры» и частичное разрушение оболочки. Вегетативные клетки симбионта никакой реакции на HCl или NaOH не обнаруживают.

Таким образом, способность определенным образом реагировать на падение pH является особенностью клеток заключительной стадии развития симбионта, с другой стороны, эта реакция несомненно зависит от физиологического состояния клетки и едва ли может рассматриваться как случайная. Выход бактерии из оболочки «споры» под влиянием низкого pH, по всей вероятности, можно рассматривать как один из первых эта-

пов в сложной цепи событий, приводящих к инфекции «чистого» ядра инфузории.

К сожалению, нам пока не удалось наблюдать какой-либо эволюции бактерий, вышедших из «спор» при помещении их в растворы HCl разной концентрации, подкисленные или не подкисленные гомогенаты тканей курицы или при наблюдениях препаратов раздавленных инфузорий. Кислотность среды, вероятно, является лишь одним из факторов, необходимых для начала развития симбионта. Здесь интересно отметить, что действие низкого pH сока пищеварительной вакуоли чувствительной инфузории на содержащие вирус каппа-частицы симбионта Paramecium aurelia — необходимый фактор для проявления киллер-эффекта ([7], [8]). Однако реакция на кислоту, подобная обнаруженной у йота-частиц, ни у каких других бактерий, насколько нам известно, не наблюдалась. Каков бы ни был механизм и биологическая роль этой реакции, очевидно, что йота-частицы проявляют ранее неизвестный тип клеточной дифференцировки бактерий.

Ленинградский государственный университет
им. А. А. Жданова

Поступило
15 IV 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] *D. P. Ossipov, I. S. Ivakhnjuck et al.*, Progress in Protozoology, IV Intern. Congr. Protozool., 1973, p. 307. [2] *D. V. Ossipov, I. I. Skoblo, M. S. Rautian*, Acta Protozool., in press. [3] *T. M. Sonnerborn*, Adv. Virus Res., v. 6, 229 (1959). [4] *G. N. Beale, A. Jurand, J. R. Preer*, J. Cell Sci., v. 5, 65 (1969). [5] *M. Müller, Digestion*, In: Chemical Zoology, N. Y.— London, 1967, p. 351. [6] *D. M. Prescott, M. V. Rao et al.*, Isolation of Single Nuclei and Mass Preparations of Nuclei from Several Cell Types. In: Methods in Cell Physiol., v. 2, N. Y., 1966, p. 131. [7] *J. R. Preer, A. Jurand*, Gen. Res., Camb., v. 12, 331 (1968). [8] *A. Jurand, B. M. Rudman, J. R. Preer*, J. Exp. Zool., v. 177, 3, 365 (1971).