

УДК 576.851.46.094.3

МИКРОБИОЛОГИЯ

В. П. ХОРИНКО, И. Ш. ВАЙСМАН

ВНУТРИЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ ВКЛЮЧЕНИЯ У *BORDETELLA PERTUSSIS*

(Представлено академиком С. С. Шварцем 18 XII 1975)

Изучению различных включений у грамположительных бактерий на уровне ультраструктур посвящено много работ. Грамотрицательные бактерии в этом плане исследованы редко, а в отношении коклюшных бактерий имеются только единичные сообщения. Описаны крупные осmioфильные слоистые включения волютина, расположенные в области нуклеоида *B. pertussis* и *B. parapertussis* ⁽¹⁾; авторы отметили вакуоли, ограниченные мембранами, соответствующие местам локализации волютина. Чаще обнаруживают вакуоли, ограниченные элементарной мембраной, на срезах коклюшных бактерий, выращенных в среде Борде — Жангу после 7 дней хранения при 4° ⁽²⁾. Имеются также внутрицитоплазматические мембранные структуры ^(2, 3). Методом негативного контрастирования выявлены ⁽³⁾ на поверхности бактериальных клеток «пузырьки», в которых, по мнению авторов, частично содержится выделяемый термолабильный летальный токсин. Этим подтверждаются на более высоком методическом уровне данные ⁽⁴⁾.

Представляется целесообразным обобщить имеющиеся в нашем распоряжении данные о разнообразных включениях, обнаруженных у нескольких штаммов коклюшных бактерий.

Объектом исследования являются штаммы *B. pertussis* №№ 267, 38, 245 и 305. Бактерии выращивали в матрицах и чашках Петри на плотных питательных средах: казеиново-угольном агаре и среде Борде — Жангу в течение 48 час. при 36°. В известных из литературы работах бактерии этого вида обычно фиксировали после смыва физиологическим раствором с поверхности агара при встряхивании с последующим центрифугированием. Между тем, только при обработке коклюшных бактерий физиологическим раствором из них уже вымывается часть токсинов: в литературе упоминают о так называемых «токсинах-смывах» ⁽⁵⁾. В связи с этим мы бактерий не смывали, а осторожно стеклянным шпателем снимали с небольшим участком поверхности агара и немедленно помещали в фиксирующий раствор без центрифугирования при последующей препаровке. Фиксацию проводили по методике «стандартных препаратов» ⁽¹⁴⁾, заливали в аралдит или смесь метакрилатов. Срезы, изготовленные алмазными ножами на Ultratome I LKB, контрастировали уранилацетатом или последовательно лимоннокислым свинцом и уранилацетатом. Бактерии штамма № 38 исследовали также после криофиксации замораживанием с разломом и травлением по методике ⁽⁸⁾. Просмотр и фотографирование препаратов проводили в микроскопе JEM-100В при инструментальных увеличениях 15 000—30 000 X.

Субмикроскопическая организация основных структурно-функциональных комплексов бактерий изученных штаммов типична для грамотрицательных бактерий.

В препаратах штаммов №№ 267, 38 и 305 в более или менее значительной части бактериальных клеток обнаружены включения, организация ко-

торых отлична от окружающих гранулярных РНП компонентов цитоплазмы (рис. 1А, Б). Эти включения представлены на срезах параллельными полосами осмиофильного электронноплотного вещества, расположенными с периодичностью 100 Å. Поперечник каждой полосы в среднем 60 Å, а просвет между ними 40 Å. При прохождении среза в иной плоскости период может достигать 140 Å, поперечник 90 Å, вероятно вследствие того, что полосам соответствуют структуры эллипсоидной конфигурации. В части случаев в описываемых включениях четкие параллельные полосы осмиофильного вещества пересекаются под углом, близким к прямому, вследствие чего образуется подобие сети с четырехугольными ячейками. И в этом случае полосы повторяются через период 100 Å. Форма этих кристаллоподобных включений на срезах четырехугольная: квадратная, прямоугольная, трапециевидная; реже их очертания неправильные округлые. Включения могут занимать до половины площади клетки, попавшей в срез. Иногда к ним примыкают внутрицитоплазматические мембранные структуры.

Морфологический анализ не позволил установить прямые доказательства наличия предшественников описанных кристаллоподобных включений. Однако, с точки зрения их формального генеза, следует отметить, что в клетках всех изученных штаммов закономерно обнаруживаются зоны цитоплазмы с аморфным, нежизнозрелым материалом равномерной электронной плотности, значительно меньшей, чем у гранулярных РНП-компонентов окружающей цитоплазмы. Их очертания округлые, размеры — разнообразные. Иногда они соприкасаются с ядерной вакуолью. При тщательном просмотре значительного числа клеток вокруг некоторых из таких участков удалось выявить четко выраженную трехслойную пограничную мембрану (рис. 1В).

Наряду с описанными включениями в цитоплазме закономерно обнаруживаются также вакуоли овальной формы. Они ограничены трехслойной мембраной тех же параметров, что и цитоплазматическая. Плотность содержимого вакуолей близка к фоновой.

В ядерной зоне бактериальных клеток всех изученных штаммов нередко видны структуры также вакуолярного типа, оптически пустые, округлой формы, ограниченные однослойной осмиофильной полосой толщиной 30 Å (рис. 1Г). В зоне ядра на срезах выявляются также кольцевидные образования диаметром от 300 до 1500 Å со стенкой высокой электронной плотности. Их центр нередко выглядит оптически пустым, иногда заполнен фибриллярным материалом. Мембранных структур, окаймляющих это образование, выявить не удастся. На сериях срезов, прошедших, по-видимому, ближе к периферии, такие структуры представляются сплошными, однородной плотности.

На нашем материале внутрицитоплазматические мембранные структуры обнаруживаются редко. Обычно они пластинчатого типа, нередко расположенные в виде стопки трехслойных мембран. В некоторых случаях удается выявить их анатомическую связь с цитоплазматической мембраной.

На репликах после замораживания — травления при прохождении плоскости скола через цитоплазму бактериальных клеток были выявлены кратероподобные выемки округлой формы. Комплементарно к последним имеются также сложные волокнистые структуры вытянутой формы, напоминающие перо птицы, которые выступают над уровнем плоскости скола, что, возможно, отчасти обусловлено упругими деформациями при разломе. Основание вытянутой перьевидной структуры расширено и имеет округлые очертания, соответствующие очертаниям кратероподобной выемки⁽⁹⁾.

Включения кристаллоидного типа, сходные с выявленными нами в клетках, описаны у ряда грамположительных бактерий, образующих споры: *Bacillus thuringiensis* ⁽¹⁵⁾, *Clostridium cochlearum* ⁽¹³⁾, *Cl. botulinum* тип В ⁽⁶⁾, *Bacillus subtilis* ⁽¹⁵⁾.

В отношении *B. thuringiensis*, например, установлена их белковая природа, причем они не содержат нуклеиновых кислот и токсичны для некоторых видов насекомых. В вегетативных и спорующих клетках организация выявленных включений соответствует кристаллической решетке. Следует подчеркнуть, что кристаллоподобные включения были нами выявлены в коклюшных бактериях, которые в процессе препаровки не подвергали действию физиологического раствора и центрифугированию. По-видимому, это обстоятельство способствовало их сохранению в условиях наших экспериментов, так как при изучении многочисленных препаратов суспензий коклюшных бактерий после смыва эти структуры не удавалось выявить и нам.

Выявленные в цитоплазме бордетелл вакуоли, ограниченные мембраной, содержащее которых по электронной плотности сравнимо с фоновой, по организации аналогичны гранулам поли- β -гидрооксибутирата. По нашему мнению, им соответствуют вытянутые «перьевидные» структуры, ранее выявленные нами ⁽⁹⁾ при замораживании — травлении. По морфологии они практически не отличаются от гранул поли- β -гидрооксибутирата, описанных при криофрактографическом исследовании *B. cereus* ⁽¹⁰⁾.

Включениям, расположенным на срезах в зоне нуклеоида, в трехмерном изображении, вероятно, соответствуют сфероидные образования. Как установлено, их высокая осmioфильность позволяет полагать, что они являются зернами волютина.

Результаты проведенного электронно-микроскопического исследования свидетельствуют о достаточном разнообразии включений различного типа в коклюшных бактериях при их препаровке щадящими методами. Морфологический анализ в сопоставлении с данными литературы дает основание для суждения о природе некоторых из них. В частности, можно считать весьма вероятной белковую природу кристаллоподобных включений. Вакуоли, ограниченные трехслойной мембраной, расположенные в цитоплазме, вероятно, относятся к липидам. Следует также подчеркнуть информативность исследования одноименных объектов методами «традиционной» электронной микроскопии после их химической фиксации в сопоставлении с препаратами, фиксированными физическими криогенными методами.

Пермский научно-исследовательский
институт вакцин и сывороток

Поступило
14 XI 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Авакян, Л. Н. Кац, И. Б. Павлова, Атлас анатомии бактерий, патогенных для человека и животных, М., «Медицина», 1972. ² И. Ш. Вайсман, Матер. VI Всесоюз. конф. по электронной микроскопии, Новосибирск, 1969. ³ О. С. Голубева, В. М. Кушнарев, Микробиол., № 10, 22 (1974). ⁴ О. С. Голубева, В. М. Кушнарев, Г. Г. Глазова, Микробиол., № 6, 101 (1974). ⁵ В. И. Иоффе, В кн.: Коклюш, Л., «Медицина», 1964. ⁶ И. Б. Павлова, Т. И. Булагова, Микробиол., № 7, 109 (1970). ⁷ Н. А. Перверзев, В. М. Должанский, Тез. докл. конф. по эпидемиологии и иммунологии коклюша, М., 1968. ⁸ Б. А. Фихте, Э. И. Заичкин, Е. Н. Ратнер, Новые методы физического препарирования биологических объектов для электронно-микроскопических исследований, М., «Наука», 1973. ⁹ В. П. Хоринко, И. Ш. Вайсман, Л. Г. Соколовский, В сб.: Криогенные методы в электронной микроскопии, Пушкино, 1974. ¹⁰ W. F. Dunlop, A. W. Robards, J. Bacteriol., v. 114, 3, 1271 (1973). ¹¹ A. G. Lane, Appl. Microbiol., v. 16, 9, 1400 (1968). ¹² J. R. Norris, H. M. Proctor, J. Bacteriol., v. 98, 2, 824 (1969). ¹³ L. Pope, D. P. Yolton, L. J. Rode, ibid., v. 96, 5, 1859 (1968). ¹⁴ A. Ryter, E. Kellenberger, Zs. Naturforsch., B. 13b, 597 (1958). ¹⁵ L. Y. Santo, R. H. Doi, J. Bacteriol., v. 116, 1, 479 (1973).

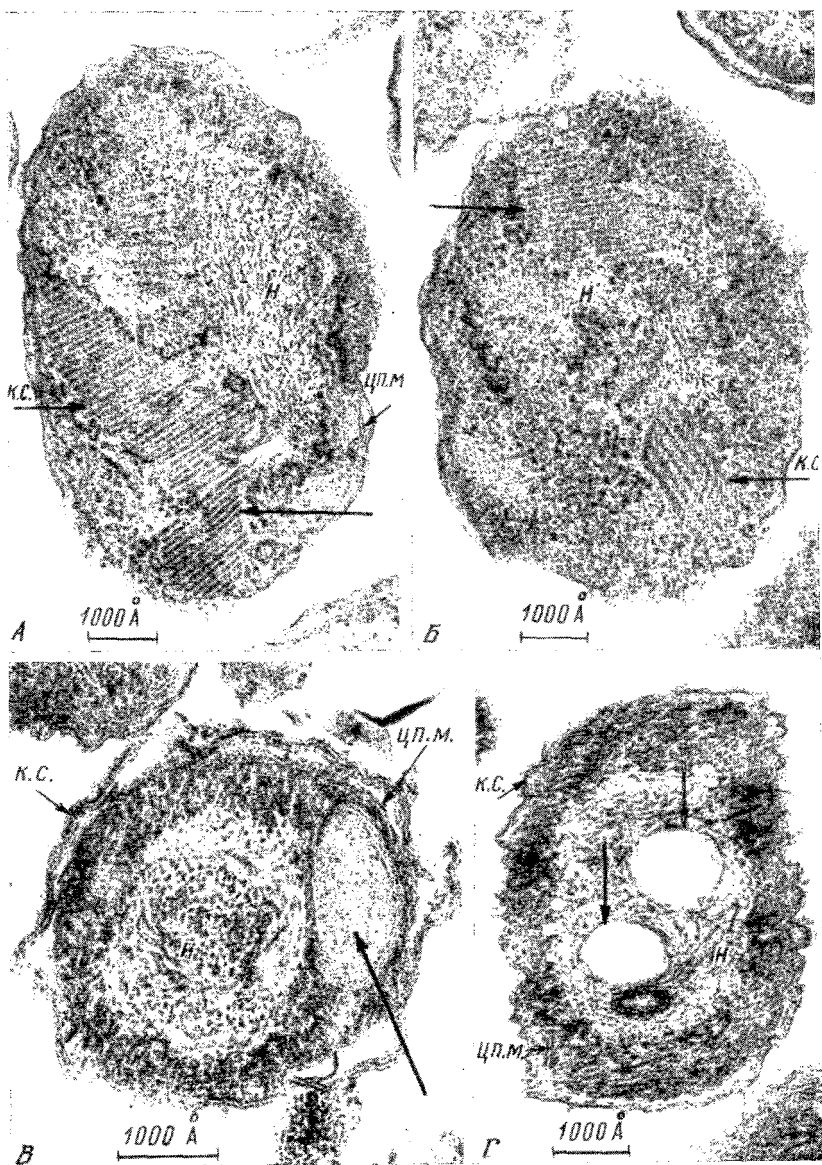


Рис. 1. Ультратонкие срезы кокловых бактерий: А, Б — включения с кристаллоидной организацией (стрелки), 100 000×; В — включение некристаллоидного вещества, ограниченное трехслойной мембраной (стрелка), 150 000×; Г — вакуоли в ядерной зоне, ограниченные мембраной (стрелки), 115 000×. к.с. — клеточная стенка, ц.п.м. — цитоплазматическая мембрана, н — нуклеотид