

К. А. ЛУСТА, Л. А. КРАСНОВА, К. А. КОЩЕЕНКО, Б. А. ФИХТЕ,
член-корреспондент АН СССР Г. К. СКРЯБИН

**УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК
BACILLUS MEGATERIUM, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ
В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ**

Изучение изменений ультраструктурной организации клеток, иммобилизованных в нерастворимых носителях, важно для понимания особенностей их функционирования в этом необычном состоянии. Имеющиеся в настоящее время данные по этому вопросу крайне малочисленны. Рядом авторов показано, что клетки *Escherichia coli*, *Tetrahymena pyriformis*, *Streptococcus faecalis*, *Mycobacterium globiforme* и *Tieghemella orchidis* после включения в гранулы остаются жизнеспособными (¹⁻³).

Целью настоящей работы было изучение изменений тонкой морфологии клеток и спор *Bacillus megaterium*, иммобилизованных в полиакриламидном геле, через различные сроки после включения и проведения непрерывной трансформации стероида. Выращивание культуры *Bac. megaterium* (штамм ВНИХФИ-1) и включение клеток в гель проводили в условиях и по методике, описанных нами ранее (^{3, 4}).

Для электронно-микроскопических исследований отмытые от среды клетки (исходный материал) фиксировали 3% глутаровым альдегидом на 0,1 *M* фосфатном буфере при pH 7,2 в течение 2 час. при комнатной температуре. Фиксирование клеток, заключенных в гелевые полиакриламидные гранулы, проводили 5% глутаровым альдегидом в течение 4 час. Затем клетки и гранулы тщательно промывали в буфере (не менее 3 раз) и подвергали вторичной фиксации в 1% растворе OsO₄ на фосфатном буфере. Фиксация свободных клеток продолжалась 1 час; фиксация гранул — не менее 3 час. Последующее обезвоживание в спиртах и заливку в эпоны проводили обычным образом. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме ЛКТБ-880-2А. Препараты просматривали в электронном микроскопе JAM-7А.

Параллельно с электронно-микроскопическими исследованиями изучали трансформирующую активность исходных и иммобилизованных клеток. С этой целью гранулы с иммобилизованными клетками помещали в термостатируемую колонку (1×30 см). В качестве субстрата для трансформации использовали кортизон или 16 α ,17 α -оксидпрогестерон (0,2 мг/мл—0,05 мг/мл буферного раствора). Для анализа продуктов трансформации использовали метод количественной тонкослойной хроматографии.

На рис. 1—4 показаны срезы иммобилизованных клеток и спор *Bac. megaterium* через различные сроки после заключения в полиакриламидный гель и при непрерывном пропускании через колонку с гранулами реакционной смеси. Период наблюдения продолжался 5 суток.

Как видно из рис. 1, уже через сутки заметно исчезновение внешнего слизистого слоя клеточной стенки. Цитоплазма клеток становится гомогенной и плотной. Мезосомы и цитоплазматическая мембрана на этой стадии трудно различимы. В дальнейшем клеточная стенка почти полностью исчезает и клеточная оболочка приобретает структуру, характерную для протопластов. Цитоплазма сильно структурируется; сплошные рибосо-

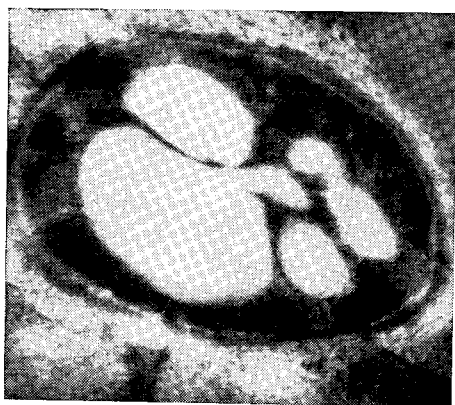


Рис. 1

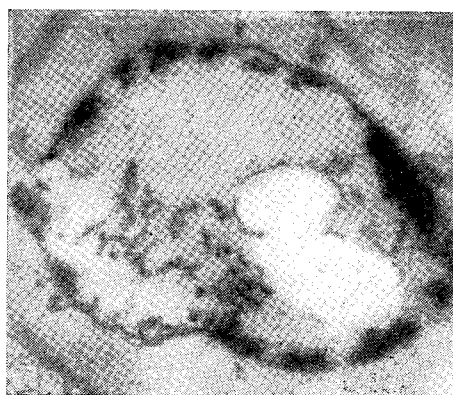


Рис. 2

Рис. 1. Ультратонкие срезы клетки *Bac. megaterium* после суточной иммобилизации в полиакриламидном геле (2500×)

Рис. 2. Срез иммобилизованной клетки *Bac. megaterium* через 5 суток работы в колонке (2500×)



Рис. 3

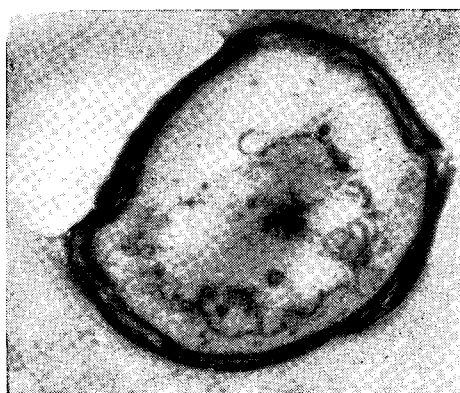


Рис. 4

Рис. 3. Срез споры *Bac. megaterium* после суточного хранения в полиакриламидном геле (2500×)

Рис. 4. Срез иммобилизованной споры *Bac. megaterium* через 5 суток хранения в геле (2500×)

мальные конгломераты чередуются с обширными электроннопустыми пространствами.

На 5 сутки явления деградации ультраструктур становятся еще более заметными и сопровождаются локальными разрушениями цитоплазматической мембраны (рис. 2).

Споры после включения в полиакриламидный гель также подвергаются значительной деструкции (рис. 3). К концу первых суток полностью лизируются остатки материнской клетки. В дальнейшем наблюдается заметное уплотнение протеинизированного слоя внешней оболочки спор и разрыхление и структурирование ее внутреннего мукопептидсодержащего кортекса. На 5 сутки последний подвергается практически полному лизису (рис. 4).

Описанные изменения наблюдаются у большинства иммобилизованных клеток и спор *Bac. megaterium*, хотя степень их повреждения может значительно варьировать. Наряду с этим, в отдельных случаях встречаются

ся единичные клетки с относительно хорошо сохранившейся морфологией. Такие находки всегда возможны и без детального просмотра препаратов и статистического анализа наблюдений могут стать причиной неправильных выводов.

Проведенные нами исследования однозначно указывают на то, что процессы деградации и деструкции как клеток, так и спор *Bac. megaterium* начинают проявляться вскоре после их включения в полиакриламидный гель и затем заметно прогрессирует, вплоть до полного лизиса и повреждения их поверхностных структур. Явления быстро прогрессирующего автолиза наблюдали также на иммобилизованных в полиакриламидном геле клетках *E. coli* (⁵). Наблюдения велись методом сканирующей электронной микроскопии.

С описанными ультраструктурными изменениями определенным образом коррелируют результаты, полученные при изучении процессов трансформации 16 α ,17 α -оксидопрогестерона иммобилизованными клетками *Bac. megaterium* на колонке. Как показал анализ продуктов трансформации, иммобилизованные клетки в отличие от свободных активно разрушают стероид. Это происходит, однако, на фоне резкого снижения 20 α -оксистероиддегидрогеназной активности (выход 20 α -оксипроизводного 16 α ,17 α -оксидопрогестерона составляет 20–25% при суммарном содержании стероидов 50–60% в течение 24–48-часовой работы колонок, активность культур еще больше снижается через 5 суток непрерывной ферментации на колонке).

Сопоставление этих данных позволяет предположить, что наблюдавшиеся изменения ферментативной активности иммобилизованных клеток *Bac. megaterium* отражают или являются прямым следствием описанных выше явлений деградации клеточной оболочки и ультраструктур клетки.

Известно, что клетки *Bac. megaterium* синтезируют различные литические ферменты. В течение роста бацилл происходит аутодеградация, которая является, вероятно, физиологическим процессом (⁶) и может быть ингибирована антибиотиками и другими факторами. При этом начинающийся лизис вызывает активизацию целого ряда литических ферментов (⁷). Очевидно, что анатомические изменения и особенности функционирования иммобилизованных клеток этого микроорганизма во многом определяются характером протекающих в них аутолитических процессов.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пущино Московской обл.

Поступило
20 X 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. J. Updike, D. R. Harris, E. Schrago, Nature, v. 224, 1122 (1969). ² N. E. Franks, Biotechn. Bioeng. Symp., v. 3, 327 (1972). ³ Г. К. Скрябин, К. А. Коцесенко и др., Изв. АН СССР, сер. биол., № 6, 856 (1974). ⁴ Л. А. Краснова, Микробиол. пром., № 7, 29 (1972). ⁵ I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, Appl. Microbiol., v. 27, № 5, 878 (1974). ⁶ I. Chaloupka, Folia Fac. Med. Univ. Comen., Suppl. VIII, 1970, p. 325. ⁷ I. Chaloupka, P. Kreckova, Folia Microbiol., v. 19, 4, 292 (1974).