ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ: ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР. БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
т. XXII, № 7, 1969

УДК 616.981.25:612.014.1

А. А. АВАКЯН, И. Х. ТОРДЖЯН

ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ У СТАФИЛОКОККА МЕТОДОМ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ЦИТОХИМИИ

Соединения тетразолия могут быть использованы как чувствительные индикаторы окислительно-восстановительной активности ферментов. В электронной микроскопии нашли широкое применение нитросиний (НСТ) и тетранитросиний (ТНСТ) тетразолий, являющиеся акцепторами электронов прямо с дыхательной цепи, по-видимому, на уровне коэнзима Q и цитохрома С [7]. При восстановлении солей тетразолия образуются формазаны, обладающие хорошей сохранностью и достаточно высокой электроннооптической плотностью, чтобы быть видимыми в электронном микроскопе. Другим индикатором, используемым в электронной микроскопии, является теллурит калия. При его восстановлении образуется Te и TeO [3], нерастворимые в органических растворителях и также обладающие высокой электроннооптической плотностью [2].

Электронномикроскопические исследования окислительных ферментов с помощью указанных индикаторов немногочисленны, а разные индикаторы дают не всегда сравнимые результаты. Так, у грамположительных бактерий восстановленные НСТ и ТНСТ избирательно откладываются в мембранных структурах [4, 5, 6, 8] и лишь изредка—в цитоплазматической мембране [8], а восстановленный теллурит—обычно только в цитоплазматической мембране [4, 9, 11].

Для сравнительной оценки результатов, полученных с помощью разных индикаторов, представляет интерес их одновременное изучение у одних и тех же бактерий. Это явилось одной из задач исследования.

В предыдущем сообщении [1] мы отмечали наличие трех типов мембранных структур у St. aureus, расположенных в области нуклеоида (первый тип), связанных с формированием перегородки при делении клетки (второй тип), а также локализованных по периферии цитоплазмы (третий тип). Было установлено, что указанные типы мембранных структур отличаются друг от друга не только местоположением в бактериальной клетке, но и поведением в различных условиях культивирования. Это дало основание предполагать возможную функциональную дифференциацию различных структурных типов мембранных органоидов у стафилококка [10]. Для дальнейшего решения этого вопроса нам представлялось целесообразным установить, в равной ли степени мембранные структуры всех трех типов являются местом локализации окислительных ферментов. Выяснение этого вопроса и явилось второй задачей настоящего исследования.

Материал и методы. Для исследования был взят штамм Б-243 St. aureus. Стафилококк является аэробом или факультативным анаэробом, обладает хорошо развитой сетью сложно устроенных мембранных структур и потому может быть использован в качестве удобной модели для таких исследований. Культуру выращивали в течение 5 час. на МПБ при 37°С, клетки отделяли центрифугированием и промывали М/15 фосфатным буфером pH 7,2. Осадок ресуспендировали в фосфатном буфере, содержащем 0,05% НСТ (NBT Shuchardt) или ТНСТ (TNBT Sigma). Теллурит калия добавляли прямо в питательную среду до конечной концентрации, 0,05%. Инкубацию проводили 15—30 мин при 37°С в атмосфере азота, затем клетки фиксировали по Ритер и Келленбергеру, обезвоживали в спиртах и заключали в метакрилат. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-Produkter, контрастировали уранилацетатом (известно, что уранил не мешает контрасту формазана [8]). Микроскопирование проводили на микроскопе JEM-7 при увеличении 30 000.

Результаты исследования. Контролем для настоящего исследования служили клетки стафилококка, выдерживаемые в инкубационной среде без индикаторов. При избранном методе фиксации такие клетки имели более или менее гомогенную клеточную стенку (рис. 1). Внутренний электроннoплотный слой клеточной стенки, выявляющийся лишь при определенных методах фиксации, здесь выражен слабо. Цитоплазматическая мембрана обычно плохо видна, так как ее наружный слой срастается с внутренним слоем клеточной стенки, а внутренний маскируется гранулярным компонентом цитоплазмы. В местах образования перегородок, а также у лизированных клеток хорошо видны оба краевых осмиофильных слоя цитоплазматической мембраны. В цитоплазме располагаются многочисленные мембранные структуры, образованные двухконтурными мембранами, нередко имеющие видимую связь с цитоплазматической мембраной. Мембранные структуры первого типа располагаются в зоне нуклеоида и нередко вплетены в фибриллы ДНК. Их можно наблюдать у неделящихся клеток. Мембранные структуры второго типа связаны с формированием перегородок и встречаются у клеток, готовящихся к делению. Мембранные структуры третьего типа расположены по периферии цитоплазмы и представляют собой небольшие инвагинаты цитоплазматической мембраны.

При инкубации центрифугата клеток с НСТ и ТНСТ отчетливое фиолетово-черное окрашивание осадка наступало через 3—5 мин. В световом микроскопе в клетках были видны гранулы. При электронномикроскопическом исследовании клеток наблюдалось значительное повышение контраста внутрицитоплазматических мембранных структур, а также участка цитоплазматической мембраны, непосредственно прилегающего к ним. Повышение контраста мембранных структур по сравнению с контрольными клетками связано с отложением в них продукта восстановленного ТНСТ—диформазана (рис. 2). Продукт восстановленного тетразолия можно обнаружить как в мембранных структурах, расположенных в зоне нуклеоида (рис. 3), так и в мембранных структурах, связанных с формированием перегородки и расположенных по перифе-

рии цитоплазмы (рис. 4). Таким образом, мембранные структуры всех трех типов в равной степени являются местом отложения формазана, образующегося при восстановлении солей тетразолия.

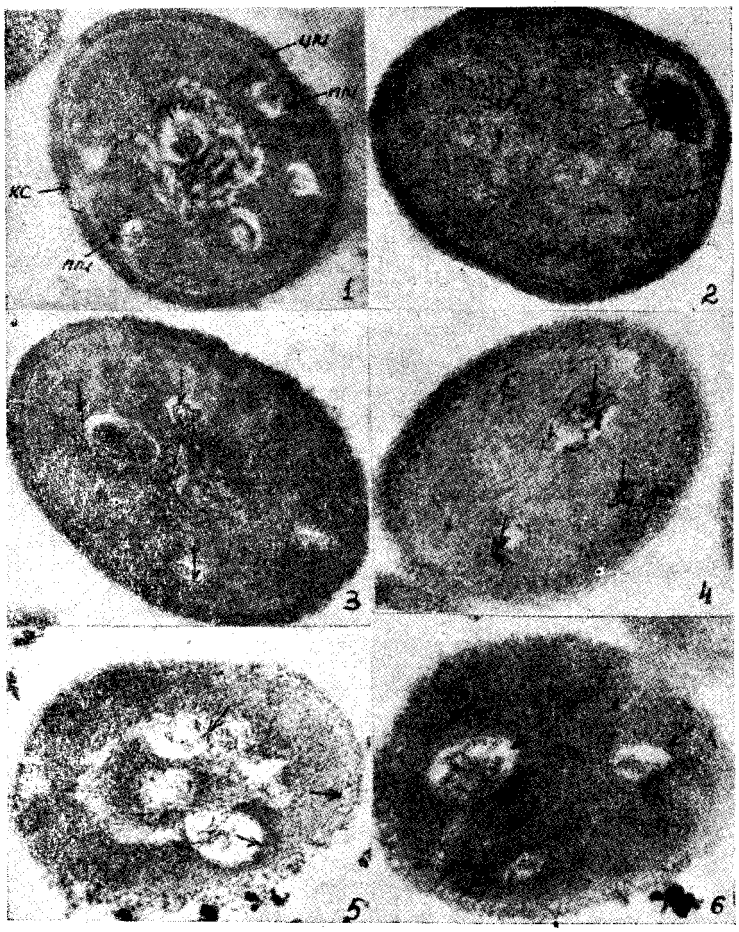

Рис. 1. Клетки стафилококка, не обработанные индикатором (контроль). Клеточная стенка — кс; цитоплазматическая мембрана — цм; мембранные структуры, расположенные в зоне нуклеоида — нм; периферические инвагинаты цитоплазматической мембраны — пм. ×90 000. Рис. 2, 3, 4. Клетки стафилококка после инкубации с ТНСТ. Отложение диформазана показано стрелками. ×60 000, ×60 000, ×90 000. Рис. 5, 6. Клетки стафилококка после инкубации с теллуритом калия. Отложение восстановленного теллурита показано стрелками. ×60 000, ×60 000.

При инкубации клеток стафилококка с теллуритом калия сероватое окрашивание осадка наступало через 10—15 мин. Исследование клеток в электронном микроскопе показало, что продукты восстановленного теллурита локализуются в цитоплазматической мембране, а также во внутрицитоплазматических мембранных структурах (рис. 5). По нашим наблюдениям, восстановление теллурита происходит в мембранных

структурах всех трех типов. Иногда небольшие кристаллы теллурита обнаруживались на внутреннем слое цитоплазматической мембраны, а также в цитоплазме вне видимой связи с мембранами клетки (рис. 6).

Обсуждение. Таким образом, наше исследование показало, что НСТ и ТНСТ дают одинаковые результаты, избирательно локализуясь во внутрицитоплазматических мембранных структурах. Неспецифического отложения формазана мы не наблюдали, хотя в литературе имеется указание, что формазан ТНСТ располагается в области нуклеоида [8] или в цитоплазме вне связи с мембранными структурами.

С одной стороны, соединения тетразолия и теллурита дают не совсем одинаковые результаты, с другой, формазан НСТ и ТНСТ у стафилококка локализуется исключительно во внутрицитоплазматических мембранных структурах, а восстановленный теллурит—как в мембранных структурах, так и в цитоплазматической мембране. У большинства других грамположительных бактерий наблюдается та же закономерность: формазан НСТ и ТНСТ обнаруживается в мембранных структурах [4, 5, 6, 8], а теллурит—только в цитоплазматической мембране [4, 9, 11]. Эти различия, по-видимому, можно объяснить либо трудностью идентификации отложений формазана в цитоплазматической мембране (благодаря срастанию последней с клеточной стенкой), либо возможным различием в качественном составе дегидрогеназ, выявляемых теллуритом и соединениями тетразолия [4, 11]. Результаты проведенного исследования, как и литературные данные, позволяют признать необходимым при изучении окислительно-восстановительных ферментов сочетание обоих методов—с ТНСТ и с теллуритом калия. Вероятно, лишь в этом случае можно получить достаточно полное представление о локализации указанных ферментов бактериальной клетки на субмикроскопическом уровне.

Особый интерес представляет изучение локализации восстановленных индикаторов у бактерий с несколькими типами мембранных органоидов. В настоящем исследовании было показано, что у стафилококка все три индикатора (теллурит, НСТ, ТНСТ) в одинаковой степени откладываются в мембранных структурах, связанных с формированием поперечных перегородок, локализованных в области нуклеоида и в периферических инвагинатах цитоплазматической мембраны. Как было показано, в предыдущем сообщении [1] у стафилококка все указанные мембранные структуры содержат материал клеточной стенки, что указывает на их связь с делением клетки. Оба этих факта говорят не в пользу физиологической специализации разных мембранных структур в одной бактериальной клетке. Более вероятно предположение о полифункциональности мембранных органоидов, выполняющих целый ряд функций, в том числе функции аналогов митохондрий и органоидов, обеспечивающих нормальное деление клетки.

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалея АМН СССР,
Ереванский государственный университет

Поступило 24.XII 1968 г.

Ա. Ս. ԱՎԱԳՅԱՆ, Ի. Խ. ԹՈՌՉՅԱՆ

ՍՏԱՖԻԼԱԿՈԿԵՐԻ ՄՈՏ ՕՔՍԻԴԱՑՄԱՆ–ՎԵՐԱԿԱՆԳՆՄԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԼՈԿԱԼԻԶԱՑԻԱՅԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԳԵՐԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԱՅԻՆ ՑԻՏՈՔԻՄԻԱՅԻ ՄԵԹՈԴՈՎ

Ա մ փ ո փ ո ւ մ

Գերբարակ կտրվածքների վրա կատարվել է վերականգնված ինդիկատորների THCT, HCT *և* K_2TeO_3 *կուտակումների համեմատական հետազոտություն։ Յույց է տրված, որ կալի տելուրիտը, ի տարբերություն* THCT*-ի և* HCT*-ի, վերականգնվում է նաև ցիտոպլազմատիկ թաղանթներում (մեմբրաններում)։ Հաստատված է նաև, որ* THCT *և տելուրիտ կալի վերականգնումը հավասարապես տեղի է ունենում թաղանթային երեք տիպի կառուցվածքներում։*

Քննարկվում են նաև ցիտոպլազմատիկ թաղանթում՝ վերականգնված տետրազոլիտների և տելուրիտների կուտակումների ոչ միանման բնույթի հնարավոր պատճառները։ Ենթադրություն է արվում ստաֆիլակոկերի թաղանթային կառուցվածքի բազմաֆունկցիոնալության մասին։

ЛИТЕРАТУРА

1. Кац Л. Н. и Торджян И. Х. Микробиология, 37, 5, 1968.
2. Barrnett R. J., Palade G. E. J. Bioph. Biochem. Cytol. 3, 577, 1957.
3. Barrnett R. J., Palade G. E. J. Histoch. Cytoch. 6, 1958.
4. Kawata T., Inone T. J. Gen. Appl. Microb., 11, 115, 1965.
5. Leene W. van Iterson W. J. Cell Biol. 27, 237, 1965.
6. Nermut M. V., Ryc M. V. Folia microb. 9, 16, 1964.
7. Novikoff A. B. First Intern. Congr. Histochemistry Cytochemistry, Pergamin Press, Oxford, p. 465, 1963.
8. Sedar A. W,, Burde R. M. J. Cell Biol. 27, 53, 1965.
9. Suganuma A. J. Infect. Dis., 111, 8, 1962.
10. Suganuma A. Ann. N. Y. Acad. Sci. 128, 26, 1965.
11. Takagi A., Abe O., Ueda M. J. Gen. Appl. Microbiol. 11, 221, 1965.