АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР

ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ
ИМЕНИ ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н. Ф. ГАМАЛЕИ

ГЛАЗАЧЕВА
Любовь Евгеньевна

На правах рукописи

СУБМИКРОСКОПИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА PROTEUS VULGARIS В ПРОЦЕССЕ Л-ТРАНСФОРМАЦИИ И РЕВЕРСИИ

(03.00.07 — Микробиология)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА — 1977

Работа выполнена в ордена Трудового Красного Знамени Институте эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н. Ф. Гамалеи АМН СССР и в Отделе селекции и генетики микроорганизмов Института экологии растений и животных Уральского научного центра АН СССР.

Научный руководитель:
доктор биологических наук Л. Н. Кац

Консультант:
доктор медицинских наук, профессор Р. А. Пшеничнов

Официальные оппоненты:
доктор медицинских наук, профессор Г. Я. Каган
кандидат биологических наук В. И. Бирюзова

Ведущее предприятие — Центральный ордена Ленина Институт усовершенствования врачей МЗ СССР.

Защита диссертации состоится « 3 » марта 1978 г. в 14 00 часов на заседании Специализированного совета № К0010701 по присуждению ученой степени кандидата наук в Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР. 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР.

Автореферат разослан « 1 » февраля 1978 г.

Ученый секретарь Специализированного совета, доктор медицинских наук
Е. И. Коптелова.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Возрастающий интерес к проблеме Л-форм вполне оправдан их существенной ролью в патогенезе многих инфекционных заболеваний, а также в переживании возбудителя в условиях антибиотикотерапии (Прозоровский и др., 1965, 1967; Левашев, 1966; Cuze, 1968; Hayflick, 1969; Тимаков, Каган, 1973; Коптелова, 1974 и др.). И хотя протей является условно патогенным микробом, закономерности Л-трансформации, выявленные при его изучении, по-видимому, могут быть распространены на другие грамотрицательные бактерии, в частности, на род провиденции, близко родственный протею и обладающий множественной устойчивостью к антибиотикам (von Graevenitz, 1973).

Интерес к этой проблеме не исчерпывается областью медицинской микробиологии. Л-формы представляют собой удобный объект для изучения структуры и функции мембранного аппарата и клеточной стенки бактерий. Исследованиями, проведенными в лаборатории A. Ryter в Париже, U. Taubeneck в Иене и проф. А. А. Авакяна в Москве показано, что в основе процесса Л-трансформации лежат структурные изменения бактериальной клетки, из которых наиболе существенны постепенная деградация клеточной стенки и «выброс» мезосом в окружающую среду. Можно думать, что в процессе реверсии Л-форм в бактерии происходит обратный процесс, т. е. постепенное восстановление поверхностных и мембранных структур, свойственных исходным бактериям. Однако, субмикроскопическая картина этих изменений практически не описана в литературе, особенно для грамотрицательных бактерий. Еще менее изучены в этом плане протопласты и сферопласты, которые могут служить промежуточным звеном в процессе превращения бактерий в Л-формы.

Таким образом, изучение субмикроскопической организации Л-форм, протопластов и сферопластов представляет интерес как для медицинской и общей микробиологии, так и для цитологии.

Цель и задачи исследования. Основной задачей данной работы было изучение последовательных этапов Л-трансформации и реверсии на модели Proteus vulgaris. В плане этой ос-

новной задачи мы поставили перед собой ряд конкретных задач:

1) выяснить, существуют ли кардинальные различия между сферопластами и протопластами с одной стороны, и Л-формами с другой, или имеет место постепенный переход сферопластов в Л-формы;

2) установить, происходит ли «выброс» мембранных структур при образовании сферопластов у грамотрицательных бактерий по типу грамположительных бактерий и на каком этапе Л-трансформации у Л-форм формируется собственная система внутренних мембран;

3) выяснить, каким путем происходит переход от нестабильной культуры Л-форм, в которой преобладают клетки типа сферопластов к стабильной культуре, для которой характерны клетки протопластного типа;

4) изучить способы деления клетки на разных этапах Л-трансформации;

5) установить расположение различных Л-элементов в колонии, сведя к минимуму их перераспределение в процессе приготовления препаратов.

Научная новизна работы. Изучение последовательных этапов Л-трансформации и реверсии ранее проводилось, главным образом, на уровне светового микроскопа. Электронномикроскопические исследования касались лишь основных этапов Л-трансформации и потому не смогли создать полного представления о морфологической картине этого процесса в целом.

Учитывая эти обстоятельства, мы провели электронномикроскопические исследования последовательных этапов превращения бактерий в сферопласты и протопласты, а затем в Л-формы по пассажам. Были также изучены последовательные стадии реверсии. Исследование проводили методом ультратонких срезов на фиксированном материале и методом криофрактографии (замораживания-травления) без предварительной фиксации. Указанный метод был использован, чтобы исключить известное из литературы действие фиксаторов на мезосомы. Для определения соотношения отдельных Л-элементов в колонии был применен метод сканирующей электронной микроскопии. Чтобы избежать возможного перераспределения Л-элементов при приготовлении препаратов Л-формы выращивали на миллипоровых фильтрах.

Параллельное использование трех указанных методов позволило, во-первых, получить новые данные о последовательных стадиях формирования сферопластов, нестабильных и стабильных Л-форм и ревертантов, во-вторых, изучить их субмикроскопическую структуру и способы репродукции и, в-третьих, выявить закономерности распределения Л-элементов в колонии на разных этапах Л-трансформации.

Практическая и научная ценность. Полученные нами данные позволяют воссоздать морфологическую картину Л-трансформации у Proteus vulgaris. Обнаруженные при этом закономерности, очевидно, могут быть распространены на Л-формы других грамотрицательных бактерий.

Так, было показано, что между сферопластами и протопластами с одной стороны, и Л-формами с другой, отсутствуют существенные различия, а имеется постепенный переход сферопластов в Л-формы. Сферопласты следует рассматривать как начальный этап Л-трансформации благодаря их способности к делению и почкованию, причем способы их репродукции в бо́льшей степени характерны для Л-форм, чем для исходных бактерий. Другим доводом в пользу этой точки зрения является обнаружение на стадии сферопластов таких характерных элементов Л-колоний как «большие тела», «элементарные тельца» и «нитевидные структуры».

Изучен механизм превращения сферопластов в нестабильные, а затем в стабильные Л-формы. В последовательных пассажах нестабильных Л-форм обнаружено уменьшение числа лизированных клеток и возрастание количества клеток протопластного типа по отношению к клеткам сферопластного типа. Установлено, что клетки протопластного типа возникают в результате особого способа деления клетки, ранее не описанного для Л-форм.

На всех этапах Л-трансформации, кроме стадии сферопластов, в клетках Л-форм обнаружены миелиноподобные структуры и более развитая система внутренних мембран, чем у исходных бактерий. Показано, что у Л-форм все мембранные структуры образуются путем инвагинации цитоплазматической мембраны, т. е. имеют общее с ней происхождение. Установлено, что большинство внутренних мембран у Л-форм в отличие от мембран бактерий с полноценной клеточной стенкой не имеют глобул размером 10 нм в гидрофобном слое. Следовательно, Л-формы обладают более развитой системой внутренних мембран, чем исходные бактерии. Возможно, именно эта особенность Л-форм обеспечивает им широкую приспособляемость к условиям существования в отсутствиии клеточной стенки.

На основании проведенных исследований, мы считаем весьма перспективным проведение комплексных исследований методом ультратонких срезов, криофрактографии и сканирующей электронной микроскопии. Сочетание этих методов позволяет получить наиболее полную информацию одновременно о форме, поверхности и внутренней структуре бактериальной клетки, а также о взаимном расположении бактериальных особей в колонии.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались:

1. На Всесоюзной X конференции по электронной микроскопии (Ташкент, 1976).

2. В Институте микробиологии и эпидемиологии имени Н. Ф. Гамалеи АМН СССР (Москва, 1977).

3. В Отделе селекции и генетики микроорганизмов Института экологии растений и животных Уральского научного центра АН СССР (Пермь, 1977).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 работ.

Объем работы. Диссертация изложена на 157 страницах машинописного текста, включает 46 вклеек с 116 микрофотографиями, 9 схем и 162 литературные ссылки, из которых 51 на русском и 111 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения сферопластов, Л-форм и ревертантов использовали культуру Proteus vulgaris штамм № 3156, любезно предоставленную нам профессором В. С. Левашевым. Кроме того изучали стабильные Л-формы Proteus vulgaris штамм № 4636, полученные В. С. Левашевым (1956 г.) и в течение многих лет культивируемые в лаборатории Л-форм и микоплазм ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи (зав. лаб. проф. Г. Я. Каган).

Сферопласты получали из культуры протея в логарифмической фазе роста на триптическом переваре сердечной мышцы крупного рогатого скота с добавлением осмотических стабилизаторов: 10% сахарозы и 0,02% сернокислого магния. Концентрация микробных тел составляла 10^8 в мл. К среде добавляли пенициллин (1000 ед/мл).

Нестабильные Л-формы получали на той же среде с добавлением 1,3% агара, 10% нормальной лошадиной сыворотки и пенициллина. Первые 14 пассажей Л-форм, полученных из сферопластов, давали спонтанную или относительно быструю реверсию на среде без пенициллина. Мы рассматриваем их как нестабильные Л-формы и условно распределяем на три группы, различающиеся по морфологии и быстроте реверсии: ранний (1—3 пассажи), средний (4—11 пассажи) и поздний (12—14 пассажи) этапы Л-трансформации. Л-формы более поздних пассажей мы рассматривали как стабильные Л-формы, т. е. не реверсирующие в процессе длительных пассажей на среде без пенициллина.

Ревертанты получали при пересеве нестабильных Л-форм на среду, применяемую для культивирования Л-форм, но без пенициллина. Исследовали ревертанты 1, 2 и 3 пассажей.

Для того, чтобы проверить выявленные нами закономерности на грамположительных бактериях была взята культура Bac. subtilis штамм № 168, из которой получали протопласты и Л-формы.

Для получения протопластов, культуру Bac. subtilis в логарифмической фазе отмывали от среды, ресуспендировали до концентрации 10^8 микробных тел в мл в 0,05 М фосфатном буфере pH 6,5, содержащем 0,05 М сахарозы и 0,01 М $MgCl_2$ и инкубировали 1—4 часа с лизоцимом (200 мкг/мл) или пенициллином (200 ед/мл). Л-формы выделяли и культивировали на синтетических средах, разработанных Landman (1968) в модификации Wyrick, Rogers (1973).

Для изучения исходных культур и ревертантов методом ультратонких срезов использовали 10 мин. фиксацию 0,1% глютаральдегидом, а затем 1% четырехокисью осмия. Протопласты, сферопласты и Л-формы фиксировали по методу Ghosh, Murray (1967). Обезвоживание и заключение в аралдит проводили по стандартной методике (Luft, 1961). Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-Produkter. Срезы дополнительно контрастировали уранилацетатом и лимоннокислым свинцом по методу Venable, Cogeshall (1965).

Для получения сколов использовали метод замораживания-травления, основанный на принципе сверхбыстрого замораживания и механического скалывания без предварительной химической фиксации объекта (Фихте, Заичкин, 1971). Сколы получены в лаборатории авторов этого метода при их участии в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР в Пущино. Микроскопирование реплик со сколов и ультратонких срезов проводили на микроскопе JEM-7 и JEM-100B при ускоряющем напряжении 80 кв и инструментальном увеличении 15 000× и 30 000×.

Для исследования в сканирующем электронном микроскопе объекты культивировали на миллипоровых фильтрах с диаметром пор 0,45 мкм, помещенных на полутвердый агар. Фиксацию и обезвоживание проводили указанными выше методами прямо на фильтрах. Затем образцы высушивали на воздухе при комнатной температуре, напыляли углеродом и алюминием круговым напылением на вращающемся столике. Фотографирование образцов проводили на японском сканирующем микроскопе JEM-50A при ускоряющем напряжении 10—15 кв и инструментальном увеличении от 200 до 30 000× на широкоформатную пленку чувствительностью 65 ед.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Ультраструктура исходной культуры

Наблюдения в сканирующем электронном микроскопе показали, что колонии Proteus vulgaris, выросшие на миллипоровых фильтрах, расположены группами по 2—3 и нередко сливаются друг с другом. Первоначальные колонии имеют вы-

росты, выступающие в окружающую среду, из которых затем развиваются молодые колонии. Образование выростов, по-видимому, объясняет явление «ползучего роста» характерное для протея (Bergey, 1974). Колонии состоят из палочковидных клеток с закругленными концами, соединенных между собой тонкими тяжами. Поверхность клеток шероховатая.

На ультратонких срезах ультраструктура клеток протея такая же, как и у большинства других гетеротрофных грамотрицательных бактерий (Павлова, 1966; Avakyan et al., 1967). Клеточная стенка имеет трехслойный извилистый асимметричный профиль. Цитоплазматическая мембрана представлена трехслойной симметричной структурой. Мембранные структуры обычно не выявляются. Деление клетки — равновеликое бинарное с помощью перетяжки.

При изучении ультраструктуры клеток методом замораживания-травления скол происходит чаще всего по внутреннему гидрофобному слою цитоплазматической мембраны. Выпуклая поверхность цитоплазматической мембраны (PFcm) * обычно содержит часто расположенные глобулы, а вогнутая поверхность (EFcm) практически лишена их. Внутрицитоплазматические мембраны в наших препаратах не выявлялись.

2. Ультраструктура сферопластов

Изучение сферопластов в сканирующем микроскопе показало, что через 15—20 мин. после добавления пенициллина к исходной культуре на конце или посередине клетки возникает вздутие, в которое постепенно переходит вся цитоплазма. Поверхность вздутия обычно складчатая. Через 1,5—2 часа сферопласты образуются у большинства клеток. В культуре выявляются сферопласты двух типов: одни (диаметром около 1,0 мкм) имеют на своей поверхности вмятины, располагающиеся со всех сторон; другие (диаметром около 2,5 мкм) обладают морщинистой поверхностью, лишенной вмятин, но имеющей почкообразные выросты. Через 24 часа после добавления пенициллина сферопласты располагаются небольшими группами, а иногда образуют выпуклые колонии неправильной формы. Отдельные сферопласты соединены друг с другом тяжами.

В культуре сферопластов можно также наблюдать «нитевидные структуры» и «большие тела» размером до 20 мкм, имеющие неправильную форму. Поверхность последних гладкая или складчатая. «Большие тела» мы наблюдали также в 24-часовой культуре протопластов Bac. subtilis. По описаниям, имеющимся в литературе, эти структуры соответствуют

* Обозначения поверхностей скола мембран приведены соответственно терминологии, принятой на одном из последних симпозиумов (Branton et al., 1975).

т. н. «large bodies», характерным для многих Л-культур (Тимаков, Каган, 1973; Гулевская и др., 1976, 1977).

Следовательно, в бактериальной культуре на стадии сферопластов и протопластов уже присутствуют элементы, характерные для Л-форм.

При изучении ультраструктуры сферопластов методом ультратонких срезов мы также наблюдали два основных способа образования сферопластов, т. е. в виде шаровидного утолщения в центре или на конце клетки. Наружная мембрана местами отходит от цитоплазматической мембраны, а в периплазматическом пространстве возникают огромные вакуоли. Благодаря им сферопласты обычно имеют неправильную форму, что подтверждает данные сканирующей микроскопии.

При исследовании сферопластов методом замораживания-травления, как и следовало ожидать по данным литературы (De Voe et al., 1971; Forge et al., 1973 и др.), разлом происходит по гидрофобному слою наружной или цитоплазматической мембраны. У наружной мембраны выявляются две поверхности скола: выпуклая, граничащая с цитоплазмой PFcw и вогнутая, граничащая с окружающей средой EFcw. Выпуклая поверхность скола наружной мембраны в основном гладкая, хотя содержит редко расположенные палочковидные вмятины. При длительном травлении выявляется гладкая структура истинной наружной поверхности клеточной стенки PScw. Цитоплазматическая мембрана при разломе также образует две поверхности скола: выпуклую PFcm с часто расположенными глобулами размером 10 нм и вогнутую EFcm с редко расположенными глобулами. Внутренние мембраны на сколах не выявлялись.

Рассмотрим отличительные черты, определяющие сходство и различия протопластов и сферопластов с одной стороны, и Л-форм с другой.

По данным литературы, при образовании протопластов и Л-форм происходит «выброс» мембранных структур в виде «нитей жемчуга» (Ryter, Landman, 1968) и потому сформировавшиеся протопласты лишены внутренних мембран. Для сферопластов подобное явление не было описано. Наши исследования показали, что при образовании сферопластов происходит «выброс» многослойных кольцевидных мембран (мкм) и отдельных везикул (в) в цитоплазматическое пространство или окружающую среду. Мы наблюдали также классическую картину «выброса» мембранных элементов в виде «нитей жемчуга», описанную для грамположительных бактерий (рис. 1).

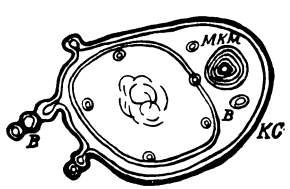


Рис. 1.

Несмотря на внешнее сходство указанной морфологической картины у протея и бацилл, в ней имеются существенные различия. Так, у протопластов бацилл цепочки везикул образованы исключительно липопротеидной мембраной. У протея, как, по-видимому, и у других грамотрицательных бактерий, в их образовании принимает участие наружная мембрана клеточной стенки (кс) и, в меньшей степени, истинная липопротеидная мембрана.

Таким образом, при образовании сферопластов и протопластов происходит частичная или полная потеря мезосом, а также внутренних мембран, не организованных в виде специальных органоидов.

Большинство исследователей считают, что одним из признаков, отличающих протопласты и сферопласты от Л-форм, является их неспособность размножаться (Weibull, 1968; Hijmans et al., 1969). Однако, существует и противоположное мнение, что на полужидком агаре протопласты размножаются (Birdsell, Cota-Robles, 1967; Taubeneck, Gumpert, 1967; Ryter, Landman, 1968).

Мы изучили этот процесс на примере сферопластов Proteus vulgaris и протопластов Bac. subtilis. Проведенные исследования позволили нам считать процесс деления сферопластов и протопластов не случайным, а закономерным явлением. У сферопластов протея, благодаря нарушению ригидного слоя клеточной стенки, расширяется периплазматическое пространство. Деление клетки происходит внутри пространства, ограниченного наружной мембраной (рис. 2 а, б, в).

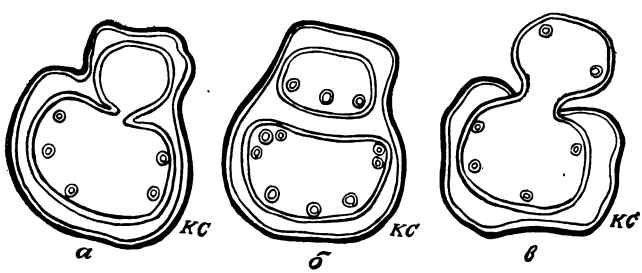


Рис. 2.

Клеточная стенка, в отличие от исходных бактерий, не принимает участия в процессе деления, чем, по-видимому, можно объяснить часто встречающееся неравновеликое деление сферопластов. Иногда одна из дочерних клеток освобождается от наружной мембраны и становится протопластом (рис. 2в). Другая клетка, ограниченная наружной мембраной, продолжает оставаться сферопластом. Описанная нами картина деления у сферопластов показывает, что способ их деления от-

личен от бактерий, имеющих полноценную клеточную стенку и, скорее, напоминает Л-формы.

Помимо описанного способа деления клетки у сферопластов мы наблюдали формирование элементарных телец, путем почкования. Почки имеют разные размеры и окружены наружной и цитоплазматической мембраной. Почкование характерно для Л-форм и не встречается у исходных бактерий.

Приведенные материалы по ультраструктуре сферопластов протея позволяют считать, что принципиальных различий между ними и Л-формами нет. Пожалуй, единственным существенным отличием сферопластов и протопластов от Л-форм является отсутствие у них столь интенсивно развитой системы внутренних мембран как и у Л-форм. Поэтому весьма правомочно рассматривать процесс образования протопластов и сферопластов у бактерий как начальный этап Л-трансформации.

3. Ультраструктура нестабильных Л-форм

Методом сканирующей электронной микроскопии были изучены нестабильные Л-формы 4—6 пассажей (см. выше). Большинство молодых колоний имели овальную форму, и, так же как в исходной культуре, образовывали дочерние колонии, сохраняющие связь с родительской колонией. В колониях преобладают шаровидные клетки размером от 0,5 до 3 мкм. Поверхность клеток ровная, иногда с небольшими углублениями. Закономерных вмятин, характерных для сферопластов, у шаровидных клеток мы не наблюдали. Взаимное расположение сферических клеток в Л-колонии представлено на рис. 3.

Рис. 3.

Клетки расположены цепочкой или группами, соединяясь между собой тяжами (т) шириной от 0,5 до 1,4 мкм, которые часто переходят в «аморфную массу» (ам). Шаровидные клетки располагаются обычно на поверхности массы, но иногда частично или полностью погружены в нее. Аналогичную

картину мы наблюдали у Л-форм Bac. subtilis. Глубинная часть Л-колонии протея состоит из «аморфной массы», по внешнему виду напоминающей пену. В Л-колониях находятся также т. н. «нитевидные структуры» шириной до 3 мкм и «большие тела» (бт) размером до 10 мкм, располагающиеся как в центре, так и на периферии колонии. На поверхности указанных структур в виде почек часто прикреплены шаровидные клетки.

Изучение раннего, среднего и позднего этапов формирования и стабилизации Л-форм проводили методом ультратонких срезов.

На раннем этапе образования нестабильных Л-форм популяция состоит в основном из клеток сферопластного типа. В окружающей среде находится большое количество рибосом, трубчатых и везикулярных мембранных структур, т. е. элементов, представляющих собой клеточный детрит. В некоторых клетках обнаружены внутрицитоплазматические мембраны и миелиноподобные структуры.

Из литературы известно, что для нестабильных Л-форм грамотрицательных бактерий характерны клетки, ограниченные двумя мембранами (т. н. клетки типа сферопластов), а для стабильных — одной мембраной (т. н. клетки типа протопластов) Taubeneck, Gumpert, 1967). Наши исследования показали, что эта закономерность не является абсолютной. Так, на среднем этапе культура нестабильных Л-форм состоит в равной степени из клеток сферопластного и протопластного типа. Клетки протопластного типа появляются уже на стадии сферопластов, но количество их увеличивается от пассажа к пасажу. Мы обнаружили два возможных механизма возникновения клеток типа протопластов из клеток сферопластного типа: путем особого способа деления клетки, когда одна из дочерних клеток становится протопластом, или путем разрыва и «слущивания» наружной мембраны.

Наличие двух типов клеток в нестабильной Л-культуре обусловливает различия в механизме их деления и образования «элементарных телец». Клетки протопластного типа делятся бинарно, а «элементарные тельца», образуемые ими, ограничены с поверхности только цитоплазматической мембраной. Клетки сферопластного типа делятся также бинарно, но внутри наружной мембраны. Дочерние клетки некоторое время окружены общей мембраной и лишь позднее освобождаются от нее. «Элементарные тельца», образуемые в виде почек клетками типа сферопластов, ограничены с поверхности двумя мембранами: цитоплазматической и наружной мембраной.

На среднем этапе у нестабильных Л-форм меняется также внешний вид «аморфной массы», состоящей из полирибосом, мембран и фибрилл ДНК. Полирибосомы часто образуют комплексы неопределенной формы, которые могут быть огра-

ничены мембранами и имеют вид самостоятельных структур. Клетки соединены между собой тяжами разной длины и ширины (от 0,5 до 1,4 мкм). Внутренняя зона тяжа заполнена округлыми структурами разных размеров, ограниченными трехслойной мембраной, а также фрагментами прямых и петлеобразных мембран. Внутри тяжей находятся клетки, от которых часто отходят тонкие «нити», ограниченные трехслойной мембраной. Внутри они заполнены цитоплазмой, а по центру тянутся фибриллы ДНК. Поперечный размер их колеблется от 0,2 до 0,6 мкм. На некоторых участках «нити» расширяются, образуя новые клетки. Возможно, это еще один из способов размножения Л-форм. Аналогичную картину описал Левашев В. С. (1957) у тех же штаммов Л-форм протея с фазовым контрастом.

Ультраструктура Л-форм позднего этапа (12—14 пассажа) не отличается от ультраструктуры стабильных Л-форм, которая будет описана ниже.

При исследовании нестабильных Л-форм (4—6 пассажи) методом замораживания-травления выявляются клетки сферической или неправильной формы, отдельно лежащие мембраны, «элементарные тельца», скопления рибосом и частично или полностью лизированные клетки. Все эти элементы составляют в препарате сплошную сеть. У клеток сферопластного типа на поверхности выявляются две мембраны, а у клеток протопластного типа — одна мембрана. На строго поперечном сколе у обеих мембран местами можно наблюдать трехслойный профиль.

На продольном сколе можно с уверенностью идентифицировать миелиноподобные структуры, для которых характерны заведомо гладкая поверхность мембраны, не содержащая глобул размером 10 нм и ступенчатое скалывание мембранных слоев (Заичкин, 1972). Сложнее обстоит дело с идентификацией «элементарных телец» и мембранных структур. И те и другие имеют чаще всего шаровидную форму, примерно одинаковые размеры и могут располагаться как в цитоплазме, так и вне клеток. Лишь некоторые из них содержат часто расположенные глобулы на вогнутой поверхности скола, подобно мезосомальным мембранам бактерий (Харатьян и др., 1975). Однако большинство шаровидных структур лишены глобул.

С большей уверенностью можно идентифицировать мембранные структуры на поперечных сколах, где они имеют форму завитка.

4. Ультраструктура стабильных Л-форм

При наблюдении в сканирующем электронном микроскопе колонии стабильных Л-форм состоят из типичных Л-элементов, описанных выше у нестабильных Л-форм: сферических

клеток размером до 3 мкм, «больших тел» размером до 10 мкм, «нитевидных структур» шириной около 3 мкм и «аморфной массы», в которую погружены другие Л-элементы. Интересно, что крупные клетки (4 мкм и более) стабильных Л-форм протея имеют на поверхности отверстия, описанные ранее у стабильных Л-форм стрептококка (Гулевская и др., 1976). Через подобные отверстия авторы наблюдали «элементарные тельца», находящиеся внутри клетки.

При исследовании методом ультратонких срезов между нестабильными и стабильными Л-формами обнаружены существенные различия.

Во-первых, популяция стабильных Л-форм состоит из клеток только протопластного типа, т. е. поверхность их ограничена одной цитоплазматической мембраной. Во-вторых, миелиноподобные и другие мембранные структуры имеются в большинстве клеток стабильных Л-форм. В-третьих, хотя стабильным Л-формам протея свойственны два способа размножения, т. е. бинарное неравновеликое деление и образование «элементарных телец» последний является основным способом их репродукции. «Элементарные тельца» могут образовываться на поверхности клеток и «нитевидных структур» в виде почек, непосредственно в цитоплазме или в вакуолях.

Большинство исследователей считают, что жизнеспособны тельца размером не менее 0,6—0,7 мкм (Dienes, Bullivant, 1968, Wyrick, Gooder, 1971 и др.). Наши исследования показали, что «элементарные тельца» размером 0,2—0,3 мкм имеют ограничивающую мембрану, ядерный материал, рибосомы и способны делиться. Последние наблюдали методом ультратонких срезов и криофрактографии. Полученные факты, таким образом, свидетельствуют о жизнеспособности «элементарных телец» размером менее 0,6 мкм.

Особое внимание было уделено изучению ультраструктуры т. н. «аморфной массы» и «нитевидных структур», ввиду отсутствия соответствующих сведений в литературе. Наши исследования показали, что бесструктурные или «аморфные» массы, занимающие значительное место в колониях стабильных Л-форм, образованы обрывками мембран самой разнообразной формы, включают также большое количество «элементарных телец», скоплений рибосом, фибрилл ДНК и электронноплотных гранул.

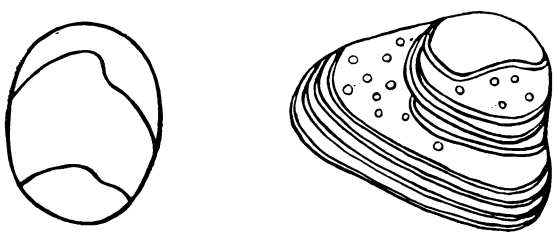
Возможно, наличие «аморфной массы» в Л-колониях является приспособлением Л-форм к существованию без ригидной стенки. И действительно, другие элементы Л-культур часто погружены в «аморфную массу», а молодые клетки формируются внутри тяжей.

На ультратонких срезах мы закономерно наблюдали также «нитевидные структуры» шириной около 0,3 мкм, ограниченные снаружи мембраной. У одних тяжей внутренняя зона за-

полнена плотно уложенным гранулярным компонентом цитоплазмы, у других цитоплазма сильно разрежена и имеется множество кольцевидных мембран и двухконтурных везикул. На поверхности нитевидных элементов иногда расположены почки. Однако, на срезах «нитевидные структуры» шириной 3 мкм не выявляются. Возможно, это объясняется тем, что мы изучали преимущественно Л-культуры логарифмической фазы роста, когда нитевидные элементы имеют ширину в пределах 0,3 мкм, а более широкие, характерные для стационарной фазы роста, еще редко встречаются в культуре (Гулевская и др., 1977).

Методом ультратонких срезов у стабильных Л-форм протея были обнаружены сложно устроенные мембранные и миелиноподобные структуры. Эти данные были подтверждены методом криофрактографии, при котором исследуемый материал не подвергался химической фиксации и обезвоживанию, которые изменяют структуру мезосом (Nanninga, 1971).

На продольном сколе миелиноподобные структуры имеют округлую форму, а поверхность их гладкая с характерными ступенчатыми сколами мембранных слоев. Иногда можно видеть, что сколовшаяся ступень является монослоем (рис. 4а). Встречаются также многослойные мембранные структуры, у которых четко видно, что сколовшиеся ступени имеют трехслойное строение, а на вогнутой поверхности мембран иногда имеются редко расположенные частицы размером 10 нм (рис. 4б).



а *б*

Рис. 4.

Следует отметить, что сколы миелиноподобных структур Л-форм бактерий напоминают сколы миелина эукариотов и искусственных липидных мембран, лишенных глобулярных частиц (Заичкин, 1972). Морфогенез и функции миелиноподобных структур до сих пор не изучены. Однако, в последнее время в литературе появились данные о том, что формирование мембран может идти не только путем синтеза мембраны от мембраны, но также путем самосборки из готовых липопротеидных субъединиц (Поглазов, 1970). Подтверждением этому служит образование новой мембраны вокруг капли прото-

плазмы, взятой из клетки растения (Саляев, 1976). Мембрана строится из материала осмиофильных липидных тел, строение которых во многом напоминает строение миелиноподобных структур. Возможно, появление последних у Л-форм также связано с восстановлением мембранного аппарата, который был частично или полностью утрачен на начальном этапе Л-трансформации. Доказательством того, что у Л-формы происходит формирование системы внутренних мембран является частно встречающиеся на сколах инвагинаты цитоплазматической мембраны.

5. Ультраструктура ревертантов

Главное, что бросается в глаза при изучении ранних и средних сроков реверсии — это существенное сходство субмикроскопической картины реверсии и образования сферопластов, т. е. начального этапа Л-трансформации. Аналогичное указание приводится и в отношении биологической характеристики этих процессов, конечно, с поправкой, что они являются зеркальным отображением друг друга (Тимаков, Каган, 1973).

При наблюдении со сканирующим электронным микроскопом это сходство проявляется в форме клетки, которая может быть грушевидной, веретеновидной или булавовидной. Встречаются длинные «нитевидные структуры» разного диаметра, имеющие морщинистую поверхность. На них располагаются палочковидные или шаровидные клетки. Особенно характерны для реверсирующей Л-культуры вытянутые формы, сегментированные на участки, которые, затем отделяются и образуют новые клетки. Большие тела шаровидной формы значительно разрушены, их поверхность губчатая, с многочисленными разрывами.

Методом ультратонких срезов обнаружено сходство в структуре наружной мембраны у ревертантов и сферопластов. Мембрана фрагильна, легко собирается в складки или образует везикулы, часто располагающиеся цепочками. Фрагильность мембраны, возможно, определяется непрочностью ее связи с пептидогликаном, для которого характерна потеря ригидности, обусловленной незавершенностью поперечных связей в муреине (Birdsell, Cota-Robles, 1967; Taubeneck, Gumpert, 1967).

Сходство морфологической картины реверсии и образования сферопластов проявляется также в «выбросе» многослойных мембранных структур в периплазматическое пространство. Однако, несмотря на значительное внешнее сходство этих процессов, имеются и существенные различия между ними.

Так, у сферопластов мы наблюдали почкование и особый тип деления клетки, когда дочерние клетки образуются внутри общей наружной мембраны. Для ревертантов эти процессы не характерны. Наконец, только у реверсирующей культуры мож-

но наблюдать прерывистое строение наружной мембраны, имеющей на срезах вид пунктирной линии (рис. 5).

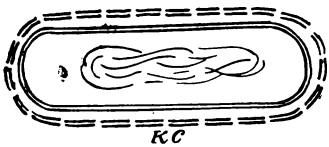


Рис. 5.

Это явление резко отлично от фрагиальности наружной мембраны, и не сопровождается ее скручиванием и образованием везикул. В данном случае, по-видимому, речь идет о синтезе наружной мембраны de novo у будущих ревертантов. Это хорошо согласуется с характером включения вновь синтезированного материала клеточной стенки. У грамотрицательных бактерий этот процесс происходит не локально, т. е. в зоне активного роста, а равномерно, по всей поверхности клетки (Cole, 1965; Beachy Cole, 1966; Ryter et al., 1973 и др.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение последовательных этапов Л-трансформации и реверсии позволило нам представить субмикроскопическую картину этих процессов в динамике, а параллельное использование трех методов электронной микроскопии дало возможность проанализировать их как на уровне Л-популяции, так и на уровне отдельных клеток.

Так, при использовании метода сканирующей электронной микроскопии были выявлены основные структурные элементы Л-колоний: сферические или неправильной формы клетки размером до 5 мкм, «элементарные тельца» размером до 1 мкм, «большие тела» размером до 20 мкм, «нитевидные структуры» диаметром до 3 мкм и т. н. «аморфная масса». Тем же методом мы показали соотношение между указанными элементами в процессе Л-трансформации, устранив возможное перераспределение этих элементов в процессе приготовления препаратов. С помощью метода ультратонких срезов удалось изучить внутреннюю структуру клетки у Л-форм, показать механизм деления клетки и способы образования «элементарных телец», а также установить морфологические изменения, сопровождающие переход сферопластов в нестабильные, а затем в стабильные, Л-формы. Наконец, метод замораживания-травления дал нам возможность выяснить механизм образования мембранных структур у Л-форм и выявить структуру гидрофобного слоя мембраны, не прибегая к предварительной фиксации объекта.

ВЫВОДЫ

1. Впервые проведено комплексное исследование процесса превращения бактерий в Л-формы и реверсии их в бактерии

методом ультратонких срезов, сканирующей электронной микроскопии и замораживания-травления. Выявлены следующие стадии Л-трансформации у протея: 1) сферопласты, 2) нестабильные Л-формы, которые включают ранний, средний и поздний этапы их образования, различающиеся по морфологии и быстроте реверсии, и 3) стабильные Л-формы, неспособные к реверсии.

2. Изучен механизм образования нестабильных Л-форм из сферопластов и переход их в стабильные Л-формы. У нестабильных Л-форм в последовательных пассажах возрастает число клеток протопластного типа по отношению к клеткам сферопластного типа. Клетки протопластного типа образуются путем разрыва и «слущивания» наружной мембраны или в результате описанного нами типа деления клетки, когда одна из дочерних клеток освобождается от наружной мембраны и становится протопластом.

3. Для всех изученных этапов Л-трансформации характерен полиморфизм. Начиная со стадии сферопластов и кончая стабильными Л-формами, мы обнаружили все элементы Л-колоний: «элементарные тельца» (менее 1 мкм), клетки сферической или неправильной формы (до 5 мкм), «большие тела» (до 20 мкм), «нитевидные структуры» (диаметром до 3 мкм) и т. н. «аморфную массу», представленную остатками лизированных клеток. Выявлены закономерности распределения Л-элементов в колонии на разных стадиях Л-трансформации.

4. Установлено, что при образовании сферопластов происходит «выброс» мембранных структур из клетки. Собственная система мембранных и миелиноподобных структур у Л-форм формируется уже в первом пассаже и усложняется в процессе стабилизации Л-форм. Мембранные структуры образуются путем инвагинации цитоплазматической мембраны, как у исходных бактерий. Большинство внутренних мембран у Л-форм не содержат глобулярных частиц в гидрофобном слое в отличие от бактерий с полноценной клеточной стенкой.

5. Основной способ репродукции Л-форм на всех стадиях Л-трансформации, включая сферопласты, — образование «элементарных телец». Последние формируются непосредственно в цитоплазме, в вакуолях, на поверхности клетки и на нитевидных ее отростках в виде почек. В «элементарных тельцах» обнаружены рибосомы и фибриллы ДНК, показана их способность к бинарному делению. Обнаружены также другие способы деления клетки: равновеликое и неравновеликое деление перетяжкой, а у клеток сферопластного типа — деление внутри общей мембраны.

6. Впервые для грамотрицательных бактерий изучен механизм реверсии на субмикроскопическом уровне. Для реверсирующих клеток установлена фрагильность наружной мембра-

ны. На раннем этапе реверсии последняя имеет прерывистое строение, очевидно, отражающее ее синтез de novo.

7. Проведенное исследование показало эффективность сочетания различных методов электронной микроскопии для изучения столь полиморфной культуры как Л-формы. Так, методом ультратонких срезов был впервые изучен механизм деления сферопластов и дополнены имеющиеся сведения о способах образования «элементарных телец». Методом сканирующей электронной микроскопии установлено взаимное расположение Л-элементов в колонии. Методом замораживания-травления изучен механизм образования мембранных структур у Л-форм и впервые выявлена структура гидрофобного слоя мембраны.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Л. Е. Глазачева и Л. Н. Кац. Некоторые данные по ультраструктуре сферопластов у протея. Ж. микроб., эпид., иммун., 1976, № 7, 48—51.

2. Л. Е. Глазачева. Структура сферопластов бактерий при исследовании методом сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии. Тезисы X Всесоюзной конференции по электронной микроскопии. Ташкент, 1976, 97—99.

3. И. С. Тартаковский, Л. Е. Глазачева. О структурных элементах Л-колоний при сканирующей электронной микроскопии. Тезисы X Всесоюзной конференции по электронной микроскопии. Ташкент, 1976, 95—97.

4. Л. Н. Кац, Л. Е. Глазачева и А. Б. Михайлов. Изучение Л-форм протея в процессе реверсии методом сканирующей электронной микроскопии и ультратонких срезов. Ж. микроб., эпид., иммун., 1976, № 10, 38—41.

5. Л. Н. Кац, Л. Е. Глазачева и Е. Н. Ратнер. Изучение сферопластов протея методом сканирующей электронной микроскопии, замораживания-травления и ультратонких срезов. Микробиология, 1976, т. 45, № 6, 1012—1017.

6. Л. Н. Кац, Л. Е. Глазачева. Изучение последовательных этапов Л-трансформации у Proteus vulgaris методом сканирующей электронной микроскопии. Микробиология, 1977, т. 46, № 3, 525—528.

ЛБ02110. 22/IX 1977 г. Тир. 200 экз.

614001 Пермь, Коммунистическая, 57, книжная типография № 2. Зак. 1276.