Е16.013.0
А-69

АНАТОМИЯ БАКТЕРИЙ

BACTERIAL ANATOMY

SIXTH SYMPOSIUM OF THE
SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY
HELD AT THE
ROYAL INSTITUTION, LONDON
APRIL 1956

CAMBRIDGE
Published for the Society for General Microbiology
AT THE UNIVERSITY PRESS 1956

АНАТОМИЯ БАКТЕРИЙ

А6
616.
А

ШЕСТОЙ СИМПОЗИУМ
ОБЩЕСТВА ОБЩЕЙ МИКРОБИОЛОГИИ
ЛОНДОН, АПРЕЛЬ 1956 г.

ПОД РЕДАКЦИЕЙ
Е. Т. С. СПУНЕРА и Б. Э. Д. СТОКЕРА

Перевод с английского и под редакцией проф.
Г. П. КАЛИНЫ

ADTI
AXB.-RESURS MARKAZI
INV № 6742

БИБЛИОТЕКА
ГОСУДАРСТВЕННОГО
МЕДИЦИНСКОГО ИНСТИТУТА
г. Андижан

Государственное издательство медицинской литературы
Медгиз — 1960 — Москва

CONTRIBUTORS

Birch-Andersen A. Statens Seruminstitut, Copenhagen.

Bisset K. A. Department of Bacteriology, University of Birmingham.

Bradfield J. R. G. Cavendish Laboratory, Cambridge.

DeLamater E. D. Department of Physiology, University of Pennsylvania Philadelphia, U. S. A.

Elliott C. G. Department of Genetics, University of Glasgow.

Hannay C. L. Science Service Laboratory, Department of Agriculture London, Ontario, Canada.

Hughes W. H. Wright-Fleming Institute, St Mary's Hospital, London.

Maale O. Statens Seruminstitut, Copenhagen.

McQuillen K. Department of Biochemistry, University of Cambridge.

Mitchell P. Department of Biochemistry, University of Cambridge.

Moyle, Jennifer. Department of Biochemistry, University of Cambridge.

Robinow C. F. Department of Bacteriology and Immunology, University of Western Ontario, Canada.

Salton M. R. J. Department of Biochemistry, University of Cambridge.

Stocker B. A. D. Lister Institute of Preventive Medicine, London.

Thorne C. B. Camp Detrick, Frederick, Maryland, U. S. A.

Tomcsik J. Institute of Hygiene and Bacteriology, University of Basel.

Weibull C. Biokemiska Institutionen, Uppsala Universitet, Uppsala, Sweden.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие к русскому изданию 7
Предисловие к английскому изданию 11
К. Э. Байссет. Клеточная организация у бактерий 13
Б. Э. Д. Стокер. Жгутики бактерий: морфология, строение и наследственность 31
Я. Томчик. Капсулы бактерий и их отношение к клеточной стенке 54
К. Б. Торн. Образование капсулы и синтез глютамил-полипептида у Bacillus anthracis и Bacillus subtilis 81
М. Р. Дж. Солтон. Клеточные стенки бактерий 95
К. Вейбулл. Бактериальные протопласты; их образование и свойства 127
К. Мак Квайллен. Свойства бактериальных протопластов ... 143
П. Митчелл и Дж. Мойл. Осмотическая функция и строение бактерий 169
К. Ф. Робинау. Хроматиновые тельца бактерий 202
Е. Д. ДеЛяматер. Хромосомы бактерий и механизм их деления 237
О. Маалое и А. Бирч-Андерсен. О построении «ядерного материала» у Salmonella typhimurium 289
Ч. Дж. Эллиотт. Хромосомы у микроорганизмов 307
Дж. Р. Дж. Бредфилд. Построение цитоплазмы бактерий ... 325
К. Л. Хенней. Включения у бактерий 348
У. Х. Хагс. Строение и развитие индуцированных длинных форм бактерий 371

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Успехи в изучении тончайшего строения бактерийных клеток, достигнутые в последние годы, обязаны совокупности многих достижений современной техники, из которых важнейшие:

1) стремительное развитие микроскопической техники — фазово-контрастной оптики и электронного микроскопа, а также техники тончайших («ультратонких») срезов бактерийных клеток, доступных исследованию в электронном микроскопе;

2) разработка цитохимических методов исследования, позволяющих выявлять биохимическую природу морфологических структур, обнаруживаемых в клетках;

3) широкое внедрение в практику цитологических исследований дифференцированного фракционирования при помощи суперцентрифуги, позволяющего изолировать различные по размерам и весу биохимические вещества и изучать их морфологическое строение;

4) применение при цитологических исследованиях радиобиологических методов, в частности использование радиоизотопов.

Все эти новые методики нашли свое отражение в 15 докладах, представленных на шестой симпозиум Общества общей микробиологии в Лондоне и объединенных под общим наименованием «Анатомия бактерий». Это наименование не совсем точно и полно отражает содержание докладов. Хотя все разделы книги и посвящены в основном тем или иным морфологическим структурам бактериальных клеток — жгутикам, капсулам, клеточным стенкам, содержимому клеток — хроматиновому веществу (ядерной субстанции), цитоплазме, включениям и т. п., особенно ценным и неоспоримым в принятом в настоящее время направлении в изучении морфологии бактерий, нашедшем полное отражение в докладах шестого симпозиума, является неразрывная связь морфологии и биологической функции клеток, своего рода функциональная анатомия бактерий. Эта связь морфологической структуры и жизненных отправлений организма, точнее функциональное значение тех или иных морфологических структур, проходит красной нитью через большинство представленных на симпозиум докладов, а в некоторых, например в докладах Торна и Митчелла и Мойл, она подчеркивается даже самими

названиями («Осмотическая функция и структура бактерий», «Образование капсулы и синтез глютамил-полипептида»).

Функциональное направление цитологических исследований стало особенно плодотворным после широкого развития биохимических методик применительно к бактериям. Не случайно ряд докладов на симпозиуме был сделан биохимиками. Особенное значение приобрела возможность анализа высокомолекулярных структур, в частности нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов. Связь нуклеиновых кислот со многими важнейшими жизненными процессами, развитием и размножением бактерийных клеток, синтезом новых клеточных структур выдвинула изучение этих биохимических компонентов клеток на первый план в современной цитологии бактерий, а возможность определения морфологических компонентов, в состав которых входят нуклеиновые кислоты и нуклеопротеиды, еще больше подчеркнула единство структуры и функции. Функциональная роль нуклеиновых кислот получила широкое освещение в докладах, представленных на симпозиум.

Все доклады симпозиума были сделаны крупными специалистами в соответствующих областях. Значительная часть материала, положенного в основу сообщений, была получена авторами и их сотрудниками, и многие из приводимых в докладах данных до этого нигде не были опубликованы. Это придает каждому разделу особую ценность и в то же время накладывает известный отпечаток субъективизма. В сущности каждый раздел книги — небольшая монография, исчерпывающе излагающая современный материал под определенным углом зрения. Такой субъективизм в изложении компенсируется до некоторой степени тем, что по отдельным, особо спорным вопросам современной цитологии бактерий на симпозиуме были представлены школы, придерживающиеся противоположных или различных точек зрения. Так, например, доклады Робинау о хроматиновых тельцах бактерий и ДеЛяматера о бактериальных хромосомах отразили два диаметрально противоположных взгляда на природу и функции хроматинового вещества, обнаруживаемого в клетках бактерий, при наличии единого мнения обеих школ о ядерном характере этого вещества.

В кратком предисловии невозможно изложить подробно содержание каждого из докладов: позволительно поэтому лишь указать на отдельные, наиболее существенные положения, выдвигаемые теми или иными докладчиками.

В докладе Байссета «Клеточная организация у бактерий» наиболее существенным является описание механизма клеточного деления. Исчерпывающе доказывается многоклеточное строение многих грамположительных бактерий. На ряде примеров показано значение «точек роста». Следует подчеркнуть, что такой крупный специалист в области цитологии бактерий, как Байссет, безоговорочно принимает положение, что «равнополовинное»

деление одной бактериальной клетки на две на самом деле является отделением, «отпочковыванием» дочерней клетки от материнской, «несмотря на приблизительно одинаковый с родительской клеткой размер».

В докладе Стокера о бактериальных жгутиках привлекает внимание трактовка механизма наследования локомоторного аппарата, в частности теория однолинейной передачи подвижности.

Капсулам бактерий посвящены доклады Томчика и Торна. Оба доклада, особенно второй, с большой полнотой освещают биохимическое строение капсул, их природу и связь с клеточной стенкой.

Представляет большой интерес также доклад Солтона о клеточных стенках бактерий. Эта ригидная структура, определяющая морфологическую структуру бактериальной клетки, является, по-видимому, защитным каркасом, не принимающим участия в метаболизме клетки, так как удаление ее не ослабляет существенно способность оставшейся структуры (протопласта) синтезировать белок и нуклеиновые кислоты. Заслуживает большого внимания высказывание автора о вероятности осуществления в почве или в подходящей водной среде трансформаций, механизм которых тесно связан с растворением клеточных стенок бактерий энзимами почвенных микроорганизмов — актиномицетов и миксобактерий, в результате чего освобождается клеточная деоксирибонуклеиновая кислота, передающая свойства одного вида клеткам или протопластам другого вида. «Частота подобных превращений, — пишет Солтон, — может быть так же велика, как мутационных изменений».

Очень интересными разделами являются статьи, касающиеся протопластов бактерий, их свойств и функций. За 3 года, прошедших между появлением в печати первых сообщений Вейбулла о протопластах и симпозиумом, накопилась значительная литература по этому вопросу, подтверждающая большое теоретическое и практическое значение исследований протопластов. С нашей точки зрения, эти исследования особенно ценны тем, что чрезвычайно наглядно подчеркивают наличие всех основных биологических функций у морфологических структур, стоящих, по выражению Мак Квайлена, «одной ступенью ниже, чем целые клетки», т. е. неклеточных живых структур в нашем понимании. Существование таких неклеточных структур и возможность их развития в клеточные формы укрепляют положение о том, что клетка не является конечной формой, в которой осуществляются жизненные процессы.

Очень интересным и методически, и теоретически является доклад Хагса о строении и развитии длинных форм бактерий. В этом докладе подчеркивается несомненная зависимость возникновения этих форм от определенных неблагоприятных воздействий внешней среды. Тем самым проводится совершенно опре-

деленная четкая граница между этими индуцированными длинными формами и L-формами, являющимися нормальной стадией в жизненном цикле лишь немногих бактерий (например, Streptobacillus moniliformis). С этим положением можно полностью согласиться, и это различие в терминологии особенно полезно для советских читателей, так как некоторые наши исследователи, занимающиеся проблемой «L-форм», склонны под этим названием понимать все сходные (и даже не всегда сходные) морфологические структуры, возникающие у многих бактериальных видов под влиянием неблагоприятных воздействий внешней среды.

Не все в докладах, представленных на симпозиуме, имеет одинаковую ценность. Советский читатель разберется, конечно, в отдельных умозрительных положениях, выдвигаемых тем или иным докладчиком и не подкрепляемых сколько-нибудь убедительными экспериментальными доказательствами или опирающимися на доказательства, допускающие и иные трактовки. Необходимо учесть, что многие докладчики твердо стоят на позициях морганистской формальной генетики и убеждены в том, что только с позиций учения о генах можно удовлетворительно объяснить связи и взаимоотношения морфологических структур и биологических функций бактерийных клеток. Особенно решителен в подобных выводах Эллиотт в своем докладе о хромосомах у микроорганизмов. Более осторожен в этом вопросе Робинау («Хроматиновые тельца бактерий»), который во второй части своего доклада подвергает уничтожающей (и с нашей точки зрения, весьма убедительной и обоснованной) критике доводы ДеЛяматера и других в пользу наличия хромосом и митотического процесса у бактерий. Это подкрепляется данными Маалое и Бирч-Андерсена, с несомненностью показавшими в своем докладе о «ядерном материале» бактерийных клеток, какие нарушения тончайшей структуры клеток может вызвать предварительная обработка препарата — фиксация, заливка (для ультратонких срезов) и т. п. Усовершенствование метода заливки позволило авторам выявить трубчатые структуры, представляющие, по их мнению, истинную конфигурацию ядерного материала.

В целом книга «Анатомия бактерий» знакомит читателя с современным положением проблемы морфологического строения бактерийных клеток. Советский читатель, дополнив материалы книги данными наших отечественных исследователей, знакомыми ему по специальной литературе на русском языке (но, к сожалению, почти полностью игнорируемыми докладчиками на симпозиуме), получит исчерпывающее представление о функциональной морфологии бактерийных клеток.

Г. Калина

ПРЕДИСЛОВИЕ К АНГЛИЙСКОМУ ИЗДАНИЮ

Пятнадцать частей этого тома представляют доклады, которые будут обсуждены на шестом симпозиуме Общества общей микробиологии в Лондоне в апреле 1956 г.

Редакция выносит благодарность сотрудникам Издательства Кембриджского университета за их превосходное сотрудничество и помощь, которые сделали возможным опубликование книги в период, позволивший членам общества познакомиться с ее содержанием до начала симпозиума.

Е. Т. С. Спунер,
Б. Э. Д. Стокер

Лондонская школа гигиены и тропической медицины и Листеровский институт профилактической медицины

Март 1956 г.

КЛЕТОЧНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ У БАКТЕРИЙ

К. Э. БАЙССЕТ

Отдел бактериологии Бирмингамского университета

ВВЕДЕНИЕ

Контроль цитологических методов

Насколько можно определить по доступным в настоящее время доказательствам, живые организмы подразделяются на три основные группы в зависимости от строения их клеток. Первая группа — вирусы, которые могут не иметь единого происхождения и у которых отсутствуют многие атрибуты клеток, настолько многие, что некоторые авторитеты сомневаются в их праве на признание живыми организмами в прямом смысле. Вторая группа — синезеленые водоросли; они обладают более обычной клеточной организацией, за исключением того, что не имеют признаков наличия жгутиков. У них есть ядро, но его строение и характер деления не описаны достаточно удовлетворительно. Третья группа — жгутиковые клетки, включая многочисленные формы, которые давно изменили или утратили жгутики, но обнаруживают очевидные признаки родства с жгутиковыми и происходят от них. Эта очень большая и важная группа включает зеленые растения, животных, грибы, а также бактерии. Все ее члены, включая бактерии, очень сходны одни с другими во многих чертах их клеточной организации, но каждое из основных перечисленных подразделений этой группы имеет некоторые детали строения и собственное, принадлежащее только им поведение. Целью этой вводной статьи является рассмотрение поведения бактерий.

На существование многих из компонентов, которые, как полагают, имеются у клеток других членов жгутиковой группы, в различные периоды времени указывали также и в отношении бактерий. И почти в каждом случае вопрос был предметом спора.

Не следует, однако, предполагать, что интерпретация цитологических данных настолько исключительно субъективна, что

в подобных спорах нельзя найти выход для того, чтобы принять твердое решение. Критерии, которые могут быть применены, просты и достаточно очевидны: Первый из них действительно настолько очевиден, что, как другие очевидные вещи, очень часто не замечается; он заключается в том, что та или иная гипотеза, которая пытается объяснить отдельное явление или группу явлений, должна быть совместима не только с данными явлениями, но и со всеми доступными сообщениями из других источников. И как вывод не следует забывать, что там, где доказательства из двух и больше источников находятся в соответствии, ценность отдельных источников, которые дают противоречащие результаты, должна, естественно, рассматриваться как сомнительная.

Второй критерий, который может быть применен к цитологическим доказательствам, есть sine qua non каждого рода экспериментальной работы, но его приложение к этому типу исследования нередко понимается неправильно, и вследствие этого им пренебрегают. Таким критерием является контроль. Контроль экспериментального метода не менее применим в цитологии, чем в любой другой области. Некоторые процедуры окраски или микроскопическое исследование должны рассматриваться как опыт. Цитолог при обычном опыте в настоящее время не верит тому или иному светопреломляющему тельцу, у которого выявляются обособленные кора и сердцевина, просто потому, что подобное явление наблюдается лишь в определенном оптическом фокусе; он также не считает структуру всегда однородной только потому, что она случайно окрашивается равномерно одной сильной краской. Равным образом при несколько менее элементарном уровне рассуждения в настоящее время обычно принято считать правильным, что ни прямой перенос на бактерий методов, которые выявили основные доказательства, касающиеся других типов цитологического материала, ни попытка обосновать цитологические толкования обычными бактериологическими методами окраски не дают больше, чем минимум полезных сведений, касающихся морфологии бактерий. Отсюда необходимо осознать, что все технические методы можно рассматривать в лучшем случае как неизбежное зло и признавать их источником искажения до тех пор, пока путем применения контроля не будет выяснена их невиновность.

Форма, в которой необходимо применять контроль в этом виде исследований, не так трудна для понимания, как она могла бы казаться, если исходить из проверки утверждений тех исследователей, которые пренебрегали применением контроля, или не смогли разобраться в полученных ими фактах.

Влияние технической обработки на организм может быть проверено по крайней мере двумя путями: путем сравнения воздействия обработки на различные сходные и более или менее несходные организмы и путем сравнения влияния различных

методических технических приемов на один и тот же организм.

Один из методов, который наиболее способствовал современному оживлению интереса к тонкому строению бактерий, а именно метод Робинау (Robinow, 1945), нашел превосходное применение обоим типам контроля.

В ряде современных работ многих авторов относительно цитологии стафилококков и других сходных кокков можно найти некоторые замечательные примеры как применения контролей, так и пренебрежения последними. Там, где контроли были должным образом использованы, результаты, полученные независимо и почти одновременно различными методами, находятся в достаточном соответствии. Там, где контролями пренебрегали или использовали их неправильно, почти неправдоподобное расхождение между утверждениями, касающимися морфологии таких хорошо известных микроорганизмов, как стафилококки, само по себе показывает соответственно их ненадежность.

Одна из наиболее интересных работ подобного рода была опубликована Уэббом и Кларком (Webb, Clark, 1954). Эти осторожные исследователи, которые заслуживают всяческого доверия за способ, которым они контролировали и проверяли свои собственные находки, применили контроль сравнительных методов окраски и описали септированные кокки с двумя или четырьмя клетками, причем каждая клетка содержала небольшое ядро. Их техника выявления ядер состояла в окраске кристалвиолетом и дифференциацией нигрозином. При окраске этим способом казалось, что некоторые из крупных кокков содержат каждый по одному крупному ядру. Однако использование второго типа контроля, заключающегося в применении того же метода к крупным бациллам (вначале автором данной статьи, а в последующем Кларком и Уэббом, 1955), показало, что у этих палочковидных бактерий в таких случаях выявляется длинное центральное окрашенное пространство и они показывают очень мало признаков делений клетки или других структур, видимых при применении иных методов. Следовательно, окрашенный центр и светлая периферия некоторых наиболее крупных кокков, возможно, могли быть объяснены тем, что под влиянием нигрозина дифференцировались только наружные слои организма. Мне известно, что последующие работы в той же лаборатории с применением различных видов ядерных красок позволили обнаружить от 4 до 6 ядер в некоторых из более крупных кокков (Кларк, личное сообщение, 1955). Общая картина, таким образом, находится в полном согласии с таковой, полученной автором ранее [Байссет (Bisset), 1954а] (см. также табл. 1, 3 и 4 в этой работе).

Точно так же Виганд и Питерс (Wigand, Peters, 1954) так корригировали противоречивые на первый взгляд результаты обработки различными энзимами кокков разного возраста,

выявляемые при классической, фазово-контрастной и электронной микроскопии, что их доказательства находятся в полном согласии с другими существующими сообщениями.

В противоположность им Доусон и Стерн (Dawson, Stern, 1954), изучая электронные микрографии разрушенных клеточных стенок стафилококков, пришли к убеждению, что эти организмы состоят из отдельной клетки, делящейся путем стягивания и врастания клеточной стенки. Они не применяли каких-либо контролей. В этом случае, исходя из хорошо известного факта, что проникающая способность электронного луча через подобный материал совсем не велика, очевидно, следовало применить ту же технику по отношению к другим бактериям с уже известной сложной структурой для того, чтобы проверить ее способность показать клеточные границы. Отсутствие подобных контролей лишило возможности противопоставить эти выводы описаниям значительно более высокой ступени клеточного подразделения, основывающимся на других, взаимно подтверждающих методах.

Из сравнения этих различных источников можно сделать заключение, что Доусоном и Стерном в этом случае были показаны лишь наиболее созревшие перегородки уже в момент деления.

С другой стороны, Брэдфилд (Bradfield, 1954) сравнил результаты своего метода окраски электронно-прозрачных срезов бактерий, полученные при исследовании многочисленных видов. Но его объяснения были бы, конечно, вполне ясны, если бы он сопровождал этот многообещающий, но ненадежный метод дополнительным контролем путем применения параллельных препаратов, используя несколько более сходную методику или методики. Выводы Брэдфилда сами по себе имеют очень мало общего с таковыми из какого-либо другого источника. Он считает, что стафилококк содержит центральное ядро с многочисленными, но амитотически делящимися хромосомами.

Взгляд на ядро стафилококка, также отличающийся от общепринятых, принадлежал Кригу (Krieg, 1954), который изучал живой материал при помощи флуоресцентной микроскопии и описал в каждом кокке одиночную запятаяобразную хромосому, делящуюся продольно и обособляющуюся путем вращающегося движения при делении клеток. Еще раз тот же метод был применен к другим бактериям, но результаты этой проверки не были учтены. У такого хорошо известного вида, как Bacterium coli, например, некоторые клетки как будто содержали нежную спиральную нить; другие не обнаружили ничего. Обычные, вегетативные, палочки не были показаны, и это должно было вызвать сомнение в универсальности возможностей методики. Проверка подобного рода была доступна также по существу из изображений самих кокков, так как только около 10% их показало вообще какую-то «ядерную структуру». Контроль при

помощи параллельных препаратов не был применен, но был возможен в работе Байссета и Хейла (Bisset, Hale, 1953a), которые показали, что кокки этого типа почти всегда содержат четыре или больше клеток, разделенных перегородками. Принимая должным образом в расчет эти два типа контролей, ясно, что даже у тех кокков, относительно которых Криг вывел свои заключения, было окрашено лишь содержимое одной или двух клеток компонентов и что именно это содержимое изображало «ядра» Крига.

Совершенно иной тип претензий принадлежит ДеЛяматеру и Вудборну (DeLamater, Woodburn, 1952), выявившим в указанных кокках структуры, которые они считали митотическими веретенами. В этом случае контроли были применены другими исследователями: Байссет (1954a), а также Кларк и Уэбб (1954) приготовили параллельные препараты, показавшие, что в этом и других сравнимых случаях каждая «митотическая фигура» включает содержимое нескольких отдельных клеток.

Следует подчеркнуть, что те из предшествующих исследований, на основании которых были сделаны взаимно подтверждающиеся и, следовательно, почти наверное правильные выводы, были несомненно все выполнены с применением одинаковых методов; хотя автор данной статьи Байссет (1954a) пытался применять и сравнивать возможно большее количество методов для того, чтобы устранить противоречия, но эти подтверждающие исследования были сходны между собой в том смысле, что сопровождались контролями, аналогичными описанным выше, и именно это обеспечивало их достоверность независимо от метода.

При оценке противоречивых утверждений в такой относительно новой области, как цитология бактерий, существенно не только рассмотреть, какая интерпретация способна объяснить все описанные явления, но и отбросить такие толкования, которые объясняют лишь те факты, на которых они основываются, и игнорируют все остальные. Существенно также выяснить, какое объяснение находится в наибольшем соответствии не только с положением дела у клеток вообще, сколько с положением, наиболее типичным для самих бактерий.

Бактерии несомненно обладают большим количеством признаков, которые они разделяют с другими простейшими, но, кроме того, как и все основные группы живых существ, они имеют свои собственные специфические особенности, по которым могут быть распознаны.

AXB.-RESURS MARKA
INV № 6742

РЕПРОДУКЦИЯ У БАКТЕРИЙ

В настоящее время можно, вероятно, твердо считать, что та часть описания бактерий, которая характеризует их как размножающихся исключительно путем «простого» деления, настолько устарела, что не нуждается в дополнительных комментариях,

ГОСУДАРСТВЕННОГО
МЕДИЦИНСКОГО ИНСТИТУТА

хотя и продолжает заботливо сохраняться в публикациях, санкционированных различными полуофициальными организациями.

Фактически бактерии размножаются путем деления или почкования отдельных клеток и нитевидных синцитий, путем фрагментации сегментированных нитей, путем образования клеток, более или менее подобных спорам, и путем выделения мельчайших подвижных конидий так же, как и путем более загадочных L-форм (табл. 1).

Образование спороподобных клеток, согласно широко распространенному взгляду, включает своеобразный половой или автогамный процесс, и ядерная активность, которой это образование сопровождается, ясно отличается от процесса вегетативного размножения (Байссет, 1955а). Иногда высказывали предположение, что образование гонидий и L-форм также включает половой процесс, [Ленис и Смит (Löhnis, Smith, 1916), Стимпен и Хатчинсон (Stempen, Hutchinson, 1951)].

Утверждали также, что у бактерий существует более сложный половой процесс, но эти утверждения или были прямо опровергнуты, или не были подтверждены. Цитологические и генетические доказательства сходятся на том, что сексуальность, если она имеется у бактерий, влечет за собой относительно простое ядерное деление.

Нет ничего исключительного в размножении бактерий. Различные типы бактерий показывают значительные вариации в их степени зволюционного приспособления, но основные тенденции развития сходны и во всяком случае сравнимы с теми, которые обнаруживаются у других членов жгутиковой группы.

Вегетативная стадия большинства типов бактерий размножается путем «простого» деления, но так как делящаяся единица, палочка или кокк, не всегда отдельная клетка, а может состоять из некоторого количества клеток, от двух или трех до дюжины и больше (см. табл. 1), деление[1] отнюдь не есть синоним разделения клетки. Недавняя и оригинальная демонстрация Ньютоном (Newton, 1955) клеточных оболочек Bacillus megaterium показывает очень большую степень, до которой этот тип бацилл может подразделяться на относительно крошечные клеточки.

Вопрос больше касается синхронизации между клеточным разделением и делением. Иногда они совпадают, иногда последнее отстает от первого и возникает многоклеточная единица

[1] В английском языке вегетативное равнополовинное деление бактерийных клеток имеет специальный термин — fission, в то время как слово «деление», обозначающее этот процесс на русском языке, переводится на английский язык как division. Автор понимает под клеточным разделением (division) образование двух клеток из одной в одном и том же многоклеточном бактериальном организме. Собственно деление (fission) наступает тогда, когда от такой бактерии отделяется одна или несколько клеток, дающие начало новому бактериальному организму. Иногда бактериальный организм состоит из одной клетки, разделение которой на две, начинающие самостоятельное существование, является собственно делением (fission). *Ред.*

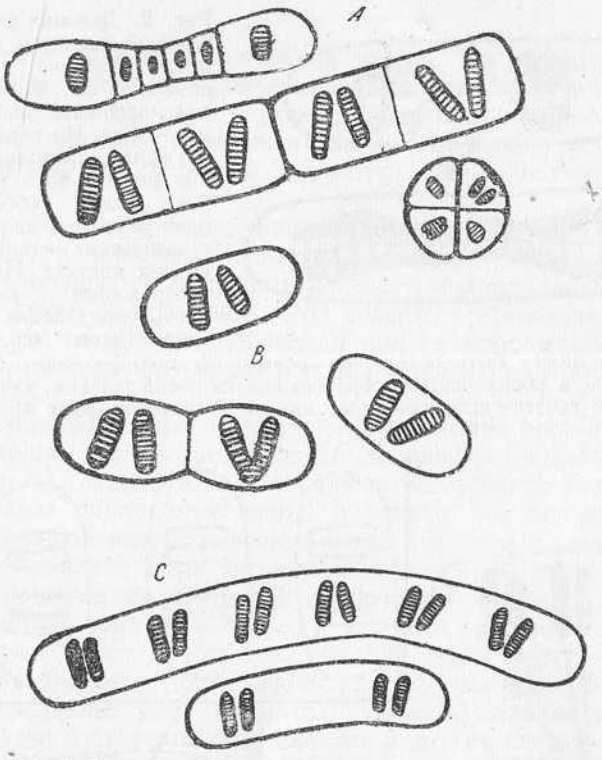


Рис. 1. Синхронизация ядерного и клеточного деления.
A — клеточное деление происходит быстрее, чем разделение, давая многоклеточные палочки и кокки; *B* — клеточное деление, разделение и деление ядра синхронны; *C* — деление ядра происходит быстрее, чем клеточное деление, давая начало многоядерным нитям.

(табл. 1, *1—5*; рис. 1, *A*, *B*). В настоящем контексте, однако, необходимо рассмотреть более подробно именно клеточное разделение.

ДЕЛЕНИЕ ЯДРА

При рассмотрении деления клеточного ядра также возникает вопрос о синхронизации, имеющей существенное значение в проблеме клеточной организации. Это — координация между делением клеток и делением ядра. Конечно, если каждая клетка действительно содержит отдельную ядерную единицу и если разделение происходит после того, как появились многоядерные клетки. Обе эти возможности постоянно встречаются среди бактерий (табл. 1, *1—5*, рис. 1, *B*).

Механизм ядерного деления у бактерий в настоящее время выявлен с такой ясностью (табл. 1, *5*), а цитологические и

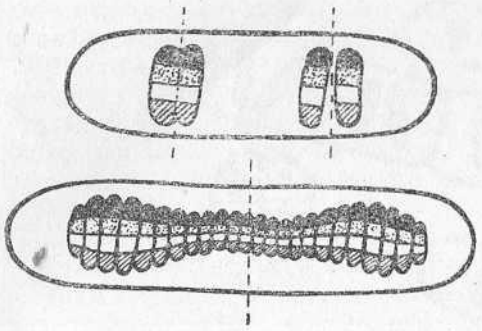


Рис. 2. Деление ядра; генетические единицы представлены различно заштрихованными секциями хромосомоподобного палочковидного ядра. На верхнем изображении продольное деление нормального вегетативного ядра обеспечивает равномерное распределение генетических единиц в дочерних клетках. На нижнем изображении кажущееся поперечное деление длинного типа ядра (ср. также табл. 1, *б*) может быть объяснено, исходя из полиплоидного строения, при котором в обеих частях, образовавшихся после деления, уже присутствуют все генетические единицы, как в гигантском ядре простейших.

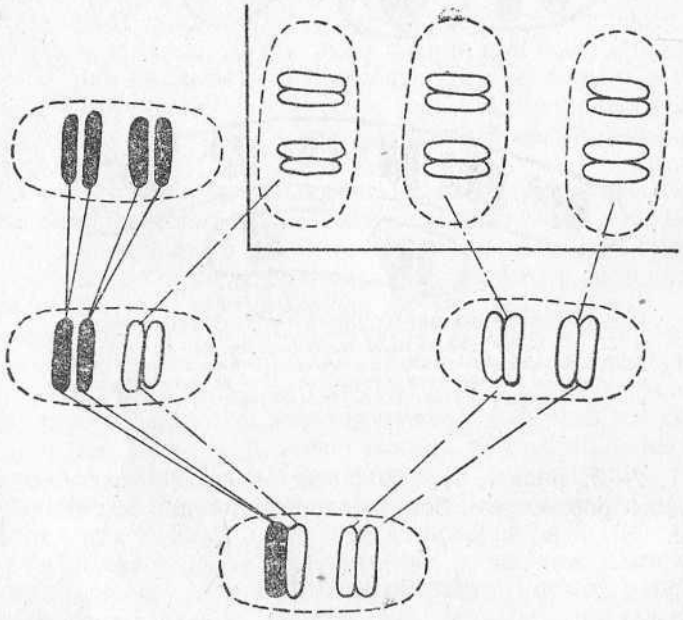


Рис. 3. Редукционное деление парных палочковидных ядер вегетативной клетки обеспечивает быстрое отщепление мутирующих признаков.

генетические картины достигли настолько полной корреляции, что трудно допустить противоположное толкование (рис. 2 и 3).

Является аксиомой цитогенетиков, что наследственные факторы в делящемся ядре должны быть размещены так, чтобы каждый был полностью представлен в обоих дочерних ядрах. Другими словами, они должны быть выстроены линейно так, что

расщепление палочки или цепочки служит для разделения каждой единицы вдоль ее продольной оси. Хотя теоретически возможно представить ядро в форме пластинки или диска, делящихся параллельно их основной плоскости, однако механически это далеко не так просто и, вероятно, обычно осуществляться не может.

Цепочка генов[1] у большинства типов клеток — действительно хромосома, и процесс митоза обеспечивает ее согласованное деление и получение дочерними клетками полного набора дочерних хромосом. Диплоидное ядро содержит хромосомы в виде сходных, но не идентичных пар, а при равнополовинном делении ядра каждый член пары расщепляется и представлен в дочернем ядре.

Бактериальное ядро в его простейшей форме состоит из единичной хромосомоподобной палочки, делящейся продольно (табл. 1, *5*; рис. 2). Хотя эти палочки очень часто лежат парами, это не истинные диплоидные пары, а только что разделившиеся сестры. Каждая идет в конечном счете в разные клетки. Следовательно, деление ядра не выравнивающее, а редукционное. Истинный митоз не требуется и почти несомненно не имеет места. Блефаропласт (табл. 1, *9*), который заменяет центриоль у некоторых типов простейших, не принимает участия в делении бактериального ядра. Попытки ДеЛяматера (1951, 1954 и многочисленные другие работы) доказать наличие классического митоза у бактерий обсуждались в других статьях [Кларк, Гэлиен и Уэбб (Clark, Galyen, Webb), 1953; Хейл, 1954; Делапорт (Delaporte), 1954; Байссет, 1953а, 1954а].

Единичная редукционно делящаяся хромосома в настоящее время приемлема для генетиков, например Райена и Уэйнрайта (Ryan, Wainwright, 1954), после периода, в который были предложены различные гипотезы, не имеющие каких-либо цитологических подтверждений (рис. 3).

Недавно Фитц-Джемс (Fitz-James, 1954) описал в прорастающих спорах внешне более сложную схему деления ядра. Однако по существу это та же концепция единичной хромосомы.

Различие синхронизации между ядерным и клеточным делением, подобное тому, которое, как полагают, приводит к образованию гигантского ядра у простейших, наблюдается и среди бактерий. Гигантское ядро у Paramecium, например, кажется делящимся простым делением. Фактически считается, что зрелое гигантское ядро — конечный результат повторных и вполне нормальных делений ядра и, таким образом, представляет собой массу ядерных элементов, настолько многочисленных, что ядро может разделяться в течение ограниченного количества генера-

---

[1] К сожалению, автор на своих рисунках и особенно на микрофотографиях не показывает структур, которые могли бы быть подведены под понятие «цепочка генов». *Ред.*

ций без риска утраты каких-либо существенных черт, представленных в каждом дочернем гигантском ядре. Аналогичное состояние у бактерий, я полагаю, представляет продольное палочковидное ядро (табл. 1, *6*), которое появляется в поздних стадиях вегетативной культуры многих типов бактерий. Поверхностно сходная тонкая спиральная форма ядра, вероятно, является артефактом.

Продольное палочковидное ядро в противоположность поперечному палочковидному ядру или хромосоме делится простым делением, сжимаясь в центре. В процессе созревания эндоспоры оно делится также на четыре части, которые в большинстве случаев все, за исключением одной, выделяются или дегенерируют. Но независимо от того, образуется ли одна или больше спор, каждая имеет только один фрагмент продольного ядра. Очевидно и совершенно неизбежно заключение, что даже небольшая часть ядра этого типа должна содержать все генетические элементы, необходимые для продолжения существования. И наиболее вероятная трактовка заключается в том, что это ядро напоминает гигантское ядро простейших, представляя собой не одно, а много ядер, образующихся благодаря повторным делениям до деления самой клетки. Такой же процесс может быть вызван или возбужден (вероятно, так оно и есть) половым или автогамным делением ядра (Байссет, 1955а). Очень возможно, что палочковидное ядро состоит из большого количества параллельных поперечных палочковидных ядер, каждое из которых — функционально полноценное ядро (см. рис. 2). Поэтому даже небольшая часть целого палочковидного ядра способна вызвать адекватное ядрообразование для целой клетки. Широко распространен взгляд (см. Байссет, 1955а, литературный обзор), что образование пузырчатого остаточного ядра из этих палочковидных ядер влечет за собой редукционный процесс.

ДЕЛЕНИЕ КЛЕТКИ

За некоторыми обычными исключениями, животная клетка делится путем сужения относительно податливой клеточной оболочки, а растительные клетки — путем образования «пластинки», которая растет центробежно, образуя новую, относительно упругую поперечную стенку.

Бактерии отличаются от тех и других тем, что они делятся путем сужения, но могут при этом образовывать упругую поперечную стенку (см. табл. 1, *1*, *2* и *3*). Прежний взгляд автора данной статьи, что типичные бактериальные формы делятся путем сужения, но что полупостоянные поперечные стенки грамположительных бактерий выделяются in situ, был опровергнут замечательными электронными микрограммами ультратонких срезов Bacillus cereus, опубликованными Чепменом и Хилльe

(Chapman, Hillier, 1953), которые показали врастание при сужении также и этих поперечных стенок.

Противоположная концепция, что деление бактериальной клетки, подобно делению растительной клетки, распространяется от центра кнаружи, имеет своих сторонников. Ченс (Chance, 1953) полагал, что сарцины делятся при помощи «клеточной пластинки, образующейся в ядре и распространяющейся так, чтобы разделить стенку». Но примененная в этом случае техника была та же, которая применялась Уэббом и Кларком (1954) и которая была описана выше. По мнению автора данной статьи, в данном случае также было дифференцирование краски от поверхности внутрь, производившее впечатление неполного слияния между стенкой и перегородкой вследствие того, что последняя остается на концах более или менее неполно окрасившейся.

Образование перегородки, заметно базофильной (табл. 1, 7) (Байссет, 1953б, 1955а) и происходящей из клеточной оболочки, предшествует и, видимо, также порождает врастание клеточной стенки. Эта секретируемая перегородка представляется состоящей из белка со значительным содержанием нуклеиновой кислоты и легко разрушается или коагулирует при фиксации. В электронных микрографиях срезов Bacillus cereus Чепмена и Хилльe, ссылка на которые дана выше, эти перегородки выглядят в виде зерен, и авторы уверяют, что это их естественное состояние и что появление непрерывной перегородки, обнаруживаемое на микрофотограммах, обязано низкой разрешающей способности оптического микроскопа. Однако по меньшей мере вероятно, что зерна образовались вследствие коагуляции перегородки во время приготовления препарата; техника обработки включала как воздействие крепкого раствора OsO_4, так и последующее высушивание in vacuo. Бактерии, имеющие постоянные поперечные стенки, затем обычно делятся повторно подобными цитоплазматическими перегородками.

В сегментированных бактериях преимущественный рост клеточной стенки имеет место в точке слияния этих перегородок с самой клеточной стенкой (Байссет, 1953б, 1955а); это заключение было подтверждено независимо от нас замечательными исследованиями Томчика и Гекс-Хольцера (Tomcsik, Guex-Holzer, 1954) методом фазового контраста, которые не нуждаются в подробном изложении здесь, поскольку они явятся предметом сообщения проф. Томчика на данном симпозиуме.

У одноклеточных бактерий при разобщении после деления клетки часть секреторной перегородки, которая закладывает основание вновь образованного конца клетки, становится точкой роста; обычно основной рост развивается только с одного конца, так что одна из дочерних клеток при делении является действительно почкой, несмотря на приблизительно одинаковый с родительской клеткой размер (Байссет, 1951). Подтверждение этого было в настоящее время получено при помощи кине-

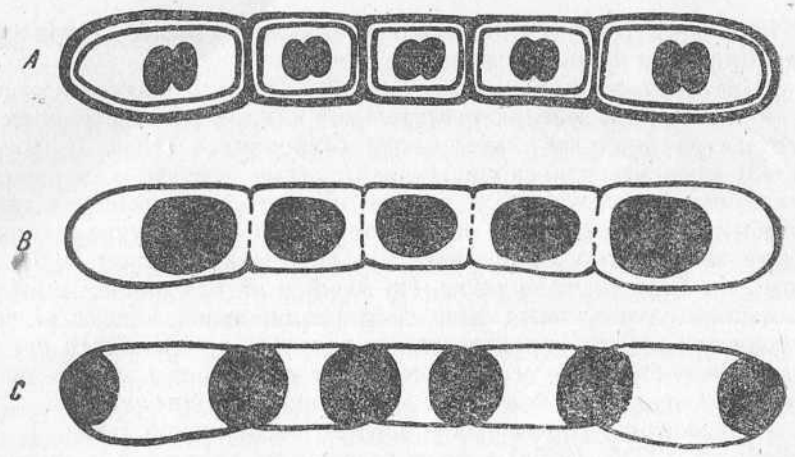


Рис. 4. Появление различных зерен, вызванное коагуляцией и сморщиванием многоклеточных бактерий.

A — схематическое изображение морфологии организма типов Corynebacterium или Mycobacterium; *B* — сморщивание клеточного содержимого в центре вокруг ядра, вызванное некоторыми диагностическими методами; *C* — свертывание базофильного материала вокруг поперечной стенки. Это явление случайно вызвано неподходящей цитологической обработкой.

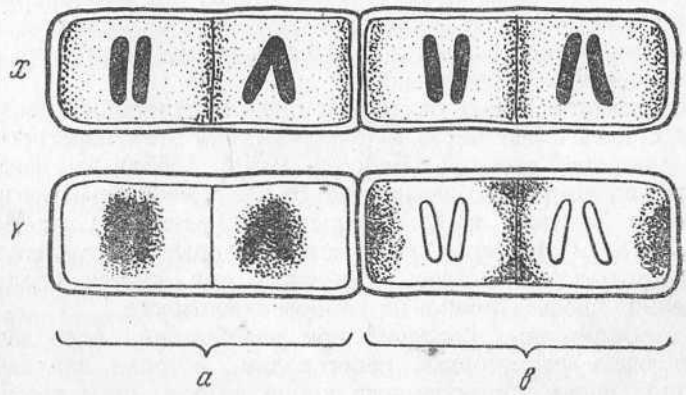


Рис. 5. Различные явления, вызванные коагуляцией и сморщиванием крупных бацилл.

X — схематическое изображение естественной морфологии. Точки изображают базофилию клеточных оболочек и цитоплазмы. *Y* — коагуляция базофильной зернистости: *a* — вокруг ядра; *b* — в поперечных стенках. В последнем случае базофилия самих ядерных телец может быть перенесена на клеточные оболочки.

матографии [Малек, Воскиова, Вольф и Фиала (Malek, Voskyova, Wolf, Fiala), 1954]. Точка роста очень часто является наиболее четкой структурой у бактерий, окрашенных простыми водными растворами красок, и ее появление дало повод многим превратным толкованиям.

Есть также основание считать, что перегородки и точки роста бактерий могут являться центрами зернистых скоплений реактивов [Вейбулл (Weibull), 1953] или нуклеиновых кислот, происходящих из других частей клетки (Байссет, 1954б) (см. табл. 1; рис. *4* и *5*).

Эти открытия вызывают сомнения относительно предложения идентифицировать подобные зерна с митохондриями клеток другого типа, выдвинутого Маддом (Mudd, 1954, и многочисленные другие сообщения). Однако Мадд (1955, личное сообщение) в настоящее время признал, что эти бактериальные зерна не имеют сложной структуры, которая благодаря последним методическим успехам обнаружена у митохондрий, и он в большей степени подчеркивает аналогию их реакций при окраске, чем продолжает настаивать на их истинном соответствии.

Исключительно ценный вклад в понимание функции ростовых точек был сделан Бергерсеном (Bergersen, 1953), который показал, что у Bacterium coli, выросшей в присутствии хлорамфеникола, типичные точки роста появляются по краям клеточной стенки и развиваются в ветви, вырастающие из конца клетки, так как это было постулировано Байссетом (1951). Многие из доказательств в последней работе основаны на поведении жгутиков и, можно подразумевать, на поведении блефаропластов.

ЖГУТИКИ

Эти структуры имеют значение при рассмотрении особенностей деления клетки и ядра у бактерий. Блефаропласт был в настоящее время демонстрирован с большой очевидностью Грейсом (Grace, 1954), а на его существование в различные времена указывали другие исследователи (табл. 1, *9*). У простейших других типов, у которых обнаружен истинный митоз, блефаропласт тесно ассоциируется с ядром; он делится самостоятельно и может вести себя как центриоль в митотических фигурах. У бактерий, у которых отсутствуют подобные центриоли (ср. Байссет, 1953а, раздел дискуссии о структурах, считающихся сходными с центриолями), блефаропласты удалены от ядер и располагаются вблизи от поверхности клетки. Они не играют заметной роли в делении ядра и даже, по-видимому, не способны саморепродуцироваться, а возникают, по крайней мере в случаях полярного расположения жгутиков, de novo на противоположном конце клетки или даже на вновь образующемся полюсе многоклеточной спириллы. Единственный пример

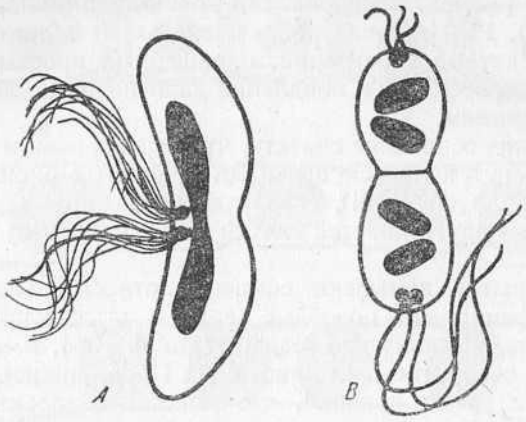


Рис. 6. Роль блефаропласта в ядерном делении.
A — Selenomonas, которая представляет собой, вероятно, протозоа, хотя и относится некоторыми авторитетными авторами к бактериям; блефаропласт делится с ядром, с которым он как будто имеет некоторую связь и которое он может снабжать центриолями, по образцу простейших [я обязан г-ну М. Х. Джейнсу (Jeynes) за информацию относительно Selenomonas]; *B* — характерное для бактерий состояние, наблюдаемое у Pseudomonas. Блефаропласты вновь образующихся жгутиков (сверху) не возникают путем деления их предшественников (внизу), от которых они пространственно отделены. Они не имеют видимой связи с ядром и не могут выполнять функции центриолей.

организма, считающегося некоторыми авторитетами бактерией, — Selenomonas, у которого блефаропласты саморепродуцируются и тесно ассоциируются с ядром, имеет сомнительное таксономическое положение (рис. 6).

Сами жгутики состоят из единичных фибрилл (Грейс, 1954: Байссет, 1955а), но у некоторых форм они являются промежуточными между таковыми и сложными жгутиками других простейших.

ГОНИДИИ

Феномен воспроизведения бактерий при помощи мельчайших подвижных гонидий, напоминающих в основном очень мелкие жгутиковые бактерии (табл. 1, *8*), был исчерпывающе и неоднократно подтвержден так много лет назад, что удивительна трактовка его как факта сомнительной достоверности, даже в таком хорошо известном случае, как репродукция азотобактера [Иенсен (Jensen), 1954]. Наиболее очевидные примеры такой репродукции при помощи гонидий найдены у азотобактера, Rhizobium и некоторых спирилл (Байссет, 1955а), но она может несомненно встречаться и у многих других бактерий.

Процессы, вызывающие образование этих мельчайших, но в то же время не являющихся чем-то исключительным бактерий

внутри материнской клетки, принадлежащей к имеющей нормальные размеры фазе жизненного цикла, неизвестны; но нет оснований рассматривать как нечто неожиданное наличие у бактерий способа воспроизведения, который очень распространен среди других простейших жгутиковой группы.

ОБЩИЕ ПРИЗНАКИ КЛЕТОЧНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Все доступные в настоящее время доказательства приводят к общему мнению, что бактерии составляют раздел жгутикового сверхцарства, равного по положению животным и растениям и обладающего, подобно этим царствам, своими собственными общими чертами сходства и различия от других.

Бактерии могут быть одноклеточными или многоклеточными (табл. 1, *1—5*).

Жгутики монофибриллярны (имеют одно волокно) (табл. 1, *8* и *9*).

Ядро появляется наиболее типично в форме единичной хромосомы или редукционно делящейся пары, лежащей под прямым углом к основной оси бактерий (табл. 1, *5*). Блефаропласт (таб. 1, *9*) не принимает существенного участия в делении ядра; у бактерий не обнаружены также другие механизмы, связанные с классическим митозом, поскольку простая форма построения генов делает его ненужным.

Вегетативное ядро может периодически принимать форму продольной палочки, делящейся поперечно, что, вероятно, представляет собой полиплоидную фазу (табл. 1, *6*). Покоящееся ядро — пузырчатое.

Репродукция может быть сложной, путем образования подвижных гонидий, значительно более мелких, чем нормальные бактерии, но в других отношениях сходных с последними, или путем деления.

Деление клеток осуществляется путем стягивающегося врастания стенки, но ведет к образованию у многоклеточных видов бактерий постоянной поперечной стенки (табл. 1, *1—3*). Места деления заметны по скоплению базофильного вещества, как естественного, так и искусственно возникающего, в большей степени, чем у большинства других типов клеток (табл. 1, *7*).

Так, бактерии, несмотря на общность многих признаков с другими живыми клетками, имеют присущие им особенности. Их степень клеточной организации не бóльшая и не меньшая, чем и других жгутиковых простейших.

ЭПИЛОГ: APOLOGIA PRO LABORE MEO

Является аксиомой в науке, что никто не может решиться уверять заранее, имеют ли отдельные частные сообщения «чисто научный» или «практический» интерес. Дополнительный эпи-

тет «только» может быть помещен перед тем или другим в зависимости от склонности. В то же время стремление к познанию истины как таковой нельзя никогда полностью презирать. Тем не менее практические применения результатов исследования во многих областях микробиологии настолько очевидны, что бактериолог-цитолог обязан объяснить цель и задачу своих исследований. Часто бывает достаточно заинтересованности самого исследователя, но не каждый удовлетворится таким обоснованием.

Как бы то ни было, вопреки твердо укоренившемуся нежеланию оценивать заранее практическую ценность результатов своих собственных исследований, автор настоящей статьи нашел, что почти все время его преследовало впечатление, что его исследование может иметь по крайней мере полупрактическое значение. Беглый взгляд на опубликованный недавно симпозиум даст ясное указание на его характер (Байссет и Грейс, 1954; Байссет, 1955б). Как в любой иной области биологии, наиболее непосредственным и очевидным применением морфологии является систематика, и если где-либо к морфологии относились с наибольшим пренебрежением, настолько, что систематика была разработана наименее удовлетворительно, так это несомненно при изучении аутотрофных бактерий.

Работа, выполняемая в настоящее время, служит примером того, как систематики следуют, более или менее некритически, за чисто цитологическими наблюдениями. В процессе исследования, касающегося образования роящихся клеток у Rhizobium (Байссет и Хейл, 1951), было замечено, что этот организм обладает некоторыми цитологическими признаками, в значительной степени наводящими на подозрение о его родстве с родом Bacillus. Так, выясняется что спорогенные организмы, найденные в корневых клубеньках наименее часто изучаемых видов овощей, были настоящие Rhizobium, но имели явное родство с Bacillus polymyxa (Байссет, 1952). Изучение образования роящихся клеток азотобактером (Байссет и Хейл, 1953б) показало, что этот процесс выявил настолько тесное сходство с таковым у Rhizobium, что это не может быть случайным совпадением. Но было также несомненно, что оба вида разделяют большое количество других необычных цитологических признаков (Байссет, 1954в). Это направление было продолжено в дальнейших исследованиях в этой лаборатории (в настоящее время находятся в стадии опубликования), которые показали, что клеточные оболочки и «цисты» азотобактера, как и соответствующие структуры у Rhizobium, имеют несомненно характер, присущий бациллам, несмотря на поверхностную разницу.

В целом это исследование приводит к довольно неожиданному выводу, что два основных типа аэробных фиксаторов азота вполне могут быть отнесены филогенетически к третьей, анаэробной, группе и помещены среди клостридиальных видов.

Более прямую очевидную практическую ценность имеет установленный факт, что виды Bacterium coli и Aerobacter, обычно рассматриваемые как морфологически сходные, могут легко отличаться по форме покоящихся клеток (Байссет, 1950) и что гетероферментативные и гомоферментативные лактобациллы сходны по клеткам вегетативных бацилл (Дэвис, Байссет и Хейл, 1955).

Существуют, конечно, другие приложения бактериальной цитологии, особенно в генетике и клеточной физиологии. Но практические работники этих областей, вполне справедливо презирающие те отрасли науки, где результаты не могут быть применены для разрешения той или иной задачи, имеют склонность обижаться, если им напоминают о возможности использования этого источника.

ЛИТЕРАТУРА

Bergersen F. J. (1953). Cytological changes induced in Bacterium coli by chloramphenicol. J. gen. Microbiol. *9*, 353.

Bisset K. A. (1950). The differentiation of certain genera of Bacteriaceae by the morphology of the microcyst stage. J. gen. Microbiol. *4*, 413.

Bisset K. A. (1951). The development of surface structures in dividing bacteria. J. gen. Microbiol. *5*, 155.

Bisset K. A. (1952). Complete and reduced life-cycles in Rhizobium. J. gen. Microbiol. *7*, 233.

Bisset K. A. (1953a). Do bacteria have mitotic spindles, fusion tubes and mitochondria? J. gen. Microbiol. *8*, 50.

Bisset K. A. (1953б). Bacterial cell envelopes. Bacterial Cytology, Symp. 6th Congr. Int. Microbiol., Rome.

Bisset K. A. (1954a). The cytology of Micrococcus cryophilus. J. Bact. *67*, 41.

Bisset K. A. (1954б). The production of stainable granules by the adsorbtion of DNA upon bacterial cell envelopes. Exp. Cell Res. *7*, 232.

Bisset K. A. (1954в). The cytology and reproductive elements of nitrogen-fixing bacteria. Rapp. et Comm. 8th Int. Congr. Bot. 21, 34.

Bisset K. A. (1955a). The Cytology and Life-history of Bacteria, 2nd ed. Edinburgh: Livingstone.

Bisset K. A. (1955б). The value of cytological studies in elucidating natural relationships among bacteria. J. gen. Microbiol. *12*, 325.

Bisset K. A. & Grace J. B. (1954). The nature and relationships of autotrophic bacteria. Autotrophic Micro-organisms, p. 28. Cambridge: University Press.

Bisset K. A. & Hale C. M. F. (1951). The production of swarmers in Rhizobium sp. J. gen. Microbiol. *5*, 592.

Bisset K. A. & Hale C. M. F. (1953a). Complex cellular structure in bacteria. Exp. Cell. Res. *5*, 449.

Bisset K. A. & Hale C. M. F. (1953б). The cytology and life-cycle of Azotobacter chroococcum. J. gen. Microbiol. *8*, 442.

Bradfield J. R. G. (1954). Electron microscopic observations on bacterial nuclei. Nature, Lond., 173, 184.

Chance H. L. (1953). Cytokinesis in Gaffkya tetragena. J. Bact. *65*, 593.

Chapman G. B. & Hillier J. (1953). Electron microscopy of ultrathin sections of bacteria. J. Bact. *66*, 362.

Clark J. B., Galyen L. I. & Webb R. B. (1953). The effect of organic solvents on the appearance of bacterial nuclei. Stain Tech. *28*, 313.

Clark J. B. & Webb R. B. (1954). Mitosis-like figures in Corynebacterium pseudodiphtheriticum. J. gen. Microbiol. *11*, 394.

Clark J. B. & Webb R. B. (1955). A comparison of the crystal violet nuclear stain with other technics. Stain Tech. *30*, 73.
Davis G. H. G., Bisset K. A. & Hale C. M. F. (1955). Correlation between morphological and physiological characters in the classification of members of the genus Lactobacillus. J. gen. Microbiol. *13*, 68.
Dawson I. M. & Stern H. (1954). Structure in the bacterial cell-wall during cell division. Biochim. biophys. Acta *13*, 31.
DeLamater E. D. (1951). A new cytological basis for bacterial genetics. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. *16*, 381.
DeLamater E. D. (1954). Cytology of bacteria. II. The bacterial nucleus. Ann. Rev. Microbiol. *8*, 23.
DeLamater E. D. & Woodburn M. (1952). Evidence for the occurrence of mitosis in micrococci. J. Bact. *64*, 793.
Delaporte B. (1954). Etat actuel de nos connaissances sur la cytologie bacterienne. Rapp. et Comm. 8th Int. Congr. Bot. *21*, 23.
Fitz-James P. C. (1954). The duplication of bacterial chromatin. J. Bact. *68*, 464.
Grace J. B. (1954). Some observations on the flagella and blepharoplasts of Spirillum and Vibrio spp. J. gen. Microbiol. *9*, 325.
Hale C. M. F. (1954). Short note on the production of nuclear artifacts resembling mitotic figures in micro-organisms by treatment with organic solvents. Exp. Cell Res. *6*, 243.
Jensen H. L. (1954). The Azotobacteriaceae. Bact. Rev. *18*, 195.
Krieg A. (1954). Nachweis Kernäquivalenter Strukturen bei Bakterien in vivo. III. Mikrokokken. Z. Hyg. Infekt. Kr. *139*, 61.
Löhnis F. & Smith N. R. (1916). Life cycles of the bacteria. J. agr. Res. *6*, 675.
Malek I., Voskyova L., Wolf A. & Fiala J. (1954). Nerovnocennost bakterijnich bunek prideleni. Ceskoslovenska Biol. *3*, 135.
Mudd S. (1954). Cytology of bacteria. II. The bacterial cell. Ann. Rev. Microbiol. *8*, 1.
Newton B. A. (1955). A fluorescent derivative of polmyxin: its preparation and use in studying the site of action of the antibiotic. J. gen. Microbiol. *12*, 226.
Robinow C. F. (1945). Addendum to The Bacterial Cell, by Dubos, R. J. Harvard University Press.
Ryan F. J. & Wainwright L. K. (1954). Nuclear segregation and the growth of clones of spontaneous mutants of bacteria. J. gen. Microbiol. *11*, 364.
Stempen H. & Hutchinson W. G. (1951). The formation and development or large bodies in Proteus vulgaris OX-19. J. Bact. *61*, 321.
Tomcsik J. & Guex-Holzer S. (1954). Genese der komplexen Kapselstruktur. Schweiz. Zeit. allg. Path. Bakt. *17*, 221.
Webb R. B. & Clark J. B. (1954). Cell division in Micrococcus pyogenes var. aureus. J. Bact. *67*, 94.
Weibull C. (1953). Observations on the staining of Bacillus megaterium with triphenyltetrazolium. J. Bact. *66*, 137.
Wigand R. & Peters D. (1954). Licht und elektronenoptische Untersuchungen über den Abbau gramnegativer Kokken mit Nucleasen und Proteasen. Z. Naturf. *96*, 586.

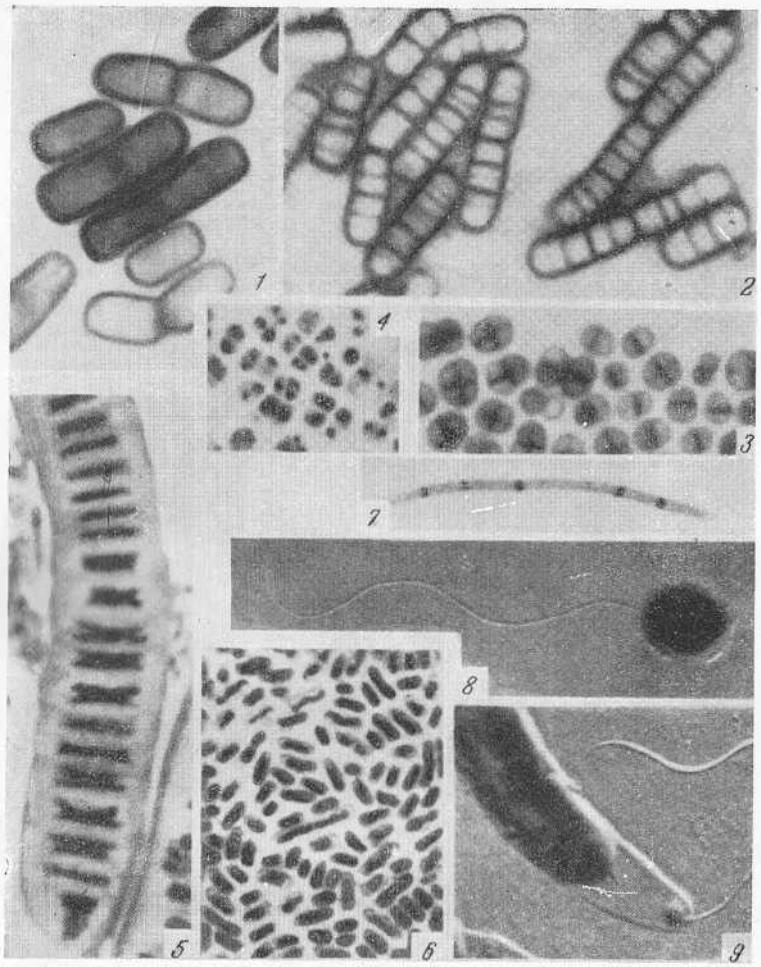


Таблица 1. Признаки бактериальной структуры.

1. Клеточные стенки Bacillus, выявляющие одну или две клетки в организме. Танин-виолет. Увеличение в 3600 раз.
2. Клеточные стенки Caryophanon latum, показывающие многочисленные дисковидные клетки, разделенные поперечными стенками. Метод Хейла. Увеличение в 2400 раз.
3 и 4. Клеточные стенки и соответственно ядра кокка Micrococcus cryophilus, каждый элемент которых состоит из двух, четырех и более клеток. Большинство кокковидных бактерий — многоклеточные. Клеточные стенки обработаны по методу Хейла; выявление ядер обработкой трихлоруксусной кислотой и по Гимза. Увеличение в 3200 раз.
5. Редукционно делящиеся парные ядра бактерий хорошо видны в гигантской бактерии кишечника травоядных Oscillospira. Выявление ядерных структур кислым тионином. Увеличение в 1600 раз.
6. Ядро в форме продольного стержня, Bacterium coli. Обработка кислотой и Гимза. Увеличение в 2400 раз (воспроизведено из Journal of Hygiene).
7. Базофилия поперечных стенок (перегородки). Bacillus megaterium, окрашенный железно-квасцовым гематоксилином. Темные пятна — поперечные стенки, клеточные стенки и ядра не видны. Этот тип реакции был причиной многих ошибок в бактериальной цитологии. Увеличение в 2400 раз.
8. Роящаяся клетка Rhizobium. Электронная микрография, оттенение золотом. Увеличение в 13 000 раз (воспроизведено из Journal of General Microbiology).
9. Блефаропласт и монофибриллярный жгутик у Spirillum sp. Электронная микрофотография. Увеличение в 15 000 раз [любезно предоставлена мисс Филлис Пиз (Phyllis Pease)].

ЖГУТИКИ БАКТЕРИЙ: МОРФОЛОГИЯ, СТРОЕНИЕ И НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ

Б. Э. Д. СТОКЕР

Листеровский институт профилактической медицины, Лондон

Бактериальные жгутики имеют необычную комбинацию свойств, сказывающуюся в том, что они анатомически лежат вне клеточной стенки и, подобно капсулам и другим внеклеточным материалам, могут быть удалены без вреда для жизни клетки, но тем не менее они обладают характерным движением, которое свидетельствует о том, что они составляют часть живой клетки. Проблема, является ли подвижность бактерий результатом движения жгутиков, была подробно обсуждена на одном из предыдущих симпозиумов этого общества [Майлс и Пири (Miles, Pirie), 1949] и дискуссия продолжалась и в последующем [Пийпер (Pijper), 1951, 1955; Вейбулл (Weibull), 1951б; Коффлер и Мелетт (Koffler, Mallett), 1952; ван Итерсон (van Iterson), 1953; Квиттинген (Kvittingen), 1955, и др.], поэтому рассматриваться здесь эта проблема не будет. Однако в некоторых отношениях функция жгутиков не может игнорироваться при обсуждении их строения и наследственности и с этой точки зрения последующая аргументация основывается на предпосылке, что бактериальные жгутики являются действительно локомоторными органеллами.

МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЖГУТИКОВ

Современные приборы, такие как электронный и фазово-контрастный микроскопы, в общем замечательно подтвердили данные, полученные на заре развития бактериологии при изучении окрашенных препаратов. Многое, что мы в настоящее время знаем относительно морфологии жгутиков, было уже известно, например, Мигуле (Migula, 1897). Изучались ли бактерии in vivo при помощи темного поля или фазово-контрастного метода, или же после высушивания в оптическом или электронном микро-

скопах, обнаруживаемое нами является плоскостным изображением того, что при жизни имеет трехмерное строение. При всех методах бактериальные жгутики выглядят как неветвящиеся волнообразные нити, прикрепленные одним концом к бактериальному телу, с изгибами, приблизительно напоминающими расходящиеся волны. Как исключение из этого обобщения мы можем отметить электронные микрографии Бредфилда и Кейтера (Bradfield, Cater, 1952), на которых у организмов родов Leptospira, Treponema и Cristispira видны одна или много нитей, имеющих приблизительные размер и форму типичного бактериального жгутика, но которые у целого организма завиваются спирально вокруг цилиндрического или винтообразного тела; у Treponema duttoni фибриллы выглядят включенными в футляр. По-видимому, они представляют собой спирохетные жгутики, отличающиеся от обычных бактериальных тем, что они прикреплены к телу на протяжении всей их длины, а не только одним концом.

Очевидным исключением из положения, что все жгутики обнаруживают в плоскости волнообразную форму, является сообщение Пийпера (1946) и др. о том, что организмы различных групп, исследованные прижизненно в темном поле, при освещении солнечными лучами выявляют локонообразный прямой «хвост», который превращается в волнистую структуру или структуры, когда клетка прекращает движение, или кратковременно в иные моменты. Однако представляется вероятным, что пучок жгутиков, совершающий очень быстро такой тип движения, который может быть видим как относительно медленный у нитей протея, суспендированного в вязкой среде, будет выглядеть и при визуальном наблюдении, и при фотографировании в виде широкого, туманного, прямого изображения.

Волнообразную форму жгутиков, видимую в плоскости, обычно принимали и как свидетельство того, что они имеют форму цилиндрической спирали. Вейбулл (1950a) подтвердил это объяснение фазово-контрастной микроскопией влажных препаратов пучков или «кос», образованных скоплением отдельных жгутиков Proteus vulgaris. При осторожной фокусировке он отличил верхнюю поверхность от нижней и сделал вывод, что у одного из всех изучавшихся штаммов винт был левовращающий, или против часовой стрелки.

Длина волны и амплитуда проецированного волнообразного изгиба могут быть измерены: во влажных препаратах (в которых, вероятно, можно видеть только агрегаты бактериальных жгутиков) эти расстояния дают прямое измерение шага и диаметра винта. Некоторое искажение должно иметь место при приготовлении высушенных препаратов и нет уверенности в точном отношении длины изгиба и амплитуды высушенных жгутиков к шагу и диаметру спирали, однако расхождение скорее всего невелико.

Давно было известно, что эти измерения приблизительно постоянны для одного штамма, но различаются у разных штаммов, находясь в зависимости от других свойств бактерий, так что длина изгибов жгутиков является признаком, имеющим некоторую таксономическую ценность. Две группы исследователей, применявших различные методы, недавно показали, что один штамм может иметь жгутики двух различных размеров изгибов, причем одна длина изгиба может быть точно вдвое или почти вдвое больше другой. Пийпер и Эбрэем (Abraham, 1954), применяя темное поле с освещением лучами солнца, показали, что при прижизненном наблюдении сарцин, Caryophanon latum и Salmonella typhi можно обнаружить жгутики двух различных размеров изгибов, и у каждого из двух видов сарцин отношение длинного изгиба к короткому равно 1,92/1—1,97/1. Лейфсон (Leifson, 1951), Лейфсон и Хаг (Hugh, 1952) и Лейфсон, Кархерт и Фалтон (Carhart, Fulton, 1955), исследуя фиксированные и окрашенные препараты, выполнили сравнительные исследования многочисленных видов, салмонелл и протея. Обе группы исследователей фотографировали индивидуальные клетки, несшие жгутики обоих типов. Лейфсон и его сотрудники показали, что длина изгиба может определяться как генетическими, так и внешними факторами; от штамма Salmonella wichita они получили два субштамма с преобладающими соответственно длинными или короткими размерами изгибов, а у одного штамма Proteus mirabilis они нашли, что изменение pH взвеси с 7,2 до 6,2 изменяет длину изгиба с длинного на короткий. Предварительная обработка формальдегидом предотвращает изменения длины изгибов при изменении pH. Лейфсон и его коллеги (1955) опубликовали микрофотографии, показывающие, что не только отдельная бактерия может нести одни жгутики с длинным размером изгиба, а другие — с коротким, но что отдельные жгутики обнаруживают длинный размер изгибов в одних сегментах и короткие — в других или даже что длинные и короткие изгибы могут чередоваться; последний феномен напоминает форму «двойного изгиба» у Pseudomonas macroselmis, описанную и сфотографированную Мигула (1897). Лейфсон и сотрудники также описали отдельные измененные формы жгутиков у штаммов протея, группы Providence, аэромонад и Bacillus. Одна, которую они обозначили «полукольцевидная», имела завитки (изгибы) с амплитудой, значительно превышающей их длину, и in vivo являлась, по-видимому, спиралью с довольно мелкими оборотами. У другой, названной ими «кольцевидной», жгутики казались свернувшимися в кольца; они представляют собой, вероятно, спиралевидные жгутики с настолько узким шагом, что при высушивании спадаются с осью нормальной спирали, вместо того чтобы лечь параллельно поверхности.

Эстбери, Бейтон и Вейбулл (Astbury, Beighton, 1955) доказывают, что спиральная форма отдельных жгутиков обуслов-

ГОСУДАРСТВЕННОГО

лена их отрывом и «смертью» в процессе многочисленных актов их волнообразного движения, после чего они остаются фиксированными в определенной форме. Однако возможно также, что жгутики в покое представляют собой спираль и что волнообразные движения обусловлены своеобразным дополнительным движением, возможно, вращением фиксированной спирали. Некоторые штаммы Salmonella имеют жгутики, выглядящие нормально после окраски на жгутики и нормальные в антигенном отношении, и все же клетки с этими жгутиками совершенно неподвижны. Если, как представляется вероятным, бактерии неподвижны потому, что жгутики не двигаются, то их волнообразная форма не может зависеть от «застывания» кругового движения в молекулярном «rigor mortis», по выражению Эстбери (1951).

Электронный микроскоп подтвердил предположение, возникшее при исследовании в оптическом микроскопе, что жгутики являются нитями очень постоянного диаметра, не суживающимися к концу. Несомненным исключением являются такие бактерии, как Spirillum undula, концевые жгутики которых на окрашенных препаратах или в темном поле кажутся заостренными, но на электронных микрографиях оказывается, что все отдельные жгутики, составляющие агрегатную структуру, видимую в оптический микроскоп, имеют одинаковый диаметр; разница в диаметрах агрегата является, как считал Мигула (1897), результатом различной длины составляющих его прядей.

Толщина нитей несколько различается от вида к виду. У протея она составляет около 12 mμ. Хауинк и ван Итерсон (Houwink, 1950) обратили внимание на необычный организм, у которого был выявлен, кроме перитрихиально расположенных жгутиков, полярный жгутик, несколько более толстый, чем другие. Хотя на большинстве электронных микрографий жгутики кажутся простыми нитями, иногда обнаруживаются признаки организованной структуры. Например, ван Итерсон (1953) опубликовал электронные микрографии штамма Vibrio metchnikovii, подвергнутого действию дистиллированной воды в рефрижераторе, на которых видно, что более толстый полярный жгутик штамма состоит из центральной нити и окружающего футляра, частично разрушающегося в процессе приготовления препарата. Робертис и Френчи (Robertis, Franchi, 1951) нашли на электронных микрографиях штамма Bacillus brevis, подвергнутого действию трипсина, указания на центральную нить и фрагментированный футляр; это свидетельствует о том, что нить была резистентна к трипсину, а футляр — чувствителен. Центральная нить, диаметр которой был определен приблизительно в 12—15 mμ, по-видимому, имеет кольцевидную структуру, возможно, в форме плотно закрученной двойной спирали. Имелись и другие сообщения о том, что жгутики несомненно составлены из субфибрилл, скрученных вместе. Старр и Уильямс (Starr, Williams, 1952) доказали, что жгутики грамположительных палочек состоят из

левовращающейся двойной спирали: Лейбоу и Мосли (Labaw, Mosley, 1954, 1955) обнаружили правовращающуюся двойную спираль у жгутиков не идентифицированного точно организма, и правовращающуюся тройную спираль у клеток штамма Brucella bronchioseptica. Хотя на основании теоретических соображений (Вейбулл, 1951б; Эстбери и др., 1955) можно рассчитывать, что каждый жгутик состоит из ряда фибрилл, многие опубликованные электронные микрографии не выявляют подобных тонких структур, которые могут, однако, существовать, но ниже разрешающей способности электронного микроскопа. Заслуживает внимания отсутствие доказательств, что бактериальные жгутики имеют строение, которое как будто является универсальным у ресничек и жгутиков животных и высших растений, т. е. состоят из девяти периферических волокон с двумя (обычно) фибриллами явно иного строения в центре.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЛОЖНЫЕ ЖГУТИКИ

Волнообразные жгутики — не единственный вид нитевидных придатков, обнаруженных у бактерий. Имеется много сообщений [Хауинг и ван Итерсон, 1950; Смит (Smith), 1954; Брайнтон, Баззел и Лауффер (Brinton, Buzzel, Lauffer), 1954] о нитях, отличающихся от жгутиков отсутствием извитой формы и тем, что они относительно тонки и коротки; они могут быть расположены перитрихиально или на одном, или на обоих полюсах. Их наблюдали как у жгутиковых, так и у безжгутиковых бактерий. Нет оснований предполагать, что они имеют отношение к движению; фактически ничего не известно относительно их функций. Нити, полученные Вейбуллом и Гедваллом (Hedvall, 1953) при помощи дифференциального центрифугирования дезинтегрированных клеток Proteus XI9H, которые, вероятно, принадлежали к этому роду структур, не разрушались при низком значении pH, как это происходит с настоящими жгутиками, что свидетельствует об их различном строении.

ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ ЖГУТИКОВ

Долгое время предполагали, что жгутики бактерий отличаются по своему химическому составу от тел бактерий. Исследования Вейбулла [Вейбулл и Тизелиус (Tiselius)], 1945; Вейбулл, 1948, 1949а, б, 1950а, б, в, 1951а, в, 1953а) в настоящее время снабдили нас большим количеством фактов относительно химизма очищенных жгутиков Proteus и Bacillus subtilis. Вейбулл использовал жгутики, отделенные от бактериальных тел энергичным встряхиванием и очищенные переменным центрифугированием при большом и малом количестве оборотов.

Крейджи (Craigie, 1931) и др. до этого получали взвеси жгутиков путем встряхивания с последующим центрифугированием для отделения бактериальных тел; Гард (Gard, 1944) применял этот метод к Salmonella paratyphi B и указал на интересную комбинацию свойств полученных таким образом препаратов. При окраске на жгутики (Крейджи, 1931) или электронной микроскопии (Гард, 1944; Вейбулл, 1948) было выявлено наличие нитей, отличающихся от жгутиков бактерий только тем, что они в среднем более коротки, по-видимому, в результате фрагментации. Несмотря на это, взвеси являются стабильными и вязкими, дающими значительный конус Тиндаля и отчетливую двойную преломляемость потока, и содержащиеся в них жгутики могут быть осаждены высокими концентрациями сернокислого аммония (Крейджи, 1931; Гард, 1944; Вейбулл, 1949а) или этиловым спиртом в соответствующей ионной среде Уцида, Сунакава и Фукуми (Uchida, Sunakava, Fukumi, 1952); они ведут себя почти как гомогенные растворы при ультрацентрифугировании и электрофорезе (Гард, 1944; Вейбулл, 1950в, и т. д.). Эта, так сказать, стабильная взвесь жгутиков подобна раствору белка, имеющего длинные тонкие молекулы.

Жгутики необратимо разрушаются при пребывании в среде с pH ниже 4 или выше 11 или при кипячении. Материал, получаемый при воздействии низких значений pH, — белок, почти гомогенный при ультрацентрифугировании, молекулярного веса около 41 000, и имеющий крайне удлиненные молекулы. Белковая природа жгутиков, предполагавшаяся Мигула (1897), а также Буавеном и Месробеану (Boivin, Mesrobeanu, 1938), была окончательно установлена Вейбуллом для жгутиков Proteus и Bacillus subtilis. Его наиболее совершенные препараты содержали по крайней мере 98% белка, не содержали фосфора и только следы углевода и жира, которые, вероятно, представляли собой примеси в результате недостаточной очистки. Этот белок, для которого было предложено наименование «флагеллин» (Эстбери и др., 1955), имеет характерное аминокислотное строение; он содержит по крайней мере 14 аминокислот, но не содержит улавливаемые количества гистидина, триптофана, гидроксипролина или цистина-цистеина.

Исследования диффракции X-лучей на пленках, составленных из правильно расположенных высушенных жгутиков, указывают, что по структуре белка их можно отнести к тому же классу, что и кератин, миозин, эпидермин и фибриноген (Эстбери и Вейбулл, 1949). Обнаруживаются две группы рефлексов: одни — характерные для полипептидных цепей, складывающихся в α-конфигурации, другие — характерные для так называемых β-конфигураций, оказываются рефлексами, которые дают белки k-m-e-f-группы в сверхсжатой конфигурации (Эстбери и др., 1955); последняя считается характерной конфигурацией активно сокращенной мышцы. Эстбери и др. (1955) уверяют, что активное

Это позволяет предположить, что широкий ряд Н-антигенов, обнаруженный в одном роде, таком как салмонеллы, определяется различием в расположении аминокислот скорее, чем различием в составе аминокислот. Жгутики различных антигенных типов показывают некоторую разницу в химических и физических свойствах. Агглютинация клеток Salmonella при pH около 4,0 обязана агглютинации их жгутиков, так как отделенные от тел жгутики также агглютинируются, тогда как клетки, у которых жгутики удалены встряхиванием, больше не агглютинируются [Аркрайт (Arkwright), 1914, 1931; Малек (Malek), 1938; Шольтенс (Scholtens), 1938]. Каждый из Н-антигенов салмонелл имеет характерный оптимум pH кислотной агглютинации, например, pH 3,8 для антигенов b, k и r, а pH 5,0 для антигенов g, o, q [Огонуки (Ogonuki), 1940, см. также Аркрайт, 1931]. Эти различия, вероятно, отражают различия в изоэлектрических точках жгутиковых белков. Клетки салмонелл с Н-антигенами 1-й фазы (специфической) агглютинируются такими концентрациями акридиновых красок, которые не агглютинируют клетки с антигенами 2-й фазы (групповой); жгутики, отделенные от тел бактерий, ведут себя аналогично [Сертич и Булгаков (Sertic, Boulgakov), 1936; Бернштейн и Ледерберг (Bernstein, Lederberg), 1955].

Накайя, Уида и Фукуми (Nakaya, 1952) показали при реакции агглютинации изолированных жгутиков Salmonella enteritidis, что антигенные свойства, обозначенные символами g и m, присвоенными Н-антигену этого организма, присущи оба каждому жгутику, так как и анти-g, и анти-m сыворотки агглютинируют все жгутики. A priori я должен был бы высказать предположение, что оба свойства агглютинироваться присущи каждой молекуле «Флагеллина», но это не кажется еще твердо установленным. Гард и др. (1955), однако, применяя пробу диффузии в агаровый гель, выявили два независимых антигена в препаратах жгутиков штамма Протеус X19H; оба, по-видимому, жгутиковые антигены. Один из этих антигенов был более термолабильным, чем другой; в одних препаратах он не был обнаружен, а в других он мог быть выявлен только после того, как жгутики подвергались кипячению или действию кислоты. Это делает маловероятным, что оба антигена происходили соответственно от клеток двух различных «фаз», как это имеет место в культурах двухфазных видов салмонелл.

РАСПОЛОЖЕНИЕ ЖГУТИКОВ НА БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКЕ; АГРЕГАЦИЯ ЖГУТИКОВ

Почти у всех палочковидных жгутиковых видов жгутики расположены на (или около) одном или обоих полюсах, или распределены по остальной поверхности, оставляя обычно полюса об-

наженными. Лейфсон и др. (1955) недавно предложили более подробную классификацию. Однако имеются отдельные сообщения о штаммах, несущих как перитрихиальные жгутики, так и полярные жгутики или жгутик, которые могут отличаться от остальных различной формой изгибов или толщиной. Одна культура некоторых штаммов Aeromonas или Alkaligenes может содержать отдельные индивидуумы только с полярными жгутиками, другие — с несколькими боковыми жгутиками и некоторые с теми и другими (Лейфсон и Хаг, 1953); у отдельных штаммов боковые жгутики образуются в молодых культурах, а полярные — в более поздние стадии. Из некоторых штаммов авторы выделили более или менее стабильные варианты с преобладающими полярным или перитрихиальным, или смешанным расположением жгутиков. В одном таком случае было основание считать, что полярный жгутик содержит антиген, отсутствующий у боковых. Эти результаты показывают, что в некоторых группах расположение жгутиков имеет лишь ограниченную таксономическую ценность.

Количество жгутиков у каждой бактерии также изменчиво. Виды, которые в одних условиях окружающей среды дают клетки с многочисленными боковыми жгутиками, могут в других условиях состоять лишь из безжгутиковых клеток; подобное влияние могут оказать присутствие фенола или повышенная температура культивирования. У некоторых видов с перитрихиальным расположением жгутиков условия окружающей среды ведут к возникновению популяции, в которой большинство клеток не имеет жгутиков, а из имеющих жгутики многие имеют только по одному [Гриффин и Роббинс (Griffin, Robbins), 1944]. То, что было названо «дегенеративным перитрихиальным расположением жгутиков» [Конн и Вольф (Cohn, Wolfe), 1938], вероятно, может быть отнесено к подобному типу. У видов с полярными жгутиками наличие последних на обоих полюсах или только на одном, вероятно, зависит от того, находится ли клетка в состоянии, предшествующем делению, или только что разделилась. У таких видов, как vibrio cholerae, большинство клеток несет только один жгутик на одном полюсе, но меньшинство имеет два или три (Мигула, 1897; Лейфсон, 1951).

У бактерий, у которых жгутики могут быть обнаружены in vivo при помощи оптического микроскопа, темного поля или фазового контраста, видимое количество часто значительно меньше, чем количество, обнаруживаемое в окрашенных препаратах или при электронной микроскопии. Это указывает на то, что нео крашенный индивидуальный жгутик не в состоянии рассеивать достаточно лучи света, чтобы быть видимым или сфотографированным, и что in vivo отдельные жгутики сплетаются в пучки с большим светорассеивающим эффектом. Отделенные от тела жгутики также сплетаются при определенных условиях, однако возможно, что при этом влияют различные факторы. Агрегация

in vivo может произойти спонтанно, в бульоне и т. п., как у Spirillum undula, у которой пучок полярных жгутиков функционирует, образуя единый действующий жгутик. У Sphaerotilis natans этот пучок достаточно широк, чтобы быть видимым при помощи фазо-контрастной микроскопии [Стокс (Stokes), 1954]. У перитрихиальных организмов агрегация возникает или наблюдается в повышающейся степени, когда среда, в которой взвешены бактерии, содержит различные макромолекулярные вещества, такие как метил-целлюлоза, гуммиарабик или желатина. Пийпер (1946—1947) приписывает способность по крайней мере некоторых из этих агентов выявлять жгутики или «хвостики» (сплетенные жгутики, рассмотренные выше) по тому, что они образуют осадок на жгутиках, тем самым утолщая последние. Однако из опытов Нейманна (Neumann, 1928) и Кингма Болтьес (Kingma Boltjes, 1948) следует, что эти вещества делают жгутики (или пучки жгутиков) видимыми в темном поле, но в то же время уменьшают количество жгутиков, видимых in vivo или в окрашенных препаратах клеток, подвергнутых действию этих агентов при жизни. Это можно было ожидать, если они вызывали агрегацию. Все материалы, вызывавшие указанный выше эффект, могли повышать вязкость, которая для таких мелких объектов, как бактерии или жгутики, оказывает фактически исключительное сопротивление движению в жидкости, оставляя незначительными силы инерции [Тейлор (Taylor), 1951, 1952; Герберт (Herbert), 1951].

Часто наблюдается, что когда отдельные клетки, имеющие каждая толкающий вперед жгутик, например сперматозоиды, лежат рядом, их жгутики соединяются и двигаются, как один. Этот феномен наблюдался также у бактерий [Нейманн, 1928; Вей (Wei), 1936]. Такое соединение двух жгутиков, по-видимому, обязано только механическим силам. Теоретический анализ Тейлора (1951) не может быть здесь непосредственно применен, так как он имел дело с упрощенной моделью движущихся вниз, без колебаний, примыкающих листов, но его данные свидетельствуют, что гидродинамические силы могут иметь склонность сдерживать вместе активные жгутики, которые пришли случайно в контакт. Так как сопротивление движению жгутиков обусловлено только вязкостью среды, некоторое повышение вязкости должно было бы, по-видимому, увеличивать тенденцию к агрегации. Если это объяснение правильно, сплетение жгутиков, вызванное макромолекулярными веществами, зависит от активной подвижности жгутиков.

Электронные микрографии жгутиковых пучков, образовавшихся in vitro при агрегации свободных жгутиков или in vivo при агрегации жгутиков подвижных бактерий, всегда показывают извитые нити, лежащие бок о бок вдоль нескольких направлений волн, но не нити, обвивающиеся одна вокруг другой, подобно прядям жгута. Это расположение неизбежно вызывает

некоторое искажение правильной спиральной формы жгутиков, составляющих пучок; альтернативное, подобное жгуту, расположение способствовало бы сплетению большого количества спиральных волокон без искажения, но нуждалось бы в осевом вращении одного жгутика относительно других для его отделения.

Если очищенные препараты жгутиков обрабатывать большими концентрациями сернокислого аммония, жгутики осаждаются из взвеси и собираются в пучки, в которых они лежат рядом, сохраняя свою спиральную форму; а когда взвесь жгутиков в дистиллированной воде высушивается на предметном стекле, получается сплошная пленка, которая в оптический микроскоп выявляет светлые и темные полосы, соответствующие приблизительно завитку спирали (Вейбулл, 1950а). Электронные микрографии разрушенных фрагментов хорошо высушенных пленок показывают, что они состоят из извитых нитей, лежащих рядом так, как этого можно было бы ожидать в результате искажения при уплощении пучков спиралей. Эти правильные агрегаты получались только в очищенных взвесях жгутиков, неочищенные препараты давали только аморфное вещество. Кроме того, хорошо известно, что жгутиковые пучки очень часто обнаруживаются в окрашенных препаратах бактерий, выращенных в бульоне, или при исследовании в темном поле, или при фазово-контрастной микроскопии живых свермеров протея; возможно, что эти пучки возникают благодаря агрегации в результате действия гидродинамических сил жгутиков, пока они еще подвижны, до отделения от бактерий.

Жгутики могут быть осаждены из очищенной взвеси многочисленными различными агентами, осаждающими белки. Кроме сернокислого аммония и спирта, о которых упоминалось выше, фосфорно-вольфрамовая кислота и соли ртути осаждают взвешенные жгутики Bacillus subtilis (Коффлер и Меллет, 1952). Крейджи (1931) нашел, что сернокислый аммоний вызывает хлопчатую Н-типа агрегацию жгутиковых Salmonella typhi, тогда как безжгутиковая взвесь давала только мелкие, О-типа, зерна. Вообще отделенные от тел бактерий жгутики не агрегируют спонтанно в бульоне и т. п. Гендерсон (Henderson, 1932) сообщил, что взвеси подвижных Clostridium chauvoei, прогретые в течение 5 минут при 100°, оказались стабильными, в то время как негретые культуры агглютинировались спонтанно при всех испытанных условиях; возможно, что нестабильность зависит от наличия жгутиков со спонтанной тенденцией к агрегации, но нельзя исключить и другие объяснения, например присутствие некоторого другого термолабильного поверхностного компонента.

При выращивании бактерий на плотной среде иногда образуются очень большие пучки жгутиков; они могут быть значительно толще, чем сами бактерии [Малвоц (Malvoz), 1902]. Едва

ли эти крупные пучки возникают благодаря движению жгутиков; возможно, что и в данном случае имела место спонтанная агрегация жгутиков.

МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЖГУТИКОВ

Очень мало известно относительно механических свойств жгутиков; доводы об упругости и других свойствах этих мелких структур рассматриваются с сомнением, так как они больше основываются на интуиции или аналогии с более крупными объектами, чем на вычислении. Однако некоторые выводы сделать можно. Могут быть предложены три гипотезы относительно источника энергии, потребной для движения концевой части жгутика или жгутикового пучка. Механическая энергия может возникать местно, например в результате химической реакции; энергия может быть механически передана от основания жгутика, например при вращении упругой спирали; энергия может быть передана центробежно по инерции от основания, как это наблюдается, когда серия завитков передается вниз по веревке, один конец которой движется быстро из стороны в сторону. Последняя из этих гипотез, по-видимому, исключается путем подсчета степени силы вязкого сопротивления для тела величины жгутика, движущегося с наблюдаемой скоростью, и скорости движения его сегмента. По этим величинам можно приблизительно вычислить время, нужное для того, чтобы скорость сегмента жгутика была снижена до нуля. Эти подсчеты показывают, что сегмент жгутика, двигающегося только благодаря своей собственной инерции, был бы переведен в покоящееся состояние фактически немедленно, в промежуток времени, слишком короткий для того, чтобы вычислить его для наблюдаемого движения. Однако, поскольку нет достаточного основания сомневаться в первой гипотезе (возникновение механической энергии на конце жгутика), невозможно сделать какое-либо заключение относительно способности жгутика поддерживать передачу механической энергии.

Квиттинген (1955) наблюдал, что не прикрепленные к бактериям пучки жгутиков отталкивались в сторону, не изгибаясь при толчках подвижными нитями протея. Его вывод, что пучки являются упругими, справедлив, хотя без подсчета степени интенсивности участвующих сил нельзя говорить о том, указывают эти наблюдения или нет на степень упругости, обозначаемую термином «упругость» при применении к более крупным объектам. Его вывод, что пучки легкие, не кажется достоверным; неактивная устойчивость пучков, даже если допустить, что они очень тяжелые, должна была бы быть совершенно незначительной сравнительно с вязким сопротивлением жидкой среды.

Отрыв жгутиков от бактериальных тел и их последующая фрагментация, вызванные энергичным встряхиванием, должны

быть следствием давления, оказываемого вязкой сопротивляемостью, когда среда, в которой взвешены бактерии, подвергается быстрому резкому движению. Данные, полученные в сообщавшихся опытах по отделению жгутиков путем встряхивания, не позволяют произвести даже приблизительный подсчет интенсивности этой скорости; если бы это было известно, следовало бы подсчитать приблизительное напряжение, необходимое для того, чтобы оторвать отдельный жгутик.

При исследованиях по генетике подвижности были обнаружены явления, относящиеся к этой проблеме (Стокер, неопубликовано). Первое заключается в том, что клетки Salmonella, втянутые в микропипетку, а затем удаленные из нее, обычно остаются по-прежнему подвижными, даже если диаметр отверстия пипетки составляет всего 2—3 μ. Второе — клетка может иногда быстро кружиться вокруг неподвижной точки в течение нескольких минут — род движения, который может быть объяснен, если принять, что жгутики (или жгутик) прикрепляют клетку к определенному месту. Когда подвижные клетки переносятся микропипеткой в гомологичную Н-антисыворотку, их перемещающееся движение прекращается по образцу второго описанного выше явления, но некоторые из них двигаются уже описанным путем или крутятся вокруг оси, проходящей через их тело, или выявляют регулярно повторяющееся судорожное движение. Этот род движения, отмеченный Аркрайтом (1927) и Пийпером (1938), может продолжаться от нескольких минут до нескольких часов. В отдельных случаях можно наблюдать две клетки, обе активно подвижные, но тем не менее не отделяющиеся больше, чем на короткое расстояние; это, по-видимому, клетки, жгутики которых переплелись. Из этих наблюдений можно заключить, что жгутик или, возможно, пучок жгутиков обладает достаточной силой, необходимой для продвижения бактерии через среду. Она составляет по подсчету приблизительно 10^{-8} дин [Ангерер (Angerer), 1919]. Исходя из определения прочности шелка, было подсчитано, что прочность на разрыв одной полипептидной цепи составляет по крайней мере 10^{-4} дин [Голдекр (Goldacre), 1954], а жгутик, вероятно, состоит из нескольких параллельных полипептидных цепей; неудивительна поэтому неспособность прикрепленной клетки освободиться путем отрыва жгутика.

Наличие у бактерий Н-антигена в некоторой степени препятствует их агглютинации соматическими антителами, в частности если клетки были обработаны формалином или фенолом или прогреты в течение получаса при 80°. Это торможение, вероятно, обязано наличию жгутиков, так как оно исчезает, если жгутики удалены путем встряхивания (Крейджи, 1931). По-видимому, жгутики механически препятствуют случайному контакту сенсибилизированных бактериальных тел и, может быть, позволительно сделать вывод, что формалин повышает упругость жгутиков.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СТРУКТУРЫ, СВЯЗАННЫЕ СО ЖГУТИКАМИ

Анализ изолированных жгутиков показал, что они отличаются химически как от клеточной стенки, так и от протоплазмы клетки. Два рода наблюдений дают сведения относительно места возникновения жгутиков.

Удаление клеточной стенки Bacillus megaterium лизоцимом дает образование сферического протопласта, сохраняющего жгутики клетки (Вейбулл, 1953б). Если некоторые морские бактерии подвергаются действию дистиллированной воды, клеточные стенки могут отделяться, оставляя клеточное тело, к которому остаются прикрепленными жгутики [Джонсон, Зворыкин и Уоррен (Johnson, Zworykin, Warren), 1943]. Отсюда можно сделать заключение, что жгутики имеют точку прикрепления к какой-то клеточной структуре, лежащей глубже, чем упругая клеточная стенка. Вейбулл нашел, что протопласты неподвижны, несмотря на наличие жгутиков. Это удивительно с точки зрения того факта, что протопласты обнаруживают многие метаболические процессы целых клеток. Возможно, что их неподвижность обусловлена не неподвижностью жгутиков, а отсутствием упругой клеточной стенки, на которую они опираются. Автолизированные клетки различных видов обычно сохраняют свои жгутики, из чего можно заключить, что жгутики каким-то образом прикрепляются или к упругой клеточной стенке, или к какой-то структуре, которая остается соединенной с ней после того, как произошел автолиз.

Многие опубликованные электронные микрографии (например, ван Итерсон, 1953) показывают наличие в автолизированных клетках электронно-плотных зерен, по-видимому, располагающихся в точке возникновения жгутика. Эти базальные зерна иногда видны в относительно электронно-прозрачной периферической зоне, что, вероятно, обязано сокращению содержимого клетки при высушивании. У некоторых крупных спирилл полярная группа очень тонких жгутиков кажется соединенной с одним базальным зерном [Грейс (Grace), 1954]. Так как подобные зерна не обнаруживаются на многих электронных микрографиях, следует пока воздержаться от вывода, что у всех бактериальных видов имеется специализированная структура в основании каждого жгутика, хотя кажется возможным, что неудача в обнаружении ее может зависеть только от технических трудностей. Пока подобные базальные зерна не будут закономерно обнаруживаться, невозможно определить, возникают или нет базальные зерна всегда путем деления предсуществующих зерен, как это имеет место в отношении соответствующих зерен у реснитчатых.

Иногда утверждали, что явно координированная активность многочисленных жгутиков, например протея, требует наличия

какой-то внутренней управляющей структуры. Волокна, возможно несущие подобную функцию, были выявлены у реснитчатых. Однако у бактерий подобная «примитивная нервная система» не была обнаружена, и довод в пользу ее обязательного наличия ошибочен. При изучении в темном поле роящегося протея, взвешенного в вязкой среде, можно видеть длинные подвижные нити, каждая из которых, по-видимому, приводится в движение несколькими жгутиками (фактически жгутиковыми пучками), направленными кзади. Выше было показано, что только гидродинамические силы могут приниматься во внимание при агрегации отдельных активных жгутиков в пучки. Видимое совместное действие жгутиковых пучков остается еще неясным. Допустим, что у подвижной, но в данный момент не двигающейся бактерии угол, образуемый каждым пучком жгутиков относительно клетки, определяется лишь случайно, и допустим, что сила, проявляемая каждым пучком, относится к роду сил, которые могут возникать из собственного движения, а именно в виде толчка вдоль оси спирального пучка и вращения вокруг оси в направлении, обратном направлению спирали (Тейлор, 1952). Комбинированный эффект беспорядочно направленных толчков будет иногда случайно достаточен для того, чтобы двигать тело бактерии в направлении, параллельном его продольной оси. При этом вязкость среды окажет препятствие пучку жгутиков, продвигающемуся вперед, и вызовет двойную тенденцию движения назад к месту прикрепления его к клетке. Как результат подобного движения назад толчок пучка жгутиков приобретет более значительную силу, действующую в направлении первоначального движения тела, которое поэтому будет продолжаться с большей скоростью, вызывающей в свою очередь повышенное отклонение угла назад, и т. д. Таким образом, возникает несомненная согласованная активность.

ОБРАЗОВАНИЕ ЖГУТИКОВ

Если действительно в основании каждого жгутика имеется зерно, ему может быть присуще большое количество функций. Эстбери и др. (1955) полагают, что оно может порождать сигналы, которые обусловливают ритмические сокращения полипептидных цепей, составляющих жгутик. Зерно может быть источником энергии, потребной для движения жгутика. Представляется также вероятным, что оно имеет отношение к образованию жгутика, который, по-видимому, выталкивается в виде нити через отверстие в твердой клеточной стенке.

Очень мало известно относительно того, как скоро синтезируются жгутики и имеется или нет какое-либо заметное изнашивание его периферического конца. Некоторые предварительные опыты (Стокер, неопубликовано) наводят на мысль, что жгутики растут довольно быстро. Молодая культура подвижных Sal-

monella paratyphi B обрабатывалась в «смесителе», в котором небольшой пропеллер вращался со скоростью 18 000 об/мин. Трехминутная экспозиция уменьшала относительное содержание подвижных клеток с 80% с лишним до 1% и меньше без значительного снижения количества жизнеспособных живых клеток, но процентное отношение подвижных клеток начинает повышаться через несколько минут после окончания обработки. В присутствии бактериостатической концентрации хлорамфеникола увеличения процента подвижных клеток не наблюдалось, что указывает на то, что этот агент, считающийся специфически тормозящим синтез белка, задерживает также образование жгутиков. Необработанные клетки того же штамма, культивировавшиеся при 37° в присутствии бактериостатической концентрации хлорамфеникола, остаются подвижными в течение многих часов; это, по-видимому, указывает, что при движении бактерий в бульоне отсутствует быстрое отмирание или отрывание уже образовавшихся жгутиков.

НАСЛЕДОВАНИЕ ПОДВИЖНОСТИ И ЖГУТИКОВ

Генетика жгутикового характера изучалась в некоторых деталях у Salmonella, и отдельные опыты были проведены также на других родах бактерий. Эти опыты показали, что жгутиковые признаки, как и другие признаки, определяются комбинированным действием генов и окружающей среды. Гены, определяющие жгутиковые признаки, как и другие бактериальные гены, ведут себя так, как будто они расположены в правильном порядке в некоторой генетической органелле (или органеллах), по-видимому, аналогичной хромосомам более крупных организмов. Они подвергаются спонтанным мутациям, могут быть перенесены или трансдуцированы от клетки к клетке частицами фага умеренной вирулентности у Salmonella [Зайндер и Ледерберг (Zinder), 1952; Стокер, Зайндер и Ледерберг, 1953; Ледерберг и Эдуордс (Edwards), 1953], а у Escherichia coli они подвергаются рекомбинации в результате некоторых процессов конъюгации [Фарнесс и Роули (Furness, Rowley), 1955].

Бактерии, подобно многоклеточным организмам, получают гены от клеток предыдущей генерации; в отличие от многоклеточных организмов они получают также большую часть сомы их «родительской» клетки, и интересно рассмотреть способ распределения таких соматических структур, как жгутики, при клеточном делении.

Мы можем первоначально рассмотреть положение у стебельчатых бактерий, группы палочковидных бактерий, клетки которых в одной из стадий образуют на одном конце стебель, служащий для прикрепления их к каким-либо плотным веществам. Стебельчатый конец клетки может быть назван проксимальным

концом. Эти организмы обычно образуют полярный жгутик, и электронные микрографии одного штамма допускают некоторые выводы относительно отношения жгутика к клеточному делению (Хауинг, 1955). Свободно плавающие клетки не имеют стебля и образуют единственный жгутик на одном полюсе. Считается, что свободно плавающие клетки прикрепляются одним концом к плотному субстрату и образуют стебель на прикрепленном конце. Стебельчатые клетки, которые не делятся, обычно имеют один жгутик, возникающий из прикрепленного конца стебля, и некоторые предполагают, что свободно плавающие клетки прикрепляются полюсом, несущим жгутик. Стебельчатые клетки, делящиеся, как видно, путем поперечного сжатия, образуют жгутик на своем периферическом конце, другими словами на конце, который составит один полюс бесстебельчатой свободно живущей дочерней клетки. Можно с уверенностью заключить из электронных микрографий, что у этого штамма и у другого, в общем сходного, описанного Боуерсом, Уивером, Грула и Эдуордсом (Bowers, Weaver, Grula, 1954), жгутик и стебель родительской клетки образуют часть дочерней клетки, тогда как оставшаяся часть приобретает вновь образующийся жгутик. У этого организма, следовательно, клеточное деление несимметрично, как и у многих одноклеточных организмов, например дрожжей, у которых одна дочерняя клетка, почка, имеет новую клеточную стенку, а другая сохраняет родительскую клеточную стенку.

У большинства палочковидных бактерий с полярным расположением жгутиков не существует ясной разницы между двумя концами палочки, кроме наличия жгутика или жгутиков только на одном конце многих или большинства клеток. Однако нет оснований сомневаться, что жгутики распределяются при клеточном делении так же, как и у стебельчатых бактерий; одна клетка получает жгутик или пучок жгутиков родительской клетки, тогда как другая приобретает вновь образующийся жгутик.

У бактерий с перитрихиальным расположением жгутиков положение менее ясное. Окрашенные препараты и электронные микрографии выявляют наличие некоторого процента клеток с несколькими жгутиками на одной половине клетки и отсутствием жгутиков на другой. Это явление было объяснено, например, Байссетом (Bisset, 1951) тем, что эти клетки находятся в состоянии деления на клетку, сохраняющую клеточную стенку и жгутики родительской клетки, и клетку, имеющую вновь образованную клеточную стенку, через которую «новые» жгутики еще не вышли наружу. Так как подвижная бактерия обычно делится на две подвижных дочерних клетки, необходимо полагать, что к тому времени, когда деление завершается, «новые» жгутики уже развились достаточно для того, чтобы сообщить клетке подвижность. Однако этот род толкования не был общепринятым (Мигула, 1897). Возможна альтернативная теория, согласно которой при клеточном делении исходные жгутики распределяются

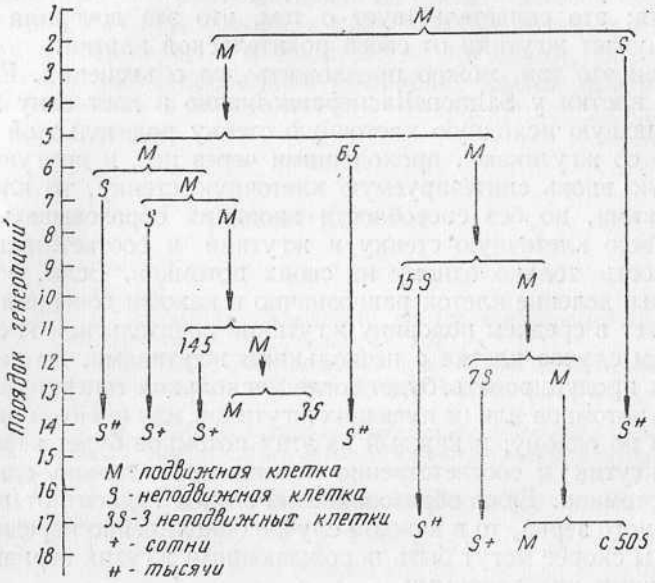
между двумя дочерними клетками почти в равных количествах. Если принято, что точка прикрепления жгутика постоянна относительно клеточной стенки, то это требует допущения, что клеточная стенка растет путем наслоения вдоль ее длины предпочтительнее, чем путем наслоения только на одном ограниченном растущем конце (Байссет, 1951). Феномен однолинейной передачи подвижности, описанный ниже, по-видимому, относится к этому вопросу.

ОДНОЛИНЕЙНАЯ ПЕРЕДАЧА ПОДВИЖНОСТИ

Этот феномен был обнаружен при исследованиях трансдукции подвижности с подвижных на неподвижные штаммы Salmonella; позже оказалось, что он встречается также при других обстоятельствах, так что не обязательно описывать здесь феномены полной и незавершенной трансдукции подвижности (Стокер и др., 1953; Стокер, неопубликовано; Ледерберг, личное сообщение). Если клетка, имеющая определенный признак, делится и дает одну клетку без этого признака и одну клетку, обладающую им, если вторая клетка в свою очередь дает лишь одну клетку с данным признаком и если процесс продолжается при последующих делениях, в таком случае признак никогда не будет обнаруживаться больше, чем у одной из потомков исходной клетки. Признак будет проходить до конца только в одной линии родословной и только у единственного потомка в каждой генерации, и может поэтому быть назван *однолинейно передаваемым* (Стокер, не опубликовано).

Однолинейная передача признака подвижности наблюдалась у многих неподвижных штаммов Salmonella, встречающихся после того, как клетка несомненно приобрела передаваемую по наследству способность строить локомоторный аппарат. Клетки с этой наследуемой способностью могут возникать путем трансдукции; у некоторых штаммов, однако, иногда они появляются спонтанно. Так как последняя возможность менее сложна, она будет описана первой. Некоторые неподвижные (не имеющие жгутиков) штаммы салмонелл редко или никогда не дают мутаций в виде стабильных подвижных вариантов; тем не менее в бульонных культурах некоторых таких штаммов можно обнаружить наличие очень малого процента подвижных клеток. Мой сотрудник К. Кведлинг (C. Quadling) изолировал подобные подвижные клетки при помощи микроманипулятора и проследил подвижность их потомства. Рис. 1 иллюстрирует один подобный опыт, в котором подвижная клетка была изолирована из культуры штамма S. typhimurium SW545; у этого штамма подобные подвижные клетки встречались в соотношении около 10^{-5}—10^{-6}. Можно увидеть, что подвижная клетка, изолированная из бульонной культуры, делилась на две, из них одна была неподвижна

и давала лишь неподвижное потомство, тогда как другая сама была подвижна, но при делениях давала восемь потомков, из которых только две клетки были подвижны. Последние в свою очередь были изолированы; каждая передавала подвижность только одному из своих потомков. Однолинейная передача была показана на протяжении 8 генераций в одной линии и на протя-



Родословная потомства подвижной клетки, изолированной при помощи микроманипулятора из культуры штамма S. typhi murium SW545. Предметное стекло с каплей, содержащей изолированную клетку, культивировали при комнатной температуре и периодически исследовали; подвижные клетки потомства переносили в отдельные капли, как указано выше (данные К. Куэдлинг).

жении 13 генераций в другой. У других неподвижных штаммов подвижные клетки были получены при абортивной или неполной трансдукции при помощи фага, полученного путем лизиса клеток подвижных штаммов. Среди потомства таких клеток была выявлена однолинейная передача подвижности на протяжении более чем 20 генераций (Стокер, неопубликовано) и на протяжении более чем 60 генераций (Ледерберг, личное сообщение).

Гомологичная противожгутиковая сыворотка останавливает движение клеток, которым подвижность была передана однолинейно; их подвижность поэтому обязана наличию одного или больше жгутиков. Клетка, подвижность которой была передана однолинейно, образует неподвижное потомство, неотличимое от

клеток родительского штамма и, подобно последнему, безжгутиковое. Наблюдавшаяся передача подвижности по одной линии потомства, следовательно, представляет соответственную передачу жгутика или жгутиков или способность синтезировать жгутики. Когда наблюдается фактический момент деления, подвижная клетка того типа, о котором говорится выше, всегда производит одну дочернюю клетку, которая неподвижна с момента отделения; это свидетельствует о том, что эта дочерняя клетка не получает жгутики от своей родительской клетки.

Если это так, можно предложить два объяснения. Если деление клетки у Salmonella неравнозначно и дает одну клетку, получающую исходную клеточную стенку родительской клетки вместе со жгутиками, проходящими через нее, и другую, получающую вновь синтезируемую клеточную стенку, то клетка со жгутиками, но без способности вновь их образовывать, передаст свою клеточную стенку и жгутики и соответственно подвижность только одному из своих потомков. Если, с другой стороны, деление клеток равнозначно и каждая дочерняя клетка получает в среднем половину жгутиков родительской клетки, то в таком случае клетка с несколькими жгутиками, но неспособная их продуцировать, будет после нескольких генераций производить потомков или не имеющих жгутиков, или имеющих каждый только по одному; и каждый из этих потомков будет передавать свой жгутик и соответственно подвижность только одной линии потомков. Если образование жгутиков зависит от наличия базального зерна, то в каждом случае однолинейно передаваемые частицы скорее могут быть порождающими жгутик зернами, чем жгутиками как таковыми.

Хотя экспериментальные результаты, полученные до сих пор, не допускают окончательного решения в пользу одной из этих гипотез, некоторые соображения поддерживают гипотезу равнозначного клеточного деления и однолинейной передачи жгутика или определяющего жгутик зерна. Исходная клетка в родословной, показанной на рисунке, производит два подвижных потомка, каждый из которых передает подвижность однолинейно; в других опытах количество подобных подвижных потомков достигало восьми. Согласно гипотезе равнозначного клеточного деления и однолинейной передачи жгутиков, клетка, производящая подобное потомство, является, вероятно, клеткой с восемью жгутиками; по другой гипотезе неравнозначного клеточного деления и однолинейной передачи клеточной стенки и жгутика, проходящего через нее, подобная клетка является одной из тех, чье потомство сохранило на время способность производить жгутики, так что все ее восемь потомков третьей генерации обладают этой способностью, которая затем утрачивается. Клетки, которые дают начало нескольким подвижным потомкам, кажутся более подвижными, чем клетки, которые передают подвижность только одному потомку, так как первые, но не по-

следние, способны проникать через полужидкую среду. Это могло бы быть объяснено, если бы первые клетки имели несколько жгутиков, а последние — только один. Теоретически можно было бы непосредственно определить, имеют ли клетки, подвижные по однолинейной передаче, каждая по одному жгутику, как этого требует гипотеза равнозначного клеточного деления и однолинейной передачи единственного жгутика. Однако подобные клетки могут быть распознаны с уверенностью только в генеалогических экспериментах и технические трудности, затрудняющие изучение селектированных единичных клеток при помощи окраски жгутиков или электронной микроскопии, до сих пор еще не преодолены.

ЛИТЕРАТУРА

Angerer V. (1919). Über die Arbeitsleistung eigenbeweglicher Bakterien. Arch. Hyg., *88*, 139.

Arkwright J. A. (1914). Experiments on the agglutination of watery extracts of B. typhosus. J. Hyg., Camb. *14*, 261.

Arkwright J. A. (1927). Microscopic evidence of the different manner of clumping of motile bacteria with somatic and flagellar agglutinins. J. Path. Bact., 30, *566*.

Arkwright J. A. (1931). A system of Bacteriology in Relation to Medicine, vol. 6, chapter 12: Agglutination. Medical Research Council. London: H. M. Stationery Office.

Astbury W. T. (1951). Some recent adventures among the proteins. Pubbl. Staz. zool. Napoli, 23, Suppl. p. 1.

Astbury W. T., Beighton E. & Weibull C. (1955). The structure of bacterial flagella. In Fibrous Proteins and their Biological Significance. (Symp. Soc. exp. Biol. *9*, 282.) Cambridge University Press.

Astbury W. T. & Weibull C. (1949). X-ray diffraction study of the structure of bacterial flagella. Nature, Lond., *163*, 280.

Bernstein A. & Lederberg J. (1955). Agglutination of motile Salmonellas by acridines. J. Bact. *69*, 142.

Bisset K. A. (1951). The development of the surface structures in dividing bacteria. J. gen. Microbiol. *5*, 155.

Boivin A. & Mesrobeanu L. (1938). Sur la résistance à l'acide trichloracétique de l'antigène flagellaire (antigène H) du bacille typhique et sur la nature chimique possible de cet antigène. C. R. Soc. Biol., Paris, *129*, 136.

Bowers L. E., Weaver R. H., Grula E. A. & Edwards O. F. (1954). Studies on a strain of Caulobacter from water. I. Isolation and identification as caulobacter vibrioides Henrici and Johnson with emended description. J. Bact. *68*, 194.

Bradfield J. R. & Cater D. B. (1952). Electron-microscopic evidence on the structure of spirochaetes. Nature, Lond., *169*, 944.

Brinton C. B. Jr., Buzzell A. & Lauffer M. A. (1954). Electrophoresis and phage susceptibility studies on a filament-producing variant of the E. coli B bacterium. Biochim. biophys. Acta, *15*, 533.

Conn H. J. & Wolfe G. E. (1938). The flagellation of bacteria. Science, *87*, 283.

Craigie J. (1931). Studies on the serological reactions of the flagella of B. typhosus. J. Immunol. *21*, 417.

Furness G. & Rowley D. (1955). Transfer of motility by Escherichia coli K12 to E. coli B. J. gen. Microbiol. 12, v (abstract).

Gard S. (1944). Preparation of bacterial flagella. Ark. Kemi Min. Geol. *19A*, no. 21.
Gard S., Heller L. & Weibull C. (1955). Immunological studies on purified flagella from Proteus X19. Acta path. microbiol. scand. *36*, 30.
Goldacre R. J. (1954). Cristalline bacterial arrays and specific long-range forces. Nature, Lond., *174*, 732.
Grace J. B. (1954). Some observations on the flagella and blepharoplasts of Spirillum and Vibrio spp. J. gen. Microbiol. *10*, 325.
Griffin A. M. & Robbins M. L. (1944). The flagellation of Listeria monocytogenes. J. Bact. *48*, 114.
Henderson D. W. (1932). Studies on Clostridium chauvoei. I. The analisis of the „H" and „O" antigens of C. chauvoei. Brit. J. exp. Path. *13*, 412.
Herbert D. (1951). Hydrodynamic aspects of bacterial locomotion. J. gen. Microbiol. *5*, xx(abstract).
Houwink A. L. (1955). Caulobacter, its morphogenesis, taxonomy and parasitism. Leeuwenhoek ned. Tijdschr. *21*, 49.
Houwink A. L. & van Iterson W. (1950). Electron microscopical observations on bacterial cytology. II. A study on flagellation. Biochim. biophys. Acta *5*, 10.
Jenkins C. E. (1946). The preparation of pure flagellar antigens from Salmonella. Brit. J. exp. Path. *27*, 121.
Johnson F. H., Zworykin N. & Warren G. (1943). A study of luminous bacterial cells and cytolysates with electron microscope. J. Bact. *46*, 167.
Kingma Boltjes T. Y. (1948). Function and arrangement of bacterial flagella. J. Path. Bact. *60*, 275.
Koffler H. & Mallett G. E. (1952). Sind Bakterien-Geisseln aktive Bewegungs-organe oder nur Fäden der Aussenschicht? Zbl. Bakt. Abt. I, Orig., *158*, 357.
Kvittingen J. (1955). Some observations on the nature and significance of bacterial flagella. Acta path. microbiol. scand. *37*, 89.
Labaw L. W. & Mosley V. M. (1954). Periodic structure in the flagella and cell walls of a bacterium. Biochim. biophys. Acta, *15*, 325.
Labaw L. W. & Mosley V. M. (1955). Periodic structure in the flagella of Brucella bronchiseptica. Biochim. biophys. Acta *17*, 322.
Lederberg J. & Edwards P. R. (1953). Serotypic recombination in Salmonella. J. Immunol. *71*, 232.
Leifson E. (1951). Staining, shape and arrangement of bacterial flagella. J. Bact. *62*, 377.
Leifson E., Carhart S. R. & Fulton M. (1955). Morphological characteristics of flagella of Proteus and related bacteria. J. Bact. *69*, 73.
Leifson E. & Hugh R. (1953). Variation in shape and arrangement of bacterial flagella. J. Bact. *65*, 263.
Malek I. (1938). Influence de l-antigène H d'Eberthella typhi sur la floculation par les ions H. C. R. Soc. Biol., Paris, *129*, 795.
Malvoz E. (1902). Sur les cils composés. Ann. Inst. Pasteur. *16*, 686.
Migula W. (1897). System der Bacterien. Jena: Fischer.
Miles A. A. & Pirie N. W. (1949) (Edit). The Nature of the Bacterial Surface. Oxford: Blackwell.
Nakaya R., Uchida H. & Fukumi H. (1952). Studies on the antigenic patterns of bacterial flagella. Jap. J. med. Sci. Biol. *5*, 467.
Neumann F. (1928). Die Sichtbarmachung von Bacteriengeisseln am lebenden Objekt im Dunckelfeld. II. Mitteilung. Zbl. Bakt. Abt. I, Orig., *109*, 143.
Ogonuki H. (1940). Acid agglutination in Salmonella group. Kitasato Arch. *17*, 80.
Pijper A. (1938). Dark-ground studies of flagellar and somatic agglutination of B. typhosus. J. Path. Bact. *47*, 1.
Pijper A. (1946). Shape and motility of bacteria. J. Path. Bact. *58*, 325.
Pijper A. (1947). Methylcellulose and bacterial motility. J. Bact. *53*, 257.
Pijper A. (1951). Bacterial flagella. Nature, Lond,. *168*, 749.

Pijper A. (1955). Shape of bacterial flagella. Nature, Lond., *175*, 214.
Pijper A. & Abraham G. (1954). Wavelengths of bacterial flagella. J. gen. Microbiol. *10*, 452.
Robertis E. de & Franchi C. M. (1951). Electron microscopic observation on the fine structure of bacterial flagella. Exp. Cell Res. *2*, 295.
Scholtens R. Th. (1938). The importance of receptor analysis for the study of physico-chemical properties of typhoid bacilli. J. Hyg., Camb., *38*, 273.
Sertic V. & Boulgakov N.-A. (1936). L'agglutination par la trypaflavine des Salmonella de structure antigénique flagellaire non-spécifique. C. R. Soc. Biol., Paris, *123*, 951.
Smith I. W. (1954). Flaggelation and motility in Aerobacter cloacae and Escherichia coli. Biochim. biophys. Acta, *15*, 20.
Starr M. P. & Williams R. C. (1952). Helical fine stucture of flagella of a motile diphteroid. J. Bact. *63*, 701.
Stocker B. A. D., Zinder N. D. & Lederberg J. (1953). Transduction of flagellar characters in Salmonella. J. gen. Microbiol. *9*, 410.
Stokes J. L. (1954). Studies on the filamentous sheathed iron bacterium Sphaerotilus natans. J. Bact. *67*, 278.
Taylor G. (1951). Analisis of the swimming of microscopic organisms. Proc. Roy. Soc. A, *209*, 447.
Taylor G. (1952). The action of waving cylindrical tails in propelling microscopic organisms. Proc. Roy. Soc. A, *211*, 225.
Uchida H., Sunakawa S. & Fukumi H. (1952). Studies on the bacterial flagella. I. Methods of purification. Jap. med. Sci. Biol. *5*, 351.
van Iterson W. (1953). Some remarks on the present state of our knowledge of bacterial flagellation. Bacterial Cytology, Symp. 6th Congr. Int. Microbiol., Rome, p. 24.
Wei H. (1936). A study of bacterial flagella by dark-field illumination. Chin. med. J., Suppl. *1*, 135.
Weibull C. (1948). Some chemical and physico-chemical properties of the flagella of Proteus vulgaris. Biochim. biophys. Acta, *2*, 351.
Weibull C. (1949a). Chemical and physico-chemical properties of the flagella of Proteus vulgaris and Bacillus subtilis. A comparison. Biochim. biophys. Acta, *3*, 378.
Weibull C. (1949б). Morphological studies on salt precipitated bacterial flagella. Ark. Kemi. *1*, 21.
Weibull C. (1950a). Ordered aggregation of salted out and dried bacterial flagella. Ark. Kemi Min. Geol. *1*, 573.
Weibull C. (1950б). Electrophoretic and titrimetric measurements on bacterial flagella. Acta chem. scand. *4*, 260.
Weibull C. (1950в). Investigation on bacterial flagella. Acta Chem. scand. *4*, 268.
Weibull C. (1951a). Some analytical evidence for the purity of Proteus flagella protein. Acta chem. scand. *5*, 529.
Weibull C. (1951б). Movement of bacterial flagella. Nature, Lond. *167*, 511.
Weibull C. (1951б). Bacterial flagella as fibrous macromolecules. Disc. Faraday Soc. *11*, 195.
Weibull C. (1953a). The free amino groups of the Proteus flagella protein. Quantitative determination of dinitrophenyl amino acids using paper chromatography. Acta chem. scand. *7*, 335.
Weibull C. (1953б). The isolation of protoplasts from Bacillus megaterium by controlled tretment with lysozyme. J. Bact. *66*, 688.
Weibull C. & Hedvall J. (1953). Some observations of fractions of disintegrated bacterial cells obtained by differential centrifugations. Biochim. biophys. Acta, *10*, 35.
Weibull C. & Tiselius A. (1945). Note on the acid hydrolysis of bacterial flagella. Ark. Kemi Min. Geol. *20B*, no. 3.
Zinder N. D. & Lederberg J. (1952). Genetic exchange in Salmonella. J. Bact. *64*, 679.

КАПСУЛЫ БАКТЕРИЙ И ИХ ОТНОШЕНИЕ К КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ

Я. ТОМЧИК

Институт гигиены и бактериологии, Базельский университет

Просматривая литературу, с трудом удерживаешься от мысли, что на разработку методов окраски капсул расходовалось непропорционально много усилий сравнительно с выяснением ее природы. Не всегда отдавали себе отчет, что окраска, сопровождающаяся фиксацией и протравливанием, ведет неизменно к сморщиванию капсулы, обязанному высокому содержанию воды в ней. Вследствие этого подобные препараты не могут дать надежной картины ее морфологии в нативном состоянии. Еще менее пригодны для этих целей электронно-микроскопические исследования, связанные с необходимостью полного высушивания. Только влажные препараты, такие как пленка туши, могут дать сравнительно точные представления относительно формы и размеров капсулы. Во всяком случае влажными пленками можно пользоваться при применении антител как специфических иммунохимических индикаторов для выявления химической природы и сложного строения капсулы. Игнорирование этого обстоятельства привело к большому количеству ошибочных утверждений и к расхождению в номенклатуре, которое частично существует и сейчас. Выражение «реакция набухания капсулы» до сих пор общеупотребительно даже тогда, когда в большинстве случаев не обнаруживается признаков набухания. Значительное расхождение взглядов, которые были высказаны относительно бактериальной капсулы, могут оправдать автора в его стремлении рассмотреть в первой части этого обзора некоторые элементарные представления, а также некоторые наблюдения, приводимые в старой литературе.

ВЫЯВЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КАПСУЛЫ

Бактериальная капсула обычно определяется как микроскопически обнаруживаемый, желеобразный или слизистый слой, покрывающий клеточную стенку и имеющий четко очерченную

внешнюю поверхность. Это определение было бы несомненным, если бы мы могли точно охарактеризовать внешние поверхности как клеточной стенки, так и капсулы, и если бы капсула не представляла собой не что иное, как гомогенный желеобразный или слизистый слой. Однако, как будет указано позже, точно определить поверхность клеточной стенки не всегда легко. Последующие трудности возникают в отношении индивидуального толкования того, что следует понимать под четко очерченной внешней поверхностью капсулы. Некоторые бактериологи говорят об оболочке вместо капсулы, если внешняя граница не отчетлива или если она имеет тенденции к растворению, особенно тогда, когда бактерии взвешены на несколько часов в воде. Другие допускают, что на поверхности одного и того же микроорганизма могут существовать как капсула, так и оболочка; внутренний более компактный слой, соответствующий капсуле, а наружный рыхлый слой — оболочке. Наконец, бактериальная капсула может рассматриваться в каждом случае только как гомогенный слизистый слой однородного коллоидального вещества. Действительно, у Bacillus megaterium имеется определенная структура [Томчик (Tomcsik), 1951]. Вместо того чтобы искать полноценное определение бактериальной капсулы, данный обзор ставит целью описать различные стороны ее морфологии, химической природы и ее отношения к клеточной стенке и определить, может ли быть установлена существенная разница между капсулой, оболочкой и клеточной стенкой.

Метод с тушью для выявления бактериальной капсулы был открыт Бурри (Burri, 1909) и модифицирован Прейсом (Preisz, 1911). Именно влажный тушевой метод Прейса дает при несложной технике наиболее точные данные относительно формы и размера капсулы. Это мнение автора разделяется среди других Дагидом (Duguid, 1951), а также Эдуордсом и Файфом (Edwards, Fife, 1952). Прекрасное описание техники дано Дагидом (1951). Можно легко избежать ошибочных толкований капсул, кажущихся очень крупными, или узких капсул соответственно в очень тонких или толстых слоях. Если внимание привлечено к этой детали, то о размере капсулы можно правильно судить по влажному мазку с тушью, и подобные препараты могут служить основанием для наблюдений, касающихся разбухания или сморщивания капсулы, вызванных неспецифическими агентами или специфическими антителами. Во влажных тушевых препаратах между бактериальным телом (протопластом) и капсулой можно наблюдать зону дифракции около 0,2 μ шириной. Об этой зоне редко упоминается, а когда это случалось, она рассматривалась различно. Тениссен (Toenniessen, 1919) описал ее как эктоплазму, Этингер-Тульчинская (Etinger-Tulczynska, 1933) — как капсулу, а Дагид (1951) — как ореол дифракции, обрисовывающий внешнюю поверхность бактерии. Тениссен, который первым изолировал капсульный полисахарид из Klebsiella, в своих ранних ра-

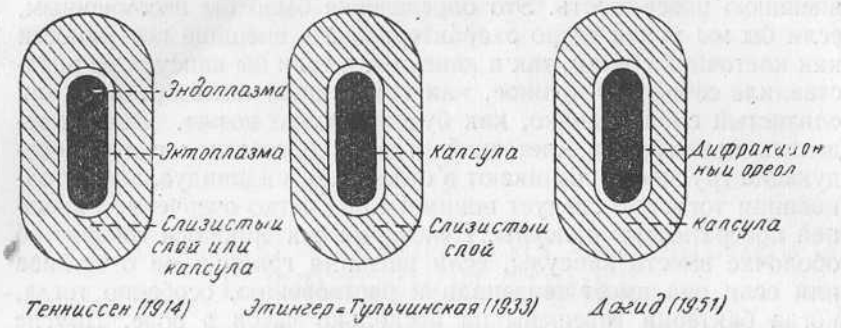


Рис. 1. Обозначения поверхностных структур капсульных бактерий.

ботах (1912, 1914) применял поочередно названия «капсула», «оболочка», «слизистый слой» и «внешний слой» («Kapsel», «Schleimhülle», «Gallerthülle», «Aussenhülle»). Позже (1919, 1920) он различал эктоплазму и оболочку, но описывал то и другое как синонимы капсулы. Он рассматривал эктоплазму как неотъемлемый компонент живой бактериальной клетки, а оболочку (слизистый слой или Gallerthülle) — как продукт секреции, содержащий галактан. Названия, употреблявшиеся Эттингер-Тульчинской (1933), еще менее понятны: они должны быть тем не менее упомянуты, так как ее работа приводит ко всеми принятому выражению «реакция набухания капсул». Дагид (1951) указывает ясно, что Эттингер-Тульчинская дала наименование «капсула» узкому светлому ореолу на поверхности клетки, а название «слизистый слой» — широкой наружной капсуле. Он подчеркивает, что узкий дифракционный ореол не должен приниматься ошибочно за узкую капсулу. По моему мнению, зона дифракции указывает на положение клеточной стенки, которая непосредственно не обнаруживается в препаратах с тушью даже при фазово-контрастной микроскопии.

В ранней литературе некоторых авторов, большей частью изучавших окрашенные препараты, допускается существование капсульной мембраны на наружной поверхности. Черчмен и Емельянов (Churchman, Emelianoff, 1933) думали, что капсула может представлять собой даже мешок, по временам спадающийся, по временам набухающий. Существование капсульной оболочки никогда не было доказано или даже воспроизведено с достоверностью. Конечно, случайная окраска поверхности капсулы не может рассматриваться как доказательство ее наличия. Периферическая капсульная реакция, видимая в микроскоп, может быть вызвана закономерно при помощи соответствующей концентрации специфического антитела, но при более высокой концентрации то же самое антитело реагирует очень быстро с внутренней частью капсулы, указывая, что реагирующая субстанция на поверхности и в более глубоких слоях одна и та же. Следова-

тельно, нет основания для каких-либо попыток дифференцировать капсулу и оболочку путем поисков самостоятельной поверхностной оболочки.

О вирулентных штаммах Pneumococcus, Klebsiella, Bacillus anthracis и о большинстве микроорганизмов со сходной поверхностной структурой обычно говорят как о капсульных бактериях. Не было достигнуто, однако, единого мнения в описании поверхностного материала Pasteurella pestis. Роуленд (Rowland, 1914) отличал капсульные варианты от вариантов, которые образуют оболочку. По этому автору оболочки не имеют определенной ограничивающей мембраны; часто скопление организмов включено в сплошную массу вещества. Он мог окрашивать капсулу, но не оболочку P. pestis. Шютце (Schütze, 1932) разделяет его мнение и указывает, что оболочки чумных палочек, взвешенных в физиологическом растворе, полностью растворяются при 60°. Культивируя P. pestis в казеиново-гидролизатном бульоне, Сил (Seal, 1951), а также Бекер, Соммер, Фостер, Мейер и Мейер (Baker, Sommer, Foster, E. Meyer, K. Meyer, 1947, 1952) получили вещество оболочки преимущественно в растворенном состоянии. С другой стороны, Сокхей (Sokhey, 1940) придерживается мнения, что капсула P. pestis представляет собой составную часть структуры бактерии и при выращивании на плотной среде периферия бактерии окрашивается очень интенсивно, создавая впечатление капсульной оболочки. По Эмису (Amies, 1951), является обычным, хотя, вероятно, неправильным, описывать капсулу и оболочку как отдельные единицы. Он думает, что оболочка — не больше, чем особенно хорошо развившаяся капсула. Применяя агаровую среду, содержащую обработанную пепсином кровь, он при помощи тушевых препаратов показал наличие особой капсулы, которая не растворялась полностью при комнатной температуре в течение часа, даже при воздействии 0,5 M KSCN, обычно высокоэффективного. Энгельсберг и Леви (Engelsberg, Levy, 1954) выдвинули другой аргумент для признания поверхностного вещества P. pestis оболочкой, констатируя, что высокое содержание в этом веществе белка делает невероятным, что оно может возникать как модификация клеточной стенки — критерий, приписываемый истинной капсуле Эттингер-Тульчинской (1933). Мы намереваемся показать позже, что этот критерий совершенно ошибочен.

Эти данные были цитированы для того, чтобы иллюстрировать тип доказательств, выдвигавшихся для отличия между капсулой и оболочкой. Но мы не в состоянии усмотреть существенную разницу между той и другой.

Если не считать генетических свойств данного штамма, в первую очередь культуральные условия определяют, поступает ли капсула легко в раствор в виде слизи или она плотно прилежит в виде компактной массы к клеточной стенке. Существует промежуточная стадия, в которой не выявляется четко ограни-

ченная и, видимо, целая поверхность, которая может быть описана как оболочка. Даже если это наименование предпочитается, то очевидно, что не может быть проведена четкая разница между капсулой и оболочкой. Оболочка, слизистый слой и слизь могут часто наблюдаться как различные стадии растворения капсулы, в которых, по крайней мере пока это касается серологически активных компонентов, участвуют одни и те же вещества.

Капсульная субстанция, как будет показано позже, часто отличается от субстанций, которые образуют составную часть клеточной стенки. Отсюда возникает вопрос, должно ли рассматриваться вещество, лежащее на поверхности клеточной стенки, но не образующее составную часть ее, как капсула, даже если оно не обнаруживается в микроскоп. Размещение и свойства М-протеина стрептококков группы А несомненно разъясняют этот вопрос. По Лендсфилду (Lancefield, 1943), М-протеин может быть легко выделен из живых клеток при переваривании трипсином без нарушения жизнеспособности бактерий. Кроме того, он отличается очень резко как химически, так и серологически от находящейся под ним клеточной стенки, которая содержит группо-специфический полисахарид и не может быть, таким образом, удалена. Следовательно, можно допустить наличие микроскопически невидимой капсулы у, по-видимому, бескапсульного варианта капсульной бактерии, не уклоняясь слишком далеко от установленных представлений, если оба штамма могут агглютинироваться одним и тем же капсульным антигеном. Барроу (Burrows, 1955) наблюдал аналогичную устойчивость к фагоцитозу капсульного и вирулентного бескапсульного штамма Pasteurella pestis. Он допускал наличие невидимой, но тем не менее эффективной степени капсуляции у последнего. Кажется логичным допустить наличие капсульного слоя, даже если он невидим, в том случае, когда поверхностный компонент, наружный относительно клеточной стенки, может быть обнаружен при помощи химически определенного антитела.

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ КАПСУЛЫ

Окраска

Обилие методов, предложенных в последнее время для окраски капсулы, вызывает подозрение, что ни один из них не дает удовлетворительных результатов. На сморщивание капсулы во время этих процедур было обращено внимание Тениссеном еще в 1912 г. Он указывал, в согласии со многими предшествовавшими авторами, что капсула бактерий, выделенных из животного организма («Tierische Kapsel»), может окрашиваться легче и с бóльшим постоянством и что она также подвергается меньшему сморщиванию. Для современной оценки большого количества методов окраски капсул необходимо обратиться к тща-

тельно выполненной работе Дагида (1951). По его данным, из всех методов, сопровождающихся подсушиванием препарата, наиболее постоянные результаты были получены при эозиносывороточном методе Хови и Киркпатрика (Howie, Kirkpatrick, 1934), который был лучшим после влажного тушевого метода. Следовало бы, однако, упомянуть, что метод Хови и Киркпатрика (1934) представляет собой «вспомогательную окраску» и что у некоторых бактерий (например, сибиреязвенной бациллы) он ведет к деформации капсулы.

Дагид не всегда получал успешные результаты ни для капсулы, ни для слизи, применяя методы окраски Клинебергер-Нобл (Klieneberger-Nobel, 1948). Тем не менее мы считаем, что необходимо обсудить вкратце теорию этих методов, так как они могут указать на разницу между неспецифическими реакциями капсулы и слизистого слоя. Клинебергер-Нобл окрашивала капсулы бактерий, предварительно фиксированные раствором Буэна (Bouin), или по Гимза (Giemsa) или, после протравливания танином, кристалвиолетом. Слизь должна была окрашиваться в соответствии с ее вторым упомянутым выше методом только после фиксации бактерий раствором Шабо (Chabaud). Она считает, что биохимическая разница между капсулой и слизью несомненна, так как методы, выявляющие капсулы путем фиксации и окраски, неприменимы, если имеется только слизь или наоборот. Это заключение, по-видимому, противоречит предшествующим наблюдениям, показавшим, что серологически идентичный глютамил-полипептид может быть выделен из капсульных Bacillus anthracis и из типичного продуцирующего слизь бескапсульного B. subtilis. Имеется, однако, существенное иммунологическое различие между этими двумя бактериями. Капсульный штамм B. anthracis вызывает образование антиполипептидного антитела [Томчик и Чонготт (Szongott), 1933], а культура содержащего полипептидную слизь B. subtilis не вызывает [Иванович и Эрдез (Ivanovics, Erdös), 1937]. Поэтому можно принять, что нативное состояние полипептида различно у этих двух организмов. Возможно, что капсульный полипептид B. anthracis может образовывать белковый комплекс, по крайней мере в соседстве с клеточной стенкой, постепенно расщепляющийся при растворении капсулы. Сенные палочки могут образовывать полипептид в свободной форме, легко выделяющийся в виде слизи, серологически являющейся гаптеном. Это допущение может объяснить случайные различия в окраске капсулы и слизи.

Новелли (Novelli, 1953) недавно наблюдал, что алциановая голубая окрашивает бактериальную капсулу так же хорошо, как полисахаридное вещество, выделенное из бактерий без предварительной протравы. Мак Кинни (McKinney, 1953) подтвердила это наблюдение и рассматривает алциановую голубую как краску, пригодную для бактериальных полисахаридов. Томчик и Грасе (Grace, 1955) применяли эту краску для элективного

выявления бактериальной клеточной стенки некоторых грамположительных микроорганизмов.

Алциановая голубая — почти единственная краска, до сих пор найденная, которая окрашивает бактериальную капсулу без протравливания. Большинство других методов окраски капсул требуют прибавления белков и многие из них — также кислот. При соответствующем регулировании pH после добавления белка вполне регулярные результаты могут быть обеспечены при окраске бактериальной капсулы некоторыми основными анилиновыми красками или при окраске по Граму [Томчик и Гекс-Хольцер (Guex-Holzer), 1953]. Принципиальное обоснование этого обсуждается в разделе о действии белков на бактериальную капсулу. Применяя этот принцип, однако, можно настолько ясно выявить бактериальную капсулу в фазо-контрастный микроскоп во влажных препаратах, что последующая окраска, сопряженная с неблагоприятной процедурой фиксации, становится излишней.

Образование комплекса с белками

Неспецифическая капсульная реакция с белками была впервые обнаружена у пневмококков. Лефстрем (Löfström, 1944) выявил капсулу некоторых типов Diplococcus pneumoniae, прибавляя «остро фазный» (см. ниже. *Ред.*) белок при нейтральной реакции в присутствии ионов кальция. Он описал эту реакцию, аналогичную реакции, возникающей при действии специфических антител, как «капсульное набухание». Реагирующий белок образуется в острой стадии бактериальной инфекции и при некоторых неинфекционных заболеваниях, сопровождающихся распадом ткани. Природа этой реакции не была полностью выяснена. Кроме того, неизвестно, дают ли такую же реакцию с этими белками капсулы каких-либо других бактерий.

Джекокс (Jacox, 1947) изучал эту реакцию и обнаружил, что некоторые белки и очищенные препараты энзимов выявляют капсулу пневмококков, если pH доводится до 4,0. Добавление кальция в этом случае не обязательно, но достаточно любопытно, что эта реакция тормозилась при такой низкой концентрации хлористого натрия, как 0,02 М. Джекокс не обнаружил сходной реакции с капсулами Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli и Streptococcus haemolyticus. Вероятно, белковая реакция при pH 4,0 ограничивается пневмококками.

Томчик и Гекс-Хольцер (1954а) сделали существенно отличающееся от предыдущего наблюдение относительно действия различных белков на бактериальную капсулу. Они изучили реакцию казеина, различных альбуминов и глобулинов, гемоглобина и лизоцима с капсулами Cryptococcus neoformans, Klebsiella pneumoniae, Streptococcus Haemolyticus, Diplococcus pneu-

moniae, Bacillus anthracis и некоторых других членов рода Bacillus при различных pH. Капсулы обнаруживались в фазово-контрастный микроскоп, когда некоторые из указанных белков и организмов приходили во взаимодействие при определенных, обычно ограниченных, порядках pH, лежащих в кислотной зоне по отношению к изоэлектрическому пункту белков. Предел pH, при котором происходит реакция, изменяется в зависимости от изоэлектрической точки исследуемого белка; с другой стороны, он зависит также от капсульного вещества микроорганизма. Отсутствие кальция или наличие изотонической концентрации (0,145 М) хлористого натрия не мешает реакции. Изолированное капсульное вещество обычно ведет себя аналогично целой капсуле, давая преципитацию при том же порядке pH. Реакция обратима; она исчезает при изменении pH. Согласно объяснению авторов, неспецифическая капсульная реакция возникает благодаря солеобразным соединениям различных белков с бактериальной капсулой, ведущим к микроскопической преципитации при значении pH в щелочной зоне от изоэлектрической точки бактериальной поверхности и в кислой зоне от изоэлектрической точки белков.

Микроскопически видимая капсульная реакция, происходящая в изоэлектрической зоне, промежуточной между таковыми бактериальной поверхности и белков, конечно, не «реакция набухания». Если какие-либо изменения в размере капсулы и наблюдаются сравнительно с размером, определяемым во влажном тушевом препарате, то это чаще сморщивание, чем набухание.

Имеется существенное сходство между неспецифической и специфической капсульными реакциями. Разница та, что если неспецифическая реакция стимулируется различными белками при благоприятном для реакции pH, то специфическая реакция возникает только при воздействии гомологичного антитела и независима от pH.

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ КАПСУЛЬНАЯ РЕАКЦИЯ: ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА КАПСУЛЫ

Действие антител на бактериальную капсулу обычно упоминается как «реакция набухания» капсул Нейфельда (Neufeld). По нашему мнению, это обозначение совершенно ошибочно и должно быть отвергнуто. Реакция была описана впервые Рожэ (Roger, 1896), и она в основном не является реакцией набухания. Мы предлагаем назвать ее специфической капсульной реакцией.

Рожэ (1896) производил микроскопическое исследование видимого действия гомологичной иммунной сыворотки на Oidium albicans во влажных препаратах. Он обнаружил, что приблизительно через 10 минут после прибавления сыворотки появляется гиалиноподобная структура, которую он назвал набуханием кутикулы («Gonflement de la cuticule»). Нейфельд (1902) цитиро-

вал наблюдения Рожэ и применил их к Diplococcus pneumoniae. Он установил, что немедленно или через несколько минут после прибавления иммунной сыворотки «отдельные кокки разбухают в два или три раза по сравнению с их исходным (начальным) размером». Он считал, что в набухание преимущественно вовлекается наружный слой бактериальной клетки, но не установил, что до прибавления иммунной сыворотки невидимая капсула такого же самого размера окружает бактериальную клетку. Обнаружение этой структуры и дало кажущееся набухание. В значительно более поздней работе (Нейфельд и Эттингер-Тульчинская, 1931) реакция называется еще разбуханием «бактериального тела». Эттингер-Тульчинская (1933) первая ясно указала, что в разбухании D. pneumoniae принимает участие одна капсула, и описала аналогичную реакцию, вызванную прибавлением гомологичных антител к другим капсульным микроорганизмам, таким как Klebsiella и Streptococcus. К сожалению, она считала, что капсула представлена внутренним слоем, соответствующим ореолу дифракции Дагида (1951), и ее микрофотографии (рис. 4 и 7), на которые она ссылается в своем тексте (стр. 776) для демонстрации набухания капсулы, непонятны и, вероятно, неверно ею истолковываются. В этой работе, целью которой было общее признание термина «реакция набухания капсулы» («Quellungsreaktion»), она, несомненно, не смогла показать, что объем капсулы после ее реакции с антителом больше, чем во влажном тушевом препарате нереагировавшей капсулы.

Мы не отрицаем, что при определенных условиях может происходить вторичное разбухание капсулы, особенно у Diplococcus pneumoniae. Мадд, Хейнметс и Эндерсон (Mudd, Heinmets, Anderson, 1943) изучали эту реакцию в электронном микроскопе и отметили относительное разбухание в тех препаратах, которые содержали, кроме специфического антитела, компоненты свежей кроличьей сыворотки, известные под общим наименованием комплемента. Джонсон и Деннисон (Johnson, Dennison, 1944) также нашли, применяя метод центрифугирования, что увеличение объема в специфической капсульной реакции оказывается бóльшим, чем объем агрегата молекул антитела, соединившихся с капсулой. Таким образом, в результате комбинации антиген-антитело может иметь место вторичная гидратация. Они полагают, однако, что реакция в основном является реакцией преципитации.

Сомнительно, имеет ли метод центрифугирования, применявшийся Джонсоном и Деннисоном, то же самое значение для измерения изменений объема, что и прямое микроскопическое сравнение величины капсулы во влажных тушевых препаратах и в препаратах, содержащих антитела. Те, кто изучал специфическую капсульную реакцию, основываясь на последнем упомянутом выше критерии, не обнаружили набухания. Мы не наблюдали набухания сравнительно с влажными тушевыми препаратами при

изучении капсульной реакции Bacillus anthracis после прибавления полипептидных антител [Бодон (Bodon) и Томчик, 1934]. Клинебергер-Нобл (1948) четко установила, что при большинстве проб, в которых иммунная сыворотка прибавляется к гомологичным бактериям, никогда не обнаруживается фактического набухания капсулы. «Капсулы не набухают, хотя они значительно уплотняются при прибавлении иммунной сыворотки». По ее наблюдениям, иммунная сыворотка реагирует не только с капсулами, но также с окружающей слизью. Дагид (1951) подтвердил эти наблюдения с типами I, II, III и XIX пневмококков, Klebsiella и Escherichia coli. По его мнению, действие антисыворотки не вызывает увеличения капсулы, а лишь делает видимыми ее очертания. Эдуордс и Файф (1952), описавшие большое количество новых типов Klebsiella, установили, что «в сотнях наблюдений над клетками в параллельных тушевых и сывороточных препаратах никогда не наблюдалось набухания массы, окружающей клетки». Они отметили реакцию преципитации, возникающую на поверхности капсулы или слизистого слоя. Нейлл, Кастилло, Смит и Капрос (Neill, Castillo, Smith, Kapros, 1949) не смогли обнаружить заметного разбухания капсулы Cryptococcus neoformans, хотя, как они констатируют, «набухание — рельефный видимый признак в капсульных реакциях бактерий».

Кажется, что последние открытия, цитированные здесь, исчерпывающе доказывают, что термин «реакция набухания капсул» был предложен в результате ошибочного толкования первоначальных наблюдений. Соединение антитела с капсульным веществом приводит в короткое время к преципитации, которая делает капсулу видимой, обычно без изменения ее размера и формы. Эта концепция привела нас к применению специфической капсульной реакции для непосредственного цитологического изучения при исследовании структурных элементов капсулы и как индикатора локализации в клетке бактериальных антигенов.

Специфическая капсульная реакция может быть применена в диагностических целях, что осуществлялось очень давно. Шваб и Шефер (Schwab, Shaffer, 1950) дали список микроорганизмов, в отношении которых было описано приготовление типоспецифических антисывороток, пригодных для пробы «набухания». Сюда относятся Diplococcus pneumoniae, некоторые группы Streptococcus, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae, Bacterium anitratum, Sporotrichum schenckii и Cryptococcus neoformans. Из прочих группы Bacillus и Pasteurella должны были быть внесены в этот список. Шваббу и Шеферу (1950) удалось получить хорошую иммунную сыворотку для специфической капсульной реакции в результате четырех инъекций капсульных организмов, произведенных с недельными интервалами.

Только немногие из последних наблюдений относительно диагностического применения специфической капсульной реак-

ции упоминаются в последующем изложении. Брук (Brooke, 1951) применял пробу «набухания» с кроличьей иммунной сывороткой для типирования 324 штаммов Klebsiella и описал 27 новых капсульных типов. При помощи этого же метода Эдуордс и Файф (1952) нашли восемнадцать, а Эдмундс (Edmunds, 1954) шесть прежде неизвестных типов Klebsiella. Прайс и Ниланд (Price, Kneeland, 1954) наблюдали реакцию «набухания» с гомологичной сывороткой у маннит- и коагулазаположительных штаммов Staphylococcus aureus после пассажа через аллантоисный мешок куриных эмбрионов. Юинг, Эдуордс и Хакс (Ewing, Hucks, 1952) описали капсульные типы Shigella boydii с антигенами, по-видимому, термолабильными. Они показали как при помощи агглютинации, так и реакцией «набухания», что капсульный антиген S. boydii 2 имеет тесное родство с капсульным антигеном типа XXI Klebsiella. Малиот и Бауер (Malyoth, Bauer, 1951) описали у слизистых вариантов Bacterium bifidum оболочки («Schleimkapsel»), которые можно было сделать видимыми в фазоконтрастный микроскоп путем реакции с иммунной сывороткой. Норрис, де Сипэн, Жилликен, Гарвей и Дьерди (Norris, de Sipin, Zilliken, Harvey, György, 1954) не обнаружили в подобных вариантах демонстративной истинной капсулы, а нашли только внеклеточное слизистое вещество. Это вещество — высокополимеризованный полисахарид, из которого при гидролизе можно получить глюкозу, галактозу, фукозу и неидентифицируемую пентозу.

В ранних работах, ставивших целью определение капсульного происхождения веществ, выделенных из капсульных бактерий, антитела не применялись. Тем не менее мы имеем в настоящее время достаточно оснований для того, чтобы считать вещество, выделенное впервые Тенниссеном (1919, 1920) из капсульных Klebsiella, соответствующим капсульному веществу. Эдуордс и Файф (1952) комментируют эту раннюю работу следующим образом: «Тенниссен был первым исследователем, который привлек внимание к серологической специфичности капсулы Klebsiella и который демонстрировал углеводную природу капсульных антигенов». Это толкование ошибочно; из щелочного (*KOH*) экстракта капсульных Klebsiella Тенниссен изолировал полисахарид, который был идентифицирован как галактан, но он не подозревал о серологической активности этого вещества. Он формулирует ясно (1914, стр. 335), что «не образуются агглютинины, которые реагируют с оболочкой. Это может быть объяснено тем, что оболочка состоит, вероятно, из высокомолекулярных углеводов, а не из белков. В результате не образуются агглютинины, которые могут вступать в реакцию с поверхностным слоем этих бактерий». Тенниссен работал в период, когда серологическая реактивность полисахаридов еще не была открыта и когда только белки считались способными к подобной активности. Серологически активные полисахариды были впер-

вые описаны у капсульных бактерий Гейдельбергером и Эвери (Heidelberger, Avery, 1923, 1924), а у некапсульных микроорганизмов — Меллером и Томчиком (Mueller, 1924). Гейдельбергер и Эвери изолировали вещество, которое они назвали «растворимое специфическое вещество» пневмококка. Его идентичность капсульному веществу была доказана позже более прямым путем — применением специфической капсульной реакции. Так как капсульные полисахариды рассматривались во многих обзорах, в том числе на первом симпозиуме этого общества, о них можно здесь не упоминать.

На протяжении длительного времени считали, что все бактериальные капсулы состоят из полисахаридов (Гейдельбергер, 1935), хотя в ранних сообщениях уже указывалось, что это обобщение не применимо к Bacillus anthracis. Ниже приводится большинство цитологических и иммунологических доказательств топографической локализации неуглеводных веществ в капсуле сибиреязвенной бациллы.

В экстракте капсульной Bacillus anthracis, приготовленном согласно Тенниссену, было найдено, кроме значительной части полисахаридов, 7—8% азота. Исходя из предположения, что экстракт происходит из капсулы, он был назван гликопротеином [Крамар (Kramár, 1922)]. При экстрагировании таким методом 10 капсульных и 10 бескапсульных штаммов содержание азота в экстрактах капсульных бактерий в среднем составляло 6,8%, а в экстрактах бескапсульных бактерий — ниже 2,5%. Сернокислая медь осаждает вещество только из экстрактов капсульных бактерий. После осаждения сернокислой медью из раствора был выделен полисахарид, содержавший 0,8% азота, 0,1% фосфора и не содержавший серы. Его редуцирующая активность после гидролиза соответствовала содержанию 60% глюкозы (Томчик и Чонготт, 1932). Вещество, изолированное из экстракта капсульных бактерий путем осаждения сернокислой медью, содержало 10% азота, было свободно от фосфора и серы и не давало редукции после гидролиза. Оно было описано как белковоподобное или P-вещество. Иммунная сыворотка, полученная путем иммунизации кроликов бескапсульными сибиреязвенными бациллами, преципитировала только полисахарид; сыворотка, приготовленная против капсульных бацилл, преципитировала как полисахарид, так и полипептид (Томчик и Чонготт, 1933). P-антитело агглютинировало только капсульные бактерии (Томчик и Бодон, 1934). Полисахаридное антитело не делало капсулу видимой; P-антитело давало специфическую капсульную реакцию, не вызывая разбухания (Бодон и Томчик, 1934). P-вещество было определено как полипептид D-глютаминовой кислоты [Иванович и Брюкнер (Bruckner), 1937].

Анализ основных этапов, ведущих к заключению, что сибиреязвенный глютамил-полипептид находится в капсуле, наводит на мысль, что наличие определенного вещества у капсуль-

ных бактерий и его отсутствие у бескапсульных бактерий является само по себе решительным указанием на капсульное происхождение изучаемого вещества. Непосредственное доказательство локализации полипептида в капсуле дается, однако, реакцией агглютинации при условии, что полипептидное антитело определено иммунохимически и все другие антитела удалены адсорбцией. До тех пор, пока такие реакции могут быть получены с полисахаридными антителами в капсуле Bacillus anthracis, не оправдано предположение о наличии полисахаридов в капсуле этого микроорганизма (Томчик, 1954).

Проблема химической природы капсульного вещества Pasteurella pestis до некоторой степени сходна с таковой Bacillus anthracis. Шютце (1932) нашел, что противооболочечная сыворотка вызывает агглютинацию образующих оболочку бактерий; антисоматическая сыворотка не действует на эти бактерии до тех пор, пока оболочка не разрушена при 100°. Бейкер и др. (1947) изолировали из образующих оболочку P. pestis после экстракции нейтральными солями две растворимые в воде фракции: IA, углеводно-белковый комплекс, и IB, свободный от углевода белок. Обе фракции были электрофоретически однородны и вызывали иммунитет у мышей, но не у морских свинок. Обе фракции казались иммунологически идентичными, что указывало на то, что антитела против полисахаридной части фракции IA не возникали. Авторы рассматривают углеводно-белковый комплекс как нативную форму вещества оболочки, а белковую фракцию как образовавшуюся путем диссоциации во время экстракции или после гибели бактерий. Эмис (1951) удалял из клеток капсулы путем применения водных растворителей, таких как тиоцианат калия, и выделял преимущественно простой белок, а не белково-полисахаридный комплекс; последний он считал капсульным веществом. Бейкер и др. (1952) нашли, что белковые части в их фракциях IA и IB идентичны, однако их попытки разделить углеводную и белковую порции фракции IA были безуспешны. Энгльсберг и Леви (1954) допускали хотя бы частичную идентичность фракции I и оболочки на следующих основаниях: обе выделяются в бóльших количествах вирулентными штаммами при 37°, чем авирулентными штаммами при более низких температурах. Кроме того, антисыворотка, приготовленная при помощи фракции I, специфически изменяет оболочку вирулентных бацилл. Иммунная сыворотка, из которой при адсорбции удалены антитела фракции I, неспособна образовывать агрегаты на оболочке.

Кажется, на основании современных работ можно с уверенностью считать, что капсула Pasteurella pestis состоит из белка, который может частично встречаться в виде белково-полисахаридного комплекса. Однако отсутствуют указания на то, что имеется капсульная структура, соответствующая раздельному морфологическому распределению двух различных веществ у капсульных Bacillus megaterium.

СЛОЖНАЯ СТРУКТУРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ КАПСУЛЫ

При использовании иммунохимически определенных антител сложная капсульная структура была обнаружена у Bacillus megaterium Томчиком (1951) и подробно изучена Томчиком и Гекс-Хольцером (1951, 1952, 1954б, в). Дополнительно к трем типичным штаммам B. megaterium в этих исследованиях был использован преимущественно штамм, обозначенный как Bacillus M. Он был назван так потому, что первоначально получен из пастеровской вакцины B. anthracis в процессе изучения индуцированной мутации. Его происхождение из B. anthracis, однако, сомнительно, и, как было установлено позже, он походит на B. megaterium по своему клеточному строению, выявляя лишь некоторое различие в ферментативных реакциях. Руфь Е. Гордон (Ruth E. Gordon, личное сообщение) классифицировала этот штамм как B. megaterium.

Ни один из четырех капсульных штаммов Bacillus megaterium не вызывал образования у кроликов антител, способных реагировать с глютамил-полипептидом. Все они, однако, давали типичную специфическую капсульную реакцию при испытании антисывороткой против полипептидов сибиреязвенной бациллы. В этом отношении капсульное вещество B. megaterium ведет себя сходно со слизью B. subtilis. Иванович и Эрдес (1937) изолировали из культур B. subtilis глютамил-полипептид, который реагировал с полипептидными антителами сибиреязвенных бацилл, но слизистая культура сенных бацилл не вызывала образования подобных антител. Капсульное вещество, обнаруженное при помощи полипептидных антител у B. megaterium, показало несомненно равномерное распределение, а на его внутренней поверхности был ясно виден дифракционный ореол, соответствующий клеточной стенке (рис. 2, *А*).

Удивительная капсульная структура была выявлена через несколько секунд после добавления гомологичных антител (рис. 2, *Б*); она состояла из поперечных перегородок полярной конденсации и неопределенной исчерченности. Как можно было наблюдать в нескольких сотнях субкультур на агаре Гледстон-Файлдса, поперечные перегородки появлялись закономерно в точке деления клеток внутри цепочки. Они часто казались толще на периферии капсулы и их продолжение внутрь к поверхности клеточной стенки редко было заметно, возможно, вследствие неполного проникновения антител. В центрифугированном осадке трехчасовой аэрированной культуры в среде Сотона через 3 дня при комнатной температуре появлялись очень широкие капсулы. Если к таким бактериям прибавляли гомологичные антитела, капсульные поперечные перегородки обнаруживались в виде толстых дисков одинаковой толщины, располагавшихся, вероятно, в непосредственном продолжении перегородки цепочки (рис. 2, *D*). Поперечные щели, соответствующие значительной толщине

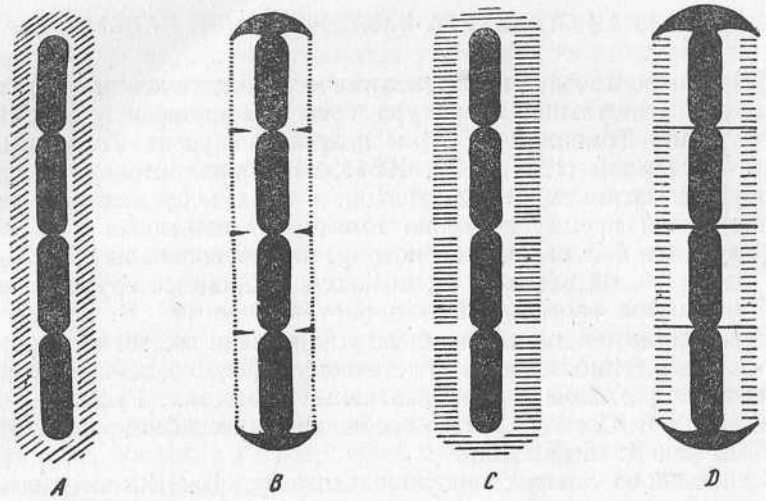


Рис. 2. Сложная капсульная структура Bacillus megaterium.

A — взвесь агаровой культуры с полипептидной антисывороткой; *B* — взвесь агаровой культуры с гомологичной антисывороткой; *C* — взвесь культуры на среде Сотона, осажденная полипептидной антисывороткой; *D* — взвесь культуры на среде Сотона, осажденная гомологичной антисывороткой.

поперечных перегородок, могли быть обнаружены при распределении полипептидного вещества, когда к бактериальной взвеси прибавляли полипептидные антитела (рис. 2, *C*). Шероховатая исчерченность полипептидной массы в последнем упомянутом препарате указывает, вероятно, на то, что в своем распределении оба вещества, выявляемые двумя различными антисыворотками, взаимно дополняют один другой. Появление обычно гомогенной полипептидной массы (см. рис. 2, *A*) может быть объяснено, если допустить, что пленки второго вещества, если они слишком тонкие, не могут быть выявлены в фазово-контрастном микроскопе как видимые щели. Фотомикрографии (табл. 1, *1* и *2*) показывают обе реакции, изображенные схематически на рис. 2, *C* и *D*.

Гомологичная антисыворотка, обнаруживающая высокохарактерную капсульную структуру, реагирует с типоспецифическим полисахаридом, изолированным из капсульных бактерий. Метод его выделения и его отношение к полисахаридам клеточной стенки будут описаны в последующем разделе. Гомологичная сыворотка, адсорбированная этим полисахаридом, не оказывает видимого влияния на какую-либо часть капсульной структуры. Отсюда мы делаем заключение, что капсула Bacillus megaterium состоит из полисахаридной сети, промежутки между петлями которой заполнены большим количеством глютамилполипептида.

Наш вывод оспаривали Иванович и Хорват (Horvath, 1952, 1953), которые полагали, что сетка образована мицеллами глю-

тамил-полипептида, плотно закрепленными на поверхности бактерии, в то время как пространства между перегородками заполнены полисахаридом, который может рассматриваться как межклеточное вещество. Мы не в состоянии понять эту концепцию. Иванович и Хорват не доказали наличия сетки каким-либо путем, сходным с изображенными на рис. 2, *B* и *D*. Они установили в соответствии с нашими собственными наблюдениями, что полипептидные антитела наиболее часто выявляют равномерно распределенный капсульный материал; они отметили, однако, в некотором проценте своих исследований узкую исчерченность, вызванную полипептидными антителами. Для ясного понимания существенной разницы между неясной узкой полипептидной исчерченностью, описанной Ивановичем и Хорватом в капсуле одной клетки, и поперечными полисахаридными перегородками, расположенными очень равномерно в месте клеточного деления в цепочке, показанными Томчиком и Гекс-Хольцером, следовало бы обратиться к подлинным опубликованным статьям. Наши последующие наблюдения над обработанными энзимами Bacillus megaterium совершенно ясно показывают, что полисахаридная капсульная сетка имеет непосредственное отношение к клеточной стенке.

ДЕЙСТВИЕ ЭНЗИМОВ НА БАКТЕРИАЛЬНУЮ КАПСУЛУ И НА КЛЕТОЧНУЮ СТЕНКУ

Наиболее точная информация, касающаяся отношения капсулы к бактериальной клетке, может быть получена из хорошо известных работ с энзимами Дюбо и Эвери (Dubos, 1931; обобщены в обзоре Дюбо, 1946), а также Сайклса и Шоу (Sickles, Shaw, 1950). Эти авторы изучали действие энзимов, полученных из почвенных микроорганизмов, на капсулы Diplococcus pneumoniae. Энзимы оказывали специфическое действие на капсулы некоторых типов бактерий. Так, они вызывали распад без нарушения жизнеспособности клеток и без изменения их последующей способности образовывать типоспецифическую капсулу. Вызванная действием энзимов декапсуляция препятствовала, однако, инвазионной способности клеток in vivo. Применение рибонуклеазы, наоборот, не разрушает капсулу, но лишает ее антигенности в смысле образования типоспецифических полисахаридных антител (Дюбо, 1946). Эти наблюдения показывают, что капсульные полисахариды являются в целых клетках по крайней мере частично комплексами с рибонуклеиновой кислотой и что они не составляют неотъемлемую часть клеточной стенки.

Легко осуществимое удаление гиалуроновой кислоты капсулы стрептококков группы А и С при помощи гиалуронидазы и М-вещества стрептококков группы А трипсином равным обра-

зом не влияет на жизнеспособность клеток. С другой стороны, энзим, выделяемый Streptomyces albus, растворяет стрептококков, как было показано Мекстедом (Maxted, 1948). По Мак Карти (McCarty, 1952) и Шмидту (Schmidt, 1952), этот энзим действует на клеточную стенку стрептококка, деполимеризуя ее углеводный компонент.

Из этих наблюдений следует сделать вывод, что чувствительные к энзиму субстраты в капсулах пневмококков и стрептококков отличаются от таковых в клеточных стенках указанных микроорганизмов. Другие исследования показывают, однако, что в случае с Bacillus megaterium один и тот же энзим деполимеризует как клеточную стенку, так и некоторые элементы капсульной структуры.

Томчик и Гекс-Хольцер (1952, 1954б, в) изучали цитологическое действие лизоцима на влажных препаратах живых капсульных Bacillus M при помощи фазовоконтрастного микроскопа. Была выбрана такая концентрация лизоцима, при которой клеточные стенки густой бактериальной взвеси полностью растворялись в течение 30—60 минут при 20°. Соответствующие разведения кристаллического лизоцима или белка куриного яйца оказывали одинаковое действие. Для обнаружения действия лизоцима на полисахаридную капсульную структуру была прибавлена гомологичная сыворотка. Бактерии образовывали цепочки, соответственно R-типу клеточного деления по определению Байссета (Bisset, 1950). Первое изменение клеток, видимое через 3—5 минут, обнаруживалось в виде небольшого полулунного полярного отделения цитоплазмы от поперечной клеточной стенки. В этой стадии капсульная поперечная перегородка становилась видимой во всей ее полной длине, от поверхности капсулы до клеточной стенки, что указывает на повышение проницаемости для антител. Приблизительно через 10—15 минут наступала стадия, в которой бóльшая часть капсульного материала растворялась и лишь наиболее устойчивые элементы, поперечные перегородки и полярные конденсаты, оставались видимыми (рис. 3, *А*). Одновременно цитоплазма принимала эллипсоидную форму и клеточные стенки и перегородки становились очень отчетливыми. Если гомологичную антисыворотку не прибавляли или заменяли антисывороткой глютамил-полипептида сибиреязвенной бациллы, капсульные поперечные перегородки оставались невидимыми, а поперечные стенки и боковые клеточные стенки различались с трудом. Эти реакции с антисыворотками были впоследствии названы специфической капсульной реакцией или специфической реакцией клеточной стенки. На микрофотографиях можно было ясно различить (Томчик и Гекс-Хольцер, 1952), что капсульные поперечные перегородки являются прямым продолжением поперечных стенок. Они выступают в капсулу и образуют существенную часть капсульной сетки. Еще через несколько минут переваривания лизоцимом выступающие

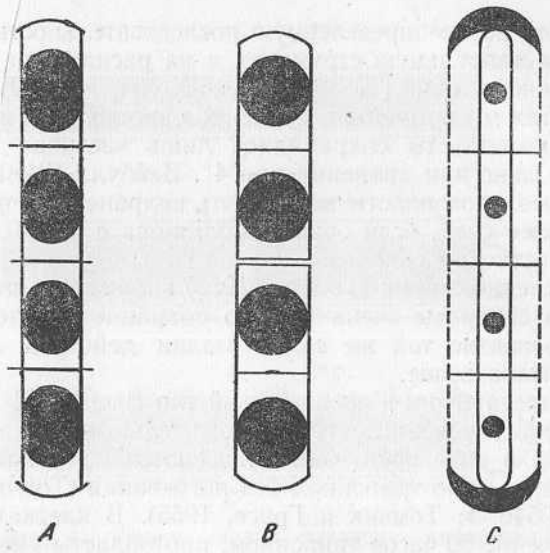


Рис. 3. Действие лизоцима и трипсина на Bacillus M.

A — лизоцим 15 минут. Полисахаридная антисыворотка выявляет выступающие поперечные перегородки капсулы, полярную конденсацию, клеточные стенки и поперечные стенки; *B* — лизоцим 25 минут. Полисахаридная антисыворотка показывает только клеточные стенки и поперечные стенки; *C* — обработанная трипсином бактерия. Полисахаридная антисыворотка выявляет все соответствующие элементы капсулы и клеточной стенки.

поперечные перегородки исчезали, в то время как клеточные стенки и поперечные стенки еще резко реагировали с гомологичной антисывороткой. Поперечные стенки в некоторых местах выглядели расцепляющимися, что указывает на начало расчленения внутри цепочки (рис. 3, *B*). На этой стадии действия лизоцима цитоплазма принимает совершенно шаровидную форму, которая сохраняется даже после полного растворения клеточной стенки.

Последовательные стадии шаровидного превращения бактериальных протопластов, вероятно, находятся в прямой связи с прогрессивным расширением клеточной стенки вследствие деполимеризации полисахаридов клеточной стенки лизоцимом. Мадд, Полевицкий, Эндерсон и Чемберс (Polevitzky, Chambers, 1941) предсказывали этот феномен так: «Факт, что большинство бактерий не шаровидны, указывает, что они обладают в некоторой степени ригидностью своей структуры; в противном случае действие сил поверхностного натяжения, относительно мощных на поверхности подобной значительной кривизны, должно было бы сделать бактериальные клетки шаровидными». Нагревание бактериальных клеток предотвращает шаровидное изменение

протопластов, но не определенную последовательность действия лизоцима на капсульную структуру и на расширение и растворение клеточной стенки (Томчик и Гекс-Хольцер, 1952). В наших первых опытах мы применяли 0,85% хлористый натрий. В этих условиях протопласты сохранялись лишь частично в течение 1—24 часов даже при хранении при 4°. Вейбулл (Weibull, 1953) наблюдал, что протопласты могут быть сохранены в течение одного или более дней, если опыт выполняется с 0,1—0,2 М забуференным раствором сахарозы.

Мы в последнее время (Томчик, 1955) наблюдали, что раствор Рингера без сахарозы очень хорошо сохраняет протопласты и допускает развитие той же самой стадии действия лизоцима, которая описана выше.

Bacillus megaterium и специальный тип Bacillus M находятся в числе немногочисленных грамположительных микроорганизмов, которые в виде исключения поддаются до некоторой степени перевариванию трипсином без нагревания (Томчик и Гекс-Хольцер, 1954б, г; Томчик и Грасе, 1955). В клетках, обработанных в течение 20 часов трипсином, протопласты уменьшаются до небольшого тела неопределенного происхождения, а полисахаридные компоненты капсулы и клеточной стенки могут быть сделаны видимыми соответствующей антисывороткой (рис. 3, *C*).

Опыты, выполненные с лизоцимом и трипсином, показали, что поперечные перегородки капсульной сетки Bacillus megaterium выявляются как непосредственно направляющиеся наружу выступы поперечной стенки. Остается, однако, убедиться в том, что обе структуры идентичны с точки зрения их происхождения и химического строения.

ОТНОШЕНИЕ КАПСУЛЫ К КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ

Согласно Байссету (1950), новый материал клеточных стенок выделяется базофильной перегородкой, происходящей из клеточной оболочки, которая появляется поперек клетки как первый признак начинающегося деления. Поперечная стенка образуется внутри толщи перегородки, которая при этом расщепляется на два слоя, облегающие новую поперечную стенку. Мы допускаем, что сходный механизм имеет место при образовании тех капсульных компонентов, которые имеют тесное отношение к клеточной стенке. Для того чтобы проверить это предположение, были изучены при помощи фазовоконтрастного микроскопа различные стадии образования капсулы у Bacillus M после прибавления полисахаридной или полипептидной антисыворотки. Бескапсульные бациллы были получены при выращивании на бульоне Гладстон-Файлдса, аэрированном в течение 5 часов при 28°. При пересеве бескапсульных бацилл на среду Гладстон-Файлдса после 1—5 часов культивирования при 28° изучались

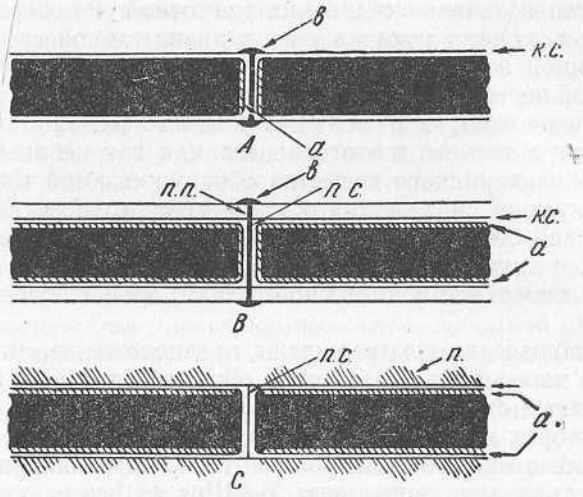


Рис. 4. Ранние стадии развития капсульной структуры у Bacillus M.

А — аэрированная 5-часовая бульонная культура с добавлением полисахаридной антисыворотки; *В* — 2-часовая агаровая культура с добавлением полисахаридной антисыворотки; *С* — 2-часовая агаровая культура с добавлением полипептидной антисыворотки. *а* — вероятная локализация белков цитоплазматической оболочки, активной в отношении образования полисахаридной и полипептидной половины; *б* — выросты полисахаридного материала; *к. с.* — клеточная стенка; *п. с.* — поперечная стенка; *п.* — полипептид; *п. п.* — поперечные перегородки в капсуле.

разные стадии образования капсулы. Те части бактериальной поверхности, которые наиболее активно включаются в образование капсульных полисахарида и полипептида, были прослежены с начала их появления в сериях микрофотографий (Томчик и Гекс-Хольцер, 1954в). Некоторые из этих данных приведены схематически на рис. 4.

Видимый рост поперечной стенки можно наблюдать в аэрированной бульонной культуре при отсутствии каких-либо других морфологических признаков формирования капсулы. Утолщенные массы становятся видимыми только после прибавления полисахаридной антисыворотки и придают бамбукообразный вид многоклеточной бацилле (рис. 4, *А*). Спустя короткое время после пересева этих клеток на агар последующий рост поперечных стенок, соответствующих капсульным перегородкам, образует протуберанцы по направлению к периферии узкого капсульного слоя. Тем самым особенно обозначаются части цитоплазматической поверхности, где в соответствии со схематическими рисунками Байссета (1950) предполагается лежащей активная продуцирующая зона. Байссет высказал мнение (1953), что в септированных бациллах наибольший рост клеточной стенки

имеет место в точках соединения клеточной и поперечной стенок. Та же активная зона может в значительной степени быть ответственной за возникновение направленного кнаружи роста поперечной перегородки (рис. 4, *A*). Во второй стадии (рис. 4, *B*), однако, возможно, что вся цитоплазматическая поверхность может быть вовлечена в этот процесс, так как небольшие количества полисахаридного вещества обнаруживаются при помощи соответствующей антисыворотки во всем тонком капсульном слое. Первая стадия образования полипептидного материала показывает, с другой стороны, неравномерные обрывки, появляющиеся на поверхности клеточной стенки, за исключением места деления.

Эти наблюдения подтверждают предположение, что полисахаридные поперечные перегородки образуются тем же путем, что и поперечные стенки, и что часть цитоплазматической поверхности, которая вовлекается в их формирование, не продуцирует обнаруживаемых количеств полипептида. Обратная зависимость действительна для капсульных Bacillus anthracis, выросших в неразбавленной инактивированной лошадиной сыворотке. В точке деления образуется больше полипептида, придающего капсулированным цепочкам четкообразный вид (Томчик, 1954).

Морфологическое отношение капсульной сетки Bacillus megaterium к клеточной стенке было подтверждено на иммунохимической основе. Капсульный материал может быть очень легко экстрагирован путем кипячения водной взвеси бактерий. Сходный метод был применен для экстракции полисахаридов Уэббом (Webb, 1948), работавшим с Staphylococcus citreus, а также Обером и Мийе (Aubert, Millet, 1950) — с капсульным B. megaterium.

Гекс-Хольцер и Томчик (1955) экстрагировали капсульные Bacillus M в водяной бане с кипящей водой в течение 4 часов. Во время этой процедуры капсулы становились все тоньше и тоньше, но могли быть обнаружены даже через 4 часа. Полипептид был выделен из экстракта при помощи фракционированного осаждения этиловым спиртом и после кислотного гидролиза очищался до тех пор, пока при помощи хроматографии на бумаге можно было обнаружить только D-глютаминовую кислоту. Полисахарид был получен из остающегося экстракта и очищен, как в основном описано ниже.

Примеси осаждали V-фракцией альбумина бычьей сыворотки при соответствующем pH; депротеинизацию проводили по Севеджу; осадок повторно растворяли в растворе формамида в насыщенной мочевине и подвергали фракционированному осаждению этиловым спиртом до тех пор, пока не наблюдалось отсутствие изменений в серологической реактивности. При хроматографическом анализе в кислотном гидролизате можно было обнаружить галактозамин, глюкозамин и неидентифицированный аминосахар, но не свободные аминокислоты. Активность

гомологичной иммунной сыворотки в отношении специфических капсульной реакции и реакции с клеточными стенками полностью исчезала после адсорбции этим полисахаридом.

Экстрагирование серологически активного материала из бескапсульных Bacillus M. было более сложным. Щелочи, кислоты, таурохолевый натрий, фенол, формамид и антиформин были испробованы без успеха. Клеточная стенка прогретых бактерий могла, однако, быть переведена в раствор, сохраняя бо́льшую часть своей серологической активности, при осторожном разрушении лизоцимом; 5 мг лизоцима были распределены равномерно в охлажденной взвеси 2 г бактерий в вибраторе Майкла и свободный лизоцим был удален промыванием. Действие связанного лизоцима в водяной бане при 35° прекращалось немедленно после того, как микроскопический контроль устанавливал растворение клеточных стенок. Охлажденный экстракт был депротеинизирован по методу Севеджа и фракционирован при помощи реакции преципитации с гомологичной антисывороткой в качестве индикатора. Наиболее существенно важные шаги были предприняты в очистке вещества, серологически активного в отношении капсульного полисахарида. После лиофилизации был получен мукопротеин следующего состава: N = 7,6%, P = 4,7%, редуцирующие вещества после кислотного гидролиза (вычисленные по глюкозе) — 18%, ацетил — до 4%. В гидролизатах при помощи хроматографического анализа можно было определить галактозамин, глюкозамин, диаминопимеликовую кислоту, аланин и небольшое количество глютаминовой кислоты. Два других вещества, выявленные в виде слабых пятен после опрыскивания нингидрином, не могли быть идентифицированы. Сходное вещество было также получено из капсульных бактерий при экстракции лизоцимом после извлечения капсульного полипептида. Оба мукопротеина были осаждены одной гомологичной иммунной сывороткой, разведенной $1 : 10^6$. Как в случае с капсульным полисахаридом, они адсорбировали из этой сыворотки антитела, дающие специфические реакции — капсульную и с клеточными стенками.

Так как капсульный полисахарид и мукопротеины клеточной стенки давали идентичную серологическую реакцию, можно заключить, что их серологическая специфичность зависима от конфигурации вещества более простого химического состава, т. е. полисахарида. Строение мукопротеина, вероятно, более близко походит на таковое специфического вещества, так как он находится в капсуле и клеточной стенке. Экстрагирование горячей водой, по-видимому, отщепляет полисахарид от более сложных молекул внутри клеточной структуры. Специфический полисахарид может, следовательно, рассматриваться как простой компонент более сложных неизвестных веществ, которые составляют, с одной стороны, клеточную стенку, а с другой — специфическую капсульную структуру Bacillus M. Полипептид D-глютамино-

вой кислоты встречается в капсуле, но он не принимает участия в строении клеточной стенки.

Идентичность полисахаридов клеточной стенки и капсулы была также подтверждена другим путем. Томчик и Гекс-Хольцер (1954) иммунизировали группу кроликов препаратами клеточных стенок, полученными путем переваривания трипсином бескапсульных Bacillus M, а другую группу — свободными от клеточных стенок сферическими протопластами. Иммунная сыворотка первой группы кроликов дала преципитацию с капсульным полисахаридом и с мукопротеином клеточной стенки в одинаковых титрах; она дала как специфическую капсульную реакцию, так и реакцию с клеточной стенкой, она агглютинировала взвесь клеточных стенок, но не обнаженные протопласты. Иммунная сыворотка против протопластов, с другой стороны, агглютинировала взвесь этих шаровидных элементов, но не содержала антител по отношению к полисахариду и не давала специфической капсульной реакции и реакции с клеточными стенками.

Идентичность или близкое сходство серологически активного капсульного вещества с некоторыми цельными материалами более сложной клеточной стенки ограничивается, согласно нашим современным представлениям, Bacillus megaterium. Мы не знаем подобных наблюдений даже для родственного B. anthracis. Смит и Кеппи (Keppie, 1955) заявили на последнем симпозиуме этого общества, что полиглютаминовая кислота почти наверное имеется в капсуле B. anthracis, так как бескапсульные штаммы ее не образуют. По их мнению, отсутствуют доказательства, что капсула B. anthracis состоит исключительно из полиглютаминовой кислоты; вероятно, полисахарид, образующий часть клеточной стенки, также выделяется в капсулу [Чу (Chu), 1953; Томчик, 1951]. Мы не согласны полностью с концепцией Смита и Кеппи. Нам кажется совершенно несомненным на основании доказательств, даваемых специфической капсульной реакцией, что глютамил-полипептид находится в капсуле B. anthracis. Мы не нашли, однако, в сообщении Чу (1953) таких наблюдений, которые указывали на наличие выделения полисахарида в капсулу. В нашем первом исследовании (1951) было ясно заявлено, что Bacillus M, у которого мы выявили полисахаридные капсульные перегородки, родствен B. anthracis, но не идентичен этому микроорганизму. Даже до того, как была обнаружена его полипептидная природа, мы основывали наши объяснения идентичности P-вещества капсуле B. anthracis на наблюдении, что специфическая капсульная реакция этого микроба может быть вызвана полипептидными, а не полисахаридными антисыворотками (Томчик и Чонготт, 1933; Бодон и Томчик, 1934). Недавно мы также показали (Томчик, 1954), что антисыворотка к полисахариду B. anthracis дает специфическую реакцию с клеточной стенкой, но не капсульную реакцию у вирулентных штаммов

капсульного B. anthracis. Затем на микрофотографиях было показано, что видимые изменения, напоминающие капсульные поперечные перегородки B. megaterium, выявляются в препаратах капсульных B. anthracis через 17 часов после прибавления полисахаридной антисыворотки. Мы рассматриваем немедленную специфическую реакцию с антисывороткой как чувствительный и надежный индикатор расположения капсульных веществ, но запоздалое появление видимых изменений в капсуле указывает на вторичный феномен, который трудно объяснить. Антитело, реагирующее с клеточной стенкой, может после определенного срока повышать ее проницаемость даже для цитоплазматических веществ, частично разрушенных автолитическими энзимами.

В этом обзоре можно было коснуться только части большого количества экспериментальной работы, выполненной с целью выяснения природы бактериальной капсулы. Обширная работа, проведенная с капсульным веществом Diplococcus pneumoniae, Streptococcus, Klebsiella, Bacillus anthracis и Pasteurella, указывает с большой вероятностью, что в противоположность Bacillus megaterium их капсульное вещество не идентично веществу, которое образует часть собственно клеточной стенки. Тенниссен (1919) уже давно предвидел это экспериментальное указание, говоря: «бактериальная капсула не происходит, как считают некоторые авторы, в результате разбухания эктоплазмы, но является совершенно новой химической единицей, происходящей из эктоплазмы». Если в понятие эктоплазма Тенниссен включал не только клеточную стенку, но также цитоплазматическую оболочку, его концепция подтверждается современными экспериментальными доказательствами в противоположность предположению Эттингер-Тульчинской (1933), которая рассматривала капсулу как модификацию бактериальной клеточной стенки. Химическая природа клеточной стенки изучалась интенсивно лишь в последние годы. Имеются, однако, немногочисленные экспериментальные данные относительно большинства патогенных бактерий, которые могут дать прямое доказательство наличия связи бактериальной капсулы с более глубокими поверхностными слоями бактериальной клетки.

ЛИТЕРАТУРА

Amies C. R. (1951). The envelope substance of Pasteurella pestis. Brit. J. exp. Path. *32*, 259.

Aubert J. P. & Millet J. (1950). Existence d'une capsule glucidique chez Bacillus megatherium. Ann. Inst. Pasteur, *79*, 468.

Baker E. E., Sommer H., Foster L. E., Meyer E. & Meyer K. F. (1947). Antigenic structure of Pasteurella pestis and the isolation of a cristalline antigen. Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 64, 139.

Baker E. E., Sommer H., Foster L. E., Meyer E. & Meyer K. F. (1952). Studies on immunization against plague. I. The isolation and characterisation of the soluble antigen of Pasteurella pestis. J. immunol. *68*, 131.

Bisset K. A. (1950). The Cytology and Life-History of Bacteria. Edinburgh: Livingstone.
Bisset K. A. (1953). Bacterial cell envelopes. In Bacterial Cytology, Sump. 6th Congr. int. Microbiol. Rome, p. 9.
Bodon G. & Tomcsik J. (1934). Effect of specific antibody on the capsule of anthrax bacilli. Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y. *32*, 122.
Brooke M. S. (1951). Further capsular antigens of Klebsiella strains. Acta path. microbiol. scand. *28*, 313.
Burri R. (1909). Das Tuscheverfahren als einfaches Mittel zur Lösung einiger schwierigen Aufgaben der Bakterioskopie. Jena: Fischer.
Burrows T. W. (1955). The basis of virulence for mice of Pasteurella pestis. In Mechanisms of Microbial Pathogenicity, ed. J. W. Howie & A. J. O'Hea, Cambridge Univesity Press.
Chu H. P (1953). Cytochemical structure of Bacillus anthracis with special reference to its cell-wall. Proc. 6th Congr. int. Microbiol., Rome, *1*, 179.
Churchman J. W. & Emelianoff N. V (1933). A study of the bacterial capsule by new methods. J. exp. Med. *57*, 485.
Dubos R. J. (1946). The Bacterial Cell. Cambridge, Mass.: Harvard University Press.
Dubos R. J. & Avery O. T. (1931). Decomposition of the capsular polysaccharide of pneumococcus Type III by a bacterial enzyme. J. exp. Med. *54*, 51
Duguid J. P. (1951). The demonstration of bacterial capsules and slime. J. Path. Bact. *63*, 673.
Edmunds P. N. (1954). Further Klebsiella capsule types. J. infect. Dis. *94*, 65.
Edwards P. R. & Fife M. A. (1952). Capsule types of Klebsiella. J. infect. Dis. *91*, 92.
Engelsberg E. & Levy J. B. (1954). Studies on immunization against plague. VI. Growth of Pasteurella pestis and the production of the envelope and other soluble antigens in a casein hydrolyzate mineral glucose medium. J. Bact. *67*, 438.
Etinger-Tulczynska R. (1933). Bakterienkapseln und Quellungsreaktion. Z. Hyg. InfektKr. *114*, 769.
Ewing W. H., Edwards P. R. & Hucks M. C. (1952). Thermolabile antigens of Shigella boydii 2 cultures with special reference to an encapsulated culture. Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., *78*, 100.
Guex-Holzer S. & Tomcsik J. (1956). Isolation and chemical nature of capsular and cell-wall haptens in a Bacillus sp. J. gen. Microbiol. (in the Press)[1].
Heidelberger M. & Avery O. T. (1923). The soluble specific substance of pneumococcus. J. exp. Med. *38*, 73.
Heidelberger M. & Avery O. T. (1924). The soluble specific substance of pneumococcus (second paper). J. exp. Med. *40*, 301.
Heidelberger M. (1935). Immunochemistry. Annu. Rev. Biochem. *4*, 569.
Howie J. W & Kirkpatrick J. (1934). Observations on bacterial capsules as demonstrated by a simple method. J. Path. Bact. 39, 165.
Ivanovics G. & Bruckner V. (1937). Die chemische Structur der Kapselsubstanz des Milzbrandbazillus und der serologisch identischen spezifischen Substanz des Bacillus mesentericus. Z. Immun Forsch. *90*, 304.
Ivanovics G. & Erdös L. (1937). Ein Beitrag zum Wesen der Kapselsubstanz des Milzbrandbazillus. Z. Immun Forsch. *90*, 5.
Ivanovics G. & Horvath S. (1952). Die Structur der Oberfläche des Bakt. Megatherium. Naturwissenschaften, *39*, 455.
Ivanovics G. &. Horvath S. (1953). The structure of the capsule of B. megatherium. Acta Physiol. Hung. *4*, 175.
Jacox R. F. (1947). A new method for the production of non-specific capsular swelling of the pneumococcus. Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y., *66*, 635.

[1] Опубликовано в J. gen. Microbiol., 1956, 14, 14—25. *Ред.*

Johnson F. H. & Dennison W. L. (1944). The volume change accompanying the Quellung reaction of Pneumococci. J. Immunol. *48*, 317.
Klieneberger-Nobel E. (1948). Capsules and mucoid envelopes of bacteria. J. Hyg., Camb., *46*, 345.
Kramar E. (1922). Untersuchungen über die chemische Beschaffenheit der Kapselsubstanz einiger Kapselbacterien. Zbl. Bakt. Abt. I, Orig, *87*, 403.
Lancefield R. C. (1943). Studies on the antigenic composition of group. A hemalytic streptococci I. Effecis of proteolytic enzymes on streptococcal cells. J. exp. Med. *78*, 465.
Löfström G. (1944). Comparison between the reactions of acute phase serum with pneumococcus C-polysaccharide and with Pneumococcus type 27. Brit. J. exp. Path *25*, 21.
McCarty M. (1952). The lysis of group A hemolytic streptococci by extracellular enzymes of Streptomyces albus. J. exp. Med. *96*, 555 and 569.
McKinney R. E. (1953). Staining bacterial polysaccharides. J. Bact. *66*, 453.
Malyoth G. & Bauer A. (1951). Die Darstellung der Schleimkapsel bei Mucoidstämmen des Bac. bifidum mittels Immunserum im Phasenkontrastmikroskop. Z. Biol. *104*, 404.
Maxted W. R. (1948.) Preparation of streptococcal extracts for Lancefield grouping. Lancet, ii, 255.
Mudd S., Polevitzky K., Anderson T. F. & Chambers L. A. (1941.) Bacterial morphology as shown by the electron microscope. J Bact. *42*, 251.
Mudd S., Heinmets F. & Anderson T. F. (1943). The pneumococcal capsular swelling reaction, studied with the aid of the electron microscope. J. exp. Med. *78*, 327.
Mueller H. & Tomcsik J. (1924). The chemical nature of residue antigen prepared from yeast. J. exp. Med. *40*, 343.
Neill J. M., Castillo C. G., Smith R. H. & Kapros Ch. E. (1949). Capsular reactions and soluble antigens of Torula histolytica and of Sporotrichum Schekii. J. exp. Med. *89*, 93.
Neufeld F. (1902). Ueber die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorien der Agglutination. Z. Hyg. InfektKr. *40*, 54.
Neufeld F. & Etinger-Tulczinska R. (1931). Nasale Pneumokokkeninfektionen und Pneumokokkenkeimträger im Tierversuch. Z. Hyg. Infekt Kr. *112*, 492.
Norris R. F., de Sipin M., Zilliken F. W., Harvey Th. S. & György P. (1954). Occurrence of mucoid variants of Lactobacillus bifidus. Demonstration of extracellular and intracellular polysaccharides. J. Bact. *67*, 159.
Novelli A. (1953). New method of staining of bacterial capsules in films and sections. Experientia, *9*, 34.
Price K. M. & Kneeland Y., Jr. (1954). A mucoid form of Micrococcus pyogenes var. aureus which shows capsular swelling with specific immune serum. J. Bact. *67*, 472.
Preisz H. (1911). Studien über das Variieren und das Wesen der Abschwächung des Milzbrandbacillus. Zbl. Bakt. Abt. I, Orig., *58*, 510.
Roger H. (1896). Les infections non bactériennes. Recherches sur l'Oidio-Mycose. Rev. gén. Sci. *7*, 770.
Rowland S. (1914). J. Hyg., Camb., Plague Supplement, *3*, 418.
Schmidt W. C. (1952). Group A Streptococcus polysaccharide: Studies on its preparation, chemical composition and cellular localisation after intra venous injection into mice. J. exp. Med. *95*, 105.
Schütze H. (1932). Studies in B. pestis antigens: I. The antigens and immunity reactions of B. pestis. Brit. J. exp. Path. *13*, 284.
Schwab M. P. & Shaffer M. F. (1950). Production of Quelling antisera in chickens. Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 74, 726.
Seal S. C. (1951). Studies on the specific soluble protein of Pasteurella pestis and allied organisms. I. Isolation, fractionation and certain physical, chemical and serological properties. J. Immunol. *67*, 93.

Sickles G. M. & Shaw M. (1950). Production of specific antisera for enzymes that decompose the carbohydrates of pneumococcus types III and VIII. J. Immunol. *64*, 21.
Smith H. & Keppie J. (1955). Studies on the chemical basis of the pathogenicity of Bacillus anthracis using organisms grown in vivo. In Mechanisms of microbial pathogenicity, ed. J. W. Howie & A J. O'Hea. Cambridge University Press.
Sokhey S. S. (1940). The capsule of the plague bacillus. J. Path. Bact. 51, 97.
Toenniessen E. (1912). Untersuchungen über die Kapsel der pathogenen Bakterien. I. Die in Kulturen und im Tierkörper gebildete Kapsel: Darstellungsmethode. Zbl. Bakt. Abt. I. Orig., *65*, 23.
Toenniessen E. (1914). Ueber die Agglutination der Kapselbacillen. Untersuchungen über die Bedeutung der einzelnen Bestandteile der Bakterienzelle für die Agglutininerzeugung und für den Vorgang der Agglutination. Zbl. Bakt. Abt. I. Orig., *75*, 329.
Toenniessen E. (1919). Ueber die chemische Beschaffenheit der Bakterienhüllen und über die Gewinnung der Eiweissubstanzen aus dem Inneren der Bakterienzelle. Münch. med. Wschr. *66*, 1412.
Toenniessen E. (1920). Untersuchungen über die Kapsel (Gummihülle) der pathogenen Bakterien. II. Die chemische Bechsaffenheit der Kapsel und ihr dadurch bedingtes Verhalten gegenüber der Fixierung und Färbung. Zbl. Bakt. Abt. I. Orig., *85*, 225.
Tomcsik J. (1951). Complex structure of the bacterial capsule in the genus Bacillus. Experientia, *7*, 459.
Tomcsik J. (1954). Ueber die Oberflächenstrukturen des Bacillus anthracis. Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. *17*, 457.
Tomcsik J. (1955). Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., *89*, 459.
Tomcsik J. & Bodon G. (1934). Agglutination of the encapsulated antrax bacilli. Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., *32*, 118.
Tomcsik J. & Grace J. B. (1955). The specific cell-wall reaction and staining of the bacterial cell-wall with Alcian blue. J. gen. Microbiol. *13*, 105.
Tomcsik J. & Guex-Holzer S. (1951). Anthrax-Polypeptid und andere spezies-spezifische Substanzen der Kapsel in der Bazillus-Gruppe. Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. *14*, 515.
Tomcsik J. & Guex-Holzer S. (1952). Aenderung der Struktur der Bakterienzelle im Ferlauf der Lysozym-Einwirkung. Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. *15*, 517.
Tomcsik J. & Guex-Holzer S. (1953). Ein neues Prinzip zur Färbung der Bakterienkapsel. Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. *16*, 882.
Tomcsik J. & Guex-Holzer S. (1954 a). Demonstration of the bacterial capsule by means of a pH dependent, salt-like combination with proteins. J. gen. Microbiol. *10*, 97.
Tomcsik J. & Guex-Holzer S. (1954б). A specific cell-wall reaction in Bacillus sp. J. gen. Microbiol. *10*, 317.
Tomcsik J. & Guex-Holzer S. (1954в). Genese der komplexen Kapselstruktur. Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. *17*, 221.
Tomcsik J & Guex-Holzer S. (1954г). Antikörperproduction mit isolierter Bakterienzellwand und mit Protoplasten. Experientia, *10*, 484.
Tomcsik J. & Szongott H. (1932). Ueber die spezifischen Polysaccharide der Milzbrandbazillen. Z. Immun Forsch. *76*, 214.
Tomcsik J. & Szongott H. (1933). Ueber ein spezifisches Protein der Kapsel des Milzbrandbazillus. Z. Immun Forsch. *77*, 86.
Webb. M. (1948). The action of lysozyme on heat-killed Gram-positive microorganisms. J. gen. Microbiol. *2*, 260.
Weibull C. (1953). The isolation of protoplasts from Bacillus megaterium by controlled treatment with lysozyme. J. Bact. *66*, 688.

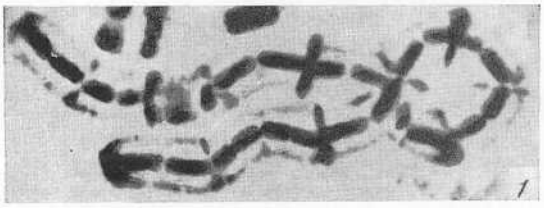


Таблица 1.

1. Исходный бескапсульный Bacillus M. с аэрированной культуры на среде Сотона; вторичное образование капсулы в центрифугальном осадке при комнатной температуре в течение 3 дней. Полисахаридная антисыворотка. Отмечаются единичные толстые поперечные перегородки. Фазовый контраст. Увеличение в 2500 раз.

2. Та же бактерия, что и на микрофотографии *1* этой таблицы. Полипептидная антисыворотка. Распределение вторично образовавшихся полипептидов неравномерно. Промежутки в месте полисахаридных поперечных перегородок. Фазовый контраст. Увеличение в 2500 раз.

ОБРАЗОВАНИЕ КАПСУЛЫ И СИНТЕЗ ГЛЮТАМИЛ-ПОЛИПЕПТИДА У *BACILLUS ANTHRACIS* И *BACILLUS SUBTILIS*

К. Б. ТОРН

Кемп Детрик, Фредерик, Мериленд

ФАКТОРЫ, ВОЗДЕЙСТВУЮЩИЕ НА ОБРАЗОВАНИЕ ПОЛИПЕПТИДА СИБИРЕЯЗВЕННЫМИ БАЦИЛЛАМИ

Влияние CO_2

Стимулирующее влияние CO_2 или бикарбоната на образование капсулы сибиреязвенной палочкой было известно давно [Иванович (Ivanovics), 1937; Стерн (Sterne), 1937]. Так как большинство сообщений в литературе основывалось на качественных исследованиях, мы предприняли некоторые количественные исследования, в которых было определено количество глютамил-полипептида [Торн, Гомец и Хаузрайт (Thorne, Gomez, Housewright, 1952; Торн, Гомец, Блинд (Blind) и Хаузрайт, 1953]. Полипептид определяли по разнице количества глютаминовой кислоты до и после кислотного гидролиза. Типовые результаты показаны в табл. 1. Для этих исследований применяли синтетическую среду и организмы культивировались во флаконах Ру, содержащих 100 мл питательного агара. Результаты даются в миллиграммах растворенной связанной глютаминовой кислоты, имеющейся в урожае клеток, собранном с одного флакона Ру. Вирулентный штамм 994 выращивали в атмосферах воздуха, 25% азота в воздухе и 25% CO_2 в воздухе на средах с pH 6,5—7,5—8,5. В атмосфере воздуха или азота при всех испытанных pH полипептид образовывался в малом количестве или совсем не образовывался. В то же время полипептид образовывался в атмосфере CO_2. Продукция полипептида, которая при pH 6,5 была очень низкой, повышалась до 21,3 мг при pH 8,5.

Азот в этом количестве пептида составлял 7% всего азота клеток. Повышение продукции при более высоких pH, вероятно, является результатом большего удержания CO_2. Рост, измеряемый по количеству общего азота, не меняется значительно при трех ступенях pH или в трех различных атмосферах.

Результаты других опытов показали, что в то время, как CO_2 существенно необходим для образования полипептида вирулентными штаммами, авирулентные слизистые штаммы М и НМ образуют полипептид при отсутствии добавления бикарбоната или CO_2.

Принимая во внимание значение вирулентности и потребления CO_2 для образования капсулы [Стерн, 1937; Чу (Chu), 1952; Торн и др., 1952], все изучавшиеся нами штаммы Bacillus anthracis входят в один из трех типов. Первый тип, являющийся нормальным, вирулентным типом, образует полипептид при выращивании в присутствии бикарбоната или CO_2, но не при выращивании в присутствии воздуха. Второй тип, авирулентный, образует полипептид при культивировании в присутствии воздуха и прибавление бикарбоната или CO_2 оказывает малое влияние или совсем не оказывает такового на количество образующегося полипептида. Третий тип, также авирулентный, не образует полипептид ни при каких условиях, испытанных до настоящего времени (табл. 1).

Таблица 1

Образование глютамил-полипептида сибиреязвенной палочкой, штамм 994, в атмосферах воздуха, азота и углекислоты

pH среды	Атмосфера	Рост по общему азоту	Пептид (растворимая связанная глютаминовая кислота)
6,5	Воздух	22,9	0
	25% азота в воздухе	22,6	0,8
	25% CO_2 в воздухе	26,3	1,4
7,5	Воздух	23,8	1,0
	25% азота в воздухе	23,2	0,3
	25% CO_2 в воздухе	24,3	9,2
8,5	Воздух	29,3	1,6
	25% азота в воздухе	24,7	1,9
	25% CO_2 в воздухе	28,3	21,3

Примечание. Результаты даны в миллиграммах азота и пептида в урожае клеток с одного флакона Ру, содержащего 100 мл агаровой среды.

Эти наблюдения подсказывают удобный метод для определения потенциальной вирулентности отдельного штамма. По нашим наблюдениям, культуры, дающие слизистые колонии в атмосфере воздуха, авирулентны; дающие шероховатые колонии в атмосфере воздуха и CO_2 — авирулентны; дающие шероховатые колонии в атмосфере воздуха и слизистые колонии в атмосфере CO_2 — вируленты. Результаты наших проб на вирулентность, проведенных на морских свинках, подтвердили эти наблюдения. Однако могут быть исключения и метод должен применяться, вероятно, лишь как пробная процедура до тех пор, пока не будет испытано больше культур и не будет установлена частота исключений. Гладстон (Gladstone, 1946) описал два штамма, которые явно образовывали капсулы в CO_2 и были авирулентны, а Стерн (1937) наблюдал вариант, который продуцировал капсулы в CO_2, но который несомненно утратил свою вирулентность для морских свинок, однако он был умеренно вирулентен для мышей.

Третий тип (шероховатый в атмосфере воздуха и CO_2) возник спонтанно из вирулентного родительского штамма, и, по Чу (1952), частота мутации варьирует у различных штаммов. На агаровой чашке, засеянной вирулентным штаммом и культивированной в атмосфере CO_2, колонии казались очень слизистыми, за исключением некоторых, имевших шероховатый наружный край. Если пересевы производили с шероховатого края колонии, они давали колонии, остающиеся шероховатыми в атмосфере как воздуха, так и CO_2, и организмы были авирулентны. Если отсевы производили из слизистой части колонии, они образовывали шероховатые колонии в атмосфере воздуха и слизистые колонии в атмосфере CO_2, и организмы оставались вирулентными.

Чу (1952) показал, что бескапсульный вариант появляется также в культурах, выросших при отсутствии сыворотки или прибавленного бикарбоната или CO_2, и сделал вывод, что диссоциация не индуцируется присутствием CO_2 или сыворотки. Чу предполагал, что наличие CO_2 или сыворотки создает условия, благоприятные для образования капсулы теми клетками, которые к этому способны, и которые впоследствии могут легко отличаться от клеток, неспособных продуцировать капсулы. Далее он предполагал, что быстрое появление шероховатых вариантов — следствие того факта, что они вырастают в виде цепочек более длинных, чем капсулированные клетки, и поэтому способны расти вне материнской колонии в среде, где они имеют лучшее снабжение питательными веществами.

Опыты в нашей лаборатории показывают, что CO_2 способствует селекции авирулентных материалов в жидкой среде. Типичные данные приведены в табл. 2. Организмы культивировались с аэрацией во флаконах, содержавших синтетическую среду. Последняя представляла собой модификацию (Торн и др., 1953)

среды, разработанной для Bacillus anthracis Брюэром, Мак Куллоф, Миллс, Росслером, Гербстом и Хауе (Brewer, McCullough, Mills, Roessler, Herbst, Howe, 1946). К среде были прибавлены различные количества бикарбоната натрия, и флаконы аэрировали смесью 30% CO_2 в воздухе. Организмы подсчитывали путем высева на чашки с агаром, содержащим бикарбонат и выращивавшимся в 50% CO_2, благодаря чему могли быть выявлены шероховатые варианты.

Если бикарбонат отсутствовал или если он прибавлялся в концентрации 0,2%, количество шероховатых вариантов составляло менее 1%. Но при наличии более высоких концентраций бикарбоната, 0,5 и 0,7%, появлялось большое количество шероховатых вариантов, причем процент повышался при увеличении концентрации бикарбоната. Эти данные указывают, что бикарбонат или некоторые условия, являющиеся следствием наличия бикарбоната, благоприятствуют шероховатым вариантам больше, чем слизистому типу. В жидкой среде оба типа клеток должны иметь одинаковый доступ к питательным веществам и поэтому неправдоподобно, что доступность питательных веществ к клеткам является фактором, вызывающим образование шероховатых вариантов. Однако возможно, что капсула затрудняет диффузию питательных веществ в клетку. Исследования по этой про-

Таблица 2

Влияние концентрации бикарбоната на появление шероховатых авирулентных вариантов, М-36

Возраст культуры	$NaHCO_3$(%)	Организмы/мл	Шероховатые варианты (%)
0	0	$1{,}0\times10^5$	1,0
24	0	$2{,}0\times10^6$	1,0
	0,2	$2{,}4\times10^7$	1,0
	0,5	$1{,}5\times10^7$	1,0
	0,7	$6{,}8\times10^6$	53,3
48	0	$6{,}4\times10^7$	1,0
	0,2	$1{,}9\times10^8$	1,0
	0,5	$1{,}4\times10^8$	2,0
	0,7	$1{,}9\times10^8$	92,0
72	0	$2{,}8\times10^7$	1,0
	0,2	$2{,}8\times10^7$	1,0
	0,5	$1{,}7\times10^7$	3,2
	0,7	$1{,}9\times10^7$	93,6
96	0	$2{,}1\times10^7$	1,0
	0,2	$1{,}4\times10^7$	1,0
	0,5	$5{,}2\times10^6$	46,4
	0,7	$6{,}4\times10^6$	75,7

Примечание. Организмы были выращены во флаконах на синтетической среде, аэрированной смесью 30% CO_2 в воздухе.

блеме продолжаются с целью определить природу такого селективного действия. Одно любопытное наблюдение заключается в том, что DL-эритроизомер хлоромицетина тормозит образование шероховатых вариантов в культурах, инкубированных в присутствии CO_2.

Функция CO_2 или бикарбоната в полипептидном синтезе у потребляющих CO_2 штаммов непонятна. В опытах с $^{14}CO_2$ в нашей лаборатории большие количества ^{14}C оказались включенными в α-карбоксил глютаминовой кислоты полипептида. Если CO_2 принимает участие только в синтезе глютаминовой кислоты, прибавление последней к среде должно было бы уменьшить потребность в CO_2. Хотя прибавленная глютаминовая кислота уменьшает количество $^{14}CO_2$, включающегося в полипептид, CO_2 или бикарбонат остаются еще необходимыми для синтеза полипептида (табл. 2).

Влияние аминокислот

Модифицированная синтетическая среда Брюэра (Торн и др., 1953) содержит 17 аминокислот. Только три из них абсолютно необходимы для роста вирулентных штаммов 994 и М-36 и капсульного авирулентного штамма М. Это — лейцин, валин и метионин. Организмы не растут при отсутствии в среде одной из этих аминокислот. Если из среды исключать каждый раз по одной из остальных аминокислот, это не оказывает или оказывает мало влияния на рост. Только при исключении двух или больше аминокислот рост значительно уменьшался. Когда каждая из аминокислот, необязательных для роста, была исследована с точки зрения влияния на синтез пептида, только DL-изолейцин, DL-фенилаланин и L-глютаминовая кислота значительно влияли на продукцию пептида.

Штаммы М-36 и 994 испытывались в закупоренных резиновыми пробками встряхиваемых флаконах с прибавленным бикарбонатом (Торн и др., 1953), т. е. в условиях, при которых образуется полипептид. При удалении изолейцина имело место скудное использование глютаминовой кислоты и выход полипептида был низким. При удалении фенилаланина аккумулировалась свободная L-глютаминовая кислота и происходил небольшой синтез пептида.

Результаты, полученные при исключении глютаминовой кислоты в указанных условиях опыта, были непостоянны. Прибавление 50—100 μг/мл, хотя и не было существенно для продукции пептида, приводило к более раннему началу роста и более стойкому результату.

Если штамм М-36 исследовался при более выраженных аэробных условиях, т. е. во флаконах, аэрированных 30% CO_2 в воздухе, результаты, полученные с изолейцином и глютаминовой ки-

слотой, были сходны с полученными в закрытых резиновыми пробками флаконах. Однако в этих условиях исключение фенилаланина не влияло на выход пептида (табл. 3).

Таблица 3

Влияние изолейцина и фенилаланина на образование пептида штаммом М

Прибавленные аминокислоты		Пептид (растворенная связанная глютаминовая кислота) (мг/мл)
DL-фенилаланин (мг/мл)	DL-изолейцин (мг/мл)	
0,33	0	0,27
0,33	0,06	0,64
0,33	0,11	1,69
0,33	0,33	1,55
0,33	0,66	1,01
0,33	0,32	0,79
0	0,66	0
0,05	0,66	0,96
0,10	0,66	1,11
0,20	0,66	1,12
0,33	0,66	1,01

Примечание. Организмы выращивались в 50 мл флаконах Эрленмейера, содержащих 100 мл синтетической среды и культивировались во встряхивателе 70 часов.

Табл. 3 показывает влияние различных концентраций изолейцина и фенилаланина на образование пептида авирулентным штаммом М в закрытых ватными пробками флаконах. Выход пептида был низким при исключении той или другой аминокислоты и глютаминовая кислота среды не использовалась.

Потребность в глютаминовой кислоте для образования пептида была больше выражена у штамма М, чем у штаммов, нуждающихся в CO_2, 994 и М-36. D-глютаминовая кислота не заменяла L-изомер.

ОБРАЗОВАНИЕ ПЕПТИДА У *BACILLUS SUBTILIS*

Некоторые штаммы других аэробных спорообразующих бацилл образуют глютамил-полипептид, подобный образуемому Bacillus anthracis [Иванович и Брукнер (Bruckner), 1937; Иванович и Эрдос (Erdos), 1937; Боварник (Bovarnick), 1942]. В то время как пептид сибиреязвенной палочки содержится в большей степени в капсуле и поступает в среду при автоклавировании или при старении и автолизе клеток (Торн и др., 1953), пептид, образуемый B. subtilis, появляется свободным в среде.

Наблюдения над растущими культурами

Образование полипептида у Bacillus subtilis изучал Боварник (1942). Он применял среду Сотона и выращивал культуры без встряхивания. Было получено в среднем 1,5 мг пептида на 1 мл. Торн, Гомец, Нойес и Хаузрайт (1954) исследовали влияние разных факторов на образование пептида у B. subtilis как в неподвижных, так и во встряхиваемых культурах. Выход в 2—3 мг/мл был получен на модифицированной среде Сотона в неподвижных культурах. Наивысшие урожаи, свыше 15 мг/мл, были получены при выращивании организма во встряхиваемых флаконах на среде следующего состава (количества в г/литр): глицерина 80; лимонной кислоты 0,04; L-глютаминовой кислоты 20; NH_4Cl 7,0; $MgSO_4$ 0,5; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,04; K_2HPO_4 0,5; pH доведено NaOH до 7,4.

В процессе наших исследований факторов, оказывающих влияние на образование пептида у B. subtilis, мы наблюдали, что культуры, которые поддерживались на скошенном питательном агаре, теряли способность образовывать большие количества пептида. Если такие культуры рассевали на агаровые чашки со средой Сотона, можно было наблюдать два типа колоний: один тип шероховатый, а другой — слизистый. Колонии, которые выглядели более слизистыми, были отобраны и рассевали на свежий агар для получения изолированных колоний. Этот процесс был повторен несколько раз, и последние изолированные штаммы образовывали значительно больше полипептида, чем исходная культура. Эта процедура изоляции и отбора слизистых колоний была повторена с другими культурами с аналогичными результатами. В результате этих наблюдений нами была освоена практика хранения эталонных сортов почвенных споровых.

Синтез пептида бесклеточными препаратами

В исследованиях образования полипептида растущими культурами Bacillus subtilis Торн и др. (1954) наблюдали, что после того, как выход пептида достигал максимума, он постепенно снижался, а количество свободной глютаминовой кислоты повышалось. Это указывает на наличие энзима, который гидролизирует пептид до глютаминовой кислоты, и было найдено, что фильтраты культур активно гидролизировали пептид как B. subtilis, так и B. anthracis. Путем насыщения фильтратов культур сернокислым аммонием были получены активные препараты. Осадок диализировали и применяли как таковой или концентрировали еще сернокислым аммонием и при помощи изоэлектрической преципитации. Мы недавно наблюдали, что ультразвуковые экстракты B. subtilis также содержат энзим, но фильтраты культур дают более активные препараты.

Те же препараты энзимов, которые гидролизируют полипептид, также катализируют синтез глютамил-пептидов путем реакции трансамидирования [Уиллиамс (Williams) и Торн, 1954а; Уиллиамс, Литвин (Litwin) и Торн, 1955]. γ-глютаминовый радикал переносится с глютамина на глютаминовую кислоту, образуя γ-глютамил-глютаминовую кислоту.

В табл. 4 сравниваются изомеры глютамина и глютаминовой кислоты как предшественников дипептида (Уиллиамс и Торн, 1954а). Дипептид синтезировался в том случае, если единственным прибавляемым субстратом был L- или D-глютамин. D-глютаминовая кислота стимулировала синтез пептида из L-глютамина, но не влияла на синтез из D-глютамина. L-глютаминовая кислота оказывала мало влияния на синтез дипептида из L-глютамина, но тормозила реакцию с D-глютамином. Таким образом, как L-, так и D-глютамин действуют как субстраты для энзима, но наиболее активный синтез наблюдался тогда, когда применялась комбинация L-глютамина и D-глютаминовой кислоты. Оптимум pH для реакции между L-глютамином и D-глютаминовой кислотой составляет 8,8 и не требуется дополнительных кофакторов. Пептид не синтезируется, если прибавляется только L- или только D-глютаминовая кислота.

Таблица 4

Синтез глютамил-дипептида из изомеров глютамина и глютаминовой кислоты

Оптические изомеры вещества		Образование дипептида (*мкм*/мл)
глютамин	глютаминовая кислота	
L-	—	2,6
L-	D-	6,1
L-	L-	2,1
D-	—	3,3
D-	D-	3,4
D-	L-	0,5

Примечание. Каждая пробирка содержала 40 μM глютамина, 30 μM глютаминовой кислоты, 20 μM буфера Триса[1] и 0,12 мг белка в общем объеме 0,5 мл. Конечный pH = 8,8; пробирки культивировались (инкубировались) при 36,5° в течение 2 часов.

Когда реагирующие смеси, содержащие энзимы, L-глютамин и D-глютаминовую кислоту, были оставлены на несколько ча-

[1] Tris — гидроксиметил аминометановый буфер. *Ред.*

сов, синтезировались другие пептиды с длиной цепочки большей, чем у дипептида. Хроматографическое подтверждение было получено для три-, тетра- и пента-пептидов и даже для более длинных пептидов, которые не обладали подвижностью на хроматограммах.

Дополнительно к реакции трансамидирования, только что описанной, препараты энзима катализируют также реакцию транспептидирования с γ-D-глютамил-D-глютаминовой кислотой в качестве субстрата (Уиллиамс и Торн, 1954б). При подходящих концентрациях субстрата и коротком периоде инкубации образовались свободная глютаминовая кислота и трипептид глютаминовой кислоты в эквимолярных количествах в равной степени. При более низких концентрациях субстрата и более продолжительной инкубации образовывалось больше глютаминовой кислоты, чем трипептида, — указание на то, что при этих условиях происходит гидролиз пептида.

В опытах по определению, могут ли из дипептида в качестве субстрата образовываться пептидные цепи, более длинные, чем остаток трех глютаминовых кислот, высокие концентрации энзима и субстрата инкубировались несколько часов. Бумажные хроматограммы реагирующих смесей выявили пятна высших пептидов, сходные с найденными в опытах с L-глютамином и D-глютаминовой кислотой.

Таким образом, оказывается, что полипептид, выделяемый растущей культурой Bacillus subtilis, может быть синтезирован при помощи комбинации реакций трансамидирования и транспептидирования, подобных тем, которые катализируются свободными от клеток препаратами. Сходная энзимная система еще не была обнаружена в клетках или фильтратах культур B. anthracis.

СИНТЕЗ D-ГЛЮТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ *B. ANTHRACIS* И *B. SUBTILIS*

В разрешении проблемы механизма синтеза D-глютамилполипептида один из вопросов касается механизма синтеза D-глютаминовой кислоты. На этот вопрос был дан ответ, когда Торн, Гомец и Хаузрайт (1955) показали, что бесклеточные экстракты Bacillus subtilis катализируют серию реакций трансаминирования, включающих D-аминокислоты.

При фракционировании сернокислым аммонием и диализе были получены препараты трансаминазы, специфические для D-аминокислот. При помощи очищенных препаратов была синтезирована D-глютаминовая кислота путем трансаминирования между α-кетоглютаровой кислотой и D-аспарагиновой кислотой, D-аланином, D-метионином и D-серином. L-изомеры аспарагиновой кислоты, метионина и серина были неактивны. Экстракты содержали аналин-рацемазу, которая превращала оба изомера в

DL-смесь. Так как рацемаза находилась даже в очищенных препаратах, как L-, так и D-аланин оказались активными в трансаминировании с α-кетоглютаровой кислотой. Однако образовавшаяся в результате глютаминовая кислота была D-изомером, указывая на то, что фактически трансаминировался только D-изомер аланина.

Очищенные препараты D-аспарагиновой кислоты и D-глютаминовой кислоты трансаминируются с пировиноградной кислотой, образуя аланин. L-изомеры были неактивны. Было получено равновесие между реагентами и продуктами реакции между D-глютаминовой кислотой и пировиноградной кислотой, подтверждающее, что реакция была действительно реакцией трансаминирования.

Ультразвуковые экстракты Bacillus anthracis также катализировали трансаминирование D-аминокислот [Торн и Молнар (Molnar), 1955] и некоторые из реакций отличались от реакций, описанных для B. subtilis. Из испытанных аминокислот единственным D-изомером, который трансаминировался с α-кетоглютаровой кислотой, образуя D-глютаминовую кислоту, был D-изомер аланина. Некоторые L-изомеры, например аланин, аспарагиновая кислота, гистидин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин и триптофан, трансаминировали с α-глютаровой кислотой. С другой стороны, D-изомеры фенилаланина, глютаминовой кислоты, триптофана, метионина, гистидина, этионина и лейцина трансаминировали с пировиноградной кислотой, образуя аланин. Единственным L-изомером, который оказался способным трансаминировать с пировиноградной кислотой, была L-глютаминовая кислота. Таким образом, за исключением глютаминовой кислоты и аланина, только L-изомеры трансаминировали с α-кетоглютаровой кислотой и только D-изомеры трансаминировали с пировиноградной кислотой. Одной из наиболее активных реакций, катализированных препаратами, полученными из B. anthracis, была реакция между D-фенилаланином и пировиноградной кислотой, приводящая к образованию аланина и фенилпировиноградной кислоты. Для этой реакции было получено трансаминазное равновесие, указывающее на то, что это была действительно реакция трансаминирования.

Эта реакция особенно интересна, так как ранние исследования, описанные выше, указывают, что фенилаланин имеет какое-то отношение к синтезу полипептида у Bacillus anthracis. В этих исследованиях активным был L-изомер. Возможно, что организм превращает один изомер аланина в смесь D- и L-изомеров при помощи серии реакций, включающих трансаминирование и рацемизацию аланина. Экстракты B. anthracis, подобно экстрактам B. subtilis, катализировали рацемизацию аланина. Таким образом, следующие реакции, которые были все выявлены в экстрактах B. anthracis, могут завершаться превращением L-фенилаланина в смесь двух изомеров:

(1) L-фенилаланин + α-кетоглютаровая кислота ⇌ фенилпировиноградная кислота + L-глютаминовая кислота;

(2) L-глютаминовая кислота + пировиноградная кислота ⇌ α-кетоглютаровая кислота + L-аланин;

(3) L-аланин → DL-аланин;

(4) D-аланин + фенилпировиноградная кислота ⇌ пировиноградная кислота + D-фенилаланин.

Среда, оптимальная для образования глютамил-полипептида растущими культурами Bacillus subtilis, содержит большое количество L-глютаминовой кислоты, тогда как глютаминовая кислота полипептида содержит значительную часть D-изомера. Боварник (1942), изучая образование пептида у B. subtilis и применяя меченую DL-глютаминовую кислоту, сделал вывод, что скелет молекулы глютаминовой кислоты мог быть использован организмом в качестве субстрата для образования пептида и что механизм реакции включает α-иминоглютаровую кислоту или ее дериват. Когл, Эммелот и Ден Боэр (Kogl, Emmelot, den Boer, 1954) также применяли меченные изотопом D- и L-глютаминовые кислоты как субстраты для синтеза полипептида у B. subtilis. Их результат показывает, что оба изомера включались в полипептид в виде D-глютаминовой кислоты, и авторы допускают наличие рацемазы глютаминовой кислоты для объяснения полученных ими данных, т. е. очевидной конверсии L-глютаминовой кислоты в D-изомер. Их предварительные попытки обнаружить рацемазу глютаминовой кислоты не дали успеха. Мы также произвели несколько безуспешных попыток выявить рацемазу глютаминовой кислоты у B. subtilis и B. anthracis. Однако обнаружение рацемазы аланина и трансаминирования D-аминокислот у этих организмов свидетельствует, что D-глютаминовая кислота, вероятно, синтезируется путем трансаминирования и что рацемаза глютаминовой кислоты не обязательно должна быть вовлечена в этот процесс. Следующие реакции, которые были обнаружены в экстрактах B. subtilis и B. anthracis (Торн и др., 1955; Торн и Молнар, 1955), могли в результате дать непрямую конверсию L-глютаминовой кислоты в D-изомер:

(1) L-глютаминовая кислота + пировиноградная кислота ⇌ α-кетоглютаровая кислота + L-аланин;

(2) L-аланин → DL-аланин;

(3) D-аланин + α-кетоглютаровая кислота ⇌ пировиноградная кислота + D-глютаминовая кислота.

СТРУКТУРА ГЛЮТАМИЛ-ПОЛИПЕПТИДА

Брайкс и Фромджот (Bricas, Fromageot, 1953) дали обзор литературы, касающейся строения и свойств глютамил-полипептида Bacillus anthracis и родственных организмов. Хотя не возникает сомнений в том, что глютаминовая кислота является

единственной аминокислотой, выделяющейся при кислотном гидролизе пептида, имеются противоречивые сообщения, касающиеся ее конфигурации. Брукнер и Иванович (1937), а также Иванович и Брукнер (1937) показали, что при кислотном гидролизе полипептида B. anthracis и B. mesentericus образовалась D-глютаминовая кислота. Боварник (1942) заключил, что полипептид B. subtilis построен только из D-глютаминовой кислоты, а Уотсон, Кромерти, Блум, Гекли, Мак Хи и Вейсман (Watson, Cromartie, Bloom, Heckly, McGhee, Weissman, 1947) нашли, что лишь 85% глютаминовой кислоты полипептида, образуемого B. subtilis, относится к D-изомеру. Пептидные препараты из B. anthracis, изученные Хенби и Райдоном (Hanby, Rydon, 1946) содержали только D-глютаминовую кислоту.

Данные, полученные нашей лабораторией (Торн и др., 1954), показали, что различные препараты полипептида, образуемого одним и тем же штаммом Bacillus subtilis при различных условиях, варьировали по содержанию D- и L-глютаминовой кислоты. Количество D-глютаминовой кислоты в образце пептида менялось в пределах от 20 до 80% общего количества глютаминовой кислоты в зависимости от условий культивирования. Глютаминовая кислота из пептида, образовавшегося в статической культуре, обычно содержала 70—80% D-изомера, тогда как в пептиде, полученном при встряхивании флаконов, этот процент падал до 40—50. Эти данные отличаются от результатов, полученных при исследовании B. anthracis. Мы не могли обнаружить сколько-нибудь значительных количеств L-глютаминовой кислоты в препаратах пептида из этого организма. В табл. 5 приводятся данные о некоторых из наших препаратов пептида, выделенных из обоих организмов.

Таблица 5

Анализ препаратов глютамил-полипептида

№ препарата	Источник	Форма пептида	Азот (%)	Глютаминовая кислота	
				общая (%)	L-изомер (в % к общей)
70-1	B. subtilis, 9945	Натриевая соль	9,40	96,2	54,9
70-2	B. subtilis, 1945	Свободная кислота	10,81	113,0	53,4
74	B. anthracis, M-36	Натриевая соль	9,25	101,0	0,6
75	То же	Свободная кислота	10,95	112,8	1,4
	Теоретические величины:				
	Натриевая соль ($C_5H_6O_3$ NNa) ∞		9,27	97,4	—
	Свободная кислота ($C_5H_7O_3N$) ∞		10,85	113,9	—

Боварник (1942) сделал заключение, что полипептид Bacillus subtilis состоит из остатка D-глютаминовой кислоты, соединенного в γ-пептидной связи. Его вывод основывался на наблюдении, что полипептид не рацемируется в сильно щелочном растворе при комнатной температуре. Хенби и Райдон (1946) считали, что полипептид B. anthracis построен из α-пептидных цепей остатков 50—100 D-глютаминовой кислоты, соединяющихся γ-пептидными цепями. Этот вывод был основан на действии азотистой кислоты на пептиды, а также на результатах электрометрического титрования.

Брукнер, Ковач (Kovacs) и Денс (Denes) (1953) сделали вывод, что полипептиды B. anthracis и B. subtilis построены преимущественно из γ-глютаминовых связей и что γ-глютаминовые связи имеются в очень небольшом количестве, если они вообще имеются. Их заключение основывалось на наблюдении, что в кислотном гидролизате деривата полиамина, приготовленного из полипептида при помощи деградации полигидразида по Курциусу или деградации полиамида по Гофману, обнаруживается β-формилпропионовая кислота и отсутствуют α- и γ-диаминомасляные кислоты. В опытах с синтетической α-полиглютаминовой кислотой при кислотном гидролизе продуктов деградации образовывались α- и γ-диаминомасляные кислоты.

Уэли (Waley, 1955) приготовил синтетическую поли - (γ-L-глютамил) - L-глютаминовую кислоту и сравнил ее свойства с препаратом из полипептида, изолированного из Bacillus anthracis и B. licheniformis. Он заключил, что естественно встречающиеся пептиды были также связаны в γ-положении.

Опыты в нашей лаборатории с гидролизирующим полипептид энзимом из Bacillus subtilis показали, что энзим может гидролизовать синтетические γ- D-глютамил- D-глютаминовую кислоту, γ- L-глютамил- L-глютаминовую кислоту и α- L-глютамил-L-глютаминовую кислоту. Он не гидролизирует α- D-глютамил-D-глютамил- D-глютаминовую кислоту. Так как препараты энзима гидролизируют полипептид B. anthracis и так как этот полипептид содержит только D-глютаминовую кислоту, вероятно, в пептиде имеются γ-связи. В настоящее время производятся опыты по определению способности энзима полностью гидролизировать полипептид. Полный гидролиз до свободной глютаминовой кислоты должен доказать отсутствие α-связи.

ЛИТЕРАТУРА

Bovarnick M. (1942). The formation of extracellular d (—) glutamic acid polypeptide by Bacillus substilis. J. biol. Chem., *145*, 415.

Brewer C. R., McCullough W. G., Mills R. C., Roessler W. G., Herbst E. J. & Howe A. F. (1946). Studies on the nutritional requirements of Bacillus anthracis. Arch. Biochem. *10*, 65.

Bricas E. & Fromageot C. (1953). Advances in Protein Chemistry, vol. *8*. New York: Academic Press.

Bruckner V, & Ivanovics G. (1937). Über das natürliche Vorkommen und über eine einfache biologische Gewinnungsart der l (—) -Glutaminsäure. Hoppe-Seyl. Z. *247*, 281.

Bruckner V., Kovacs J. & Denes G. (1953) Stsucture of poly-D--glutamic acid isolated from capsulated strains of B. anthracis. Nature, Lond., *172*, 508.

Chu H. P. (1952). Variation of Bacillus anthracis with special reference to the non-capsulated avirulent variant. J. Hyg., Camb., *50*, 433.

Gladstone G. P. (1946).Immunity to anthrax: protective antigen present in cell-free culture filtrates. Brit. J. exp. Path. *27*, 394.

Hanby W. E. & Rydon H. N. (1946). The capsular substance of Bacillus anthracis. Biochem. J. *40*, 297.

Ivanovics G. (1937). Unter welchen Bedingungen werden bei der Nährbodenzüchtung der Milzbrandbazillen Kapseln gebildet? Zbl. Bakt. Abt. I. Orig., *138*, 449.

Ivanovics G. & Bruckner V. (1937). Die chemische Structur der Kapselsubstanz des Milzbrandbazillus und der serologisch identischen spezifischen Substanz des Bacillus mesentericus. Z. Immun Forsch. *90*, 304.

Ivanovics G. & Erdos L. (1937). Ein Beitrag zum Wesen der Kapselsubstanz des Milzbrandbazillus. Z. Immun Forsch. *90*, 5.

Kogl F., Emmelot P. & den Boer D. H. W. (1954). Über die Biosynthese der Poly-D-glutaminsäure-Baustein. Liebigs Ann. *589*, 15.

Sterne M. (1937). Variation in Bacillus anthracis. Onderstepoort. J. vet. Sci. *8*, 271.

Thorne C. B., Gomez C. G. & Housewright R. D. (1952). Synthesis of glutamic acid and glutamyl polypeptide by Bacillus anthracis. II. The effect of carbon dioxide on peptide production on solid media. J. Bact. *63*, 363.

Thorne C. B., Gomez C. G., Blind G. R. & Housewright R. D. (1953). Synthesis of glutamic acid and glutamyl polypeptide by Bacillus anthracis. III. Factors affecting peptide production in synthetic liquid media. J. Bact. *65*, 472.

Thorne C. B., Gomez C. G., Noyes H. E. & Housewright R. D. (1954). Production of glutamyl polypeptide by Bacillus subtilis. J. Bact. *68*, 307.

Thorne C. B., Gomez C. G. & Housewright R. D. (1955). Transamination of D-amino acids by Bacillus subtilis. J. Bact. *69*, 357.

Thorne C. B. & Molnar D. M. (1955). D-amino acid transaminations in Bacillus anthracis. J. Bact. *70*, 420.

Waley S. G. (1955). The structure of bacterial polyglutamic acid. J. Chem. Soc. p. 517.

Watson D. W., Cromartie W. J., Bloom W. L., Heckly R. J., McGhee W. J. & Weissman N. (1947). Studies on infection with Bacillus anthracis. V. The isolation of an inflammatory factor from crude extracts of lesions of B. anthracis infection and its biological and chemical relationship to glutamyl polypeptide. J. infect. Dis. *80*, 121.

Williams W. J. & Thorne C. B. (1954a). Biosynthesis of glutamyl peptides from glutamyne by a transfer reaction. J. biol. Chem. *210*, 203.

Williams W. J. Thorne C. B. (1954б). Elongation of γ-D-glutamyc acid peptide chains by a transfer reaction. J. biol. Chem. *211*, 631.

Williams W. J., Litwin J. & Thorne C. B. (1955). Further studies on the biosynthesis of γ-glutamyl peptides by transfer reactions. J. biol. Chem. *212*, 427.

КЛЕТОЧНЫЕ СТЕНКИ БАКТЕРИЙ

М. Р. ДЖ. СОЛТОН

Отдел биохимии Кембриджского университета

ВВЕДЕНИЕ

Открытие того факта, что некоторые микроорганизмы способны синтезировать свою протоплазму из простых составных частей, таких как минеральные соли и углекислый газ (Виноградский, 1887), вызвало у некоторых микробиологов ложное представление, что эта кажущаяся биохимическая простота является синонимом структурной простоты. Однако цитологические исследования, изучение взаимодействия с красками и эксперименты по плазмолизу — все это указывало на структурную сложность маленьких бактериальных клеток. Цитологи достигли в настоящее время единогласия относительно основных структурных особенностей микроорганизмов. Многие бактерии обладают упругой клеточной стенкой со свойствами иными, чем включенная в нее цитоплазма, и в этом отношении они близко напоминают клетки высших растений.

О наличии четко обозначенной клеточной стенки у бактерий высказывал предположение Кон (Cohn, 1875). Он считал, что резистентность бактерий к растворяющему действию щелочей и кислот обязана не характеру клеточной протоплазмы, а «оболочке», подобной по своим свойствам оболочке мицелия грибов. Ранние цитологические исследования не оставляют сомнений в том, что поверхностные слои бактерий должны быть дифференцированы на капсулы и слизистые пласты и клеточную стенку. По аналогии со строением высших организмов полагали, что бактериальная клетка имеет оболочку, которая может отличаться от своего наружного соседа, клеточной стенки, и от внутренней протоплазмы [Фишер (Fischer), 1895; Найзи (Knaysi), 1938]. Тем не менее до недавнего времени доводы в пользу существования специфической структуры цитоплазматической оболочки были малоудовлетворительными. Более убедительное доказательство дифференциации цитоплазматической оболочки от стенки и внут-

ренней протоплазмы было обеспечено блестящим цитологическим исследованием Робинау и Меррей (Robinow, Murray, 1953) и вызывающим захватывающий интерес обособлением протопластов Вейбуллом (Weibull, 1953).

Связь поверхностных слоев (капсулы, клеточной стенки и цитоплазматической оболочки) с морфологической целостностью бактериальной клетки сделала возможным прямое исследование со специфическими энзимными системами. Так, было возможно удалить полисахарид пневмококка III типа при помощи энзиматического переваривания [Эвери и Дюбо (Avery, Dubos), 1931] и М-протеинового антигена из гемолитических стрептококков при обработке трипсином [Ленсфилд (Lancefield), 1943] без влияния на жизнеспособность организмов. Ясно, следовательно, что некоторые поверхностные слои могут быть удалены при помощи энзимов без существенного структурного изменения организма. Растворение клеточной стенки палочковидных Bacillus megaterium при обработке лизоцимом в 0,2 М растворе сахарозы в 0,03 М фосфате (Вейбулл, 1953) сопровождается превращением в сферические протопласты. Это дает дальнейшее доказательство для общего предположения, что упругая внешняя стенка является структурным компонентом, который ограничивает протопласт в пределах характерной формы клеточной стенки.

Хотя ранние цитологические наблюдения привели к достаточному доказательству существования упругой клеточной стенки у большинства «истинных бактерий», точное определение ее толщины, общих свойств и химического состава представляло известные трудности. Обычно предполагают, что вещество, остающееся после экстракции щелочью, представляет собой резистентные клеточные стенки. Подобные остатки действительно обладали типичными контурами экстрагированных клеток [Винценти (Vincenzi), 1887], но было мало достаточных доказательств для того, чтобы думать о полном удалении внутриклеточных компонентов. Пределы разрешающей способности, допускаемые оптическим микроскопом, составляли основное затруднение — слои щелочеустойчивого вещества или мелкие частицы могли, вероятно, ускользнуть от исследователя, особенно если отсутствовали методы окраски для их отличия от стенки. Существенные успехи в задаче выделения клеточной стенки как самостоятельной морфологической единицы, без примеси цитоплазматического вещества, можно было ждать от развития электронной микроскопии с ее мощной разрешающей способностью.

ОБОСОБЛЕНИЕ СТЕНОК БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Ранние методы обособления того, что считали структурами клеточных стенок, были основаны на экстрагировании организмов щелочью. Еще в 1887 г. Винценти изолировал стенку («обо-

лочку клеток») сенной палочки при помощи экстрагирования 0,5% NaOH и обработки «синтетическим желудочным соком». Из данного Винценти описания остатков ясно, что они в значительной степени соответствовали веществу клеточной стенки, однако трудно определить степень деградации, которая могла быть вызвана этим методом изоляции. В настоящее время мы знаем, что остатки обработанных щелочью клеток значительно отличаются по виду при рассматривании в электронный микроскоп от стенок, обособленных другими методами [Солтон и Горн (Salton, Horne), 1951б], и что при обработке NaOH может иметь место известная деградация стенок (Солтон, 1952а).

Одним из четких методов, при котором можно было бы избежать химического изменения стенок, было, конечно, механическое разрушение микробных клеток. Подобные методы ни в коем случае не современны, так как Бернерд и Хьюлетт (Barnard, Hewlett) в 1911 г. описали специально сконструированный аппарат для разрушения бактерий и дрожжей. Они показали одновременную утрату жизнеспособности и окрашиваемости, но в мазках из разрушенных дрожжей было ясно видны толстые клеточные стенки. Природа клеточного детрита из разрушенных бактерий осталась неясной.

Электронная микроскопия механически разрушенных бактерий

Мадд и Лекмен (Mudd, Lackman, 1941), Мадд, Полевицкий (Polevitzky), Эндерсон (Anderson) и Чемберс (Chambers) (1941) были первыми, изучившими разрушенные бактерии в электронный микроскоп. Они показали, что разрушенные ультразвуком клетки стрептококков и некоторых видов бацилл теряют бо́льшую часть их плотного для электронного потока протоплазматического вещества, в результате чего были обнаружены ригидные клеточные стенки.

Еще в 1901 г. Мак Фейдайн и Роуленд (McFadyen, Rowland) применяли встряхивание с мелким песком как метод разрушения тифозных палочек. Эта техника была усовершенствована Кингом и Александером (King, Alexander, 1948), применявшими мельчайшие стеклянные бусы совершенно одинаковых размеров. Доусон (Dawson, 1949) нашел, что Staphylococcus aureus может быть разрушен при встряхивании со стеклянными бусами в тканевом дезинтеграторе Майкла (Mickle, 1948). При центрифугировании распавшихся клеток при 8000 об/мин Доусон отделил более тяжелые не разрушенные клетки и клеточные стенки от цитоплазматических компонентов. Исследование таких препаратов в электронном микроскопе выявило отделение ригидных стафилококковых стенок от внутриклеточного цитоплазматического вещества.

В целях получения изолированных клеточных стенок для химического анализа Солтон и Горн (1951б) применяли преимущественно тот же метод, который был описан Доусоном (1949) для разрушения Escherichia coli и Salmonella pullorum. Для химического анализа клеточных стенок было совершенно необходимо снизить до минимума примесь неразрушенных бактерий и цитоплазматического содержимого. При первоначальном центрифугировании при 2000—3000 об/мин в течение 10—15 минут оказалось возможным осадить некоторые целые бактерии и грубые частицы, проходящие через шлаковый стеклянный фильтр, применяемый для удаления стеклянных бус. При дифференцированном центрифугировании, сопровождаемом осторожным отмыванием стенок дистиллированной водой, может быть получен гомогенный препарат клеточных стенок, относительно свободный от задерживающего электронный поток цитоплазматического материала (Солтон и Горн, 1951б). У некоторых грамотрицательных бактерий удаление примеси цитоплазматического материала от стенок было значительно более трудным, но оно могло быть достигнуто путем осторожного отмывания осадка клеточных стенок подходящими буферными растворами или раствором м-NaCl. Отмывание неочищенного осадка клеточных стенок м-NaCl было применено в стандартной очистке клеточных стенок как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (Солтон, 1952а, 1953а).

Хотя в настоящее время твердо установлено, что бактериальные стенки не подвергаются воздействию энзимов, таких как трипсин, рибонуклеаза и дезоксирибонуклеаза, я, как правило, избегал применения этих энзимов для «очистки» клеточных стенок. Основные доводы против их неограниченного применения заключаются в том, что при воздействии таких энзимов, как трипсин, в препаратах клеточных стенок может остаться примесь нерастворимых пластеинов и что неочищенные энзимы могут, возможно, содержать незначительные количества разрушающих клеточные стенки энзимов. Этим недостаткам может быть противопоставлено полезное действие — удаление задерживающего электронные лучи цитоплазматического вещества при обработке энзимами стенок, в частности грамотрицательных бактерий.

В дополнение к методам, в основе которых лежит разрушение бактерий встряхиванием со стеклянными бусами, клеточные стенки некоторых организмов могут быть выделены одинаково хорошо при применении звукового или ультразвукового воздействия. Однако некоторые организмы, в частности стафилококки, стрептококки и Micrococcus lysodeicticus, не разрушаются в достаточной степени даже при длительном воздействии магнитострикционного осциллятора Рейтеон (Raytheon) 9Кс. Могут быть применены многие разновидности механического разрушения клеток, и Мак Карти (McCarty, 1952б) изолировал стенки

стрептококка группы А размалыванием в шаровой мельнице. Он нашел, что в нерастворимом осадке остается много белка и нуклеиновых кислот, которые, однако, могут быть удалены при обработке трипсином и рибонуклеазой; после такой обработки остаток, содержащий стенки, был исследован в электронном микроскопе и был найден относительно свободным от внутриклеточного вещества.

Другие методы выделения

Кроме механических методов разрушения бактерий для отделения клеточных стенок были разработаны некоторые другие процедуры. Вейдель (Weidel, 1950, 1951) изолировал стенки Escherichia coli путем автолиза клеток под толуолом и переваривания трипсином. Выделенные таким образом стенки были все же способны адсорбировать и инактивировать бактериофаг. Хотя однородность клеточного материала была подтверждена проверкой при ультрацентрифугировании и электрофорезе (Вейдель, 1950), небольшой, резистентный к трипсину остаток мог быть обнаружен на электронных микрографиях стенок.

Установленный факт, что стенки некоторых грамотрицательных бактерий разрывались, если взвесь клеток вносили струей в дистиллированную воду, нагретую до 70—100° (Солтон и Горн, 1951а), явился основой для другого метода изолирования стенок. Разрушенные стенки могли быть отделены от свернувшегося протопласта встряхиванием и изолированы дифференцированным центрифугированием (Солтон и Горн, 1951б). Вследствие незначительного выхода материала клеточных стенок и вероятности, что термическая обработка может вызвать изменения некоторых компонентов клеточной стенки, этот метод был признан менее удовлетворительным, чем механическое разрушение (Солтон, 1953а).

Изменение стенки в процессе ее выделения

Несомненно труднее определить, в какой степени процесс изоляции, включающий механическое разрушение, может привести к каким-либо химическим или биохимическим изменениям вещества стенки. В общем кажется, что эти изменения не имеют места; с другой стороны, вещество стенки, изолированное при разрыве, вызванном термической обработкой, показало некоторые признаки химического изменения (Солтон, 1953а). Однако у механически разрушенных клеток более опасным является наличие внутриклеточных энзимов, которые могут разрушать некоторые компоненты стенок. У целого организма такой энзим, вероятно, отделен от соответствующего субстрата благодаря организованному строению клетки, но при разрушении и при выде-

лении внутриклеточных составных частей энзим может проявить свою активность.

Взвесь изолированных стенок некоторых организмов остается стабильной на известный период хранения при температуре около 4° (Солтон, 1952б). Однако в неполностью отмытой взвеси клеточных стенок золотистого стафилококка наблюдалось значительное снижение мутности при хранении под хлороформом свыше 4 недель при 4°, и кажется обоснованным допустить, что растворение стенок могло быть результатом примеси разрушающих стенки энзимов из разрушенных стафилококков (Солтон, неопубликованные наблюдения). Это предположение подкрепляется существованием «стафилолитических» систем, выявленных Уэлшом и Солмоном (Welsch, Salmon, 1950).

Однородность препаратов клеточных стенок

Однородность или отсутствие в изолированных стенках посторонних примесей нелегко определить количественно. Подобная трудность присуща любому методу изоляции, включающему механическое разрушение и дифференцированное центрифугирование. Основной критерий однородности изолированных стенок — отсутствие цитоплазматической примеси, определяемое при исследовании в электронном микроскопе. Критерий этот недостаточно удовлетворителен и, конечно, не свободен от возражений. Однако, несмотря на эти трудности, при осторожной стандартизации разрушения в дезинтеграторе Майкла (применяя равный объем бус и бактериальной взвеси, содержащей 10—15 мг сухого веса бактерий на 1 мл) и при отмывании осадка клеточных стенок м-NaCl можно получить препараты клеточных стенок, свободные от непропускающих электронный поток цитоплазматических частиц, нуклеиновых кислот, внутриклеточных пигментов и т. д.

Однородность препаратов стенок, изолированных из Micrococcus lysodeicticus, была определена путем растворения стенок лизоцимом и взвешивания нерастворимого в лизоциме остатка после осаждения (10 000 об/мин в течение 30 минут). Нерастворимый в лизоциме остаток составлял всего 0,8% веса препарата изолированных стенок. Подобные результаты, полученные со стенками Sarcina lutea и Bacillus megaterium (оба чувствительны к лизоциму), показали, что примеси нерастворимого материала могут составить не больше 1%. Несмотря на то, что подобные определения, вероятно, недооцениваются на том основании, что некоторые целые чувствительные к лизоциму бактерии якобы растворяются полностью, они дают возможность получить относительно однородный материал.

Могут также применяться другие критерии, такие как определение количества золы или примесей известных внутрикле-

точных энзимов и нуклеиновых кислот. Количество зольного остатка в общем должно соответствовать довольно точно содержанию P (Солтон, 1952a); высокое его содержание должно указывать, вероятно, на примесь осколков стекла.

ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК

Относительный вес стенки бактериальной клетки

При прямом выделении клеточных стенок золотистого стафилококка Купер, Раули (Cooper, Rowley) и Даусон (1949) нашли, что стенки составляют до 20% сухого веса организма. Эта величина была подтверждена Митчеллом и Мойл (Mitchell, Moyle, 1951). Клеточные стенки большинства грамположительных организмов также составляют в среднем 20% сухого веса бактерий, но в некоторых случаях стенка Micrococcus lysodeicticus может достигать 25—30% сухого веса бактериальной субстанции (Солтон, неопубликованные наблюдения).

Нерастворимый остаток клеточных стенок, изученный Холдсуортом (Holdsworth, 1952a), составлял 45% сухого веса клеток Corynebacterium diphtheriae. Фернелл (Fernell) и Кинг (1953) исследовали нерастворимый остаток многих грамположительных и грамотрицательных бактерий и во всех случаях вес нерастворимых фракций представлял собой значительную часть сухого веса целых организмов. Нерастворимый остаток Pseudomonas aeruginosa достигает 76—78% сухого веса всего организма. Кажется сомнительным, были ли эти остатки исключительно материалом клеточных стенок.

Более тонкие стенки грамотрицательных организмов, вероятно, составляют менее чем 20% сухого веса организма.

Толщина и ригидность

При измерении длины тени, отбрасываемой клеточной стенкой золотистого стафилококка, Даусон (1949) определил толщину стенки в 15—20 mμ. Сходные величины были получены для толщины стенок Streptococcus faecalis; электронные микрографии стенок грамотрицательных бактерий Escherichia coli и Salmonella pullorum (Солтон и Горн, 1951б) указывают, что они несколько тоньше, порядка 10—15 mμ. Бирч-Андерсен, Маалое и Сьестранд (Birch-Anderson, Maaløe, Sjöstrand, 1953), изучая ультратонкие срезы Escherichia coli, сообщили об «оболочке» толщиной около 10 mμ. Толщина стенок Mycobacterium tuberculosis равна в среднем 23 mμ [Найзи, Хилльe и Фабрикант (Hillier, Fabricant), 1950].

Хотя бактериальная стенка образует вокруг клетки непрерывный слой совершенно одинаковой толщины, имеются некоторые основания, вытекающие из ультратонких срезов [Чепмен (Chapman) и Хилльe, 1953] и из изучения клеточных стенок, приготовленных для электронной микроскопии путем высушивания в замороженном состоянии [Солтон и Уилльямс (Williams), 1954], что внешняя поверхность стенки имеет более неровное строение, чем внутренняя поверхность. Сходные наблюдения были сделаны при изучении стенок Bacillus subtilis [Иосида, Фукуйа, Какутани, Танака, Тегава и Хасимото (Yoshida, Fukuya, Kakutani, Tanaka, Tegawa, Hashimoto), 1954].

Если взвесь клеточных стенок высушена на воздухе на опорной пленке для изучения при помощи электронного микроскопа, стенки выглядят как плоские спавшиеся мешки. Подобный спавшийся вид несомненно обязан силам поверхностного натяжения, оказывающим давление во время высушивания препарата для электронной микроскопии. Уилльямс (1953) усовершенствовал лиофильный метод для сохранения строения биологических материалов во время приготовления препарата для электронной микроскопии, и когда изолированные бактериальные стенки были исследованы этим методом, то стала очевидной их ригидность (Солтон и Уилльямс, 1954). Вместо спавшихся мешковидных образований стенки большинства палочковидных бактерий были типичными цилиндрическими. В настоящее время остается мало сомнений в том, что стенки бактерий обладают достаточной механической твердостью для того, чтобы придать организму его характерную форму. Изменение типичной палочковидной формы в сферический протопласт при растворении стенки Bacillus megaterium под влиянием лизоцима в растворе сахарозы (Вейбулл, 1953) составляет второе подтверждение ригидности внешней стенки.

Ясно, что стенки некоторых бактерий должны быть достаточно тверды для сохранения структурной целостности клетки при воздействии на них высоких внешних осмотических давлений. Митчелл и Мойл (1955) вычислили, что внутриклеточное содержимое золотистого стафилококка обладает осмотическим давлением, достигающим 15—20 атмосфер. Имеются, однако, многие организмы, которые подвергаются осмотическому лизису. Солтон (неопубликованные данные) нашел, что мечниковский вибрион быстро лизируется при суспендировании в дистиллированной воде, а исследования при помощи ультрацентрифуги показали наличие характерных внутриклеточных компонентов при константах осаждения, равных 45 S; 29 S и 5,2 S; такие же компоненты были получены при звуковой дезинтеграции или раздроблении с окисью алюминия других организмов [Шахман, Перди и Стенье (Schachman, Pardee, Stanier), 1952]. Осмотический лизис люминесцентных и галофильных организмов является дальнейшим примером чувствительности стенок не-

которых бактерий к осмотическому повреждению. Представляется вероятным, что большинство организмов, показывающих такую осмотическую хрупкость, принадлежат к грамотрицательной группе бактерий. Возможно, что эта хрупкость может зависеть от тонкости стенок этих организмов, различного химического состава и наличия более сложного строения стенки, содержащей сферические макромолекулы.

Макромолекулярная структура клеточных стенок

Не считая выявления валиков и экваториальных колец, соответствующих зонам клеточного деления и образованию поперечных стенок [Доусон и Стерн (Stern), 1954], стенки многих организмов не обнаружили наличия тонкого строения. Существование микромолекулярных составных частей в бактериальной клетке было впервые показано на изящных электронных микрографиях стенки организма вида Spirillum, исследованного Хауинком (Houwink, 1953). Он нашел, что стенка этого организма составлена по крайней мере из двух слоев и внутренний слой состоит из шаровидных макромолекул диаметром до 120—140 Å, расположенных в гексагональном порядке.

Шаровидные макромолекулы диаметром около 100 Å (также показывающие гексагональное расположение) были открыты в клеточной стенке Rhodospirillum rubrum (Солтон и Уилльямс, 1954). Как показано в табл. 1, *1*, макромолекулы видимы в изолированной стенке и просвечивают через ее внешнюю поверхность. Стенка R. rubrum также составлена по крайней мере из двух слоев, как это видно на фрагментах стенки в табл. 1, *2*.

Несколько труднее решить, является ли макромолекулярный слой стенки этого организма внутренним или наружным.

Существование макромолекулярных компонентов стенки Spirillum serpens (Хауинк, 1953) было подтверждено Горном (личное сообщение); шары имели в диаметре около 50 Å с промежутком между центрами макромолекул, достигающим 80 Å.

Иной тип макроструктуры был выявлен у стенки неидентифицированного грамположительного организма Лебоу и Мосли (Labaw, Mosley, 1954). Шаровидные макромолекулы, достигающие около 115 Å в диаметре, были построены в стенке этого организма в правильном прямоугольном порядке.

До сих пор Хауинк (1953), а также Солтон и Уилльямс (1954) не могли подтвердить предположение Найзи (1951) о существовании тонкого строения стенок вегетативных клеток видов, принадлежащих к роду Bacillus. Гомогенность строения клеточной стенки B. megaterium изображена в табл. 1, *3*, а также в табл. 2, *4* и *5*, в которых, кроме того, видно присоединение к стенке бактериофагов.

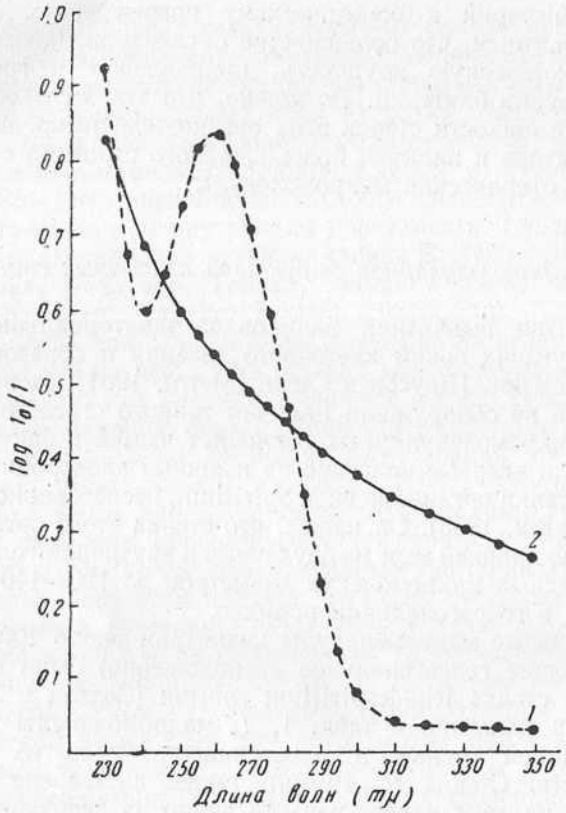


Рис. 1. Ультрафиолетовая часть адсорбционного спектра фракций str. faecalis.

Кривая *1* — «цитоплазматическая» фракция (произвольная концентрация); кривая *2*—взвесь клеточных стенок—200 *μг* сухого веса клеточных стенок/мл.

Некоторые свойства взвеси клеточных стенок

Изолированные стенки образуют молочно-белую, несколько опалесцирующую взвесь, заметно отличающуюся по внешнему виду от мутной взвеси целых бактерий. За исключением стенок Rhodospirillum rubrum, изолированные стенки пигментированных организмов, например желтой сарцины, Micrococcus lysodeicticus и золотистого стафилококка, полностью свободны от пигментов; пигменты обнаруживаются в мелких частицах и «растворимых цитоплазматических» фракциях.

Адсорбционный спектр изолированных стенок многих грамположительных бактерий показывает ровно идущую кривую без признака характерных подъемов в ультрафиолетовой части

спектра. Следовательно, стенки грамположительных организмов могут быть легко дифференцированы от цитоплазматических компонентов, обладающих характерным адсорбционным максимумом в пределах 260 mμ. Адсорбционный спектр ультрафиолетовой части стенок (кривая *2*) и цитоплазмы (кривая *1*) показаны на рис 1. Благодаря наличию ароматических аминокислот в стенках грамотрицательных бактерий (Солтон, 1953а) обнаруживается характерный «горб» в пределах длины волны около 270—280 mμ (Солтон и Горн, 1951б).

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ

Винценти (1887) был одним из ранних исследователей, предпринявших химическое изучение бактерийной клеточной стенки. Он нашел, что «стенка» Bacillus subtilis содержит 5—11% азота, и, кроме вывода, что она не построена из целлюлозы, он не смог дать указание на ее общее строение. Различные утверждения были сделаны относительно присутствия в бактериальной стенке целлюлюзы, гемицеллюлозы или хитина. Было выполнено много исследований остатков, изолированных из обработанных щелочью клеток, но, как уже отмечалось (Солтон и Горн, 1951б), подобные остатки не обязательно соответствуют неразрушенным клеточным стенкам.

С развитием подходящих приемов изолирования клеточных стенок и выяснения их гомогенности путем изучения в электронном микроскопе методы аналитической химии и биохимии могли уже быть применены для выяснения химического строения стенок. Вейдель (1950, 1951) сделал заключение, что клеточная стенка Escherichia coli липопротеидной природы. Митчелл и Мойл (1951) нашли, что клеточная «оболочка» золотистого стафилококка состоит из глицеро-фосфоро-протеидного комплекса. Клеточная стенка Streptococcus faecalis отличается от других организмов тем, что она состоит из мукополисахарида, содержащего гексозамин, рамнозу, глюкозу и галактозу, а также многочисленные аминокислоты (Солтон, 1952а). Клеточная стенка Corynebacterium diphtheriae, исследованная Холдсуортом (1952б), содержит и белок, и углеводные компоненты и, следовательно, принадлежит к общему классу веществ, известных как мукоидные комплексы [Кент и Уайтхауз (Kent, Whitehouse), 1955]. Эти наблюдения показали, что бактериальные стенки обладают высоко индивидуальными химическими особенностями. Дальнейшие исследования строения стенок других организмов в избытке подтвердили это предположение, но при этом были выявлены некоторые интересные особенности в различных родах в грамположительных и грамотрицательных группах бактерий.

Некоторые различия строения клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий

Изучение химического состава клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий (Солтон, 1952в, 1953а) выявило два существенных различия:

1. а) стенки грамположительных организмов содержат ограниченный набор аминокислот; бросающейся в глаза особенностью является отсутствие ароматических и S-содержащих аминокислот, пролина, гистидина и аргинина;

б) стенки грамотрицательных бактерий, с другой стороны, содержат набор аминокислот, сходный с найденным у большинства общих белков, включая ароматические и S-содержащие аминокислоты, аргинин и пролин.

2. Содержание липида в стенках грамотрицательных бактерий в общем значительнее, чем у грамположительных организмов.

Результаты некоторых независимых одно от другого исследований строения клеточной стенки [Мак Карти, 1952б; Ньютон (Newton), 1956] еще более обосновали эти различия; суммарные данные, показывающие эти особенности, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Некоторые особенности аминокислотного состава и содержания липидов в клеточных стенках

Организм	Аминокислотные особенности	К-во известных аминокислот, определенных при помощи хроматографии	«Общий липидный» состав (% к сухому весу клеточной стенки)
Грамположительные:			
Strept. faecalis (4)	Отсутствие ароматических и некоторых S-содержащих аминокислот; аргинин и пролин обычно не обнаруживаются	9	2,3
Strept. pyogenes (4)		9	—
M. lysodeicticus (4)		4	1,2
S. lutea (4)		5	1,1
Staph. aureus (2)		12	4,4
B. subtilis (4)		10*	2,6
B. megaterium (4)		10*	—
C. diphtheriae (1)		10*	—
Грамотрицательные:			
Esch. coli (4)	Наличие ароматических и содержащих аминокислот, аргинина и пролина	17*	22
Salm. pullorum (4)		16*	19
Ps. aeruginosa (3)		16*	11
R. rubrum (4)		16*	21,7

* В клеточных стенках обнаружена диаминопимелиновая кислота.

Примечание. Данные получены: (1) Камминсон и Гаррисом (Cummins, Harris, 1954); (2) Митчеллом и Мойлом (1951); (3) Ньютоном (1956); (4) Солтоном (1952а, 1953а, 1954 и неопубликованные наблюдения)

Аминокислотный состав

С точки зрения терминологии кажется сомнительным, что мы должны употреблять термин «белок» для описания большинства азотсодержащих компонентов стенок грамположительных бактерий. Аминокислотный состав этих стенок отличается некоторыми существенными особенностями от аминокислотного строения большей части белков [Тристрам (Tristram), 1953]. Фенилаланин и аргинин, оба рассматриваемые как «неотъемлемые аминокислоты» белков (Тристрам, 1953), не были найдены в стенках грамположительных организмов. Возможно, что другой, более тщательный и ведущий к меньшим ошибкам путь описания этих составных частей позволил бы описать их как содержащие «аминокислоты» или как пептидные компоненты. Из анализа аминокислотного состава стенок грамотрицательных бактерий ясно, что их основные азотсодержащие компоненты могут быть с полным правом описаны как «белки».

Хотя общее количество компонентов стенок, содержащих аминокислоты (или «белки»), может варьировать у различных организмов, большинство стенок, исследованных до сих пор, вероятно, содержат относительно бо́льшие пропорции аланина и глютаминовой кислоты. Снелл (Snell) (личное сообщение) нашел, что аланин может составлять значительную часть (до 40%) общего азота стенки Streptococcus faecalis и что и D-, и L-аланин обнаруживаются в стенках Lactobacillus casei и Streptococcus faecalis. Интересно также определить, содержат ли бактериальные стенки обе формы (D и L) глютаминовой кислоты. Стенки золотистого стафилококка, изученные Митчеллом и Мойл (1951), как будто отличаются от стенок других организмов тем, что они содержат значительное количество глицина в дополнение к аланину и глютаминовой кислоте.

Другим типичным аминокислотным компонентом клеточных стенок некоторых организмов является диаминопимелиновая кислота, впервые выделенная Уорком (Work, 1951) из дифтерийной бактерии. Диаминопимелиновая кислота была впоследствии найдена в стенках дифтерийной бактерии (Холдсуорт, 1952а, б) и ее присутствие в стенках многих бактерий в настоящее время полностью установлено (Солтон, 1953а; Камминс и Гаррис, 1954, 1955). Представляет интерес выяснить, насколько соответствует ее наличие в клеточных стенках ее распределению в других группах микроорганизмов (Уорк и Деви, 1953). Еще не ясно, ограничивается ли диаминопимелиновая кислота клеточной стенкой или она имеется также во внутриклеточных белках.

Природа пептидных компонентов комплексов стенок пока не исследована. В работах с клеточными стенками Streptococcus faecalis трудность исследования заключалась в расщеплении комплекса стенок на полисахаридную и аминокислотную части (Солтон, 1952а). Тем не менее Холдсуорт (1952а, б) успешно

экстрагировал полисахариды из клеточной стенки Corynebacterium diptheriae путем кипячения в насыщенной пикриновой кислоте; пептиды остались в нерастворимом пикрате. Как гексозамин, так и диаминопимелиновая кислота были найдены в пептидной фракции. Можно предположить, на основании некоторых признаков, что пептиды спор, изучавшиеся Стренджем и Поуэллом (Strange, Powell, 1954), также содержат гексозамин, и представляется вероятным, что подобные пептиды могут быть постоянными компонентами бактериальных структур.

Полисахариды и гексозамины

Полисахаридные компоненты были обнаружены в изолированных стенках как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (Солтон, 1953а). Как и в отношении пептидных и белковых составных частей, их фактическое количество колеблется в зависимости от организма. Митчелл и Мойл (1951) смогли выявить лишь малые количества редуцирующих веществ в стенках стафилококков.

Таблица 2

Редуцирующие вещества, содержание гексозамина и сахара клеточных стенок

Организм	В процентах к сухому весу клеточных стенок		
	редуцирующие субстанции[1] (как глюкоза)	гексозамин[2]	Сахара, идентифицированные путем хроматографии
Грамположительные:			
Strept. faecalis (5)[2]	61	22	Рамноза, галактоза, глюкоза
Strept. pyogenes (2)	55—62	18—22	Рамноза
M. lysodeicticus (5)	45	16	Глюкоза
S. lutea (5)	46,5	16	Глюкоза
Staph. aureus (3)	0,5	До 1	—
B. subtilis (5)	34	8,5	Глюкоза
B. megaterium (5)	45—48	18	Глюкоза
C. diphtheriae (1)	25	—	Галактоза, манноза, арабиноза
Грамотрицательные:			
Ech. coli (5)	16	3	Галактоза, глюкоза
Salm. pullorum (5)	46	4,8	Галактоза, глюкоза, манноза, рамноза
Ps. aeruginosa (4)	16,9; 16,8	2,1; 2,7	—
R. rubrum (5)	23	2	—

[1] Определения редуцирующих веществ и гексозамина были произведены после гидролиза (обычно 2 NHCl или H_2SO_4 в течение 2 часов при 100°).

[2] Данные: (1) Холдсуорт (1952 а, б); (2) Мак Карти (1952б); (3) Митчелл и Мойл (1951); (4) данные, касающиеся двух штаммов, Ньютон (1956); Солтон (1952а, 1953а, 1954, неопубликованные наблюдения).

Количество полисахаридов может быть определено в виде редуцирующих веществ после кислотного гидролиза, а содержание сахара идентифицируется при помощи бумажной хроматографии. Кроме редуцирующих сахаров, клеточные стенки многих бактерий содержат также значительное количество аминосахаров. Определения редуцирующих веществ и гексозамина, а также определенных редуцирующих веществ стенок различных бактерий даны в табл. 2. В общем стенки грамотрицательных бактерий содержат меньше гексозамина, чем стенки большинства грамположительных бактерий (стенки стафилококков также отличаются в этом отношении). Однако содержание полисахарида и природа сахарных компонентов не выявляют такой разницы, какая имеет место в отношении липидного и аминокислотного состава.

Значение полисахаридных компонентов клеточных стенок грамотрицательных бактерий заслуживает некоторых специальных разъяснений. Пока отсутствует достаточная информация, которая позволила бы нам решить, представляют ли они структурные единицы стенки или являются только компонентами поверхностных слоев, физически примыкающих к клеточной стенке. Возможно, что полисахариды могут составлять часть сложного соматического «О» антигена и не находятся в химической связи с твердой структурой клеточной стенки. Сходство моносахаридных компонентов, определенных в препаратах клеточных стенок (Солтон, 1953а), с сахарными компонентами изолированных соматических «О» антигенов соответствующего вида [Дэвис (Davies, 1955] прибавляет некоторые обоснования к этому предположению. Кажется вероятным, что слои поверхностных антигенных компонентов грамотрицательных бактерий могут быть удержаны стенками при выделении почти аналогично тому, как М-белок пристает к стенке в процессе разрушения стрептококков группы А (Солтон, 1953а). Наиболее очевидным путем для решения вопроса, являются ли полисахаридные компоненты изолированных стенок грамотрицательных бактерий неотъемлемыми составными частями плотной структуры клеточной стенки, было бы изучение их судьбы в результате извлечения диэтиленгликолем при обстоятельствах, примененных Морганом (Morgan, 1937).

Единственное подробное исследование полисахаридного компонента, о котором известно его происхождение из клеточной стенки, принадлежит Холдсуорту (1952б). Изолированный олигосахарид содержит 2 молекулы D-галактозы, одну — D-маннозы и три — D-арабинозы и имеет молекулярный вес порядка 1000.

Хотя прежние предположения, что некоторые бактериальные стенки могут быть построены из хитина, в настоящее время кажутся неправдоподобными, в некоторых клеточных стенках было установлено наличие значительного количества гексозамина (Мак Карти, 1952б; Солтон, 1952а). Гексозамин, вероятно, входит в состав стенки в виде N-ацетилгексозамина, но нет дан-

ных предполагать, что он существует как полимер хитинового типа. Гексозаминовые реакции гидролизированных стенок, по Элсону и Моргану, вероятно, не обязаны исключительно глюкозамину. Исходя из обнаружения неидентифицированного аминосахара в гексозаминсодержащих пептидах спор (Стрэндж и Поуэлл, 1954), Камминс и Гаррис (1955) нашли сходное вещество в клеточных стенках других бактерий. Эти последние исследователи указали также на наличие галактозамина в некоторых бактериальных стенках.

Кажется вероятным, что роль гексозаминов в мукоидном комплексе клеточных стенок, может быть, заключается в том, чтобы обеспечить связь между полисахаридным и пептидным компонентами вещества клеточной стенки.

Липидные компоненты

Липидные составные части клеточных стенок могут быть определены лишь методами экстракции, и на основании исследования «извлекаемого эфиром липида» клеточные стенки грамположительных бактерий содержат незначительные количества его (Солтон, 1952а, 1953а). Стенки грамотрицательных бактерий могут содержать до 8% «извлекаемого эфиром липида». Экстрагирование эфиром после того, как препараты стенок были подвергнуты более жесткой обработке (гидролиз 6N-HCl в течение 2 часов при 100°), показывают содержание «общего липида» уже до 22% для грамотрицательных организмов. Представляется возможным, что высокое содержание липида в стенках грамотрицательных бактерий может быть объяснено тем, что липид играет роль «цементирующего» вещества для мозаики белковых макромолекул, подобно тому как это выявлено у некоторых видов спирилл. Как указывалось выше, небольшие количества липида в стенках грамположительных бактерий могут явиться результатом значительного связывания липида в процессе выделения.

Данные о химическом строении липидов клеточных стенок отсутствуют.

ДЕЙСТВИЕ ЭНЗИМОВ НА КЛЕТОЧНЫЕ СТЕНКИ

Бактериолитические свойства различных тканевых экстрактов, секретов и фильтратов микробных культур давно были известны, а действие этих энзимов на клеточную структуру освещалось в обзоре Солтона (1953а). Быстрое просветление бактериальной взвеси энзимами должно указать на решительные изменения поверхностных компонентов клеток. Это кажется законным выводом для лизиса живых бактерий, но, как подчеркивает Солтон (1953б), растворение убитых нагреванием бактерий

(в частности, грамотрицательных организмов) протеолитическими энзимами не обязательно включает прямое действие на стенки. Повреждение стенок во время термической обработки делает коагулированный протопласт более доступным для протеолитического энзима. Изолированные стенки не разрушаются энзимами, такими, как трипсин. Имеются, однако, некоторые бактериолитические энзимы, у которых было обнаружено прямое действие на клеточные стенки.

Лизоцим

Флеминг (Fleming, 1922) назвал лизоцимом мощный бактериолитический агент, найденный в секретах и тканях. Со времени наблюдений Флеминга над быстрым лизисом Micrococcus lysodeicticus под влиянием лизоцима литические свойства этого энзима были изучены в некоторых подробностях. Относительная легкость, с которой лизоцим яичного белка может быть кристаллизован [Алдертон, Уорд и Фиволд (Alderton, Ward, Fevold)], в значительной степени облегчила наши современные представления о его действии на клеточную стенку.

Ранние исследования действия лизоцима на чувствительные бактерии показали, что энзим гидролизирует мукоидное вещество «оболочки» [Мейер, Палмер, Томпсон и Хоразо (Meyer, Palmer, Thompson, Khorazo), 1936]. Эпштейн и Чейн (Epstein, Chain, 1940) утверждали, что полисахаридный компонент, на который воздействует лизоцим, присутствует в целых клетках в нерастворимой форме и что этот компонент необходим для сохранения морфологической целостности некоторых чувствительных бактерий. Боассон (Boasson, 1938), с другой стороны, считал, что клеточная стенка Micrococcus lysodeicticus не разрушается лизоцимом, а становится более проницаемой для клеточного содержимого.

Турбидиметрическое определение чувствительности стенок к лизоциму

Непосредственное действие на изолированные клеточные стенки Micrococcus lysodeicticus было установлено наблюдением над растворением мутных взвесей клеточных стенок при воздействии кристаллического лизоцима из яичного белка (Солтон, 1952б). Растворение стенок сопровождалось потерей мутности на 97% и исследование остаточного материала в электронном микроскопе показало, что остались лишь немногие резистентные клетки и детрит. Было сделано заключение, что стенка M. lysodeicticus представляет собой «природный субстрат» лизоцима. Подобным же образом было показано, что изолированные стенки

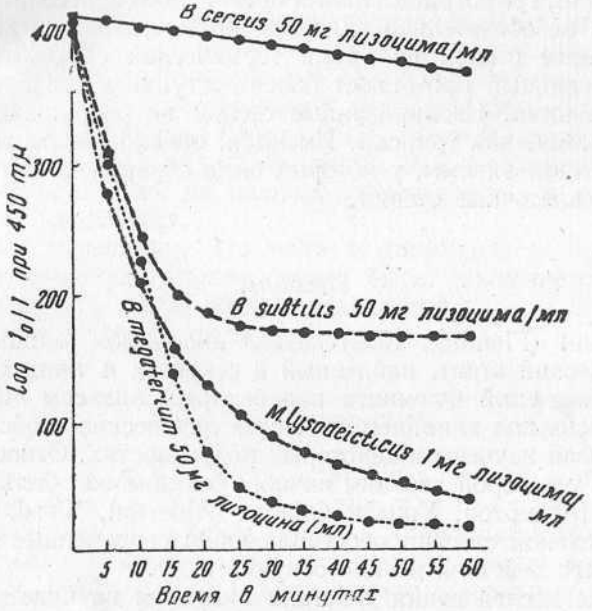


Рис. 2. Растворение стенок бактериальных клеток кристаллическим лизоцимом при температуре 37° и pH = 6,0. Оптические плотности до 0,4 ($\log I_0/I$ при 450 $m\mu$) соответствуют 1—1,5 μг сухого веса клеточных стенок/мл.

Bacillus megaterium и Sarcina lutea полностью перевариваются лизоцимом (Солтон, 1953б, 1954).

Комбинируя фазово-контрастную микроскопию и иммунологические реакции, Томчик и Гекс-Хольцер (Tomcsik, Guex-Holzer, 1952) пришли к заключению, что лизоцим действует специфически на стенку одного вида бацилл. Уэлшимер (Welshimer, 1953), применяя измельченные бактериальные препараты B. megaterium, наблюдал при обработке лизоцимом растворение фрагментов стенок.

Отсутствие изменения мутности при обработке лизоцимом целых бактерий не обязательно означает, что данный организм резистентен к лизоциму. Несомненно, что поверхностные компоненты могут предотвратить проникновение лизоцима к подлежащим структурам. Подобный эффект может быть особенно выражен там, где стенка покрыта слоем вещества, обладающего группами, заряженными отрицательно, — основной лизоцим может образовать прочный комплекс с подобными компонентами.

Один из наиболее чувствительных и надежных методов определения разрушения бактериальных стенок лизоцимом заклю-

чается в турбидиметрическом наблюдении за взаимодействием изолированных клеточных стенок с лизоцимом. Различие в чувствительности к лизоциму может быть показано путем определения степени и интенсивности растворения стенок, как это видно из рис. 2. Для разрушения стенок бациллярных видов требуются более высокие концентрации лизоцима. Подобные различия могут быть обязаны частоте и расположению соединений, подвергающихся воздействию лизоцима и неодинаковых в стенках разных организмов.

Хотя стенка Bacillus cereus относительно резистентна к лизису лизоцимом (рис. 2), продолжительное воздействие на стенки 50 μг кристаллического лизоцима яичного белка на 1 мл в течение 10 часов при 37° приводит к максимальному снижению мутности до 58%. Степень растворения клеточных стенок B. subtilis фактически такая же — 57% (Солтон, 1955а). Таким образом, стенки этих двух организмов отличаются от стенок B. megaterium тем, что они перевариваются лизоцимом неполностью, и исследование остатков после максимального лизиса выявляет наличие остаточных, похожих на стенки, структур у B. subtilis и B. cereus. В этих наблюдениях получены некоторые экспериментальные подтверждения мнения Эпштейна и Чейна (1940), что компонент, подвергающийся воздействию лизоцима, может быть не единственным структурным элементом у некоторых организмов. Подобные находки были предусмотрены на основании химического анализа стенок B. subtilis (Солтон, 1953а). Представляется вполне вероятным, что чувствительный к лизоциму компонент может быть общей структурной единицей клеточных стенок видов рода Bacillus и что аналогичные отношения могут быть также допущены для сходных компонентов в группах сарцин и микрококков.

Не было замечено уменьшения мутности при выдерживании с кристаллическим лизоцимом изолированных стенок следующих организмов: Clostridium welchii, Streptococcus pyogenes, S. agalactiae, S. faecalis, Escherichia coli, Rhodospirillum rubrum, Pseudomonas aeruginosa (Солтон, неопубликованные наблюдения). Несомненно, что эти стенки не содержат сколько-нибудь значительных количеств чувствительных к лизоциму компонентов.

Некоторые свойства изолированных стенок чувствительных к лизоциму бактерий и действие на них лизоцима

Наиболее выдающейся особенностью клеточных стенок Micrococcus lysodeicticus, Sarcina lutea, Bacillus megaterium и B. subtilis на первый взгляд можно считать то, что глюкоза и глюкозамин являются компонентами, общими для всех четырех видов. Помимо глюкозамина, недавние исследования (Солтон, неопубли-

ковано) выявили наличие вещества, соответствующего неизвестному аминосахару, описанному Стренджем и Поуэллом (1954). Только ли наличие этих веществ обусловливает чувствительность организма к лизоциму, сказать с уверенностью в настоящее время нельзя. По крайней мере ныне уже твердо установлена мукополисахаридная или мукоидно-комплексная природа «естественного» чувствительного к лизоциму субстрата.

При переваривании лизоцимом растворимых мукополисахаридов, изолированных из Micrococcus lysodeicticus, действие энзима сопровождалось освобождением редуцирующих веществ [Мейер и др., 1936; Мейер и Ханель (Hahnel), 1946; Эпштейн и Чейн, 1940]. Эпштейн и Чейн (1940), а также Мейер и Ханель (1946) сообщили о выделении N-ацетилгексозамина, а Эпштейн и Чейн (1940) дополнительно указали, что выделяется также вещество, дающее реакции на кетогексозу. Кроме этих исследований, других указаний на типы молекулярных фрагментов, являющихся следствием распада мукополисахаридных веществ под влиянием лизоцима, не появлялось.

При наличии методов изоляции клеточных стенок желательно повторное изучение действия лизоцима на нерастворимые вещества клеточных стенок. Солтон (неопубликованные наблюдения) исследовал переваренные лизоцимом стенки Micrococcus lysodeicticus, Sarcina lutea, Bacillus megaterium при помощи ультрацентрифуги и нашел, что главные компоненты всех трех продуктов переваривания обладают молекулярным весом порядка 10 000—20 000. Были также обнаружены частицы меньшего молекулярного веса и их присутствие было подтверждено другими методами. Разнородность молекулярных частиц была

Таблица 3

Некоторые свойства клеточных стенок, лизированных лизоцимом

	Данные ультрацентрифугирования S 20	% недиализирующегося материала (48 часов при 4°)	% выделенных редуцирующих веществ (выраженных в глюкозе)
Продукты лизиса клеточных стенок:			
M. lysodeicticus	1,15	66	10—11
S. lutea	1,27	86	3,4—5,3
B. megaterium	1,50	71	6,7

Растворитель 0,1 М фосфатный буфер, pH 6,2.

Условия лизиса: 15 мг клеточных стенок на 1 мл; 50 μг кристаллического лизоцима яичного белка на 1 мл; 0,1 М ацетат аммония, pH 6,3; лизирование 24 часа при 37°.

установлена опытами диализа и электрофореза недиализирующегося материала. В недиализирующейся фракции клеточных стенок Micrococcus lysodeicticus, лизированных лизоцимом, было по крайней мере три различных электрофоретических компонента, равно как электрофоретически сложными были недиализирующиеся фракции переваренных Sarcina lutea и Bacillus megaterium. Некоторые из свойств продуктов переваривания клеточных стенок сведены в табл. 3.

Как можно было ожидать из предыдущих исследований, при растворении стенок лизоцимом выделяются редуцирующие вещества и лизат дает положительные реакции Моргана и Элсона (Elson, 1934) на ацетилгексозамин. Хотя цветовые комплексы, образующиеся в условиях модифицированной реакции Моргана и Элсона [Аминов (Aminoff), Морган и Уоткинс (Watkins), 1952], дают спектр адсорбции, идентичный спектру N-ацетилглюкозамина, не удалось обнаружить свободный ацетилглюкозамин при проверке лизата стенок методом хроматографии (Солтон, 1954). Глюкоза, второй редуцирующий сахар, общий для клеточных стенок всех трех видов, не был обнаружен в виде свободной глюкозы ни методом хроматографии, ни при обработке глюкозо-оксидазой. В результате действия лизоцима не было получено ни одной из аминокислот, обнаруженных в гидролизатах стенок.

Изучение диализирующегося материала лизатов клеточных стенок при помощи хроматографии показало, что основные мелкие частицы представляют вещество с Rf, близким к таковому ацетилглюкозамина при движении в феноле-NH_3. Этот компонент может быть обнаружен на бумаге при опрыскивании анилин-фталатом, аммиачно-серебряным нитратом и ацетилгексозамином; с последним получается желтое пятно вместо пурпурного, характерного для N-ацетилгликозамина. Отделение этого фрагмента в диализирующейся фракции лизата Micrococcus lysodeicticus было достигнуто путем нанесения многочисленных пятен на ватманскую бумагу № 3 и опрыскивания фенолом-NH_3. Положение фрагмента было определено при помощи проявленных полосок, и материал, извлеченный из смежных полосок, дал при гидролизе с 2 N-HCl в течение часа резкую реакцию на гексозамин. Хроматография после гидролиза с 6N-HCl показала наличие глюкозамина и вещества, обладающего до известной степени сходными свойствами с неидентифицированным аминосахаром, найденным в пептидах спор Стренджем и Поуэллом (1954). Определение точной природы этого мелкого фрагмента, освобождаемого лизоцимом, должно явиться предметом последующих исследований.

Сейчас ясно, что стенки чувствительных к лизоциму организмов, таких как Micrococcus lysodeicticus, Sarcina lutea и Bacillus megaterium, распадаются на сложную смесь частиц с различными молекулярными весами и электрофоретическими свой-

ствами. Представляется обоснованным считать, что мелкая частица, отщепляющаяся лизоцимом, может образовать связь между компонентами, содержащими аминокислотную и полисахаридную части комплекса клеточных стенок. Конечное выяснение природы гетерогенного скопления фрагментов, образующегося в результате расщепления лизоцимом стенок, должно пролить много света на молекулярную анатомию клеточных стенок хотя бы некоторых бактерий.

Другие энзимы, разрушающие клеточные стенки

Макстед (Maxted, 1948) сообщил, что путем обработки экзоэнзимами, выделяемыми Streptomyces albus, из некоторых стрептококков могут быть освобождены группо-специфические вещества. Кажется вероятным, что подобные энзимы могут обладать прямым действием на стенки стрептококков; экспериментальное подтверждение этому было дано Мак Карти (1952б) и Солтоном (1952в, 1953а).

Мак Карти (1952а, б) исследовал образование, фракционирование и действие энзима Streptomyces albus. Имеет некоторое значение, что очищенные фракции энзима, активные против стрептококковых стенок, были лишены активности против Micrococcus lysodeicticus (Мак Карти, 1952а). Что этот энзим может иметь специфичность, отличающую его от лизоэнзима, было в дальнейшем доказано исследованием клеточных стенок стрептококков группы А (Мак Карти, 1952б). Рамноза и гексозамин оказываются двумя редуцирующими веществами, общими для стрептококковых стенок (Мак Карти, 1952б; Солтон, 1952а, 1953а). Стенка Streptococcus faecalis дополнительно содержит глюкозу и галактозу (Солтон, 1952а).

Из исследований действия «стрептолитического» энзима на стенки стрептококков группы А Мак Карти (1952б) заключил, что недиализирующиеся вещества имели гетерогенный характер. Некоторые из глюкозаминов клеточных стенок диализировались после переваривания энзимом, но диализирующийся глюкозамин не был ни свободным глюкозамином, ни исключительно ацетилглюкозамином. Подобные свойства этих продуктов переваривания клеточных стенок скорее напоминают таковые у стенок, лизированных лизоцимом.

Было показано, что виды Streptomyces, другие, чем S. albus, продуцируют энзимы, активные против стрептококковых стенок (Солтон, 1955б). Энзимы, расщепляющие клеточные стенки, могут быть обнаружены путем внесения изолированных клеточных стенок в отмытый агар и оказалось, что многие актиномицеты обладают способностью выделять энзимы, разрушающие стенки Streptococcus faecalis и S. agalactiae (Солтон, 1955б).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИОФАГОВ С КЛЕТОЧНЫМИ СТЕНКАМИ

Работая с изолированными клеточными стенками Escherichia coli B, Вейдель (1951) нашел, что наблюдается специфическая адсорбция бактериофагов T_2, T_4 и T_6. Это устанавливает морфологическую локализацию специфических рецепторных веществ для этих фагов. Позже из стенок E. coli B был изолирован рецептор для фага T_5 в виде сферической частицы, и взаимоотношение этой рецепторной шарообразной частицы и фага было изящно показано в электронном микроскопе [Вейдель и Келленбергер (Kellenberger), 1955]. Они сделали заключение, что

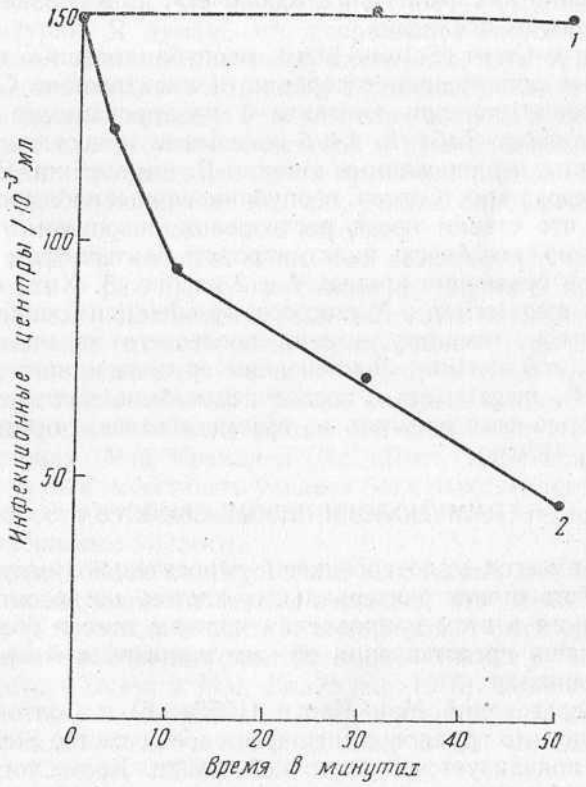


Рис. 3. Взаимодействие фага C с изолированными клеточными стенками B. megaterium. Кривая *1* показывает инактивацию фага при инкубации с клеточными стенками (150 *μ*г сухого веса/мл), взвешенными в 5% растворе пептона при температуре 37°; на кривой *2* — титр бактериофага не меняется в том случае, когда клеточные стенки были предварительно растворены лизоцимом.

«шары», вероятно, глубоко внедрены в стенки целых клеток. Предварительно была исследована природа рецепторного вещества, в результате чего было обнаружено, что оно представляет собой липо-глюкопротеид, содержащий 34% липида и 16,5% редуцирующих веществ [Вейдель, Кох (Koch) и Бобош (Bobosch), 1954].

Готчин (Hotchin), Доусон и Элфорд (Elford) (1952) изучали взаимоотношение бактериофага стафилококка К с изолированными «клеточными оболочками или скорлупой» золотистого стафилококка (Staphylococcus aureus). Адсорбция фага клеточными стенками была установлена непосредственным наблюдением в электронном микроскопе и путем инактивации фага стенками. Процент адсорбированного фага оказался пропорциональным концентрации как фага, так и «оболочек», но в большей степени был зависим от последних.

Солтон и Стент (Solton, Stent, неопубликованные исследования) также обнаружили адсорбцию и инактивацию С-фага Bacillus megaterium при контакте с изолированными стенками этого организма. Табл. 2, *4* и *5* показывает присоединение фаговых частиц к изолированным стенкам B. megaterium. В дальнейших исследованиях (Солтон, неопубликованные наблюдения) было найдено, что стенки после растворения лизоцимом полностью теряют свою способность инактивировать бактериофаг; это выявляется при сравнении кривых *1* и *2* на рис. 3. Хотя клеточные стенки B. megaterium и Micrococcus lysodeicticus одинаково чувствительны к лизоциму, стенки последнего не инактивируют С-фага B. megaterium. Локализация специфического рецептора в стенке B. megaterium в последующем была подтверждена неспособностью фага вступать во взаимодействие с протопластами (Вейбулл, 1953).

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Пока имеется мало сообщений относительно иммунологических свойств стенок бактериальных клеток, но несомненно, что исследования в этом направлении должны внести большую ясность в наши представления об иммунологической архитектуре микроорганизмов.

Из исследований Мак Карти (1952а, б) и Солтона (1952с, 1953а) ясно, что групповое специфическое вещество Streptococcus pyogenes локализуется в клеточной стенке. Кроме того, наблюдали специфическую агглютинацию на стекле стабильной взвеси клеточных стенок стрептококков группы B и D их гомологичными сыворотками, а смесь стенок группы D с групповой D-антисывороткой дает типичную реакцию связывания комплемента (Солтон, неопубликованные наблюдения).

Единственное систематическое изучение иммунологических реакций бактериальных клеточных стенок принадлежит Кам-

минсу (1954). В стенках штамма mitis дифтерийной палочки были обнаружены два антигена; поверхностный специфический протеин и более глубокий антиген, вероятно, полисахаридной природы. Поверхностный белковый антиген был относительно термолабильный, групповой антиген в стенке — термостабильный, но быстро разрушавшийся перйодатом. Групповой антиген был обнаружен во всех культуральных вариантах Corynebacterium diphtheriae, а также в одном штамме C. ovis.

ФУНКЦИЯ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИАЛЬНОЙ СТЕНКИ

Часто утверждали, что клеточная стенка — «мертвая, инертная структура». Я думаю, что современное состояние наших представлений об отношении между клеточной структурой и функцией недостаточно для того, чтобы подтвердить или отвергнуть ценность подобного взгляда. Решение этого вопроса путем выявления наличия или отсутствия энзимов в изолированных стенках представляется грубым подходом к проблеме; подобные попытки оказались бы спорными так же, как усилия определить энзиматическую активность некоторых вирусов.

Более выгодные способы выяснения возможного участия клеточной стенки в различных клеточных функциях и биохимических процессах в настоящее время вытекают из недавних данных о выделении бактериальных протопластов (Вейбулл, 1953). Так, вместо определения энзиматической активности изолированных стенок казалось бы лучшим определить биохимические реакции, сохраняющиеся полностью или частично при отсутствии внешней стенки. Мак Квайллен (McQuillen, 1955) показал, что клеточная стенка может быть удалена без существенного ослабления способности организованного протопласта синтезировать белок и нуклеиновые кислоты.

Хотя стенка Bacillus megaterium необходима для механизма инфекции специфическим фагом, очевидно, что после того, как ДНК вируса проникла в клетку, стенка может быть удалена без существенного нарушения последующего синтеза и созревания бактериофага (Солтон и Мак Квайллен, 1955). Равным образом протопласт может осуществлять процессы, включающие продукцию сложных биологических единиц, таких, как бактериальные споры (Солтон, 1955в).

Распространение изучения протопласта на другие группы организмов, облегченное выявлением соответствующих, разрушающих стенки энзиматических систем, должно дать нам возможность решить, является ли стенка преимущественного плотным защитным каркасом клетки или она необходима для осуществления некоторых биохимических процессов.

РОСТ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ

Несмотря на то, что имеется большое количество цитологических исследований внешнего вида клеточной поверхности во время деления, мы точно не знаем локализации и характера синтеза стенки бактериальной клетки. Наиболее четкое проявление развития и роста стенки выражается в утолщении поперечных ободков, перегородок и т. д. Последние были показаны многими цитологами и позднее на электронных микрограммах изолированных стенок были выявлены утолщенные экваториальные ободки (Доусон и Стерн, 1954). Путем комбинации фазово-контрастной микроскопии и иммунологических методов Томчик и Гекс-Хольцер (1954) установили, что специфическая реакция клеточной стенки выражена сильнее в точке формирования поперечной перегородки. Доусон и Стерн (1954) сделали заключение, что по крайней мере у некоторых бактерий поперечная перегородка клеточной стенки происходит и вырастает центростремительно из клеточной стенки — вывод, также подготовленный предшествующими исследователями (см. Робинау, 1945). У некоторых бактерий образование перегородки и построение клеточной стенки («расщепление» или «расслоение» — Робинау, 1945) могут быть независимыми процессами (Робинау, 1945; Доусон и Стерн, 1954).

Великолепные ультратонкие срезы Bacillus cereus, представленные в работе Чепмена и Хиллье (1953), показали присутствие периферических телец, которые как будто находятся в связи с развитием перегородки. Эти периферические тельца движутся внутрь вместе с внутренним краем центростремительно растущей стенки. Эти наблюдения с очевидной неспособностью изолированного протопласта B. megaterium вновь возвратиться в состояние палочковидной клетки путем синтеза новой клеточной стенки приводят меня к убеждению, что синтезирующий клеточную стенку механизм может быть сосредоточен в периферических тельцах и что эти тельца не могут быть включены в оболочку протопласта. Возможно, что периферические тельца имеют более слабую связь с протопластом и что они могут обособляться во время растворения стенки лизоцимом. Это не должно означать, что протопласт не способен синтезировать некоторые характерные компоненты стенки, вещества относительно низкого молекулярного веса, образующиеся в результате лизиса стенок лизоцимом. Вероятность, что периферические тельца обладают специфическим механизмом для полимеризации компонентов низкого молекулярного веса в нерастворимое вещество клеточной стенки, представляется заслуживающей экспериментального рассмотрения. Я понимаю, конечно, что видимая неспособность изолированных протопластов B. megaterium формировать новую стенку может быть объяснена менее тонкими соображениями, вроде непрерывного наличия основного лизоцима в

местах построения клеточных стенок, в оболочке протопласта или близко к последней.

Робинау (1945) предположил, что у некоторых бактерий деление цитоплазмы, завершающееся образованием поперечной плазматической оболочки или клеточной границы, может сопровождаться образованием перегородки; у других организмов развитие поперечной стенки можно с успехом наблюдать до деления всей бактерии. То, что протопласты некоторых бактерий могут подвергаться процессу деления независимо от образования поперечной стенки, в настоящее время было подкреплено превосходными опытами, выполненными Мак Квайлленом (неопубликованные наблюдения) с изолированными протопластами Bacillus megaterium.

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие соответствующих методов изоляции клеточных стенок бактерий, свободных от внутриклеточных протоплазматических составных частей, позволило нам изучить их микроструктуру, а также физические и химические свойства и облегчило наше понимание возможного участия клеточной стенки в некоторых биохимических процессах и функциях клетки.

Представляется несомненным, что стенка обеспечивает бактериальную клетку прочной внешней структурой, защищающей более нежный протопласт от повреждений, обязанных неблагоприятным условиям окружающей среды. Хотя стенка может не быть необходимой для непрерывного существования бактериальной клетки (например, протопласты могут продуцировать живые споры, способные прорастать и давать начало нормальным колониям) (Солтон, 1955б), она, вероятно, имеет значительную ценность для выживания клетки. Благодаря способности почвенных микроорганизмов, таких, как актиномицеты и миксобактерии, выделять энзимы, разрушающие клеточные стенки (Солтон, 1955б), представляется вероятным, что бактериальные протопласты могут не только присутствовать, но и переживать в естественных условиях. Однако, поскольку протопласты требуют более ограниченных осмотических условий для своей стабильности (Вейбулл, 1953), ясно, что организмы с клеточными стенками способны выдерживать более широкий предел естественного окружения. Выделение энзимов, разрушающих клеточные стенки в естественных условиях, имеет еще другое замечательное применение: эти энзимы могут облегчить освобождение клеточной ДНК, которая в свою очередь может оказаться способной осуществлять трансформацию целых растущих организмов или протопластов в окружающей среде. Представляется вероятным существование предпосылок для трансформаций в естественных условиях в почве или в подходящей водной среде и частота подобных

превращений может быть так же велика, как мутационных изменений.

Исследования химического состава стенки бактериальной клетки показали, что многие различные классы веществ могут обеспечивать микроорганизмы плотными структурами клеточной стенки. Некоторые из клеточных стенок, в частности те, которые состоят из мукоидного комплекса, обладают настолько определенными химическими признаками, что могут быть охарактеризованы легче, чем другие клеточные компоненты, такие, как белки, нуклеиновые кислоты, липиды и т. д. Во многих отношениях некоторые из мукоидных комплексов стенок грамположительных бактерий напоминают вещества кровяных групп (Солтон, 1952а), и заманчиво представить, что они могут также принимать участие в генетических связях подобных составных частей. Имеются уже некоторые указания на то, что состав стенок некоторых групп организмов может быть достаточным основанием для использования их в качестве исключительно полезного показателя в таксономии бактерий (Камминс и Гаррис, 1955). Наиболее интересным в естественных отношениях в микробном мире мне представляется определение природы составных частей клеточной стенки, снабжающее более обнадеживающими средствами при установлении переходов в естественно родственных группах микроорганизмов. Это не только помогает нашему пониманию филогенетических отношений бактерий с химических позиций, но также обнаруживает некоторые интереснейшие детали эволюции клеточной стенки бактерий.

Хотя химический анализ клеточных стенок дал указание на типы веществ, которые можно предполагать в стенках, он представил нам лишь грубую картину их молекулярного строения. Имеются, однако, два изящных способа изучения макромолекулярных и молекулярных компонентов клеточных стенок — путем изоляции и характеристики специфических рецепторов бактериофага в стенках и путем исследования природы фрагментов клеточных стенок, переваренных энзимами. Превосходные исследования природы и локализации рецепторов Escherichia coli для Т-фагов, выполненные Вейделем с сотрудниками, показали, что можно детально изучить специфические компоненты клеточных стенок. Исследование строения различных фрагментов, образовавшихся в результате переваривания стенок энзимами, такими, как лизоцим, должно будет объяснить много в вопросе о молекулярном строении стенок некоторых организмов.

Наш интерес к молекулярным и макромолекулярным компонентам клеточных стенок бактерий не ограничивается только их размещением в структуре клеточных стенок. Познание этих молекулярных «кусочков и обломков» должно было бы дать нам возможность выяснить типы составных частей, которые могут быть синтезированы клеткой для образования нерастворимой кле-

точной стенки. Как отдельная морфологическая единица бактериальной клетки стенка составляет в среднем до 20% сухого веса организма и, следовательно, представляет собой его основной структурный компонент. Поэтому неизбежно, что наша заинтересованность в строении клеточной стенки быстро приводит к необходимости сосредоточить внимание на энзиматических системах, участвующих в биосинтезах одной или многих морфологических структур бактериальной клетки.

ЛИТЕРАТУРА

Alderton G., Ward B. H. & Fevold H. L. (1945). Isolation of lysozyme from egg white. J. biol. Chem *157*, 43.

Aminoff D., Morgan W. T. J. & Watkins W. M. (1952). Studies in immunochemistry. 11. The action of dilute alkali on the N-acetylhexosamines and the specific blood-group mucoids. Biochem. J. *51*, 379.

Avery O. T. & Dubos R. (1931). The protective action of a specific enzyme against type III pneumococcus infection in mice. J. exp. Med. *54*, 73.

Barnard I. E. & Hewlett R. T. (1911). On a method of disintegrating bacteria and other organic cells. Proc. Roy. Soc. B, *84*, 57.

Birch-Andersen A., Maaløe O. & Sjöstrand F. S. (1953). High-resolution electron micrographs of sections of Escherichia coli. Biochim. biophys. Acta, *12*, 395.

Boasson E. H. (1938). On the bacteriolysis by lysozyme. J. Immunol. *34*, 281.

Chapman G. B. & Hillier J. (1953). Electron microscopy of ultrathin sections of bacteria. I. Cellular division in Bacillus cereus. J. Bact. *66*, 362.

Cohn F. (1875). Untersuchungen über Bacterien. Beitr. Biol. Pfl. 1, Heft 2, 127.

Cooper P. D., Rowley D. & Dawson I. M. (1949). Location of radioactive penicillin in Staphylococcus aureus after contact with the drug. Nature, Lond., *164*, 842.

Cummins C. S. (1954). Some observations on the nature of the antigens in the cell-wall of Corynebacterium diphtheriae. Brit. J. exp. Path. *35*, 166.

Cummins C. S. & Harris H. (1954). Carbohydrate and amino acid constituents of the cell walls of Corynebacterium diphtheriae. Biochem. J. *57*, XXXII.

Cummins C. S. & Harris H. (1955). Differences in cell-wall composition among Gram-positive cocci and bacilli. J. gen. Microbiol. *13*, III.

Davies D. A. L. (1955). The specific polysaccharides of some Gramm-negative bacteria. Biochem. J. *59*, 696.

Dawson I. M. (1949). The Nature of the Bacterial Surface, ed. A. A. Miles & N. W. Pirie. Oxford: Blackwell.

Dawson I. M. & Stern H. (1954). Stucture of the bacterial cell-wall during cell division. Biochim. biophys. Acta, *13*, 31.

Epstein L. A. & Chain E. (1940). Some observations on the preparation and properties of the substrate of lysozyme. Brit. J. exp. Path. *21*, 339.

Fernell W. R. & King H. K. (1953). The chemical composition of the soluble and insoluble fractions of the bacterial cell. Biochem. J. *55*, 758.

Fischer A. (1895). Untersuchungen über Bakterien. Jb. wiss. Bot. *27*, 1.

Fleming A. (1922). On a remarcable bacteriolytic element found in tissues and secretions. Proc. Roy. Soc. B, *93*, 306.

Holdsworth E. S. (1952 a). The nature of the cell-wall of Corynebacterium diphtheriae. Biochim. biophys. Acta, *8*, 110.

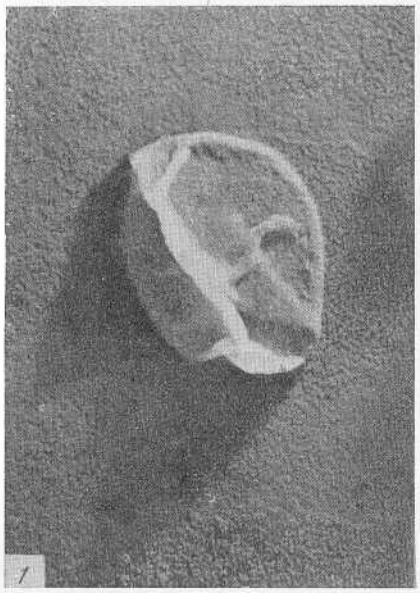
Holdsworth E. S. (1952б). The nature of the cell wall of Corynebacterium diphtheriae. Isolation of an oligosaccharide. Biochim. biophys. Acta. *9*,19.

Hotchin J. E., Dawson I. M. & Elford W. J (1952). The use of empty bacterial membranes in the study of the adsorption of Staphylococcus K phage upon its host. Brit. J. exp. Path. *33*, 177.
Houwink A. L. (1953). A macromolecular mono-layer in the cell-wall of Spirillum spec. Biochim. biophys. Acta, *10*, 360.
Kent P. W. & Whitehouse M. W. (1955). Biochemistry of the amino-sugars. London: Butterworth.
King H. K & Alexander H. (1948). The mechanical destruction of bacteria. J. gen. Microbiol. *2*, 315.
Knaysi G. (1938). Cytology of bacteria. Bot. Rev. *4*, 83.
Knaysi G. (1951). Elements of Bacterial Cytology, 2nd ed. Ithaca, N. Y.: Comstock.
Knaysi G., Hillier J. & Fabricant C. (1950). The cytology of an avian strain of Mycobacterium tuberculosis studied with the electron and light microscopes. J. Bact. *60*, 423.
Labaw W. & Mosley V. M. (1954). Periodic structure in the flagella and cell walls of a bacterium. Biochim. biophys. Acta, *15*, 325.
Lancefield R. C. (1943). Studies on the antigenic composition of group A hemolytic streptococci. I. Effects of proteolytic enzymes on streptococcal cells. J. exp. Med. *78*, 465.
Maxted W. R. (1948). Preparation of streptococcal extracts for Lancefield grouping. Lancet, ii, 255.
McCarty M. (1952a). The lysis of group A hemolytic streptococci by extracellular enzymes of Streptomyces albus. I. Production and fractionation of the lytic enzymes. J. exp. Med. *96*, 555.
McCarty M. (1952б). The lysis of group A hemolytic streptococci by extracellular enzymes of Streptomyces albus. II. Nature of the cellular substrate attacked by the lytic enzymes. J. exp. Med. *96*, 569.
MacFadyen A. &. Rowland S. (1901). Upon the intracellular constituens of the typhoid bacillus. Zbl. Bakt. Abt. I. *30*, 48.
McQuillen K. (1955). Bacterial protoplasts. I. Protein and nucleic acid metabolism in protoplasts of Bacillus megaterium. Biochim. biophys. Acta, *17*, 382.
Meyer K., Palmer J. W., Thompson R. & Khorazo D. (1936). On the mechanism of lysozyme action. J. biol. Chem. *113*, 479.
Meyer K. &. Hahnel E. (1946). Estimation of lysozyme by a viscosimetric method. J. biol. Chem. *163*, 723.
Mickle H. (1948). Tissue disintegration. J. R. micr. Soc. *68*, 10.
Mitchell P. & Moyle J. (1951). The glycerophospho-protein complex envelope of Micrococcus pyogenes. J. gen. Microbiol. *5*, 981.
Mitchell P. & Moyle J. (1955). Permeability of the osmotic barrier of Staphylococcus aureus to some salts, amino-acids and non-electrolytes (In the Press).
Morgan W. T. J. (1937). Studies in immuno-chemistry. II. The isolation and properties of a specific antigenic substance from B. dysenteriae (Shiga). Biochem. J. *31*, 2003.
Morgan W. T. J. & Elson L. A. (1934). A colorimetric method for the determination of N-acetylglucosamine and N-acetylchondrosamine. Biochem. J. *28*, 988.
Mudd S. & Lackman D. B. (1941). Bacterial morphology as shown by the electron microscope. I. Structural differentiation within the streptococcal cell. J. Bact. *41*, 415.
Mudd S., Polevitzky K., Anderson T. F. & Chambers L. A. (1941). Bacterial morphology as shown by the electron microscope. II. The bacterial cell-wall in the Genus Bacillus. J. Bact. *42*, 251.
Newton B. A. (1956). The polymyxins: their properties and mode of action. Bact. Rev. (In the Press)[1].

[1] Опубликовано в Bact. Rev., 1956, 20, 1, 14—27. *Ред.*

Robinow C. F. (1945). Addendum to the Bacterial Cell, by R. J. Dubos. Cambridge, Mass.: Harward Universiti Press.
Robinow C. F. &. Murray R. G. E. (1953). The differentiation of cell-wall, cytoplasmic membrane and cytoplasm of Gram positive bacteria by selective staining. Exp. Cell. Res. *4*, 390.
Salton M. R. J. (1952a). Studies of the bacterial cell-wall. III. Preliminary investigation of the chemical constitution of the cell-wall of Streptococcus faecalis. Biochim. biophys. Acta, *8*, 510.
Salton M. R. J. (1952б). Cell-wall of Micrococcus lysodeicticus as the substrate of lyzosyme. Nature, Lond. *170* , 746.
Salton M. R. J. (1952б). The nature of the cell-walls of some Grampositive and Gram-negative bacteria. Biochim. biophys. Acta, *9*, 334.
Salton M. R. J. (1953a). Studies of the bacterial cell-wall. IV. The composition of the cell-walls of some Gram-positive and Gram-negative bacteria. Biochim. biophys. Acta, *10*, 512.
Salton M. R. J. (1953б). Cell structure and enzymic lysis of bacteria. J. gen. Microbiol. *9*, 512.
Salton M. R. J. (1954). The action of lysozyme on the cell-walls of certain bacteria. J. gen. Microbiol. *11*, i.
Salton M. R. J. (1955a). Cellular structure and enzymic bacteriolysis. Proc. 3 rd. Congr. int. Biochem., Brussels.
Salton M. R. J. (1955б). Isolation of Streptomyces spp. capable of decomposing preparations of cell-walls from various micro-organisms and a comparison of their lytic activities with those of certain actinomycetes and myxobacteria. J. gen. Microbiol. *12*, 25.
Salton M. R. J. (1955в). The formation of spores in protoplasts of Bacillus megaterium. J. gen. Microbiol. *13* iv.
Salton M. R. J. & Horne R. W. (1951a). Studies of the bacterial cell wall. I. Electron microscopical observations on heated bacteria. Biochim. biophys. Acta, *7*, 19.
Salton M. R. J. & Horne R. W. (1951б). Studies of the bacterial cell wall. II. Methods of preparation and some properties of cell walls. Biochim. biophys. Acta, *7*, 177.
Salton M. R. J. & McQuillen K. (1955). Bacterial protoplasts. II. Bacteriophage multiplication in protoplasts of sensitive and lysogenic strains of Bacillus megaterium. Biochim. biophys. Acta, *17*, 465.
Salton M. R. J. &. Williams R. C. (1954). Electron microscopy of the cell-walls of Bacillus megaterium and Rhodospirillum rubrum. Biochim. biophys. Acta, *14*, 455.
Schachman H. K., Pardee A. B. & Stanier R. Y. (1952). Studies on the macromolecular organization of microbial cells. Arch. Biochem. Biophys. *38*, 245.
Strange R. E. &. Powell J. F. (1954). Hexosamine-containing peptides in spores of Bacillus subtilis. B. megaterium and B. cereus. Biochem. J. *58*, 80.
Tomcsik J. & Guex-Holzer S. (1952). Änderung der Structur der Bakterienzelle im Verlauf der Lysozym-Einwirkung. Z. Path. *15*, 518.
Tomcsik J. & Guex-Holzer S. (1954). A specific cell-wall reaction in Bacillus sp. J. gen. Microbiol. *10*, 317.
Tristram G. R. (1953). Amino acid composition of proteins in The Proteins, vol. *1*, part A, p. 181, New York: Academic Press.
Vincenzi L. (1887). Ueber die chemischen Bestandtheile der Spaltpilze. Hoppe-Seyl. Z. *11*, 181.
Weibull C. (1953). The isolation of protoplasts from Bacillus megaterium by controlled treatment with lysozyme. J. Bact. *66*, 688.
Weidel W. (1950). In Viruses, ed. M. Delbrück, Pasadena. California Institute of Technology.
Weidel W. (1951). Über die Zellmembrane von Escherichia coli B. I. Präparierung der Membranen. Analytische daten. Morphologie. Verhalten der Membranen gegenüber den Bakteriophagen der T-serie. Z. Naturf. *6b*, 251.

Weidel W., Koch G. & Bobosch K. (1954). Über die Rezeptorsubstanz für den Phagen T_5. Z. Naturf. 9b, 573.
Weidel W. &. Kellenberger E. (1955). The E. coli B receptor for the phage T_5. II. Electron microscopic studies. Biochim. biophys. Acta, *17*,1.
Welsch M. & Salmon J. (1950). Quelques aspects de la Staphylolyse. Ann. Inst. Pasteur, *79*, 802.
Welshimer H. J. (1953). The action of lysozyme on the cell-wall and capsule of Bacillus megaterium. J. Bact. *66*, 112.
Williams R. C. (1953). A method of freeze-drying for electron microscopy. Exp. Cell Res. *4*, 188.
Winogradsky S. (1887). Ueber Schwefelbakterien. Bot. Z. *45*, 489.
Work E. (1951). The isolation of αε-diaminopimelic acid from Corynebacterium diphtheriae and Macobacterium tuberculosis. Biochem. J. *49*, 17.
Work E. & Dewey D. L. (1953). The distribution of αε-diaminopimelic acid among various micro-organisms. J. gen. Microbiol., *9*, 394.
Yoshida N., Fukuya I., Kakutani I., Tanaka S., Tegawa J. & Hashimoto T. (1954). Studies on the bacterial cell-wall. I. Electron staining of the cell-wall of B. subtilis by phosphotungstic acid. Tokushima J. exp. Med. *1*, 8.



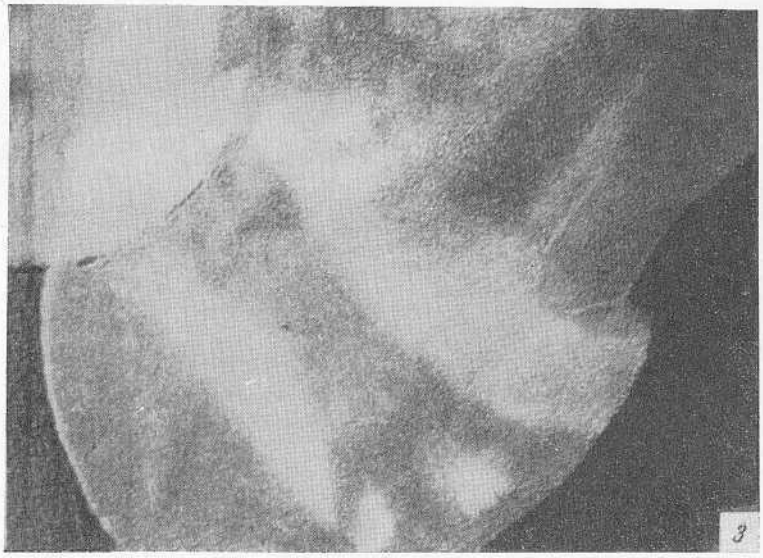
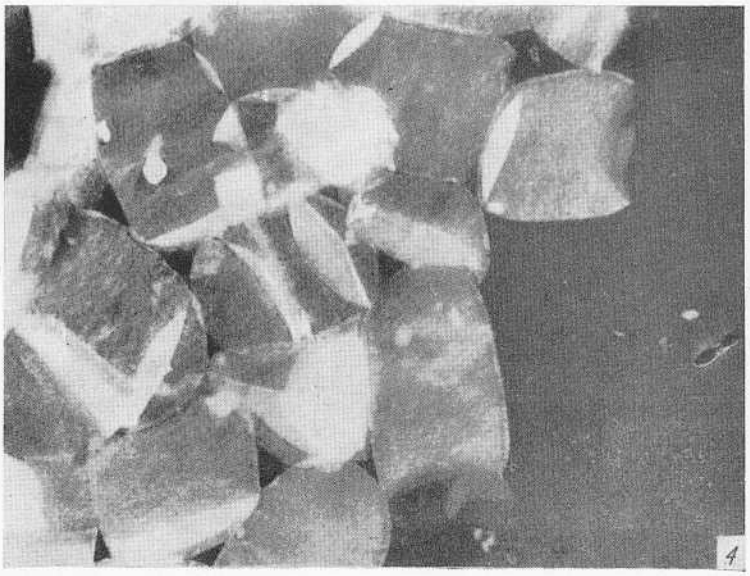


Таблица 1.

1. Клеточная стенка **Rhodospirillum rubrum**, приготовленная для электронной микроскопии путем лиофилизации (высушивания-замораживания). Увеличение в 50 000 раз.
2. Фрагменты клеточной стенки **Rhodospirillum rubrum** с двойным слоем. Увеличение в 27 000 раз.
3. Клеточная стенка **Bacillus megaterium**. Увеличение в 35 000 раз.



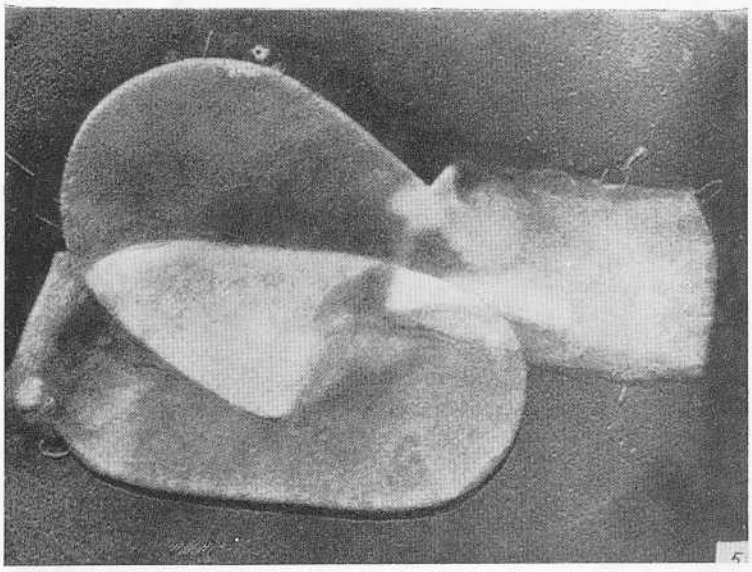


Таблица 2.

4. Клеточные стенки Bacillus megaterium, на которых видно много адсорбированных фаговых хвостов. Увеличение в 14 000 раз.

5. Клеточные стенки Bacillus megaterium, несущие несколько фаговых частиц. Увеличение в 18 000 раз.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРОТОПЛАСТЫ; ИХ ОБРАЗОВАНИЕ И СВОЙСТВА

К. ВЕЙБУЛЛ

Биохимический институт Упсальского университета, Упсала, Швеция

Протоплазма большинства бактерий покрыта твердой оболочкой, обычно называемой клеточной стенкой. Сохранение постоянной формы клетки, помимо сферической, обязано этой оболочке. При повреждении клеточной стенки протоплазма, как правило, разрушается. При определенных условиях, однако, строение протоплазмы может остаться в основном неизмененным, даже после полного удаления стенки. Получающаяся в итоге структурная единица была названа протопластом [Вейбулл (Weibull), 1953а] или гимнопластом [Штехелин (Stähelin), 1954]. В настоящей работе мы будем предпочтительно применять первый термин.

В настоящее время в различных лабораториях выполняется значительное количество исследований, касающихся бактериальных протопластов. Поэтому настоящее сообщение о том, что уже известно об этих телах, не претендует на полноту, хотя автором и была сделана попытка проследить современное развитие этого вопроса. Надо надеяться, однако, что данное сообщение вместе с другими докладами на этом симпозиуме прольет новый свет на свойства протопластов и косвенно на структуру и функционирование целой бактериальной клетки.

ОБРАЗОВАНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ. ИСТОРИЧЕСКИЙ ОБЗОР.

Как и другие клетки, многие бактерии могут подвергаться плазмолизу при пребывании в гипертонической среде. Протоплазма может в этих условиях отделяться от клеточной стенки. Во многих случаях применялись очень концентрированные растворы солей. Иногда вообще нельзя было получить плазмолиз, но даже если он и возникает, протоплазма не полностью отделяется

от окружающей клеточной стенки и свободные протопласты в указанном выше смысле получены быть не могут. Литература, касающаяся плазмолиза бактериальных клеток, была дана в обзоре Найзи (Knaysi), 1951.

Термин плазмоптиз был создан А. Фишером (Fischer) в 1900 г. Когда происходит плазмоптиз, как определил его Фишер, протоплазма извергается из клетки и тем самым отделяется от клеточной стенки. Фишер описал этот феномен у некоторых видов, например Bacillus anthracis и Vibrio proteus. Было обнаружено, что извергнутая протоплазма принимает форму шара. Работа Фишера подверглась критике других ученых и в более позднем сообщении он допускал, что при воздействии неблагоприятных жизненных условий на клетки V. proteus можно наблюдать два сходных, но не идентичных феномена. Возникает или общее, обратимое, разбухание всего тела клетки, или настоящий, необратимый плазмоптиз. В последнем случае пустая клеточная стенка пристает к извергнутому шаровидному протопласту в виде стебля. В своей поздней работе Фишер (1906) сообщил также о появлении пустых клеточных стенок, полностью отделенных от протоплазмы. Основываясь на данных Гарбовского (Garbowski, 1907), можно сомневаться, однако, наблюдается ли полное отделение клеточной стенки и протоплазмы тогда, когда клетки Vibrio подвергаются плазмоптизу. В других отношениях Гарбовский подтвердил бо́льшую часть наблюдений Фишера и, возможно, что Фишер действительно видел истинный плазмоптиз, т. е. выделение из клетки бактериальной протоплазмы.

Гарбовский изучал плазмоптиз также у других видов, например спирилл, и показал, что в этом случае выделяемая наружу протоплазма не принимает шаровидной формы, а дает начало бесформенным массам. Это было подтверждено Райхелем (Raichel, 1928).

Штапп и Зиха (Stapp, Zycha, 1931) обнаружили плазмоптиз у Bacillus mycoides более точным путем при выращивании клеток в бульоне, содержащем 0,5 М сернокислый магний. Во многих местах вдоль нитевидной клетки возникали резко преломляющие свет сферические пузырьки. В то же время преломляемость этих клеток значительно уменьшалась. Наконец, пузырьки освобождались от остатков клеток, которые сокращались и исчезали. Пузырьки могли окрашиваться и содержали липидные зерна. Последующего роста или деления протоплазматических пузырьков не наблюдалось.

Штехелин (1953) недавно опубликовал рисунки клеток Bacillus anthracis, полученные при помощи фазо-контрастной микроскопии. Изображения показывают очень убедительно возникновение у этой бактерии истинного плазмоптиза. Наблюдавшийся при этом плазмоптиз имел место тогда, когда клетки были помещены в растворы соли различного рода. Рисунки показывают, что протопласты в конечном результате отделяются от

клеточной стенки, остающейся в виде пустой цилиндрической трубки.

Факторы, вызывающие плазмоптиз, остаются неясными. Фишер полагал, что плазмоптиз представляет собой оружие клеток в борьбе за существование. Это, вероятно, неправильно, так как у свободных протопластов не наблюдалось воспроизведения и, как в общем очевидно, они представляют собой структуры более нежного характера. Плазмоптиз не может быть объяснен как чисто осмотический феномен. Штехелин (1953) указывает, что как токсические, так и ростовые вещества могут способствовать плазмоптизу.

В 1935 г. Клинебергер-Нобл (Klieneberger-Nobel) (Клинебергер, 1935) показала, что из культуры Streptobacillus moniliformis может быть отделена культура, не содержащая бациллярных форм, а состоящая из мягких плазматических элементов, шаров и мельчайших зерен. Новый тип роста был обозначен буквой L. Позже было показано, что L-форма представляет собой фазу роста S. moniliformis. Сходные фазы роста, состоящие из мягких элементов, образующих микроколонии, были обнаружены, начиная с 1935 г., у различных родов бактерий, например Bacteroides, Proteus, Salmonella, Haemophilus, Clostridium и Bacillus. Для того, однако, чтобы получить L-формы этих бактерий, клетки должны подвергнуться необычному или неблагоприятному воздействию окружающей среды. Пенициллин препятствует нормальному росту и вызывает образование так называемых крупных тел, являющихся первой стадией L-роста. Исчерпывающие обзоры свойств L-форм недавно были даны Дайнсом и Вейнбергером (Dienes, Weinberger, 1951), Клинебергер-Нобл (1951) и Тюлянем (Tulasne, 1951, 1953). Я хочу отметить только, что превращение нормального роста в L-формы через крупные тела ставились в связь с типичным феноменом плазмоптиза. Дайнс (1946) описал первые стадии превращения нормальных бацилл Proteus в L-формы так: «Механизм, при котором образуются крупные тела, может легко наблюдаться в водопроводной воде. Они образуются при процессе, который давно был известен как „плазмоптиз". Содержимое нитей вытекает и остается прикрепленным к нитям в виде мелких капель. Капля может быстро увеличиваться в размере и развиваться в 1—2 минуты в крупное круглое тело. Тем временем нить сморщивается. Несомненно, что бóльшая часть содержимого нитей вытекает, образуя крупное тело». Тюлянь (1951), а также Хопкен и Бартманн (Höpken, Bartmann, 1955), применяя фазо-контрастный микроскоп, описали сходный процесс, Стимпен и Хатчинсон (Stempen, Hutchinson, 1951), с другой стороны, объясняют разбухание не как чисто физический процесс (плазмоптиз), но предполагают, что феномен обязан прежде всего активному росту. Возможно, что типичный плазмоптиз не является условием, предшествующим образованию крупных тел и, следовательно, эти структуры мо-

гут еще содержать вещество клеточных стенок. Тюлянь (1951) сообщил о наличии О антигенов в L-формах протея.

Из того, что было сказано выше, должно быть ясно, что отделение протоплазмы от клеточной стенки может быть вызвано без разрушения той или другой структуры в момент отделения. Протопласты могут, однако, быть получены также при растворении клеточной стенки в контролируемых условиях. Это было достигнуто применением бактериолитического агента лизоцима, который, как показал Солтон (Salton, 1952), растворяет изолированные стенки Micrococcus lysodeicticus. Эта процедура представляется исключительно пригодной для приготовления протопластов бактерий, чувствительных к лизоциму в физиологических условиях, например видов Micrococcus, Sarcina и Bacillus.

Образование бактериальных протопластов при помощи обработки лизоцимом было впервые показано Томчиком и Гекс-Хольцером (Tomcsik, Guex-Holzer, 1952). Они исследовали детально действие этого энзима на бактерию, Bacillus M., стоящую, по мнению авторов, близко к B. megaterium. При прибавлении к бактериальной взвеси антисыворотки, реагирующей специфически с полисахаридом, имеющимся в капсульной структуре Bacillus M, можно было наблюдать при помощи фазо-контрастного микроскопа морфологическую дифференциацию между протоплазмой и клеточной стенкой. При прибавлении лизоцима отмечается разбухание клеток и в то же время протоплазма частично отделяется от клеточной стенки. Стенка скоро полностью растворяется и протоплазма бактерии остается в виде шаровидного тела, взвешенного в среде. Скоро, однако, протопласты превращаются в пустые оболочки, которые затем разрушаются. Опыты Томчика и Гекс-Хольцера были выполнены в физиологическом растворе.

Автор данной статьи исследовал независимо от других действие лизоцима на клетки Bacillus megaterium прижизненно. Было установлено, что сферические протоплазматические тела возникали тогда, когда клеточные стенки быстро растворялись достаточно высокими концентрациями лизоцима. Кроме того, было обнаружено, что протопласты могут быть стабилизированы в полуанаэробных условиях в 0,1—0,2 М сахарозе или 7,5% полиэтиленгликоле. Исследование среды показало, что по крайней мере бóльшая часть клеточной стенки растворилась без примеси каких-либо адсорбирующих ультрафиолетовую часть спектра составных частей протоплазмы. В дальнейшем полное растворение стенки было доказано морфологически (Вейбулл, 1955а).

Действие лизоцима на люминесцентную бактерию, Achromobacterium fischeri, было изучено Уорреном и Дерсо (Warren, Durso, 1952). Факт, что палочковидные клетки превратились в сферические или веретенообразные тела, делает вероятным, что

и в этом случае происходило частичное растворение клеточной стенки. Люминесценция при применявшейся концентрации лизоцима не тормозилась.

Протопласты Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Sarcina lutea и Micrococcus lysodeicticus также были приготовлены путем контролируемой обработки клеток лизоцимом [Виам, Сторк и Вандервинкель (Wiame, Storck, Vanderwinckel), 1955; Митчелл (Mitchell), личное сообщение].

Извлечение части клеточной структуры, вероятно, имело место также в опытах Лестера (Lester, 1953) и Белянского (Beljanski, 1954). В этих опытах клетки Micrococcus lysodeicticus были обработаны лизоцимом в растворах сахарозы.

ПРЕПАРАТИВНАЯ ТЕХНИКА; СТАБИЛЬНОСТЬ ПРОТОПЛАСТОВ

1. *Приготовление без лизоцима*

Как упоминалось выше, Штехелин (1953, 1954) получил протопласты из клеток Bacillus anthracis при плазмоптизе. Автор указывает, что клеточная стенка применявшегося в опытах штамма (A_1) была, вероятно, необычно тонкая. Лучшие результаты были получены при культивировании бактерий на агаре [Гледстона и Файлдса (Gladstone, Fildes), 1940], содержащем избыток дрожжевого экстракта, но без глютамина и глицерофосфата. После 20 часов роста при 37° клетки были суспензированы в растворе Рингера (0,9% NaCl, 0,03% KCl, 0,026% безводного $CaCl_2$). В этой среде 80—95% клеток превратились в протопласты. Стабильность протопластов и влияющие на нее факторы подробно не установлены. Однако было сообщено об исследованиях по плазмолизу в различных направлениях (Штехелин, 1954).

2. *Приготовление протопластов при контролируемой обработке лизоцимом*

Bacillus megaterium. Растворение клеточной стенки было в большинстве случаев вызвано достаточно высокими концентрациями лизоцима (0,01—0,05%). Так как протопласты наиболее стабильны в анаэробных условиях, лизис предпочтительно осуществлялся в узких пробирках при густых взвесях бактерий (5—50 мг сухого веса бактерий на 1 мл), если было желательно получить наиболее совершенный выход протопластов.

При отсутствии стабилизирующего агента протопласты разрушались почти немедленно после их образования. В качестве стабилизатора наиболее часто применялись сахароза или полиэтиленгликоль (средний молекулярный вес 4000). Концентрация

этих веществ составляла соответственно 0,1—0,2 М и 7,5% и протопласты оставались стабильными по крайней мере на протяжении 24 часов. Протопласты могут быть осаждены центрифугированием без повреждения их целости, но ресуспендированные частицы заметно менее стабильны. Другие эффективные стабилизаторы — 0,3 М глюкоза и 0,15 М раффиноза, мелибиоза и трегалоза. Целлобиоза (0,15 М) и эритрит (0,3 М) не способствуют стабильности. Некоторая стабильность была получена в среде, содержащей 0,15 М хлористый натрий.

Даже в присутствии стабилизатора протопласты более или менее быстро разрушаются, если их взвесь встряхивается в присутствии воздуха.

Условия культивирования, по-видимому, влияют на стабильность протопластов Bacillus megaterium в аэробных условиях. Приведенные выше данные относятся к клеткам, культивированным в течение 6—12 часов в 2% «Дифко»-пептоне при 30° и при максимальной глубине культуральной жидкости 25 мм. Аэрация осуществлялась путем помещения колб с культурами во вращающийся встряхиватель, дающий около 100 об/мин.

Если скорость встряхивателя доводится до 400 об/мин, клетки имеют меньшие размеры, а полученные из них протопласты обладают более высокой степенью стабильности (Сторк, личное сообщение).

Стабильность протопластов повышается также при культивировании клеток на синтетической среде, содержащей в качестве источника углеродного питания глюкозу [Мак Квайллен (McQuillen), 1955а]. Протопласты из таких клеток стабильны даже при осторожной аэрации.

Bacillus M. Первоначальные опыты Томчика и Гекс-Хольцера (1952) были выполнены с раствором Рингера в качестве суспендирующей среды. Несомненно, что в этом растворе была достигнута некоторая стабилизация, так как протопласты обнаруживались в течение нескольких часов после растворения клеточных стенок. Значительно лучшая стабилизация была достигнута в 0,3 М сахарозе (Томчик и Гекс-Хольцер, 1954).

Bacillus subtilis. Свойства протопластов, полученных из этой бактерии, описали Виам, Сторк и Вандервинкель (1955). Клетки были выращены в синтетической среде с глюкозой в качестве источника углерода (Виам и Сторк, 1953). Протопласты были получены обработкой лизоцимом (конечная концентрация 0,1%) в среде, содержащей 0,05 М фосфат (pH 7,0) и 0,5 М сахарозу. Эти протопласты казались более стабильными, чем протопласты B. megaterium. Сообщалось об опытах по дыханию, длящемуся несколько часов. Наивысшая степень стабилизации была достигнута при применении 0,25—0,5 М хлористого натрия, но в этой среде тормозится действие лизоцима на клетки.

СТРОЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ

Bacillus megaterium. При помощи оптического и электронного микроскопов было показано, что изолированные клеточные стенки этой бактерии растворяются лизоцимом [Уэлдшимер (Welshimer), 1953; Солтон, личное сообщение]. Принимая, что действие энзима на клеточные стенки, изолированные или in situ, одно и то же, можно считать, что образование протопласта обязано полному удалению твердой оболочки бактерии.

При лизисе в присутствии сахарозы значительное количество веществ высокого молекулярного веса переходит в раствор. Это может быть доказано анализом среды, окружающей клетки до и после обработки взвеси лизоцимом. Растворенный материал показывает, однако, отсутствие специфической адсорбции в ультрафиолетовой зоне спектра, свидетельствующее о том, что протоплазматическое содержимое не поступает в среду во время или после лизиса. Это, кроме того, подтверждается тем, что одновременно в среде не изменяется содержание неорганического фосфата (Вейбулл, 1955б). Следовательно, вещества, переходящие в раствор, наиболее вероятно представляют собой исключительно материал клеточных стенок. Количественный подсчет материала был произведен при помощи гравиметрического анализа среды до прибавления лизоцима и после образования протопластов. Если учесть изменение объема бактериального тела, сопровождающее удаление клеточной стенки, анализ показывает, что клеточная стенка составляет около 45% общего веса клетки. Приблизительно та же цифра (38%) получается при непосредственном взвешивании клеток и соответствующих протопластов после фиксации формальдегидом.

Удаление клеточной стенки можно также показать непосредственно сравнением клеток и фиксированных протопластов, взвешенных в туши (Вейбулл, 1955а). Целые клетки состоят из центральной части, окруженной внешней, несколько более широкой оболочкой. Такая оболочка, очевидно, представляющая собой клеточную стенку, отсутствует у протопластов.

При окраске протопластов соответствующими методами и исследовании в оптический микроскоп видно, что жгутики продолжают оставаться прикрепленными к этим телам (Вейбулл, 1953а). Это также подтверждается электронными микрографиями протопластов, фиксированных формальдегидом. Отсюда можно заключить, что жгутики являются протоплазматическими органеллами, проходящими через клеточную стенку.

Как выше упоминалось, протопласты быстро подвергаются лизису, если среда не содержит стабилизирующий агент. Исследования подобных лизатов при помощи фазовоконтрастного микроскопа выявляют два рода остаточных структур, а именно пустые пузырьки, или «тени», и мелкие зерна. Такие же структуры

обнаруживаются при непосредственном лизисе клеток лизоцимом, т. е. минуя образование протопластов.

Зерна могут быть отделены дифференцированным центрифугированием (Вейбулл, 1953б). Они почти полностью растворимы в горячей щелочи и горячем хлороформе. Щелочной раствор не дает специфической адсорбции спектра в пределах 250—300 mμ. Зерна содержат около 0,25% азота (Солтон, личное сообщение) и окрашиваются суданово́й черной В. Эти факты подтверждают сообщение Лемуаня (Lemoigne), Деляпорт (Delaporte) и Крозона (Croson) (1944), что зерна в клетках Bacillus megaterium состоят из липидного материала, определенного ими как полимеризованная β-гидроксимасляная кислота.

Подобно описанным выше зернам, «тени» могут быть также отделены от других цитоплазматических элементов при помощи центрифугирования (Вейбулл, 1953б). Они образуют темно-желтый осадок в центрифужных пробирках. Электронные микрографии фракции «теней», фиксированной в парах осмиевой кислоты, выявляют оболочкоподобные тела и зерна, бóльшая часть которых включена в оболочки. При исследовании нефиксированных препаратов видны только аморфные массы. По-видимому, оболочки образуют очень хрупкую структуру, возможно, частично состоящую из липидов.

Фракция «теней» содержит по крайней мере бóльшую часть пигментного вещества клетки. Абсорбционный спектр «теней», взвешенных в 70% глицерине, до и после восстановления гидросульфитом натрия, может быть исследован при помощи спектрофотометра Бекмана (Вейбулл, 1953б). Кривая, полученная при исследовании редуцированной взвеси, показывает максимум в пределах 530, 558 и 600 mμ, что вполне соответствует спектру абсорбции целых клеток Bacillus megaterium [Кейлин (Keilin), 1934]. Это указывает, что вся цитохромная система сосредоточена во фракции «теней».

Благодаря оболочкоподобному виду «теней» было сделано предположение, что они могут быть цитоплазматическими оболочками, целыми или денатурированными (Вейбулл, 1953б). Если они равнозначны неповрежденным цитоплазматическим оболочкам, то при подсчете протопластов и соответствующих «теней» должно было бы быть получено численное соотношение 1 : 1.

«Тени» обычно выявляют очень слабый контраст в фазово-контрастном микроскопе (см. рис. 3, *б* в статье Вейбулла, 1953а). Их размер колеблется в достаточно широких пределах сравнительно с относительно малыми колебаниями размеров протопластов, и большое количество липидных зерен находится свободным в бактериальном лизате. Трудно подсчитать точно эти «тени» даже при помощи фазово-контрастного микроскопа.

Положение меняется, если протопласты поместить на 4—8 часов в среду, содержащую 0,2 М сахарозу и соли магния в концентрациях, превышающих 0,0005—0,01 М. При лизисе про-

топластов в результате снижения содержания сахарозы остаются «тени». Все они, однако, теперь почти одинаковой величины, как и соответствующие протопласты, и бóльшая часть липидных зерен находится внутри «теней», как показано в табл. 1, *1* и *2* Эти «тени» могут быть подсчитаны в оптическом микроскопе, лучше в «темном поле». Подсчет протопластов и соответствующих «теней», полученных в присутствии ионов магния, показал, что 1,00±0,015 протопластов дает начало 0,98±0,015 «теней». Коэффициент, таким образом, равен единице в пределах статистической ошибки. «Тени», приготовленные в присутствии и в отсутствие ионов магния, были также подсчитаны в электронном микроскопе по методу Уилльямса (Williams) и Бэкуса (Backus) (1949). Опыты подобного рода показали, что в первом случае из каждого протопласта получается 1,3—1,4 оболочкоподобных тела. Некоторые из них создают впечатление «тени», разделенной на две половины. Это должно объяснить полученную величину (1,35 вместо ожидаемой цифры 1,0).

В отсутствие ионов магния, с другой стороны, получаются 3—5 «теней» вместе с большим количеством свободных зерен. В этом случае размер и форма «теней» значительно изменяются, некоторые из них оказываются ниже предела разрешения оптического микроскопа. В табл. 1, *3* и *4* представлены электронные микрографии двух типов «теней». Фон в каплях состоит преимущественно из растворимых бактериальных белков; имеются также шарики латекса.

Данные, полученные из опытов с подсчетом, свидетельствуют, что «тени», приготовленные в присутствии ионов магния, действительно пустые цитоплазматические оболочки, включающие возможно некоторые дополнительные структуры, в то время как при отсутствии ионов магния оболочки разрываются на фрагменты различной величины.

Присутствие ионов магния уменьшает количество материала, освобождающегося при лизисе протопластов, на 10—15%.

Протоплазматическое содержимое, кроме липидных зерен и «теней», было определено при исследовании суперцентрифугированных лизатов, полученных из протопластов (Вейбулл, 1953б). Сходные результаты были получены при лизисе целых клеток. Макромолекулярное строение клеток и протопластов Bacillus megaterium, таким образом, соответствует характеристике общей конфигурации микробных клеток, описанных Шахманом (Schachman), Перди (Pardee) и Стеньером (Stanier) (1952). Можно полагать, однако, что деоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) B. megaterium осаждается быстрее, чем все другие макромолекулярные компоненты, в 0,15 М хлористом натрии. По-видимому, ДНК получается в этом растворе в виде своеобразного геля.

Bacillus M. Томчик и Гекс-Хольцер показали в иммунологическом исследовании (1954), что антисыворотка, полученная при

иммунизации протопластами этих бактерий кроликов, не агглютинирует изолированные клеточные стенки или кипяченые бактерии. С другой стороны, агглютинируются протопласты и живые бактерии. Антисыворотка клеточных стенок агглютинирует кипяченые и живые бактерии, но не протопласты. Эти данные указывают, что клеточная стенка полностью отделяется от клеточного тела при обработке лизоцимом, за исключением термолабильного поверхностного антигена. Этим антигеном, вероятно, является жгутиковый белок. Таким образом, исследование иммунологических свойств Bacillus M подтверждает результаты, полученные при аналитическом и морфологическом изучении B. megaterium (см. выше).

Bacillus subtilis. Виам и др. (1955) сообщили, что жгутики прикрепляются к протопластам этой бактерии.

СВОЙСТВА ПРОНИЦАЕМОСТИ ПРОТОПЛАСТОВ

В настоящем сообщении будет дано описание свойств проницаемости протопластов Bacillus M и B. megaterium, выражающееся в соотношении между объемом протопластов и осмотическим давлением окружающей среды. Будут обсуждены также некоторые данные, касающиеся свойств проницаемости целых клеток.

Если допустить, что протопласты окружены полупроницаемой оболочкой, понижение объема этих тел, сопровождающее повышение концентрации растворенного в воде вещества, указывает, что они менее проницаемы для данного вещества, чем для воды. В количественных выражениях изменения объема должны были бы следовать закону $P\,(V—b) = \text{const}$. P представляет осмотическое давление среды, а V — объем клетки; b — соответствует «мертвому пространству» внутри клетки, наполненному осмотически инертными веществами. Было найдено, что этот закон имеет силу для клеток высших организмов в пределах некоторых концентраций [Люке (Lucké), 1940]. Естественно, что закон не мог бы быть применим в том случае, если бы клетки представляли собой безоболочечные гелеобразные тела [Хебер (Höber), 1945].

Bacillus M. Осмотические свойства протопластов этой бактерии, полученных при плазмоптизе, были исследованы Штехелином (1954). Изменения объема отдельных протопластов могли быть прослежены и измерены в оптическом микроскопе, так как они имели тенденцию прилипать к покровному стеклу.

Протопласты были взвешены в растворах сахарозы или хлористого натрия. При повышении концентрации вещества объем протопластов понижался, и наоборот. Другими словами, протопласты были плазмолизабильны, что указывало на выраженную непроницаемость для изучавшихся веществ. Штехелин показал, что изменения объема протопластов Bacillus M приблизительно подчиняются закону $P\,(V - b) = \text{const}$. Автор указывает, что

для получения достаточного приближения необходимо принять неправдоподобно высокие значения для величины b.

Средний объем протопластов в 10% сахарозе был установлен в 0,76, если принять объем в 1% хлористом натрии за единицу. Отмечается, что сложные физико-химические условия внутри клеток затрудняют количественное объяснение этих данных.

В той же работе Штехелин сообщил интересные наблюдения, что два протопласта могут при помещении в гипотонический раствор или при повышении температуры выше 40° соединяться, образуя большое шаровидное тело.

Bacillus megaterium. Свойства проницаемости протопластов этой бактерии были изучены при помощи осмотических исследований, во многих отношениях аналогичных описанным выше (Вейбулл, 1955б). Средний объем протопластов определяли измерением диаметра 50—400 этих телец при помощи окулярного микрометра. При этом было неожиданно обнаружено, что осмотическое давление среды до удаления клеточной стенки мало или совсем не влияет на объем протопластов. Объем протопластов, полученных на 1 г сухого веса целых клеток, был установлен в 1,1 мл в 0,1—0,2 М сахарозе и 1,3 мл в 5,8 — 16% полиэтиленгликоле. Осмотическое давление внутри целой клетки B. megaterium не может, следовательно, быть определено на основании выполненных до сих пор опытов.

Как только протопласты образовались, они реагируют на изменения осмотического давления внешней среды.

Плазмолиз, проявляющийся в растворах полиэтиленгликоля, почти полностью обратим. Плазмолиз может быть вызван при помощи сахарозы, глюкозы и полиэтиленгликоля, но не уретана. Опыты с фосфатными буферами не дали четких результатов, так как многие протопласты разрушились. Определения непроницаемого объема (см. ниже) протопластов указывают, что протопласты непроницаемы также и для фосфата.

Если вычертить на диаграмме объем протопластов против эквивалента осмотического давления, то получается прямая линия. Это показывает действительность закона $P\,(V - b) = \text{const}$, так как он может быть написан в виде $V = \text{const}/P + b$. Как указывалось раньше, тем самым в значительной степени обосновано наличие полупроницаемой оболочки вокруг протопластов. Объем осмотически инертных веществ, т. е. величина b в приведенном выше уравнении, был найден равным около 35% (v/v) протоплазмы живых клеток. Остальная часть протоплазмы должна представлять «свободное пространство» внутри клеток, содержащее осмотически переносимую воду и растворенные вещества низкого молекулярного веса.

Независимость объема протопластов от осмотического давления среды до удаления клеточной стенки объяснить нелегко. Можно допустить более или менее свободное прохождение веществ

низкого молекулярного веса в протопласты и из них во время их образования. Это объяснение, однако, не очень вероятно, так как в среде, после того как бактериальные клетки были обработаны лизоцимом в растворах сахарозы, не удалось обнаружить вещества, абсорбирующие ультрафиолетовую часть спектра, или неорганические фосфаты (Вейбулл, 1953а, 1955б).

Сопоставление результатов, полученных в опытах по осмосу, описанных выше, делает вероятным, что проницаемость протопластов Bacillus M. и B. megaterium совершенно одинакова.

Свойства проницаемости покоящихся целых клеток Bacillus megaterium относительно различных растворенных веществ в полуанаэробных условиях изучали путем прибавления к густой бактериальной взвеси раствора, содержащего заданное количество изучаемого вещества. Через некоторое время клетки отделяли центрифугированием и определяли концентрацию вещества в надосадочной жидкости. Пространство, в которое не проникает вещество в конечном разведении, дается по формуле:

$$V \text{ непроницаемости} = V_1 + V_2 - V_2 \cdot c/c_8,$$

где V_1 представляет объем исходной бактериальной взвеси; V_2 — объем добавленного вещества; c и c_8 — начальную и конечную концентрации этого вещества. V непроницаемости может быть названо непроницаемым объемом бактерий.

Результаты исследования показали (Вейбулл, 1955а), что в данных условиях бóльшая часть бактериального тела непроницаема для значительного количества веществ, таких, как ионы фосфора, сахароза и козимаза, но проницаема для уретана. В количественном выражении объем непроницаемости равен 2,9 мл/г сухих бактерий.

Эта цифра может быть сравнена со средним объемом целых бактериальных клеток и заключающейся в них протоплазмы. Эти количества были определены измерением в оптическом микроскопе длины и ширины большого количества бактерий и ширины протоплазмы. Четкая морфологическая дифференциация между протопластом и клеточной стенкой была получена при взвешивании бактерий в разведенной туши, как описано выше. Было установлено, что объем такого количества живых бактерий, которое соответствует сухому весу в 1 г, равен 4,5 мл, а объем протопластов — 2,5 мл. Отсюда можно сделать вывод, что объем непроницаемости Bacillus megaterium (2,9 мл/г сухих бактериальных клеток) значительно меньше, чем объем целых клеток (4,5 мл), но лишь слегка больше, чем объем протоплазмы (2,5 мл). Эти факты наиболее легко объясняются, если принять наличие барьера проницаемости на поверхности протоплазмы. Разница между морфологически определяемым объемом протоплазмы и объемом непроницаемости вероятнее всего представляет объем полипептидных и полисахаридных молекул клеточной стенки.

Можно упомянуть, что оказалось невозможным плазмолизировать Bacillus megaterium (штамм КМ) даже в насыщенных растворах хлористого натрия или сахарозы.

Как упоминалось раньше, средний объем протопластов, определяемый измерением диаметров большого их количества, указывает, что 1,1—1,3 мл протопластов получается из взвеси бактериальных клеток, сухой вес которой равен 1 г. Это означает, что при удалении клеточной стенки протоплазма сокращается почти до половины начального объема.

Сравнение между свойствами проницаемости целых клеток и протопластов указывает, что проницаемость протоплазмы до и после удаления клеточной стенки одинакова относительно сахарозы, уретана и фосфата.

ЭНЗИМОЛОГИЯ, МЕТАБОЛИЗМ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ

Автор настоящей статьи наблюдал (Вейбулл, 1953а), что целые клетки и протопласты обладают одинаковым эндогенным дыханием и окисляют глюкозу в равной степени. Это указывает, что в протопластах по крайней мере многие энзимные системы остаются неповрежденными. Насколько автору известно, в изолированных клеточных стенках энзиматическая активность обнаружена не была.

В протопластах, точнее во фракции «теней», найдена полная цитохромная система. Сторк (личное сообщение) обнаружил, что в той же фракции сосредоточивается вся сукциноксидазная активность.

Биохимические свойства протопластов будут обсуждаться в докладе Мак Квайллена на этом симпозиуме. Здесь будет дан только краткий обзор.

Во фракции нуклеиновых кислот и белков включаются различные питательные вещества. Степень присоединения протопластами может быть сравнена с таковой целых растущих клеток (Мак Квайллен, 1955а).

Образование адаптивных энзимов было показано у протопластов Bacillus subtilis (Виам и др., 1955). Изучался синтез энзима арабокиназы. Образование адаптивных энзимов имеет также место у протопластов B. megaterium (Мак Квайллен, 1955б).

Солтон и Мак Квайллен (1955), а также Бреннер (Brenner) и Стент (Stent) (1955) показали, что протопласты Bacillus megaterium способны поддерживать рост бактериофагов. Это же верно относительно протопластов B. subtilis [Мутсаарс (Mutsaars), 1955].

Солтон (1955) показал, что клетки Bacillus megaterium, приступившие к образованию спор, могут быть превращены в протопласты, которые способны затем развивать споры.

Недавно Мак Квайллен (см. эти труды) смог показать повышение объема и сухого веса протопластов в аэробных условиях при культивировании их при 28° в среде, содержащей сахарозу (0,2 М) и аминокислоты, и при легком встряхивании. Рост протопластов был одинаков с ростом целых клеток. Кроме того, применяя 0,5 М фосфат в качестве стабилизирующей среды, Мак Квайллен нашел, что приблизительно через 6 часов появляются гантелеобразные протопласты. Это, весьма вероятно, указывает на то, что протопласты могут делиться.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Несомненно, что протоплазма некоторых бактериальных видов может быть отделена от клеточной стенки и все же может оставаться в виде относительно стабильной структурной единицы. Для успешного отделения необходимо, дополнительно к мягким методам этого процесса, наличие агента, стабилизирующего обнаженную протоплазму.

Нелегко дать простое объяснение феномена стабилизации. Трудно объяснить его исключительно осмотическими терминами. Эквимолярные концентрации сахарозы, хлористого натрия и целлобиозы, например, дают соответственно хорошую, умеренную и отрицательную стабилизацию протопластов Bacillus megaterium. Кроме того, одни и те же протопласты менее стабильны в аэробных, чем в анаэробных условиях.

Из того, что было сказано предварительно, должно быть ясно, что отделение бактериальной клеточной стенки от клетки в присутствии стабилизирующего агента не изменяет глубоко строение и свойства бактериальной протоплазмы. Свойства проницаемости протопластов представляются одинаковыми с таковыми целых клеток. Протопласты дышат почти так же интенсивно, как и целые клетки, и способны продуцировать фаг и образовывать споры. В особых условиях они растут и, вероятно, также делятся.

С другой стороны, протопласты едва ли равноценны целым клеткам. Не было до сих пор выявлено активное движение протопластов, несмотря на сохранение протопластами жгутиков. Опыты по осмотическому давлению, выполненные с протопластами Bacillus megaterium, также свидетельствуют, что строение протоплазмы слегка изменяется при отделении клеточной стенки. В противном случае объем протопластов не был бы независим от начального осмотического давления среды. Метаболизм протопластов и клеток кажется очень сходным, но, вероятно, не идентичен. Дальнейшие исследования в этой области, вероятно, прибавят новые факты к нашим представлениям относительно тонких обменных процессов, дающих начало росту и делению. Должны также представлять большое значение усовершенство-

ванные сравнительные исследования строения клеток и протопластов.

В начале данной статьи упоминались L-формы некоторых бактерий как имеющие протоплазматическую природу. Обменные и серологические исследования вместе с изучением роста клеток, протопластов и L-форм могут раскрыть интересные взаимоотношения между этими бактериальными структурами.

ЛИТЕРАТУРА

Beljanski M. (1954) L'action de la ribonucléase et de la desoxyribonucléase sur l'incorporation de glycocolle radio-actif dans les protéines de lysats de Micrococcus lysodeikticus. Biochim. biophys. Acta, *15*, 425.

Brenner S. &. Stent G. S. (1955). Bacteriophage growth in protoplasts of Bacillus megaterium. Biochim. biophys. Acta, *17*, 473.

Dienes L. (1946). Reproductive processes in Proteus cultures. Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., *63*, 265.

Dienes L. & Weinberger H. J. (1951). The L forms of bacteria. Bact. Rev. *15*, 245.

Fischer A. (1900). Die Empfindlichkeit der Bakterienzelle und das baktericide Serum. Z. Hyg. Infekt Kr. *35*, 1.

Fischer A. (1906). Über Plasmoptyse der Bakterien. Der. deutsch. bot. Ges. *24*, 55.

Garbowski L. (1907). Gestaltsänderung und Plasmoptyse. Arch. Protistenk. *9*, 53.

Gladstone G. P. & Fildes P. (1940). A simple culture medium for general use without meat extract or peptone. Brit. J. exp. Path. *21*, 161.

Höber R. (1945). Physical Chemistry of Cells and Tissues, p. 272. Philadelphia and Toronto: The Blakiston Company.

Höpken W. & Bartmann K. (1955). Phasenkontrastmikroskopische Beobachtungen des durch Penicillin ausgelösten L-Cyclus von Bact. proteus. Zbl. Bakt. Abt. 1, Orig., *162*, 372.

Keilin D. (1934). Cytochrome and the supposed direct spectroscopic observation of oxidase. Nature, Lond., *133*, 290.

Klieneberger E. (1935). The natural occurrence of pleuro-pneumonia-like organisms in apparent symbiosis with Streptobacillus moniliformis and other bacteria. J. Path. Bact. *40*, 93.

Klieneberger-Nobel E. (1951). Filterable forms of bacteria. Bact. Rev. *15*, 77.

Knaysi G. (1951). Elements of Bacterial Cytology, 2nd ed. Ithaca, New York: Comstock Publishing Company.

Lemoigne M., Delaporte B. & Croson M. (1944). Contribution a l'étude botanique et biochimique des bactéries du genre Bacillus. Ann. Inst. Pasteur, *70*, 224.

Lester R. L. (1953). In vitro incorporation of leucine into the proteins of Micrococcus lysodeikticus. J. Amer. chem. Soc. *75*, 5448.

Lucké B. (1940). The living cell as an osmotic system and its permeability to water. Cold Spr. Harb. Sym. quant. Biol. *8*, 123.

McQuillen K. (1955a). Bacterial protoplasts. I. Protein and nucleic acid metabolism in protoplasts of Bacillus megaterium. Biochim. biophys. Acta, *17*, 382.

McQuillen K. (1955 б) Protein, nucleic acid and adaptive enzyme formation in protoplasts of Bacillus megaterium. J. gen. Microbiol. *13*, iv.

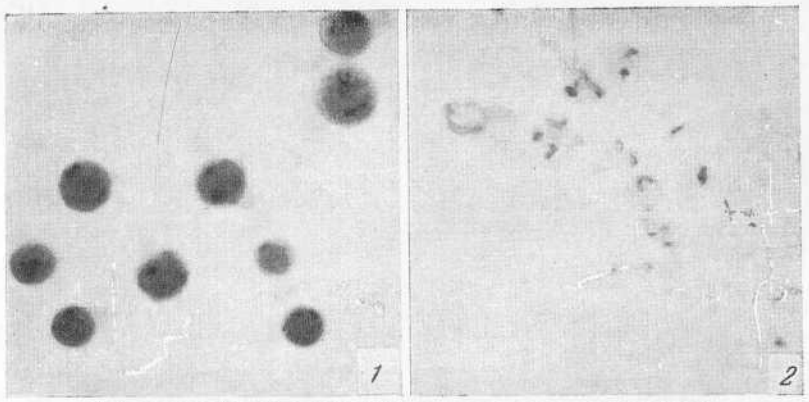
Mutsaars W. (1955). Ann. Inst. Pasteur, *89*, 166.

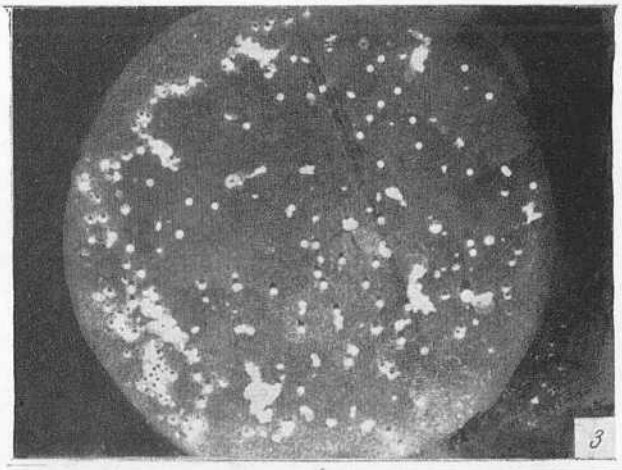
Raichel B. (1928). Über den Einfluss osmotisch wirksamer Mittel auf die Bakterienzelle. Arch. Protistenk. *63*, 333.

Salton M. R. J. (1952). Cell wall of Micrococcus lysodeikticus as the substrate of lysozyme. Nature, Lond., *170*, 746.
Salton M. R. J. (1955). The formation of spores in protoplasts of Bacillus megaterium. J. gen. Microbiol. *13*, iv.
Salton M. R. J. & McQuillen K. (1955). Bacterial protoplasts. II. Bacteriophage multiplication in protoplasts of sensitive and lysogenic strains of Bacillus megaterium. Biochim. biophys. Acta. *17*, 465.
Schachman H. K., Pardee A. B. & Stanier R. Y. (1952). Studies on the macromolecular organisation of microbial cells. Arch. Biochem. Biophys. *38*, 245.
Stähelin H. (1953). Über spontane sphärische Transformation von Milzbrandbazillen. Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. *16*, 892.
Stähelin H. (1954). Über osmotisches Verhalten und Fusion nach der Protoplasten von Bact. anthracis. Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. *17*, 296.
Stapp C. & Zycha H. (1931). Morphologische Untersuchungen an Bacillus mycoides; ein Beitrag zur Frage des Pleomorphismus der Bakterien. Arch. Mikrobiol. *2*, 493.
Stempen H. & Hutchinson W. G. (1951). The formation and development of large bodies in Proteus vulgaris OX-19. J. Bact. *61*, 321.
Tomcsik J. & Guex-Holzer S. (1952.) Änderung der Structur der Bakterienzelle im Verlauf der Lysozym-Einwirkung. Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. *15*, 517.
Tomcsik J. & Guex-Holzer S. (1954). Antikörperproduktion mit isolierter Bakterienzellwand und mit Protoplasten. Experientia, *10*, 484.
Tulasne R. (1951). Les formes L des bactéries. Rev. Immunol. *15*, 223.
Tulasne R. (1953). Le cycle L et les formes naines des bactéries. In Bacterial Cytology, Samp. 6th Congr. Int. Microbiol., Rome, p. 144.
Warren G. H. & Durso J. G. (1952). Effect of lysozyme on the cell structure of Achromobacter fischeri. J. Bact. *64*, 483.
Weibull C. (1953a). The isolation of protoplasts from Bacillus megaterium by controlled treatment with lysozyme. J. Bact. *66*, 688.
Weibull C. (1953б). Characterisation of the protoplasmic constituents of Bacillus megaterium. J. Bact. *66*, 696.
Weibull C. (1955a). The localisation of a permeability barrier in the cells of Bacillus megaterium. Exp. Cell Res. *9*, 139.
Weibull C. (1955б). Osmotic properties of protoplasts of Bacillus megaterium. Exp. Cell Res. *9*, 294.
Welshimer H. J. (1953). The action of lysozyme on the cell-wall and capsule of Bacillus megaterium. J. Bact. *66*, 112.
Wiame J. M & Storck R. (1953). Metabolisme de l'acide glutamique chez Bacillus subtilis. Biochim. biophys. Acta, *10*, 268.
Wiame J. M., Storck R. & Vanderwinckel E. (1955). Biosynthèse induite d'arabokinase dans les protoplastes de Bacillus subtilis. Biochim. biophys. Acta, *18*, 353.
Williams R. C. & Backus R. C. (1949). Macromolecular weights determined by direct particle counting. I. The weight of the Bushy Stunt Virus particle. J. Amer. chem. Soc. *71*, 4052.

Таблица I

1 и *2*. Фазовоконтрастные микрофотографии протопластов и «теней» Bacillus megaterium. Увеличение в 3000 раз. Фотографии сняты, проявлены и отпечатаны в одинаковых условиях.
1. Протопласты.
2. «Тени», полученные при лизисе протопластов в присутствии ионов магния.
3 и *4*. Электронные микрографии капель, образованных бактериальными лизатами, смешанными с взвесью полистирен-латекса и распыленными на сетках. Увеличение до 3000 раз.
3. Протопласты, лизированные в отсутствие ионов магния.
4. Протопласты, лизированные в присутствии ионов магния.





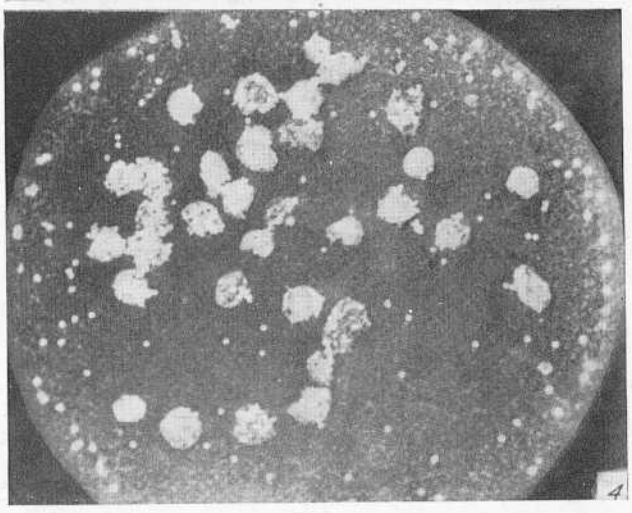


Таблица I.

СВОЙСТВА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРОТОПЛАСТОВ

К. МАК КВАЙЛЛЕН

Отдел биохимии Кембриджского университета

Понятие о бактериальной клетке как биологическом существе предполагает детальное знание строения и функции целого и его частей. Другие докладчики на этом симпозиуме имеют дело со специализированными структурами, такими, как жгутики, ядра, клеточные стенки и капсулы, и совершенно очевидно, какие быстрые успехи были сделаны в приготовлении и характеристике этих клеточных компонентов. Цитологические, гистохимические и иммунохимические исследования снабдили нас некоторыми сведениями об анатомической локализации специфических структур, но свойства изолированных субцеллюлярных фракций были изучены менее полно. Это частично обязано малым размерам бактерий и вследствие этого — большей трудности разделения их на части сравнительно с дрожжевыми клетками и клетками животных и растений. Прошло меньше 20 лет с тех пор, как изобретение мельницы Бут-Грина впервые сделало возможным разрушение бактерий и приготовление бесклеточных энзимов [Бут и Грин (Booth, Green), 1938]. С тех пор были разработаны другие технические приемы [Хьюго (Hugo), 1954], но изучение физиологических и биохимических свойств компонентов бактериальной клетки находится еще в зачаточном состоянии даже сравнительно с ядрами, митохондриями, микрозомами и хлоропластами высших организмов. Известно, что определенные энзимные системы и пигменты ассоциируются у некоторых бактерий со специфическими «частицами»; представляется вероятным, что клеточные стенки тех или иных видов в сущности инертны — никто никогда не выявил у них наличия энзимной активности, а химическое строение некоторых клеточных стенок свидетельствует против наличия белка в общепринятом смысле [см. доклад Солтона (Salton) в этих трудах]; и несомненно, что капсулы могут быть удалены из различных организмов без нарушения жизнеспособности последних в подходя-

щей среде. Но много остается еще изучать относительно взаимоотношений между структурой и функцией у бактериальной клетки.

Значительный прогресс был достигнут в последнее время, когда Гейл (Gale) и Фолкс (Folkes) (1954, 1955а,б) показали, что разрушенные ультразвуком стафилококки способны включать меченные изотопами аминокислоты и синтезировать белки, в том числе некоторые энзимы. Эти препараты, которые остаются еще активными после экстрагирования различными способами, по-видимому, состоят из оболочки клетки (стенки), внутри которой сохранилось некоторое количество детрита. Сейчас невозможно еще решить, какие структуры клетки существенно необходимы для биохимической активности, но принимая во внимание, что клеточная стенка других организмов может быть удалена без нарушения синтеза белка и нуклеиновых кислот, возможно, что бóльшая часть материала Гейла инертна. Вещество, изолированное как активная фракция после разрушения, представляет собой только очень небольшую часть (меньше чем 1%) исходного сухого веса клеток. Возможно, что такой скудный выход присущ только механическим методам разрушения.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРОТОПЛАСТЫ

Другим методом приготовления субцеллюлярных компонентов бактерий может быть применение специфических энзимов. К сожалению, имеется немного энзимов, о которых известно, что они действуют на живые организмы, но Вейбулл (Weibull, 1953) показал, что лизоцим может быть применен для переваривания клеточной стенки и перегородок Bacillus megaterium. Если это осуществляется при наличии подходящих условий, каждая особь исходного микроорганизма дает от одного до четырех шаровидных «протопластов» — идеальный материал для изучения свойств субцеллюлярных структур на уровне одной ступенью ниже, чем целая клетка.

Последующие разделы этой статьи посвящены обсуждению некоторых биохимических и физиологических свойств этих структур сравнительно с соответствующими свойствами целых живых бактерий. Хотя большинство работ касается протопластов Bacillus megaterium, аналогичные структуры были приготовлены из B. subtilis, Micrococcus lysodeicticus, Sarcina lutea, Staphylococcus aureus и других организмов [Мак Квайллен (McQuillen), 1955а; Митчелл (Mitchell), статья в этих трудах; Виам, Сторк и Вандервинкель (Wiame, Storck, Vanderwinckel), 1955].

Приготовление и характеристика протопластов детально описаны в предыдущей статье Вейбулла и достаточно сказать, что может быть достигнут исключительный выход, содержащий 60—80% сухого веса исходных клеток и состоящий в основном из организованной структуры, которая в живом организме, воз-

можно, изменяется только по форме вследствие наличия твердой клеточной стенки. Последовательность явлений, наблюдающихся при фазово-контрастной микроскопии во время растворения клеточной стенки лизоцимом, представлена схематически на рис. 1 (ср. электронные микрографии Виама и др., 1955).

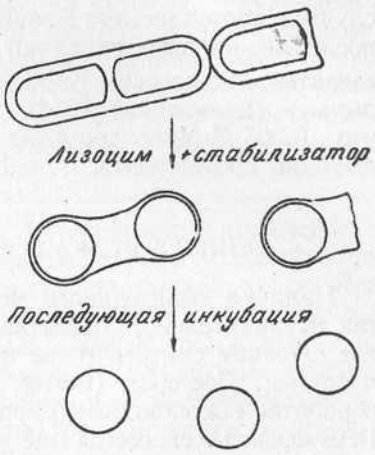


Рис. 1. Образование шаровидных протопластов при обработке лизоцимом палочковидных клеток Bacillus megaterium.

Принципиальная трудность в управлении протопластами и изучении их свойств заключается в их необычайной хрупкости и чувствительности к осмотическому потрясению, механическим воздействиям, таким, как встряхивание и центрифугирование, и аэрации. Суспендирующие среды, которые обеспечивают некоторую защиту, включают сахарозу (0,15—0,5М), хлористый натрий (0,25—0,5М), «карбовакс 4000», полиэтиленгликоль (7,5%) и фосфатный буфер (pH 7,0; 0,5М) (Вейбулл, 1953; Виам и др., 1955; Мак Квайллен, 1955в). Проблема снабжения воздухом для поддержания обмена веществ протопластов такого высокоаэробного организма, как Bacillus megaterium, была изучена Мак Квайлленом (1955а). Аэрация пропусканием пузырьков воздуха или во вращающихся флаконах приводит к быстрому лизису и в конечном результате наименее повреждающей техникой оказалось осторожное покачивание наполненных до половины и закупоренных пробирок. Для работы в большом масштабе были применены матрацы Ру, снабженные отверстием в пробке для доступа воздуха и содержавшие до 250 мл среды, подвергавшиеся в исследованиях метаболизма покачиванию на протяжении более чем 6 часов (Мак Квайллен, неопубликовано).

По Виаму и др. (1955), протопласты Bacillus subtilis более устойчивы, чем протопласты других видов, но поскольку Солтон (личное сообщение) показал, что лизоцим растворяет клеточные стенки этого организма не полностью, возможно, что шары, образующиеся при обработке лизоцимом B. subtilis, еще несут на себе часть клеточной стенки.

ДЫХАНИЕ

Протопласты Bacillus megaterium обладают значительным эндогенным дыханием ($Q_{O_2} = 66$) и могут окислять глюкозу ($Q_{O_2} = 128$, без поправки на эндогенность). Эти величины фак-

тически те же, что и у целых бактерий (Вейбулл, 1953). Равным образом протопласты B. subtilis, как показали Виам и др. (1955), окисляют глюкозу на постоянном уровне в течение 3 часов. Осмотический лизис приводит к полной утрате активности в случае с протопластами B. subtilis, но протопласты B. megaterium после лизиса еще окисляют глюкозу ($Q_{O_2} = 27$). Лизоцимные «лизаты» Micrococcus lysodeicticus в сахарозе также способны дышать (Белянский, 1954). Вейбулл (неопубликовано) нашел, что 0,005 M-Mg^{++} тормозит как эндогенное, так и глюкозное дыхание протопластов B. subtilis.

СИНТЕЗ БЕЛКА И НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Наличие дыхательного механизма в целлюлярных препаратах неудивительно; представляет интерес выяснить, какие более сложные синтетические процессы могут выполняться протопластами. Лестером (Lester, 1953) было установлено, что при обработке высококонцентрированных взвесей Micrococcus lysodeicticus «лизаты» способны еще включать в белковую фракцию меченный ^{14}C лейцин. Прибавление деоксирибонуклеазы (ДНК-азы) усиливает включение, тогда как рибонуклеаза (РНК-аза) полностью подавляет его. Подобные данные были сообщены Белянским (1954), применявшим вместо лейцина глицин, но ни в одном случае полученные при воздействии энзима «лизаты» совершенно не были охарактеризованы относительно их структурных взаимоотношений с целыми клетками. Представляется вероятным, однако, что эти препараты содержали протопласты M. lysodeicticus. Действие нуклеаз не может быть принято как указание на вовлечение рибонуклеиновой кислоты (РНК) в синтез протеина. Во-первых, синтез белка не был доказан, и Гейл и Фолкс (1953) показали, что отдельная аминокислота может быть включена в бактериальный белок путем обменной реакции в отсутствие синтеза самого белка. Во-вторых, непохоже, что какой-либо энзим проникает внутрь целых протопластов, так как вещества низкого молекулярного веса, такие, как нуклеотиды и сахароза, нелегко проходят в них и из них. В-третьих, Бреннер (Brenner, личное сообщение) показал, что протопласты Bacillus megaterium быстро лизируются РНК-азой, хотя не повреждаются ДНК-азой. Стимулирующее действие ДНК-азы могло в значительной степени быть обязано деградации деоксирибонуклеиновой кислоты, освобождаемой из распадающихся организмов, скорее, чем действию на протопласты как таковые. Наивысшие степени включения меченых аминокислот в белок в этих опытах достигали порядка 0,001 — 0,0025 μM/мг белка в час при 37°.

Более детальное изучение включения веществ, меченных ^{14}C, в протопласты Bacillus megaterium было выполнено Мак Квайлленом (1955а, б и неопубликованные данные). Штамм КМ был рань-

ше приучен к росту в глюкозо-аммиачно-солевой среде, и взвеси отмытых целых клеток и протопластов культивировались в этой среде, дополненной сахарозой и радиоактивным веществом. В некоторых случаях была прибавлена также смесь аминокислот. Препараты были фракционированы на липиды, нуклеиновые кислоты и белки, и каждая фракция была испытана на радиоактивность. Образцы белка и нуклеиновой кислоты были также гидролизованы, хроматографированы и радио-автографированы. Таким путем оказалось возможным определить, в какие аминокислоты и пурины или пиримидины оказался включенным радиоактивный углерод.

Было найдено, что включение ^{14}C в содержимое протопластов составляло обычно от 50 до 100% интенсивности включения в соответствующие фракции целых клеток, даже в условиях, при которых целые клетки имели возможность быстро расти. При применении меченого глицина, например, степень включения в характерном опыте доходила до 0,2 μM/мг белка в час, т. е. около 1% сухого веса протопластов в час. Подобные коэффициенты сохранились на одном уровне или увеличивались на протяжении 3 часов культивирования. В осмотически лизированных протопластах включение отсутствовало.

В числе препаратов, содержащих изотоп, были глюкоза, ацетат, глицин, аспарагиновая кислота, урацил и тимин. В табл. 1 перечисляются основные фракции, в которые происходит включение радиоизотопов, а в табл. 2 и 3 указываются специфические конечные продукты.

В этих таблицах несомненно имеется почти точное сходство в поведении целых клеток и протопластов, но имеется поразительное отличие — протопласты в противоположность целым клеткам не включают изотопы в диаминопимелиновую кислоту своей белковой фракции. Больше того, эта аминокислота, по-видимому, отсутствует в протопластах при наличии ее как составной части в клеточной стенке Bacillus megaterium (Солтон, 1953) и при явной неспособности протопластов формировать новые клеточные стенки. Кажется совершенно невероятным, что протопласты не в состоянии синтезировать эту аминокислоту и очень возможно, что диаминопимелиновая кислота будет квалифицирована как продукт экскреции, хотя этот вопрос еще не исследовался.

Ход включения ацетатного углерода в аминокислоты и пиримидины очень сходен в таковым, найденным у Escherichia coli [Мак Квайллен и Робертс (Roberts), 1954], где для обеспечения промежуточных продуктов для синтеза аминокислоты осуществляется главным образом цикл трикарбоновой кислоты [Робертс, Эбелсон, Кови, Болтон и Бриттен (Abelson, Cowie, Bolton, Britten), 1955].

Разнообразие, степень и размер включения углерода из различных источников делают вероятным, что в этой протопластной системе чаще происходит синтез de novo большинства клеточ-

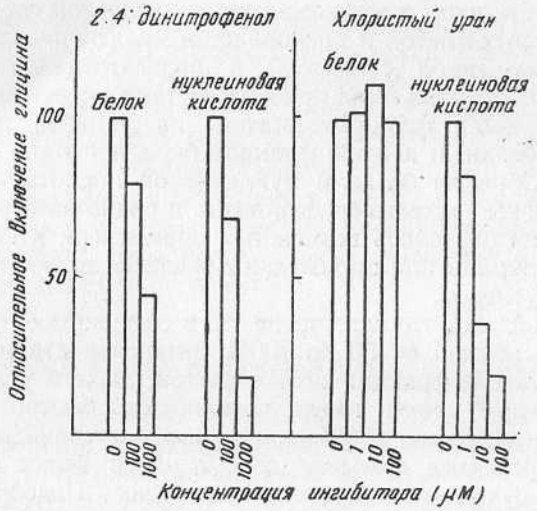


Рис. 2. Торможение включения глицина в белок и нуклеиновую кислоту протопластов Bacillus megaterium. Результаты выражены в отношении к 100 для контроля в отсутствие ингибитора (данные Мак Квайллена, 1955а).

Таблица 1

Включение ^{14}C в основные фракции протопластов Bacillus megaterium

^{14}C-вещества	Фракции		
	липид	нуклеиновая кислота	белок
Глюкоза	+++	+++	+++
CH_3COOO Na	+++	+	+++
$^{14}CH_3COO$ Na	+++	+	+++
CH_2 NH_2 $^{14}COOH$	·	+++	+++
Аспарагиновая кислота .	·	+++	+++
Урацил	·	+++	·
Тимин	·	—	·

Протопласты культивировались при аэрации в среде, содержащей глюкозу, сахарозу (как стабилизатор), NH_3 и неорганические соли, а также радиоактивное вещество. Целые клетки Bacillus megaterium показали одинаковый рисунок. Знаки +++, + и — соответствуют сильной, слабой радиоактивности и отсутствию таковой (данные Мак Квайллена, 1955а, б).

Таблица 2

Включение ^{14}C в аминокислоты белков Bacillus megaterium и его протопластов

Аминокислоты	^{14}C-вещества							
	глюкоза		ацетат		аспарагиновая кислота		глицин	
	цк	пп	цк	пп	цк	пп	цк	пп
Аланин	+	+	+	+	+	+	—	—
Аргинин	+	+	+	+	+	+	—	—
Аспарагиновая кислота	+	+	+	+	+	+	(+)	(±)
Глютаминовая кислота	+	+	+	+	+	+	(+)	(±)
Глицин	+	+	—	—	—	—	+	+
Лейцин (S)	+	+	+	+	+	+	—	—
Лизин	+	+	+	+	+	+	—	—
Пролин	+	+	+	+	+	+	(+)	—
Серин	+	+	—	—	—	—	(±)	(±)
Треонин	+	+	+	+	+	+	—	—
Диаминопимелиновая кислота	+	—	+	—	+	—	(+)	—

Целые клетки (цк) или протопласты (пп) культивировались, как указано в табл. 1. Знаки +, (+) и — соответствуют сильной, слабой радиоактивности и отсутствию таковой; (±) указывает на случайные следы активности (данные Мак Квайллена 1955а, б).

Таблица 3

Включение ^{14}C в составные части нуклеиновой кислоты Bacillus megaterium и его протопластов

Составные части нуклеиновой кислоты	^{14}C-вещество									
	глицин		ацетат		аспарагиновая кислота		урацил		тимин	
	цк	пп	цк	пп	цк	пп	цк	пп	цк	пп
Аденин	+	+	—	—	(+)	(+)	—	—	—	—
Гуанин	+	+	—	—	(+)	(+)	—	—	—	—
Цитидиновая кислота	—	—	(+)	(+)	+	+	+	+	—	—
Уридиновая кислота	—	—	(+)	(+)	+	+	+	+	—	—
Тимидиновая кислота	—	—	—	—	(+)	(+)	(+)	(+)	—	—

Целые клетки (цк) или протопласты (пп) культивировались, как указано в табл. 1. Знаки +, (+) и — соответствуют сильной, слабой радиоактивности и отсутствию таковой (данные Мак Квайллена, 1955а, б и неопубликованные).

ных компонентов, чем только обменное включение. Это подтверждается последующей работой по синтезу энзимов и т. д. (см. ниже).

Все применявшиеся реакции тормозились 2:4-динитрофенолом, имевшим одинаковое действие как на протопласты, так и на целые клетки. С другой стороны, хлористый уран тормозил включение углерода глицина в нуклеиновую кислоту протопластов, но не в белок (рис. 2). Больше того, у целых клеток ни синтез белка, ни синтез нуклеиновой кислоты этим реактивом не тормозился. Это может иметь отношение к известному взаимодействию хлористого урана с клеточными стенками различных видов бактерий (Мак Квайллен, 1950).

СИНТЕЗ ЭНЗИМОВ

Конститутивные энзимы

Исследования, описанные в предыдущем разделе, установили значительные синтетические способности протопластов. Были выполнены также некоторые исследования по синтезу этими субцеллюлярными структурами специфических энзимов. Мак Квайллен (неопубликовано) испытывал сукциндегидразную активность протопластов Bacillus megaterium, культивировавшихся в присутствии глюкозы и аминокислот, с сахарозой в качестве стабилизатора. Энзиматическая активность определялась в осаждаемом материале при помощи метода с применением метиленовой синьки в трубке Тунберга. Во время культивирования, длившегося несколько часов, наблюдалось повышение активности больше чем в 5 раз. В общем результаты были приблизительно сходны с результатами, полученными с целыми клетками, обработанными таким же путем.

Адаптивные энзимы

Были выполнены два исследования по направленному биосинтезу адаптивных энзимов протопластами. Виам и др. (1955) исследовали образование арабокиназы у протопластов Bacillus subtilis; Мак Квайллен (1955б и не опубликовано) наблюдал синтез β-галактозидазы протопластами B. megaterium. Первые авторы измеряли потребление кислорода протопластами манометрически на протяжении 3 часов в отсутствие вещества, в присутствии глюкозы и в присутствии L(+)арабинозы. Коэффициенты глюкозного и эндогенного дыхания оставались приблизительно постоянными на протяжении эксперимента. В присутствии арабинозы, однако, степень использования кислорода повышалась двумя этапами на протяжении около полутора часов и затем оставалась постоянной на такой же период времени. Была изме-

рена также арабокиназная активность экстрактов из протопластов, которые выращивались в присутствии арабинозы; в табл. 4 приведены результаты, полученные в этих опытах. Развивавшаяся активность была того же порядка, что и у целых клеток.

Таблица 4

Синтез адаптивного энзима арабокиназы протопластами Bacillus subtilis

Субстрат	Степень продукции CO_2 (μl/ч) после предварительной инкубации на протяжении:		
	0 часов	1 часа	2 часов
АТФ (10 μM)	24	19	28
АТФ (10 μM) + арабиноза (20 μM)	46	106	220
Арабокиназная активность	22	87	192

Протопласты встряхивались с арабинозой (0,02 М) разные промежутки времени в растворе, содержащем NaCl (0,5 М), $(NH_4)_2SO_4$ (0,005 М) и дрожжевой экстракт (0,1%). Энзиматическая активность определялась по экстрактам лиофилизированных препаратов (данные Виама и др., 1955).

Мак Квайллен (1955б и не опубликовано) работал со штаммом KM Bacillus megaterium, использованным в исследованиях с изотопами, упоминавшимися выше. Как целые клетки, так и полученные из них протопласты имели относительно низкую β-галактозидазную активность при культивировании организма в глюкозо-аммиачно-солевой среде. Однако культивирование той и другой системы в присутствии галактозы (10 мг/мл) индуцировало синтез адаптивной β-галактозидазы, определявшейся при помощи О-нитрофенил-β-D-галактопиранозида [Ледерберг (Lederberg), 1950; Кризер (Creaser), 1955а]. Адаптация происходила легко в отмытых взвесях и была почти одинаково быстрой как у протопластов, так и у целых клеток. Ввиду хрупкости протопластов и растворимости энзима при изучении этой системы возникают некоторые трудности, так как для определения активности препараты должны быть центрифугированы и отмыты для удаления галактозы, а затем ресуспендированы в присутствии О-нитрофенил-галактозида. Позже было найдено, что тиометил-β-D-галактозид действует в концентрации 1 мг/мл как индуцирующий агент; он как будто не мешает при испытании, так что центрифугирование и отмывание можно не применять.

Синтез энзима продолжается несколько часов и конечные активности могут в сотни раз превышать начальные. На адаптацию оказывают влияние некоторые факторы. Аэрация существенна,

как было установлено для всех метаболических активностей этого организма. Небольшие количества глюкозы (100 μг/мл) являются стимулирующими, но более высокие концентрации тормозят образование энзима. Прибавление смеси аминокислот (18 аминокислот, каждая по 50 μг/мл) (см. Мак Квайллен и Солтон, 1955) или пептона (2 μг/мл) усиливает синтез β-галактозидазы, а 2 : 4-динитрофенол задерживает, так же как «ауреомицин» (1 μг/мл) и «пуромицин» (25 μг/мл). Хлористый уран (0,001 М) не оказывает влияния на синтез энзима, хотя флокулирует протопласты, тормозит включение глицина в нуклеиновую кислоту (см. рис. 2) и снижает размножение бактериофага (см. ниже). Кризер (1955б) показал, что синтез β-галактозидазы целыми стафилококками может быть заторможен аналогами пурина (8-азогуанин и 2 : 6-диаминопурин), но не аналогами пиримидина (5-нитроурацил, 5-бромоурацил, 2-тиоурацил и изоцистин). В разрушенных ультразвуком стафилококках, изучавшихся Гейлом и Фолкс (1955б), было показано образование различных энзимов, включая β-галактозидазу. После экстрагирования из этих препаратов большей части нуклеиновой кислоты синтез энзимов повышался в большей или меньшей степени при прибавлении пуринов и пиримидинов, рибонуклеиновой кислоты или деоксирибонуклеиновой кислоты. В большинстве других работ также имеются указания о тесном взаимоотношении между метаболизмом белка и нуклеиновых кислот. Будет интересно определить, может ли возникать синтез белка в протопластах без сопутствующего синтеза нуклеиновых кислот.

РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ

Система вирулентного бактериофага

С точки зрения значительной структурной целостности, сохраняющейся в протопластах, и факта, что клеточная стенка не существенна для синтеза белка, нуклеиновой кислоты и энзимов, не удивительно, вероятно, что бактериофаги могут размножаться в протопластах.

Фаг, активный против целых клеток, не адсорбируется протопластами Bacillus megaterium (Вейбулл, 1953), как это и можно было ожидать, поскольку первичное взаимодействие между хозяином и вирусом — это, вероятно, специфическая реакция отростка фага с бактериальной клеточной стенкой. По крайней мере в некоторых системах бактерия-бактериофаг после адсорбции фага ДНК проходит в бактериальную клетку, оставляя белковую оболочку фага снаружи. Бóльшая часть этого белка может быть удалена без нарушения способности системы хозяин/ДНК фага продолжать нормальный курс внутриклеточного развития фага, лизис бактерий и освобождение многих созревших

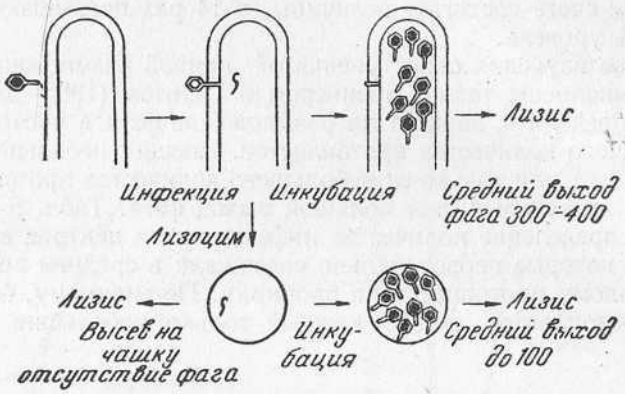


Рис. 3. Изображение общепринятой гипотезы о размножении вирулентного бактериофага, включая превращение клеток в протопласты.

частиц бактериофага из каждой клетки. Рис. 3 дает схематическое представление о вероятном течении процесса.

Было установлено независимо друг от друга Бреннером и Стентом (1955) и Солтоном и Мак Квайлленом (1955), что в протопластах можно наблюдать размножение бактериофага, если бактерии инфицированы вирулентным фагом до растворения лизоцимом их клеточных стенок. Эта последовательность также представлена на рис. 3.

Бреннер и Стент (1955) заражали Bacillus megaterium, штамм КМ, фагом С в пептонной среде и после центрифугирования и отмывания ресуспендировали клетки в сахарозном буфере. Одна часть взвеси была обработана лизоцимом и после того, как образование протопластов было завершено, на что указывало микроскопическое изучение, эта порция и порция, состоявшая из целых инфицированных клеток, были разведены в сахарозно-буферно-пептонной среде и культивировались при 25°. Образцы высевались на чашки через определенные интервалы для определения количества инфекционных центров. Целые клетки обнаружили нормальную одноступенчатую кривую размножения с латентным периодом 90 минут и величиной среднего выхода, равной 230. Начальные подсчеты в системе протопластов были, однако, меньше, чем 1% потребления, по-видимому, потому, что во время скрытого «периода»[1] высев на чашки протопластов заканчивается немедленным лизисом и предотвращает созревание фага. Позже количество инфекционных центров повышается и в

[1] „Relipse period" буквально — «период затмения», период между внедрением ДНК фага в клетку и образованием «зрелых» фаговых частиц; в этот период фаг как будто исчезает из клеток. *Ред.*

конечном счете достигает величины, в 14 раз превышающей начальный уровень.

Опыты изучения одноступенчатой кривой размножения фага были выполнены также Бреннером и Стентом (1955) для того, чтобы определить, зависит ли размножение фага в протопластах от большого количества протопластов, дающих небольшие средние выходы, или только от небольшого количества протопластов, каждый из которых дает большой выход фага. Табл. 5 показывает распределение количества инфекционных центров в 40 пробирках, которые первоначально содержали в среднем по одному зараженному протопласту на пробирку. По-видимому, большинство протопластов давало каждый только небольшие средние выходы.

Таблица 5

Опыт изучения выходов фага из отдельных клеток с применением инфицированных бактериофагом протопластов Bacillus megaterium

Количество стерильных пятен	Количество пробирок	Количество стерильных пятен	Количество пробирок
0	25	5	1
1	5	12	2
2	2	23	1
3	4	25	1

Сорок пробирок, содержащих в среднем по одному инфицированному протопласту на пробирку, культивировались, и все содержимое каждой пробирки в конечном счете высевалось на чашки для определения количества инфекционных центров.

Пробирки без выхода фага $24/40 = 0{,}60$.

Среднее количество выхода фага на пробирку — в $0{,}60 = 0{,}51$.

Среднее количество инфицированных протопластов на пробирку 1,0.

Фракция протопластов, давших выход фага $0{,}51/1{,}0 = 0{,}51$. данные Бреннера и Стента, 1955.

Этот незначительный размер среднего выхода фага встречается у протопластов не всегда; Солтон и Мак Квайллен (1955, см. ниже), применяя глюкозо-сахарозо-солевую среду, получили величины, достигавшие 100 или 30% величин, полученных у целых клеток. Они были, однако, не в состоянии получить удовлетворительные результаты в пептонной среде и, больше того, они аэрировали взвеси, чего не делали Бреннер и Стент (1955). Позже Бреннер (личное сообщение), применяя аспарагин-фосфат-сахарозную среду во встряхиваемых пробирках, получил величину среднего выхода фага, равную 45 для целых клеток Bacil-

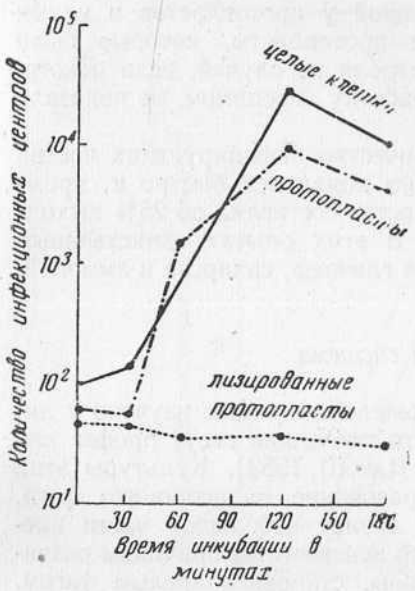


Рис. 4. Образование бактериофага после инфекции Bacillus megaterium с большим количеством частиц фага С на клетку. Целые клетки были заражены до отмывания и превращения в протопласты (данные Солтона и Мак Квайллена, 1955).

Рис. 5. Образование бактериофага после инфекции Bacillus megaterium КМ малым количеством частиц фага С. Целые клетки были заражены до отмывания и превращения в протопласты. Обратите внимание на «скрытый период», который сохраняется первые 30 минут (в противоположность рис. 4) (данные Солтона и Мак Квайллена, 1955).

lus megaterium и 30 — для протопластов. Он также показал, что ДНК-аза не влияет на размер среднего выхода фага в каждом препарате и что, хотя РНК-аза не влияет на целые клетки, она прекращает размножение фага в протопластах. Микроскопическое исследование показало, что при обработке РНК-азой протопласты лизировались. Неопубликованные опыты Бреннера также показали, что уксуснокислый уран стойко угнетает продукцию фага в протопластах на 80% или больше. Это может находиться в связи с обнаруженным Мак Квайлленом фактом, что хлористый уран тормозит включение глицина в нуклеиновую кислоту протопласта.

Солтон и Мак Квайллен (1955) заражали тот же штамм (КМ) Bacillus megaterium фагом С в пептонной воде и затем изучали размножение вируса в целых клетках, протопластах и осмотически лизированных протопластах в глюкозо-сахарозо-солевой среде — эта синтетическая среда не была пригодна для адсорбции. Применяя большие количества заражающих частиц фага на клетку, они не нашли признаков «скрытого периода» и степень

освобождения фага была одинаковой у протопластов и целых клеток (рис. 4). Лизированные протопласты, которые были включены в опыт в качестве контроля на случай, если некоторые целые клетки выдержали обработку лизоцимом, не показали повышения в титре фага.

Если применялось малое количество инфицирующих частиц на одну клетку, «скрытый период» появлялся быстро и, кроме того, конечный выход из протопластов составлял до 25% выхода из целых организмов (рис. 5). В этих опытах единственным источником углерода и азота были глюкоза, сахароза и аммоний.

Лизогенная система

Размножение бактериофага может быть также изучено у лизогенных бактерий. Считается, что последние несут профаг как генетический компонент [Львов (Lwoff), 1953]. Культуры этих организмов часто выявляют образование «спонтанного» фага, который, как полагают, обязан лизису небольшой части клеток, в которых профаг по каким-то неизвестным причинам развивался во время вегетативной фазы, становясь зрелым фагом. Различные индуцирующие агенты, такие, как ультрафиолетовый свет, некоторые редуцирующие вещества и перекись водорода, могут заставить бóльшую часть или все лизогенные бактерии в растущей культуре продуцировать зрелый фаг и в конце концов лизироваться. Во многих отношениях течение процесса после индукции лизогенной культуры напоминает таковое после заражения нелизогенной культуры вирулентным фагом. Это представлено схематически на рис. 6.

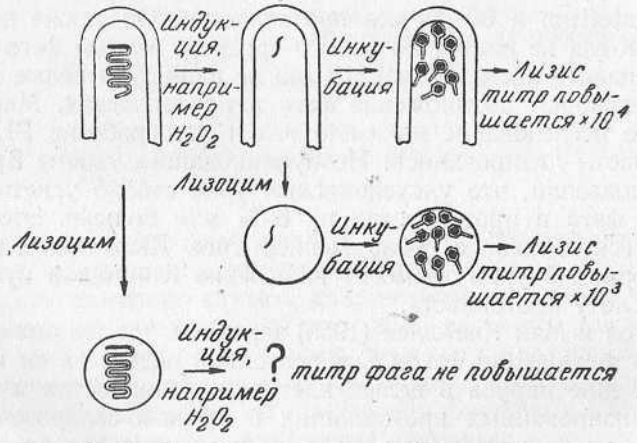


Рис. 6. Изображение общепринятой гипотезы относительно индукции лизогенного организма, включая превращение клеток в протопласты.

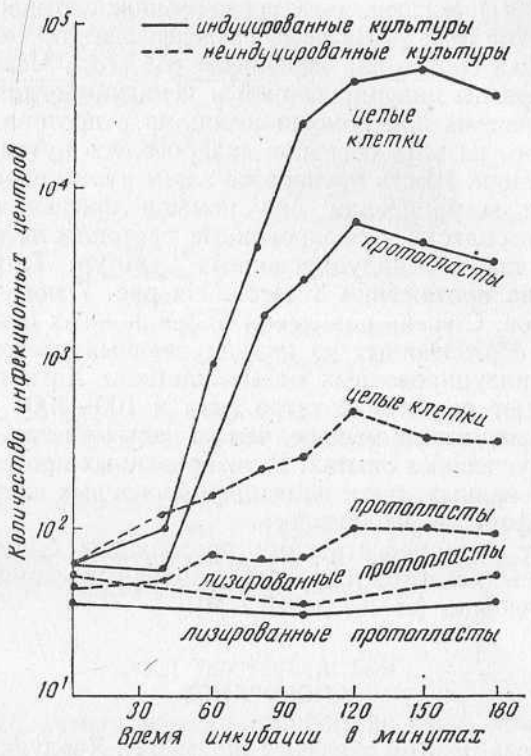


Рис. 7. Образование бактериофага лизогенным штаммом 899 (1) Bacillus megaterium с индукцией и без индукции 67 μ M—H_2O_2. Протопласты образовались через 15 минут после индукции (данные Мак Квайллена и Солтона, 1955).

Необходима подходящая среда как для создания условий лизогении в культуре, так и для создания условий «готовности»[1] для индукции клеток. Простая синтетическая среда была разработана Мак Квайлленом и Солтоном (1955) для лизогенного штамма 899 (1) Bacillus megaterium. В качестве индуцирующего агента была применена перекись водорода (конечная концентрация 67 μM). Были предприняты два варианта опытов: индуцирование до превращения клеток в протопласты и непосредственная индукция протопластов (см. рис. 6). Только первый вариант дал положительные результаты. Процедура опыта заключалась в следующем (Солтон и Мак Квайллен, 1955). Культура B. me-

[1] Aptitude буквально — «склонность» лизогенной клетки индуцироваться и дать начало фаговым частицам. *Ред.*

gaterium 899(1) в глюкозо-сахарозо-аминокислотной среде в логарифмической фазе роста была разделена на две части, одна из которых была обработана перекисью водорода. Через 15 минут аэрации образцы индуцированной и неиндуцированной культур были превращены при помощи лизоцима в протопласты. Половина каждого из этих образцов лизировалась путем разведения и встряхивания. Шесть препаратов затем культивировались при осторожном встряхивании при помощи вращения — целые клетки, протопласты и лизированные протопласты как индуцированных, так и неиндуцированных культур. Титр фага был определен на протяжении 3 часов. На рис. 7 показан один из таких опытов. Степень появления инфекционных центров в протопластах, образованных из индуцированных клеток, сходна с таковой в индуцированных целых клетках. Хотя протопласты обнаруживают повышение титра фага в 100—1000 раз, максимальный выход всегда меньше, чем из целых клеток — около $^1/_7$ в наиболее успешных опытах. В лизированных протопластах как из индуцированных, так и из неиндуцированных клеток повышения титра фага не наблюдалось.

Попытки индуцировать сами протопласты были неизменно отрицательны, несмотря на пробы с различными концентрациями перекиси водорода (от 167 до 16,7 М).

СПОРОГЕНЕЗ

Члены рода Bacillus образуют эндоспоры. Хердуик (Hardwick) и Фостер (Foster) (1952) показали, что при соответствующих условиях почти 100% вегетативных клеток превращается в споры. Кроме того, раз процесс достиг определенной стадии, клетки «побуждены» к спорогенезу и невозможно обратное направление процесса. Эти авторы встряхивали взвеси B. mycoides в дистиллированной воде и нашли, что хотя фаза быстрого появления спор наблюдалась между 10 и 12 часами, взвесь была необратимо «побуждена» к спорообразованию значительно раньше.

Солтон (1955) произвел сходные опыты со штаммами Bacillus megaterium. Он обнаружил широкие ежедневные колебания в степени споруляции, осуществляющейся в дистиллированной воде, но получил более постоянные результаты, если в качестве среды был взят раствор сахарозы (7,5%) в фосфатном буфере (0,033 М; pH 7,0), содержащий 0,01 М Mg^{++}. После $4^1/_2$-часового встряхивания клетки были побуждены к спорогенезу и часть взвеси была обработана лизоцимом; получившиеся в результате протопласты встряхивались в последующий период. Развились живые споры и их количество определялось путем высева на чашки с 5% пептонным / 0,1% крахмальным агаром. В типичном опыте количество жизнеспособных спор на 1 мл, полученное из целых клеток, составляло 10^7, из протопластов — 10^5 и из осмотически

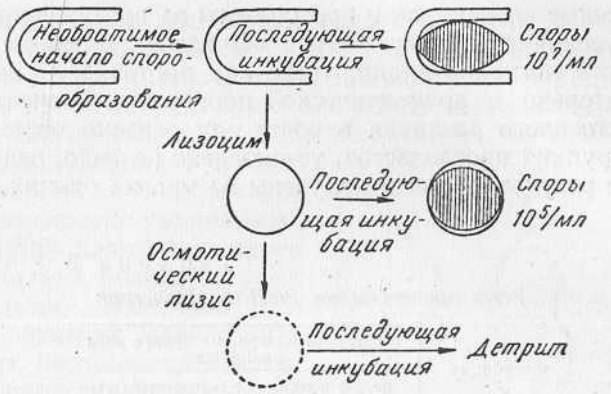


Рис. 8. Изображение спорогенеза Bacillus megaterium с включением превращения клеток в протопласты.

лизированных протопластов — 10^1. Образование спор было подтверждено обнаружением в фазово-контрастном микроскопе телец с высокой светопреломляемостью внутри оболочек протопластов. Рис. 8 изображает течение процесса.

РОСТ ПРОТОПЛАСТОВ

Насколько автору известно, никем не было показано, что бактериальные протопласты образуют колонии. Наиболее приближается к этому только что упоминавшаяся работа Солтона со спорами. В предшествующей работе Вейбулл привлек внимание к вероятному тождеству L-форм и протопластов, а Клинебергер-Нобл в беседе также отметила эту возможность. Недавно было найдено, что протопласты Bacillus megaterium могут повышаться заметно в размере, оптической мутности и сухом весе в процессе культивирования в подходящей среде (Мак Квайллен, 1955в). Были поставлены параллельные опыты над целыми клетками и протопластами, взвешенными в 250 мл глюкозо-сахарозо-пептонной среды во флаконах Ру, снабженных отверстием для воздуха и осторожно вращавшихся в термостате при 28°. Через определенные промежутки времени отбирали пробы, которые обрабатывали формальдегидом и центрифугировали. Осадок хорошо промывали дистиллированной водой и высушивали до постоянного веса. Пептон может быть заменен смесью аминокислот, но неизвестно, будет ли достаточна глюкозо-сахарозо-аммонийно-солевая среда, поддерживающая рост целых клеток. В табл. 6 показаны результаты типичного опыта, проведенного в присутствии пептона. Контрольные взвеси протопластов, которые культивировали без аэрации, не выявили изменений в весе.

Как целые клетки, так и протопласты на протяжении первых 2 часов увеличились в весе больше чем вдвое, но первые продолжали расти логарифмически, тогда как протопласты нарастали приблизительно в арифметической прогрессии. Зависит ли это от существенного различия в росте или обязано постепенному лизису хрупких протопластов, установлено не было, однако аналогичные результаты были получены во многих опытах.

Таблица 6

Рост протопластов Bacillus megaterium

Время инкубации	Плотность взвеси, мг сухого веса на 100 мл	
	целые клетки	протопласты
0	10,4	8,2
2	23,4	17,2
4	52,4	24,8

Взвеси целых клеток и протопластов культивировали с аэрацией в глюкозо-сахарозо-пептонной среде. Пробы обрабатывали формалином, отмывали и высушивали до постоянного веса (данные Мак Квайллена, 1955в).

В этих опытах протопласты обычно приготовляли путем обработки лизоцимом в сахарозной среде и затем центрифугировали; осадок промывали дважды в сахарозной среде до взвешивания в среде культивирования. Несмотря на тщательную стандартизацию условий, некоторые партии протопластов очень трудно суспендируются, и когда это случается, они обычно нестабильны и быстро лизируются. В последние недели до доклада была испытана другая защитная среда. Вместо сахарозы (7,5—10%) был применен фосфатный буфер (0,5 М; pH 7,0). Образование протопластов на этой среде идет медленнее, однако нестабильных препаратов получалось меньше и фосфат в качестве стабилизатора может иметь преимущество перед сахарозой. При применении протопластов, приготовленных, центрифугированных, отмытых и культивированных в среде, содержащей 0,5 М фосфат, было получено нарастание их размера, оптической плотности и сухого веса, такое же, какое было установлено в сахарозной среде.

ДЕЛЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ

Некоторые из только что приведенных исследований роста протопластов были продлены на много часов, в результате чего были открыты новые свойства протопластов. Во время всех ис-

следований автора, касавшихся этих субклеточных форм, как правило, производились повторные просмотры экспериментального материала в фазово-контрастном микроскопе. Таким путем возможно проследить за лизисом и изменениями в размере или внешнем виде протопластов. Было установлено, что через 4—6 часов культивирования в присутствии глюкозы и аминокислот среди значительно увеличенных протопластов появлялось много таких, которые больше не были шаровидными. Известная разница в размерах свежеприготовленных протопластов обычно обнаруживается, но все они более или менее шаровидны. Новые формы имели небольшие выпячивания (протуберанцы). При продолжении культивирования этот тип начинал преобладать и узелки казались более крупными, пока не появлялись в конце концов симметричные гантелеобразные формы. Очень редко на одном протопласте было видно больше одной «почки». Препараты не изменялись во внешности после обработки формальдегидом, и было сделано много фазово-контрастных микрофотографий и электронных микрографий, иллюстрирующих различные формы. Некоторые характерные рисунки даны в табл. 1 и 2, а рис. 9 показывает схематически, как должна выглядеть последовательность развития.

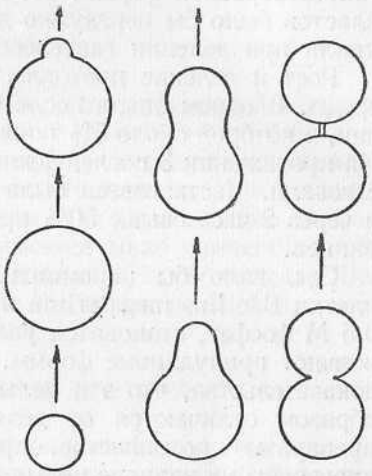


Рис. 9. Изображение вероятной последовательности роста и деления протопластов Bacillus megaterium при непрерывном культивировании на подходящей среде.

Появление гантелеобразных форм и даже «теней» соответствующей формы не оставляет сомнений, что у протопластов может происходить деление. В настоящее время еще не установлено, разделяются или нет в конечном счете эти гантели на две отдельные единицы. Это происходит главным образом потому, что а) до сих пор не было подсчитано общее количество протопластов и в отдельных случаях это могло бы быть неубедительно благодаря сопутствующему лизису некоторой части протопластов, б) еще невозможно наблюдать непрерывно отдельный протопласт во время его роста. Активный аэробный обмен веществ является предпосылкой для большинства свойств протопластов, и никто до сих пор не добился успеха в культивировании их на плотных средах. Можно надеяться, что будет изобретена небольшая камера, в которой эти образования могли бы быть прослежены непрерывно, будучи иммобилизованными в вязкой среде.

Примером случайного доказательства, указывающего, что деление протопластов может завершиться их отделением, является то, что после 8—10 часов культивирования появляются протопласты и их «тени», меньшие по размерам наблюдавшихся в ранней стадии и составляющие примерно по размеру половину гантелеобразной формы. Но в виду колебаний размеров протопластов было бы неразумно делать отсюда вывод, что они возникли при делении гантелеобразных форм.

Рост и деление протопластов требуют наличия питательной среды. В одном опыте после 6 часов протопласты достигли стадии, в которой около 5% показали ранние признаки почкования. На протяжении 3 последующих часов заметные изменения отсутствовали. Часть взвеси была затем перенесена в свежую среду и через 2 часа свыше 50% протопластов дали развитие протуберанцев.

Следовало бы напомнить, что нормальные палочковидные клетки Bacillus megaterium при росте в этой среде, содержащей 0,5 М фосфат, становятся раздутыми и искаженными и обнаруживают причудливые формы. Однако имеются неопровержимые доказательства, что эти целые бактериальные формы коренным образом отличаются от делящихся протопластов. Во-первых, препараты протопластов, примененные в этих опытах, были проверены на наличие целых палочковидных клеток, оставшихся после обработки лизоцимом. Содержание таковых было менее чем 0,1%; все остальные были типичными шаровидными протопластами. Во-вторых, сухой вес этих протопластов повышался больше чем вдвое в течение первых немногих часов культивирования, а позже до 50% видимых структур оказались делящимися протопластами. В-третьих, в то время как целые клетки выявили широкое разнообразие форм, включая большое количество искаженных, делящиеся протопласты были почти без исключений правильны и симметричны. В-четвертых, поперечная стенка между сегментами обычно различима в разбухших целых клетках, но не в протопластах. Наконец, целые клетки устойчивы к разбавлению среды, в то время как делящиеся протопласты, подобно единичным протопластам, крайне чувствительны к осмотическому потрясению. Больше того, были обнаружены оболочки протопластов или «тени» в форме гантелей.

Хотя у протопластов не была доказана способность образования нового вещества клеточных стенок и хотя в делящихся формах отсутствовало прямое указание на наличие поперечной оболочки, имеются некоторые указания на то, что цитоплазма может не образовывать непрерывной плазмодесмы между двумя половинами гантелей. Соединяющий мостик часто меньше задерживает электронный поток, чем два шара, которые в некоторых случаях резко разграничены друг от друга, что делает вероятным наличие ограничивающей оболочки вокруг каждого из них. Дальше, в одном случае был обнаружен частичный лизис

гантели, давший в результате структуру, состоявшую из одного плотного шаровидного протопласта, соединенного мостиком с круглой «тенью». Несомненно, недолго еще осталось ждать, пока кто-нибудь окончательно покажет, что может иметь место полное отделение протопластов.

ПОДВИЖНОСТЬ

Большинство из свойств целых живых бактерий присуще также протопластам, хотя во многих случаях ранние исследования дали отрицательные результаты. Это положение сохраняется еще в отношении выявления подвижности протопластов. Насколько автору известно, в этом направлении не было сделано сколько-нибудь значительных усилий и имеется мало сомнений в том, что жгутики остаются прикрепленными к протопластам (Вейбулл, 1953; Виам и др., 1955; Мак Квайллен, не опубликовано).

СВОЙСТВА ЛИЗИРОВАННЫХ ПРОТОПЛАСТОВ

Если взвесь протопластов энергично встряхивается или если осмотическое давление среды понижается путем разбавления, возникает лизис и вытекают растворимые компоненты и ДНК. «Тени», которые, вероятно, состоят из оболочек протопластов, и липидные зерна, так же как другой детрит, могут быть видны в фазово-контрастном микроскопе. Дыхание таких лизатов уменьшается или приостанавливается соответственно исследованному виду организма (Вейбулл, 1953; Виам и др., 1955). Многие опыты (Мак Квайллен, 1955а, б; Солтон и Мак Квайллен, 1955; Солтон, 1955; Солтон, неопубликовано) показали, что осмотический лизис ведет к прекращению способности включать ^{14}C в белки и нуклеиновые кислоты, образовывать адаптивные энзимы и споры и поддерживать размножение бактериофага.

Мак Квайллен (неопубликовано) доказал, однако, что если лизис осуществляется встряхиванием в стабилизирующей среде (10% сахароза), получается препарат, содержащий очень мало целых протопластов, но сохраняющий способность воспроизведения широкого ряда синтезов аминокислот и включения этих аминокислот в белок. Пока еще эти опыты находятся в предварительной стадии, но представляется вероятным, что оболочка протопластов может быть местом синтеза белка. Если это так, то это могло быть сопоставлено с открытием Гейла и Фолкса (1955а), что у стафилококков таким местом является фракция клеточной оболочки (которая может содержать также оболочку протопластов). Может иметь значение, что как Гейл и Фолкс, так и Мак Квайллен обнаружили активность в препаратах, приготовленных

в 10% сахарозе, но очень мало активности или отсутствие таковой без стабилизатора. Это может означать, что в процесс включаются доступные осмотическому потрясению органеллы, возможно, аналогично микросомам, которые в настоящее время считаются ассоциирующимися с оболочечным веществом в животных клетках и принимающими участие в синтезе белка.

ОБСУЖДЕНИЕ

Целые бактерии и протопласты, происходящие из них, имеют крайне сходные свойства. Те и другие дышат; те и другие синтезируют белки и нуклеиновые кислоты и формируют адаптивные энзимы; те и другие могут поддерживать размножение вирулентных и слабовирулентных бактериофагов; те и другие растут на подходящих средах; те и другие могут делиться. Больше того, многие из этих активностей осуществляются в приблизительно одинаковой степени и сходно обеими формами — целым и частью. И все же часть — не целое; имеется разница в поведении. В какой степени некоторые из этих различий обязаны использованию неподходящих условий, еще неизвестно.

Перечислим различия в свойствах целых клеток и протопластов Bacillus megaterium и позволим себе высказать некоторые соображения по этому поводу.

(а) Протопласты, не имея клеточной стенки, по-видимому, не содержат диаминопимелиновой кислоты, известной составной части стенки целой Bacillus megaterium, и не была выявлена их способность строить стенку. Целые клетки могут присоединять ^{14}C из глюкозы, из ацетата или из аспарагиновой кислоты в диаминопимелиновую кислоту белковой фракции. Это не имеет места у протопластов. Включение должно происходить в вещество новых клеточных стенок и возможно, что оно образуется в протопластах, но выделяется или распадается вследствие неспособности сложить клеточную стенку как законченную структуру. Почему это так происходит — неизвестно. Если отбросить как маловероятную возможность, что протопласты неспособны синтезировать некоторые простые составные части клеточной стенки, такие, как ацетилглюкозамин или диаминопимелиновая кислота, остается еще вероятность, что «пусковой прибор» или «ключ» вещества клеточной стенки должен иметься задолго до того, как оно может быть построено, подобно тому как энзимфосфорилаза нуждается в короткоцепочечном декстрине, прежде чем он может построить еще единицы глюкозы. Для проверки подобной гипотезы было бы полезно остановить действие лизоцима до того, как растворение клеточной стенки будет полным, и определить, насколько далеко может зайти процесс, прежде чем будет утрачена способность строить новую стенку. Также стоило бы одновременно пытаться вызвать синтез путем прибавления

осколков и кусочков вроде частично разрушенного вещества клеточных стенок. Другая возможность заключается в том, что синтез клеточной стенки — внепротоплазматическая активность, причем необходимые энзимы и т. п. должны быть освобождены или переварены действием лизоцима. Если это так, то непохоже, что аппарат, синтезирующий клеточную стенку, находится в клеточной стенке, вроде той, которая была изолирована Солтоном (см. доклад на этом симпозиуме), так как его анализ обнаруживает отсутствие типичного белка, разве что энзимы небелкового происхождения. Наконец, всегда имеется возможность, что протопласты после своего формирования несут на себе некоторое количество лизоцима, который разрушает вещество новой клеточной стенки, как только оно формируется.

(б) Протопласты не могут быть заражены вирулентным бактериофагом. Поскольку клеточная стенка является существенным участником первичного взаимодействия — это понятно. Но так как ни клеточная стенка бактерии, ни белковая оболочка фага не необходимы для последующего развития зрелого вируса, возникает вопрос, можно ли добиться, чтобы ДНК фага проникла в обнаженный протопласт? Является ли неизбежной функция микрошприца, выполняемая отростком фага? Бреннер (личное сообщение) предпринял несколько безуспешных попыток воспроизвести подобное проникновение[1]. Солтон (личное сообщение) предполагал, что искусственная стенка может быть построена на протопласте серией реакций антиген-антитело, заканчивающихся построением вещества клеточной стенки. Возможно также, что на некоторых стадиях оболочка протопласта может стать поддающейся внедрению ДНК фага, например во время деления или при условии слияния протопластов, которое, как утверждал Штехелин (1954), может происходить.

Невозможность индуцировать перекисью водорода непосредственно протопласты лизогенных бактерий может не стоять в связи с отсутствием клеточной стенки. Были выполнены только немногие опыты и кажется более правдоподобным, что не были подобраны условия, подходящие для индукции.

(в) Хотя бактерии, которые были побуждены к спорообразованию, могут быть превращены в протопласты, продолжающие образовывать эндоспоры (хотя только в 1% к выходу у целых клеток), не было доказано, что протопласты сами могут быть индуцированы к спорообразованию. Биохимический процесс, ведущий к образованию спор целыми бациллами, малопонятен и вполне возможно, что вещество клеточных стенок отделяется или изменяется в период, когда клетка приступает к образова-

---

[1] Малер и Фразер (Mahler, Fraser) недавно опубликовали работу (Bioch. et Bioph. Acta, 1956, 22, 197), в которой утверждают, что им удалось доказать на примере протопластов E. coli возможность инфицирования фагом после растворения клеточной стенки (лизоцим + «версен»). *Ред.*

нию споры. Пока не будет известно больше, последующие рассуждения скорее были бы спекулятивны.

(г) Что касается подвижности, автору представляется, что если сами жгутики не поражаются каким-то образом лизоцимом, будет возможно обнаружить подвижные протопласты[1].

Механизм клеточного деления

Байссет (Bisset, 1951) цитирует одного выдающегося американского цитогенетика, говоря в связи с бактериальной цитологией, что существуют две стадии в прогрессе научной проблемы: первая, в которой открытия совершенно неправдоподобны, и вторая, в которой они очевидны. Наблюдение, что протопласты могут несомненно делиться при отсутствии клеточной стенки, было неожиданно, но в конце концов оно согласуется с общепринятыми теориями механизма клеточного деления. Процесс обычно описывается как имеющий три стадии: деление цитоплазмы путем роста поперечной плазматической оболочки, образование поперечной стенки и, наконец, отделение сестринских клеток. Если процессы, наблюдающиеся во время деления протопласта, воспроизводятся целыми бациллами, перетяжка цитоплазмы на две отдельных единицы является потенциальной возможностью протопласта независимо от образования поперечной стенки.

Неясно почему, когда протопласты возникают при обработке Bacillus megaterium лизоцимом, у них не наблюдается формы деления — все они шарообразны. Это может быть потому, что стабильные протопласты лучше образуются из культур в стационарной фазе роста, когда клеточное деление более или менее приостанавливается. Если окажется возможным работать с протопластами активно делящихся клеток, можно будет обнаружить гантелеобразные формы. Другой вопрос, который было бы интересно исследовать, — это распределение ядерного материала в делящихся протопластах.

ИТОГ

Протопласты, образующиеся при растворении клеточной стенки Bacillus megaterium, способны синтезировать белки, нуклеиновые кислоты и энзимы, включая адаптивные энзимы; они могут поддерживать размножение вирулентных и умеренных бактериофагов и допускают развитие эндоспор. Они могут также расти и делиться.

[1] См. на стр. 44 этой книги вполне логичное предположение Стокера, что отсутствие подвижности протопластов при сохранении ими жгутиков может быть объяснено отсутствием точки опоры для жгутиков в виде твердой клеточной стенки. *Ред.*

ЛИТЕРАТУРА

Beljanski M. (1954). L'action de la ribonucléase et de la desoxyribonucléase sur l'incorporation de glycocolle radioactif dans les protéines de lysats de Micrococcus lysodeikticus. Biochim. biophys. Acta, *15*, 425.

Bisset K. A (1951). The morphology and cytology of bacteria. Annu. Rev. Microbiol. *5*, 1.

Booth V. H. & Green D. E. (1938). A wet-crushing mill for micro-organisms. Biochem. J. *32*, 855.

Brenner S. & Stent G. S. (1955). Bacteriophage growth in protoplasts of Bacillus megaterium. Biochim. biophys. Acta, *17*, 473.

Creaser E. H. (1955a). The induced (adaptive) biosynthesis of β-galaktosidase in Staphylococcus aureus J. gen. Microbiol. *12*, 288.

Creaser E. H. (1955б). Inhibition of induced enzyme formation by purine analogues. Nature, Lond., *175*, 899.

Gale E. F. & Folkes J. P. (1953). The assimilation of amino acids by bacteria. 18. The incorporation of glutamic acid into the protein fraction of Staphylococcus aureus. Biochem. J. *55*, 721.

Gale E. F. & Folkes J. P. (1954). Effect of nucleic acids on protein synthesis and amino-acid incorporation in disrupted staphylococcal cells. Nature, Lond., *173*, 1223.

Gale E. F. & Folkes J. P. (1955a). The assimilation of amino acids by bacteria. 20. The incorporation of labelled amino acids by disrupted staphylococcal cells. Biochem. J. *59*, 661.

Gale E. F. & Folkes J. P. (1955б). The assimilation of amino acids by bacteria. 21. The effects of nucleic acids on the development of certain enzymic activities in disrupted staphylococcal cells. Biochem. J. *59*, 675.

Hardwick W. A. & Foster J. W. (1952). On the nature of sporogenesis in some aerobic bacteria. J. gen. Physiol. *35*, 907.

Hugo W. B. (1954). The preparation of cell-free anzymes from micro-organisms. Bact. Rev. *18*, 87.

Lederberg J. (1950). The beta-D-galactosidase of Escherichia coli, strain K-12. J. Bact. *60*, 381.

Lester R. L. (1953). In vitro incorporation of leucine into the proteins of Micrococcus lysodeicticus. J. Amer. chem. Soc. *75*, 5448.

Lwoff A. (1953). Lysogeny. Bact. Rev. *17*, 269.

McQuillen K. (1950). The bacterial surface. II. Effect of uranyl chloride on the electrophoretic mobility of bacteria. Biochim. biophys. Acta, *6*, 66.

McQuillen K. (1955a). Bacterial Protoplasts. I. Protein and nucleic acid metabolism of protoplasts of Bacillus megaterium. Biochim. biophys. Acta, *17*, 382.

McQuillen K. (1955б). Protein, nucleic acid and adaptive enzyme synthesis in protoplasts of Bacillus megaterium. J. gen. Microbiol. *13*, iv.

McQuillen K. (1955в). Bacterial protoplast: Growth and division of protoplast of Bacillus megaterium. Biochim. biophys. Acta, *18*, 458.

McQuillen K. & Roberts R. B. (1954). The utilisation of acetate for synthesis in Escherichia coli. J. biol. Chem. *207*, 81.

McQuillen K. & Salton M. R. J. (1955). Synthetic media for maintenance and induction of lysogenic Bacillus megaterium. Biochim. biophys. Acta, *16*, 596.

Roberts R. B., Abelson P. H., Cowie D. B., Bolton E. T. & Britten R. J. (1955). Studies of Biosynthesis in Escherichia coli. Carnegie Institution of Washington Publication no. 607. Washington, D. C., U. S. A.

Salton M. R. J. (1953). Studies on the bacterial cell-wall. IV. The composition of the cell-walls of some Gram-positive and Gram-negative bacteria. Biochim. biophys. Acta, *10*, 512.

Salton M. R. J. (1955). The formation of spores in protoplasts of Bacillus megaterium. J. gen. Microbiol. *13*, iv.

Salton M. R. J. & McQuillen K. (1955). Bacterial protoplasts. II. Bacteriophage multiplication in sensitive and lysogenic strains of Bacillus megaterium. Biochim. biophys. Acta, *17*, 465.
Stähelin von H. (1954). Über osmotisches Verhalten und Fusion nackter Protoplasten von Bac. Anthracis. Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. *17*, 296.
Weibull C. (1953). The isolation of protoplasts from Bacillus megaterium by controlled treatment with lysozyme. J. Bact. *66*, 688
Wiame J. M., Storck R. & Vanderwinckel E. (1955). Biosynthése induite d'arabokinase dans les protoplastes de Bacillus subtilis. Biochim. biophys. Acta, *18*, 353.

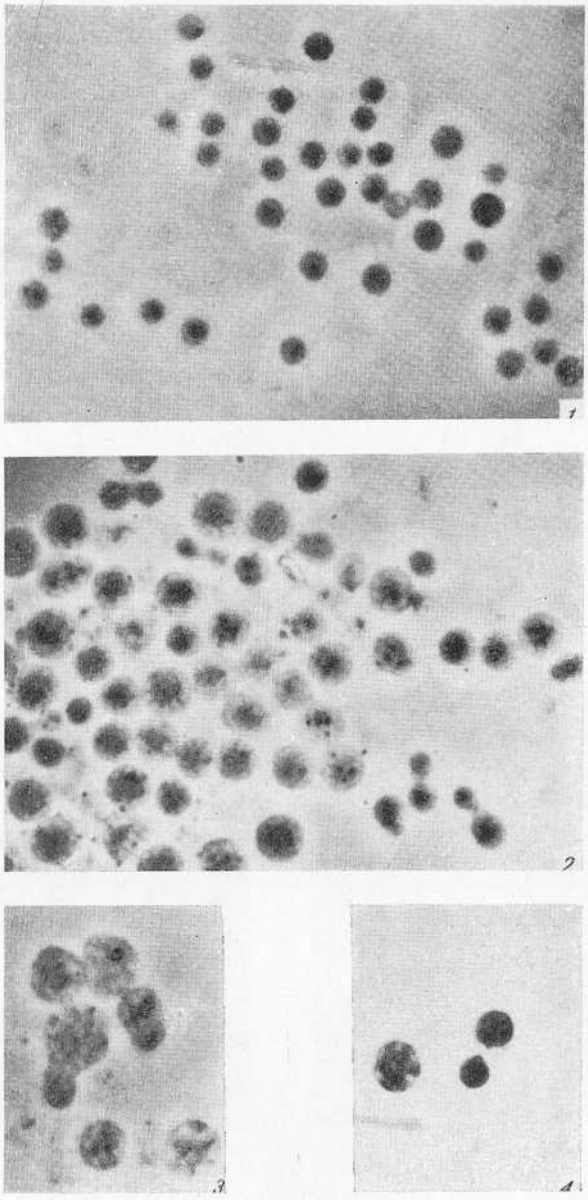


Таблица 1. Фазовоконтрастные фотомикрографии протопластов Bacillus megaterium (увеличение в 1450 раз) (воспроизведено из Biochimica et Biophysica Acta).

1. Протопласты в начале опыта.
2, *3* и *4*. Протопласты через 8—9 часов культивирования.

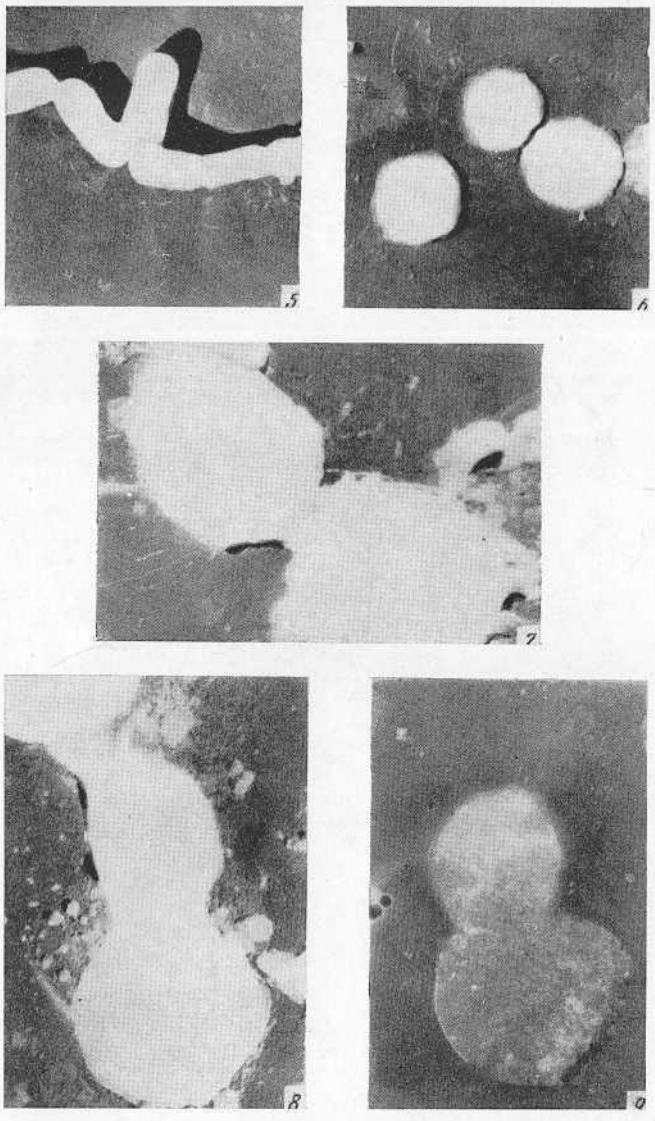


Таблица 2. Электронные микрографии Bacillus megaterium и протопластов, происшедших из них (фиксация в формальдегиде; увеличение в 8000 раз) (воспроизведено из Biochimica et Biophysica Acta).

5. Целые клетки в начале опыта.
6. Протопласты в начале опыта.
7, *8*. Делящиеся протопласты через 9 часов культивирования.
9. «Тени» делящихся протопластов (9-часовое культивирование).

ОСМОТИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ И СТРОЕНИЕ БАКТЕРИЙ

П. МИТЧЕЛЛ и ДЖЕННИФЕР МОЙЛ

Отделение биохимии Кембриджского университета

Анатомическая целостность живой клетки, отличающая последнюю от большинства безжизненных объектов, обусловлена обменом веществ между внутренним содержимым клетки и внешней средой. Молекулы питательных веществ проходят внутрь через поверхность клетки, конечные продукты метаболизма выходят из клетки, вещество цитоплазмы задерживается в ней и многие вещества внешней среды выключаются из обмена. Основным содержанием данного доклада является рассмотрение происхождения сил, ответственных за отграничение клетки от внешней среды, с учетом большинства веществ, и за специфическую связь клетки с внешней средой, выражающихся в поглощении молекул питательных материалов и удалении молекул продуктов обмена. Будут рассмотрены также некоторые из осмотических факторов, участвующих в растяжении и изменении формы цитоплазмы и клеточной оболочки в процессе роста и деления клеток.

Были выдвинуты два различных взгляда относительно локализации осмотических сил бактерий. Форма бактерий, как и форма растительных клеток, может зависеть преимущественно от структурной упругости клеточной стенки, тогда как осмотические взаимоотношения между протоплазмой и внешней средой могут определяться плазматической мембраной, плотно прилегающей с внутренней стороны к клеточной стенке. Клеточная стенка становится тем самым основным местопребыванием механических сил, возникающих из осмотических связей клетки с ее окружением. С другой стороны, протоплазма может обладать достаточной упругостью для того, чтобы играть роль в создании формы клетки, и движение растворов между протоплазмой и внешней средой может регулироваться не только клеточной оболочкой, но и адсорбцией протоплазматическим гелем. Механические силы, сопровождающие осмотические связи клетки с ее окружением,

могут, следовательно, быть порождены, хотя бы частично, механической упругостью протоплазматического геля. Статическая анатомия клетки может быть одна и та же в обоих случаях, но функционально обе альтернативы глубоко разнятся и могут быть отличены только при изучении механических и осмотических свойств целой клетки и составляющих ее частей.

На Первом симпозиуме Общества общей микробиологии Митчелл (1949) описал функциональную единицу, влияющую на осмотическое разграничение клеточного содержимого и внешнего окружения бактерии, под названием «осмотического барьера». Поскольку существование такого барьера для растворов низкого молекулярного веса недавно подвергалось серьезному сомнению в случае кишечной палочки и некоторых других организмов [Робертс, Эбелсон, Кови, Болтон и Бриттен (Roberts, Abelson, Cowie, Bolton, Britten), 1955], необходимо будет рассмотреть доказательства существования осмотического барьера у бактерий, прежде чем пытаться определить его анатомическое местонахождение.

ОСМОТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПОКОЯЩИХСЯ КЛЕТКАХ

Факты в пользу существования осмотического барьера у бактерий

В общем бактерии не очень требовательны к среде, в которой они способны оставаться живыми. Они часто выносят пребывание в дистиллированной воде или в крепких солевых или неэлектролитических растворах, растворенные вещества которых могут варьировать в чрезвычайно широких пределах. Однако устойчивость к внешней среде определяется в глубокой степени «возрастом» клеток, иначе говоря, тем, в какой период они были сняты с питательной среды. Чем быстрее была степень роста в тот момент, когда культуру смывали с поверхности среды, тем более хрупкими оказываются клетки [см. Уинслоу и Уокер (Winslow, Walker), 1939]. Bacterium coli, например, остается живой в дистиллированной воде при смывании в стационарной фазе роста, но если ее внести в дистиллированную воду в логарифмической (экспоненциальной) фазе, клетки быстро подвергаются плазмоптизу, лишаются внутреннего, способного диффундировать содержимого [Митчелл и Мойл (Mitchell, Moyle), 1954, и неопубликованные наблюдения] и утрачивают жизнеспособность [Херши (Hershey), 1939]. Различная осмотическая хрупкость клеток разного возраста может быть обязана разнице внутреннего осмотического давления, разнице силы растяжения клетки как целого или разнице в активности автолитических систем. Необходимо рассмотреть, какова причина так называемого осмотического давления бактериальной клетки и каким образом клетка как целое сопротивляется тенденции к набуханию в среде с низким осмотическим давлением.

Причины внутреннего «осмотического давления» и набухания: осмотический барьер против протоплазматического геля

Много лет назад Жак Леб (Loeb, 1922) сравнивал осмотическое давление раствора желатины с гелированными частицами желатины одинаковой весовой концентрации и нашел, что осмотическое давление последних было ничтожно в сравнении с первым. Это было объяснено тем, что осмотическое давление гелеобразных частиц уравновешивается механическим давлением, обусловленным сцеплением геля. Конечно, мы не должны игнорировать вероятность того, что сцепление протоплазмы может играть роль в предотвращении набухания бактерий в среде с низким осмотическим давлением, особенно потому, что известно, что другие одноклеточные организмы, такие, как амебы, имеют поверхностный гель, придающий клетке упругость. В самом деле, факт, что бактерия сжимается в среде с высоким содержанием растворенных веществ и разбухает в дистиллированной воде, не является доказательством существования истинной осмотической системы, так как гелеобразные частицы могут вести себя аналогично тому, как Хермен и Китийякара (Harman, Kitiyakara, 1955) указали в случае мышечных митохондрий. Если разбухание и сжатие обязаны истинному осмотическому давлению, воздействующему на полупроницаемую мембрану, они будут зависеть от проницаемости мембраны для раствора, применяемого для определения осмотического давления внешней среды. Только такие растворенные вещества, которые не проникают через мембрану, должны быть эффективными в предотвращении истинного осмотического набухания. Конечно, если кто-либо захочет вывести заключение о внутреннем осмотическом давлении и проницаемости нормальных клеток, существенно, что применяемые растворенные вещества не должны разрушать осмотический барьер или влиять значительно на его проницаемость.

В конце прошлого столетия Альфред Фишер (Fischer) открыл, что в то время как многие грамотрицательные организмы могут быть плазмолизированы в солевых растворах или в сахарозе, они не подвергаются плазмолизу при воздействии таких же концентраций глицерина, мочевины, хлоралгидрата и других веществ низкого молекулярного веса или с высокой растворимостью в липидах (см. Фишер, 1903). Это составляет блестящее доказательство существования плазматической мембраны, проницаемой для глицерина и т. п., но не проницаемой для сахарозы или растворов электролитов, свободно проходящих через относительно проницаемую твердую клеточную стенку. Мнение, что плазматическая мембрана у многих грамотрицательных бактерий действует как основной осмотический барьер, подкрепляется наблюдением, что плазмолиз предотвращается или прекращается, если обработать клетки реагентами, которые могут нарушить полупроницаемость липидной мембраны, подобно предложен-

ным Овертоном (Overton, 1899), например метиловым или этиловым спиртом, хлороформом, фенолом, уксусной кислотой [Эйзенберг (Eisenberg), 1910] или метиленовой синью [Валь (Vahle), 1910]. Предельная концентрация внешнего раствора, потребного для плазмолиза, указывает, что эффективное внутреннее осмотическое давление грамнегативных бактерий составляет 2—3 атмосферы в старых клетках. По Найзи (Knaysi, 1951), внутреннее осмотическое давление Bacterium coli во время быстрого роста нарастает и достигает 15 атмосфер. Но не следует забывать факт, что предел плазмолиза может зависеть от сцепления плазматической мембраны с клеточной стенкой так же, как от внутреннего осмотического давления протопласта (см. ниже).

Во время плазмолиза грамотрицательных бактерий клеточная стенка не спадается вместе с протопластом и, следовательно, несомненно, что клеточная стенка обладает структурной твердостью и должна играть роль в определении формы нормальной клетки [Фишер, 1903; Эллис (Ellis), 1903; Свелленгребель (Swellengrebel), 1909; Эйзенберг, 1910; Валь, 1910; Райхель (Raichel), 1928] — факт, впоследствии подтвержденный электронно-микроскопическими наблюдениями, обзор которых дает Солтон (Salton) на данном симпозиуме. Тем не менее, поскольку осмотическое давление влияет на плазматическую мембрану плазмолизирующейся клетки, но не на клеточную стенку, невозможно из разрушения протопласта делать вывод, что плазматическая мембрана или протоплазма не оказывает сопротивления осмотическому напряжению и что они не обусловливают в какой-то мере твердость клетки. Применительно к Spirillum volutans имеются основания считать, что цитоплазма не обладает высокой вязкостью, характерной для геля, так как Кинг и Бимс (King, Beams, 1942) обнаружили, что после центрифугирования при 400 000 G в течение 10—20 минут внутриклеточные зерна, которые были смещены к краю клетки, вновь распределяются в содержимом клетки в течение 30—60 минут. Но относительно физического состояния протоплазмы бактерий не имеется других измерений, кроме тех, которые определяются в условиях, могущих вызвать разрушение протоплазматического геля. Опыты Вамошера (Wamoscher, 1930) с рассечением бактерий, в которых наблюдалось вытекание протоплазмы из разорванной клетки в виде ряда капель, и способы разрушения, при которых «фракции частиц» могли быть отделены от «растворимых» компонентов [Даусон (Dawson), 1949; Митчелл и Мойл, 1951; Вейбулл (Weibull), 1953а], не в состоянии убедить в том, что протоплазма бактерий в нормальном состоянии имеет жидкую консистенцию.

Факт, что грамположительные организмы, как правило, не могут быть плазмолизированы даже в крепких растворах сахарозы, считался доказательством того, что грамположительная группа бактерий обладает относительно проницаемой оболочкой [Фи-

шер, 1903; Брэдни (Brudny), 1908; Эйзенберг, 1910; Баумгертель (Baumgartel), 1924] и что осмотическая функция делится более или менее ровно между плазматической оболочкой и клеточной стенкой (Фишер, 1903). «Плазмолиз» некоторых видов бацилл возможен [Найзи, 1930; Робинау и Мюррей (Robinow, Murray), 1953] в очень крепких растворах солей (например, 25% NaCl), но сомнительно, обусловлен ли «плазмолиз» в подобных исследованиях только сокращением протоплазмы или состояние дегидратации, обязанное высокой концентрации раствора, может не играть роль при разрыве нормальной связи между клеточной стенкой и поверхностью протопласта и отделении клеточной стенки от протопласта. Эффект последнего типа, который напоминает осмотический плазмолиз только внешне, может быть получен при действии на клетки паров эфира (Робинау и Мюррей, 1953). Вообще грамположительные бактерии равномерно сокращаются в среде с высоким осмотическим давлением. B. megaterium, например, сжимается приблизительно на 14—25% при перемещении из нормального бульона в бульон, содержащий 2 M NaCl [Датки (Dutky), 1933], в то время как Staphylococcus aureus, приближающийся к стационарной фазе роста, сжимается до 6—9% по объему (непроницаемый для фосфата объем) или до 2—3% линейно, будучи перенесен из 0,1 в 1,0 M NaCl (Митчелл и Мойл, 1955а). Таким образом, клеточная стенка некоторых бактерий эластична — факт, установленный непосредственно при микропрепарировании (Вамошер, 1930).

Причиной отсутствия плазмолиза у большинства грамположительных организмов может быть, как предполагает Фишер (1903), их проницаемость для растворов низкого молекулярного веса, применяемых для повышения осмотического давления среды. Если это действительно так, сжатие, наблюдаемое вместо плазмолиза, может быть равноценным синерезису протоплазмы, обязанному снижению водной активности. Однако, несмотря на то, что у молодых клеток Staphylococcus aureus, Micrococcus lysodeicticus, Sarcina lutea и Bacillus megaterium можно обнаружить при фазово-контрастной микроскопии сокращение при перемещении из 0,1 M NaCl в 1,0 M NaCl, содержащий 1,2 M сахарозу, они не сокращаются при перенесении из 0,1 M NaCl в 1,0 M NaCl, содержащий 1,2 M глицерин, — указание на то, что они обладают осмотическим барьером, проницаемым для глицерина, но не для сахарозы (Митчелл и Мойл, 1955а). Осмотические свойства этих грамположительных организмов, следовательно, аналогичны таковым грамотрицательной группы, за исключением того, что плазматическая мембрана у первых не отделяется от клеточной стенки. Отделению плазматической мембраны от клеточной стенки у грамположительных бактерий, возможно, препятствует очень высокое внутреннее осмотическое давление или сильное сцепление между плазматической мембраной и клеточной стенкой. В последнем случае протоплазма ис-

пытывала бы отрицательное давление, в то время как вещество клеточной стенки было бы под давлением при помещении клетки в гипертонический раствор. Это было показано на примере крупной серобактерии Beggiatoa mirabilis, так как клеточная стенка этого организма выгибается, если осмотическое давление внешней среды превышает определенную величину. Кроме того, если клетку обработать реактивом, нарушающим сцепление между протопластом и клеточной стенкой, последняя отделяется от протопласта [Рулэнд и Гофманн (Ruhland, Hoffmann), 1926]. Достойно внимания, что когда грамотрицательные бактерии подвергаются плазмолизу, плазматическая оболочка приобретает вогнутую поверхность относительно клеточной стенки, как будто она отталкивается от последней, что указывает на наличие сцепления между плазматической мембраной и клеточной стенкой (Фишер, 1903; Еллис, 1903; Свелленгребель, 1909; Райхель, 1928). Несомненно, сцепление плазматической мембраны с клеточной стенкой может значительно варьировать у различных организмов и у некоторых организмов оно может играть роль в предотвращении плазмолиза или в ограничении порога плазмолиза.

Наблюдения над плазмолизом и разбуханием бактерий дают блестящее доказательство в пользу существования осмотического барьера, легко проницаемого для глицерина, но относительно непроницаемого для сахарозы и некоторых электролитов. Однако на вопрос о значении роли, которую играет связывание растворенных веществ малого молекулярного веса составными частями протоплазмы, имеющими большой молекулярный вес, и сцепление последних друг с другом в сопротивлении осмотическому давлению, можно ответить лишь количественными измерениями проницаемости и осмотического давления.

Способность клетки удерживать внутренние растворенные вещества

Лишь относительно недавно было найдено, что бактерии содержат высокие концентрации «свободных» внутренних растворенных веществ низкого молекулярного веса, которые могут быть извлечены при помощи обработки холодной трихлоруксусной кислотой, детергентами, органическими растворителями или при нагревании. Эта концепция получила значительное подтверждение в наблюдениях Гэла (Gale) о накоплении бактериями «свободных» аминокислот. В недавнем обзоре на эту тему Гэл (1953) указал, что имеется мало оснований для того, чтобы считать, что аминокислоты могут свободно диффундировать внутрь осмотического барьера. Больше того, Робертс с сотрудниками представили доводы против существования осмотического барьера для растворенных веществ низкого молекулярного веса у Bacterium coli и Staphylococcus aureus. Р. Робертс и И. Робертс (1950) наблюдали, что взвеси Bacterium coli в физиологическом

растворе, содержащем неорганический фосфат, меченный ^{32}P, быстро осуществляют обмен фосфата со средой — обмен, ограничивающийся так называемой свободной внутренней неорганической фосфатной фракцией клеток, экстрагированной холодной трихлоруксусной кислотой. Они предлагают, что внутренний «неорганический фосфат» был лабильным адсорбционным комплексом или соединением, остающимся в постоянном количестве, так как число адсорбционных участков остается постоянным, но что каждый участок может быстро осуществлять обмен одного фосфата на другой, давая толчок процессу «обменной адсорбции», наблюдаемой с помощью фосфата, меченного ^{32}P, во взвеси. Было также представлено доказательство того, что поверхность B. coli проницаема для некоторых неорганических катионов (Кови, Р. Робертс и И. Робертс, 1949; Р. Робертс, И. Робертс и Кови, 1949) и для сахарофосфатов [Робертс и Волф (Wolffe), 1952] и что поверхность Staphylococcus aureus проницаема для глютаминовой кислоты (Бриттен, 1951, 1952). Можно отсюда предположить, что многие из внутренних «свободных» растворенных веществ могут нормально находиться в бактериях в виде адсорбционных комплексов или лабильных соединений. Соответственно этой концепции мы должны были бы рассматривать протоплазму как гель, внутри которого адсорбированы все «свободные» растворенные вещества, или как раствор веществ высокого молекулярного веса (белки, нуклеиновые кислоты и т. д.), которые адсорбируют «свободные» внутренние растворенные вещества. В первом случае протоплазматический гель может частично сопротивляться непосредственно осмотическому давлению, в то время как во втором случае жидкая протоплазма должна была бы удерживаться только при помощи оболочки, проницаемой для растворенных веществ низкого молекулярного веса, но непроницаемой для адсорбирующих их веществ с высоким молекулярным весом.

Вычисление внутреннего осмотического давления

Общий вес внутренних растворенных веществ, экстрагированных на холоду трихлоруксусной кислотой, соответствует примерно 18% сухого веса клеток Staphylococcus aureus (Митчелл, 1953) и около 6% сухого веса клеток Bacterium coli (Митчелл и Мойл, 1955б) в том случае, если исследованию подвергался урожай клеток, снятый в период, непосредственно предшествующий стационарной фазе роста. Протоплазматическая вода насчитывает соответственно (см. ниже) до 1,5 и 2,4 мл/г, и внутренние растворы, следовательно, дают примерно 12% (w/v) раствор для стафилококка и 2,5% раствор для кишечной палочки. Если средний вес частиц внутренних растворенных веществ равен приблизительно 100, внутреннее осмотическое давление должно доходить до 20—30 атмосфер у стафилококка и до 5—6 атмосфер у

кишечной палочки при условии, что растворенные вещества могут проникать самостоятельно в воду, находящуюся внутри. Если, напротив, внутренние растворенные вещества связаны с высокомолекулярными компонентами, их осмотическое давление должно быть значительно снижено. Количество в 2—3 атмосферы, даваемое для измерения внутреннего осмотического давления кишечной палочки при изучении предела плазмолиза, показывает, что значительная часть внутренних растворенных веществ может

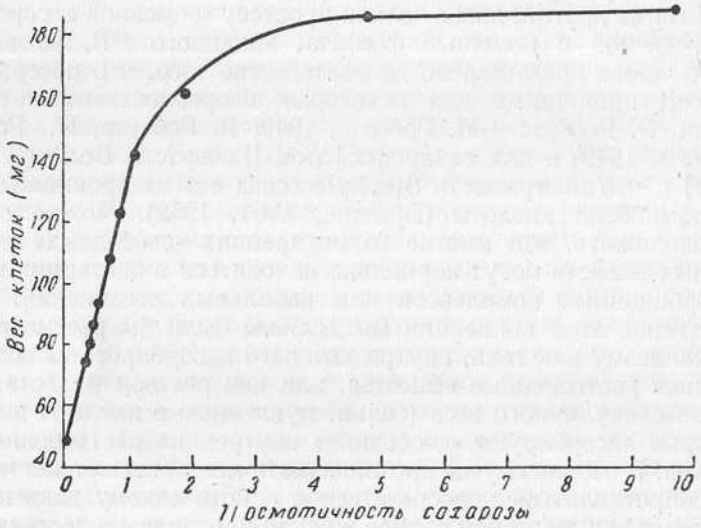


Рис. 1. Данные равновесия давления пара у Staphylococcus aureus (штамм Дункан) после уравновешивания клеток против сахарозы в течение 5 часов при температуре 20°.

свободно диффундировать в протоплазму. Для стафилококка, неспособного к плазмолизу, был применен для измерения активного осмотического давления новый равновесный метод измерения давления пара (Митчелл и Мойл, 1955а). Была приготовлена очень густая взвесь в дистиллированной воде S. aureus (штамм Дункан), снятого с агара в период, предшествующий стационарной фазе. Равные порции этой взвеси были быстро нанесены на тонкие куски политена, покрыты часовыми стеклами и взвешены. Затем они были уравновешены до постоянного веса в небольших эксикаторах против раствора сахарозы определенной молярности в вакууме при 20°. Равновесие было достигнуто в течение 5 часов при помещении кусочков политена мазками вниз насколько возможно плотно на поверхность растворов сахарозы. Результаты этих опытов показаны на рис. 1; эквивалентность полярности каждого раствора сахарозы наносили против веса клеток, уравновешенных с растворами. Сухой вес клеток при

давлении пара, равном нулю, был получен путем уравновешивания мазков против P_2O_5. Должно быть понятно, что этот тип эксперимента аналогичен эксперименту с осмотическим равновесием, в котором набухание (поглощение воды) клеток наносится против эквивалентности осмотического давления среды, в которой помещена взвесь; сообщение между клетками и средой осуществлялось через фазу пара вместо прямого контакта. Для концентраций сахарозы, превышающих молярные (эквивалентность ниже 1), вес воды, удерживаемой клетками, варьирует линейно соответственно молярности сахарозы, но для низких концентраций вес воды, удерживаемой клетками, быстро достигает предела. Перерыв при 1 М растворе сахарозы соответствует точке, при которой внутренняя связь гидростатического давления клеток начинает сопротивляться дальнейшей отдаче воды. В данном опыте эта точка равна поглощению 1,9 мл воды на 1 г сухого веса клеток, что достаточно хорошо соответствует величине 1,5—1,6, полученной при прямом определении проницаемости (Митчелл, 1953). Поскольку поглощение воды для концентраций сахарозы, превышающих 1 М, точно подчиняется закону Ван-Хоффа (осмотическое давление × объем воды = const), возможно, что эта вода свободно смешана с внутренними растворенными веществами. Во всяком случае, если клетки содержат нормальное количество воды, растворенные вещества клеток вызывают снижение давления пара, соответствующее снижению, вызванному приблизительно 1 М сахарозой, и осмотическому давлению до 20—25 атмосфер. Поэтому мало сомнений в том, что значительная часть внутренних растворенных веществ должна быть свободной для того, чтобы диффундировать внутрь осмотического барьера.

Механическое сопротивление внутреннему осмотическому давлению

Давление до 20 атмосфер кажется на первый взгляд очень большим для того, чтобы клеточная структура могла его выдержать. Осмотическое давление такой величины было дано для Achromobacter harveyi [Джонсон и Харвей (Johnson, Harvey), 1937; Джонсон, Зворыкин (Zworykin) и Уоррен (Warren), 1943], но этот морской организм разрывается без разбухания при помещении в дистиллированную воду. Мы можем легко подсчитать, что для сферической клетки диаметром 0,7 μ (средний размер упомянутого выше стафилококка) давление в 20 атмосфер соответствует натяжению до 300 дин/см клеточной поверхности, что почти в 4 раза превышает поверхностное натяжение воды. Для длинного палочковидного организма, имеющего поперечный диаметр, равный 0,7 μ, осевое давление будет одинаковым с давлением на поверхность сферического организма, но давление под прямым углом к оси будет вдвое большим. Следовательно,

поверхностное натяжение клетки пропорционально ее линейным размерам при одном и том же внутреннем давлении. Позже мы покажем, что сопротивление этому очень значительному давлению оказывает клеточная стенка. В среде с низким осмотическим давлением плазмоптиз возникает тогда, когда эластичность клеточной стенки недостаточна для того, чтобы выдержать давление. Мы можем ожидать, что в общем небольшие сферические организмы в состоянии противостоять более высоким внутренним осмотическим давлениям, чем крупные, и что сферические организмы в состоянии противостоять более высоким внутренним давлениям, чем цилиндрические равного радиуса. Мы можем также рассчитывать, что клеточная стенка цилиндрических бактерий предназначается для поддержания анизотропного давления.

ИСКЛЮЧЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Целые клетки. Техника густой взвеси

Большинство достоверных методов определения наличия у бактерий осмотического барьера основано на определении доступности воды внутри клетки для прибавленных к внешней среде растворенных веществ. Это может быть без труда получено путем использования чрезмерно густой взвеси клеток, добавления к взвеси определенного по весу растворенного вещества в малом количестве воды, центрифугирования и определения концентрации растворенного вещества в надосадочной жидкости. Зная вес прибавленного растворенного вещества и общий объем использованной взвеси, можно по конечной концентрации растворенного вещества в среде вычислить объем воды, доступной растворенному веществу, и по разнице — действительный объем клеток. Этот метод (Митчелл, 1953) дает истинный непроницаемый для фосфата клеточный объем в 2,42 $\pm$ 0,05 мл/г сухого веса для Staphylococcus aureus (штамм Дункан), взвешенного в 0,1 M NaCl, причем этот объем не уменьшается значительно в течение 30 минут при 25°. Поскольку мы знаем, что специфический объем клеточного содержимого находится между 0,7 и 1,0, то, следовательно, должен быть значительный объем воды, недоступной прибавленному к внешней среде фосфату, а именно около 1,5 мл/г сухого веса клеток. Ион фосфата при pH 7 колеблется между одним и двумя отрицательными зарядами, и большинство клеточного содержимого несет также отрицательный заряд. Возможно поэтому, что недоступность для иона фосфата обязана электрическому отталкиванию, а не осмотическому барьеру. Однако, если ион фосфата не пропускается осмотическим барьером, реагенты, способные разрушить барьер, должны были бы сделать внутреннюю клеточную воду доступной для него. После обра-

ботки 5% (w/v) бутиловым спиртом или трихлоруксусной кислотой внутреннее пространство клеток, не доступное неорганическому фосфату, снижается и достигает только 0,76 ± 0,07 мл/г сухого веса клеток. В то время как трихлоруксусная кислота может сделать внутреннее пространство клеток доступным вследствие нейтрализации электрического заряда между внутренностью клетки и ионом фосфата, бутиловый спирт так не действует. Таким образом, остается мало сомнений в том, что внутреннее водное пространство обязано осмотическому барьеру, непроницаемому для иона фосфата. Средний объем осадка целых клеток при центрифугировании в этих опытах был 3,61 ± 0,01 мл/г сухого веса клеток. Из них 2,42 ± 0,05 мл/г сухого веса клеток представлены непроницаемым для фосфата объемом клеток, оставляя объем промежуточного пространства в 33% объема клеточного осадка. Это промежуточное пространство лишь на 7% больше, чем промежуточное пространство замкнутых шаров (26%), и отсюда мы можем заключить, что наружная поверхность осмотического барьера S. aureus близка к внешней поверхности клеток. Возможно, что добавочные 7% промежуточного пространства, соответствующие 0,25 мл/г воды сухого веса, представлены водой, удерживающейся в порах клеточной стенки. Это находится в соответствии с измерениями клеточного объема, непроницаемого для декстрана, имеющего средний молекулярный вес 10 000 и не проникающего через клеточную стенку (Митчелл и Мойл, 1955а). Непроницаемый для декстрана объем на 8% больше, чем объем, непроницаемый для фосфата, давая внешнее водное пространство в 0,18 мл/г сухого веса.

Поскольку Бриттен (1951-2) утверждал, что Staphylococcus aureus свободно проницаем для глютаминовой кислоты, на основании измерений при помощи густой взвеси, технически сходных с методом, описанным Митчеллом (1953), но, применяя радиоактивную глютаминовую кислоту и основываясь только на счетчике Гейгера для ее вычисления, было важно определить проницаемость S. aureus к некоторым другим растворенным веществам, чтобы выяснить, не представляет ли фосфат в данном случае исключение.

Измерения были проведены с глютаминовой кислотой, глютамином, хлористым натрием, серноцианистым натрием и декстраном (Митчелл и Мойл, 1955а). Непроницаемый для фосфата объем клеток измерялся одновременно с объемами, непроницаемыми для каждого из этих растворенных веществ, как контроль вариабильности размера клеток, установленной для различных культур. Определения количеств аминокислот производили при pH 7 в 0,1 M NaCl. Глютаминовую кислоту и глютамин определяли манометрически при помощи декарбоксилазного метода (Гэл, 1945); глицин определяли путем окисления нингидрином, отгонкой образовавшегося формальдегида и колориметрическим подсчетом при помощи 4,5-дигидрокси-2,7-нафтален-дисульфано-

вой кислоты[1] [Александер, Ландвер и Зелигман (Alexander, Landwehr, Seligman), 1945]; хлориды и тиоцианат подсчитывали объемным способом, прибавляя избыток азотнокислого серебра и обратным титрованием тиоцианатом в разведенной азотной кислоте, применяя железо-аммиачную соль серной кислоты в качестве индикатора.

Таблица 1

Объемы Oj, непроницаемые для аминокислот и фосфата Staphylococcus aureus (штамм Дункан)

Аминокислота в среде (приблизительная концентрация)	Время и температура уравновешивания	Отношение непроницаемого объема на 1 г сухого веса клеток	Отношение непроницаемого объема фосфата на 1 г сухого веса клеток	Отношение сухого веса клеток в миллиграммах на 1 мл взвеси	Отношение μм аминокислот, исчезающих из внешнего фосфатного объема, к 1 г сухого веса клеток
Глютаминовая кислота (0,02 М)	5 минут при 25°	2,25	2,34	203	1,7
Глютамин (0,02 М)	То же	2,01			
Глютаминовая кислота (0,02 М)	5 минут при 2°	1,93			0,4
То же	30 » » 25°	1,87		242	0,8
Глютамин (0,02 М)	5 » » 2°	1,55			6,4
То же	30 » » 25°	1,51	1,91		7,2
Глютаминовая кислота (0,04 М)	5 » » 2°	1,87			1,5
То же	30 » » 25°	1,89		230	0,7
Глютамин (0,04 М)	5 » » 2°	1,76			5,1
То же	30 » » 25°	1,72			6,2
Глицин (0,02 М)	5 » » 2°	1,60			8,9(23,4)[1]
То же	30 » » 25°	—2,38	2,17	235	29,3(29,6)[1]
Глицин (0,04 М)	5 » » 2°	1,86			10,6(41,3)[1]
То же	30 » » 25°	—0,25			45,7(51,1)[1]

[1] Показатели после разрушения осмотического барьера 5% (w/v) бутиловым спиртом.

Табл. 1 показывает величины непроницаемых объемов для глютаминовой кислоты, глютамина и глицина двух различных партий клеток. Установлено, что ни глютаминовая кислота, ни глютамин не проникают через осмотический барьер в значительной степени в течение 30 минут при 25°, но в то время как глютаминовая кислота ведет себя почти точно так, как неорганический фосфат, до 5—7 μМ глютамина исчезает из внешнего фосфатного пространства в течение 5 минут (время, потребное для центрифугирования) при 2°. Поскольку количество исчезающего глютамина приблизительно одинаковое, независимо от того, равна ли внешняя концентрация 0,02 или 0,04 М и количество

[1] В оригинале — chromotropic acid. *Ред.*

возрастает очень мало в течение 5 или 30 минут при 25°, можно допустить, что этот глютамин адсорбирован на клеточной стенке или на поверхности осмотического барьера. Эти результаты кажутся стоящими в прямом противоречии с полученными Бриттеном (1951—2). Однако «пространство клеточной воды», с которым, по мнению Бриттена, уравновешивается глютаминовая кислота внешней среды, может быть проще объяснено межфазовой средой в центрифугированном клеточном осадке, которую он не принял в расчет (Бриттен, 1955).

Величина непроницаемого для глицина объема та же, что и для глютамина при 2°, но при 25° она быстро становится отрицательной. Это означает, что количество глицина, исчезающего из среды, больше, чем может быть подсчитано путем полного равномерного распределения во всем веществе клеток. Клетки поэтому как будто занимают отрицательный объем. Это показывает, что глицин или включается в обмен веществ, или адсорбируется. При прибавлении бутана до содержания 5%, потребного для разрушения осмотического барьера клеток, из среды извлекается количество глицина, близкое к количеству, извлекаемому целыми клетками в течение 30 минут при 25°, даже если взвесь выдерживать при 2° (см. величины в скобках в табл. 1). Результаты указывают, что при 2° клетки непроницаемы для глицина, но что до 10 μM глицина адсорбируется вне осмотического барьера. Если клетки обработаны бутаном или если температура поднята до 25°, глицин, по-видимому, проходит через осмотический барьер. Поскольку клеточное содержимое должно занимать до 0,9 мл/г сухого веса клеток, общее количество глицина, исчезающего при разрушении бутиловым спиртом осмотического барьера, при 2° составляет 15 и 24 μM/г сухого веса при конечной концентрации глицина соответственно 8 и 18 μM. Непохоже, что этот глицин вступает в обмен веществ при 2° в присутствии 5% бутилового спирта и, следовательно, надо думать, что он адсорбируется до проникновения внутрь и частично внутри клетки. Это находится в соответствии с наблюдениями Гэля о спонтанном включении радиоактивного глицина этими организмами (Гэл, 1953). Для того чтобы пролить больше света на относительную степень проникновения глицина при 2° и при 25°, было произведено измерение непроницаемого для глицина объема в динамике при начальной концентрации глицина в 0,04 М (рис. 2). При 2° глицин не проникает значительно в течение 2 часов, а при 25° примерно через 30 минут возникает полуравновесие. Факт, что проникновение глицина имеет высокий температурный коэффициент, позволяет предположить участие в этом процессе специфического транспортирующего механизма.

Объем, непроницаемый для хлоридов и тиоцианата, нанесен на рис. 3 против времени, при 2° с фосфатом, взятым для сравнения. Хлорид и тиоцианат были взяты в виде натриевых солей

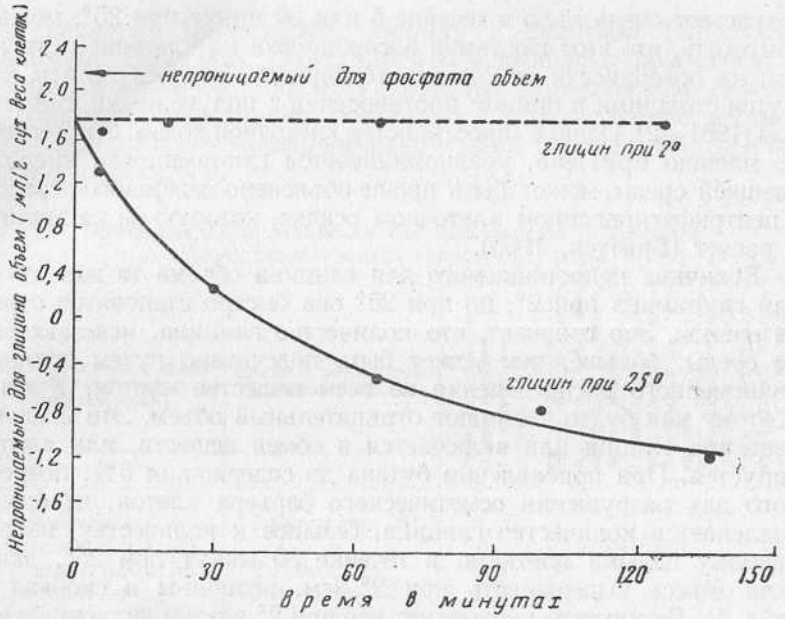


Рис. 2. Динамика изменения непроницаемого для глицина объема Staphylococcus aureus (штамм Дункан) при температуре 2 и 25°.

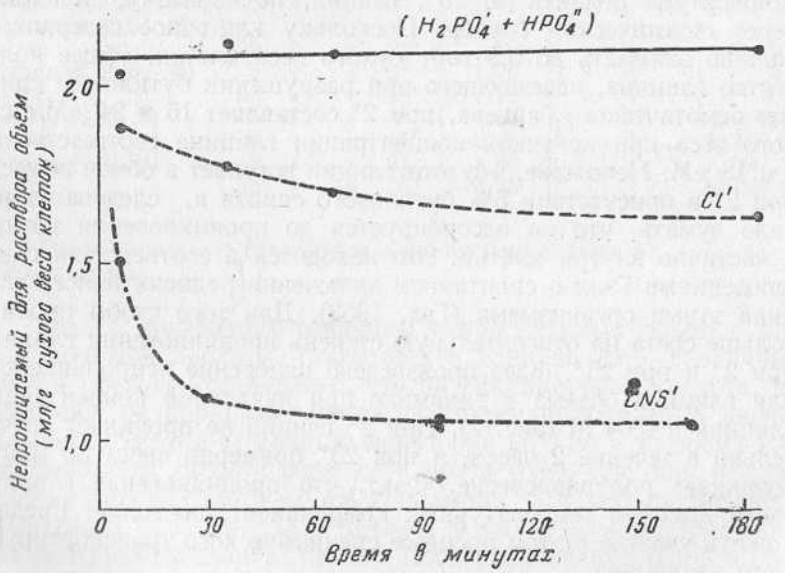


Рис. 3. Динамика изменений непроницаемого для фосфата, хлорида и тиоцианата объема Staphylococcus aureus (штамм Дункан) при температуре 2°.

в начальной концентрации 0,1М; pH взвеси был равен 7,2. Очевидно, что Staphylococcus aureus до некоторой степени проницаем для хлористого натрия и в большой степени проницаем для тиоцианата натрия. Ион тиоцианата в данной концентрации не нарушает осмотический барьер, так как было найдено, что даже 1 М NaCNS не является причиной проникновения фосфата через осмотический барьер. Так как анион и катион, вероятно, проникают внутрь независимо один от другого, эти данные указывают, что Na^+ легко проникает, в то время как легкость проникновения для анионов может быть расположена в порядке $CNS' > Cl' > (H_2PO'_4 + HPO''_4)$.

Непроницаемый для фосфата объем был сравнен с непроницаемым объемом для декстрана, выделяемого Leuconostoc среднего молекулярного веса 10 000, в нормальных клетках и в клетках, обработанных 5% бутиловым спиртом для разрушения осмотического барьера; декстран вычислялся реакцией с антроном[1] (Митчелл и Мойл, 1955а). Непроницаемый объем для фосфата и декстрана у нормальных клеток был равен соответственно 2,21 и 2,39 мл/г сухого веса, тогда как после обработки бутиловым спиртом они равнялись 0,78 и 2,15 мл/г сухого веса клеток. Таким образом, осмотическим барьером для фосфата служит плазматическая оболочка, в то время как осмотическим барьером для декстрана является клеточная стенка.

Наблюдения над проникновением солей и аминокислот в Staphylococcus aureus устанавливают два основных факта: осмотический барьер, непроницаемый для некоторых растворенных веществ низкого молекулярного веса, находится близко от клеточной поверхности; несмотря на то, что этот барьер может быть достаточен для того, чтобы задержать определенные растворенные вещества внутри клетки (например, глицин при 2°), растворенные вещества могут дополнительно быть связаны содержимым клетки как внутри, так на поверхности или сверх того — поверхностью осмотического барьера.

Используя метод густой взвеси, Вейбулл (1955) показал, что Bacillus megaterium в общем сходен со стафилококком в строении и свойствах проницаемости. B. megaterium непроницаем для фосфата, сахарозы и дифосфопиридина нуклеотида; осмотические барьеры для этих веществ помещаются, вероятно, скорее в плазматической оболочке, чем в клеточной стенке.

Опыты Робертса и др. (1955) над проницаемостью поверхности Bacterium coli для неорганического фосфата, сульфата, сахарофосфатов, аминокислот и неорганических катионов с применением метода радиоактивных изотопов привели их к взгляду, что «протоплазма может быть уподоблена губке, клеточная оболочка — окружающей волосяной сетке, неспособной задержать вхождение или выхождение мелких молекул». С точки зрения

[1] Антрон (anthrone) = 9,10-дигидро-9-антрацен. *Ред.*

наших наблюдений над Staphylococcus aureus кажется, что эти два организма могут глубоко различаться по своим строениям, общим свойствам проницаемости и по характеру извлечения растворенных веществ из питательной среды. Проницаемость для фосфата того же штамма Bacterium coli (американский штамм B), выросшего в той же неорганической глюкозо-солевой среде, которая была применена Робертсом и его группой, была поэтому определена при помощи того же описанного выше метода (Митчелл, 1953) с той разницей, что клетки смывали и суспендировали в 1% хлористом натрии вместо дистиллированной воды. Большое количество опытов определили непроницаемый для фосфата объем в пределах между 3,34 и 3,09 мл/г сухого веса клеток и фазовый объем, составляющий около 22%. Можно не сомневаться, что плазматическая оболочка непроницаема для неорганического фосфата. Микроскопические наблюдения над взвесью, сделанные при обычном контроле нормальной морфологии клеток, показали, что размер клеток подвергался видимым изменениям при изменении концентрации солей в среде. При увеличении концентрации NaCl с 1 до 2% у клеток было обнаружено небольшое, но определенное сокращение, но при концентрации, превышающей 2%, очень быстро возник плазмолиз. Отсюда непроницаемый для фосфата объем был определен при различных концентрациях соли. Результаты приведены в табл. 2.

Для того чтобы увидеть более ясно взаимоотношение между внешним осмотическим давлением и непроницаемым для фосфата объемом, концентрация хлористого натрия была приведена к эквивалентному показателю осмотичности сахарозы [учитывая данные Робинсона и Синклера (Robinson, Sinclair, 1934) о равновесии давления пара] и непроницаемый для фосфата объем был нанесен на таблицу относительно эквивалентной осмотичности на рис. 4. Очевидно, что ниже порога плазмолиза протопласт подчиняется закону Вант-Гоффа и что выше порога гидростатическое давление, проявляемое клеточной стенкой, начинает оказывать сопротивление дальнейшему набуханию протопласта. Это означает, что плазматическая оболочка и протоплазма оказывают мало или совсем не оказывают сопротивления поглощению воды внутренними растворенными веществами в плазмолизированной клетке и что клеточная стенка в нормальном состоянии ответственна за осуществление гидростатического давления, соответствующего разнице осмотического давления между

Таблица 2

Непроницаемый для фосфата объем Bacterium coli (штамм B) в различных концентрациях NaCl при 25°

%(w/v) NaCl	Непроницаемый объем фосфата (мл/г сухого веса клеток)
1,0	3,09
1,4	2,88
2,2	2,40
3,3	2,08
4,7	1,85
8,8	1,62

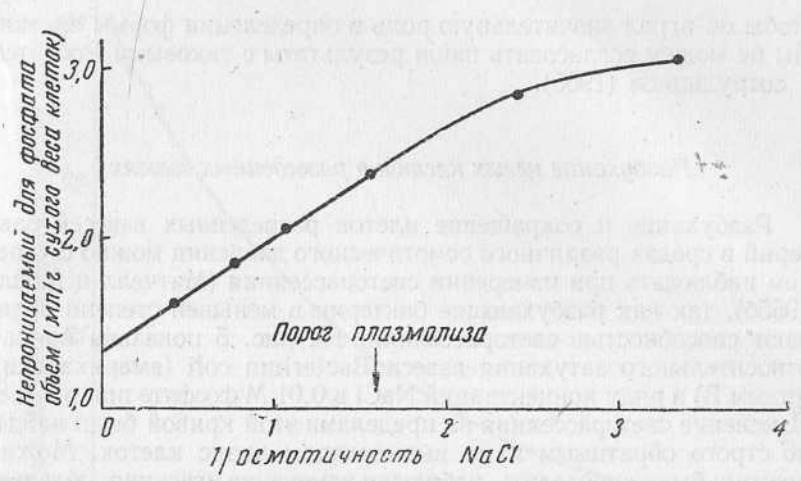


Рис. 4. Зависимость непроницаемого для фосфата объема Bacterium coli (американский штамм B) от концентрации NaCl в среде.

средами внутри и снаружи плазматической мембраны. Если показатель внешнего напряжения повышается от 0 до 1,0, непроницаемый для фосфата объем также повышается от 1,33 до 2,03, или при 0,7 мл/г сухого веса клеток. В 1% растворе соли, следовательно, в котором непроницаемый для фосфата объем равен 3,09, эквивалентное внутреннее напряжение должно быть равным $0,7/1,06 = 0,66$, тогда как внешнее напряжение равно 0,30. Таким образом, в 1% растворе соли клеточная стенка должна оказывать гидростатическое давление $0,36 \times 22,4 = 8,1$ атмосферы на плазматическую мембрану. Факт, что точка пересечения на вертикальной оси на рис. 4 находится на уровне объема в 1,33 мл/г сухого веса клеток, в то время как нельзя рассчитывать, что объем, занимаемый клеточным содержимым, может превышать 0,9 мл/г, означает, что вода, составляющая 31% клеточного объема, не доступна свободно внутренним растворенным веществам или внешнему фосфату, или наоборот, что эта вода доступна хлориду, но не фосфату. Эта вода могла быть связана с содержимым протоплазмы и удерживаться внутри осмотического барьера или внутри клеточной стенки. Трудно избежать вывода, что B. coli имеет осмотический барьер, который относительно непроницаем для натриевых солей фосфорной кислоты и для хлористого натрия, и, больше того, что этот осмотический барьер представлен плазматической оболочкой. Протоплазма и плазматическая оболочка могут мало влиять или совсем не влиять на механическую резистентность к сокращению до объема в 1,33 мл/г сухого веса клеток. Если существует гелированное пространство протоплазмы, этот гель не может, следовательно, создавать большую сопротивляемость протопласта и поэтому непохоже,

чтобы он играл значительную роль в определении формы клетки. Мы не можем согласовать наши результаты с таковыми Робертса и сотрудников (1955).

Разбухание целых клеток в разведенных взвесях

Разбухание и сокращение клеток разведенных взвесей бактерий в средах различного осмотического давления можно с успехом наблюдать при измерении светорассеяния (Митчелл и Мойл, 1955б), так как разбухающие бактерии в меньшей степени обладают способностью светорассеяния. На рис. 5 показана кривая относительного затухания взвеси Bacterium coli (американский штамм B) в ряду концентраций NaCl в 0,01 M фосфате при pH 6,8. Изменение светорассеяния за пределами этой кривой было найдено строго обратимым и не вызывающим лизис клеток. Можно поэтому было определить, наблюдая изменение угасания, обладает ли B. coli проницаемостью к данному растворенному веществу в концентрации, соответствующей 0,2 M NaCl (осмотическое давление, соответствующее 0,36 M) в 0,01 M фосфате, так как если вещество проникло, клетки разбухают и угасание достигает относительной величины, наблюдаемой в 0,01 M фосфате. Рис. 6 показывает изменение светорассеяния при проникновении эритри-

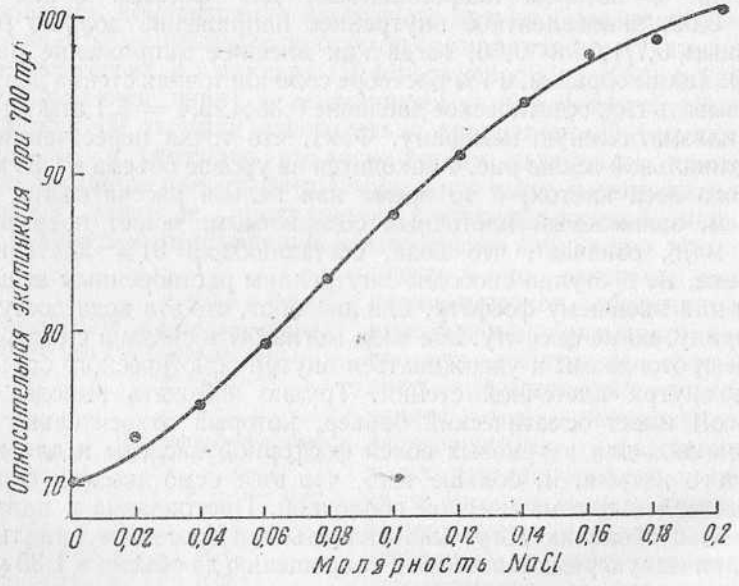


Рис. 5. Зависимость экстинкции взвеси Bacterium coli (американский штамм B) при 700 $m\mu$ от концентрации NaCl в среде. Среда содержит также 0,01 M фосфат при pH 6,8.

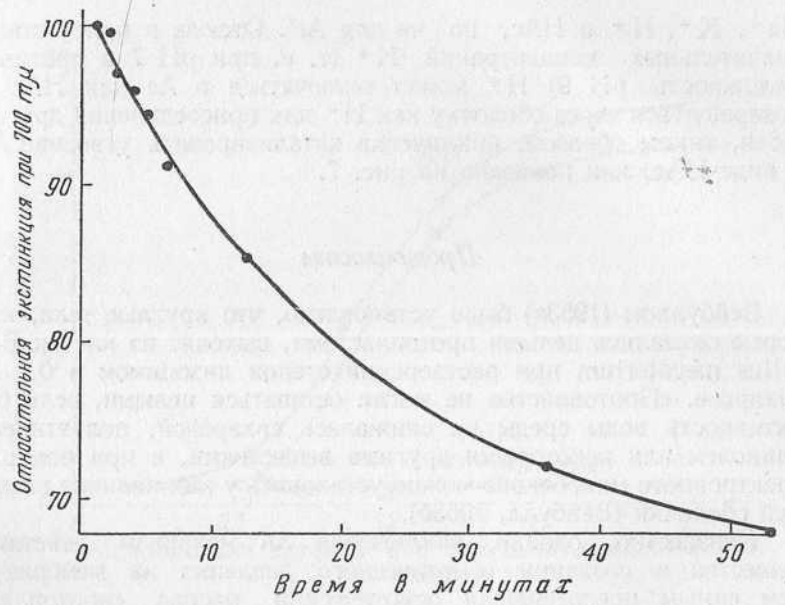


Рис. 6. Динамика проникновения эритрита в Bacterium coli (американский штамм B) при температуре 20°, измеряемая изменениями экстинкции при 700 *mμ*. Клетки взвешены в 0,36 молярном эритрите, содержащем 0,01 М фосфат при pH 6,8.

та при 20°. Этим методом было установлено, что следующие соли не проникают в определяемых количествах в течение одного часа при 20°: NaCl, KCl, NH_4Cl, $MgCl_2$, NaBr, NaCNS, KCNS, NH_4CNS, Na_2SO_4, ($Na_2HPO_4 + NaH_2PO_4$), уксуснокислый натрий (pH 9), уксуснокислый калий (pH 9).

Глицерин достигает равновесия против осмотического барьера в течение 3 минут, эритрит — приблизительно за час; как видно из рис. 6 и лактоза не проникает в значительном количестве за час. В некоторых взвесях уксуснокислый натрий и калий при нейтрализации до pH 7 при помощи уксусной кислоты способен быстро проникать в клетку. Это может быть объяснено тем, что плазматическая оболочка проницаема для

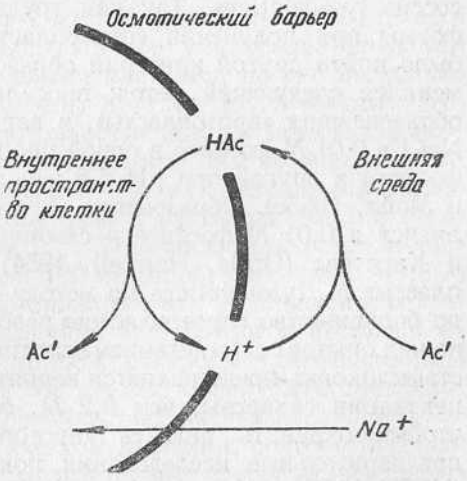


Рис. 7. Механизм переноса иона ацетата.

Na^+, K^+, H^+ и HAc, но не для Ac'. Отсюда в присутствии значительных концентраций H^+ (т. е. при pH 7 в противоположность pH 9) H^+ может включаться в Ac как HAc и возвращаться через оболочку как H^+ для присоединения другой Ac и, таким образом, циклически катализировать усвоение Ac в виде HAc, как показано на рис. 7.

Протопласты

Вейбуллом (1953а) было установлено, что круглые тела, которые оказались целыми протопластами, выходят из клеток Bacillus megaterium при растворении стенок лизоцимом в 0,2 М сахарозе. «Протопласты» не могли оставаться целыми, если бы активность воды среды не снижалась сахарозой, полиэтиленгликолем или некоторыми другими веществами, и при помощи электронного микроскопа можно установить у них наличие внешней оболочки (Вейбулл, 1953б).

Неизвестно, однако, заключался ли механизм действия вещества в создании осмотического давления на мембрану, тем самым предотвращая осмотический распад «протопласта», или вещество непосредственно предупреждало разбухание гидратированного содержимого протоплазмы, которое в противном случае разорвало бы внешнюю оболочку. Отсюда представляло интерес определить проницаемость изолированных «протопластов» для ряда веществ.

Для того чтобы получить данные, сравнимые с описанными выше, было важно приготовить «протопласты» Staphylococcus aureus. Однако, поскольку чувствительность к лизоциму S. aureus очень низка, внимание было привлечено прежде всего к Micrococcus lysodeicticus. Так как трудно было ожидать изменения формы при получении «протопластов» из кокков, необходимо было найти другой критерий образования «протопластов». Применялся следующий метод: вносили по 0,1 мл взвеси клеток, образовавших «протопласты», в парные пробирки с 5 мл 1,2 М NaCl в 0,01 М фосфате в одной пробирке и с 5 мл одного 0,01 М фосфата в другой при pH 6,8 и сравнивали мутность (Митчелл и Мойл, 1955с). Образование «протопласта» учитывалось путем лизиса в 0,01 М фосфате и стабильности в 1,2 М NaCl. Грула и Харстелл (Grula, Harstell, 1954) пытались получить «протопласты» M. lysodeicticus по методу Вейбулла в 0,2 М сахарозе, но большинство «протопластов» разбухало и распадалось. В свете наших опытов с определением осмотического давления золотистого стафилококка представляется вероятным, что более высокая концентрация сахарозы, чем 0,2 М, была бы потребна для того, чтобы сохранить целость «протопластов». Немногочисленные предварительные исследования показали, что M. lysodeicticus (NCTC 2665), собранные с поверхности плотной среды близко

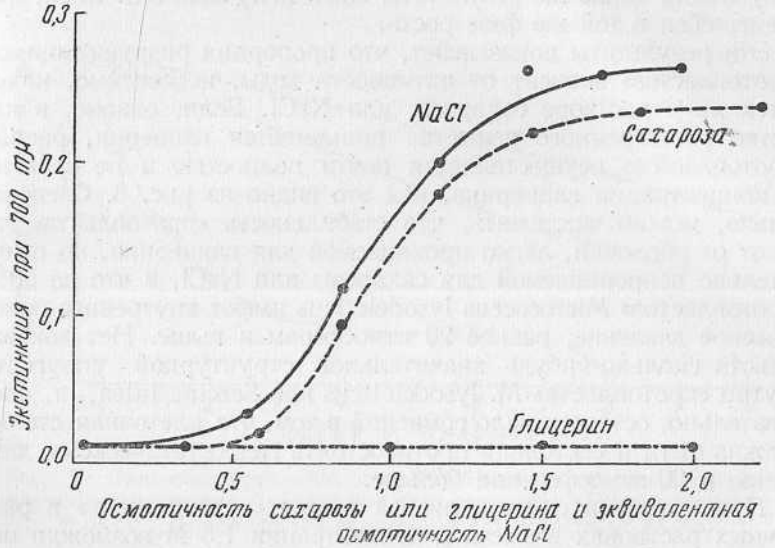


Рис. 8. Стабильность «протопластов» Micrococcus lysodeicticus (NCTC 2665) при взвешивании в растворах хлористого натрия, сахарозы и глицерина различной концентрации. Экстинкция измерялась в 1,2 М растворе NaCl, содержащем 0,01 М фосфат pH 6,8.

к стационарной фазе роста и омытые в дистиллированной воде, могут легко образовывать «протопласты» при культивировании в течение 2 часов при 25° при концентрации, соответствующей 10 мг/мл, в 1,2 М сахарозе, забуференной 0,04 М фосфатом при pH 6,8 и содержащей 10 μг кристаллического лизоцима, полученного из яичного белка, на 1 мл. «Протопласты» при исследовании при помощи фазово-контрастного микроскопа представляются внешне сходными с целыми клетками, но они несколько более бледные и обычно отделены друг от друга вместо того, чтобы быть скученными. «Протопласты» Sarcina lutea были получены тем же путем, но при воздействии 0,02 мг лизоцима/мл вместо 0,01 мг. Рис. 8 показывает чувствительность «протопластов» M. lysodeicticus к пребыванию в растворах NaCl и сахарозы в течение 30 минут при 25°. Устойчивость «протопластов» определялась экстинкцией при 700 mμ проб, внесенных в 1,2 М раствор NaCl, в котором «протопласты», как установлено, сохраняют свою стабильность. Величина экстинкции наносилась на диаграмму относительно молярности сахарозы и эквивалентной молярности NaCl так, чтобы обе кривые могли быть сравнены. Очевидно не свыше 10% «протопластов» распадается в течение 30 минут при 25° при осмотическом давлении, соответствующем 1,5 М, в то время как 50% разрушается при осмотическом напряжении, вызванном как хлористым натрием, так и сахарозой.

В сущности такие же результаты были получены с S. lutea, находившейся в той же фазе роста.

Эти результаты показывают, что пропорция разрушающихся «протопластов» зависит от активности воды, независимо, находится ли в растворе сахароза, или NaCl. Если, однако, в качестве растворенного вещества применяется глицерин, распад «протопластов» осуществляется почти полностью и не зависит от концентрации глицерина, как это видно из рис. 8. Следовательно, можно заключить, что стабильность «протопласта» зависит от оболочки, легко проницаемой для глицерина, но относительно непроницаемой для сахарозы или NaCl, и что до 50% «протопластов» Micrococcus lysodeicticus имеют внутреннее осмотическое давление, равное 20 атмосферам и выше. Нет доказательств сколько-нибудь значительной структурной упругости внутри «протопласта» M. lysodeicticus или Sarcina lutea, и, следовательно, остается мало сомнений в том, что клеточная стенка должна быть в состоянии противостоять гидростатическому давлению в 20 атмосфер или больше.

При изучении степени лизиса взвеси «протопластов» в различных растворах веществ в концентрации 1,5 М возможно получить относительное измерение проницаемости оболочки «протопласта» для этих веществ. Так, «протопласты» Micrococcus lysodeicticus и Sarcina lutea оказываются проницаемы лишь очень медленно для следующих веществ: NaCl, KCl, NH_4Cl, $MgCl_2$, ацетат натрия (pH 9), ацетат калия (pH 9), NaBr, K_2SO_4, ($KH_2PO_4 + K_2HPO_4$), глютамат натрия, лизин солянокислый, глюкоза и сахароза. «Протопласты» распадаются почти мгновенно в глицерине при 20°; время, необходимое для лизиса почти 50% «протопластов», равно 20 секундам для эритрита, 5 минутам для рибозы и свыше 1 часа для сорбита. «Протопласты» также распадаются мгновенно в 1,5 М растворе глицина или мочевины, но возможно, что эти вещества могут в некоторых случаях значительно воздействовать на оболочку «протопласта» при таких высоких концентрациях. Действительно, этот метод вызывает критические возражения, так как высокие концентрации реагентов могут в значительной степени воздействовать на проницаемость оболочки, даже если вещество относительно малоактивно.

«*Протопласты*» *стафилококков*. Было найдено, что семь штаммов стафилококка могут медленно образовывать чувствительные к осмосу «протопласты» при условиях, сходных с описанными выше, но при действии 0,5 мг лизоцима на 1 мл (Митчелл и Мойл, 1955д). Мы подчеркивали, однако, что контрольные взвеси, не содержавшие лизоцима, также образуют «протопласты» в значительной степени. При соответствующем регулировании условий возможно образовать чувствительные к осмосу «протопласты» из S. aureus (штамм Дункан) путем «автолиза» в сроки, равные немногим часам при 25°. Эти «протопласты» близко на-

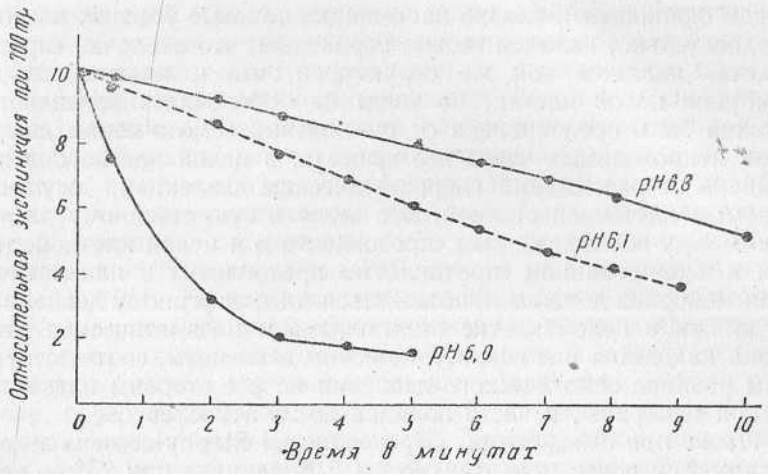


Рис. 9. Динамика проникновения KCNS в «протопласты» Staphylococcus aureus (штамм Дункан) при трех величинах pH при температуре 20°. «Протопласты» взвешены в 1,5 М растворе KCNS.

поминают таковые у Micrococcus lysodeicticus и Sarcina lutea тем, что они дают светопреломление на 40% меньше, чем целые клетки в 1,2 М NaCl, и показывают в общем одинаковую чувствительность к снижению внешнего осмотического давления в растворах NaCl или сахарозы, как это представлено на рис. 8. Судя по стабильности «протопластов» S. aureus в осмотических растворах, соответствующих 1,5 мл, они проницаемы лишь очень медленно для электролитов: NaCl, KCl, NH_4Cl, KBr, KNO_3, ацетата натрия (pH 9), ацетата калия (pH 9), K_2SO_4, (KN_2PO_4 + + K_2HPO_4), глютамата натрия и солянокислого лизина. В KCNS, однако, «протопласты» разрушаются в течение немногих минут, как показано на рис. 9, причем степень распада оказывается тесно зависимой от pH. В NaCNS сходные кривые показывают степень лизиса до 0,8 того, что наблюдается в соответствующих растворах KCNS. Более быстрый лизис при низких величинах pH не может быть обязан только повышению хрупкости «протопластов», так как в растворах NaCl при соответствующих величинах pH лизиса не наблюдается. Эти результаты находятся в соответствии с наблюдениями, изложенными выше, относительно проницаемости целых S. aureus для тиоцианата. Время, необходимое для половинного лизиса «протопластов» S. aureus, было меньше, чем 3 секунды для глицерина, 20 секунд для эритрита, 5 минут для рибозы, 30 минут для арабинозы и 20 минут для сорбита. Лизис в глюкозе, сорбозе, маннозе, галактозе, фруктозе и сахарозе был крайне медленным.

Таким образом, свойства проницаемости «протопластов» Micrococcus lysodeicticus, sarcina lutea и Staphylococcus aureus в

общем одинаковы и близко напоминают таковые у целых клеток. Следовательно, кажется весьма вероятным, что оболочка «протопласта» является той же структурой, что и плазматическая мембрана целой клетки, но тогда как оболочка «протопласта» должна быть предохранена от растяжения осмотическим давлением непроходимых через нее веществ, в целой клетке она защищена от растяжения гидростатическим давлением, осуществляемым клеточной стенкой. Это ведет к существенному различию между изолированным «протопластом» и целой клеткой, так как в изолированном «протопласте» протоплазма и плазматическая мембрана должны приближаться к атмосферному давлению, тогда как в целой клетке протоплазма и плазматическая мембрана находятся под гидростатическим давлением, соответствующим разнице осмотического давления по обе стороны плазматической мембраны, и часто порядка до 20 атмосфер.

Лизис при охлаждении. «Протопласты» Staphylococcus aureus лизируются почти моментально в 1,5 М глицине при 25° — температуре, при которой, как известно, глицин способен проникать в целые клетки. Если распад «протопластов» в глицине был бы обязан просто проникновению глицина, а не повреждению оболочки «протопласта», последние должны были бы оставаться целыми при 2°, так как при этой температуре целые клетки, как известно, непроницаемы для глицина. Было найдено, однако, что «протопласты» очень быстро лизируются при 2°, но что при этой температуре они также лизируются в NaCl или сахарозе. Этот лизис осуществляется почти полностью при охлаждении взвеси с 25 до 2° при интенсивности 10° в минуту и лишь немногим меньше, если степень охлаждения снижена до 1° в минуту. В этом отношении целые клетки глубоко различаются от «протопластов», так как при охлаждении целых клеток отсутствует сколько-нибудь заметная потеря внутренних веществ. Имелись указания на то, что резкое воздействие холода быстро убивает растущие клетки Bacterium coli [Шермен и Элбус (Sherman, Albus), 1923; Шермен и Кэмерон (Cameron), 1934; Хегарти и Уикс (Hegarty, Weeks), 1940], но неизвестно, является ли причиной гибели нарушение осмотического барьера. Во всяком случае наличие внешней стенки S. aureus, вероятно, снижает чувствительность лежащей под ней плазматической оболочки к разрушающему воздействию охлаждения.

КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА И ОБОЛОЧКА ПЛАЗМЫ КАК ЕДИНОЕ

Перед лицом экспериментальных данных нельзя серьезно сомневаться, что как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии обладают осмотическим барьером, непроницаемым для многих веществ низкого молекулярного веса. Осмотически функционирующая часть этого барьера соответствует

плазматической оболочке, которая лежит непосредственно внутри клеточной стенки и механически поддерживается последней.

Исследования веса, морфологии и химического строения фрагментов механически разрушенных Staphylococcus aureus, разделенных на морфологически однородные фракции при помощи дифференциального центрифугирования, позволяют предполагать, что плазматическая оболочка этого организма является липопротеидным комплексом, который легко распадается на мелкие частицы, содержащие 41% по весу протеина и 22,5% липида, и составляющие до 10% сухого веса клетки (Митчелл и Мойл, 1951). Проводящиеся в настоящее время опыты показывают, что вещество этой «фракции мелких частиц» практически идентично таковым оболочки «протопластов» S. aureus, отделенным путем лизиса «протопластов» в разбавленном солевом растворе, содержащем деоксирибонуклеазу, с последующим дифференциальным центрифугированием. Поэтому мало сомнений в том, что «фракция мелких частиц» представляет собой плазматическую оболочку целого организма. Вес «фракции мелких частиц» тот же, что дается для оболочки, достигающей 15 $m\mu$ толщины, если она гидратирует до такой же степени, как и вся клетка (Митчелл и Мойл, 1951), но имеющей до 5 $m\mu$ при отсутствии гидратации, следовательно, факты находятся в соответствии с представлением о классической липопротеиновой оболочке [Доусон и Даниелли (Danielli), 1943], содержащей один или два слоя молекул липида и протеина.

Плазматическая оболочка обладает очень небольшой механической прочностью и, так как она получает гидростатическое давление, соответствующее противостоящему ему осмотическому давлению, она оказывает на клеточную стенку давление, которое часто может достигать 20 атмосфер. Клеточная стенка поэтому должна быть так устроена, чтобы противодействовать давлению по всей поверхности плазматической мембраны; отверстия в клеточной стенке должны быть достаточно малы. Тот факт, что в случае нарушения целости плазматической оболочки Staphylococcus aureus дезинфицирующими веществами или органическими растворителями диффундирующие вещества, размеры молекул которых обычно не превосходят размеров нуклеотидов, выделяются через клеточную стенку, указывает, что клеточная стенка состоит из сетки цепочек или нитей с действующей порой диаметром до 1 $m\mu$ (Митчелл и Мойл, 1951); эта концепция подтверждается наблюдением, что декстран, молекулы которого достигают 2,5 $m\mu$ в диаметре, не проникает через клеточные стенки извне (Митчелл и Мойл, 1955а). Таким образом, мы должны представить себе плазматическую оболочку как замкнутый липопротеиновый слой толщиной от 2 до 4 молекул, имеющий незначительное сродство к воде и содержащий очень мало пропитанных водой пор, поддерживаемый клеточной стенкой — более гидратированной сеткой значительной силой растя-

жимости, содержащей поры с действующим диаметром до 1 mμ.

Возникает вопрос, в какой степени плазматическая оболочка встроена в поры клеточной стенки, так как у грамположительных бактерий обычно наблюдается значительное прикрепление плазматической оболочки к клеточной стенке и обе оболочки обычно не могут быть отделены одна от другой, исключая лишь энзиматическое переваривание стенки или механическое разрушение. Уместно отметить, однако, что свыше 90% кислой фосфатазы, которая действует снаружи осмотического барьера целых Staphylococcus aureus, может быть обнаружено в веществе плазматической оболочки разрушенных клеток, тогда как менее чем 3% остается во фракции клеточной стенки. Материал плазматической оболочки содержит также большую часть цитохромной системы и многие другие энзимы, в то время как лишь очень незначительные следы их могут быть найдены во фракции клеточной стенки (Митчелл, 1954б). Больше того, в то время как фракция плазматической оболочки содержит до 20% липида, фракция клеточной стенки в очищенном виде содержит менее чем 0,5% липидов. Следовательно, если даже некоторые содержащиеся в плазматической оболочке вещества и проникают в поры клеточной стенки целой клетки, то липиды и многие белковые компоненты, вероятно, в поры не проникают, поскольку они не сильно встроены в клеточную стенку. Факт, что проницаемость «протопластов» для веществ с низким молекулярным весом не отличается существенно от таковой целых клеток, свидетельствует, что поры клеточной стенки большей частью пропитаны водой. Но наиболее действительный довод против вхождения материала плазматической оболочки в поры клеточной стенки — это тот факт, что плазматическая оболочка может продавливаться через клеточную стенку, если внутреннее осмотическое давление повышается. Мы можем поэтому рассматривать осмотически функциональную часть плазматической мембраны как показывающую в большей степени боковое сцепление, чем прикрепление к клеточной стенке. С другой стороны, клеточная стенка должна быть достаточно тесно связана с плазматической оболочкой для того, чтобы стабилизировать последнюю к литическому действию охлаждения. Возможно, что лизис плазматической оболочки «протопласта» при охлаждении обязан перестройке (кристаллизации) частей оболочки, дающей участки, проницаемые для ионов сахарозы или хлорида, в результате чего «протопласт» вздувается и разрывается. Защитное действие клеточной стенки должно, следовательно, выражаться в связи между двумя оболочками, которая, надо полагать, затруднит боковое смещение или перестройку частей плазматической оболочки.

Хотя их можно отделить друг от друга искусственно, мы сможем рассматривать клеточную стенку и плазматическую обо-

лочку не как самостоятельные структуры, а как составные части хорошо интегрированной единицы, ответственной за многие осмотические свойства клетки. Больше того, в то время как плазматическая оболочка действует как осмотический барьер для веществ низкого молекулярного веса, для веществ молекулярного веса 10 000 или больше тотчас начинает действовать в качестве осмотического барьера клеточная стенка. Это может, вероятно, иметь значение для сохранения клетки, поскольку литические вещества (антитела или энзимы) из окружающей организм среды не получают доступа к нежной плазматической оболочке. Хотя данные, касающиеся функциональных свойств клеточных оболочек других бактерий, менее полные, чем у Staphylococcus aureus, они достаточны для того, чтобы считать, что имеет место сходное разделение функции и структуры.

У некоторых спирилл и у неидентифицированной грамположительной палочки [Хувинк (Houwink), 1953; Лебоу и Мосли (Labaw, Mosley), 1954] клеточная стенка при исследовании в электронном микроскопе оказывается состоящей (частично) из слоя круглых частиц, уложенных гексагонально в первом случае и, вероятно, в виде прямоугольника во втором. Интересно вычислить вероятный размер пор этих стенок, исходя из простых геометрических расчетов. При гексагональном порядке расположения шаров, имеющих по 100 единиц в диаметре каждый, через пору может пройти шар диаметром в 13 единиц, в то время как при прямоугольном расположении может проникнуть шар диаметром в 40 единиц. У спириллы размеры частиц стенки достигают 14 $m\mu$ в диаметре, давая «размер пор» до 2 $m\mu$, тогда как у неидентифицированного грамположительного организма частицы стенки составляют около 11 $m\mu$ в диаметре, давая «размер пор» до 1,5 $m\mu$ при гексагональном расположении или до 5 $m\mu$ для прямоугольного расположения. Эти цифры приближаются к размеру пор в 1 $m\mu$ у стенки Staphylococcus aureus, определенному при помощи измерения проницаемости. К сожалению, тонкое строение клеточной стенки у S. aureus обнаружено еще не было.

Нет данных для утверждения, что протоплазма или плазматическая оболочка обычно способствует значительно сохранению нормальной формы клетки при осмотическом или механическом давлении, которому организм подвергается в его естественном окружении, и необходимо, следовательно, допустить, что эту функцию выполняет клеточная стенка. У спириллы, однако, клетки скучиваются во время клеточного деления, и наблюдается процесс расщепления (Эллис, 1922), который может вполне включать деятельность митотического веретена, звезд и коркового геля, как у многих простейших. Поэтому не следует исключать возможность, что структурная твердость протоплазмы бактерий может играть роль в определении их формы по крайней мере на некоторых стадиях роста и деления.

ОБМЕННАЯ ДИФФУЗИЯ И МЕХАНИЗМ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ

Было установлено, что обменный процесс неорганического фосфата осуществляется на поверхности Staphylococcus aureus (Митчелл и Мойл, 1953) точно так же, как кишечной палочки (Робертс и Робертс, 1950). Фосфорный обмен может быть объяснен типом механизма, названного Юссингом (Ussing, 1947) обменной диффузией, при которой ионы проходят через плазматическую оболочку на несущих группах, которые можно рассматривать как «паром», перевозящий равное количество «пассажиров» в обоих направлениях. Имеются два основных факта, подтверждающих механизм обменной диффузии и опровергающих противоположный механизм, названный Робертсом и Робертсом (1950) обменной адсорбцией: во-первых, измерения проницаемости показали, что плазматическая оболочка непроницаема для неорганического фосфата, и, во-вторых, обмен неорганического фосфата тормозится количеством фенил-хлористой ртути[1], соответствующим всего 3% количества молекул внутреннего неорганического фосфата (Митчелл, 1953, 1954а). Трудно понять, каким образом каждый ион фенил-ртути сможет предотвратить фосфорный обмен более чем в тридцати гипотетических адсорбционных точках. С другой стороны, ингибитор может легко предупредить движение относительно небольших «паромов» или въезд или выезд их фосфатных «пассажиров». Больше того, специфичность обменных реакций относительно ионов фосфата, специфичность действия ингибиторов и влияние изменений pH, концентрации фосфата и температуры подтверждают идею, что ионы фосфата движутся через осмотический барьер в комбинации со специфической несущей группой и что движение этих несущих групп вызывает обратимую деформацию частей плазматической оболочки, которая напоминает обратимую белковую денатурацию (Митчелл, 1954б). Было найдено также, что плазматическая оболочка Staphylococcus aureus содержит массу цитохромной системы (подобно таковой у Bacillus megaterium) (Вейбулл, 1953б) и многие другие энзиматические активности (Митчелл, 1954б). Эти и другие наблюдения, детальный обзор которых был дан в другом месте (Митчелл и Мойл, 1956), ведут к представлению о плазматической оболочке не только как о статическом барьере свободной диффузии веществ низкого молекулярного веса, но и как о мозаике специфических проводников, которые могут допускать свободное движение тех или иных веществ со специфичностью, приравниваемой к таковой комбинации энзимных субстратов — некоторые из проводников сами являются энзимами. Хотя несущие группы, вероятно, движутся туда и обратно через осмотический барьер просто при температурном колебании, однако если

[1] C_6H_5HgCl. *Ред.*

метаболизм осуществляется внутри клетки, это движение может ассоциироваться с возникновением и нарушением связей, которые прикрепляют вещества-«пассажиры» к несущим группам таким образом, что вещества активно транспортируются внутрь и наружу через плазматическую оболочку.

Эти соображения помогают устранить давно существующее препятствие для восприятия идеи, что бактерии обладают оболочками, которые непроницаемы для веществ низкого молекулярного веса, т. е. что бактерии, обладая очень энергичным метаболизмом, должны быть свободно проницаемы для их продуктов питания и обмена. Мы предлагаем гипотезу, согласно которой проницаемость бактерий для многих продуктов их питания и обмена является специфической, зависящей от энзимов, которые адсорбируют питательные и десорбируют конечные продукты обмена на поверхности плазматической оболочки.

ОСМОТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ВО ВРЕМЯ РОСТА

Мы указывали выше, что форма бактерии, вероятно, определяется механической твердостью (и формой) клеточной стенки. Клетка должна быть рассматриваема как высокоорганизованный род кристалла. Во время роста и деления плазматическая оболочка и клеточная стенка растягиваются и изменяют форму в направлении, которое должно в конечном счете быть определено локализацией энзимов и расположением единиц, из которых построены плазматическая оболочка и клеточная стенка.

Плазматическая оболочка находится в контакте с протоплазмой и представляется вероятным, что вещества, из которых она состоит, находятся в равновесии с запасом этих веществ в месте их синтеза в цитоплазме, непосредственно или через опосредование энзимами. Сходным образом клеточная стенка находится в контакте с плазматической мембраной и можно ожидать, что частицы, из которых клеточная стенка построена, находятся в равновесии с резервами этих частиц в месте их синтеза в протоплазме или плазматической оболочке. В последнем случае, однако, положение особенно интересно с точки зрения осмоса, потому что клеточная стенка находится снаружи от плазматической оболочки. Проблема, которую мы должны рассмотреть, — как клеточная стенка может быть выведена наружу от плазматической оболочки без образования отверстия в плазматической оболочке (осмотическом барьере) и в то время, как сохранение силы натяжения клеточной стенки таково, что она может сопротивляться значительному внутреннему давлению.

Было найдено, что клетки 7 штаммов стафилококка, желтой сарцины, Micrococcus lysodeicticus и Bacillus megaterium спонтанно образуют «протопласты», если находятся в фазе быстро растущей культуры и что интенсивность образования «прото-

пластов» приблизительно пропорциональна интенсивности роста культуры в момент смыва. Больше того, стенки этих организмов, если их отделить от остального вещества клеток при посредстве обычной техники механического разрушения и центрифугирования (Митчелл и Мойл, 1951), начинают частично или полностью растворяться с быстротой, приблизительно соответствующей быстроте образования «протопластов», и в то же время эти изолированные клеточные стенки освобождают лизоцимоподобный фактор, который способен лизировать Micrococcus lysodeicticus и растворяет изолированные клеточные стенки старых культур этого микроба (Митчелл и Мойл, неопубликовано). Мы поэтому предлагаем гипотезу, что стенки этих организмов построены при посредстве лизоцимоподобного энзима, обратимо катализирующего образование звеньев (связей) между «единицами с относительно низким молекулярным весом», из которых построена клеточная стенка.

Было также обнаружено, что если «протопласты» Staphylococcus aureus, образованные из клеток, снятых вскоре после окончания логарифмической фазы роста, лизируются в разбавленном солевом растворе, содержащем деоксирибонуклеазу, и фракция клеточных стенок изолируется, клеточные стенки при наблюдении в электронный микроскоп оказываются разделенными на полушаровидные части (полушария). Больше того, когда в стенке виден экваториальный гребень (край, выступ), он располагается под прямым углом к краю полушария. Отсюда мы заключаем, что лизоцимоподобный фактор, вызвавший уплотнение вещества клеточной стенки, располагается по экваториальному кольцу стенки. Молекулы лизоцимоподобного энзима могут быть изображены как действующие подобно звеньям в ряду застежки-молнии; они вытесняются через плазматическую оболочку и снаружи становятся замкнутыми вместе, образуя сплошную стенку.

Возможно, что уплотнение частиц, образующих клеточную стенку, может происходить в результате того, что материал клеточной стенки нерастворим в воде, так же как нерастворимый пептид (например, бензоил-лейцил-лейцил-анилид) образуется при действии протеолитического энзима (цистеина-папаина) [Бергманн и Френкель-Конрат (Bergmann, Fraenkel-Conrat), 1938]. Если это имеет место, следует ожидать, что если на поверхности плазматической оболочки не находятся уже частицы клеточной стенки, образование клеточной стенки невозможно: пока будет формироваться агрегат, достаточно большой, чтобы быть нерастворимым в воде, равновесие не будет благоприятным для образования клеточной стенки. Так, протопласт со всеми необходимыми промежуточными веществами и энзимами, потребными для образования клеточной стенки, может быть не в состоянии синтезировать клеточную стенку, пока не будет снабжен частицами, дающими толчок к этому синтезу (см. до-

клад Мак Квайллена на этом симпозиуме). Мы заключаем этот раздел предположением, что форма клетки может регулироваться соответствующими колебаниями количества активных лизоцимоподобных энзиматических молекул в течение цикла клеточного деления и роста.

ЛИТЕРАТУРА

Alexander B., Landwehr G. & Seligman, A. M. (1945). A specific micromethod for the colorimetric determination of glycine in blood and urine. J. biol. Chem. *160*, 51.

Baumgärtel P. T. (1924). Grundriss der theoretischen Bakteriologie. Berlin: Springer.

Bergmann M. & Fraenkel-Conrat H. (1938). The enzymatic synthesis of peptide bonds. J. biol. Chem. *124*, 1.

Britten R. (1951—2). Report of Biophysics Section, Dept. of Terrestrial Magnetism. Yearb. Carneg. Instn, p. 92.

Britten R. (1955). Discussion in Symposium on Amino acid Metabolism, p. 120, ed. McElroy & Glass. Baltimore: Johns Hopkins Press.

Brudny V. (1908). Über die Beziehung zwischen der Färbbarkeit der Bakterien nach Gram und ihrer Permeabilität. Zbl. Bakt., Abt. II. *21*, 62.

Cowie D. B., Roberts R. B. & Roberts I. Z. (1949). Potassium metabolism in Esherichia coli. 1. Permeability to sodium and potassium ions. J. cell. comp. Physiol. *34*, 243.

Davson H. & Danielli J. R. (1943). The permeability of Natural Membranes. Cambridge: University Press.

Dawson I. M. (1949). Discussion in The Nature of the Bacterial Surface, p. 119, ed. A. A. Miles & N. W. Pirie. Oxford: Blackwell.

Dutky S. R. (1933). Unpublished, quoted by Knaysi, G. (1938). Cytology of bacteria. Bot. Rev. *4*, 83.

Eisenberg P. (1910). Über die Tuschedifferenzierung gramnegativer Bakterien. Zbl. Bakt. Abt. I, Orig., *56*, 183.

Ellis D. (1903). Untersuchungen über Sarcina, Streptococcus und Spirillum. Zbl. Bakt. Abt. I, Orig., *33* 1, 81 und 161.

Ellis D. (1922). The intimate structure of the bacterial cell. Brit. med. J. ii, 731.

Fischer A. (1903). Vorlesungen über Bakterien, 2nd ed. Jena: Fischer:

Gale E. F. (1945). Studies on bacterial amino-acid decarboxylases. 5. The use of specific decarboxylase preparations in the estimation of amino-acids and in protein analysis. Biochem. J. *39*, 46.

Gale E. F. (1953). Assimilation of amino-acids by Gram-positive bacteria and some actions of antibiotics thereon. Advanc. Prot. Chem. *8*, 285.

Grula E. A. & Hartsell S. E. (1954. Lysozyme and morphological alterations induced in Micrococcus lysodeikticus, J. Bact. *68*, 171.

Harman J. W. & Kitiyakara A. (1955). Studies on mitochondria. 6. The relationship between the structure, osmotic reactivity and ATPase activity of mitochondria from pigeon skeletal muscle. Exp. Cell. Res *8*, 411.

Hegatry C. P. & Weeks O. B. (1940). Sensitivity of Escherichia coli to cold shock during the logarithmic growth phase. J. Bact. *39*, 475.

Herchey A. D. (1939). Factors limiting bacterial growth. 4. The age of the parent culture and the rate of growth of transplants of Escherichia coli. J. Bact. *37*, 285.

Houwink A. L. (1953). A macromolecular monolayer in the cell-wall of Spirillum spec. Biochim. biophys. Acta, *10*, 360.

Johnson F. H. & Harvey E. N. (1937). The osmotic and surface properties of marine luminous bacterial. J. cell. comp. Physiol. *9*, 363.

Johnson F. H., Zworykin N. & Warren G. (1943). A study of luminous bacterial cells and cytolysates with the electron microscope. J. Bact. *46*, 167.

King R. L. & Beams H. W. (1942). Ultracentrifugation and cytology of Spirillum volutans. J. Bact. *44*, 597.
Knaysi G. (1930). The cell structure and cell division of Bacillus subtilis. J. Bact. *19*, 113.
Knaysi G. (1951). Elements of Bacterial Cytology, 2nd ed. Ithaca, New York: Comstock.
Labaw L. W. & Mosley V. M. (1954). Periodic structure in the flagella and cell walls of a bacterium. Biochim. biophys. Acta, *15*, 325.
Loeb J. (1922). On the influence of aggregates on the membrane potentials and the osmotic pressure of protein solutions. J. gen. Physiol. *4*, 769.
Mitchell P. (1949). The osmotic barrier in bacteria. In The Nature of the Bacterial Surface, p. 55, ed. A. A. Miles & N. W. Pirie. Oxford: Blackwell.
Mitchell P. (1953). Transport of phosphate across the surface of Micrococcus pyogenes: nature of cell „inorganic phosphate" J. gen. Microbiol., *9*, 273.
Mitchell P. (1954a). Transport of phosphate across the osmotic barrier of Micrococcus pyogenes: specificity and kinetics: J. gen. Microbiol., *11*, 73.
Mitchell P. (1954б). The mechanism of transport of phosphate across the osmotic barrier of Staphylococcus auerus. J. gen. Microbiol., *11*, x.
Mitchell P. (1954в). Transport of phosphate through an osmotic barrier. Symp. Soc. exp. Biol. *8*, 254.
Mitchell P. & Moyle J. (1951). The glycerophospho-protein complex envelope of Micrococcus pyogenes. J. gen. Microbiol. *5*, 981.
Mitchell P. & Moyle J. (1953). Paths of phosphate transfer in Micrococcus pyogenes: phosphate turnover in nucleic acids and other fractions. J. gen. Microbiol. *9*, 257.
Mitchell P. & Moyle J. (1954). The Gram reaction and cell composition: nucleic acids and other phosphate fractions. J. gen. Microbiol. *10*, 533.
Mitchell P. & Moyle (1955a). Permeability of the osmotic barrier of Staphylococcus aureus to some salts, amino-acids and non-electrolytes (in the Press).
Mitchell P. & Moyle J. (1955б). Permeability of the osmotic barrier of Bacterium coli to small molecular weight solutes (in the Press).
Mitchell P. & Moyle J. (1955в). Preparation and osmotic properties of „protoplasts" from Micrococcus lysodeicticus and Sarcina lutea (in the Press)[1].
Mitchell P. & Moyle J. (1955г). Autolytic preparation and osmotic properties of „protoplasts" from Staphylococcus aureus (in the Press)[2].
Mitchell P. & Moyle J. (1956). Permeation mechanisms in bacterial membranes. Faraday Soc. Symp.
Overton E. (1899). Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zellen, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie. Vjschr. naturf. Ges. Zürich, *44*, 88.
Raichel B. (1928). Über den Einfluss osmotisch wirksamer Mittel auf die Bakterienzelle. Arch. Protistenk. *63*, 333.
Roberts R. B., Abelson P. H., Cowie D. B., Bolton E. T. & Britten R. J. (1955). Studies on Biosynthesis in Escherichia coli. Washington: Carnegie Institution.
Roberts R. B. & Roberts I. Z. (1950). Potassium metabolism in Escherichia coli. 3. Interrelationship of potassium and phosphorus metabolism. J. cell. comp. Physiol. *36*, 15.
Roberts R. B., Roberts I. Z. & Cowie D. B. (1949). Potassium metabolism in Escherichia coli. 2. Metabolism in the presence of carbohydrates and their metabolic derivatives. J. cell. comp. Physiol. *34*, 259.
Roberts R. B. & Wolffe E. L. (1952). Utilization of labelled fructose-6-phosphate and fructose-1, 6-diphosphate by Escherichia coli. Arch. Biochem. *33*, 165.

---

[1] Опубликовано в J. gen. Microbiol., 1956, 15, 512—520. *Ред.*
[2] Опубликовано в J. gen. Microbiol., 1957, 16, 1, 187—194. *Ред.*

Robinow C. F. & Murray R. G. E. (1953). The differentiation of cell-wall, cytoplasmic membrane and cytoplasm of Gram-positive bacteria by selective staining. Exp. Cell Res. *4*, 390.
Robinson R. A. & Sinclair D. A. (1934). The activity coefficients of the alkali chlorides and of lithium iodide in aqueous solution from vapour pressure measurements. J. Amer. chem. Soc. *56*, 1830.
Ruhland W. & Hoffmann C. (1926). Beggiatoa mirabilis. Ein Beitrag zur Ultrafiltertheorie des Plasmas. Planta, *1*, 1.
Sherman J. M. & Albus W. R. (1923). Phisiological youth in bacteria. J. Bact. *8*, 127.
Sherman J. M. & Cameron G. M. (1934). Lethal environmental factors within the natural range of growth. J. Bact. *27*, 341.
Swellengrebel N. H. (1909). Neuere Untersuchungen über die vergleichende Cytologie der Spirillen und Spirochäten. Zbl. Bakt. Abt. *1*, 49 529.
Ussing H. H. (1947). Interpretation of the exhange of radio-sodium in isolated muscle. Nature, Lond., *160*, 262.
Vahle C. (1910). Vergleichende Untersuchungen über die Myxobakteriazeen und Bakteriazeen, sowie die Rhodobakteriazeen und Spirillazeen. Zbl. Bakt. Abt. II, *25*, 178.
Wámoscher L. (1930). Versuche über die Structur der Bakterienzelle. Z. Hyg. InfektKr. *111*, 422.
Weibull C. (1953a). The isolation of protoplasts from Bacillus megaterium by controlled treatment with lysozyme. J. Bact. *66*, 688.
Weibull C. (1953б). Characterisation of the protoplasmic constituents of Bacillus megaterium. J. Bact. *66*, 696.
Weibull C. (1955). The localisation of a permeability barrier in the cells of Bacillus megaterium. Exp. Cell Res. *9*, 139.
Winslow C. E. A. & Walker H. H. (1939). The earlier phases of the bacterial culture cycle. Bact. Rev. *3*, 147.

ХРОМАТИНОВЫЕ ТЕЛЬЦА БАКТЕРИЙ

К. Ф. РОБИНАУ

Отделение бактериологии и иммунологии,
Университет в Западном Онтарио, Канада

Живые палочковидные бактерии из молодых культур выглядят нежно-узорчатыми. При обычном или при фазово-контрастном освещении они относительно плотны на полюсах и поперек центра [Кноелл (Knoell), 1944; Кноелл и Цапф (Zapf), 1951; Стимпен (Stempen), 1950; Стимпен и Хатчинсон (Hutchinson), 1951; Клифтон и Эрхерд (Clifton, Erhard), 1952]. С каждой стороны темной центральной полосы имеются два или больше неясных, менее плотных образования. Часто указывали, что относительно прозрачные области являются местом нахождения структур, которые дают положительную реакцию Фельгена [Стайл (Stile), 1937; Пекарский (Piekarski), 1937; Нейманн (Neumann), 1941, и др.) (табл. 1, *2*).

В данной статье эти структуры будут обозначены как «хроматиновые тельца».

Структуры подобного рода были выявлены у многих видов бактерий, но лишь у немногих из них они достаточно крупны для детального изучения в оптическом микроскопе. Относительно крупные правильно расположенные хроматиновые тельца постоянно обнаруживаются в клетках очень молодых культур различных видов рода Bacillus (табл. 1, *2—9*); сходные расположения хроматиновых телец также часто находят в клетках молодых культур Escherichia coli и Proteus. Беспорядочные, трудно объясняемые расположения хроматиновых телец были описаны у светящейся бактерии Achromobacter fischeri [Джонсон и Грей (Johnson, Gray), 1949]; у Azotobacter [Траянт (Truant), 1954]; у штамма C E. coli K12 [Келленбергер (Kellenberger), 1953]; Либ, Вейгл и Келленбергер (Lieb, Weigle, 1955) и у Shigella dysenteriae [Уайтфелд и Маррей (Whitfield, Murray), 1954].

МЕТОДИКА

а) *Фиксация*

Хроматиновые тельца в фиксированных и окрашенных препаратах относительно крупных бактерий, таких, как Bacillus cereus, B. mycoides и B. megaterium, не все сходны; некоторые полые, некоторые плотны, некоторые расцеплены посередине, другие выглядят в виде групп из трех или четырех зерен. Очень немногие из этих деталей видны при жизни. Поэтому точно неизвестно, сколько деталей отражают прижизненную организацию хроматиновых телец и сколько являются результатом фиксации. Эта неопределенность в настоящее время наиболее остро ощущается при объяснении электронных микрографий тонких срезов бактерий.

Здесь не место обсуждать достоинства многих фиксаторов, которые применялись при изучении бактерий. Но один или два вопроса специального значения будут упомянуты. Широко используемая осмиева кислота, как в последнее время выяснилось, действует более медленно на бактерии, чем предполагали, и оставляет их хроматиновый материал в состоянии очень лабильном и далеком от «фиксированного». Опыты Маррея (1955), а также Уайтфелда и Маррея (1955) показали, что при обычных условиях фиксации парами OsO_4 хроматин остается чувствительным к воздействиям окружающей ионной среды.

Осмий, как свидетельствуют опыты, повреждает механизмы, сохраняющие нормальную внутреннюю ионную среду клетки. Приток ионов натрия в отмирающую клетку влияет на электрический заряд хроматина, который авторы рассматривают как анионный гель, и может вызвать его агрегацию в плотный осевой шнур. Этот артефакт объясняет результаты опытов, в которых бактерии были фиксированы для электронной микроскопии путем прибавления тетроксида осмия к содержащей соль жидкой культуральной среде [Бирч-Андерсен, Маалое и Сьостранд (Birch-Andersen, Maaløe, Sjöstrand), 1953].

Большой интерес представляют наблюдения (Уайтфелд, 1955), что сходная, но обратимая агрегация хроматиновых структур имеет место в *живых* бактериях, растущих на содержащей соль среде, всякий раз, когда их энергия регулирования осмотического давления подвергается напряжению, имеющему дело с внезапным повышением концентрации ионов натрия в окружающей среде, или временно ослаблена различными неблагоприятными влияниями, такими, как охлаждение, ультрафиолетовые лучи, фаговая инфекция или наличие антибиотиков стрептомицина или тетрациклина.

Более ценной в качестве фиксатора, чем осмий, в некоторых отношениях является жидкость Буэна (пикриновая кислота, формалин, уксусная кислота). Эта смесь как будто дает более

близкое сходство с прижизненной картиной у клеток рода Bacillus и кишечных бактерий в логарифмической фазе роста, чем другие обычные фиксаторы. Вид хроматиновых телец у бактерий, фиксированных *in situ* жидкостью Буэна (табл. 1, *3*, *3а*) (Робинау, 1944, табл. 7, *24*; табл. 8, *28*), очень хорошо соответствует их виду в живых бациллах, изученных при помощи фазово-контрастной оптики или ультрафиолетового света [Хеден (Hedén), 1951], и также хорошо соответствует форме и относительно незначительной плотности хроматиновых телец в целых или подвергнутых ультратонким срезам бактериях. Препараты, обработанные жидкостью Буэна, сохраняют нежно-волнистые контуры и однородное строение хроматиновых телец, видимые при жизни, но возможность применения фиксации по Буэну ограничивается тем обстоятельством, что хроматиновые тельца делаются практически неокрашенными при этой обработке и могут быть обнаружены только как силуэты в резко базофильной, легко окрашивающейся цитоплазме. Анаэробные грамотрицательные бактерии представляют собой замечательное исключение из этого правила; их хроматиновые тельца могут быть непосредственно окрашены раствором Гимза после фиксации по Буэну [Дайнс и Смит (Dienes, Smith), 1944].

Сравнение с живыми бактериями свидетельствует, что все фиксаторы, включая и Буэна, дубят и подчеркивают детали хроматиновых телец. Это впечатление подтверждается изучением электронных микрографий ультратонких срезов, в которых хроматиновые тельца наиболее диффузны и неясно разграничены в тех образцах, которые по независимым причинам должны рассматриваться как оптимально сохранившие структуру (неопубликованные наблюдения Р. Дж. Э. Маррей).

б) *Окраска*

Хроматиновые тельца не выявляются в фиксированных нагреванием мазках бактерий, окрашенных общепринятыми методами диагностической бактериологии, но и гематоксилин и ацетокармин — две краски, наиболее часто применяемые при изучении растительных и животных хромосом, не могут дать уверенности в надежности их применения на всех стадиях жизненного цикла. Другими словами, хроматиновые тельца обычно остаются скрытыми для тех, которые при повседневной работе постоянно исследуют окрашенных бактерий, и не совсем легко обнаруживаются теми, которые стремятся их обнаружить при помощи стандартных методов общей цитологии. Это необходимо учесть некоторым сомневающимся в реальности хроматиновых телец, а такие сомнения еще существуют во многих умах. Процесс обработки реактивом Фельгена — один из немногих методов, одинаковых для общей и бактериальной цитологии, окрашивает хрома-

тиновые тельца чисто, но бледно. К счастью, имеются другие краски со специфическим сродством к хроматину бактерий. Давно уже было установлено, что бактериальный хроматин, особенно у грамотрицательных видов, более ярко окрашивается сложными красками серии Романовского [Гимза, Лейшман, Райт (Giemsa, Leishman, Wright)], чем большинством других красок [Добелл (Dobell), 1911; Дуглаз и Дистазо (Douglas, Distaso), 1912; Нейманн, 1941; Гартман и Пейн (Hartman, Payne), 1954]. Красящий комплекс Романовского окрашивает бактериальные хроматиновые тельца в красный цвет. Это не всегда достаточно для того, чтобы сделать их четко видимыми в темно-синей цитоплазме, но контраст между хроматиновыми тельцами и цитоплазмой может быть повышен обработкой фиксированных бактерий N/1 HCl при 60° или путем переваривания их рибонуклеазой [Тюлянь и Вендрели (Tulasne, Vendrely), 1947] перед окраской.

Обычно думают, что кислотный гидролиз применяется потому, что он удаляет из цитоплазмы бактерий рибонуклеиновую кислоту [Вендрели и Липарди (Lipardy), 1946], но это еще не все. Гидролиз оказывает также *непосредственное* влияние на хроматиновые тельца. Он значительно повышает их очень низкое в норме сродство к обычным основным краскам. Растворение рибонуклеазой не оказывает такого влияния на ядра. Таким образом, хроматиновые тельца бациллярных видов можно окрасить основным фуксином после гидролиза, но не после растворения рибонуклеазой. В настоящее время хроматиновые тельца обычно окрашивают по Гимза, а не фуксином, и поэтому прямое влияние гидролиза на способность хроматиновых телец окрашиваться не привлекает больше внимания. Гимза окрашивает эти структуры даже до гидролиза и при этой окраске результат как гидролиза, так и обработки рибонуклеазой одинаков и частично является следствием большей видимости.

Хроматиновые тельца Escherichia coli, Proteus и видов Bacillus при прямой окраске по Гимза (или по Мей-Грюнвальд-Гимза) окрашиваются в вишнево-красный цвет (Гартман и Пейн, 1954). После переваривания деоксирибонуклеазой они не окрашиваются в красный цвет [Тюлянь, 1953; Питерс и Уигенд (Peters, Wigand), 1953]. В соответствии с открытиями Джекобсона и Уэбба (Jacobson, Webb, 1952) красная окраска объясняется как указание на наличие в хроматиновых тельцах деоксирибонуклеиновокислого белка, и это в свою очередь согласуется с положительной реакцией Фельгена у этих же структур.

Хроматиновые тельца после гидролиза часто более многочисленны и после этой обработки окрашиваются по Гимза не в красный, а в темно-голубой или голубовато-пурпурный цвет. Подлинность этого голубовато-пурпурного вещества менее определенна, чем окрашивающегося в красный цвет компонента, о котором говорилось выше. В настоящее время допускается, что во время кислотного гидролиза или переваривания рибонуклеазой

на хроматиновых тельцах отлагаются вещества, отсутствующие в нормальном состоянии. Это предположение должно также объяснить ненормально высокую плотность хроматиновых телец при электронной микроскопии гидролизированных бактерий [Мадд (Mudd) и Смит, 1950] или бактерий, переваренных рибонуклеазой с последующей обработкой пепсином (Питерс и Уигенд, 1953; Уигенд и Питерс, 1954).

Неприятные сами по себе эти цитохимические неопределенности не имеют непосредственного отношения к *морфологической* проблеме, представленной хроматиновыми тельцами, структурами, которые, несмотря на все, ясно видны уже на неокрашенных препаратах.

Описанная только что комбинация метода Гимза с кислотной обработкой применима в общей работе, но является менее дифференцирующей, чем метод Фельгена. Для фотографического протоколирования хроматиновых деталей в настоящее время часто применяется модификация метода Фельгена, введенная в бактериальную цитологию ДеЛяматером (DeLamater, 1951a). Она основана на опытах Этвуда и Оринштейн (Atwood, Orinstein, 1949). В этом методе фуксин в реактиве Шиффа, входящем в стандартный метод Фельгена, заменен тионином или азуром А. При применении модификации ДеЛяматера получаются очень четкие и изящно окрашенные препараты бактериального хроматина. Автор нашел, что сходный метод Гюбшмана (Huebschman, 1952) почти так же применим, но как будто оставляет меньше осадка краски на препарате. ДеЛяматер настаивает на том, что при обезвоживании в сильно нагретом спирте клеток, окрашенных по этому методу, повышается количество видимых деталей, но это никогда не было доказано. В опытах, в которых одни и те же окрашенные бактерии первоначально изучались в воде, а затем повторно после обезвоживания по методу ДеЛяматера, я обнаружил точное сохранение, но не увеличение количества видимых хроматиновых деталей.

Специальные проблемы, возникающие при окраске бактериального ядра, указаны в совсем недавней работе Кессел (Cassel) и Хатчинсона (1955), с которой автор познакомился слишком поздно, чтобы обсуждать ее в настоящей статье.

СВОЙСТВА И ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ХРОМАТИНОВЫХ ТЕЛЕЦ

[a) *Цитологическая терминология*

Постоянное наличие хроматиновых телец в вегетативных бактериях и спорах свидетельствует о том, что они являются неотъемлемой частью бактериальной клетки. Положительная реак-

ция Фельгена, которую дают хроматиновые тельца при наличии увеличения количества последних при росте и делении, склонило многих к предположению, что хроматиновые тельца представляют собой эквивалент ядра у бактериальных клеток. Протистологи, больше чем кто-либо широко знакомые с разнообразием ядерной организации, были настроены критично к этой идее, исходя из морфологических оснований. Генетики допускали ее потому, что она не противоречила их открытиям, хотя некоторые выражали сомнение, насколько кариологическое изучение бактерий может вообще иметь значение [Огинский и Амбрейт (Oginski, Umbreit), 1954].

Плодотворная дискуссия по этому предмету может быть проведена только в том случае, когда будет признано, что в биологических сочинениях термин «ядро» применяется в трех различных и частично совпадающих контекстах химиками, генетиками и морфологами и что из этих трех описания ядра морфологом наиболее проницательны, наименее двусмысленны и наиболее легко могут быть проверены.

Цитологи определяют ядро как нечто, возникающее из группы хромосом. Они рассматривают общую морфологию покоящейся фазы как предмет второстепенного значения, но отчетливо различают различные разновидности ядра соответственно *поведению хромосом в течение деления*. Большинство ядер в растущих тканях высших растений и животных делится митотически, но хромосомы ядра высших организмов и простейших могут также расти и размножаться другими способами, включая прямое деление или *амитоз* [Гейтлер (Geitler), 1942, 1953; Грелл (Grell), 1953б]. Постоянно делятся таким образом макронуклеусы реснитчатых простейших и сукторий. Значение амитоза все еще часто недооценивается вне кругов протозоологов. Важно знать, что недавние опыты Зоннеборна [(Sonneborn), 1947; Биль (Beale), 1954] и исследования других ученых показали, что макронуклеусы генетически активны, доминируя над микронуклеусами, которые играют ведущую роль лишь при конъюгации, и достаточны сами по себе для размножения животных нормального строения и активности, у которых не происходит конъюгация. Макронуклеусы замечательны цитологически тем, что они образуются из хромосом путем повторного эндомитотического деления (Грелл, 1953а), но не дают начало хромосомам при своем делении.

Цитологи полагают, что все организмы имеют ядра, за исключением синезеленых водорослей и бактерий. Эти два класса организмов имеют загадочные хроматиновые структуры, но не хромосомы, следовательно, в строгом смысле и не ядра.

Эта значительно упрощенная схема существующих концепций о типах ядер указывает, что прежде чем мы сможем отнести описанные бактериальные хроматиновые тельца к известным типам ядер, мы должны выяснить, как они делятся и имеют ли они хромосомы.

б) *Наблюдения над живыми клетками*

Деление живых хроматиновых телец было изучено у Escherichia coli (Кноелль и Цапф, 1951; Стимпен, 1950) и у протея (Тюлянь, 1949; Стимпен и Хатчинсон, 1951), и в каждом случае было получено впечатление существования простого прямого процесса (рис. 1). Никто не видел что-либо сходное с изменением ядерных пузырьков и скоплений хромосом в митозе, знакомым по микрокинофильмам культур тканей, допустим, фибробластов млекопитающих или сперматоцитов саранчи. Напротив, характерным для живых хроматиновых телец бактерий является то, что они всегда, по-видимому, находятся в *одном и том же* физическом состоянии. Однако неопределенность деталей даже в лучших фазово-контрастных микрофотографиях делает невозможной уверенность, что составные части хроматиновых телец, невидимые при жизни, не подвергаются сложным процессам деления (Клифтон и Эрхерд, 1952).

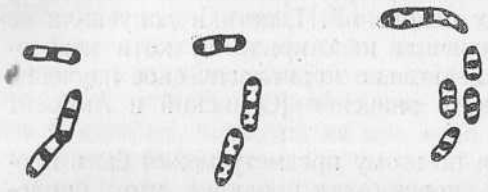


Рис. 1. Изменения в структуре живых Escherichia coli, видимые в фазовоконтрастный микроскоп. Снимки сделаны с интервалами в 20 минут (по Кноелль и Цапфу, 1951).

в) *Общие замечания о свойствах хроматиновых телец, выявляемых на окрашенных препаратах*

Процесс деления хроматиновых телец будет в конечном счете восстановлен по электронным микрографиям серийных ультратонких срезов. Тем временем приближение к действительности может быть получено из анализа фиксированных и окрашенных препаратов.

Первые полезные наблюдения Стайла (1937) и Пекарского (1937) были сделаны на окрашенных по Фельгену препаратах Bacillus subtilis и Salmonella paratyphi. В выбранной для изучения стадии роста хроматиновые тельца обоих видов обнаруживались в постоянном количестве и были расположены повсюду и симметрично. Сравнение бацилл различной длины показало, что хроматиновые тельца увеличиваются в количестве в зависимости от длины бацилл. На этом материале могло быть разработано соответствующее действительности восстановление процесса деления хроматиновых телец, потому что деление было связано непосредственно с рядом точно определенных показателей, т. е. различной длиной бацилл, составляющих данный обра-

зец. У видов, у которых свойства хроматиновых телец не имеют непосредственного отношения к росту клетки, восстановление их процесса деления должно всегда быть более или менее произвольным.

В этих ранних экспериментах нельзя почерпнуть ничего полезного относительно *структуры* хроматиновых телец, которые при примененных методах исследования были очень малы. Мнение, что хроматиновые тельца представляют собой нечто родственное ядрам, таким образом, основывалось единственно на их положительной реакции Фельгена и соответствии их деления делению клетки. С морфологической точки зрения эти свойства недостаточны для определения ядра. Цитологическое положение хроматиновых телец может быть определено лишь по детальному ознакомлению со *строением* и поведением отдельных телец в покоящемся состоянии и при делении. У Bacillus cereus подобные данные могут быть получены, хотя в настоящее время и недостаточно, при изучении препаратов вегетативных бацилл, потому что их хроматиновые тельца относительно крупны и часто расположены симметрично (табл. 1, *2—5*). Более трудной эта задача является у вегетативных форм B. megaterium, так как у них хроматиновые тельца часто расположены беспорядочно и очень плотно скучены (Смит, 1950; табл. 1, *9*).

Наиболее удовлетворительным материалом для изучения отдельных хроматиновых телец было бы, очевидно, отдельное хроматиновое тельце достаточно крупных размеров, деление которого могло бы быть индуцировано. Подобной клеткой является спора, и изучение поведения хроматиновых телец в синхронно прорастающих спорах дало наиболее полезные сведения об их характере деления из всех данных, полученных пока при помощи оптического микроскопа.

г) *Поведение хроматиновых телец в процессе прорастания спор*

Самостоятельные наблюдения над покоящимися спорами Bacillus megaterium при помощи двух прямых методов — метода срезов и метода разрушения [Робинау (Robinow), 1953; Фитц-Джемс (Fitz-James), 1953] — показали, что хроматин в них расположен в виде кольца или вариантов такового, состоящего по крайней мере из трех сегментов. Хотя в немногих случаях эти сегменты кажутся настолько тесно соединенными, что образуют форму целого круглого ободка, большинство расположено более свободно в виде четкообразного кольца. Многие из последних структур разорваны в одной особой точке, возможно в результате дезинтеграции. Отмечаются также треугольные формы, а у некоторых три расходящиеся ветки образуют зубцеобразную структуру. У немногих встречаются S-образные и

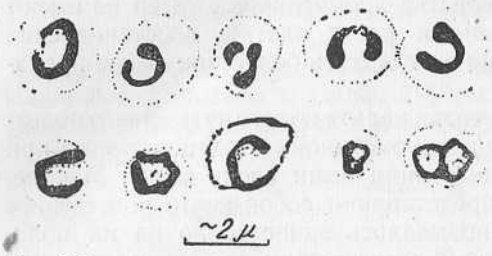


Рис. 2. Расположение хроматина в покоящихся спорах Bacillus megaterium. Верхний ряд: срезы спор; нижний ряд: механически разрушенные споры. Рисунки с микрофотографий препаратов, обработанных рибонуклеазой и окрашенных по Гимза (Фитц-Джемс, 1953; Робинау, 1953). Увеличение лишь приблизительное.

восьмерочные конфигурации (Фитц-Джемс, 1953). Имеется поразительное сходство между характером расположения хроматина спор (рис. 2) и разнообразием форм бесхромосомного ядра паразита малярии птиц Plasmodium elongatum, описанного Ченом (Chen, 1944) и изображенного на рис. 3. Я не утверждаю, что имеется прямая связь между бактериями и простейшими. Хроматиновое тельце P. elongatum приведено здесь только в виде геометрической модели, чтобы помочь нам отчетливо представить пространственное расположение хроматина в покоящихся бактериальных спорах.

Та же конфигурация, которую мы впредь будем называть коротко «кольцом», неоднократно описывалась также в целых спорах в ранних стадиях подготовки к прорастанию [Робинау, 1942; 1945; Хантер (Hunter) и ДеЛяматер, 1952]. Некоторые современные исследования дают достаточно сходные представления о последующем поведении хроматина спор. Через какие-нибудь 10 минут при 37° на среде, пригодной для прорастания, кольца хроматина больше не обнаруживаются. Вместо них в центре каж-

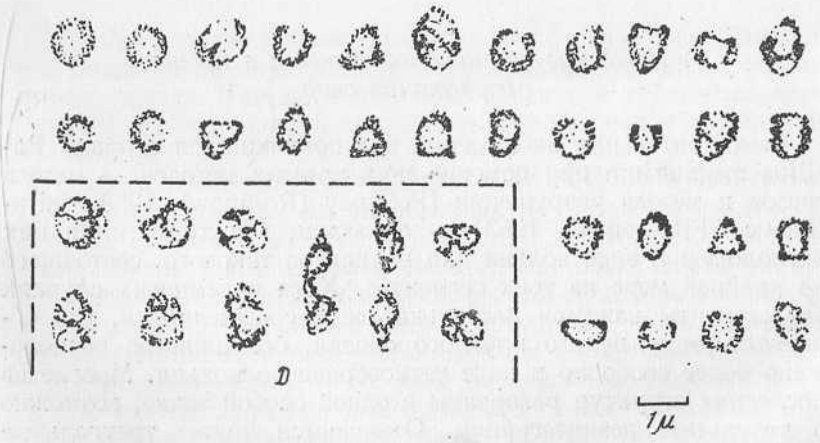


Рис. 3. Ядра Plasmodium elongatum. *D* — делящиеся ядра в шизонтах по Чену (1944).

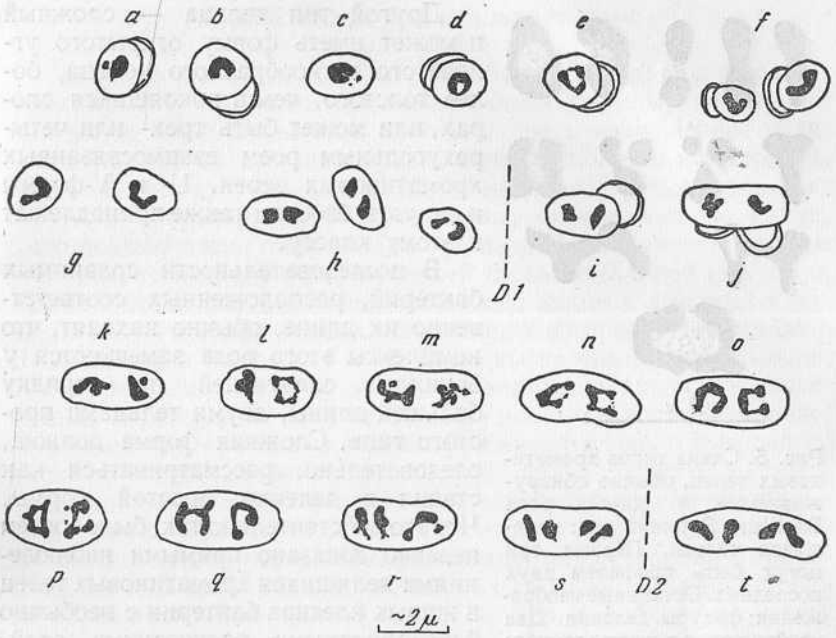


Рис. 4. Bacillus megaterium. OsO_4, HCl, Азур-А, SO_2. Стадии размножения хроматиновых телец во время развития прорастающей споры с одним хроматиновым тельцем *(a)* в бациллу с четырьмя хроматиновыми тельцами *(t)*. Зарисовано с микрофотографий, которые будут опубликованы в дальнейшем. Клетки *(p)* и *(q)* показаны также в табл. 2, *7*. Последовательность продолжена в табл. 2, *9*. D_1 указывает на конец первого деления. Фигуры от *j* до *r* представляют хроматиновые тельца, совершающие второе деление. Процесс завершается на D_2.

дой споры можно обнаружить одиночное круглое хроматиновое тельце (Робинау, 1942, 1945; Пекарский, 1952; Хантер и ДеЛяматер, 1952).

Все хроматиновые тельца вегетативных бацилл являются потомками одиночного тельца в прорастающей споре и поэтому гомологичны. Последовательные деления одного исходного тельца во время прорастания и раннего вегетативного роста Bacillus megaterium изображены на рис. 4 и в табл. 2, *7—9*. Хроматиновые тельца в этом материале и в любом другом у вегетативных бацилл обычно бывают в одном из двух состояний. Один тип телец представляет собой простую плотную полоску или имеет гантелеобразную форму. Другой, встречающийся реже, простой тип имеет форму, подобную маленькому или узкому овалу (рис. 5, табл. 1, *3*, *5* и *9*). Возможно, что овалы и палочки представляют собой только два различных аспекта, фас и профиль, одного основного дисковидного тельца, но это еще не установлено с достоверностью.

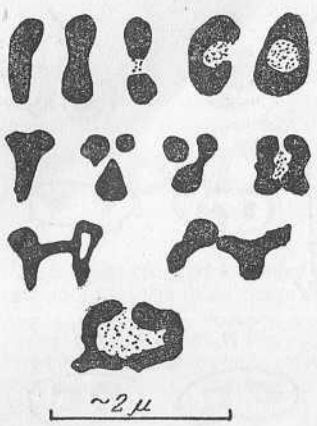


Рис. 5. Схема типов хроматиновых телец, обычно обнаруживаемых у клеток рода Bacillus. Верхний ряд: делящиеся тельца. Первые три могут быть профилем двух последних. Остальные изображения: фигуры деления. Два изображения в центре второго ряда иногда объяснялись как покоящиеся ядра с тремя хромосомами. Пунктир указывает проблематические внутриядерные «основы», упоминаемые в тексте. Сравните с табл. 1, *3—9*.

Другой тип тельца — сложный и может иметь форму открытого угловатого четкообразного кольца, более толстого, чем в покоящихся спорах, или может быть трех- или четырехугольным роем взаимосвязанных хроматиновых зерен. U- и V-формы и силуэты бабочки также принадлежат к этому классу.

В последовательности сравнимых бактерий, расположенных соответственно их длине, обычно находят, что комплексы этого рода замещаются у бациллы, следующей по порядку большей длины, двумя тельцами простого типа. Сложная форма должна, следовательно, рассматриваться как стадия в делении простой формы. Что это действительно так, было совсем недавно доказано прямыми наблюдениями делящихся хроматиновых телец в живых клетках бактерии с необычно благоприятными оптическими свойствами, изолированной из коровьего навоза и подробно описанной в другом месте.

Кроме *делящихся* и *только что разделившихся* телец, возможно также различать тельца, которые находятся в состоянии *подготовки* к делению (табл. 1, *8*). Переход от одного типа к другому непрерывен. Все фазы его одинаково хроматичны и отсутствует особая покоящаяся стадия.

Что именно происходит во время деления — еще неясно. Простые трехмерные модели, сконструированные Фитц-Джемсом (1954), отражают некоторые из особенностей фигур деления, но не учитывают формы только что разделившихся телец. Недавние наблюдения позволяют думать, что «исходная триада» хроматиновых зерен автора сама по себе является стадией деления более простой структуры. Должна была бы также возникнуть мысль, что большинство фиксаторов дубят и укрупняют пропорции хроматиновых телец.

Триады на первый взгляд отдельных хроматиновых зерен, которые обычны в гидролизированных осмиевых препаратах и которые являются основной конфигурацией в модельной последовательности Фитц-Джемса, вероятно, представляют собой искусственно подчеркнутые утолщения в непрерывной хроматиновой структуре.

д) *Добавочные хроматиновые зерна*

ДеЛяматер и Мадд (1951) и ДеЛяматер (1953а) сделали важное открытие, что очень часто около более крупных хроматиновых телец обнаруживаются одно или два мелких зерна, видимых только за пределами разрешающей способности микроскопа. Зерна обычно круглы, но иногда удлинены. Существование этих структур в препаратах Bacillus cereus, окрашенных по Гимза, было подтверждено Марреем (рис. 6) и они были также выявлены у B. megaterium автором настоящей статьи и Хенней (Hannay). Крошечные добавочные зерна часто ясно видны в крупных клетках первой генерации бацилл, возникших из прорастающих спор B. megaterium (табл. 1, *6* и *7*). Было высказано предположение, что зерна выполняют функцию, связанную с закладкой поперечных перегородок (Байссет, 1953), но это кажется неправдоподобным, так как они часто обнаруживаются около одиночного хроматинового тельца прорастающей споры задолго до того, когда поперек молодой бациллы закладывается первая разделяющая стенка. Кроме того, у палочковидных форм одно или два добавочных зерна часто обнаруживаются между крайним хроматиновым тельцем и концом клетки, т. е. в точке, где перегородка не образуется. Возможно, что ДеЛяматер и Байссет не всегда имели в виду одни и те же структуры. Добавочные зерна не всегда легко видны в полностью выросших размножающихся вегетативных бациллах. Что они тем не менее там находятся и большей частью прячутся среди более крупных обычных хроматиновых телец, можно вывести из экспериментов Уайтфелда и Маррея (1955), в которых хроматиновые тельца, скопившиеся в центре клетки вследствие внезапного повышения концентрации соли в среде с 0,5 до 3%, оставили в светлой протоплазме добавочные зерна, где они теперь выступали очень четко (см. рис. 6). В этих исследованиях бациллы быстро адаптировались к пребыванию в новых условиях окружающей среды и их хроматиновые тельца в течение нескольких минут вновь заняли нормальное расположение.

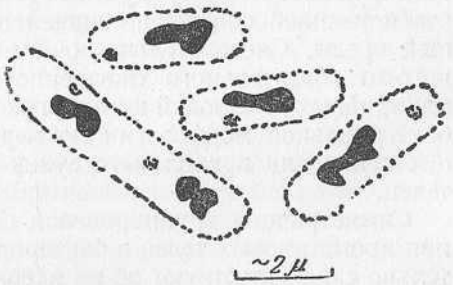


Рис. 6. Добавочные зерна («центриоли»), выявленные благодаря сокращению хроматиновых телец. $2^1/_2$-часовая культура Bacillus cereus на плотной среде из настоя сердечной мышцы (Дифко). Фиксация через 10 минут после пересева на ту же среду с 3% соли. В оставшейся культуре хроматиновые тельца вскоре перестраиваются сами в нормальные конфигурации. Рисунок с микрофотографии д-ра Р. Дж. Маррея.

Среди добавочных зерен и хроматиновых зерен мы не обнаружили волокон и их положение относи-

тельно делящихся и только что поделившихся хроматиновых телец на наших препаратах менялось неожиданно. Но сведения о свойствах этих элементов должны считаться неполными, так как они часто заслоняются более крупными хроматиновыми тельцами, и наши опыты не могут исключить возможности, что изменения количества и положения добавочных зерен действительно находятся в систематической связи с ростом и делением хроматиновых телец.

Положительная реакция Фельгена, которую дают мелкие зерна (табл. 1, *2*), и факт, что они не передвигаются вместе с хроматиновыми тельцами, когда последние перемещаются по всей клетке (см. рис. 6), делают неправдоподобным, что они функционируют как «центриоли» в том понимании, в котором этот термин применяется в общей цитологии [Шрадер (Schrader), 1953].

Никакое другое хорошо обоснованное толкование в настоящее время выдвинуто быть не может.

е) *Беспорядочное расположение хроматиновых телец*

Описание хроматиновых телец в предыдущих разделах основано на препаратах культур ранних фаз роста. Оно не обязательно должно быть верным в отношении хроматиновых телец из старых культур. Строение бактерий в культурах с ограниченным питанием подвергается во многих случаях изменениям, заметным с возрастом [Деляпорт (Delaporte), 1950]. Эти изменения, включающие образование спор, обязаны действию бактерий на окружающую их среду и могут неограниченно задерживаться стабилизацией снабжения пищей и других факторов окружающей среды. Следовательно, они не имеют значения стадий какого-то обязательного «жизненного цикла», характерного для малярийных плазмодий или других паразитов. Знание изменений бактериальной морфологии по мере старения тем не менее существенно для правильного суждения о природе хроматиновых телец.

Симметричная группировка и синхроничные движения деления хроматиновых телец в бактериях из молодых культур убедительно свидетельствуют об их ядерной природе и отвлекают внимание изучающих от размышления о свойствах *отдельного* тельца. Напротив, случайные формы и беспорядочное распределение хроматиновых телец в клетках из более старых культур (у многих видов) подчеркивает примитивное, скорее не ядерное, значение этих элементов.

Различия во внешности между клетками из очень молодых культур и клетками из более старых культур особенно заметны у крупных видов Bacillus, часто применяемых для цитологических наблюдений. У B. megaterium и B. mycoides в двух истори-

чески важных образцах различие обязано накоплению в цитоплазме большого количества ярко преломляющих зерен через несколько часов роста на всех обычных средах [де Бари (de Bary), 1884; Бейн-Джонс (Bayne-Jones) и Петрилли (Petrilli), 1933]. Блестящие зерна — капли липида [Льюис (Lewis), 1934; Деляпорт, 1939]. Липид, который был определен Лемуанем (Lemoigne), Деляпорт и Крозоном (Croson) (1944) как полимер β-гидроксимасляной кислоты, может быть выявлен при помощи судановой черной В [Гартман, 1940; Бурдон (Burdon), 1946], но не обычными красками. Поэтому липидные шарики выглядят в цитоплазме окрашенных бактерий как неокрашенные отверстия или «вакуоли» [Гийермон (Guilliermond), 1908; Шеде (Schaede), 1939]. Хроматиновые тельца выглядят нежнее, чем липидные шарики, и превращаются ими во множество различных форм (табл. 2, *10—13*). У бацилл со многими мелкими липидными шариками хроматиновые тельца сдавливаются между последними в тонких пластинках оставшейся цитоплазмы и выглядят фрагментированными, хотя, вероятно, в действительности это и не так. Бациллы в таком состоянии были описаны Гийермоном (1908) как имеющие рассеянные или «хромидиальные» ядра. Из литературы и из изображений в табл. 2 ясно, что хроматиновые тельца обремененных липидом бацилл не собираются в кучки постоянного количества внутри ядра, а лежат отдельно и независимо друг от друга в цитоплазме. После пересева в свежую питательную среду каждое хроматиновое тельце делится прямым делением и ведет себя как независимое единичное тельце или «ядро». Простая ситуация, в которой новый рост начинается от клетки, содержащей одно хроматиновое тельце, сжатое между несколькими крупными липидными шариками, изображено на рис. 8, но бациллы с «хромидиальными» ядрами также полностью жизнеспособны и в субкультурах их хроматиновые тельца, как бы они ни были искажены вначале, в конечном счете восстанавливают свой нормальный размер и внешность (Деляпорт, 1950; Робинау и Хенней, не опубликовано).

Липид — не единственное вещество, вероятно, изменяющее нормальное расположение хроматиновых телец в бактериальных клетках. Деляпорт (1939, 1950) приводила и другие примеры.

ж) *Индуцированное ненормальное расположение хроматиновых телец*

У грамотрицательных бактерий не всегда обнаруживается видимое накопление липидных капель, влияющее на морфологию хроматиновых телец. Но здесь имеется также выразительное доказательство большой пластичности хроматиновых элементов при различных условиях роста. Это, так же как их способность восстанавливаться после воздействий, которые полностью разру-

шают их нормальное строение и расположение в клетке, было четко описано Джонсоном и Греем (1949), Келленбергером (1953) и Уитфелдом (1955), с поучительными исследованиями которых необходимо познакомиться в оригинале.

Здесь следует также упомянуть о таинственных сетках хроматина в некоторых ненормальных, но жизнеспособных формах, спонтанно возникающих у грамотрицательных бактерий (Стимпен и Хатчинсон, 1951) или индуцируемых у них небольшими концентрациями LiCl или CsCl [Браун, Берг, Кесслер и Мавроиди (Braun, Berg, Kessler, Mavroidi), 1954].

з) *Поведение хроматиновых телец в период образования спор*

До сих пор не проводится систематическое изучение поведения хроматиновых телец во время спорообразования. Достигнуто единое мнение в том, что только одно из нескольких хроматиновых телец, первоначально имеющихся в споровой бацилле, включается в спору. Но мнения различны относительно природы явления, которое ведет к отделению одного привилегированного хроматинового тельца от других, обреченных на разрушение. У Clostridium oedematiens и Bacillus mycoides [Бадиан (Badian), 1933; Клинеберг (Klieneberger), 1945], B. anthracis [Флюэтт (Flewett), 1948] и C. tetani [Байссет (Bisset), 1950] были обнаружены хроматиновые тельца, слившиеся в сплошной осевой стержень с начала процесса образования споры, и это рассматривалось как явление, имеющее генетическое значение. В настоящее время имеются серьезные основания для того, чтобы сомневаться в этом. Хроматиновые тельца споровых, так же как и неспоровых видов, могут на некоторое время собираться в осевую нить при воздействии холода, антибиотиков, при нахождении в среде с высоким pH или при внезапном повышении концентрации соли в среде. Эти изменения, в которых по Утфелду (1955) всегда имеется непрямое влияние соли, легко обратимы. Осевые нити хроматина, например, которые встречаются нормально в бациллах из относительно старых, но еще не приступивших к формированию спор, культур B. cereus, и которые так ясно показаны Чепменом и Хиллье (Chapman, Hillier, 1953) в ультратонких срезах этого микроба, восстанавливают хроматиновую конфигурацию, типичную для очень молодого роста в течение нескольких минут после пересева в свежую питательную среду (личное сообщение Маррея).

С точки зрения этих наблюдений в настоящее время кажется сомнительным, является ли образование осевых нитей, связанное с образованием спор, чем-то бо́льшим, чем неспецифическим и обратимым ответом на изменения в окружающей среде или на изменения проницаемости клеток или на то и другое вместе. Эти сомнения подкрепляются фактом, что споры могут формироваться

в бациллах, у которых обычно хроматиновые тельца расположены в беспорядке между многочисленными липидными шариками и принимают форму осевой нити лишь изредка и, вероятно, потому, что площадь этой формы оказывается единственной, имеющейся в их распоряжении.

Образование спор при этих условиях было ясно описано Деляпорт (1950) у B. cereus. Ее мнение, которое в значительной степени соответствует исследованию автора над B. megaterium, стоит цитировать полностью: «Если мы наблюдаем окрашенные клетки, например, в 16-часовой культуре B. cereus, мы видим много клеток, в которых несколько зерен ядерного вещества («хроматиновые тельца» в настоящей статье) локализуются между липидными шариками; следовательно, ядерное вещество разбросано между шариками в двух-шести (в отдельных случаях больше) основных центрах. Каждое из этих ядерных зерен клетки кажется полностью отделенным от других, но возможно, что они соединены невидимыми связями. Немногие клетки имеют только один ядерный элемент в форме осевой нити, а многие клетки в это время уже начали формировать споры... Во-первых, все ядерные зерна внутри клетки выглядят одинаково, но при истинном начале образования споры одно зерно, располагающееся ближе всех к краю клетки (см. табл. 2, *15*), выглядит немного крупнее. Затем цитоплазма кругом этого зерна становится более гомогенной и плотной, без шариков, и окрашивается по методу Гимза в розовый цвет... Эта часть, которая развивается в спору, вырастает и приобретает овоидную форму...» Открытие Деляпорт согласуется с ранними наблюдениями Гийермона (1908) и объясняет их.

Фотомикрографии спорулирующих клеток B. megaterium, многие из которых напоминают изображения Деляпорт (1950), были опубликованы ДеЛяматером и Хантером (1952; рис. 4, 8, 9, 10, 12, 13 и 14). Авторы устанавливают, что «никогда не наблюдались доказательства появления палочковидного ядра в процессе споруляции», однако их рис. 12 и 14 представляют собой ясные примеры подобных ядер. Расхождение во мнениях между Деляпорт и американскими авторами относительно природы этих форм заключается в том, что Деляпорт, наблюдая осевую нить (ядерного вещества), сдавленную между каплями жира, относится к ней как к «осевой нити», в то время как ДеЛяматер и Хантер, игнорируя жир, называют ее «удлиненной телофазной стадией деления».

Виды, подобные Bacillus megaterium, чьи клетки неизменно образуют липид, не могут быть лучшим образцом для детальных исследований поведения хроматиновых телец во время образования спор. В беспорядочном расположении хроматиновых телец, стесненных липидными шариками, невозможно проследить происхождение крошечных концевых хроматиновых зерен, вокруг которых образуется спора. Виды бацилл, которые образуют

мало липида или не образуют его совсем, или у которых образование липида может быть поставлено под контроль, являются более благодарными объектами для изучения образования спор, чем B. megaterium.

Флюэтт (1948), а также ДеЛяматер иХантер (1951) нашли, что мелкие споры первоначально обнаруживаются в нежном кольце, включенном в нехроматиновое вещество (табл. 2, *16*). Это раннее и скоропреходящее появление кольца хроматина в срезах и разрушенных спорах в настоящее время также выявлено в зрелых, свободных, покоящихся спорах (см. рис. 2).

Любопытным фактом является то, что расположение хроматина в зрелых покоящихся спорах напоминает скорее *делящиеся*, чем «покоящиеся», хроматиновые тельца вегетативных бацилл и напоминают также стадии *деления* Plasmodium elongatum (см. рис. 3).

Резюмируя все сказанное, мы видим, что много остается еще неясного относительно роли хроматиновых телец в образовании спор.

У B. megaterium спора возникает на одном конце клетки из крошечного гиперхроматинового зерна, происхождение которого не было определено, но которое, вероятно, возникает в неразрывной связи с преформированными хроматиновыми тельцами.

Точечная начальная стадия хроматина споры позже изменяется в кольцо, которое продолжает существовать во время покоящейся фазы и еще ясно заметно в начале прорастания. Наблюдения Клинебергер, Флюэтт и Байсетта говорят о том, что поведение хроматиновых телец во время образования спор везде такое же, как у B. megaterium.

и) *Синхронизация образования спор*

У большинства вегетативных бацилл в сливающемся росте культур B. cereus и B. megaterium на чашках можно вызвать начало образования спор одновременно в намеченное время. Если культуры B. megaterium на чашках с агаром на картофельном экстракте первоначально культивировать 18 часов при 16—20°, а затем при 37°, большинство бацилл начинает формировать споры через 3—4 часа. Например, на табл. 2, фото *16* сделано с культуры, в которой $^2/_3$ бацилл находились в одной и той же ранней стадии образования спор через 4 часа после смены температуры. При соблюдении постоянных условий момент начала образования спор может быть точно предсказан.

Этот метод полезен в цитологической работе, где он дает объективную основу для объяснения последовательности морфологических изменений. Он может быть также применен в физиологических исследованиях.

к) *Общие свойства хроматиновых телец*

Исследования при помощи оптического микроскопа в настоящее время позволяют сделать следующие общие выводы.

Многочисленные хроматиновые тельца у растущей палочковидной бактерии представляют собой точные копии одной единицы и гомологичны. Одиночное тельце является простым в том смысле, что его хроматиновое вещество заключается в одной массе. Четковидные хроматиновые тельца, обычно видимые во время деления, составляют сплошные структуры, а не скопления отдельных зерен.

Форма хроматиновых телец и их распределение в клетке подвержены крайним изменениям, вызванным иными причинами, чем перемещения, связанные с делением. У бацилл, содержащих много липида, количество и поведение отдельных хроматиновых телец определить невозможно. Бациллы в этих условиях тем не менее вполне жизнеспособны.

На электронных микрографиях ультратонких срезов бактерий хроматиновые тельца или нежно-зернисты (Чепмен и Хиллье, 1953), или наполнены беспорядочно переплетающимися волокнами различной степени толщины [Бредфилд (Bradfield), 1954; Бирч-Эндерсен и др., 1953; Томлин и Мэй (Tomlin, May), 1955; Маррей, Хенней, не опубликовано]. Толщина волокон как будто имеет отношение к содержанию соли в культуральной среде и фиксаторе. В одном образце хроматиновые тельца имеют одинаковое нежное строение между делениями и во время их. Методы фиксации и срезов для электронной микроскопии, которые постоянно выявляют отчетливые оболочки вокруг ядер клеток высших организмов и простейших, как правило, не в состоянии показать оболочку на поверхности хроматиновых телец. Эти единицы должны поэтому рассматриваться как лежащие непосредственно и обособленно в цитоплазме.

На электронных микрографиях вегетативных бацилл хроматиновые тельца никогда не были обнаружены внутри ядра. ДеЛяматер (1954) считает, что он нашел ядро в форме «резко очерченного пузырька со скоплением, можно думать, хромосомного материала» в срезах Бирч-Эндерсена и др. (1953), но это толкование исходит из путаницы размеров. Пузырьки, о которых идет речь, измеряются в микронах и представляют собой профили целых хроматиновых телец или «хромосом» (по ДеЛяматеру), что без труда обнаруживается, если сравнивать рис. 1 Бирч-Эндерсона и др. (1953) с рис. 6 и 18 ДеЛяматера (1953б, стр. 174). Нити на срезах пузырьков, составляющие хромосомное вещество, измеряются в миллимикронах и ангстремах и должны быть невидимы в оптическом микроскопе!

Что еще стоит на пути полного описания хроматиновых телец, так это неопределенность относительно природы и расположения своеобразного нехроматинового вещества, которое при

некоторых условиях кажется ассоциирующимся с ними (Маррей, 1953). Это вещество наиболее заметно после фиксации метиловым спиртом — формалином и в меньшей степени, но все же заметно, после фиксации осмием. Недавно разделившиеся («покоящиеся») хроматиновые тельца в препаратах, окрашенных по Гимза, кажутся состоящими только из хроматинового вещества, но фигуры деления часто выявляют включенную в них основу нехроматинового вещества, более преломляющего свет, чем обычная цитоплазма. Внезапное появление этого вещества во время деления выдвигает вопрос, не находится ли оно постоянно в хроматиновых тельцах, но обычно не заметно, потому что мы видим последние преимущественно в профиль. Нехроматиновый центр в С-образном «покоящемся» хроматиновом тельце, о котором упоминалось выше, может прекрасно представлять собой начало «основы» в фигурах деления.

Наблюдались другие примеры хроматиновых структур с сердцевиной из нехроматического вещества: хроматиновое тельце в покоящихся спорах, сетка хроматиновых нитей, которые Уитфелд (1955) описал у Shigella dysenteriae, дисковидные тельца с хроматином по краю, которые Хеллинг (Hoelling, 1910) видел у Fusiformis и который напоминает сходные формы, позже обнаруженные Пешковым (1945) в изолированных клетках механически разрушенных трихом у Caryophanon latum и в целых трихомах Прингсхеймом (Pringsheim) и Робинау (1947), и, наконец, хроматиновые тельца Bacteroides (Дайнс и Смит, 1944). Короче говоря, кажется вполне возможным, что палочковидный или гантелеобразный вид хроматиновых телец (см. рис. 5), как указывалось выше, на самом деле является боковой стороной дисковидных или чечевицеобразных элементов с нехроматической сердцевиной и толстым хроматиновым краем. Внешний вид этого гипотетического хроматинового тельца, которое должно было бы рассматриваться как совершенно открытая структура, исходит из формы Plasmodium elongatum (см. рис. 3), чье соответствие с хроматином покоящихся спор уже было отмечено выше.

Большинство данных, полученных при просмотре ультратонких срезов, еще не может иметь прямое отношение к исследованиям гидролизированных окрашенных препаратов, но поскольку дело касается только этого, они поддерживают идею о наличии сердцевины в хроматиновых тельцах. Внутри хроматиновых телец B. cereus и в четырех удачных продольных срезах через клетку B. thuringiensis, сделанных Хенней, были обнаружены небольшие включения плотного вещества, отличающегося от обычной цитоплазмы (Чепмен и Хилльe, 1953). В срезах B. thuringiensis, так же как в срезах, полученных Томлин и Мэй (1955), можно видеть, что плотное вещество, которое выглядит как сердцевина в одной плоскости, находится в связи с цитоплазмой в другой плоскости. «Сердцевина», как уже подозревали Чепмен

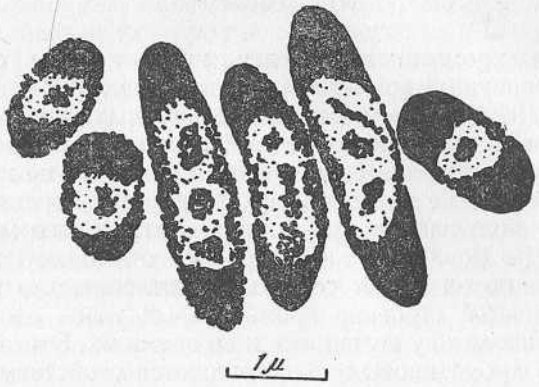


Рис. 7. Скопления хроматиновых телец (белые формы) у Escherichia coli K12, выживших в питательном бульоне в присутствии 3 μг/мл ауреомицина. В хроматиновых тельцах видны «сердцевины», плотность которых является промежуточной между плотностью хроматина и плотностью цитоплазмы. Рисунок с электронной микрографии Келленбергера (1953, рис. 15).

и Хиллье, должна поэтому, вероятно, рассматриваться как цитоплазма, модифицированная благодаря тесной связи с хроматиновым веществом.

Отсутствие оболочки вокруг хроматина и общность сердцевины с цитоплазмой объясняют легкость, с которой отдельные хроматиновые тельца и их сердцевины сливаются вместе, образуя кольца и цепочки колец (рис. 7), показанные с большой четкостью у Escherichia coli K12, подверженных действию сублетальных концентраций ауреомицина (Келленбергер, 1953), и возникавшие у других бактерий благодаря ряду других причин (ДеЛяматер, 1953; Уитфелд, 1955).

На электронных микрографиях Келленбергера нехроматическая внутренность колец незначительно отличается от окружающей цитоплазмы в противоположность тому, что имеет место при исследовании в оптическом микроскопе. При обычном свете ауреомициновый артефакт выглядит в виде плотного куска хроматина. В красном свете он представляется в виде кольца со светлым центром, который не состоит из хроматина, но дает большее светопреломление, чем обычная цитоплазма. Эти артефакты должны рассматриваться как преувеличения нормального строения хроматиновых телец, но они обратимы, не тормозят жизненных процессов, и не кажется невероятным видеть в них, как в ядрах Plasmodium elongatum, приблизительно истинное изображение структур, чьи настоящие форма и строение до сих пор не могли быть с уверенностью описаны.

л) *Сходство*[1]

Простота хроматиновых телец придает этим структурам характер, присущий исключительно им, и можно согласиться с Гейтлером (1942), одним из наиболее опытных цитологов нашего времени, когда он приветствует открытие хроматиновых телец как последнее доказательство того, что бактерии не имеют ядра.

Морфологические критерии ядер в настоящее время основаны на данных, полученных при помощи оптического микроскопа. Микроскоп не может выявить строение отдельного хроматинового тельца, но он может создать впечатление, что в пределах его возможностей строение хроматиновых телец одно и то же в промежутках между делениями и во время их. Этот факт и способ деления хроматиновых телец являются свойствами, которые мы использовали в попытках выявить их сходство с известными типами ядер. Оптические и электронные микрографии согласованно показывают, что хроматиновые тельца кокков осуществляют прямое деление [Добелл (Dobell), 1911; Найзи (Knaysi), 1942; Робинау, 1942; Байссет, 1954; Брэдфилд, 1954; Уйгенд и Питерс, 1954]. В препаратах тонких бацилл, таких, как Bacillus subtilis, исследуемых в оптическом микроскопе, также не обнаруживается ничего, указывающего на то, что деление хроматиновых телец включает что-нибудь более сложное, чем простую констрикцию. Хроматиновые тельца в крупных бактериях также делятся простым делением, но так как они оптически лучше различимы, термин «констрикция» не может дальше достаточно определить то, что при этом обнаруживается. Как описано выше, деление хроматинового тельца, скажем B. cereus, обычно начинается на одном конце, но не в середине, и развивается до завершения деления через ряд V- и U-образных форм. Почкообразный вид некоторых делящихся хроматиновых телец — другая особенность, которая делает «констрикцию» не подходящей для описания деления.

Прямое деление хроматиновых телец напоминает поведение макронуклеусов (Пекарский, 1949). Принятая всерьез, эта аналогия означала бы, что хроматиновые тельца возникают путем повторных эндомитозов групп хромосом. Это не было обнаружено. Больше того, факты, полученные бактериальной генетикой, не подтверждают идею, что хроматиновые тельца в нормальном состоянии высокополиплоидны.

Сходство с известными хроматиновыми органами мы должны искать в другом. Направление нашего исследования не может подвергаться сомнению. Если не придавать значения неразрешенным вопросам деталей, часто выявляется поразительное общее сходство между хроматиновыми тельцами бактерий и хрома-

[1] Речь идет о сходстве хроматиновых телец бактерий с хроматиновыми структурами других организмов. *Ред.*

тиновыми тельцами синезеленых водорослей. Невозможно изучать великолепные фотографии Synechococcus и Gloecapsa, Oscillatoria, Fremyella и Microcoleus в последних трудах Кесселя и Хатчинсона (1954) без того, чтобы не отдать себе отчет в этом сходстве. Изучение подобных препаратов, сделанных Трайнт в нашей лаборатории, усиливает это впечатление. Наиболее сильное сходство наблюдается между фазово-контрастными изображениями живых нитчатых Myxophyceae и фиксированными по Буэну и окрашенными тионином препаратами палочковидных бактерий из очень молодых культур (табл. 1, *3*). Хроматиновые органы синезеленых водорослей во многих отношениях более сложны, чем у бактерий. В некоторых случаях они кажутся построенными из многих мелких и взаимосвязанных хроматиновых телец того же образца, которые (единичные или множественные) найдены у бактериальных клеток. Хроматиновые структуры обоих классов организмов одинаково лишены ограничивающей оболочки, делятся простым путем, без образования веретен и выявляемых хромосом и не имеют особых покоящихся стадий.

Нет ничего удивительного в этом сходстве. Синезеленые водоросли долгое время были известны как более близко относящиеся к бактериям, чем к каким-либо другим группам организмов. Те и другие встречаются в одинаковых основных формах (кокки, палочки, спирали, цепочки), один бесцветный организм Caryophanon latum Пешкова, отнесенный к бактериям благодаря его перитрихиально расположенным жгутикам, имеет в естественных условиях обитания клеточное строение и пропорции вида Oscillatoria; и, наконец, было показано, что бактерии и синезеленые водоросли имеют общее свойство — это единственные микроорганизмы, содержащие диаминопимелиновую кислоту [Уорк и Дьюей (Work, Dewey), 1953; Стеньер (Stanier), 1954].

Представляется желательным, чтобы несомненные морфологические различия определялись при помощи определенных терминов. Хроматиновые органы у Myxophyceae и у бактерий, хотя и различающиеся в деталях, имеют общим то, что они лишены большинства свойств, которые цитологи считают специфическими для ядер. Поэтому они должны быть названы как-то иначе, например «хроматиновыми тельцами». Они не становятся менее интересными, если их так трактовать. Фактически единственная опасность для прогресса знания может возникнуть из описания этих загадочных структур в терминах неоправданного сходства. Именно различные терминологии лучше, чем одинаковые, стимулируют дальнейшие исследования!

Кажется вполне возможным, что активности хроматиновых телец соответствуют таковым ядер, и генетики в некоторых случаях получили результаты, которые выгодно объясняются таким предположением [Уиткин (Witkin), 1951; Райен и Уэйнрайт (Ryan, Wainwright), 1954]. Постоянство содержания деоксирибонуклеиновой кислоты в бактериальных клетках, выросших в

разнообразнейших условиях [Колдуелл и Хиншелвуд (Caldwell, Hinshelwood), 1950], также свидетельствует о важном значении хроматиновых телец. Но в целом связь между морфологией и физиологией этих органелл пока еще очень слаба.

О НЕОБОСНОВАННЫХ ДОКАЗАТЕЛЬСТВАХ МИТОЗА У БАКТЕРИЙ

What is wanted is not the will to believe, but the wish to find out, which is its exact opposite.

BERTRAND RUSSELL (*Free Thought and Official Propaganda*, 1922).

Потребность чего-либо не есть желание верить, но стремление узнать, что является полной противоположностью.

БЕРТРАН РАССЕЛ (*Свободный разум и официальная пропаганда, 1922*).

Наблюдения, обсуждавшиеся на предыдущих страницах, указывают на то, что хроматиновые тельца бактерий, хотя и могут состоять из нескольких различных веществ, представляют собой морфологически простые структуры, которые делятся прямым делением. В противоположность этому ДеЛяматер и его сотрудники в Пенсильванском университете утверждают, что они получили «не только доказательство наличия у B. megaterium истинного митотического процесса, но также доказательство наличия ядра, внутреннее строение которого в основном сходно со строением, давно известным и принятым для более крупных форм» (ДеЛяматер и Мадд, 1951).

Подобная значительная разница в интерпретации одних и тех же наблюдавшихся фактов не должна остаться необъясненной.

ДеЛяматер открыл митоз сначала у вегетативных форм B. megaterium (ДеЛяматер и Хантер, 1951; ДеЛяматер и Мадд, 1951; ДеЛяматер, 1951б; ДеЛяматер, Хантер и Мадд, 1952). Опыты по митозу затем были применены для того, чтобы показать, что образование спор и их прорастание у B. megaterium представляют собой вегетативные процессы, не включающие ни слияния ядер, ни редукционного деления (ДеЛяматер и Хантер, 1952; Хантер и ДеЛяматер, 1952). Позже ДеЛяматер и его сотрудники изучали также другие бактерии, но их первые опубликованные работы являются до настоящего времени показательными по взглядам этой группы и методам, а обсуждение их замысла должно осветить причину и степень расхождения между ДеЛяматером и автором.

Проблема

Вегетативные палочки Bacillus megaterium — основной источник данных ДеЛяматера — обычно состоят из двух клеток, каждая из которых содержит по крайней мере по две группы

хроматиновых телец. В образцах из культуры, находящейся в состоянии логарифмического роста, все бациллы и все их хроматиновые структуры находятся в той или иной фазе непрерывно повторяющегося цикла роста и деления. Фактически правильнее было бы сказать, что каждая бацилла в такой культуре состоит из двух *делящихся* клеток. Свойства хроматиновых телец в этих бациллах не могут быть сразу выяснены. Прежде чем мы можем установить, как различные одновременно присутствующие хроматиновые скопления связаны во времени, мы обнаруживаем некоторое не связанное с ядром свойство бацилл, изменения которого во времени может быть объективно определено. *Рост в длину* является типичным в этом отношении и объективно устанавливает согласование во времени неизвестного процесса деления, который мы намереваемся изучить.

Цитолог, получающий случайный образец растущих бактерий, должен, следовательно, прежде всего расположить их в соответствии с длиной, а затем искать периодические изменения формы и размера хроматиновых телец, которые должны быть корригированы с ростом бактерий.

Было необходимо предпослать эти очевидные утверждения для того, чтобы с самого начала стало ясно, насколько отличался подход ДеЛяматера и Мадда (1951) к проблеме поведения хроматиновых телец. Цитолог, о котором говорилось в предыдущем абзаце, не знал наперед, как делятся хроматиновые тельца, и ставил опыты, чтобы узнать это. Не так поступили ДеЛяматер и Мадд. Они это знали заранее! Прежде чем представить доказательства, авторы декларировали свою уверенность в том, что «процесс митоза, или его эквивалент, так же необходим для бислогической стабильности и активности бактерий, как и у более крупных организмов» (ДеЛяматер и Мадд, 1951, стр. 503). Это априорное решение придает определенную окраску всем произведениям ДеЛяматера до сегодняшнего дня. Здесь не место опровергать в деталях совершенно неоправданное допущение универсальной необходимости митоза как средства равномерного распределения хромосом (авторы подразумевают «истинный» митоз, а не один из его физиологических эквивалентов), но синезеленые водоросли, близко относящиеся к бактериям, могут, вероятно, быть приведены в качестве примера организмов стабильных и активных, у которых никогда не было обнаружено наличие митотического деления.

Материал

А. *По поводу доказательств митоза у вегетативных бацилл*

ДеЛяматер и Мадд (1951) утверждали, что их фотографии «демонстрируют последовательность событий в митотическом процессе у Bacillus megaterium» (стр. 505). Это иллюзия! Имеются

три основные причины, почему это утверждение не может быть принято.

1) *Отсутствие доказательства генетической связи морфологических типов, составляющих предполагаемую последовательность деления.* Авторы представили свои доказательства в форме двух серий отдельных фотографий одиночных бацилл или небольших групп бацилл. В каждой бацилле указываются одно или два ядра, идентифицируемые как находящиеся в профазе, метафазе и т. д. Сразу же выясняется нечто случайное в этой «последовательности». Странным фактом является то, что длина бациллы не увеличивается непрерывно, а беспорядочно колеблется на протяжении хода воображаемого цикла митоза. Количество ядер в каждой бацилле также непредвиденно варьирует, хотя в целом остается неожиданно постоянным и равным четырем. Так, бацилла, 4 ядра которой находятся в «метафазе», по ДеЛяматеру и Мадду (1951, табл. 2, *3*), оказывается значительно длиннее, чем бацилла в «телофазе» (табл. 2, *13*), имеющая только 4 ядра из восьми, которые можно было рассчитывать найти у нее.

Ясно, что отдельные ядра были определены как находящиеся в той или иной фазе митоза больше потому, что они поддерживали фантастическое сходство со стадиями абстрактной последовательности митоза в умах авторов. Не было сделано попыток определить пригодность подобного сходства путем сопоставления его с ростом бактерий! Фотографии авторов образуют серии только в том смысле, что они снабжены последовательными номерами. Отсутствие *объективно доказуемой* связи приводит к невозможности рассматривать их как доказательство действительной последовательности процесса.

2) *Различные стадии предполагаемой последовательности митоза иллюстрируются примерами, взятыми из культур, несравнимых одна с другой* (ДеЛяматер и Мадд, 1951). Является характерным для растущих культур B. megaterium, что все составляющие их бациллы имеют в одно и то же время один и тот же общий вид. Это особенно справедливо для очень молодых культур того типа, который применяли ДеЛяматер и Мадд (1951) в своих исследованиях по митозу. Поэтому было удивительно обнаружить, что ход митоза иллюстрируется фотографиями по крайней мере двух различных сортов бацилл. Один сорт относительно крупный и имеет мелкие зернистые хроматиновые тельца в пенящейся цитоплазме (табл. 1, *5*, *6*, *7*, *8*, *9* и *11* и табл. 2, *1*). Все эти бациллы, кроме одной, служат для иллюстрации интерфазы и профазы ядер. Другие бациллы тонкие и имеют небольшое количество плотных хроматиновых телец в светлой цитоплазме (табл. 2, *3*, *4*, *8*, *11*, *12* и *13*). Бациллы этого сорта были использованы для иллюстрации метафаз и телофаз.

Эти же фотографии в различных комбинациях были применены в четырех опубликованных работах по митозу, цитированных выше, и в другом месте. Мимо них нельзя пройти без вни-

мания, отдавая предпочтение другим. Они представляют собой доказательство и заслуживают тщательного изучения. Разница между этими двумя сериями настолько велика, что делает фактически несомненным то, что они действительно произошли из культур, находившихся в различном состоянии роста, и таким образом их нельзя непосредственно сравнивать между собой. Обнаруживается, например, что все 5 бацилл на одном рисунке табл. 2 — одного сорта, а на другом — все семь другого сорта. Наиболее вероятно, что каждый из этих случайных образцов так однообразен, потому что он происходит из однородной культуры.

Можно решительно утверждать, что хроматиновые тельца в нормальных вегетативных бациллах в чистой культуре Bacillus megaterium никогда не располагаются поочередно в «крупные интерфазные ядра» и плотные «метафазные пластинки» ДеЛяматера и Мадда (1951). Их настоящие изменения при делении неуловимы и незаметны; взгляните, например, на рис. 7 и 8 в работе Смита (1950) и на табл. 1, *9* настоящей работы. ДеЛяматер и Мадд успешно создали иллюзию регулярного изменения совершенно различных хроматиновых конфигураций лишь на основании изображения разных фаз митоза с рисунками бацилл из различных культур, каждая из которых была однородной с точки зрения размера, структуры цитоплазмы и типа хроматиновых узоров. Двойное происхождение серий фотографий авторов еще больше снижает их ценность как доказательства действительной последовательности явлений.

3) *Распределение хроматина в клетках исходного материала авторов обнаруживает, что «интерфазные и профазные ядра» в сериях ДеЛяматера и Мадда (1951) представляют собой начальные агрегаты нескольких самостоятельных хроматиновых телец.* Разница между культурами, из которых ДеЛяматер и Мадд (1951) отбирали свои рисунки, может быть объяснена, если принять во внимание историю этих образцов. Авторы (стр. 504 цитированной работы) устанавливают, что их «цитологические препараты для изучения были приготовлены из культур, выросших на среде Мортона и Инглей, декстрозном питательном агаре и кровяном агаре... Посевы были сделаны из 18—24-часовых культур и культивировались на вышеуказанных средах в течение 2 часов при 37° перед приготовлением мазков». Каковы же были условия для ядер в клетках старых культур? Они должны были быть «интерфазными ядрами» в 18—24-часовых культурах в большей степени, чем в 2-часовых. Но были ли они там? Авторы не описали расположения хроматина в своем отправном материале (что удивительно в исследовании ядерного цикла), но это было сделано автором настоящей статьи и Хенней. Полученные результаты вполне определенны. Ни в одной клетке трех сортов 18—20-часовых культур, которые указанные авторы применяли для посева, не было ни «интерфазных», ни «профазных ядер» с

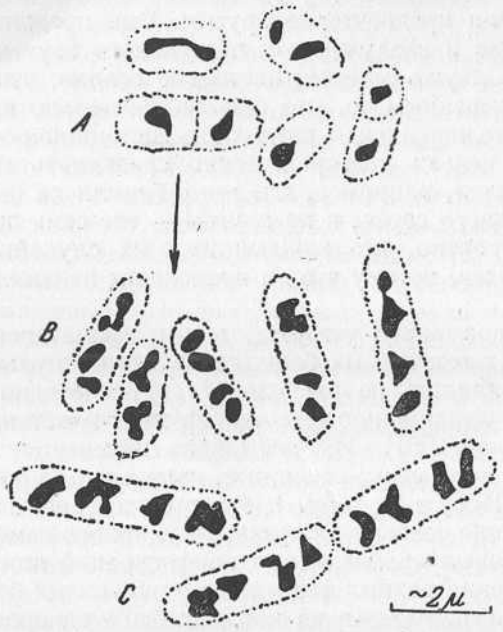


Рис. 8. *A* — Bacillus megaterium. 18 часов на кровяном агаре при температуре 37°. Хроматиновые тельца должны были бы быть изображены сжатыми между липидными шариками так, как в табл. 2, *10а*, *10в*, на которых основана эта схема; *B*, *C* — последовательные стадии прямого деления хроматиновых телец бацилл, обозначенных буквой *A*, после пересева на свежий кровяной агар. Все рисунки воспроизводят фотографии.

набором спутанных хромосом. Были только отдельные хроматиновые тельца (табл. 2, *10а*, *б*). После пересева в свежую среду клетки удлиняются и их хроматиновые тельца делятся прямым делением (рис. 8), каждое само по себе, без того, чтобы в данный момент или позже пройти через фазу, в которой они образуют интерфазные или профазные ядра, сходные с изображенными ДеЛяматером и Маддом (1951).

Каково же в таком случае происхождение этих крупных зернистых бацилл со сложным хроматиновым рисунком, о которых упоминают авторы профазных ядер? Наиболее вероятный ответ может быть найден в том факте, что клетки посевного материала авторов содержат большие количества липида (табл. 2, *10б* и *11б*). Хроматиновые тельца сжаты между липидными шариками и после пересева начинают расти и делиться в таком стиснутом положении (табл. 2, *10а*, *11а* и *12*). В других случаях хроматин клеток посевного материала рассеивается на много мелких ку-

сочков среди многих мелких липидных шариков по всей клетке. После пересева отдельные, возможно, соединенные невидимыми связями кусочки хроматина начинают увеличиваться, растут и сразу делятся непосредственно среди липидных шариков. При этом возникают запутанные сочетания до тех пор, пока липид не исчезает из бацилл на третьем часу инкубации, когда восстанавливаются нормальные конфигурации. Типичный пример митозоподобного агрегата отдельных, независимых хроматиновых телец в клетке с пенистой (т. е. загроможденной липидом) цитоплазмой показан в табл. 2, *13*. Между хроматиновыми тельцами крупных зернистых бацилл, послуживших ДеЛяматеру и Мадду иллюстрацией интерфазных ядер, имеется много блестящих белых пятен, которые могут быть неокрашенными липидом. Появление таких клеток с несомненностью указывает, что они еще не избавились полностью от своей начальной липидной загрузки и что этому факту они обязаны своим сложным хроматиновым рисунком.

В пользу этого объяснения говорит то, что автору данной статьи удалось симулировать интерфазные ядра (табл. 2, *18б*), окрашивая хроматин крупных, сильно нагруженных липидом бацилл, имеющих пропорции, сходные с таковыми на иллюстрациях авторов.

Отсутствие у авторов изучения процесса образования хроматиновых сочетаний, которые они описали как покоящиеся ядра, является дополнительной причиной, почему их материал не может быть принят за доказательство истинной последовательности процесса.

Б. *Митоз и образование спор*

ДеЛяматер и Хантер (1952) утверждают, что они наблюдали митоз во время образования спор у Bacillus megaterium. Одиночная бацилла с четырьмя равномерно расположенными скоплениями хроматиновых элементов была представлена и цитировалась в последующих статьях как доказательство, что «последнее ядерное деление перед образованием спор выглядит как типичный митотический процесс (рис. 1)». Но может ли быть доказательством *процесса* единственный этап? И по какому признаку можем мы распознать это деление как последнее перед образованием споры? Здесь, как и в других местах, понимание авторами доказательности, очевидно, не является общепринятым. Другие изображения имеют целью показать «типичные и распознаваемые» «подтверждающие интерфазные ядра» в части бациллы, не занятой развивающейся спорой. Фотографии авторов вполне показательны в выявлении распределения хроматина в спорулирующих Bacillus megaterium. Но их интерпретация этих звездных конфигураций как интерфазных ядер могла возникнуть только в результате решительного нежелания применить к своему

собственному материалу все относящиеся сюда сведения о спорообразовании, опубликованные в литературе за последние 70 лет.

Уже упоминалось, что Bacillus megaterium образует липидные шарики в своей цитоплазме после нескольких часов культивирования на средах, на которых этот микроб вообще растет. Во время спорообразования всегда имеется много липида. На среде, на которой образование спор изучалось ДеЛяматером и Хантером (1952), проходит много времени, прежде чем начинается образование спор (табл. 2, *17*), и к тому времени, когда примордиальные споры делаются впервые ясно видимыми, бациллы настолько забиты липидными шариками, что выглядят почти совершенно черными на препаратах, окрашенных суданом (табл. 2, *14*). Хроматиновые тельца помещаются между частицами липида в тонких пластинках — все, что остается от цитоплазмы. Именно это является причиной, почему они распределены в виде звездчатых рисунков. Если бы здесь были «типичные и распознаваемые» интерфазные ядра среди липидных шариков, они должны были бы выделяться в виде крупных светлых неокрашенных промежутков, но это никогда не обнаруживается. Обсуждение поведения хроматина во время образования споры у Bacillus megaterium, не принимающее в расчет множество липидных шариков в вегетативной части клетки, не представляет научного интереса.

В. *Митоз в прорастающих спорах*

Хантер и ДеЛяматер(1952) утверждают, что они получили доказательство митоза в прорастающих спорах Bacillus megaterium. Явления первого деления на фотографиях авторов остаются неясными, но последние 5 снимков в первой из двух серий образуют последовательность сравнимых бацилл, расположенных равномерно по их длине. Существенные детали этой серии воспроизведены на рис. 9. В *a* и *b* находятся «два уплотненных и отдельных дочерних ядра», в *b*, *c* и *d* мы видим, как они становятся крупнее и более сложными, как будто они приготовились ко второму делению. В последующем порядок нарушается. Каково происхождение последней стадии? Разум говорит, что она должна

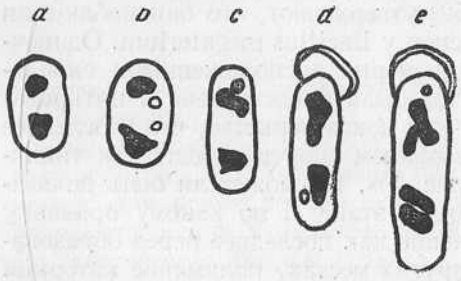


Рис. 9. Хроматиновые тельца в прорастающих спорах Bacillus megaterium по Хантеру и ДеЛяматеру (1952, рис. 15—19). Согласно авторам, в *a* имеются «два отдельных дочерних ядра»; *b* и *c* — «двухъядерная стадия с одним ядром, приступающим ко второму митозу», но *e* вновь описывается как двухъядерная стадия, представляющая конец *первого* митоза! Дальнейшие пояснения в тексте.

представлять собой следующий шаг по пути к завершению второго (прямого) деления. Продленная дальше серия (рис. 4) должна была бы показать, что это так и есть.

Но не к такому заключению приходят Хантер и ДеЛяматер. Пренебрегая всеми объективными признаками, авторы, наоборот, развивают два различных несовместимых и ничем не оправданных толкования хроматиновых сочетаний в последнем звене последовательности (бацилла *d*). *Заголовок* гласит: «...двухъядерная стадия, удлиненные хромосомы в поздней телофазе или ранней интерфазе». Если это объяснение было правильным, необходимо было переделать линейную последовательность авторов в циркулярную, в которой последнее и первое звенья идентичны. Однако в *тексте* говорится о той же фигуре, что она представляет собой сравнительно с *(d)* «...несколько более позднюю стадию митотического деления двух дочерних ядер». Это приближается к истине, но позже на той же странице опровергается описанием другой бациллы в той же развивающейся стадии второго деления, как в табл. 2, *10e*, которая опять приводится как подтверждение продуманного «интерфазного» толкования.

Очень короткой последовательности серии Хантера и ДеЛяматера не достает непосредственного контроля, обеспечивающегося проделанной дальше серией опытов. Кроме того, фотографии, относительно которых их авторы не уверены, показывают ли они покоящиеся или делящиеся ядра, едва ли могут рассматриваться как доказательство митоза.

ДеЛяматер опубликовал много других работ относительно хроматиновых телец в бактериях, помимо тех, которые здесь обсуждались.

Эти работы обогатили литературу многими, часто превосходными, изображениями хроматиновых телец, но практически все эти работы допускают то, что должно быть еще доказано, и представляют собой скопления наблюдений и толкований, в которых трудно, если не невозможно, разобраться.

ЛИТЕРАТУРА

Atwood K. & Orinstein L. (1949). Exhibit A. A. A. S. New York City (abstract in programme.)

Badian J. (1933). Eine cytologische Untersuchung über das Chromatin und den Entwicklungszyklus der Bakterien. Arch. Mikrobiol. *4*, 409.

de Bary A. (1884). Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoën und Bakterien, pp. 500 und 502. Leipzig.

Bayne-Jones S. & Petrilli A. (1933). Cytological changes during the formation of the endospore in Bacillus megatherium. J. Bact. *25*, 261.

Beale G. H. (1954). The Genetics of Paramaecium aurelia. Cambridge University Press.

Birch-Andersen A., Maaløe O. & Sjöstrand F. (1953). High-resolution electron micrographs of sections of E. coli. Biochim. biophys. Acta, *12*, 395.

Bisset K. A. (1950). The sporulation of Cl. tetani. J. gen. Microbiol. *4*, 1.
Bisset K. A. (1953). Do bacteria have mitotic spindles, fusion tubes and mitochondria? J. gen. Microbiol. *8*, 50.
Bisset K. A. (1954). The cytology of Micrococcus cryophilus. J. Bact. *67*, 41.
Bradfield J. R. G. (1954). Electron microscopic observations on bacterial nuclei. Nature, Lond., *173*, 184.
Braun H., Berg St., Kessler S. & Mavroidi P. (1954). Über die Anormo-morphogenese bei Bakterien. Med. Mschr., Stuttgart, *1*, 446.
Burdon K. L. (1946). Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried fixed slide preparations. J. Bact. *52*, 665.
Caldwell P. C. & Hinshelwood C. (1950). The nucleic acid content of Bact. lactis aerogenes. J. Chem. Soc. p. 1415.
Cassel W. A. & Hutchinson W. G. (1954). Nuclear studies on the smaller Myxophyceae. Exp. Cell. Res. *6*, 134.
Chapman G. B. & Hillier J. (1953). Electron microscopy of ultra-thin sections of bacteria. J. Bact. *66*, 362.
Chen T. T. (1944). The nuclei in avian malaria parasites. I. The structure of nuclei in Plasmodium elongatum with some considerations on technique. Amer. J. Hyg. *40*, 26.
Clifton C. E. & Erhard. H. (1952) Nuclear changes in living cells of a variant of Bacillus anthracis. J. Bact. *63*, 537.
DeLamater E. D. (1951a). A staining and dehydrating procedure for the handling of microorganisms. Stain Tech., *26*, 199.
DeLamater E. D. (1951б). A new cytological basis for bacterial genetics. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 16, 357.
DeLamater E. D. (1953a). Structure and Division of the Bacterial Nucleus. Bacterial Cytology, Symp. 6th Congr. int. Microbiol., Rome, p. 108.
DeLamater E. D. (1953б). Aspects of bacteria as cells and as organisms. Part II. Int. Rev. Cytol. *2*, 158.
DeLamater E. D. (1954). Cytology of bacteria. Part II. The bacterial nucleus. Ann. Rev. Microbiol. *8*, 23.
DeLamater E. D. & Hunter M. E. (1951). Preliminary report of true mitosis in the vegetative cell of Bacillus megatherium. Amer. J. Bot. *38*, 659.
DeLamater E. D. & Hunter M. E. (1952). The nuclear cytology of sporulation in Bacillus megaterium. J. Bact. *63*, 13.
DeLamater E. D., Hunter M. E. & Mudd S. (1952). Current status of the bacterial nucleus. Exp. Cell. Res. Suppl. 2, p. 319.
DeLamater E. D. & Mudd S. (1951). The occurence of mitosis in the vegetative phase of Bacillus megatherium. Exp. Cell Res. *2*, 449.
Delaporte B. (1939). Recherches cytologiques sur les Bactéries et les Cyanophycées. Rev. gén. Bot. *51*, 615. 689, 748.
Delaporte B. (1950). Observations on the cytology of bacteria. Advanc. Genet. *3*, 1.
Dienes Y. & Smith W. E. (1944). The significance of pleomorphism in Bacteroides strains. J. Bact. *48*, 125.
Dobell C. (1911). Contributions to the cytology of the bacteria. Quart. J. micr. Sci. *56*, 395.
Douglas S. R. & Distaso A. (1912). Über den Kern der Bakterien. Zbl. Bakt., Abt. I. Orig. *66*, 21.
Fitz-James P. C. (1953). The structure of spores as revealed by mechanical disruption. J. Bact. *66*, 312.
Fitz-James P. C. (1954). The duplication of bacterial chromatin. J. Bact. *68*, 464.
Flewett T. H. (1948). Nuclear changes in Bacillus anthracis and their relation to variants. J. gen. Microbiol. *2*, 325.

Geitler L. (1942). Kern- und Chromosomenbau bei Protisten im Vergleich mit dem höherer Pflanzen und Tiere. Ergebnisse und Problem. Naturwissenschaften, *30*, 162.
Geitler L. (1953). Endomitose u. endomitotische Polyploidisierung. In Protoplasmatologia, *6*, C, edit. Heilbrunn C. V. & Weber F.
Grell K. G. (1953a). Die Konjugation von Ephelota gemmipara R. Hertwig. Arch. Protistenk. *98*, 288.
Grell K. G. (1953б.) Der Stand unserer Kenntnisse ueber den Bau der Protistenkerne. Verh. dtsch. zool. Ges. in Freibung, 1952, pp. 212—251.
Guilliermond A. (1908). Contribution à l'étude cytologique des bacilles endosporés. Arch. Protistenk. *12*, 9.
Hartman T. L. (1940). The use of Sudan black B as a bacterial fat stain. Stain Tech. *15*, 23.
Hartman P. E. &. Payne J. I. (1954). Direct staining of nucleoproteins in E. coli. J. Bact. *68*, 237.
Hedén C. G. (1951). Studies of the infection of E. coli B with the bacteriophage T_2. Acta path. microbiol. scand. suppl. *88*, 1.
Hoelling A. (1910). Die Kernverhältnisse von Fusiformis termitidis. Arch. Protistenk. *19*, 239.
Huebschman C. (1952). A method for varying the average number of nuclei in the conidia of Neurospora crassa. Mycologia, *44*, 599.
Hunter M. E. & DeLamater E. D. (1952). Observations on the nuclear cytology of spore germination in Bacillus megaterium. J. Bact. *63*, 23.
Jacobson W. & Webb M. (1952). The two types of nucleoproteins during mitosis. Exp. Cell Res. *3*, 163.
Johnson F. H. & Gray D. H. (1949). Nuclei and large bodies of luminous bacteria in relation to salt concentration, osmotic pressure, temperature and urethane. J. Bact. *58*, 675.
Kellenberger E. (1953). Les formes caractéristiques des nucleoides de E. coli et leurs transformations dues a l'action d'agents mutagénes-inducteurs et de bactériophages. Bacterial Cytology, Symp. 6th Congr. int. Microbiol., Rome, p. 45.
Klieneberger-Nobel E. (1945). Changes in the nuclear structure of bacteria, particularly during spore formation. J. Hyg. Camb, *44*, 99.
Knaysi G. (1942). The demonstration of a nucleus in the cell of a staphylococcus. J. Bact. *43*, 365.
Knoell H. (1944). Zur Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie in der Bacteriologie. Zeiss Nachr. *5*, 38.
Knoell H. & Zapf K. (1951). Untersuchungen zum Problem des Bakterienzellkerns. Zbl. Bakt. Abt. I, Orig., *157*, 389.
LeMoigne M., Delaporte B. & Croson M. (1944). Contribution à l'étude botanique et biochimique des bactéries du genre Bacillus. Ann. Inst. Pasteur, *70*, 224.
Lewis I. M. (1934). Cell inclusions and endospore formation in Bacillus mycoides. J. Bact. *28*, 133.
Lieb M., Weigle J. J. & Kellenberger E. (1955). A study of hybrids between two strains of Escherichia coli. J. Bact. *69*, 468.
Mudd S. & Smith A. (1950). Electron and light microscopical studies of bacterial nuclei. J. Bact. *50*, 561.
Murray R. G. E. (1953). The problem of fixation for studies of bacterial nuclei. Bacterial Cytology, Symp. 6th. Congr. int. Microbiol., Rome.
Murray R. G. E. (1955). In preparation[1].
McIntosh D. L (1954). A Feulgen-carmine technic for staining fungus chromosomes. Stain Tech. *29*, 29.
Neumann F. (1941). Untersuchungen zur Erforschung der Kernverhältnisse bei den Bakterien. Zbl. Bakt., Abt. II., Orig., *103*, 385.

[1] Опубликовано в Canad. J. Bioch. a. Physiol., 1957, 35, 7, 565—568. *Ред.*

Oginski E. & Umbreit W. (1954). An Introduction to Bacterial Physiology, San Francisco: Freeman.
Peshkoff M. A. (1940). Phylogenesis of new microbes, Caryophanon latum and Caryophanon tenue, organisms which are intermediate between blue-green algae and the bacteria (summary in English). J. gen. Biol. (Russ.), *1*, 598.
Peters D. & Wigand R. (1953). Enzymatisch-electronenoptische Analyse der Nucleinsäureverteilung, dargestellt an E. coli als Modell. Z. Natur Forsch. *8b*, 180.
Piekarski G. (1937). Zytologische Untersuchungen an Paratyphus- und Coli-bakterien. Arch. Mikrobiol. *8*, 428.
Piekarski G. (1949). Zum Problem des Bakterienzell-kerns. Ergebn. Hyg. Bakt. *26*, 334.
Piekarski G. (1952). Mikroskopische und chemische Organisation der Zelle. 2 Colloq. Dtsch. Ges. Phys. Chemie, p. 83. Berlin: Springer.
Pringsheim E. G. & Robinow C. F. (1947). Observations on two very large bacteria Caryophanon latum Peshkoff and Lineola longa (nomen provisorium). J. gen. Microbiol. *1*, 267.
Robinow C. F. (1942). A study of the nuclear apparatus of bacteria. Proc. Roy. Soc. *B*, 130.
Robinow C. F. (1944). Cytological observations on Bact. coli, Proteus vulgaris and various aerobic spore-forming bacteria with special reference to the nuclear sturctures. J. Hyg., Camb., *43*, 413.
Robinow C. F. (1945). Addendum to The Bacterial Cell, by R. J. Dubos. Cambridge, Mass.: Harvard University Press.
Robinow C. F. (1953). Spore stucture as revealed by thin sections. J. Bact. *66*, 300.
Ryan F. J. &. Wainwright L. K. (1954). Nuclear segregation and the growth of clones of spontaneous mutants of bacteria. J. gen. Microbiol. *11*, 364.
Schaede R. (1939). Zum Problem des Vorkommens von chromatischer Substanz bei Bakterien und Actinomyceten. Arch. Mikrobiol. *10*, 473.
Schrader F. (1953). Mitosis. The Movements of Chromosomes in Cell Division. 2nd ed. New York: Columbia University Press.
Smith A. G. (1950). An improved staining technique for the nuclear chromatin of bacterial cells. J. Bact. *59*, 575.
Sonneborn T. M. (1947). Recent advances in the genetics of Paramaecium and Euplotes. Advanc. Genet. *1*, 263.
Stanier R. Y. (1954). Singular features of bacteria as dynamic systems. In Cellular Metabolism and Infections, p. 3. New York: Academic Press.
Stempen H. (1950). Demonstration of the chromatinic bodies of E. coli and Proteus vulgaris with the aid of the phase contrast microscope. J. Bact. *60*, 81.
Stempen H. & Hutchinson W. G. (1951). The formation and development of large bodies in Proteus vulgaris OX-19. J. Bact. *61*, 337.
Stille B. (1937). Zytologische Untersuchungen an Bakterien mit Hilfe der feulgenschen Nuclealreaktion. Arch. Microbiol. *8*, 125.
Tomlin S. G. & May J. W. (1955). Electron microscopy of sectioned bacteria. A study of Escherichia coli. Aust. J. exp. Biol. *33*, 249.
Truant J. P. (1954). Ph. D. thesis. University of Western Ontario, London, Canada.
Tulasne R. (1949). Sur la cytologie des bactéries vivantes étudiées grâce au microscope à contraste de phase. C. R. Soc. Biol., Paris, *143*, 1390.
Tulasne R. (1953). Le cycle L et les formes naines des bactéries. Bacterial Cytology, Symp. 6th Congr. int. Microbiol., Rome, p. 144.
Tulasne R. & Vendrely R. (1947). Demonstration of bacterial nuclei with ribonuclease. Nature, Lond., *160*, 225.
Vendrely R. & Lipardy J. (1946). Acides nucléiques et noyaux bactériens. C. R. Acad. Sci., Paris, *223*, 342.

Whitfield J. F. (1955). Ph. D. thesis, University of Western Ontario, London, Canada.
Whitfield J. F. & Murray R. G. E. (1954). A cytological study of the lysogenization of Shigella dysenteriae with P1 and P2 bacteriophages. Canad. J. Microbiol. *1*, 216.
Whitfield J. F. & Murray R. G. E. (1955). In preparation[1].
Wigand R. & Peters D. (1954). Licht- und electronenoptische Untersuchungen über den Abbau gram-negativer Kokken mit Nucleasen und Proteasen. Z. NaturForsch. *9*b, 586.
Witkin E. (1951). Nuclear segregation and the delayed appearance of induced mutants in Escherichia coli. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. *16*, 357.
Work E. & Dewey D. L. (1953). The distribution of α-, ε-diaminopimelic acid among various micro-organisms. J. gen. Microbiol. *9*, 394.

[1] Опубликовано в Canad. J. Microbiol., 1956, 2, 3, 245—260. *Ред.*

Автор сожалеет, что ограниченность места вынудила воспроизвести некоторые из фотографий очень маленькими. За немногими исключениями, все изображения представляют собой небольшие части фотографий однородных групп, состоявших из 50—300 бацилл. Фотографии в свою очередь были показательны для целых препаратов.]

Таблица 1. Хроматиновые тельца в клетках 1—1$^1/_2$-часовых культур Bacillus cereus и B. megaterium на настое сердечной мышцы Дифко или 2% триптозном агаре при температуре 37°. Увеличение везде в 3600 раз, кроме *5*, где оно составляет 4500 раз. За исключением *1* и *2*, все фотографии сделаны с препаратов, монтированных в воде.

1. B. cereus. Живые бациллы, сфотографированные при фазово-контрастном освещении. Одна из них кажется лентовидной. X — делящееся хроматиновое тельце. Препарат любезно предоставлен проф. Р. Мареем.

2. B. cereus. Пары OSO_4, сулема (спирт, Фельген), фотографический снимок в ацетокармине по Мак Интошу (1954). Стрелка в нижнем правом углу указывает на отдельное хроматиновое тельце.
Стрелка слева указывает на отдельное хроматиновое тельце с прилегающим добавочным зерном.

3 и *3a*. B. cereus. Перенесена на стекло in situ при помощи фиксации по Буэну через агар; *3* — препарат был окрашен 0,01% раствором тионина в течение 40 секунд; *3a* — та же окраска, но толуидиновой голубой. Хроматиновые тельца не окрашены. Сравнение с *1* свидетельствует, что реактив Буэна — лучший фиксатор для хроматиновых телец, чем осмий, примененный для приготовления препарата, обозначенный цифрой 2. Стрелка налево указывает на отдельное хроматиновое тельце. Имеются фигуры деления около каждого конца центральной стрелки. У двух бацилл у верхнего края *3* можно видеть овальные хроматиновые тельца.

4 и *5*. B. cereus. Последовательные деления хроматиновых телец во время развития прорастающих спор в первую генерацию вегетативных бацилл. Пары OsO_4, HCl, Азур-А, SO_2 по ДеЛяматер или Гюбшман.

6. Добавочные зерна («центриоли» ДеДяматера) около хроматиновых телец, разделившихся после первого деления. Другие ясные примеры добавочных зерен видны в клетке в центре *7* и в третьей клетке справа вдоль бокового края.

7. Сверху в левом углу и в других местах — овоидные клетки с двумя плотными отдельными хроматиновыми тельцами, образовавшимися при первом делении. Второе деление совершается в крупных клетках сразу выше и ниже центра. Оно завершено в бацилле с четырьмя вытянутыми хроматиновыми глыбами справа сверху.

8. Бацилла на этом рисунке содержит четыре отдельных хроматиновых зерна, толщина которых свидетельствует о том, что вскоре начнется третье деление. На оригинальной фотографии эта клетка лежит непосредственно около группы, показанной на *9*, где третье деление уже началось.

9. Хроматиновые тельца в двух бациллах в центре в состоянии третьего деления. Хроматиновые конфигурации здесь становятся непонятными вследствие большого скопления (Смит, 1950). В нижнем конце первой справа бациллы, в верхнем ряду, находится общий тип фигуры деления, который иногда ошибочно принимался за покоящееся ядро с тремя хромосомами.

Таблица 2. Все рисунки — Bacillus megaterium. Многие представляют собой примеры того, что может быть названо «эффектом Деляпорт», а именно поведение хроматиновых телец в присутствии большого количества липида. *10* и *12—16* — увеличение в 3600 раз, *11*, *17* и *18* — в 4500 раз.

10а — Группа бацилл с 18 - часовой культурой при температуре 37° на кровяном агаре. OSO_4, HCl, Гимза.

10б. Те же бациллы, окрашенные суданóвой черной В после того, как первоначальная краска (Гимза) была удалена алкоголем (спиртом). У отмеченной стрелкой бациллы в правом верхнем углу хроматиновые тельца сжаты между большими массами липида. Заметьте отсутствие «интерфазных» ядер.

11а и *б*. Такая же пара фотографий, липид — слева, хроматин — справа. Культура, сходная с указанной на *10*, фиксирована через 1 час 40 минут после пересева на свежий кровяной агар.

12. Хроматиновые тельца, начинающиеся размножаться между липидными шариками, представлены здесь светлыми «вакуолями». Тот же материал, что и на *10*, фиксирован через 1 час после пересева на свежую среду. Сравните с работой Деляпорт, 1950, табл. I, *3* и *3а*.

13. Беспорядочное расположение хроматиновых телец в пенистой цитоплазме бациллы из исходного, перегруженного жиром посевного материала, фиксированного через 2 часа после пересева на свежую среду.

14. Ранняя стадия образования споры через 6 часов культивирования на казаминово-кислом агаре. Высушенный в воздухе отпечаток, обработанный 0,3 % раствором суданóвой черной В пополам с этиловым спиртом и 70 % спиртом. Бациллы наполнены липидом, за исключением участков, где развиваются споры.

15. OSO_4, HCl, Гимза. Наиболее ранняя обнаруживаемая стадия образования споры на картофельном агаре. Отметьте солитарные темные зерна на конце бациллы, параллельно нижнему краю, на концах двух бацилл в вставке, и в других местах. Наличие большого количества мелких липидных шариков превратило цитоплазму в систему тонких пластинок, в которых хроматиновые тельца кажутся разбросанными беспорядочно. Эти фотографии напоминают рисунки «хроматиновых ядер» Гийермона (1908). Фиксировано через $3^1/_2$ часа после смены температуры, описанной в тексте.

16. Поздняя стадия образования спор на картофельном агаре, фиксация через 5 часов после смены температуры. Выше центра и в нижнем левом углу можно видеть в развивающихся спорах кольцевидные хроматиновые тельца.

17. Липидные шарики в вегетативных бациллах с обильно засеянной поверхностью 0,1 % казаминокислотного агара в чашке через 4 часа при температуре 37°. Высушенный на воздухе отпечаток, обработанный суданóвой черной В в спирте (этиленгликоле).

18а и *б*. Бациллы с той же культуры, что и на предыдущей фотографии. Пары OsO_4, HCl, азур А, SO_2. Хроматиновые тельца беспорядочно разбросаны между множеством светлых «вакуолей», т. е. неокрашенных липидных зерен. Наблюдатель-фантазер, не знающий о наличии липида, может обнаружить в правом конце бациллы, обозначенной цифрой *18в*, «крупное интерфазное ядро».

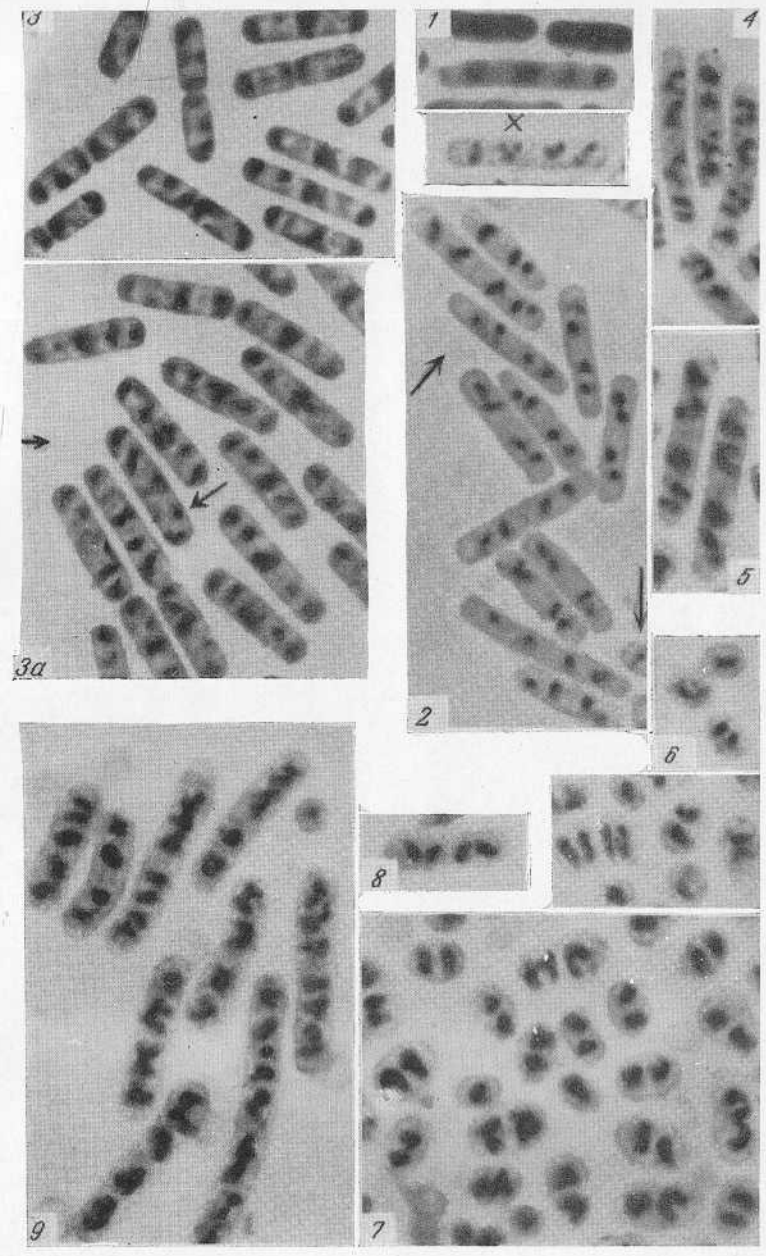


Таблица I.

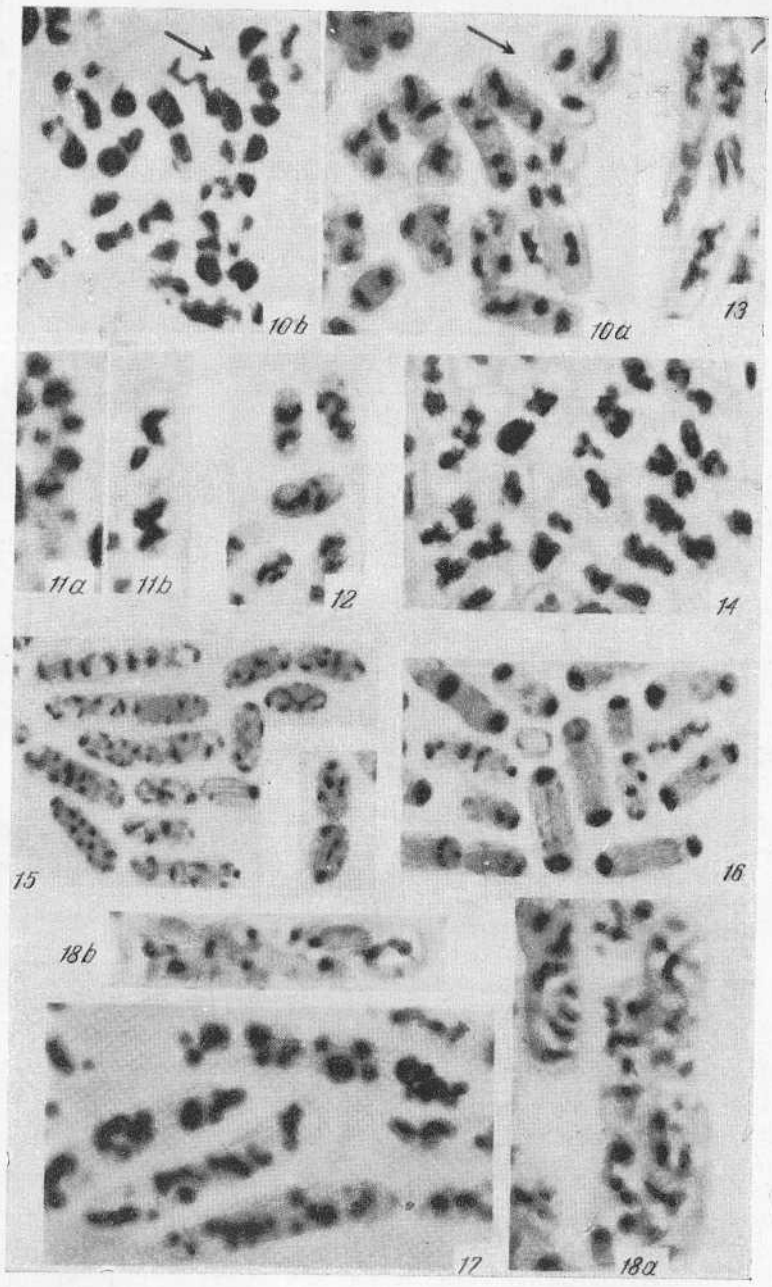


Таблица 2.

ХРОМОСОМЫ БАКТЕРИЙ И МЕХАНИЗМ ИХ ДЕЛЕНИЯ

Е. Д. ДеЛЯМАТЕР

Отделение физиологии, Медицинская школа, Пенсильванский университет, Филадельфия, США

Уже много лет в литературе распространено мнение, что бактерии составляют особые и единственные в своем роде клетки. Это особенно касается обсуждения строения бактериального ядра. Оснований для этого много; некоторые из них очевидны. Клетки большей частью малы. Предполагалось, что то, что можно видеть при помощи обычных методов, органичено. Специальная химически-цитологическая техника стала доступна и начала применяться лишь относительно недавно. Бóльшая часть оставшейся с того времени путаницы, обязанной применению неспецифических методов, еще не была разъяснена или устранена [Найзи (Knaysi), 1955; Ченс (Chance), 1955]. Подходящие новые методы, необходимые для должного применения новейших, доступных в настоящее время, инструментов, находятся еще в процессе эволюции [Бредфилд (Bradfield), 1954]. Однако объект бактериальной цитологии не «френетический» [Спигелмэн и Лэндмэн (Spiegelman, Landman), 1954], он — просто растущий.

Мне кажется, что мы как бактериологи-цитологи сами стремились слишком тесно ограничить себя исключительно морфологическими представлениями. В этом отношении мы отставали от наших коллег в общей цитологии [Де Робертис, Новинский и Заец (de Robertis, Nowinski, Saez), 1954]. Цитология не должна ограничиваться одной структурой, а должна стремиться к определению химического строения клетки и, кроме того, к пониманию объединенных функций различных частей. Если мы представляем себе клетку как химическую машину, которая действует в живом состоянии как сложное целое, то кажется правильным пытаться анализировать активности клетки с комбинированной цитологической и химической точки зрения в терминах не только химически определяемой морфологической единицы, но также

в терминах общей организации. Это, если необходимо, потребует одновременного приложения техники других дисциплин, таких, как биохимия. Это, как все признают, очень широкая задача и, насколько я знаю, я не одинок в стремлении видеть ее осуществленной. Я убежден, однако, что этот подход придает бактериальной цитологии правильную перспективу, увязывая ее непосредственно с такими дисциплинами, как цитохимия, биохимия, иммунохимия и внутриклеточная физиология, которые могут ей способствовать. Но еще более существенно, я считаю, сохранить представление о *клетке*, как о целой сложной системе, которая должна изучаться как таковая, если мы можем в основном понять ее целый механизм. Это, я полагаю, должно быть ареной деятельности цитолога, и так как бактерии могут в настоящее время без оговорок считаться клетками, они равным образом становятся ареной деятельности бактериолога-цитолога.

Много было изучено и много должно быть изучено при помощи фракционирования и при помощи изучения изолированных морфологических и химических систем, которые получены таким путем. Но эта ценная информация не обязательно объясняет, как, где или каковы функциональные взаимоотношения, которые существуют в целой живой клетке. Я считаю, что предпринять изучение этих сложных проблем — широкий путь прогресса цитолога.

Эта статья делится на три части. В первой мы рассмотрим общую организацию бактериальной клетки, выявляемую избранными биохимическими пробами. Во второй части будет обсуждаться строение ядра и механизм его деления, а также структура хромосом. В третьей части будут представлены наши современные попытки разрешить проблемы синтеза ядерного вещества и динамики ядерного механизма.

СООБРАЖЕНИЯ О ВНУТРЕННЕЙ СТРУКТУРЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Так как все еще имеется путаница относительно того, что составляет ядро в бактериальной клетке (Найзи, 1955), необходимо и справедливо рассмотреть здесь, что может быть дифференцировано и определено внутри бактериальной клетки посредством доступных в настоящее время цитохимических методов. Соответствие результатов, полученных этими методами, результатам, достигнутым химическими анализами, в высшей степени значительно, как будет ясно из предстоящей дискуссии. Вследствие недостатка места, однако, здесь не будет сделано сравнение этих данных. Я представлю в этом разделе дискуссии итог недавней работы д-ра Эбреема Уидра в моей лаборатории. Методики этой работы в деталях не будут даны, так как они могут быть найдены в обычно цитируемых работах [Пирс (Pearse),

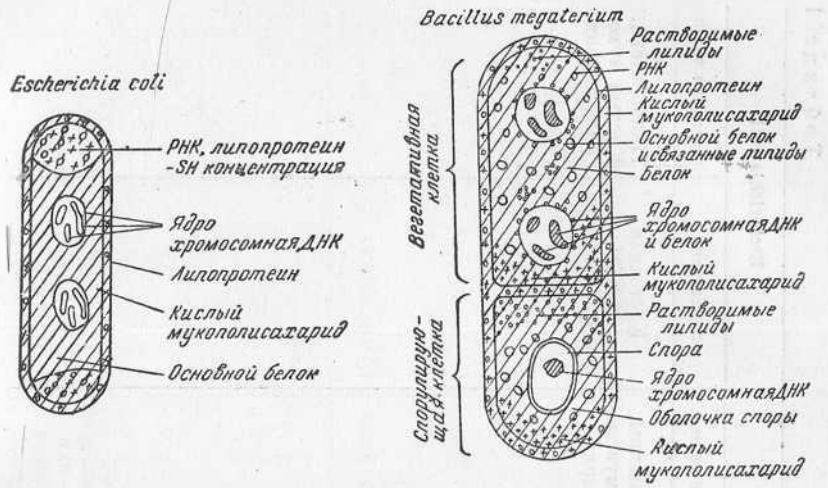


Рис. 1. Сравнение основных структур, определенных по химическому содержанию, у Bacillus megaterium и Escherichia coli.

1953], и в детальной работе д-ра Уидра (Widra), 1955 так, как они были им применены.

Прежде чем перейти к изложению, следует указать, что, применяя цитохимические процедуры, о которых известно, что они специфичны только для отдельных химических радикалов или группировок, обычно нельзя сделать специфического заключения относительно категории части клетки, имеющей отношение к данной пробе. Так, не всегда допустимо идентифицировать соединения, такие, как «полисахарид», при помощи реакции, которая специфична только для наличия 1,2-гликолевой группировки, без того, чтобы проделать необходимые дополнительные пробы. Табл. 1 показывает процедуры, необходимые для определения специфических типов веществ.

Табл. 1 суммирует эти исследования. Указаны применяемые методы с химической специфичностью каждого; показана локализация каждой реакции и реагирующая часть клетки сравнительно у Bacillus megaterium и Escherichia coli. Рис. 1 суммирует графически и сравнительно результаты, полученные при изучении B. megaterium и E. coli. У обоих организмов клеточная стенка и клеточная оболочка не отделены. Они содержат липопротеин и мукополисахарид. У B. megaterium стенка содержит также РНК. РНК преобладает в стенке молодых клеток, в то время как кислый мукополисахарид — у старых клеток. В вегетативной клетке B. megaterium протоплазма содержит белок и связанные липиды с рассеянными по всей клетке растворимыми липидами. Ядра — хорошо очерченный участок, содержащий хромосомы, в которых можно ясно обнаружить содержа-

Сводка цитохимических данных Таблица 1

	Процедура	Химическая специфичность	B. megaterium		Escherichia coli	
			локализация	составная часть	локализация	составная часть
1	Йоднокислая реакция Шиффа: клетки, фиксированные в парах осмия — 1% йодная кислота, 3 минуты промывка — реактив Шиффа — 10 минут — промывка в SO_2 (10% метабисульфит калия, 5 мл; N—HCl 5 мл; вода, 40 мл)—промывка—среда Фарранта	1,2-гликолевая группировка, ее продукты окисления, эквивалентные амино- или алкаламинодериваты. Практически сюда включаются некоторые аминокислоты (серин, треонин, гидроксилизин), АТФ, фосфолипиды и ненасыщенные липиды, так же как различные классы полисахаридов	Клеточная стенка вегетативной клетки; ограниченные скопления вдоль стенки и перегородок; зерна в клетке. Старые дегенерированные клетки показывают более слабую равномерную окраску во всей цитоплазме	Липопротеины. Кислый мукополисахарид	Клеточная стенка; полярные зерна	Липопротеин. Кислый мукополисахарид
1а	Контроли: отсутствуют свободные альдегиды (клетки + реактив Шиффа — отрицательны). Отсутствуют плазмогены (клетки + $HgCl_2$ — реакция Шиффа — отрицательны). Отсутствуют ненасыщенные липиды у B. megaterium (клетки + окисление надуксусной кислотой — реакция Шиффа — отрицательны)					
2	Извлечение гиалуронидазы: «Видаза» Стока (150 TR ед/мл) соответствует 500 ед/мл вязкости, разведение 1 : 5 водой при pH 6,0. 3 часа при 37°. Контроль промывной воды, промывка. 0,5% водный раствор толуидиновой синей 10 минут. Промывка. Исследование во влажном состоянии под «Васпар»-клеем	Удаляет гиалуроновую кислоту и хондротин-серную кислоту; кислый мукополисахарид обычно устойчив	После обработки гиалуронидазой окраска основными красками не уменьшается	Отсутствует гиалуроновая кислота или хондроитинсерная кислота	Не влияет	—
3	α-амилаза (как птиалин в слюне): экстрагирование фиксированных осмием препаратов 30 минут при комнатной температуре	Устраняет окраску гликогена	Не действует на положительную реакцию йодная кислота — реактив Шиффа	Отсутствие гликогена	Не влияет	—
4	Окраска алциановой голубой: фиксированные осмием препараты — 5 минут в 1% водном растворе краски. Промывка. Монтаж в среде Фарранта	Кислые мукополисахариды, редко мукопротеин	Стенки клетки и споры	Кислый мукополисахарид	Стенки клетки. Слизистый слой мукоидных штаммов	Кислый мукополисахарид

	Процедура	Химическая специфичность	B. megaterium		Escherichia coli	
			локализация	составная часть	локализация	составная часть
5	Редукция метиленовой синьки (РМС): 0,0005 М конечная концентрация метиленовой синьки в растворе вероналоацетатного буфера, расположенного от pH 2,62 до 8,18, фиксация осмием, окраска 24 часа при комнатной температуре. Промывка, монтировка в «Васпар»-клей	Если наличие нуклеиновых кислот можно исключить, РМС при pH 4,0 или ниже указывает наличие мукополисахаридов	Старые клетки: клеточные стенки и перегородки ниже pH 4. Молодые клетки: стенки не окрашиваются ниже pH 4. У всех — спорангиальные внеспоровые зерна	Старые клетки: кислый мукополисахарид. Молодые клетки: преимущественно РНК. У всех кислый мукополисахарид	Полярные зерна; окраска при pH 2,6 удаляется рибонуклеазой	РНК
5а	Контроль: рибонуклеаза, сопровождаемая РМС; отмывание редуцированной метиленовой синькой и водный контроль (на рибонуклеазу)					

6	Метахромазия: фиксация осмием. Окраска 0,5 водным раствором толуидиновой синей. Промывка. Монтировка во влажном состоянии с «Васпар»	Не специфична; положительна для мукополисахаридов или соединений фосфорной кислоты, положительна для крупных молекул углеводов с конечной группой COOH и других крупных молекул с анионными конечными группами	Отсутствуют метахроматические участки	—	Нет	—
7	Суданová черная B: фиксация осмием или формалином. Окраска в 0,25% растворе ацетилированной суданової черной B в этиленгликоле 2 часа, споласкивание в 70% этиловом спирте, промывка в воде, монтирование в среде Фарранта	Окрашивает растворимые липиды, иногда фосфолипиды	Мелкие зерна в молодых клетках; крупные центральные и полярные зоны в зрелых клетках; полярные зоны в спорулирующих клетках	Растворимые липиды	Нет	—
8	Масло красное O: идентично судановой черной B, применяется насыщенный раствор в этиленгликоле	Растворим в нейтральных липидах	То же	Растворимые нейтральные липиды	Нет	—

	Процедура	Химическая специфичность	B. megaterium		Escherichia coli	
			локализация	составная часть	локализация	составная часть
9	Реакция Сакагучи (модификация Бекера): фиксация осмием; препарат погружается в нафтол-гипохлорит на 15 минут, высушивается, помещается в сухой пиридин: хлороформ (1:1), монтируется в сухом пиридине	Практически специфичен для аргинина; применяется для обнаружения гистонов	Совпадает с фельгенположительными участками	Белок	Клеточная стенка и полюса	Белок
10	SH-техника Баррнетта: фиксация 1% трихлоруксусной кислотой в 80% этиловом спирте — промывка 70% этиловым спиртом—промывка водой—1 час в растворе 25 мг DDD в 15 мл этилового спирта + 35 мл 0,1 M веронал-ацетатного буфера, pH 8,5. Холод 10 минут — промывка. Споласкивать 4 раза (2 минуты каждый раз) в воде, подкисленной уксусной кислотой	SH-группы	Совпадает с фельгенположительными участками; дополнительные места внутри ядерного пузырька. Также спорулирующие внеспоровые зерна	Белок	Бледно по всей клетке. Заметнее на полюсах	Белок

	(pH 4). Промывка. Обезвоживание в эфире. Регидратация. Свежий 0,1% тетрадиортодианизидин в 0,1 M фосфатном буфере pH 7,4—2 минуты. Промывка и монтировка в среде Фарранта					
11	Связанный тетразоний: фиксация осмием. Свежеприготовленный 0,1% тетразотный бензидин в веронал-ацетатном буфере pH 9,2—15 минут при 4°. Промывка в воде и в некоторых случаях в буфере pH 9,2. Погрузить в насыщенный раствор β-нафтола в верональном буфере (pH 9,2) на 15 минут. Монтировка в среде Фарранта	Специфичен для гистидина, триптофана, тирозина	Стенка спор; фельгенположительные участки	Белок	Вся клетка, заметнее на полюсах	Белок
12	Нингидрин-Шифф: фиксация осмием. 0,5% раствор нингидрина 24 часа при 37°. Тщательная промывка. Реактив Шиффа 10 минут, споласкивание SO_2, промывка водой — среда Фарранта	Специфична для белков с реагирующими SH_2-группами	Совпадает с фельгенположительными участками; дополнительные места внутри ядерного пузырька. Также спорулирующие внеспоровые зерна	Белок	Клеточная стенка и полярные зерна	Белок

	Процедура	Химическая специфичность	B. megaterium		Escherichia coli	
			локализация	составная часть	локализация	составная часть
13	Метод диализированного железа по Хейлу: фиксация осмием. Диализированное железо: 2 М уксусная кислота (1:1) 10 минут — промывка 10 минут в 0,02 М ферроцианиде калия; 0,14 М HCl (1:1) — промывка — среда Фарранта	Низкая специфичность для кислых мукополисахаридов	Стенка споры; стенка вегетативной клетки	Кислый мукополисахарид	Стенка клетки; диффузно в цитоплазме; полюса не окрашены	Кислый мукополисахарид
14	Лимоннокислая суданова черная В: фиксация 40% формалином; 10% хлористый кальций (безводный): 2% нитрат кобальта: вода (1:1:1:7) на 12 часов — промывка — 5% лимонная кислота: суданова черная В в этиленгликоле (насыщенный раствор (1:1) на 2 часа при 60°. Дифференцировка в 70% этиловом спирте — промывка — среда Фарранта	Выявляет связанные («замаскированные») липиды	Стенка споры; вся цитоплазма молодых и зрелых клеток. Отсутствует в старых дегенерированных клетках	Сложные липиды	Бледно в стенке клетки. Очень заметно на полюсах	Сложные липиды

15	Окраска жира (для нейтральных и кислых липидов) (по Кейну): фиксация осмием или формалином. 1% водный раствор нильской голубой 5 минут при 60° — промывка в воде 60° — дифференциация в 1% уксусной кислоте — промывка — среда Фарранта. Параллельно препарат перекрашивается при 60° в 0,02% нильской голубой — промывка в воде 60° — дифференциация в 1% уксусной кислоте — промывка — среда Фарранта	Для липидов (красящихся суданом и экстрагируемых пирилином). Нейтральные липиды (розовый цвет); кислые липиды, жирные кислоты (голубой цвет)	Голубая окраска совпадает с окрашивающимися суданом участками	Кислые липиды (наличие нейтрального липида не исключается этой реакцией)	Проба неприменима при отсутствии чистых липидных включений	—

ние ДНК, так же как и сульфгидрилсодержащего белка. Положительные, реагирующие на HJ-реактив Шиффа участки (кислый мукополисахарид) и свободный жир взаимно исключают друг друга. В спорулирующих клетках B. megaterium имеется заметная биполярность с растворимыми липидами на одном полюсе и кислым полисахаридом на другом. В споре ядро более концентрировано, чем в вегетативной клетке, и в ядре споры можно обнаружить только одну хромосомную ДНК.

Escherichia coli представляется иначе организованной в тех пределах, которые можно определить цитохимически. На каждом полюсе наблюдается скопление липопротеина и сульфгидрилсодержащего белка и РНК. Ядро E. coli содержит хромосомы, в которых может быть обнаружена только ДНК; применяемые методы не выявляют сульфгидрилсодержащего белка. Протоплазма содержит основной белок. Липопротеин и кислый мукополисахарид обнаруживаются в клеточной стенке и в клеточной оболочке.

У Escherichia coli произведено дальнейшее определение участков митохондриальной активности. Эти участки содержат связанные липиды и РНК, так же как значительное количество сульфгидрилсодержащего белка, который находится в соответствии с наличием энзима сукциндегидрогеназы.

Уидра считает, что критерии для митохондрий у высших клеток и бактерий должны были бы заключаться в следующем: они являются обособленными и видимыми в оптическом микроскопе, по крайней мере в скоплениях; они содержат сульфгидрилсодержащие белки, РНК и связанные липиды фосфор- и азотсодержащих типов, но в них отсутствует ДНК.

Эти критерии отделяют ядра и хромосомы от митохондрий и должны были бы при правильном применении положить конец спору о том, что составляет ядро, с одной стороны, и что составляет митохондриальные участки — с другой. Для сравнения следовало бы указать, что хромосомы в ядрах можно различить в оптическом микроскопе как единичные, так и в скоплениях. Они не содержат связанных липидов, мало РНК, много ДНК и у Bacillus megaterium по крайней мере может быть доказано наличие в них сульфгидрилсодержащего белка.

Ничего нет удивительного в обнаружении у Escherichia coli и других грамотрицательных организмов разных типов биологически различных веществ, накапливающихся около активных химических центров, т. е. митохондрий. РНК была обнаружена Гартманом и Пейном (Hartman, Payne, 1954), кислые мукополисахариды — Байссетом (Bisset, 1951) и Бергерсоном (Bergerson, 1953). Было также показано, что они содержат щелочную фосфатазу [Шехтер (Schaechter), Трис (Treece) и ДеЛяматер (DeLamater), 1954]. Они могут содержать метафосфат, как полагает Мадд (Mudd, 1954), а также Девис (Davis) и Мадд (1955).

Утверждения о существовании точно определенных участков митохондрий у Bacillus megaterium, представленные Маддом, Броди (Brodie), Уинтершедом (Winterscheid), Гартманом, Бейтнером (Beutner) и Мак Лином (McLean) (1951), должны быть пересмотрены в свете работ Гартмана и Лиу (Liu) (1954), Вейбулла (Weibull, 1953), Шехтера и др. (1954), Новикова (Novikoff, 1955), а также Гонзе (Gonse) и Иотсуианаги (Iotsuyanagi) (1955).

Работа Уидра ясно подтверждает определение ядер и участков митохондриональной активности, которое было дано другими авторами (Мадд, 1954), и должна помочь устранить смешение этих двух морфологически и химически различных участков клеточной активности. Его работа откладывает на будущее определение «центриолей» как рассеянных физиологических и структурных единиц, равным образом и возможность существования ядрышек в этих маленьких ядрах. Как показано в табл. 2, *26* и *27*, сульфгидрилсодержащие белки находятся не только в хромосомах, но и в центриолях и веретенах.

Здесь необходимо особенно подчеркнуть, что одновременное обнаружение ядерных компонентов, клеточных стенок и перегородок химически специфическими методами делает недействительными аргументы Байссета (см. ДеЛяматер, 1954а), что ДеЛяматер в прошлом путал эти структуры. Точно так же лишено основания утверждение Робинау [Робинау и Хэнней (Robinow, Hannay), 1953], что ядерные конфигурации, представленные ДеЛяматером, своим происхождением обязаны каплям жира. Описанные ядерные конфигурации встречаются в клетках, лишенных жира, включая грамотрицательные организмы, такие, как Escherichia coli и Salmonella, так же как в спорах и молодых клетках Bacillus megaterium, не содержащих жира. Они также обнаруживаются в более старых клетках B. megaterium, из которых жир был удален. Уидра применял также одномоментную двойную окраску для выявления ядра и жира в одной и той же клетке. Цитохимически жир и хромосомы взаимно исключают друг друга. Чепмен и Хилльe (Chapman, Hillier, 1953), а также Доусон и Стерн (Dawson, Stern, 1954) в дополнение к моим исследованиям (ДеЛяматер, 1953а, б) показали, что поперечные стенки образуются за счет центростремительного роста клеточной стенки. Как электронный микроскоп, так и гистохимические методы опровергают утверждение Байссета (см. обсуждение в работе ДеЛяматера, 1951б), что поперечные стенки могут быть приняты за ядерный аппарат (ДеЛяматер, 1954а).

Наличие сульфгидрилсодержащего белка в хромосомах Bacillus megaterium, но не в хромосомах Escherichia coli свидетельствует о том, что строение ядра B. megaterium более сложно, чем у E. coli, и эта степень сложности может быть отражена в генетических механизмах, которые изучаются у каждого из них [Хейс (Hayes), 1953].

Последнее указание, которое следовало бы, возможно, сделать прежде, чем перейти к следующей фазе обсуждения: Уидра, изучая культуры на различных стадиях роста, был ошеломлен драматическими изменениями, возникшими в цитохимических реакциях во время роста организма. Они отразились на динамике объединенного внутриклеточного аппарата и могут при последующем изучении и дальнейшем выяснении вызывающих их специфических биохимических условий роста привести к интересным биохимическим и физиологическим открытиям. Пока слишком рано пытаться извлечь очень многое из данных, имеющихся у нас в руках в настоящее время.

СВОДКА ДОКАЗАТЕЛЬСТВ, ПОДДЕРЖИВАЮЩИХ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О СЛОЖНОМ МЕХАНИЗМЕ ЯДЕРНОГО ДЕЛЕНИЯ У БАКТЕРИЙ

Уверенность в наличии митотического механизма у различных бактерий и доказательства, подтверждающие этот механизм, были представлены автором в многочисленных сообщениях [ДеЛяматер и его сотрудники, 1951—1955; Хантер (Hunter), и ДеЛяматер, 1952, 1955]. В сообщениях об этих исследованиях умышленно была применена терминология, принятая для более крупных организмов. В последней работе и в настоящем сообщении эти термины применены в следующем смысле: «профаза» — для обозначения ядерной стадии, в которой хромосомы укорачиваются и становятся более плотными в подготовке к предстоящему (наступающему) делению; «прометафаза» (однополярная метафаза) — для обозначения стадии, в которой отдельная центриоль появляется с одной стороны уплотненных хромосом; «метафаза» — для обозначения стадии, в которой две центриоли, происшедшие из одной центриоли «прометафазы», перемещаются к полюсам и уплотненные хромосомы ложатся на «метафазной пластинке» между ними; «анафаза» — для обозначения стадии отделения сестринских хромосом; «телофаза» — для обозначения стадии полного отделения и ранней перестройки сестринских ядер, образовавшихся при делении; «интерфаза» — для обозначения вегетативной фазы ядра, в которой хромосомы удлинены и ядро значительно увеличено. Эти стадии показаны в табл. 1, *1—8* и в табл. 2, *1—10*, которые были ранее опубликованы. О деталях см. пояснения к рисункам (ДеЛяматер, 1951б).

Примененные в данной работе методы были подробно изложены в другой работе ДеЛяматер (1951б, в; 1953б). Они состояли в основном из модифицированной реакции Фельгена и из метода обезвоживания замораживанием, который дает постоянные препараты с минимальным искажением. Для отделения хромосомы, что является наилучшим для их индивидуального анализа, применяли также технику раздавливания (ДеЛяматер, 1953а, б).

Исследования до настоящего времени состояли из непосредственного цитологического анализа препаратов, приготовленных из активно растущих организмов на различных стадиях роста. Организмы, изученные до настоящего времени, включали Bacillus megaterium (ДеЛяматер, Хантер и Мадд, 1951а, б; 1953а; ДеЛяматер и Хантер, 1951; ДеЛяматер, Хантер и Мадд, 1951), Escherichia coli (штамм К12 и В) (ДеЛяматер, 1953а, в), Micrococcus cryophilus [ДеЛяматер, 1952а; ДеЛяматер и Вудберн (Woodburn), 1952], Caryophanon latum (ДеЛяматер, 1952б) и Salmonella [Минсеведж (Minsavage) и ДеЛяматер, 1955а, б] наряду с другими (ДеЛяматер, 1951б). В этих исследованиях была представлена обширная фотографическая документация, которая, как мы считаем, подтверждает взгляд, что у всех изученных организмов существует митотический аппарат. У B. megaterium (ДеЛяматер, 1951б, 1953а), E. coli (ДеЛяматер, 1953в) и Salmonella (Минсеведж и ДеЛяматер, 1955а) количество хромосом, установленное в каждом случае, равнялось трем. У C. latum (ДеЛяматер, 1952б) и у M. cryophilus (ДеЛяматер, 1952а; ДеЛяматер и Вудборн, 1952) количество хромосом было найдено равным двум. В отношении M. cryophilus подтверждение числа хромосом было дано Хантером (1955) при изучении «крупных клеток», которые напоминают диплоидную фазу. В них хромосомы претерпевают последовательность явлений, напоминающих мейоз.

Наиболее четко были описаны три хромосомы у Bacillus megaterium (ДеЛяматер, 1953а): одна крупная хромосома, имеющая нечто вроде сателлитной структуры на одном конце (ДеЛяматер, 1953а, табл. IV, рис. 11), хромосома средних размеров и короткая хромосома. Приблизительно в середине длинной хромосомы видна центромера (ДеЛяматер, 1953а, табл. XIII, рис. 5), тогда как в средней по величине хромосоме центромера выявляется терминально или субтерминально (ДеЛяматер, 1953а, табл. XIII, рис. 6). В короткой хромосоме центромеры не видно. Центромеры всех трех хромосом могут, однако, быть обнаружены в полностью сокращенном состоянии хромосом, когда они выглядят как парные зерна в прометафазе и метафазе в раздавленных препаратах (ДеЛяматер, 1953а). У Escherichia coli три хромосомы были также охарактеризованы как одна длинная и две более коротких (ДеЛяматер, 1953а). Ни у одной из хромосом этого организма не были обнаружены сателлиты. Интересно отметить, что цитологическое доказательство наличия трех хромосом у E. coli согласуется с генетическим доказательством, представленным Хейсом (1953), о существовании у этого организма трех групп связи. Три хромосомы у салмонелл, как было выяснено Минсеведжем и автором (1955а), являются сходными с хромосомами, обнаруженными у E. coli.

У Bacillus megaterium во время профазы в раздавленных препаратах было четко описано и сфотографировано продольное

расщепление хроматидов на два (ДеЛяматер, 1953а, табл. II, рис. 5—12; табл. III, рис. 1—6) и это подкрепляет взгляд, что такое продольное разделение хроматидов появляется одновременно у всех трех хромосом. Это доказательство не подтверждает взгляды Фитц-Джемса и не было приведено им в его последней статье [Фитц-Джемс (Fitz-James), 1954], в которой он предполагает асинхронный рост и деление хромосом у B. megaterium и B. cereus. Кроме того, его объяснения не совпадают с наблюдениями Хантера и ДеЛяматера (1952) об ядерной активности при прорастании споры.

Была представлена фотографическая документация всех организмов, изученных до настоящего времени, указывающая на наличие центриолей и веретенообразных элементов у этих организмов. Это особенно хорошо показано в табл. V, рис. 1, 2, 7, 8, 10, 12, 13, 16, 17 и 18 в ранее опубликованной работе ДеЛяматера (1953а). Как указывалось раньше, имела место значительная дискуссия по поводу того, не были ли приняты за центриолярные структуры другие элементы внутри клетки, т. е. перегородки, поперечные стенки и т. п. (Байссет, 1951, и последующие работы; см. ДеЛяматер, 1954а). Данные Уидра (1955), суммированные здесь, ясно свидетельствуют, что это не так.

В сотрудничестве с Минсеведжем, Брайзон и Чибалски [ДеЛяматер, 1953а, 1954в; ДеЛяматер, Хантер, Минсеведж, Чибалски (Szibalski) и Брайзон (Bryson), 1953; Минсеведж и ДеЛяматер, 1955б] автор изучал действие различных бактериостатических агентов на цитологию бактериального ядра. В этих исследованиях была обнаружена задержка развития ядра в прометафазе и метафазе с сопутствующей задержкой деления и перемещения центриолей и с их поразительным увеличением при повышении длительности действия медикамента. Одно это доказательство убедительно свидетельствует, что указанные структуры дискретны и отличаются от тех, которые, как утверждает Байссет, были за них приняты.

В ранних статьях четко определено и документировано наличие веретенообразных элементов. Так как эти структуры появляются постоянно и повторно и, как это было показано при изучении влияния медикаментозных веществ и холода, способны изменяться в соответствии с физиологическим состоянием клетки, автору кажется, что они должны рассматриваться как реальность. Эти разнообразные конфигурации показаны в табл. 2, *1—25* (детали см. в объяснении к таблице). При изучении влияния различных лекарственных веществ, в том числе, помимо других, террамицина, ауреомицина, стрептомицина и парааминосалициловой кислоты, также было возможно дифференцировать влияние различных веществ на цитологическом и цитохимическом уровне. Известный интерес представляло дополнительное наблюдение, обнаружившее то, что было названо «мимолетными полиплоидными ядрами» (ДеЛяматер, 1953а, 1954в;

ДеЛяматер, Хантер, Минсеведж, Чибалски и Брайзон, 1953); Хромосомы продолжают размножаться и делиться, но остаются спутанными внутри одной ядерной оболочки. В таких ядрах центриоли размножаются независимо в цитоплазме при развитии «полиплоидности» (ДеЛяматер, 1953а, табл. IX, рис. 6, 7, 12 и 14). Когда организм освобождается от влияния лекарственного вещества вследствие химического разложения вещества или его удаления, нормально построенные ядра реорганизуются путем отделения хромосом в отдельные ядра (ДеЛяматер, 1953а, табл. X, рис. 1—11).

Применение воздействия холода при попытках вызвать синхронизацию бактериальных ядер также изучалось в нашей лаборатории автором и его ассистентом М. Е. Хантер. Эксперименты по синхронизации будут детально обсуждены ниже. Здесь необходимо подчеркнуть, что холод, как и некоторые антибиотики (ауреомицин и террамицин), вызывает образование ядерных фигур, очень сходных с описанными и показанными в табл. 2. Здесь ядра также задерживаются преимущественно в прометафазе и метафазе и при продолжающемся действии холода образуют конфигурации, напоминающие «мимолетную» полиплоидию, когда тормозящая температура равна 15° или когда организм выращен на агаре и охлажден в рефрижераторе. На синтез хромосом это как будто не влияет, но кинетика механизма деления кажется заторможенной. Центриоли появляются и затем замирают. Они становятся более крупными и могут претерпевать независимое деление без деления ядра. Эти наблюдения показаны в табл. 1, *14—20* (см. детали в объяснении к таблице).

Приведенный факт указывает на то, что «центриоль» — реальность и что она не должна смешиваться с другими структурами внутри клетки; она подвергается воздействию холода; она также подвергается воздействию некоторых лекарственных веществ, что указывает на ее чувствительность к изменениям физиологического состояния организма. Эта структура была обозначена автором как «центриоль»; была названа «вторичным ядром» или «ядерной почкой» Найзи (1955); «поперечной стенкой», «центром роста» и т. п. — Байссетом (см. ДеЛяматер, 1954а) и игнорировалась, помимо других, Фитц-Джемсом (1954).

Изучение действия фиксирующих агентов [Маррей (Murray), 1953; неопубликованные наблюдения автора] показало утолщение ядерной оболочки с образованием рисунков, свидетельствующих, что ядерная оболочка существует на протяжении всего цикла деления. Это объяснение было высказано на Интернациональном микробиологическом конгрессе в Риме в 1953 г. Сходная реакция была получена в клетках под влиянием некоторых из изученных лекарственных веществ (ДеЛяматер, 1953а, табл. 7 и 8.

В результате суммирования этих накопленных данных, подкрепляемых многочисленными фотографиями, была сформулиро-

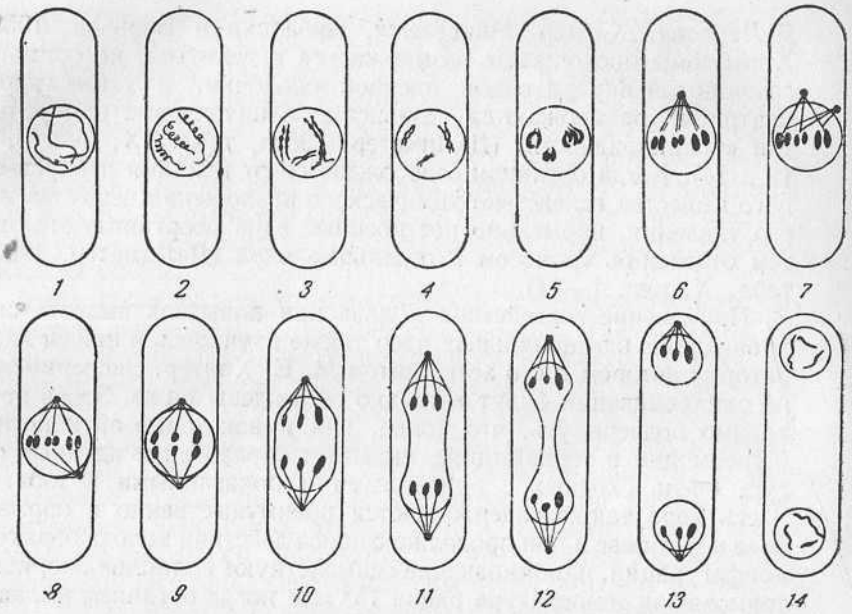


Рис. 2. Деление бактериального ядра Bacillus megaterium.

вана концепция бактериального ядра. Она показана на рис. 2 и заключается в следующем (ДеЛяматер, 1954а, б). Клетка палочковидных бактерий рассматривается как многоядерная, хотя схема для ясности показывает только одно ядро. Процесс деления мыслится происходящим внутри оболочки, которая существует на протяжении всего цикла, как у некоторых простейших, но не как обычно имеет место у высших форм, у которых оболочка исчезает в профазе и восстанавливается в телофазе. Хромосомы нитевидны, имеют четковидное строение в интерфазе и сокращаются и расщепляются продольно в профазе. С последующим сокращением отделяются хроматиды, но остаются прикрепленными к неразделившимся центромерам, выглядящим в этой стадии, прометафазе, в виде парных зерен. В это время в цитоплазме появляется центриоль, примыкающая к оболочке. Она затем делится и две образовавшиеся центриоли перемещаются на противоположные стороны ядра, образуя метафазную стадию.

Думается, что веретенообразный элемент прикрепляется как к ядерной оболочке, так и через нее к центромерам хромосом. При возникновении анафазы центромеры делятся и обособляются соответственно с их дочерними хромосомами на каждом полюсе, будучи растянутыми аппаратом веретена, который также вытягивает ядерную оболочку. Оболочка выдавливается, образуя

отдельные дочерние ядра в телофазе. В интерфазе центриоли исчезают, ядро разбухает и хромосомы вновь удлиняются.

Заключая этот раздел обсуждения, уместно, вероятно, еще раз подчеркнуть следующие моменты. Хромосомы могут быть сосчитаны, охарактеризованы и идентифицированы с относительной легкостью и четкостью, особенно у Bacillus megaterium. Их активность может быть прослежена во время хода митотического цикла. В профазе у двух более крупных хромосом во время стадии удлинения были обнаружены центромеры. Центриоли и веретена являются реальными структурами, так как они могут быть окрашены, изучены и сфотографированы в нормальных клетках, а также могут быть значительно увеличены и легче окрашены под влиянием как холода, так и лекарственных веществ. Равным образом может быть выявлено увеличение количества хромосом независимо от ядерного деления. Полиплоидия, насколько это пока наблюдалось, является «мимолетной» и ядра восстанавливаются при устранении соответствующего воздействия. Распознавание стадий деления, как видно на рис. 2, нетрудно.

СИНХРОНИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЯДЕР И ЕЕ ЗНАЧЕНИЕ

Хочкис (Hotchkiss, 1954) своими наблюдениями над пневмококками и трансформирующим принципом вновь пробудил интерес к синхронизации бактериальных ядер. В этой работе, для того чтобы привести ядра в одну и ту же фазу, он применил воздействие холода. Затем он наблюдал чувствительность организма к трансформирующему принципу в различные отрезки времени после устранения действия холода. Хочкис нашел, что во время стадий деления чувствительность к трансформирующему принципу отсутствовала. Маалое и Ларк (Maaløe, Lark, 1954), а также Ларк и Маалое (1954), работая с салмонеллами, применяли повторные экспозиции при 25°, для того чтобы синхронизировать свои культуры. Они изучали чувствительность таких синхронизированных систем к лизогении и нашли, что чувствительность удваивается при удвоении ядер в каждом организме. Шербаум и Цейтен (Scherbaum, Zeuthen, 1954), а также Цейтен и Шербаум (1954) применяли холод для синхронизации ядер в культурах простейших Tetrahymena. Эдемс (Adams, 1954) в редакционной статье в Science дал обзор проблемы синхронизации Tetrahymena и у пневмококка. Эдемс также считал, что изучение синхронизированных бактериальных культур может пролить свет на ряд проблем в цитологии бактерий. Скотт (Scott, личное сообщение) в неопубликованном исследовании Escherichia coli применяла холод для синхронизации ядерной активности этого организма. Она была заинтересована в изучении феноменов, имеющих отношение к синтезу ДНК и РНК в течение синхрони-

зированного клеточного деления. Ее работа будет опубликована в недалеком будущем. В имеющих большое значение ранних работах Хегерти и Уикса (Hegarti, Weeks, 1940), Адольфа и Бейн-Джонса (Adolph, Bayne-Jones, 1932), Шермена и Кемерона (Sherman, Cameron, 1934), а также Роджерса и Гринбенка (Rogers, Greenbank, 1930) было обнаружено явление синхронизации в культурах бактерий.

Фитц-Джемс (1954) утверждал, что он воспроизвел синхронизацию ядерного деления у Bacillus megaterium, применяя прорастание споры как собственный метод синхронизации. Этот автор также считает, что он проследил синтез ДНК в синхронизированных этим методом культурах и утверждал, что полученная кривая свидетельствует о том, что синтез ДНК в хромосомах — непрерывный процесс. Мне кажется, что преждевременно применять подобное доказательство в качестве основы для сложной и цитологически необоснованной гипотезы о непрерывном образовании хромосом, особенно поскольку не были представлены химические методы.

В многочисленных опытах автор пытался повторить исследования Фитц-Джемса, стремясь вызвать ядерную синхронию при помощи прорастания спор. До сих пор не получено доказательств, что ядерная синхрония вызывается этим методом. Нет основания также считать, что прорастание спор может быть использовано для этих целей, так как можно легко показать, не только на примере Bacillus megaterium, но и на множестве различных организмов, что имеются широкие колебания во времени между прорастанием первой споры и прорастанием последней в любой взвеси. Так как ядерный цикл в активно растущей культуре в питательной среде совершается обычно в пределах 30 минут, было бы невозможно синхронизировать ядра в спорах, прорастающих в течение часа или больше. В подобной культуре, проросшей из спор, которые по указанной выше причине могли быть только асинхронными, следовало бы ожидать, что синтез ДНК происходил таким образом, что ход концентрации, нанесенный на диаграмму против времени, давал прямую линию. Опыты, поставленные в нашей лаборатории, подтвердили это предположение.

Летом 1954 г. М. Е. Хантер, работая в качестве моего ассистента, пыталась синхронизировать Bacillus megaterium при помощи воздействия холода и изучить ядерный аппарат во время и после влияния этого фактора. Дальнейшие исследования на жидких культурах были выполнены Хантер и Чибалским как в нашей лаборатории, так и в Нью-Брунсвике.

В этих исследованиях [Хантер-Чибалская (Hunter-Szybalska), Чибалский и ДеЛяматер, 1955] синхронизация была достигнута внезапным снижением температуры активно растущей культуры Bacillus megaterium, выросшей при 34°, до 15° и выдерживанием при этой температуре в течение 30 минут. Цитологические пре-

параты были приготовлены в период охлаждения и периодически после восстановления прежней температуры. Авторы этой работы наблюдали и сопоставляли ядерные цитологические данные с клеточной активностью в синхронизированной таким образом культуре. В необработанной культуре, выросшей при нормальной температуре до периода охлаждения, цитологическая картина в сущности постоянно такая же, какая была ранее описана ДеЛяматером (см. табл. 1, *1—8*). Относительная редкость стадий мета- и анафазы в такой активно растущей культуре указывает как на короткую продолжительность этих стадий, так и на причину, почему другие авторы, например Байссет, не были в состоянии их обнаружить.

Во время периода охлаждения в бульонных культурах при 15° и в культурах на питательном агаре, охлажденных до 6°, ядра становятся крупнее, центриоли увеличиваются в размере и могут даже размножаться независимо от ядерного деления (табл. 2, *18*), и количество ядер в ранней и поздней метафазах (прометa- и метафаза) увеличивается. При более низких температурах, 3—10°, цитологическая картина более сходна с картиной, обнаруженной у необработанных клеток, хотя, как будет показано, при этих температурах вырабатывается синхронизация.

После восстановления роста вследствие повышения температуры с 15 до 34° в последующие 10—15 минут имеет место деление ядер, и возникают интерфазные ядра, в которых хромосомы вновь удлиняются. При более длительном охлаждении возникают изменения, описанные как «мимолетная полиплоидия» и очень сходные с изменениями, вызванными действием террамицина или ауреомицина. Данные, представленные этими авторами, подтверждают синхронизирующее воздействие холода, недавно обнаруженное Хочкисом (1954). Четкое выявление митотического аппарата, вызванное воздействием холода, дает дальнейшее подтверждение наличия митотического цикла у этого организма. Полученные результаты также еще раз подчеркивают центриоль как особую структуру. Нетрудно распознать стадии деления.

Несомненно, что охлаждение тормозит только некоторые фазы деления, особенно те, которые относятся к отделению хромосом, иначе говоря, эта фаза цикла очень чувствительна к температуре — факт, свидетельствующий, что указанные фазы имеют значительную энергию активации. По-видимому, синтез ядерного материала (ДНК) не поражается преимущественно и не составляет сущность действия синхронизирующей температуры. То же можно сказать относительно сходной реакции, вызванной ранее упоминавшимися бактериостатическими агентами.

Размножение клеток и ядерное деление совершаются параллельно. Разделение ядра, по-видимому, составляет полный цикл прежде клеточного деления. Представление о циклической при-

роде ядерного деления утрачивается в теории непрерывного роста ядерного вещества, разработанной Фитц-Джемсом. Автор данной статьи (ДеЛяматер) делает вывод, что ядра Bacillus megaterium аналогичны ядрам высших форм и что это поддерживает взгляд о митотическом делении бактериальных ядер.

Бернер и Коен (Barner, Kohen, 1955), применяя нуждающийся в тимине штамм Escherichia coli, смогли вызвать синхронизацию ядерного вещества у этого организма, лишая культуру необходимого тимина, а затем прибавляя его. Введение тимина давало начало ядерному циклу, который был в сущности синхроничным во всех клетках и происходил характерным ступенчатым образом. Синтез ДНК появлялся скачкообразно, что еще больше опровергает тезис Фитц-Джемса. Эти авторы делали также попытки цитологического анализа, но, к сожалению, были ограничены малыми размерами клеток, не позволявшими им увидеть то, что они могли бы увидеть при более крупных размерах.

Автор считает, что воспроизведение синхронизации ядерного деления само по себе не является доказательством наличия митоза, но при сопоставлении с цитологическими наблюдениями полученные результаты дают более выразительное и важное доказательство наличия митоза у этих организмов. Если результаты сопоставляются еще со статистическим анализом ядер в разных фазах митоза и с одновременным химическим анализом синтеза ДНК и РНК, использования глюкозы и т. д., то тем самым достигается подход к тому, что может быть названо физиологической цитологией.

ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СИНХРОНИЗИРОВАННОЙ СИСТЕМЫ

Методы синхронизации в этих исследованиях

В описываемых здесь исследованиях Bacillus megaterium, штамм Робинау и Escherichia coli, штамм В выращивались в солевой глюкозной среде с непрерывной аэрацией и перемешиванием. Продолжительность репродуктивного цикла, как и ожидалось, значительно превышает при этих условиях таковую при использовании питательного бульона (Хантер-Чибалская и др., 1955). Начальная плотность по Клетту составляла около 120 единиц и количество клеток в среднем составляло $2{,}2 \times 10^8$ бактерий в 1 мл. Подсчет клеток производился непосредственно в бактериальной счетной камере Петрова-Хауссера и путем высева на чашки. Воздействие холода осуществлялось перенесением активно растущей культуры в водяную баню желаемой или более низкой температуры с последующим помещением культуры при нужной температуре. Параллельно с культурой охлаждался флакон того же объема и с той же средой с введенным в нее тер-

мометром. Полученная таким образом кривая температурных изменений составила графические значения сравнения температурных условий, имевших место в различных исследованиях. Таким же образом восстанавливались культуры при температуре выращивания.

Цитология изучалась так, как это было описано раньше в других наблюдениях [ДеЛяматер, 1951в; Бланк (Blank), Мак Карти (McCarthy) ДеЛяматер, 1951], с той разницей, что 0,5—1 мл жидких культур помещался или на подсушенные агаровые блоки, или на фильтры «Миллипор» и затем быстро переносился на покровные стекла с последующей фиксацией парами осмия (2%). Техника с применением «Миллипор»-фильтров при испытании оказалась более быстрой и давала несколько лучшие результаты (Хантер-Чибалская и др., 1955), но не является обязательным условием получения хороших препаратов. Клетки были гидролизированы в 1 N HCl в течение 6 минут и окрашивались азуром A-SO_2. Затем они обезвоживались в ледяном спирте и монтировались в одной из применяемых для этих целей смол.

Образцы для цитологических и статистических анализов брались через 6, 15, 30 и 60 минут после охлаждения и с 6—8-минутными интервалами во время последующего периода роста при 34° на протяжении 2—5 часов.

Во время каждого опыта периодически брались образцы для анализа ДНК и РНК, счета клеток, абсорбционных исследований на пурины и пиримидины (техника будет описана ниже) и в особых случаях для цитохимических анализов на жир и белок.

Химические анализы

РНК. Химические определения РНК были даны на основании пробы Биал-Миллера [Миллер (Miller), Миллер и Голдер (Golder), 1950].

ДНК. Для анализа ДНК применялась реакция Дише [Зейберт (Seibert), 1940]. Принятая окончательно модификация была такова: 8 мл культуры для подкисления материала и прекращения роста были внесены в пробирку, содержащую 0,1 мл 1 N HCl. Затем образцы были помещены в баню со льдом в соленой воде. Все образцы выдерживали таким образом до конца исследования. Образцы центрифугировали; концентрированные клетки ресуспендировали в 0,7 мл дистиллированной воды; 0,5 мл этой взвеси помещали в отдельную пробирку для анализа на ДНК. Остаток 0,2 мл был использован на пробу Биал-Миллера на РНК (см. выше). К 0,5 мл прибавляли 1,5 мл реактива Дише для исследования на ДНК и пробирки помещали в кипящую водяную баню на 1 час. После кипячения пробирки быстро охлаждали в ледяной воде и учитывали в спектрофотометре «Бекман» при 600 $m\mu$.

Обычно применяемое в реакции Дише 10-минутное нагревание оказалось слишком коротким для Bacillus megaterium. Клетки не растворялись, и за такой короткий срок не вся ДНК извлекалась из клеток. Было найдено, что при кипячении в течение того же времени реакция повышается в среднем на 50—60% и что клетки растворяются только после 20-минутной (приблизительно) экспозиции с горячим реактивом. Случайно было обнаружено, что даже коммерческая ДНК дает повышение интенсивности реакции в среднем на 30% после кипячения в течение часа вместо обычных 10 минут. Для Escherichia coli 10-минутное кипячение оказалось достаточным. Именно этот метод был применен МакНейр Скотт (личное сообщение), а также Бернером и Коеном (1955) для кишечной палочки. Данной методикой было установлено, что содержание ДНК на одну клетку B. megaterium в среднем в 10 раз превышает установленное для E. coli. Это соотношение находится в соответствии с относительными размерами клеток. Полные данные об этих наблюдениях вместе с точными биохимическими данными будут представлены в другой статье.

В попытке выделить ДНК, как было показано при помощи реактива Дише, из Bacillus megaterium путем кипячения в 5% соляной кислоте было найдено, что наибольшее количество извлекается в первые 10 минут при наличии большого количества, остающегося в клетках. При дальнейшем кипячении определяемое количество ДНК в надосадочной жидкости снижается и меньшее количество может быть экстрагировано из обработанных клеток. Отсюда был сделан вывод, что кипящая 5% соляная кислота разрушает деоксирибозу, для обнаружения которой предназначена проба Дише, и, следовательно, этот метод не может быть применен. Вследствие этих трудностей была использована техника Уэбба и Леви (Webb, Levy, 1955) с вполне приемлемыми результатами. Трудность этого метода заключается в том, что цветовая реакция очень быстротечна, поэтому трудно получить правильный учет результата. Однако в исследованиях, в которых этот метод был применен, был обнаружен тот же тип синтеза ДНК, какой наблюдался в других опытах.

Вследствие трудностей, возникших при получении того, что может считаться количественным результатом при установленных химических методах или их модификациях, была предпринята попытка разработать метод, который позволил бы установить общее количество нуклеиновой кислоты во всех клетках и остающуюся ДНК в клетках, обработанных холодной 5% соляной кислотой для удаления РНК. Из работы Берера (Barer, 1955) вытекает, что возможно применять суспендирующую среду, которая имела бы коэффициент преломления, в основном сходный с таковым у бактерий, но у которой отсутствовала бы характерная адсорбция в той части спектра, в которой мы заинтересованы (230—350 mμ). Проба могла бы зависеть от характер-

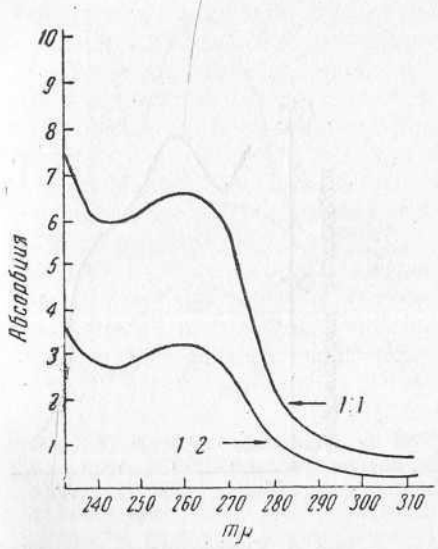


Рис. 3. Спектр абсорбции необработанных клеток Bacillus megaterium в 96% глицерине. 1 : 1 — неразбавленная взвесь; 1 : 2 — взвесь разбавлена 1 : 2.

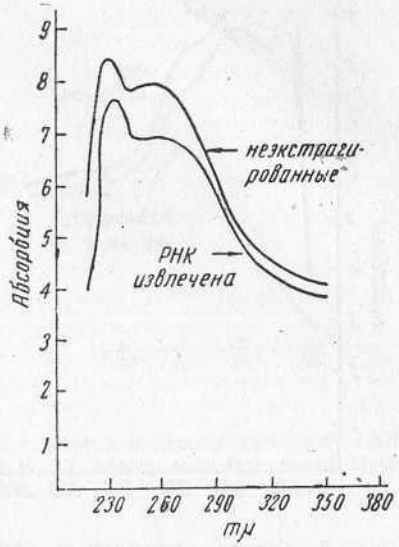


Рис. 4. Спектр абсорбции в 96% глицерине необработанных клеток Bacillus megaterium и клеток, экстрагированных холодной соляной кислотой в течение 20 часов для удаления РНК.

ного поглощения спектра пуринов и пиримидинов. Подходящим для этих целей оказался 96% глицерин; 1 мл культуры был осажден и ресуспендирован в 4 мл 96% глицерина.

Рис. 3 показывает спектр поглощения необработанных Bacillus megaterium в 96% глицерине. Верхняя кривая показывает разведение 1 : 1, которое означает, что 1 мл культуры был осажден и ресуспендирован в 1 мл 96% глицерина, т. е. восстановление той же концентрации клеток, что и в исходной культуре. На нижней кривой разведение было 1 : 2. Пропорциональность этих двух кривых очевидна. На рис. 4 целые клетки были взвешены в 96% глицерине и для сравнения приведена соответствующая культура, экстрагированная для удаления РНК холодной соляной кислотой в течение 20 часов. Неэкстрагированные клетки дали в сущности такую же кривую, какая показана на рис. 3. У клеток, из которых извлечена РНК, взвешенных в одинаковой концентрации, имеется подъем в области 280—290 mμ. Появление этого максимума поглощения было последовательно вызвано извлечением РНК и может зависеть от (а) изменения pH клеток; (б) демаскировки белка, дающего абсорбцию в этой области; или (в) демаскировки отдельных нуклеотидов, присутствующих в оставшейся ДНК, имеющей относительно бóльшую абсорбцию в этой области.

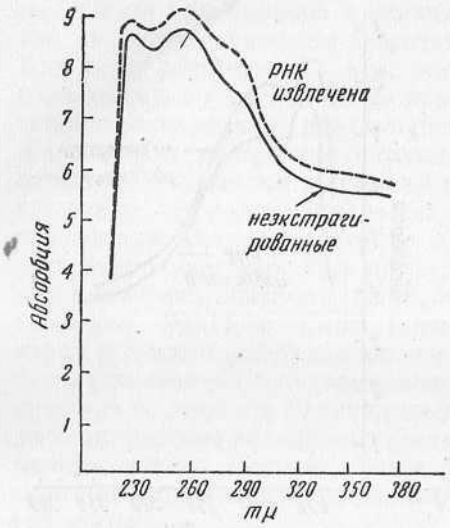


Рис. 5. Спектр абсорбции в 96% глицерине необработанных клеток Escherichia coli и клеток, экстрагированных холодной соляной кислотой в течение 20 часов для удаления РНК.

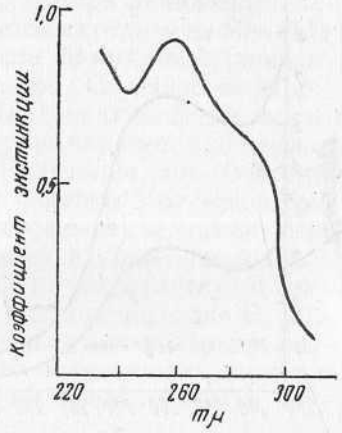


Рис. 6. Коэффициенты экстинкции хромосомы материнских клеток пыльцы Tradescantia (Касперсон, 1950).

На рис. 5 приведены кривые соответствующей абсорбции неэкстрагированных и экстрагированных 5% холодной соляной кислотой клеток Escherichia coli, также помещенных в 96% глицерин. И здесь можно видеть подъем кривой в области 280—290 mμ. Максимум в области 230 mμ — характерная особенность кривой абсорбции, полученной у целых и экстрагированных клеток у E. coli и B. megaterium.

Интересно отметить, что это же было установлено Касперсоном (Caspersson, 1950) в кривых абсорбции зоны хромосом материнских клеток пыльцы Tradescantia, как показано на рис. 6. На рис. 7 три кривые представляют спектр поглощения, полученный при обработке клеток B. megaterium холодной соляной кислотой для удаления РНК и затем кипящей соляной кислотой для удаления ДНК. Кривая абсорбции экстрагированной РНК в 96% глицерине представлена внизу диаграммы. Высота кривой отражает разведение и не могла быть построена так, чтобы показать количество экстрагированной ДНК. Пик соответствует 260 mμ. Затем клетки были обработаны кипящей 5% соляной кислотой в течение 20 минут для удаления ДНК. Экстрагированная ДНК была помещена в 96% глицерин и затем исследована; кривая, полученная при этом, показана сплошной линией. Она характерна для кривой абсорбции ДНК, как видно из сравнения с рис. 8, на котором показан спектр поглощения коммерческой ДНК в глицерине. Верхняя прерывистая линия

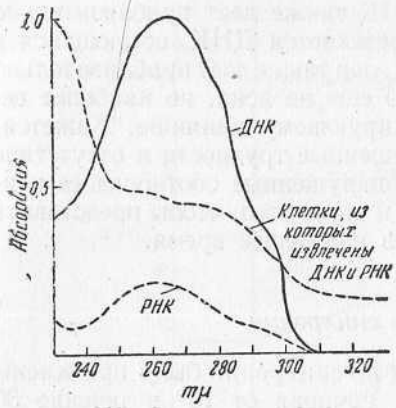


Рис. 7. Спектр абсорбции в 96% глицерине РНК, экстрагированной из клеток Bacillus megaterium холодной соляной кислотой; ДНК, экстрагированной из тех же клеток 20-минутной обработкой кипящей 5% соляной кислотой; клеток, из которых РНК и ДНК были таким образом удалены.

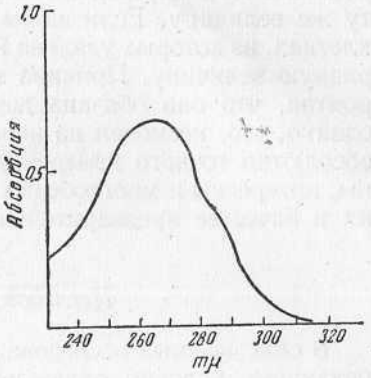


Рис. 8. Спектр абсорбции в 96% глицерине коммерческой ДНК.

показывает спектр поглощения клеток, из которых были экстрагированы, как описано выше, ДНК и РНК. Клетки также были взвешены в 96% глицерине. Кривая показывает, что сохраняется максимум в зоне 230 mμ, что имеется значительное выравнивание кривой между 250 и 290 mμ с небольшим максимумом, который продолжает сохраняться в зоне 260 mμ. Остается подъем в пределах 280—290 mμ. Это поглощение, вероятно, связано с наличием белка. Пик в зоне 230 mμ указывает на наличие в клетках какого-то вещества, сохранившегося, несмотря на удаление ДНК и РНК. Эта кривая также свидетельствует, что 20-часовая экстракция холодной соляной кислотой с последующей обработкой в течение 20 минут кипящей соляной кислотой недостаточна для удаления из клеток всех нуклеиновых кислот.

Казалось бы, однако, что спектр абсорбции, вызванный обработанными соляной кислотой клетками при помощи указанной техники, дает некоторое представление о ДНК клеток, но до настоящего времени было невозможно сделать это определение полностью количественным.

Непохоже также, что при экстракции холодной соляной кислотой удаляется вся РНК, поэтому учет ДНК в клетках, из которых извлечена РНК, возможно, включает абсорбцию, обусловленную некоторым количеством РНК.

Была обнаружена еще одна особенность. Если общее количество нуклеиновых кислот определяется этим методом, давая, скажем, одну величину, а из параллельного образца экстраги-

рована РНК, определение на РНК также дает приблизительно ту же величину. Если затем определяется ДНК, остающаяся в клетках, из которых удалена РНК, она также дает приблизительно равную величину. Причина этого еще не ясна, но наиболее вероятно, что она обязана демаскирующему влиянию. Кажется, однако, что, несмотря на неразрешенные трудности и отсутствие абсолютно точного измерения, обнаруженные соотношения ценны, интересны и многообещающи и стоят того, чтобы представить их в качестве предварительных в настоящее время.

Исследования синхронии

В описываемых исследованиях по синхронии были применены различные условия охлаждения, начиная от 15° в течение 30

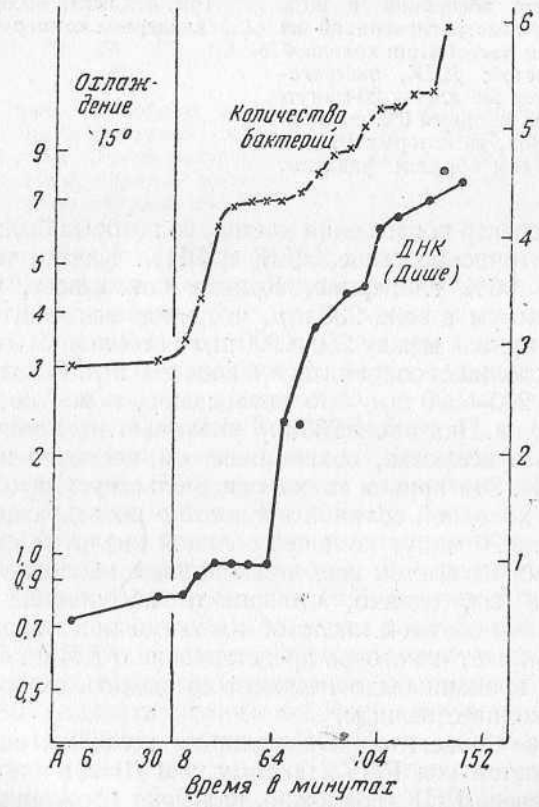


Рис. 9. Культура Bacillus megaterium. Частичная синхронизация путем охлаждения при температуре 15° в течение 30 минут с последующим восстановлением температуры роста. Количество бактерий и содержание ДНК (Дише).

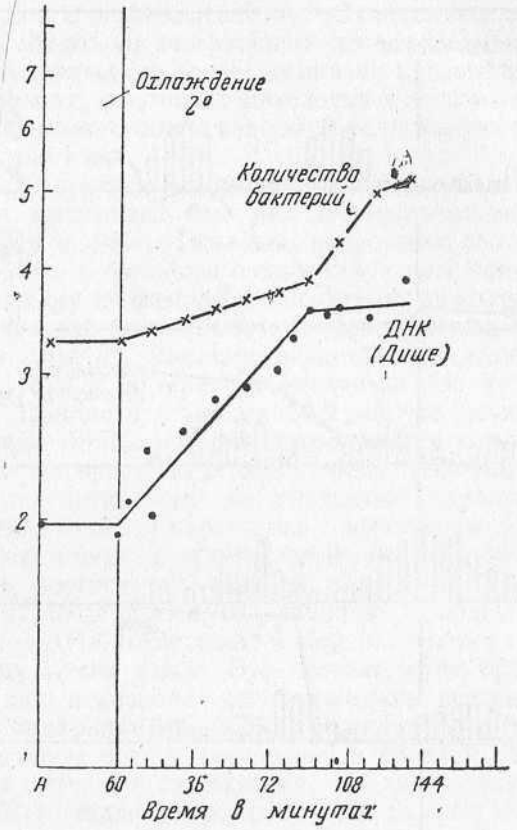


Рис. 10. Культура Bacillus megaterium. Частичная синхронизация при охлаждении до температуры 2° в течение 60 минут с последующим восстановлением температуры роста. Количество бактерий и содержание ДНК (Дише).

минут и до 2° в течение часа. Результаты выполненных многочисленных опытов, которые, как казалось, могут иметь отношение (имеют отношение) к нашему обсуждению, представлены на прилагаемых диаграммах. На рис. 9 частичная синхронизация была достигнута у Bacillus megaterium, охлажденной в течение 30 минут при 15°. Количество бактерий после устранения охлаждения круто возрастает в течение первых 24 минут, затем остается на одном уровне, а на 72-й минуте заостряется в асинхронной отлогой кривой. ДНК остается постоянной до 64-й минуты после устранения охлаждения, а затем подвергается ступенчатому подъему, который также отклоняется от синхронии. Параллельное взаимоотношение между ступенеобразным уси-

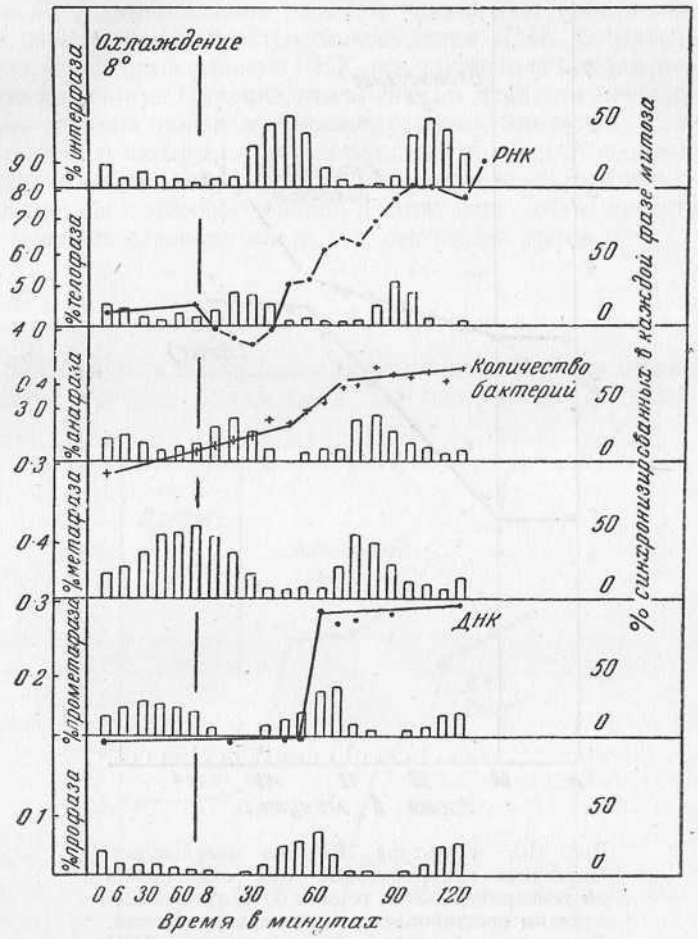


Рис. 11. Bacillus megaterium, культура охлаждена до температуры 8° в течение 60 минут. Подсчет количества бактерий, содержание РНК и ДНК и соотношение ядер в различных стадиях митоза во время охлаждения и после восстановления температуры роста.

лением клеточного деления, как показывает подсчет бактерий, и синтезом ДНК показано также на рис. 10, на котором степень синхронии была значительно меньшей, чем в предыдущем опыте. Крутизна ступеней синтеза ДНК будет обсуждена более подробно ниже. По-видимому, в опытах, в которых имела место только частичная синхрония, еще возможны существенные разъяснения. В этих опытах температура охлаждения в течение 60 минут и взаимоотношение синтеза ДНК и клеточного деления свидетельствуют, что эта температура меняется с синтезом ДНК

так же, как и с делением клеток. Охлаждение до 15° в то же время как будто не задерживает синтеза ДНК. В этих двух опытах цитологические исследования не производились. Однако в других опытах, в которых цитология изучалась, деление ядер также показывает специфическую параллельную кривую (Хантер-Чибалская и др., 1955).

На рис. 11 представлен анализ стадий митоза вместе с кривой нарастания количества бактерий и результатами химического анализа ДНК и РНК. Показано нарастание соотношения ядер в прометафазе и метафазе с сопутствующим снижением количества ядер в других фазах. Синхронизация не полная, но приближается к таковой (около 80%). Воздействующая температура в этом опыте была 8°. Показано развитие ядра через стадии анафазы, телофазы и интерфазы, следующие за устранением охлаждения. Приблизительно на 30-й минуте начинается увеличение синтеза РНК, которое продолжается с небольшими отклонениями на протяжении всего опыта. Деление клеток, определяемое их подсчетом, не полностью ступенеобразно; наблюдается постепенное нарастание с небольшим скачком в центре. Подсчет клеток в этом случае не дает ясного указания на степень достигнутой ядерной синхронии. Приблизительно в то время, когда хромосомы начинают сокращаться для профазы, синтез ДНК происходит в виде внезапного скачка. Увеличение здесь почти вдвое. Это соответствует пропорции ядер, которые, как показывает цитологическое исследование, находятся в синхронии (±80%). Длительность митотического цикла в данном случае составляет в среднем 68 минут после устранения действия охлаждения. Из диаграммы видно, что у ядер имеется тенденция осуществлять деление после синхронизации для построения в стадии интерфазы. Это соответствует идее, что интерфаза представляет собой активную вегетативную метаболическую стадию.

Рис. 12 демонстрирует опыт с Bacillus megaterium, в котором была достигнута почти полная синхронизация в результате действия охлаждения до 3° на протяжении 60 минут. В период охлаждения здесь также повышается относительное количество ядер в прометафазе и метафазе с соответствующим снижением других фаз. После устранения холода наблюдается почти немедленный импульс к завершению деления с отчетливым построением в интерфазной стадии, которая сохраняется в этом опыте на протяжении почти одного часа. Точно так же, в то время, когда хромосомы начинают сокращаться для перехода в профазу, резким скачком возникает синтез ДНК, которая здесь удваивается в количестве. Деление клеток возникает в первые минуты после устранения воздействия холода, и количество бактерий остается постоянным на протяжении последующих 130 минут, прежде чем происходит второй скачок в конце опыта. Как показали Хантер-Чибалская и др. (1955), это взаи-

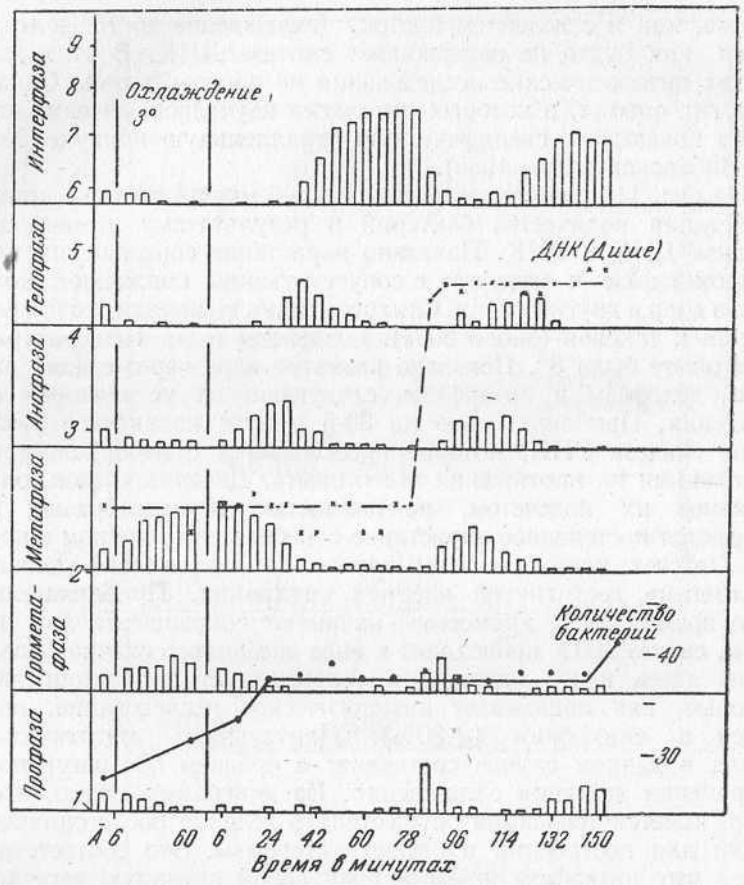


Рис. 12. Bacillus megaterium, культура охлаждена до температуры 3° на протяжении 60 минут; подсчет количества бактерий, содержание ДНК и соотношение ядер в различных стадиях митоза во время охлаждения и после восстановления температуры роста; синхрония.

моотношение между клеточным делением и делением ядер оказывается параллельным и независимым от механизма синтеза ДНК. Синтез ДНК, однако, также как будто совершается аналогичным образом. Можно сделать предположение, что температурный коэффициент характерен для каждой из этих реакций. Бентцон (Bentzon), Маалое и Раш (Rasch) (1952) уже показали, что температурный коэффициент синтеза ДНК (фага) в среднем вдвое превышает таковой для клеточного деления. Поверхностный анализ дополнительных данных свидетельствует, что деление клеток, деление ядер, синтез деоксирибозы и синтез пурина и пиримидина (замыкание круга) могут иметь характерные

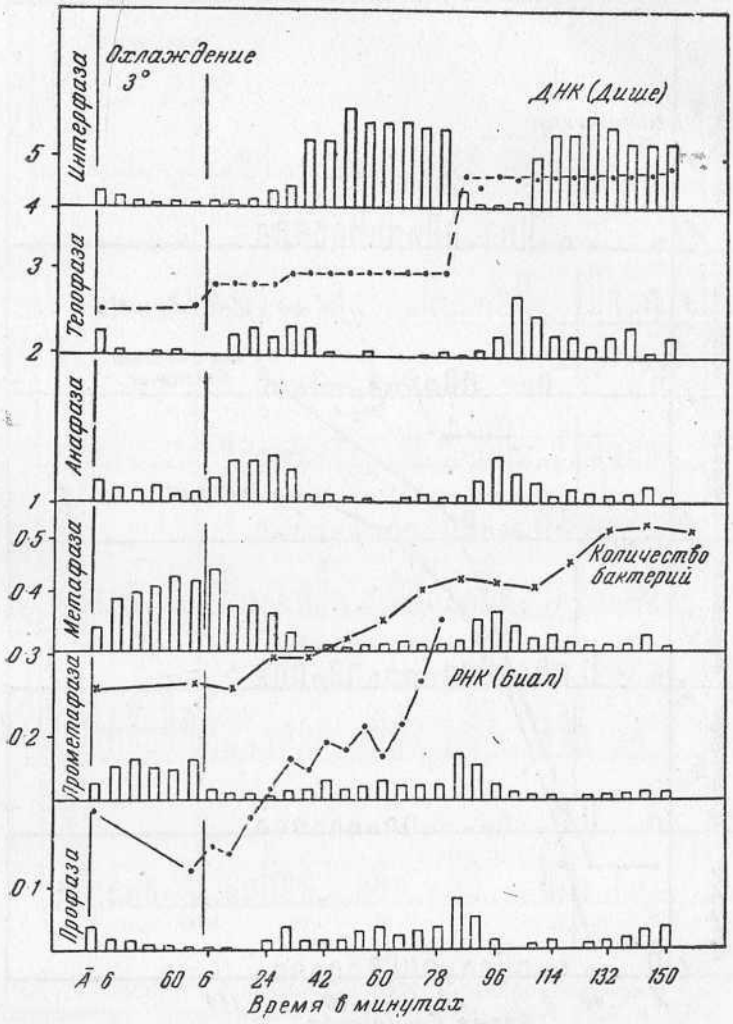


Рис. 13. Bacillus megaterium, культура охлаждена до температуры 3° на протяжении 60 минут; подсчет количества бактерий, содержание ДНК и соотношение ядер в различных стадиях митоза во время охлаждения и после восстановления температуры роста; частичная синхрония ядерного деления и синтеза ДНК.

температурные коэффициенты. Это должно было бы оказаться интересным и плодотворным направлением изысканий.

Во время этих исследований стало несомненным, что было невозможно предвидеть заранее результаты данных опытов, даже несмотря на одинаковые температурные условия и, насколько можно было бы обеспечить регулирование, одинаковые

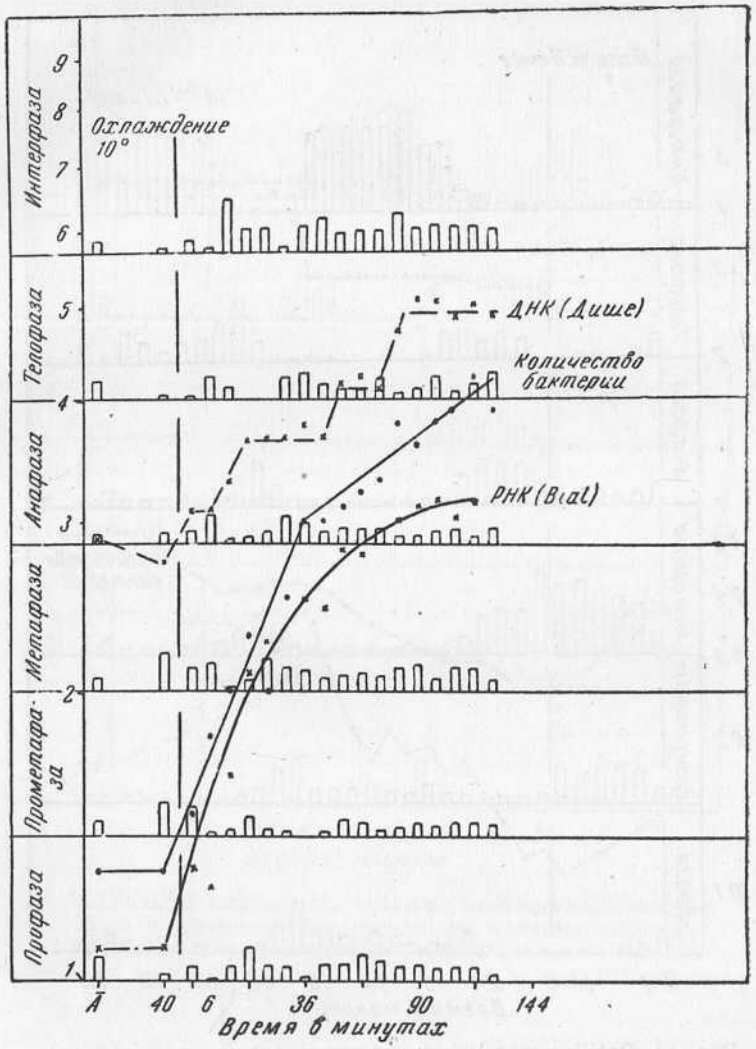


Рис. 14. Bacillus megaterium, культура выдерживалась на воздухе при температуре 10° в течение 40 минут; подсчет количества бактерий, содержание ДНК и соотношение ядер в различных стадиях митоза во время охлаждения и после восстановления температуры роста. Частичная синхрония.

условия посева, роста и т. п. Рис. 13 демонстрирует опыт, идентичный показанному на рис. 12, но в котором синтез ДНК был не полностью синхронизирован. Трудно установить факторы, которым обязаны эти различия; дополнительные исследования проводятся в настоящее время.

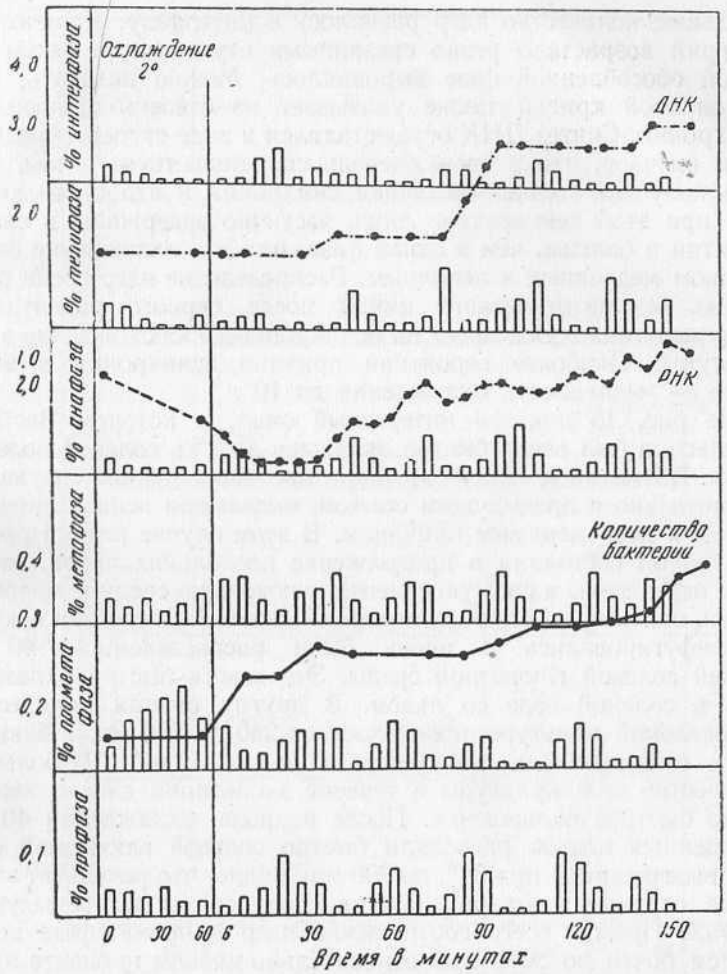


Рис. 15. Bacillus megaterium, культура быстро охлаждена до температуры 2°; количество бактерий, содержание РНК и ДНК и соотношение ядер в различных стадиях митоза во время охлаждения и после восстановления температуры роста. Частичная синхрония и депрессия центриолей.

На рис. 14 представлен опыт, в котором была достигнута лишь частичная синхрония. В этом случае температура охлаждения была —10° в течение 40 минут. Охлаждение производилось в ящике со льдом, культура была окружена воздухом, но не ледяной водой. Охлаждение, следовательно, было значительно более медленным, чем в других опытах.

Ядра распределялись почти поровну в стадиях прометафазы и метафазы. После устранения действия холода относительно

небольшое количество ядер развилось в интерфазу. Количество бактерий возрастало резко срезанными ступенями и затем во второй обособленной фазе выровнялось. Можно полагать, что наклон этой кривой также указывает на степень имеющейся асинхронии. Синтез ДНК осуществлялся в виде ступенеобразной серии скачков, что в свою очередь свидетельствует о том, что была получена только частичная синхрония и что ядра могли быть при этой температуре лишь частично задержаны в своем развитии и больше, чем в одной фазе, или что охлаждение было слишком медленным и неполным. Распределение ядер среди различных фаз митотического цикла после первого развития в интерфазу также указывает на асинхронное происхождение этой культуры. Наиболее вероятная причина асинхронии в этом опыте — медленность охлаждения до 10°.

На рис. 15 показан интересный опыт, в котором Bacillus megaterium был очень быстро охлажден до 2° в соленой воде со льдом. В известном смысле это была противоположная ситуация, сравнительно с предыдущим опытом, вызвавшая асинхронию по другим и необъяснимым причинам. В этом случае клетки росли в активном состоянии в продолжение нескольких часов, затем были перенесены в свежую солевую глюкозную среду и выращивались опять при 34° дополнительно один час. Затем они быстро центрифугировались и вновь были распределены в 40 мл свежей солевой глюкозной среды. Эта взвесь быстро охлаждалась в соленой воде со льдом. В других опытах количество охлаждаемой культуры колебалось от 240 до 450 мл, в зависимости от потребного количества образцов (проб). Небольшое количество этой культуры в течение экспозиции давало необычайно быстрое охлаждение. После периода охлаждения 40 мл взвешенных клеток разводили быстро солевой глюкозной средой, выдержанной при 34°, до 200 мл. Видно, что результат этого опыта отличается от результатов, полученных в предыдущих опытах. Прежде всего соотношение ядер в прометафазе повышается почти до 80% при относительно низком проценте ядер, находящихся в метафазе. Цитологическим исследованием было установлено, что интенсивное и быстрое охлаждение вызывает сокращение ядер, в результате чего многие ядра, которые казались находящимися в прометафазе, на самом деле не были в этой фазе, как оказалось при цитологическом изучении препаратов, приготовленных после того, как было устранено действие охлаждения на культуру. После восстановления температуры культивирования (34°) приблизительно 50% ядер подверглись немедленному делению, как это свойственно начальным этапам стадий митоза. Приблизительно равное количество продолжало находиться в это время в метафазе или прометафазе. Примерно через 30 минут после восстановления температуры роста при 34° вторая группа ядер подверглась делению. В отношении этих двух групп имело место последовательное параллельное раз-

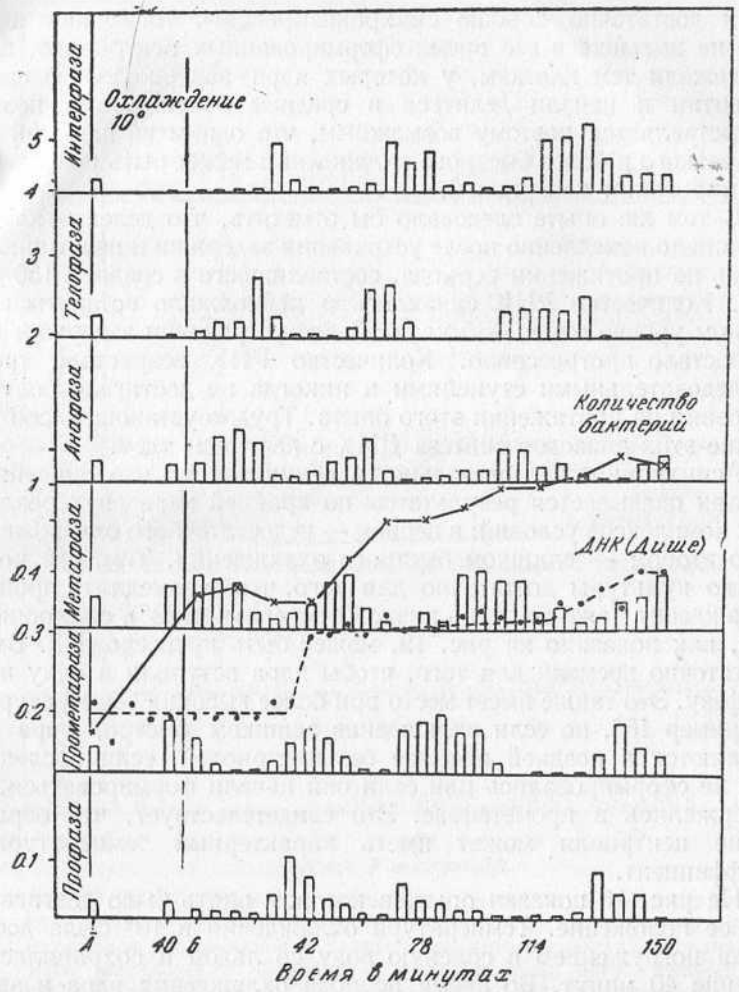


Рис. 16. Bacillus megaterium, культура охлаждена до температуры 10° на протяжении 40 минут; учет количества бактерий, содержание ДНК и соотношение ядер в разных стадиях митоза во время охлаждения и после восстановления температуры роста. Частичная синхрония; деление ядер без синтеза ДНК.

вите ядер через стадии деления, составлявшее около 30 минут для каждой группы. Цикл деления при условиях роста, примененных в этих опытах, был равен в среднем 60 минутам.

После пересмотра цитологического материала было выяснено, что клетки, у которых центриоли уже сформировались или находились в процессе формирования в период охлаждения, были именно теми, которые подверглись первому делению и которые

были достаточно хорошо синхронизированы, тогда как ядра, еще не имевшие в это время сформированных центриолей, принадлежали тем клеткам, у которых ядра задержались в своем развитии и начали делиться в среднем 30 минутами позже. Представляется поэтому возможным, что одним из влияний более резкого и более быстрого охлаждения может быть подавление формирования центриолей.

В том же опыте следовало бы отметить, что деление клеток возникало немедленно после устранения задержки и не возникало вновь на протяжении периода, составлявшего в среднем 150 минут. Количество РНК снизилось и продолжало оставаться на низком уровне около 36 минут. После устранения задержки оно возрастало прогрессивно. Количество РНК возрастало тремя последовательными ступенями и никогда не достигало полного удвоения на протяжении этого опыта. Трудно установить соотношение этих эпизодов синтеза ДНК с делением ядер.

Асинхрония, следовательно, в обоих только что описанных опытах оказывается результатом по крайней мере двух различных комплексов условий: в первом — недостаточного охлаждения, а во втором — слишком быстрого охлаждения. Там, где количество культуры достаточно для того, чтобы замедлить процесс охлаждения даже до очень низкой температуры (3°), синхронизация, как показано на рис. 12, может быть превосходной. Было достаточно времени для того, чтобы ядра вступили в одну и ту же фазу. Это также имеет место при более высоких температурах, например 15°, но если охлаждение слишком быстро, ядра накопляются в поздней профазе без центриолей, если последние еще не сформировались или если они начали формироваться, но задержались в прометафазе. Это свидетельствует, что образование центриоли может иметь характерный температурный коэффициент.

На рис. 16 показан опыт, в котором опять было достигнуто особое положение. Температура охлаждения в 10° была достигнута погружением в соленую воду со льдом и сохранялась в течение 40 минут. Во время периода охлаждения ядра и здесь накопляются в прометафазе и метафазе. После устранения действия холода наблюдается волна деления, проходящего через стадии митоза, но ядра не остаются в интерфазе, как в предыдущем опыте (см. рис. 12), а немедленно переходят в профазу и приступают ко второму делению. Здесь цикл деления значительно короче. Однако в период развития от интерфазы к профазе совершается всего около 50% синтеза ДНК. Кривая синтеза ДНК затем становится пологой на протяжении около 80 минут, прежде чем начинает увеличиваться в постепенном подъеме. Во время этого периода, когда отсутствует улавливаемый синтез ДНК, начинающийся около 72-й минуты после периода охлаждения, в культуре наблюдается третья волна ядерного деления. Она, по-видимому, не имеет отношения к какому-либо синтезу

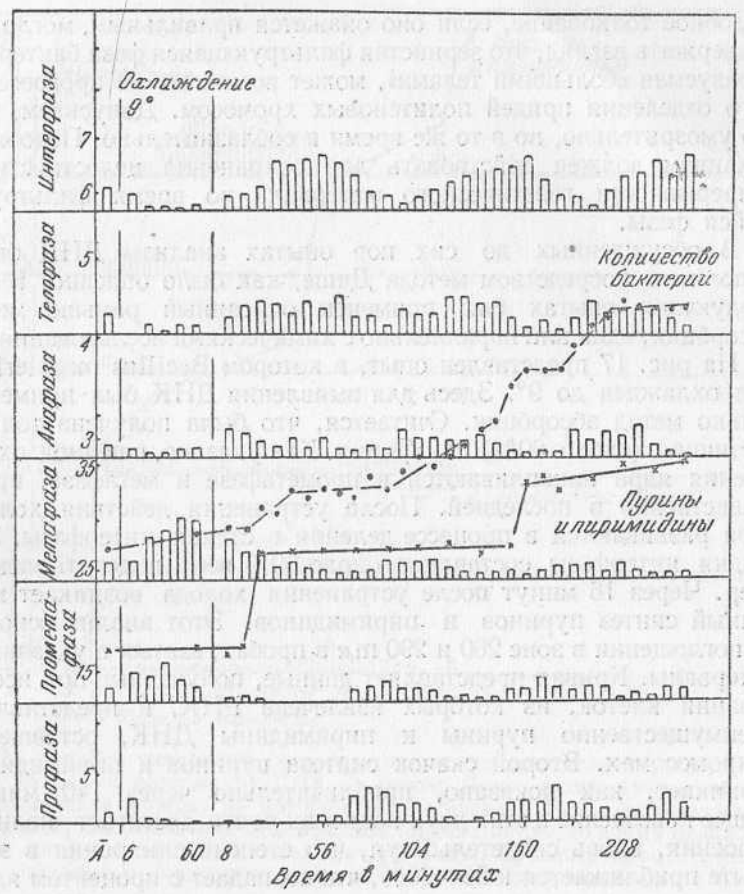


Рис. 17. Bacillus megaterium, культура охлаждена до температуры 9° в течение 60 минут; учет количества бактерий, содержание пуринов и пиримидинов в клетках, из которых экстрагирована РНК (определение абсорбцией) и соотношение ядер в разных стадиях митоза во время охлаждения и после восстановления температуры роста. Частичная синхрония; скачкообразный синтез пуринов и пиримидинов ДНК.

ДНК. В то же время размер клетки уменьшается почти наполовину. Этот своеобразный результат позволяет предположить одно из двух: (1) что необходимый для этого деления синтез совершается перед периодом охлаждения или (2) что деление ядер может происходить как последствие политеновой природы хромосом и что раз хроматиды размножились, они могут отделяться при каких-то неизвестных физиологических условиях. Результаты этого опыта свидетельствуют о возможном явлении политении у бактериальных хромосом вместе с возможностью прогрессивного отделения их без дальнейшего синтеза ДНК.

Подобное толкование, если оно окажется правильным, могло бы поддержать взгляд, что зернистая фильтрующаяся фаза бактерий, образуемая «большими телами», может возникать из прогрессивного отделения прядей политеновых хромосом. Допускаем, что это умозрительно, но в то же время и соблазнительно. Подобный механизм должен действовать для сохранения целостности и непрерывности генетического материала во время фильтрующейся фазы.

В обсужденных до сих пор опытах анализы ДНК были выполнены посредством метода Дише, как было описано. В последующих опытах был применен описанный раньше метод абсорбции, один или параллельно с химическими исследованиями.

На рис. 17 представлен опыт, в котором Bacillus megaterium был охлажден до 9°. Здесь для выявления ДНК был применен только метод абсорбции. Считается, что была получена только частичная (около 60%) синхрония. Как указано, в период охлаждения ядра накапливаются в прометафазе и метафазе, преимущественно в последней. После устранения действия холода ядра развиваются в процессе деления в стадию интерфазы. Эта стадия интерфазы составляет около 60% всех подсчитываемых ядер. Через 16 минут после устранения холода возникает внезапный синтез пуринов и пиримидинов. Этот анализ основан на поглощении в зоне 260 и 290 mμ в пробах, взятых в указанные интервалы. Кривая представляет данные, полученные при исследовании клеток, из которых извлечена РНК, и представляет преимущественно пурины и пиримидины ДНК, оставшейся в хромосомах. Второй скачок синтеза пуринов и пиримидинов возникает, как показано, приблизительно через 140 минут. Общее повышение в этих двух подъемах почти достигает полного удвоения, вновь свидетельствуя, что степень синхронии в этом опыте приближается к 50—60%, что совпадает с процентом ядер, синхроничность которых определена цитологически. Интересно отметить, что степень синхронизации, как показывает учет количества бактерий, довольно низкая, так как повышение количества бактерий здесь постепенное и медленное. Повышение количества бактерий, однако, несколько меньше, чем простое удвоение на протяжении всего опыта. Следует отметить, что первый скачок синтеза пуринов и пиримидинов происходит очень рано, в стадии телофазы—интерфазы первого цикла деления, в то время как второй скачок синтеза пуринов—пиримидинов имеет место позже, в стадии интерфазы, но прежде, чем хромосомы начинают переходить в профазу в довольно большом количестве. Другими словами, возникает предположение, что этот скачок должен был бы предшествовать скачку, определяемому анализом деоксирибозы, если бы проба Дише была применена в этом опыте.

Как вывод из этого результата и в попытке удостовериться, дают ли одну и ту же картину химические исследования на

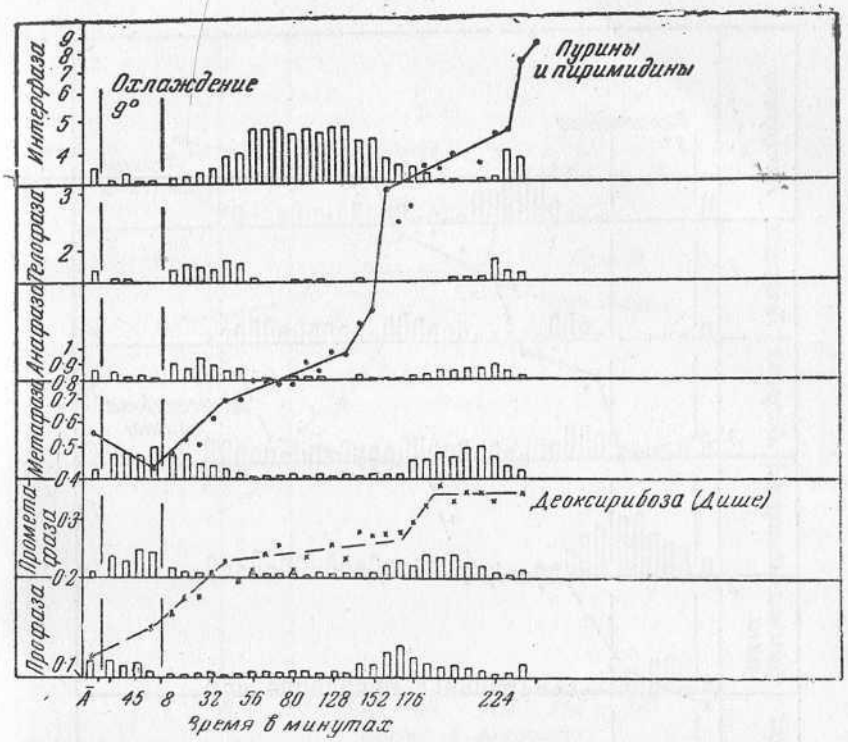


Рис. 18. Bacillus megaterium, культура охлаждена до температуры 9° в течение 45 минут; содержание ДНК по методу Дише, содержание пуринов и пиримидинов клеток, из которых экстрагирована РНК (определяемое абсорбцией) и соотношение ядер в разных стадиях митоза во время охлаждения и после восстановления температуры роста. Сравните время синтеза пуринов и пиримидинов с временем синтеза деоксирибозы.

деоксирибозу и результаты абсорбции на пурины и пиримидины, были предприняты опыты, в которых одновременно в одной и той же экспериментальной системе были применены оба метода. В этом опыте (рис. 18) в качестве тест-организма был опять взят Bacillus megaterium, и охлаждение было доведено до 9° в течение 45 минут. Ядра показаны накопившимися в прометафазе и метафазе и после устранения действия холода они начали немедленно делиться и перешли в интерфазу. Количество ядер, остающихся в интерфазе, колеблется между 80 и 90%. После устранения действия холода пурины и пиримидины обнаруживают подъем в период от 8 до 152 минут; в это время имеется резкий скачок, при котором наблюдается почти полное удвоение этих веществ, как видно из рис. 18. Этот скачок, как указано, возникает ближе к концу периода интерфазы. Кривая синтеза деоксирибозы выявляет медленный подъем между 8-й и 40-й минутой, после чего имеется сглаживание кривой и относительно

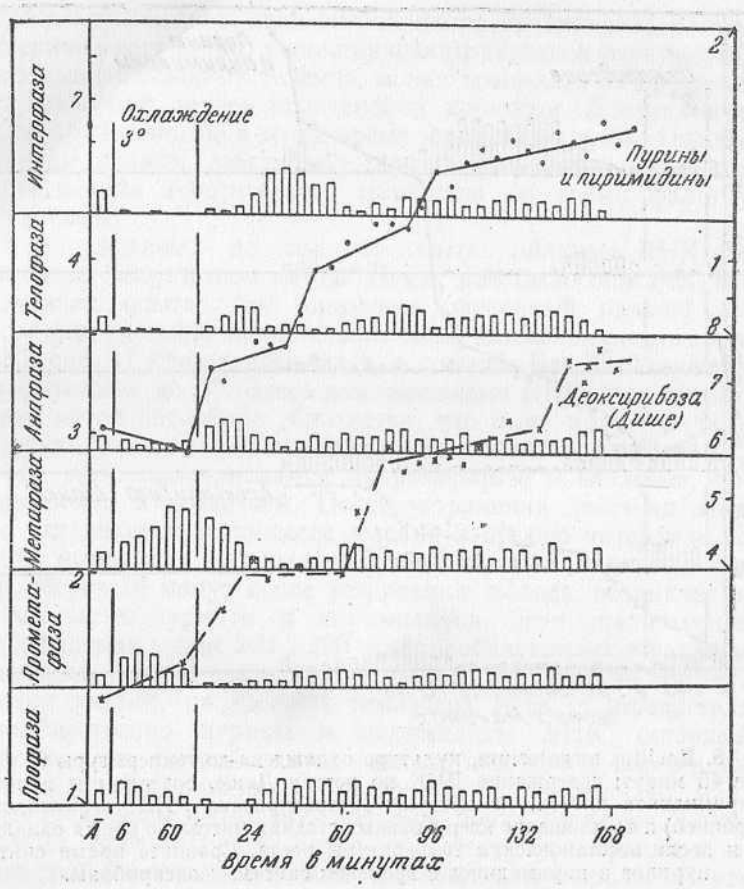


Рис. 19. Bacillus megaterium, культура охлаждена до температуры 3° в течение 60 минут; содержание ДНК по Дише, содержание пуринов и пиримидинов в клетках, у которых экстрагирована РНК (определяемое абсорбцией) и соотношение ядер в разных стадиях митоза во время охлаждения и после восстановления температуры роста. Частичная синхрония. Сравните время синтеза пуринов и пиримидинов с временем синтеза деоксирибозы.

незначительный синтез на протяжении последующих 120 минут. Затем обнаруживается половинный скачок, прежде чем кривая вновь выравнивается. Интересно, что имеется 16-минутный промежуток между скачком синтеза пуринов и пиримидинов и скачком синтеза деоксирибозы. Этот результат был неожиданным и вызывающим наибольший интерес, свидетельствуя, что возможно разделить во времени синтез пуринов и пиримидинов хромосом, с одной стороны, от синтеза деоксирибозы — с другой. Аналогичный результат был получен при повторении опыта с теми же взаимоотношениями, как видно из рис. 19. Здесь охла-

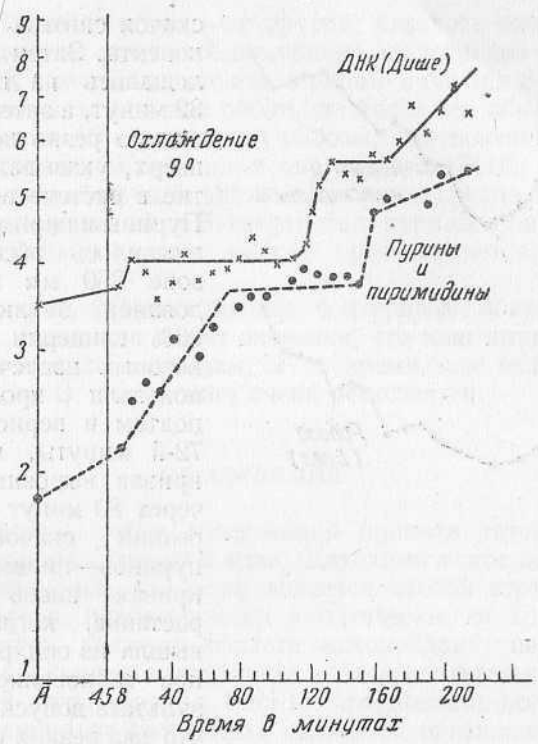


Рис. 20. Escherichia coli, культура охлаждена до температуры 9° в течение 45 минут; содержание ДНК по Дише и содержание пурина и пиримидина в клетках, из которых экстрагирована РНК (определяемое абсорбцией), после восстановления температуры роста. Сравните время синтеза пуринов и пиримидинов с временем синтеза деоксирибозы.

ждение было доведено до 3° на протяжении 60 минут; синхронизация достигла около 60—70%.

Только что описанные данные, касающиеся Bacillus megaterium, не были основаны на биохимическом изучении синтеза РНК, которое было выполнено с гомогенатом печени голубя и с Escherichia coli; в этих исследованиях было показано, что раньше рибоза присоединяется к карбоксамиду и что замыкание кольца, образующего пурины, происходит позже [Рейхард (Reichard), 1955; Шленк (Schlenk), 1955; Браун (Brown) и Ролл (Roll), 1955].

Так же, как описано для Escherichia coli, были начаты опыты с Bacillus megaterium. Интересно, что здесь, как показано на рис. 20, сахар, определенный реакцией Дише, был по существу постоянным до 114—120-й минуты, когда наблюдался резкий

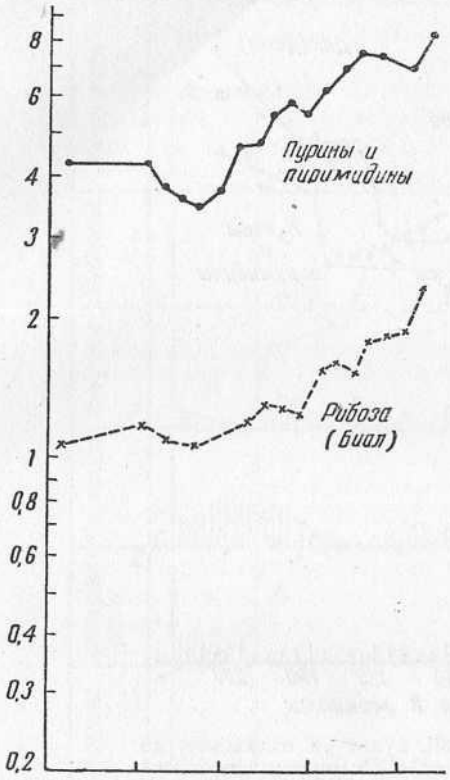


Рис. 21. Bacillus megaterium, синхронизированная культура. Повышение содержания рибозы (проба Биала) и пуринов и пиримидинов РНК (определяемых по абсорбции).

скачок синтеза этого компонента. Затем кривая уплощалась на протяжении 32 минут, а затем вновь довольно резко поднималась вверх, указывая на развитие в системе асинхронии. Пурины и пиримидины, как выявилось абсорбцией в зоне 260 мμ при исследовании заключенных в 96% глицерин клеток, у которых извлечена РНК, показали прогрессивный подъем в период с 8-й до 72-й минуты, после чего кривая выровнялась. Еще через 80 минут имел место резкий скачок синтеза пуринов—пиримидинов, и кривая вновь дала нарастание, когда система вышла из синхронии. Данное толкование этого результата допускает взгляд, что два резких скачка синтеза двух компонентов взаимосвязаны, хотя это и может быть еще пересмотрено. Таким образом, в соответствии с биохимическим доказательством синтеза РНК у E. coli первым, очевидно, синтезируется скачкообразно дезоксирибозный компонент, тогда как пурины и пиримидины синтезируются примерно на 40 минут позже также резким скачком. Эти данные поддерживают идею, что деоксирибозный компонент может быть присоединен к карбоксиламиду и что замыкание кольца пурина возникает вторично вслед за этим присоединением рибозы к карбоксиламиду («риболизацией»). Так как непосредственные доказательства механизма или путей, включающих синтез ДНК у E. coli или B. megaterium, отсутствуют, эти результаты могут явиться первым доказательством в данном вопросе и оправдать высказанное выше предположение, даже несмотря на то, что работа может считаться лишь немного более чем предварительной.

Поскольку противоположные до некоторой степени результаты были получены при изучении Bacillus megaterium, с одной

стороны, и Escherichia coli — с другой, казалось желательным выяснить, имеет ли рибозный компонент аналогичное направление синтеза. К сожалению, данные о рибозе в опытах с кишечной палочкой были на этом этапе работы не более чем обнадеживающими, но данные об образовании рибозы, как показано пробой Биала и образованием пуринов и пиримидинов РНК, в соответствии с данными абсорбции также позволяют предположить, но только предположить, что у B. megaterium пурины и пиримидины образуются раньше и что рибоза присоединяется вторично (рис. 21).

Кривые на рис. 21 менее точные, чем кривые, показывающие синтез ДНК. Возможно, имеет значение, что наш штамм E. coli чувствителен к сульфонамидам, в то время как взятый нами в работу штамм B. megaterium очень резистентен.

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные выше обоснования привели автора к поддержке следующей обширной идеи. Цитохимическое доказательство ясно указывает, что ядро является особой структурой и четко обособлено, цитохимически и оптически, от других клеточных структур, включая области митохондрий, перегородки и т. д. Это цитохимическое основание дальше свидетельствует, что с химической точки зрения Bacillus megaterium построен совершенно отлично от Escherichia coli. Этот организм содержит не только растворимые и связанные липиды, но с возрастом и в процессе споруляции кислый полисахарид имеет тенденцию накапливаться на одном полюсе, в то время как липид собирается на другом. Эти вещества остаются дискретными. У E. coli биполярно расположенное вещество, как правило, включает как липопротеин, так и РНК, так же как сульфгидрилсодержащий белок. Наличие липопротеина и РНК на полюсах этого организма мешает точному определению полисахаридных веществ, которые могут здесь иметься и быть выявлены HI-реактивом Шиффа. У E. coli эти полярные зоны соответствуют митохондриям и обособлены от ядер. Хромосомы B. megaterium содержат не только ДНК, но в них также можно обнаружить сульфгидрилсодержащий белок, по крайней мере в вегетативных клетках. В ядрах E. coli, с другой стороны, при помощи данной техники можно обнаружить только ДНК. Это позволяет предположить различные степени сложности хромосом у этих двух организмов, что может иметь относительное значение в генетических отношениях E. coli. Цитохимия также указывает, что центриоль и веретено содержат SH белок.

Escherichia coli, так же как и Bacillus megaterium, вероятно, содержат три гаплоидные хромосомы, которые могут быть охарактеризованы со значительной точностью; хромосомы у B. me-

gaterium настолько крупны, что у крупной хромосомы можно видеть сателлита. Могут быть также видны центромеры, присоединенные к крупным и средней величины хромосомам.

Собранные доказательства действия некоторых лекарственных веществ, включая тетрамицин, ауреомицин и парааминосалициловую кислоту, равным образом, как цитологические исследования влияния холода на бактериальное ядро, позволяют предположить, что аппарат деления бактериального ядра включает центриоль и веретенообразный элемент. У центриолей было обнаружено не только увеличение размеров при действии более высоких температур и под влиянием указанных веществ, но также и способность к независимому делению. Цитологические конфигурации, наблюдавшиеся в клетках, подвергнутых охлаждению, еще больше поддерживают взгляд, что мы имеем дело с митотическим механизмом, и поддерживают концепцию ядерной структуры и организации, суммированную на рис. 2.

Используя синхронизированные или частично синхронизированные системы, было возможно выявить параллелизм между делением ядер и клеточным делением. Было возможно также обнаружить то, что представляется независимым параллелизмом механизма синтеза как деоксирибозы, так и пурина и пиримидина, и отделить его от кинетики ядерного деления.

Биохимическое основание, полученное в результате этих исследований, позволяет предположить у Escherichia coli вероятную схему биохимических данных включения ДНК (Рейхард, 1955; Шленк, 1955; Браун и Ролл, 1955), которая указывает, что в синтезе РНК рибоза образуется первой, а пуриновые и пиримидиновые кольца замыкаются позже посредством карбоксамида. Противоположный результат, полученный у Bacillus megaterium как с ДНК, так и с РНК, прямо свидетельствует, что направления синтеза нуклеиновых кислот у этого организма отличны от направлений у E. coli, что может оказаться существенной разницей между грамположительными и грамотрицательными бактериями. Эта гипотеза или умозрительное предположение, к счастью, легко доступно экспериментальной проверке. Если последняя позволит развивать подобные предположения дальше, указанная разница может явиться основой для различия между грамотрицательными и грамположительными организмами в их чувствительности к различным антибиотикам и антибактериальным агентам. Это, возможно, объясняет, что E. coli чувствительна к сульфонамидам, в то время как данный штамм B. megaterium резистентен. Доказательство, полученное при изучении синхронизации при различных температурах, позволяет предположить возможность, что температурный коэффициент клеточного деления может, если изучить его более глубоко, оказаться отличным от температурного коэффициента ядерного деления и синтеза пуринов и пиримидинов и должен быть исследован экспериментально. Полученные данные позволяют пред-

положить дальше, что центриоль, которая дает один тип реакций при 15°, становясь более крупной и даже делясь независимо, совершенно не образуется при 2°, если охлаждение осуществляется достаточно быстро. Эта структура со специфическими физиологическими активностями и склонностями представляется решающей частью механизма делящегося ядра.

Внезапность скачков синтеза деоксирибозы, а также пуринов и пиримидинов указывает, что синтез происходит исключительно быстро, как только в клетке выполнена необходимая подготовка (т. е., по-видимому, образование набора необходимых строительных блоков). Каковы именно факторы, которые стимулируют внезапные порывы синтеза, — неясно. Кажется более важным, однако, что эти скачки возникают внезапно и завершаются в течение коротких отрезков времени. Ограниченность объема статьи не позволяет изложить многочисленные интересные предположения, которые вызывают и заслуживают эти детали.

Совершенно очевидно, что исследования, выполненные до настоящего времени, являются только началом разрешения очень сложной и трудной серии вопросов. Кажется полностью возможным, однако, что динамика митоза может быть рассмотрена и отделена от проблем, касающихся синтеза ядерных веществ, включающегося в воспроизведение клеток.

Несомненно, что бактерии открывают единственную в своем роде возможность комбинированного одновременного применения различных научных дисциплин. Стало возможным изучение клетки в целом с объединенных точек зрения биохимика, цитохимика и цитолога. Кажется также, что с применением комбинированного применения этих дисциплин приблизится в конечном счете истинное познание клетки как единой системы.

ИТОГ

Представлено и сравнено цитологическое обоснование построения Bacillus megaterium и Escherichia coli, указывающее, что E. coli обладает дифференцированными зонами митохондриальной активности, тогда как у B. megaterium эти зоны отсутствуют. Можно далее предположить, что хромосомы E. coli содержат мало или не содержат совсем SH белка, тогда как B. megaterium содержит SH белок не только в хромосомах, но также и в центриоли и веретене.

Цитологическое обоснование ядерного построения выявляет три хромосомы в вегетативных клетках обоих организмов и, кроме того, показывает, что они могут быть идентифицированы и охарактеризованы с относительной четкостью. Суммированы также обоснования их одновременного продольного деления. Цитологические данные, далее, поддерживают концепцию сложного митотического механизма у обоих типов бактерий. Эти

данные позволяют предположить, что это в сущности внутриядерный процесс и что ядерная оболочка сохраняется на протяжении всего ядерного цикла.

Отдельные лекарственные вещества и холод обусловливают задержку митоза очень сходного типа, вызывая замедление и задержку деления и перемещение центриолей. Одновременное цитологическое, химическое и статистическое изучение синхронизированных бактериальных культур, в которых клеточное и ядерное деление было введено в фазу, показало, что деление клеток, деление ядер, синтез деоксирибозы и синтез пурина и пиримидина ДНК протекают параллельно. Полученные данные позволяют предположить, что химические реакции этих клеточных активностей имеют каждая свой характерный температурный коэффициент. Образование центриоли, очевидно, имеет специфический температурный коэффициент, отличающийся от коэффициента деления и последующего развития этой структуры.

Синтез деоксирибозы и синтез пурина и пиримидина ДНК отделены во времени от синхронизированной системы. У Bacillus megaterium синтез пурина и пиримидина ДНК возникает раньше образования деоксирибозы, тогда как у Escherichia coli деоксирибоза может быть выявлена до образования пурина и пиримидина ДНК.

Обсуждается значение этих результатов.

ЛИТЕРАТУРА

Adams M. H. (1954). Synchronization of cell division in microorganisms. Science, *120*, 793.

Adolph E. F. & Bayne-Jones S. (1932). Growth in size of microorganisms measured from motion pictures. II. Bacillus megatherium. J. cell. comp. Physiol. *1*, 409.

Barer R. (1955). Spectrophotometry of clarified cell suspensions. Science, *121*, 709.

Barner H. D. & Cohen S. S. (1955). Synchronization of a devision of thymineless mutant of Escherichia coli. Fed. Proc. *14*, (1, pt. 1), 177.

Bentzon M. W., Maaløe O. & Rasch G. (1952). An analysis of increase in number of intracellular phage particles at different temperatures Acta path. microbiol. scand. *30*, 243.

Bergerson F. J. (1953). A probable growth cycle in Bacillus megaterium. J. gen. Microbiol. *9*, 26.

Bisset K. A. (1951). Morphology and cytology of bacteria. Ann. Rev. Microbiol. *5*, 1.

Blank H., McCarthy P. & DeLamater E. D. (1951). A non-vacuum freezing-dehydrating. technic for histology, autoradiography and microbial cytology. Stain Tech. *26*, 193.

Bradfield J. R. G. (1954). Electron macroscopic observations on bacterial nuclei. Nature, Lond., *173*, 184.

Brown G. B. & Roll P. M. (1955). Biosynthesis of nucleic acids. The Nucleic Acids, vol. 2, chapter 25, p. 341. Editors, E. Chargaff and J. Davidson. New York: Academic Press.

Caspersson T. O. (1950). Cell Growth and Cell Function. New York: W.W. Norton.

Chance H. L. (1955). Hydrogen chloride gas for effecting staining of internal structures in Escherichia coli. Stain Tech. *30*, 53.
Chapman G. B. &. Hillier J. (1953). Electron microscopy of ultrathin sections of bacteria. I. Cellular division in Bacillus cereus. J. Bact. *66*, 362.
Davis J. & Mudd S. (1955). Cytology of a strain of C. diphteriae. J. Bact. *69*, 372.
Dawson I. M. & Stern H. (1954). Structure in the bacterial cell walls during cell division. Biochim. biophys. Acta, *13*, 31.
DeLamater E. D. (1951a). Evidence for the occurrence of true mitosis in bacteria. Science, *113*, 477.
DeLamater E. D. (1951б). A new cytological basis for bacterial genetics. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. *16*, 381.
DeLamater E. D. (1951в). A staining and dehydrating procedure for the handling of microorganisms. Stain Tech. 26, 199.
DeLamater E. D. (1952a). Preliminary observation on the occurrence of a typical mitotic process in micrococci. Bull. Torrey bot. Cl. *79*, 1.
DeLamater E. D. (1952б). Preliminary observations on the occurrence of mitosis in Caryophanon latum. Mycologia, *44*, 203.
DeLamater E. D. (1952в). A consideration of the newer methods for the demonstration of nuclear structure in bacteria and other microorganisms. Mikroskopie, *7*, 358.
DeLamater E. D. (1953a). Structure and division of the bacterial nucleus. Bacterial Cytology, Symp. 6th Congr. int. Microbiol., Rome, p. 108.
DeLamater E. D. (1953б). Aspects of bacteria as cells and as organisms, Part, II. Nuclei and chromosomes. Int. Rev. Cytology, *2*, 158.
DeLamater E. D. (1953в). The mitotic mechanism in bacteria. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. *18*, 99.
DeLamater E. D. (1954a). Cytology of bacteria, Part II. The bacterial nucleus. Ann. Rev. Microbiol. *8*, 23.
DeLamater E. D. (1954б). A conceptual formulation of the structure and divisional mechanism of the bacterial nucleus. Trans. N. Y. Acad. Sci. *16*, 366.
DeLamater E. D. (1954в). A demonstration of the antimitotic nature of the inhibition produced in bacteria by antibiotics and other drugs. Amer. J. Syph. *38*, 593.
DeLamater E. D. & Hunter M. E. (1951). Preliminary report of true mitosis in the vegetative cell of Bacillus megaterium. Amer. J. Bot. *38*, 659.
DeLamater E. D. & Hunter M. E. (1952). The nuclear cytology of sporulation in Bacillus megaterium. J. Bact. *63*, 13.
DeLamater E. D. & Hunter M. E. (1953). Preliminary studies into the conditions controlling cellular fusion and secondary colony formation in Bacillus megaterium. J. Bact. *65*, 739.
DeLamater E. D., Hunter M. E., Minsavage E. J., Szybalski W. & Bryson V. (1953). Observations on the influence of various inhibitors including colchicine, camphor, benzimidazole, formaldehyde, isoniazid, sodium p-aminosalicylate, and antibiotics of the tetracycline, erytromycin and streptomicin groups, on the bacterial nucleus. Proc. 6th Congr. int. Microbiol. *1*, 83.
DeLamater E. D., Hunter M. E. & Mudd S. (1951). Current status of the bacterial nucleus. Exp. Cell Res. *2*, 319.
DeLamater E. D., Hunter M. E., Szybalski W. & Bryson V. (1955). Chemically induced aberrations of mitosis in bacteria. J. gen. Microbiol. *12*, 203.
DeLamater E. D. & Mudd S. (1951). The occurrence of mitosis in the vegetative phase of Bacillus megaterium. Exp. Cell. Res. *2*, 499.
DeLamater E. D., Schaechter M. & Hunter M. E. (1955). A chemically specific double-staining technique for desoxyribonucleic acid and other aldehyde-yielding or aldehyde-containing substances. J. Histochem. Cytochem. *3*, 16.

DeLamater E. D. & Woodburn M. (1952). Evidence for the occurrence of mitosis in the micrococci. J. Bact. *64*, 793.
De Robertis E. D. P., Nowinski W. W. & Saez F. A. (1954). General Cytology. Philadelphia: W. B. Saunders.
Fitz-James P. C. (1954). The duplication of bacterial chromatin. Interpretations of some cytological and chemical studies of the germinating spores of Bacillus cereus and Bacillus megaterium. J. Bact. *68*, 464.
Gonse P. H. & Yotsuyanagi Y. (1955). Note sur la réduction intracellulaire du triphényltétrazolium dans les oeufs d'oursin. Exp. Cell Res. *8*, 500.
Hartman P. E. & Liu C. (1954). Comparative cytology of wild type Saccharomyces and a respirationally deficient mutant. J. Bact. *67*, 77.
Hartman P. E. & Payne J. I. (1954). Direct staining of two types of nucleoproteins in Escherichia coli. J. Bact. *68*, 237.
Hayes W. (1953). The mechanism of genetic recombination in Escherichia coli. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. *18*, 75.
Hegarty B. P. & Weeks O. B. (1940). Sensitivity of Escherichia coli to cold shock during the logarithmic growth phase. J. Bact. *39*, 475.
Hotchkiss R. D. (1954). Cyclical behavior in pneumococcal growth and transformability occasioned by environmental changes. Proc. nat. Acad. Sci., Wash., *40*, 49.
Hunter M. E. (1955). Studies on the nucleus of giant cells of Micrococcus cryophilus. Exp. Cell Res. (in the Press)[1].
Hunter M. E. & DeLamater E. D. (1952). Observations on the nuclear cytology of spore germination in Bacillus megaterium. J. Bact. *63*, 23.
Hunter M. E. & DeLamater E. D. (1955). Further observations on the bacterial spore nucleus. J. Bact. *69*, 108.
Hunter-Szybalska M. E., Szybalski W. & DeLamater E. D. (1955). Temperature synchronisation of nuclear and cellular division in Bacillus megaterium. J. Bact. (in the Press)[2].
Knaysi G. (1955). The structure, composition and behavior of the nucleus in Bacillus cereus. J. Bact. *29*, 117.
Lark K. G. & Maaløe O. (1954). The induction of cellular and nuclear division in Salmonella typhimurium by means of temperature shifts. Biochim. biophys. Acta, 15, 345.
Maaløe. O. & Lark K. G. (1954). A study of bacterial populations with induced nuclear and cellular division. In Recent Developments in Cell Physiology. Editor, J. A. Kitching. London: Butterworths.
Miller G. L., Miller E. E. & Golder R. H. (1950). Studies on the orcinal method for determining pentoses. Fed. Proc. *9*, 206.
Minsavage E. J. & De Lamater E. D. (1955a). The nuclear cytology of Salmonella typhosa. J. Bact. *70*, 482.
Minsavage E. J. & DeLamater E. D. (1955б). Some observations on the effect of colchicine upon Salmonella typhosa. J. Bact. *70*, 501.
Mudd S. (1954). Cytology of bacteria. Part I. The bacterial cell. Ann. Rev. Microbiol. *8*, 1.
Mudd S., Brodie A. F., Winterscheid L. C., Hartman P. E., Beutner E. H. & McLean R. A. (1951). Further evidence of the existence of mitochondria in bacteria. J. Bact. *62*, 729.
Murray R. G. E. (1953). The problems of fixation for studies of bacterial nuclei. Bacterial Cytology, Symp. 6th Congr. int. Microbiol. Rome, p. 136.
Novikoff A. B. (1955). Histochemical and cytochemical staining methods. In Analytical Cytology. Editor, R. C. Mellors. New York: McGraw-Hill.
Pearse A. G. E. (1953). Histochemistry, Theoretical and Applied. Boston: Little, Brown & Company.

---

[1] Опубликовано в Exp. Cell Res., 1955, 9, 2, 221—231. *Ред.*
[2] Опубликовано в J. Bact., 1956, 71, 1, 17—24. *Ред.*

Reichard P. (1955). Biosynthesis of purines and pyrimidines. In The Nucleic Acids, vol. 2, chapter 23, p. 277. Editors, E. Chargaff and J. Davidson. New York: Academic Press.
Robinow C. F. & Hannay C. L. (1953). The nuclear structures of Bacillus megaterium. 6th Congr. int. Microbiol., Abstracts, vol. 1, Abstract no. 44, p. 76.
Rogers L. A. & Greenbank G. R. (1930). The intermittent growth of bacterial cultures. J. Bact. *19*, 181.
Schaechter M., Treece E. L. & DeLamater E. D. (1954). Studies on the cytochemistry of alkaline phosphatase in various bacteria. Exp. Cell Res. *6*, 361.
Scherbaum O. & Zeuthen E. (1954). Induction of synchronized cell division in mass cultures of Tetrahymena pyriformis. Exp. Cell Res. *6*, 221.
Schlenk F. (1955). Biosynthesis of nucleosides and nucleotides In The Nucleic Acids, vol. 2, chapter 24, p. 309. Editors, E. Chargaff and J. Davidson. New York: Academic Press.
Seibert F. B. (1940). Removal of the impurities, nucleic acid and polysaccharide, from tuberculin protein. J. biol. Chem. *133*, 593.
Sherman J. M. & Cameron G. M. (1934). Lethal environmental factors within the natural range of growth. J. Bact. *27*, 341.
Spiegelman S. & Landman O. E. (1954). Genetics of microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. *8*, 181.
Webb J. M. & Levy H. B. (1955). A sensitive method for the determination of desoxyribose nucleic acid in tissues and microorganisms. J. biol. Chem. *213*, 107.
Weibull C. (1953). Characterization of the protoplasmic constituents of Bacillus megaterium. J. Bact. *66*, 696.
Widra A. (1955). Studies on the cytochemistry of bacteria. J. Bact. (in the Press)[1].
Zeuthen E. & Scherbaum O. (1954). Synchronous divisions in mass cultures of the ciliate protozoan Tetrahymena pyriformis, as induced by temperature changes. In Recent Development in Cell Physiology. Editor, J. A. Kitching. London: Butterworth.

[1] Опубликовано в J. Bact., 1956, 71, 6, 689—702. *Ред.*

Таблица 1. Bacillus megaterium.

1—8 и *14—20*. Окраска азуром А—SO_2. *1—8*. Увеличение в 3200 раз. *9—20*. Увеличение в 4500 раз.

1—8. Стадии митоза в необработанных клетках.

1. Профаза. Третье ядро сверху показывает три сокращенные палочковидные хромосомы.

2. Прометафаза. Верхнее ядро показывает плотно скученные хромосомы, лежащие против единственной центриоли. Предполагается зона веретена.

3. Метафаза. Верхнее ядро имеет три хромосомы в полярной стороне метафазной пластинки. В соседнем ядре боковая сторона метафазного веретена с хромосомами, лежащими между двумя полярными центриолями.

4. Анафаза. Во втором снизу ядре дочерние хромосомы, разделившиеся к полюсам. Видны центриоли. Хромосомы примерно наполовину меньше, чем в метафазе.

5. Телофаза. Дочерние ядра полностью отделились и начинают реорганизовываться. Во втором снизу ядре можно видеть 3 хромосомы.

6 и *7*. Интерфаза. Ядра увеличены. Хромосомы вновь удлиняются. Можно видеть ядерную оболочку.

8. Интерфаза. Хромосомы выглядят как длинные четковидные нити.

9 и *10*. B. megaterium, дающая реакцию Шиффа с HI на кислый мукополисахарид (детали см. в табл. на стр. 240—247.

9. Молодая клетка. Зона поперечной стенки резко окрашена.

10. Клетка 4-часового возраста; в двух примыкающих клетках видны плотные полярные массы материала, окрашенного реактивом Шиффа с HY.

11—13. Клетки, окрашенные на наличие растворимого жира (Судан В).

11. Молодые клетки, еще прикрепленные к оболочке споры. Они не содержат жира.

12. Клетка одночасового возраста с редкими капельками жира.

13. Клетки пятичасового возраста с плотным накоплением суданофильного материала.

14—20. Влияние охлаждения активных клеток на ядро. Эти клетки культивировались на питательном агаре и охлаждались в леднике.
14. Верхнее ядро в нижней клетке в средней профазе с тремя хромосомами в виде полос.
15. Во втором ядре сверху прометафаза с хромосомами, плотно сбившимися против единственной центриоли.
16. Заторможенная метафаза с четырьмя видимыми центриолями.
17. Самое верхнее ядро в метафазе. Скопившиеся хромосомы лежат между центриолями.
18. Заторможенные анафазы. У четырех ядер удвоение центриолей на одном полюсе.
19. Задержанные поздние анафазы; растянутая мембрана, указывающая на ее целость на протяжении всего митотического цикла.
20. Два ядра в правой клетке в анафазе. У верхнего ядра удлиненная оболочка.

Таблица 2. Bacillus megaterium.

1—25. Окраска Азуром А—SO_2. *1—10.* Нормальные стадии митотического цикла.
1. Ранняя профаза; сократившиеся хромосомы без отчетливой оболочки.
2. Хромосомы поздней профазы, плотные сократившиеся палочки.
3 и *4.* Три обособленные палочковидные хромосомы. Виден придаток на длинной правой хромосоме на микрофотографии *4*.
5. Прометафаза. Хромосомы скопились против единственной центриоли с одним веретенообразным элементом.
6. Метафаза. Две из трех хромосом в фокусе между двумя центриолями.
7—9. Ранняя и средняя стадии метафазы. Ясно видны центриоли и веретена.
10. Реорганизация телофазы.
11—25. Влияние террамицина, ауреомицина, неомицина и парааминосалициловой кислоты. *11—20.* Влияние террамицина.
11. Верхнее ядро в прометафазе с плотными хромосомами против единственной центриоли. В нижнем ядре заторможенная метафаза.
15 и *16.* Торможение стадии анафазы. Центриоли значительно увеличены и плотны. Плотные массы хромосом лежат между ними.
17—20. Заторможенные стадии анафазы.
17. В клетках направо продолжающееся размножение хромосом и сохранение ядерной оболочки.
20. Деление центриоли на нижнем полюсе.
21. Аналогичное воздействие неомицина. Заторможенные стадии анафазы. В ядре направо центриоли, верхняя со светлой зоной между ней и плотной хромосомой. В среднем ядре деление нижней центриоли и значительно увеличенная верхняя центриоль.
22. Заторможенная анафаза. Обе центриоли разделились, но остаются соединенными нежной нитью.
23—25. Влияние парааминосалициловой кислоты.
23 и *24.* Характерная задержка центриоли в прометафазе, образующая характерные однополюсные фигуры. Центриоли кажутся прикрепленными к ядерной оболочке.
25. Деление центриоли на две и их прикрепление к оболочке ядра.
26 и *27.* B. megaterium, окрашенный на SH белок. Нежная, но определенная окраска хромосом, центриолей и веретен видна в каждой фигуре. (Некоторые из этих иллюстраций перепечатаны с разрешения из American Journal et Syphilis, Gonorrhoea and Veneral Diseases, 1954, 38, 593).

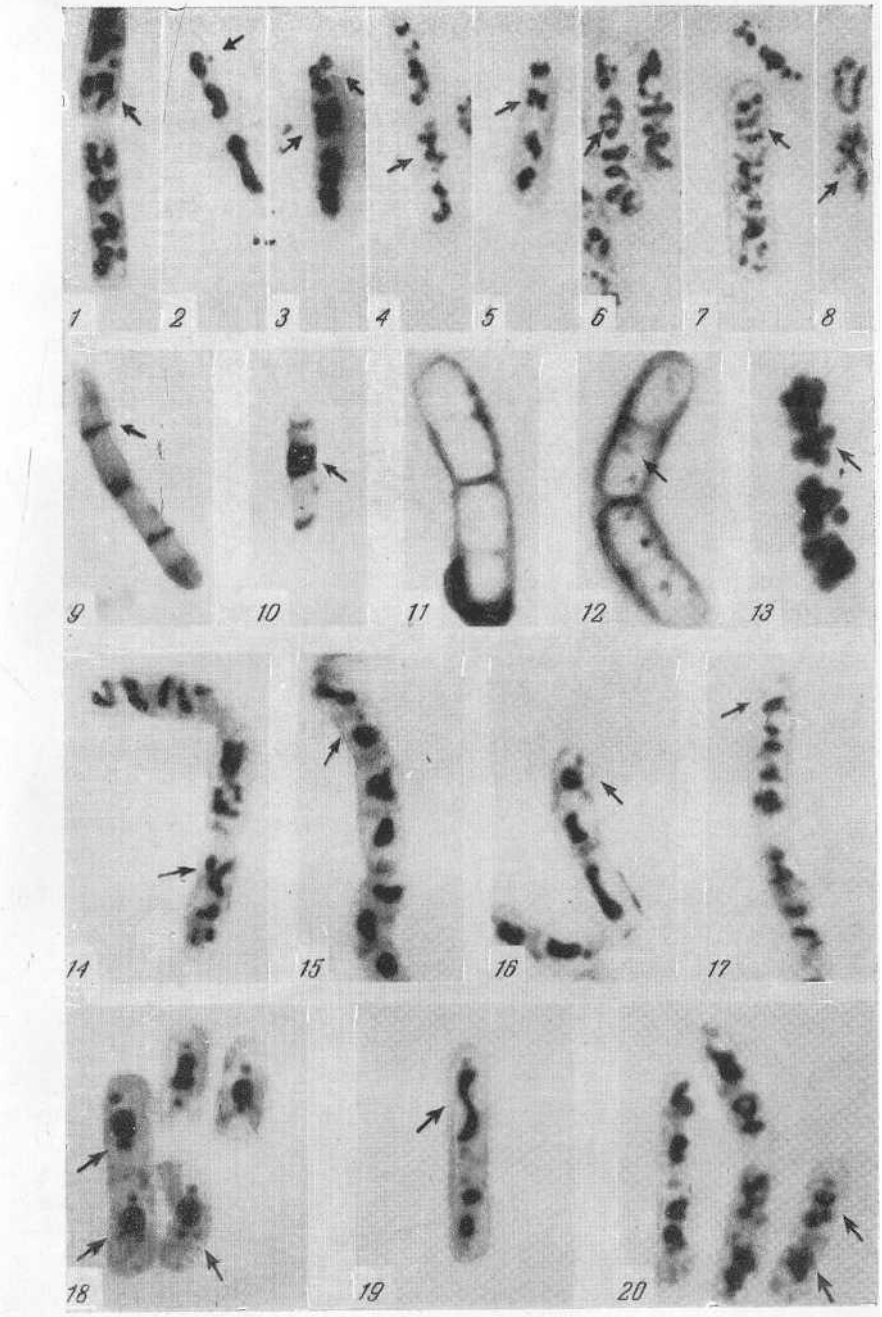


Таблица I.

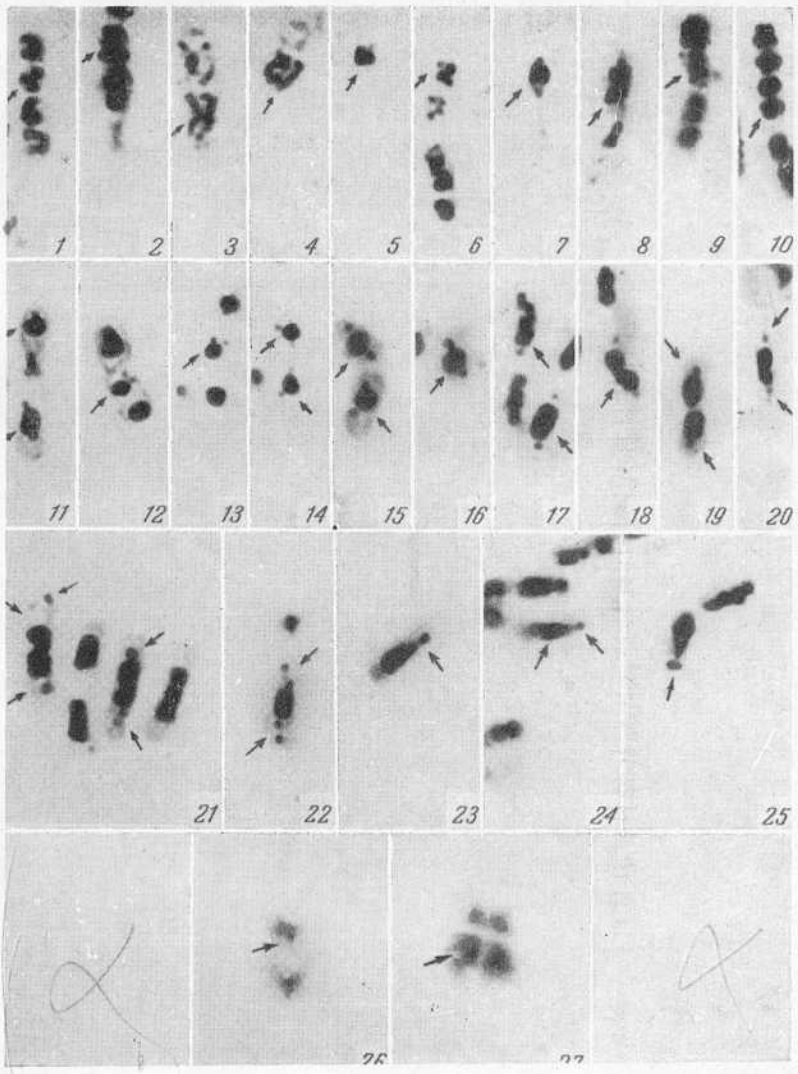


Таблица 2.

О ПОСТРОЕНИИ «ЯДЕРНОГО МАТЕРИАЛА» У SALMONELLA TYPHIMURIUM

О. МААЛОЕ и А. БИРЧ-АНДЕРСЕН

Государственный сывороточный институт, Копенгаген

Мало, а может быть, и совсем нет биологов, которые серьезно сомневались бы, что бактерии, несмотря на их незначительные размеры, обладают органами, функционирующими более или менее так, как это свойственно ядрам клеток высших организмов. Было разработано несколько остроумных методов окраски для того, чтобы обнаружить количество и форму «ядерных участков» у бактерий, которые, конечно, представляют собой мелкие и трудные объекты для изучения при помощи оптического микроскопа. На этом симпозиуме цитологи с большим опытом в данной области бактериологии представят новые достижения в этом направлении.

Казалось бы, что современные открытия, особенно в области бактериальной генетики и вирусологии, призывают к изучению структуры и построения ядерного аппарата бактерий более детально, чем это было возможно, пользуясь оптическим микроскопом. Во-первых, быстрое развитие бактериальной генетики за последние 10 лет выяснило, что поведение «ядерного материала» у бактерий до некоторой степени сходно с поведением хромосом у высших организмов [Ледерберг (Lederberg), 1947]. Во-вторых, было выяснено, что, кроме более или менее традиционного обмена «ядерного материала», требующего прямого контакта или конъюгации между бактериальными клетками, у бактерий действуют по крайней мере два неортодоксальных «механизма», известных как трансформация и трансдукция [Гриффитс (Griffith), 1928; Зайндер (Zinder) и Ледерберг, 1952]. В этих исследованиях цитологи оставлены далеко позади, как это вытекает из того факта, что очень мало известно относительно величины и формы структур, которые принимают участие в делении ядра и в генетических процессах у бактерий.

Отсутствие цитологической информации, конечно, обязано в значительной степени техническим трудностям и нелегко пред-

видеть даже, насколько могут быть продвинуты цитологические исследования субмикроскопических структур бактерий. Может быть следует пока все же напомнить, что цитология оказалась исключительно полезным орудием для прогресса генетических концепций у высших организмов. У дрозофил и у кукурузы микроскопическое дифференцирование хромосом было с успехом сопоставлено с генетическими достижениями. Это соответствие между цитологическими и генетическими данными наиболее часто использовалось для подкрепления некоторых объяснений генетических опытов; в то же время, однако, необходимо принять во внимание, что клетки должны быть фиксированы и окрашены таким образом, чтобы сохранить построение генетического материала ядра. Фактически только в том случае, если эти условия полностью выполнены и *если генетические концепции правильны*, может быть объяснено тесное соответствие между цитологическими и генетическими наблюдениями.

Исследования в области бактериальной генетики, о которых говорилось выше, собрали очень важную информацию относительно химической природы материала, который несет и передает генетические детерминанты. Так, работа над трансформирующим принципом и над бактериофагом указывает, что в этом направлении может действовать чистая деоксирибозная нуклеиновая кислота (ДНК) и что генетическая дифференциация молекулы ДНК — линейная, т. е. что существенный элемент «бактериальной хромосомы» может рассматриваться как длинная нитевидная молекула ДНК, несущая генетический код почти так же, как надпись на телеграфной ленте. Это представление привело к интенсивному изучению структуры молекулы ДНК при помощи физических методов и в настоящее время принято, что эта молекула состоит из двойной цилиндрической спирали диаметром около 25 Å [Уотсон и Крик (Watson, Crick), 1953]. Несомненно, бóльшая часть этих данных относительно ядерного материала бактерий была получена скорее путем логических выводов, чем при помощи прямых исследований клетки, и можно законно спросить, вправе ли цитология рассчитывать внести что-либо новое на этом уровне исследований. Очевидно, что вопросы, касающиеся функции или удвоения индивидуальной (отдельной) нити ДНК, не могут быть в настоящее время разрешены цитологами. В то же время количество ДНК, например в клетках Salmonella typhimurium [Ларк (Lark) и Маалое (Maaløe), 1956], соответствует нити, почти в 1000 раз превышающей длину клетки, и поэтому естественно рассчитывать на особый род пространственного построения этого материала. Если одна или несколько нитей ДНК значительной длины свертываются спирально внутри ядерного участка клетки, они должны быть легко обнаружены на электронных микрографиях ультратонких срезов.

Несомненно, что выяснение ядерного строения в клетках Escherichia coli или Salmonella typhimurium значительно более

трудно, чем изучение крупных хромосом, например дрозофилы или кукурузы, которые сами по себе значительно крупнее, чем наши бактерии. Однако эти бактерии имеют известные преимущества с экспериментальной точки зрения; подобные существа в отношении восприятия бактериальным ядром генетического материала, отдаваемого другой клеткой или переносимого частицами фага, могут контролироваться, подобно ядерному делению. Поэтому можно, несмотря на технические трудности, идентифицировать при помощи электронного микроскопа структуры бактериальной клетки, которые принимают участие в этих процессах.

Эта статья не претендует на то, чтобы привести большое количество доказательств, которые могли бы окончательно установить соответствие между бактериальной цитологией и генетикой. Следовало бы рассмотреть ранее выполненные исследования и, может быть, удобно поэтому вначале определить задачи, которые должны быть включены в изучение построения ядерного материала бактерий.

I. Первая задача, очевидно, заключается в том, чтобы получить возможно более детальное выявление микроскопической картины, что означает, что по крайней мере часть исследования должна выполняться при помощи электронной микроскопии ультратонких срезов клеток. Некоторые исследователи указали, как эти технические приемы могут найти применение в работе с бактериями [Бирч-Андерсен (Birch-Andersen), Маалое и Съестранд (Sjöstrand), 1953; Чепмен (Chapman) и Хилльe (Hillier), 1953; Бредфилд (Bradfield), 1954; Бриджер (Brieger) и Глауерт (Glauert), 1954].

II. Вторая задача состоит в обнаружении артефактов, возникающих при фиксации, обезвоживании и заливке биологического материала для приготовления срезов и микроскопии.

III. Третья и конечная задача, с которой необходимо иметь дело, это идентификация, как функциональная, так и химическая, структур, выявляемых при помощи электронной микроскопии.

В дальнейшем мы обсудим эти различные стороны в отдельных разделах.

I. ЗАДАЧИ, СВЯЗАННЫЕ С ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИЕЙ ПРЕПАРАТОВ ОРГАНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Техника, принятая для получения высокоразрешающих электронных микрографий срезов бактерий, была описана детально Бирч-Андерсеном и др. (1953). Излишне поэтому возвращаться к этой технике, применявшейся на протяжении всей работы, за исключением того, что электронная микроскопия была выполнена электронным микроскопом Филипс ЕМ 100, оборудованным новой линзой в 25 Å.

Объяснение полученных электронных микрографий будет дано в разделе III данной статьи. Однако здесь будут сделаны некоторые замечания относительно разницы между микрографиями, полученными при помощи оптического и электронного микроскопа. Хиллье (1950) описал существенные различия между этими двумя микроскопами, а Лоу (Low, 1953) обсудил в деталях трудности, возникающие при сравнении оптических и электронных микрографий срезов тканей. Относительно деталей и справок мы отсылаем читателя к статье Лоу, и ниже будут обсуждены только некоторые существенные вопросы.

В электронной микроскопии глубина поля обычно составляет около 1 μ [Зворыкин (Zworykin) и др., 1945; Косслетт (Cosslett), 1951] сравнительно с 0,2 μ в оптическом микроскопе. Практический предел разрешения для ультратонких срезов с уплотняющей средой равен в настоящее время 20—50 Å [Съестранд, 1953а; Съестранд и Родэн (Rhodin), 1953; Родэн, 1954, и др.], тогда как предел для оптической микроскопии составляет приблизительно около 2000 Å. Задачи, создаваемые относительно огромной глубиной поля в электронной микроскопии, удачно изложены Лоу: «Оптическая микрофотография лучше всего может быть объяснена как плоская поверхность без заметной толщины. Но электронная микрография может быть удачно сравнена с рентгенограммой, в которой структуры накладываются одна на другую в смешанных пропорциях силуэта и прозрачности».

Возможность получения высокоразрешающих электронных микрографий, таким образом, связана с конструкцией микротома, производящего чрезвычайно тонкие срезы, в которых эффект наслаивания не затуманивает картину [Съестранд, 1953б; Портер (Porter) и Блум (Blum), 1953, и др.]. Это означает, что в каждом отдельном срезе видна только очень ограниченная часть бактериальной клетки и общая картина клетки утрачивается. При срезах в 200—400 Å толщины можно наблюдать одновременно лишь около 2% всего объема Salmonella typhimurium или Escherichia coli. Следовательно, размер и форма, например, ядерных вакуолей клеток значительно варьируют от среза к срезу в зависимости как от положения срезов в клетке, так и от угла, под которым клетка была срезана. Единственный путь, который может устранить эти трудности, — изучение серийных срезов клеток. Гей (Gay) и Эндерсон (Anderson) (1954) представили серии 18—19 отдельных срезов клеток слюнных желез дрозофилы, и при помощи серийных срезов и специальной сложной техники мы недавно показали, что «вакуоли», обнаруживаемые в срезах клеток S. typhimurium, в значительной степени соответствуют темным областям в клетках, окрашенных на ДНК (Бирч-Андерсен, 1955).

Метод Палада, включающий забуференные растворы осмиевой кислоты в качестве фиксирующих и окрашивающих агентов, для электронной микроскопии срезов принят повсеместно как

дающий превосходное сохранение ультраструктур [Палад (Palade), 1952; Съестранд, 1953а; Родэн, 1954, и др.]. Фиксация биологического материала обсуждалась Портером и Коллменом (Kallman, 1953) и в последующем изучалась Баром (Bahr, 1954). Рассеивание электронов атома осмия (атомный вес 76) значительно превосходит таковое на атомах биологического материала и пропитывающего вещества (по Бару, средний атомный вес этого вещества равен 18). Эти цифры привели Бара к предположению, что в ультратонких срезах единственно определяющим получаемый контраст является распределение осмия, воспринимаемого биологическим материалом; он показал, что белки и жиры редуцируют OsO_4, в то время как углеводы и чистые препараты нуклеиновых кислот инертны по отношению к этому агенту.

В противоположность гипотезе Бара мы нашли, что умеренно хороший контраст получается в ультратонких срезах бактерий, фиксированных формальдегидом, без последующего воздействия OsO_4 (табл. 1, *2*). Принимая во внимание, что примененный нами пропитывающий материал не содержит атомов тяжелее кислорода, мы должны сделать заключение, что атомы фосфора и серы и, возможно, ионы обычных металлов создают бóльшую часть контраста, получаемого на электронных микрографиях срезов бактерий.

Это наблюдение соответствует данным, представленным Афзелиусом (Afzelius) (личное сообщение), который изучал действие различных фиксаторов на структуры, наблюдаемые при электронной микроскопии срезов яиц морского ежа. Применяя OsO_4, формальдегид, азотнокислый уран и метилхлористую ртуть [по Бару и Мобергеру (Moberger) (1954), последняя смесь специфически окрашивает SH- группы], Афзелиус получил хороший контраст; кроме того, структуры, наблюдавшиеся в различных случаях, были одинаковы. Обсуждение химической природы некоторых структур, наблюдаемых в срезах клеток Salmonella typhimurium, будет дано в разделе III этой статьи.

II. ЗАДАЧИ, СВЯЗАННЫЕ С ФИКСАЦИЕЙ, ОБЕЗВОЖИВАНИЕМ И ЗАЛИВКОЙ

Цитологические работы, выполняемые при помощи оптического микроскопа, допускают сравнение между наблюдениями над живыми клетками и наблюдениями, выполненными при помощи методов избирательной окраски. В электронной микроскопии бактерий этот существенный контроль почти полностью утрачивается. Все, что мы можем сделать, это убедиться в том, что крупные «вакуоли», постоянно наблюдаемые на электронных микрографиях, грубо соответствуют по размеру и локализации светлым участкам, которые могут быть видны у живых бактерий

в фазово-контрастный микроскоп [Хиллье, Мадд (Mudd) и Смит (Smith), 1949; Меррей (Murray), 1953]. Имея дело с более мелкими элементами, обнаруживаемыми электронным микроскопом, мы не располагаем прямыми средствами, которые позволили бы ручаться, что наблюдаемые нами структуры не являются артефактами. Значению этого ограничения не следует придавать слишком большой роли и мы посвятим большинство разделов этой статьи изложению выполненных в последнее время работ, в которых ставилась задача обнаружить и устранить некоторые источники артефактов.

Приготовление бактерий для срезов обычно выполняется в три этапа, а именно: фиксация OsO_4, обезвоживание в этиловом спирте и заливка в метакрилат (МЕТ). В нашей лаборатории этот метод давал достаточно хорошие результаты с точки зрения сохранения клеток и выявления вакуолей, содержащих плотные структуры, которые были объяснены, как массы ДНК (Бирч-Андерсен и др., 1953). В целях контроля этого метода мы в настоящее время изменили эти условия. (Наша обычная процедура заключалась в прибавлении растворенного в солевом буфере OsO_4 непосредственно к бульонной культуре в концентрации 0,2%, центрифугировании и ресуспендировании клеток в $^1/_{100}$ исходного объема 1% раствора OsO_4 и инкубирования этой взвеси при 37° в течение 2 часов. После осторожного отмывания клетки были обезвожены в 70, 96 и 100% этиловом спирте и проведены через три смены смеси 1 части метила и 9 частей N-бутил-метакрилата, содержащего 1% бензоил-пероксида.) Клетки просматривались в оптическом микроскопе на всех этапах между логарифмическим ростом в бульоне и конечной взвесью в жидком МЕТ, и независимо от метода фиксации (OsO_4 в концентрациях между 0,1 и 1%, формалин в концентрациях между 0,5 и 4% или 70% этиловый спирт) клетки оказались неизмененными до этой стадии. Скоро стало ясным, однако, что процесс фиксации имел решающее значение для судьбы этих клеток во время полимеризации МЕТ. От полимеризованных блоков МЕТ отрезались маленькие кусочки, помещались в каплю хлороформа для растворения МЕТ и окрашивались метилвиолетом (растворенном в хлороформе). Освобожденные клетки окрашивались хорошо, и таким путем было легко установить, подверглись ли фиксированные клетки большому повреждению в процессе полимеризации.

Было установлено, что фиксация в течение 2 часов в бульоне с низкой концентрацией OsO_4 (0,1 или 0,2%) или в течение короткого времени при более высокой концентрации (1% OsO_4 на протяжении около 10 минут) дала клетки, многие из которых были раздуты в крупные теневидные тела и сильно разорваны (табл. 1, *1*), тогда как некоторые клетки были ясно сплющены. Более интенсивная фиксация OsO_4 или формальдегидом предотвращает большие повреждения, но многие клетки показывают

характерное разбухание областей вакуоли, в результате чего целые клетки выглядят наподобие гантелей (табл. 1, *2*). Наша обычная двухэтапная фиксация предохраняет клетки относительно хорошо, по-видимому, потому, что бульон удаляется до основного периода фиксации (см. сводку на стр. 296). Предварительная полимеризация МЕТ так, как она описана, например, Бориско и Сапранаускас (Borysko, Sapranauskas, 1954), также помогает в значительной степени избежать искажений без устранения их, однако не полностью.

Фиксация формальдегидом дает аналогичные результаты; применяя высокую концентрацию формальдегида (2—4%) и заливку предварительно полимеризованным МЕТ, можно относительно хорошо сохранить клетки, но все же видны некоторые крайне уродливые клетки. В целом условия фиксации могут быть классифицированы соответственно их способности делать клетки резистентными к давлению, которому они подвергаются при полимеризации МЕТ; фиксация 1% OsO_4 в течение слишком длительного времени при 37° (10—12 часов) наиболее эффективна, но такая удлиненная фиксация вызывает сморщивание клеток (см. сводку на стр. 296).

При изучении в электронном микроскопе срезов клеток, фиксированных указанными различными способами, становится ясно, что даже клетки, выглядящие нормально в окрашенных препаратах, могут обнаружить незначительное, но несомненное повреждение. Признаки повреждения — слабость внешней клеточной оболочки (которая в исключительных случаях «отслаивается» от клетки, оставаясь прикрепленной только в отдельных точках; Маалое, Бирч-Андерсен и Съестранд, 1954) и неправильные щели в правильной в других отношениях конфигурации цитоплазмы.

Не является новым наблюдение, что процесс полимеризации может вызвать нарушение структуры залитого МЕТ материала. Так, Бориско и Сапранаускас (1954) сообщили, что некоторые препараты тканей полностью разрушаются, если заливка начинается в жидкой МЕТ скорее, чем в предварительно полимеризованной и высоковязкой МЕТ, а Чепмен и Хилльe (1953) нашли необходимым фиксировать бактерии очень интенсивно (1% OsO_4 на протяжении около 20 часов) для предотвращения разрыва клеток. Существенная часть наших наблюдений над залитыми МЕТ клетками заключается в том, что был установлен постепенный переход между громадными искажениями и легкими аномалиями. Логически рассуждая, это указывает, что наиболее нежные клеточные структуры не могут рассматриваться как неповрежденные даже там, где отсутствуют несомненные признаки разрушения. Это, очевидно, применимо, в частности, к обнаруживаемым внутри вакуолей темным элементам, которые мы описали как неправильно извитые, плотные волокна, построенные, по крайней мере частично, из ДНК (Бирч-Андер-

сен и др., 1953). В разорванных или тенеподобных клетках эти внутренние структуры могут выглядеть, подобно плотным волокнам, но чаще они появляются в виде неправильной решетки из тонких нитей. Эта конфигурация, обнаруживаемая иногда в клетках без каких-либо несомненных признаков разрушения, указывает на то, что организация этих внутренних структур может быть очень чувствительна к повреждениям во время приготовления препарата.

Причины, почему полимеризованная МЕТ может вызвать разрыв или сплющивание залитых клеток, необходимо искать в большой чувствительности каталитического процесса затвердения к примесям и в факте, что полимеризация сопровождается значительным сморщиванием (10—20% уменьшения объема в зависимости от состава смеси метилового и бутилового эфиров). Процесс полимеризации, вероятно, начинается во многих различных точках, тем самым вызывая как механические, так и осмотические напряжения. Сами клетки, которые мы хотим залить, могут ускорять или замедлять местно процесс полимеризации и тем самым способствовать разнородности процесса.

Из того, что было сказано относительно результатов, полученных при изучении бактерий, залитых МЕТ, и относительно свойств этого материала, становится очевидным, что необходимо было бы испытать с этой целью другое вещество. В идеале это вещество должно было бы иметь низкую вязкость мономеров метил- и бутил-метакрилата и низкую способность рассеивания электронного потока полимерами, и в то же время оно должно было бы застывать гомогенно и без изменения объема. Испытанный нами материал удовлетворяет только последнему требованию; это высоковязкое эпокси-соединение (*epoxy* = EPO), которое при добавлении диэтилентриамина и нагревания до температуры около 60° твердеет без изменения объема, образуя слегка желтый смолоподобный блок [Бирч-Андерсен, Маалое и Сундиен (Sundien), неопубликовано]. Процесс затвердения представляет собой однородную химическую реакцию между EPO и амином, на которую не влияют примеси (это подтверждается фактом, что реакция всегда протекает одинаково, тогда как полимеризация МЕТ часто полностью отсутствует в одной или больше из серии, по-видимому, идентичных пробирок). Так как EPO до сих пор как будто никем не испытывался, ниже следует описание процедуры заливки.

Клетки Salmonella typhimurium фиксируются непосредственно в питательной среде, отмываются и обезвоживаются в этиловом спирте, как обычно. Конечная взвесь в этиловом спирте центрифугируется и осадок взвешивается в смеси 2 частей EPO и 1 части этилового спирта. Эти две фазы не смешиваются легко при встряхивании, но можно получить легко гомогенную смесь относительно низкой вязкости при помощи размешивания палочкой. По прошествии около 30 минут прибавляется амин (соотно-

шение объемов между ЕРО и амином всегда равно 1:10), и взвесь центрифугируется около 15 минут при 8000 об/мин. в угловой центрифуге Сервалл. Надосадочная жидкость осторожно удаляется при помощи сифона и осадок взбалтывается в небольшом объеме ЕРО + этиловый спирт + амин (в соотношениях 10:2,5:1). Эта довольно вязкая взвесь разливается в небольшие желатиновые капсулы, которые немедленно центрифугируются в горизонтальной центрифуге в течение 20—30 минут. Вновь надосадочная жидкость удаляется сифоном, в капсулы вносится ЕРО + амин и нагревается до 60° в течение по крайней мере 3—4 часов. Важно, чтобы осадок в капсулах не превышал 1—2 мм, в противном случае этиловый спирт, остающийся вместе с осажденными бактериями, будет препятствовать соединению двух слоев, и верхушка блока будет слишком мягкой. Можно добавить, что микроскопия бактерий, взвешенных в ЕРО, очень трудна, так как коэффициент преломления этой смеси очень близок к коэффициенту преломления клеток. Затвердевший ЕРО также с трудом растворим в хлороформе, этиловом спирте или ацетоне, что затрудняет микроскопический контроль залитых клеток, подобный описанному выше.

Электронные микрографии срезов клеток, залитых в ЕРО, обнаруживают меньший контраст между клетками и фоном, чем в препаратах МЕТ. Рассеивающая электронный поток способность ЕРО несколько больше, чем у МЕТ, хотя оба состава содержат только атомы углерода, водорода и кислорода. Разница может зависеть от наличия в ЕРО бензольных колец. Однако потеря контраста не влияет на разрешающую способность. На хороших микрографиях ультратонких срезов разрешение колеблется между 25 и 50 Å независимо от того, производилась ли заливка в МЕТ или в ЕРО (ср. табл. 1, *3* и табл. 2, *б*).

Срезы клеток, залитых ЕРО, прежде всего показывают, что клетки сохраняют свои размеры и форму почти независимо от фиксации. Это не должно означать, что замена заливки МЕТ заливкой ЕРО — событие в том смысле, что клетки теперь представляют одинаковую картину деталей при всех условиях фиксации; эта замена, однако, является определенным усовершенствованием потому, что *клетки, фиксированные соответствующей концентрацией OsO_4 и залитые в ЕРО, в значительной степени свободны от очевидных признаков повреждения, описанных выше*. В частности, наружная оболочка всегда остается однородной и ровно прикрепленной, а цитоплазма — свободной от щелей.

В образчиках, залитых ЕРО, «ядерные» структуры в вакуолях выявляют очень характерные особенности: вместо обычной картины длинных плотных волокон или решетчатых структур *во всех клетках можно наблюдать правильное построение этого «ядерного материала» в круглые, извивающиеся трубки* (см. табл. 2, *б*). Эта правильная конфигурация наблюдалась в отдельных

случаях одинаково хорошо в препаратах, залитых MET, но лишь в одном случае многие клетки показали подобную конфигурацию в препарате, фиксированном 1% OsO_4 в течение 2 часов при 37° (табл. 1, *3*). В фиксированном и обезвоженном состоянии трубки представляют собой пустые и относительно непроницаемые структуры, что доказывается фактом, что вязкая EPO часто не в состоянии диффундировать в трубку (см. табл. 2, *6*).

Мы можем теперь, сравнивая результаты, полученные при применении соответственно MET и EPO, оценить, в какой степени различные методы приготовления препаратов сохраняют размер и форму клеток и ровное прикрепление внешней оболочки. В последующей сводке во всех случаях фиксация начиналась со смешивания бульонных культур логарифмического роста клеток Salmonella typhimurium с фиксирующим агентом.

А. *Фиксация постоянными концентрациями OsO_4 при 37°*

1. *1% около 20 часов; заливка MET.* Все клетки значительно и одинаково сморщены. Оболочки соответственно в складках. Осаждение интенсивно рассеивающих электронный поток зерен (металлический осмий?) на оболочках и внутри клеток.

2а. *1% в течение 2 часов; заливка MET.* Различные соотношения клеток нормальной величины и правильной формы (некоторые партии MET дают лучший результат, чем другие); всегда некоторое количество чрезвычайно деформированных клеток. Оболочки иногда сморщены или рыхлые [отдельные трубчатые структуры в вакуолях (см. табл. 1, *3*), но большей частью плотные волокна или решетки].

2б. *1% в течение 2 часов; заливка EPO.* Оптимальная комбинация фиксации и заливки (см. табл. 2, *6*).

3. *1%, 15 минут; заливка MET.* Все клетки умеренно или значительно увеличены и разорваны (см. табл. 1, *1*).

4а. *0,2%, 2 часа; заливка MET.* Все клетки значительно увеличены и разорваны.

4б. *0,2%, 2 часа; заливка EPO.* Поразительно отличается от 4а; все клетки целые, но одинаково сморщенные, мембраны соответственно в складках (цитоплазма и содержимое вакуолей неравномерны, волокнисты, как бы частично растворены).

Б. *Начальная фиксация OsO_4, бульон удален посредством центрифугирования до последующей фиксации OsO_4 при 37°*

1а. *0,2% в течение 15 минут при комнатной температуре → 1% в течение 2 часов при 37°; заливка MET.* Раннее удаление бульона ведет к предотвращению разрушения во время заливки;

улучшение заметно даже при применении 1% OsO_4 на обоих этапах фиксации. Постоянно некоторое количество вздутых клеток и рыхлых оболочек. Трубчатая структура в вакуолях встречается редко.

1б. *Фиксация та же; заливка EPO.* Целые клетки нормальной величины с гладко прилегающими оболочками (трубчатая структура имеется, но менее правильная, чем в А, 2б; ср. табл. 2, *5* и *6*).

2. *0,2% в течение 2 часов при 37°, 1% в течение 2 часов при 37°; заливка EPO.* Целые клетки нормальной величины с гладко примыкающей оболочкой (большинство клеток содержит в вакуолях неправильные нити вместо трубчатых структур; см. табл. 2, *4*).

В. *Фиксация формальдегидом при 37°*

1. *0,5%, 2 часа; заливка MET.* Слабые тени сморщенных клеток. Оболочка не видна.

2. *0,5%, 2 часа, последующая фиксация 1% OsO_4 в течение 2 часов при 37°; заливка MET.* Большинство клеток вздуто, но клеточные элементы сохранены значительно лучше, чем в 1. Оболочки почти полностью рыхлые.

3а. *2 или 4% формальдегид на 2 часа; заливка MET.* Много гантелевидных клеток, некоторые, кроме того, увеличены. Оболочки почти полностью рыхлые (см. табл. 1, *2*).

3б. *Фиксация та же; заливка EPO.* Клетки не раздуты. Оболочки рыхлые.

Примечание. В случаях А, 2а; А, 4а; В, 3а клетки заливались в жидком, а также в преполимеризованном MET (Бориско и Сапранаускас, 1954); преполимеризация всегда улучшала результат, но не устраняла искажения. В случае В фиксация формальдегидом (концентрация $\geqslant$ 2%) давала почти такой же хороший контраст, как и фиксация OsO_4 (ср. табл. 1, *2* и *3*); степень сохранения, судя по правильности цитоплазматической и «ядерной» конфигурации и прилегания наружной оболочки, была всегда меньшей, чем в лучших препаратах, фиксированных OsO_4.

При обсуждении этих данных мы можем рассмотреть отдельно три фазы процесса приготовления клеток для срезов, т. е. фиксация как таковая, обезвоживание и заливка.

Фиксация может быть несомненно недостаточна с точки зрения предохранения максимальной степени правильного построения различных клеточных элементов. Низкие концентрации OsO_4 или формальдегида (А, 4, Б, 2 и В, 1) дают беспорядочную картину независимо от последующей обработки. В связи с этим можно думать, что эффективность фиксации OsO_4 в большой степени зависима от ионного окружения. Если культура, выра-

щенная в бульоне, разведенном 1:5 дистиллированной водой, фиксировалась OsO_4, растворенным в дистиллированной воде, результат получается менее удовлетворительный, чем если фиксация произошла в неразведенном бульоне (т. е. свободно примыкающие оболочки, щели в цитоплазме и, при заливке ЕРО, менее постоянно трубчатые структуры). Фиксация при низкой концентрации солей, вероятно, недостаточна вследствие того, что реакция между OsO_4 и органическими веществами очень медленна, как можно заключить из того, что обычное темное окрашивание бульона после прибавления OsO_4 слабее и появляется позже, если ионная сила раствора уменьшена. Более тщательное изучение этой реакции в настоящее время начато Мерреем и Уитфелд (Murray, Whitfield) (личное сообщение). Как видно из разделов А и Б приведенной выше сводки, только после более длинной экспозиции к высоким концентрациям OsO_4 клетки могут подвергаться дальнейшим процедурам и микроскопированию без заметных признаков нарушения структуры.

Что касается обезвоживания, то наши данные показывают, что этот процесс, подобно заливке МЕТ, выдерживается клеткой только после относительно интенсивной фиксации. Так, сравнение А, 2б и В, 2 показывает, что после фиксации в течение 2 часов 0,2% OsO_4 имеет место некоторое нарушение структуры. С другой стороны, если клетки, фиксированные 2 часа в 0,2% OsO_4, подвергаются непосредственному действию этилового спирта, без дополнительной фиксации 1% OsO_4, структура нарушается больше, до степени, описанной в А, 4б. То же наблюдалось после фиксации низкими концентрациями формальдегида, как видно из сравнения В, 1 и В, 2.

Наконец, что касается процесса заливки, мы можем сослаться на подробное изложение на стр. 296—297 результатов, полученных при сравнении заливки МЕТ и ЕРО.

Положение, как оно представляется после этих исследований, не ободряющее. Несомненно трудно провести бактериальную клетку через все этапы от культуры до залитого состояния без того, чтобы она не претерпела ясных повреждений. Хуже всего, однако, что мы не можем судить, насколько верно воспроизведены наиболее тонкие детали, такие, как ядерные структуры, относительно которых не могут быть высказаны априорные предположения. Как уже указывалось, мы не имеем средств, при помощи которых можно было бы изучать структуры этого размера в живых клетках.

В тех случаях, когда считается, что заливка в ЕРО дает микрографии, на которых нет заметных признаков повреждения клеток, можно с уверенностью допустить, что трубчатые структуры, обнаруживаемые на подобных препаратах, представляют собой состояние ядерного материала после фиксации OsO_4. Легко представить, как эти структуры могут сплющиваться, образуя плотные волокна, или разрываться на неправильные

решетки, часто находимые в срезах клеток, залитых МЕТ. В то же время на основании этих микрографий невозможно решить, не может ли фиксация OsO_4 вызвать свертывание рассеянных элементов в трубчатые структуры. Мы вернемся к этому вопросу в последнем разделе при обсуждении путей, которыми в конце концов может быть достигнуто решение.

III. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ СТРУКТУР, ВЫЯВЛЯЕМЫХ В ЭЛЕКТРОННОМ МИКРОСКОПЕ

В приготовлении хороших электронных микрографий бактерий, как и всех других биологических объектов, основным остается техническое выполнение с его собственными достоинствами, до тех пор пока видимые на изображении структуры не будут объяснены биологически. В идеале это объяснение должно было бы вести к химическому, так же как к функциональному, определению клеточных структур.

В данной работе мы сосредоточили внимание на организации темных структур, видимых в «вакуолях», и произвольно определили эти структуры как «ядерный материал». Оправдание такого толкования главным образом исходит из цитохимических наблюдений. Во-первых, исследование ядер высших организмов привело к идентификации «ядерного материала» со структурами, содержащими ДНК [см., например, Рис и Мирский (Ris, Mirsky), 1949]; во-вторых, мы знаем, что бактерии, окрашивающиеся избирательно на ДНК, воспринимают краску в участках, которые соответствуют светлым пространствам или вакуолям, наблюдаемым в живых клетках (Хилльe и др., 1949; Меррей, 1953). Таким образом, кажется, что бóльшая часть ДНК находится где-то в этих участках. Затем мы хотели узнать, как будет выглядеть ДНК на электронной микрографии. Мы нашли ответ на этот вопрос при исследовании срезов очищенного бактериофага (фаг кишечной палочки T_4) после фиксации и заливки в МЕТ (Маалое и др., 1954). Эти частицы фага состоят из белковой оболочки, окружающей большие количества ДНК, что делает их идеальным объектом для цитологической характеристики этого вещества. Срезы частиц T_4, фиксированные в OsO_4, показали очень плотное для электронного потока шестиугольное ядро, соответствующее внутренней зоне частицы фага, размер и форма которой могут быть определены на электронных микрографиях целых фаговых частиц, приготовленных посредством метода критической точки (Эндерсон, 1951). Отсюда можно заключить, что агрегаты ДНК являются объектами, которые выглядят темными на электронных микрографиях. У бактерий, фиксированных OsO_4 или формальдегидом, вакуоли содержат темные структуры, и мы полагаем, что они представляют собой ДНК, которая при избирательных методах окраски локализуется в

этих участках. (В связи с этим неважно, что темное вещество показывает разные степени организации соответственно примененным процедурам фиксации и заливки.)

Дальнейшее подтверждение этого предположения может быть получено из исследований, в которых клетки Escherichia coli были заражены бактериофагом T_4 (Маалое и др., 1954). На срезах клеток, фиксированных через 8 минут после заражения, было найдено, что бóльшая часть плотного темного вещества распределялась в мелких периферических вакуолях; это распределение вещества, которое мы считаем ДНК, совпадает с изучением избирательно окрашенных клеток [Меррей, Джиллен (Gillen) и Хиджи (Heady), 1950; Лурия (Luria) и Хэмен (Human), 1950]. Таким образом, при разных условиях и у различных бактерий вещество, которое хотя бы частично может быть ДНК, обнаруживается внутри кажущихся «пустыми» участков, или вакуолей, общая плотность которых меньше, чем окружающих структур [Бирч-Андерсен и др., 1953; Чепмен и Хилльe, 1953; Бредфилд, 1954; Келленбергер (Kellenberger) и Ритер (Ryter), личное сообщение]. Как указывалось раньше, хорошо очерченная оболочка, отделяющая вакуоли от цитоплазмы, не выявляется (Бирч-Андерсен и др., 1953); усовершенствованная техника заливки, описанная в этой статье, не меняет этого положения и все еще кажется, что бактериальные вакуоли лишены одной из наиболее характерных деталей ядра высших организмов.

Вывод, что скопления ДНК выглядят темными на электронных микрографиях, должен был бы рассматриваться в связи с ранее установленными фактами относительно электронно-рассеивающих свойств органического вещества (см. стр. 290—291). Так как фиксация формальдегидом обеспечивает относительно хороший контраст, становится несомненным, что восприятие клетками атомов осмия в процессе фиксации OsO_4 не является предпосылкой для получения контраста между клеточной структурой и веществом, в которое производится заливка. Действительно, разница между контрастом, полученным после фиксации формальдегидом и OsO_4, настолько незначительна, что мы можем сделать вывод, что в клетках остается фиксированным очень мало осмия (см. табл. 1, *1*, *2*). Если это так, то естественно, что ДНК сама по себе должна была бы дать резкий контраст, поскольку она содержит значительный процент относительно тяжелых атомов фосфора (и, возможно, связанных в виде солей ионов металла), которые вместе с атомами серы, вероятно, создают бóльшую часть контраста, находимого в органическом веществе.

Следовало бы в связи с этим напомнить, что реакция между OsO_4 и большей частью клеточного содержимого, по-видимому, тормозит полностью бактериальные энзимы, не вызывая глубокой денатурации. Это было показано на клетках Escherichia coli,

меченных ^{32}P или ^{35}S, подвергнутых обработке энзимом (Бирч-Андерсен и др., 1953). Во-первых, было найдено, что после отмывания клеток, освобожденных от активности среды и фиксированных OsO_4, активность не терялась в процессе последующего отмывания при комнатной температуре, предназначенного для удаления OsO_4. Во-вторых, было видно, что образцы, обработанные высокоочищенными препаратами трипсина, деоксирибонуклеазы или рибонуклеазы, освобождали большие количества ^{35}S или ^{32}P. В количественном отношении этот опыт показал, что фиксация OsO_4 успешно предотвращает автолиз без разрушения белков и нуклеиновых кислот в такой степени, что они не могут служить субстратом для соответствующих энзимов. При исследовании активности клеток на протяжении последовательных стадий приготовления препарата было найдено, что во время обработки 70% этиловым спиртом около 6—8% активности ^{32}P было потеряно. Эта потеря зависит, вероятно, от растворения фосфолипидов в спирте. При последующих обезвоживании и обработке мономерами МЕТ дальнейшей потери не наблюдалось.

Во введении упоминалось, что количество ДНК в клетке Salmonella typhimurium (Ларк и Маалое, 1956) должно было бы составить молекулу ДНК, почти в 1000 раз превышающую длину клетки, и было высказано предположение, что можно ожидать особого рода правильную конфигурацию этого вещества внутри клетки. В качестве рабочей гипотезы мы полагаем, что трубчатые структуры, наблюдаемые в вакуолях клеток, фиксированных OsO_4 и залитых ЕРО, представляют подобную конфигурацию, в которой тонкая, нитевидная молекула ДНК, сама по себе спиральная по строению, свернута, образуя спираль вторичного порядка[1]. Согласно этой гипотезе, структура, образующая трубку, должна, конечно, проявлять правильную периодичность. Однако размеры трубок и нити, из которой они, вероятно, построены, таковы, что наблюдать требуемую периодичность будет очень трудно. Во-первых, элементарная нить должна иметь диаметр 25—50 Å (ДНК может сочетаться с белком, в таком случае диаметр нити будет больше, чем 25 Å, — диаметр обнаженной спирали ДНК), что означает, что контраст окажется очень незначительным, если пучок лучей пройдет под прямым углом к оси нити. Во-вторых, если пучок лучей проходит по касательной через трубку, получается хороший контраст, но соседние нити только в том случае будут выделены, если угол между осью трубки и пучком лучей таков, что между нитями остается свободный промежуток для пучка. Следовательно, по стереометрическим причинам можно ожидать, что периодичность

[1] Во избежание недоразумения можно напомнить, что эта «спираль вторичного порядка» субмикроскопична и поэтому имеет величину иного порядка, чем свернувшиеся в кольцо хромосомы высших организмов (Рис и Мирский, 1949). Эти крупные тела могли бы быть представлены как «спирали третьего порядка».

в структуре такого рода может выявиться только тогда, когда трубка на срезе располагается под подходящим углом. Остается рассмотреть, в какой степени может быть подвергнуто анализу строение трубок.

На микрографиях трубки представляются разрезанными под всеми углами. Их диаметр, измеряемый по более или менее круговым сечениям, составляет около 500 Å, а толщина стенки — порядка 5 Å. Продольно разрезанная трубка иногда представляет крайне однородную полосу, превышающую 4000—5000Å. (см. табл. 2, *б*), которая указывает, что все трубки имеют один и тот же размер. Часто наблюдающиеся более неправильные конфигурации могут быть обязаны сжатию или разрывам в процессе приготовления препарата. Следует упомянуть, что Бредфилд (1954) представил срез клетки Staphylococcus aureus, на котором выявляются структуры, очень сходные с нашими «трубками».

Последний параграф предыдущего раздела подчеркивает трудности, встречающиеся при попытках объяснить тончайшие детали, наблюдаемые на микрофотографиях срезов бактерий. Придавалось особое значение тому, что микрография может в лучшем случае воспроизвести, например, ядерные структуры в том виде, в каком они находятся после фиксации. Состояние этих структур в живых клетках остается неизвестным. Очевидный выход из этой трудности заключается в изучении клеток, в которых имеет место одновременно определенная последовательность физиологических и генетических процессов, и в выяснении того, могут ли наблюдаться сопутствующие цитологические изменения. Если да, мы узнали бы, что приготовление клеток для электронной микроскопии не нарушило *истинной* цитологической конфигурации.

Для достижения таких экспериментальных условий мы недавно разработали методику стимулирования синхронного ядерного деления у Salmonella typhimurium (Маалое и Ларк, 1954; Ларк и Маалое, 1954), и в этом направлении были выполнены некоторые цитологические исследования, главным образом с применением окрашенных препаратов [Ларк, Маалое и Росток (Rostock), 1955]. Были сделаны попытки выполнить параллельные исследования при помощи электронного микроскопа серийных срезов препаратов, залитых МЕТ. Однако при наших настоящих взглядах должна была бы казаться потерей времени попытка усмотреть систематические изменения в вероятнее всего разрушенных ядерных структурах, которые представлены на микрофотографиях этих препаратов. Все, о чем эти предварительные исследования говорят, это то, что форма ядерных вакуолей, восстановленных на основании серийных срезов, может привести к выявлению состояния ядра относительно его деления (Бирч-Андерсен, 1955).

Новые препараты будут сделаны с применением усовершенствованных методов фиксации и заливки, и мы надеемся решить,

ведут ли себя трубчатые структуры во время деления ядер соответственно с нашими взглядами о том, что они представляют собой хромосомы бактерий.

Опыты с бактериофагом — другое направление изучения, которое может дать сведения относительно функционального значения этих структур. У Salmonella typhimurium, так же как у Escherichia coli, генетическая сторона лизогении и трансдукции была разработана очень тщательно, и твердо установлено, что в обоих случаях материал, переносимый в клетку инфицирующей фаговой частицей, тесно ассоциирован с бактериальным ядром [Е. Ледерберг и Дж. Ледерберг, 1953; Эпплиэрд (Appleyard), 1953; Стокер (Stocker), Зайндер и Ледерберг, 1953; Бертани (Bertani), личное сообщение]. Может быть, возможно установить соответствие между этими генетическими явлениями и цитологическими наблюдениями.

ЛИТЕРАТУРА

Anderson T. F. (1951). Technique for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. Trans. N. Y. Acad. Sci., Series II. *13*, 130.

Appleyard R. K. (1953). Segregation of Lambda lysogenicity during bacterial recombination in E. coli, K-12. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. *18*, 95.

Bahr G. F. (1954). Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide and their reactions with biologically important substances. Exp. Cell. Res 7, 457.

Bahr G. F. & Moberger G. (1954). Methyl-mercuri-chloride as a specific reagent for sulphydryl groups. Exp. Cell Res. *6*, 506.

Birch-Andersen A. (1955). Reconstruction of the nuclear sites of Salmonella typhimurium from electron micrographs of serial sections. J. gen. Microbiol. *13*, 327.

Birch-Andersen A., Maaløe O. & Sjöstrand F. S. (1953). High resolution electron micrographs of sections of E. coli Biochim. biophys. Acta, *12*, 395.

Borysko E. & Sapranauskas P. (1954). A new technique for comparative phase-contrast and electron microscope studies of cells grown in tissue culture with an evaluation of the technique by means of time-lapse cinemicrography. Johns Hopk. Hops. Bull. *95*, 68.

Bradfield J. R. G. (1954). Electron microscopic observations on bacterial nuclei. Nature, Lond., *173*, 184.

Brieger E. M. & Glauert A. M (1954). The demonstration of tubercle bacilli in ultra-thin sections of infected tissues by electron microscopy. Tubercle, Chicago, *35*, 80.

Chapman G. B. & Hillier J. (1953). Electron microscopy of ultrathin sections of bacteria. I. Cellular division in Bacillus cereus. J. Bact. *66*, 362.

Cosslett V. E. (1951). Practical elektron microscopy. New York: Academic Press.

Gay H. & Anderson T. F. (1954). Serial sections for electron microscopy. Science, *120*, 1071.

Griffith F. (1928). The significance of pneumococcal types. J. Hyg., Camb., *27*, 113.

Hillier J. (1950). Electron macroscopy. In Biophysical Research Methods, ed. by F. M. Uber. New York: Interscience Press.

Hillier J., Mudd S. & Smith A. G. (1949). Internal structure and nuclei in cells of Escherichia coli as shown by improved electron microscopic techniques. J. Bact. *51*, 319.
Lark K. G. & Maaløe O. (1954). The induction of cellular and nuclear division in Salmonella typhimurium by means of temperature shifts. Biochim. biophys. Acta, *15*, 345.
Lark K. G. & Maaløe O. (1956). Nucleic acid synthesis and the division cycle of Salmonella typhimurium. Biochim. biophys. Acta (in the Press)[1].
Lark K. G., Maaløe O. & Rostock O. (1955). Cytological studies of nuclear division in Salmonella typhimurium. J. gen. Microbiol (in the Press).
Lederberg J. (1947). Gene recombination and linked segregation in Escherichia coli. Genetics, *32*, 505.
Lederberg J. & Lederberg E. M. (1953). Genetic studies of lysogenicity in Escherichia coli. Genetics, *38*, 51.
Low F. N. (1953). The preliminary alveolar epithelium of laboratory mammals and man. Anat. Rec. *117*, 241.
Luria S. E. & Human M. L. (1950). Chromatin staining of bacteria during bacteriophage infection. J. Bact. *59*, 551.
Maaløe O. & Lark K. G. (1954). In Recent Developments in Cell Physiology, ed. Kitching, J. A. London: Butterworths.
Maaløe O., Birch-Andersen A. & Sjöstrand F. S. (1954). Electron micrographs of sections of E. coli cells infected with the bacteriophage T_4. Biochim. biophys. Acta, *15*, 12.
Murray R. G. E. (1953). The problem of fixation for studies of bacterial nuclei. Bacterial cytology, Symp. 6th Congr. int. Microbiol, Rome, p. 136.
Murray R. G. E., Gillen D. H. & Heagy F. C. (1950). Cytological changes in Escherichia coli produced by infection with phage T_2. J. Bact., *59*, 603.
Palade G. E. (1952). A study of fixation for electron microscopy. J. exp. Med. *95*, 285.
Porter K. R. & Blum J. (1953). A study in microtomy for electron microscopy. Anat. Rec. *117*, 685.
Porter K. R. & Kallman F. (1953). The properties and effects of asmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy. Exp. Cell Res. *4*, 127.
Rhodin J. (1954). Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Thesis. Stockholm: Aktiebolaged Godvil.
Ris H. & Mirsky A. E. (1949). The state of the chromosomes in the interphase nucleus. J. gen. Physiol. *32*, 489.
Sjöstrand F. S. (1953a). The ultrastructure of the outer segments of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscope. J. cell. comp. Phys. *42*, 15.
Sjöstrand F. S. (1953б) A new microtome for ultrathin sectioning for high resolution electron microscopy. Experientia, *9*, 114.
Sjöstrand F. S. & Rhodin J. (1953). The ultrastructure of the proximal convoluted tubules of the mouse kidney as revealed by high resolution electron microscopy. Exp. Cell Res. *4*, 426.
Stocker B. A. D., Zinder N. D. & Lederberg J. (1953). Transduction of flagellar characters in Salmonella. J. gen. Microbiol. *9*, 410.
Watson J. D. & Crick F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids. Nature, Lond., *171*, 737.
Zinder N. D. & Lederberg J. (1952). Genetic exchange in Salmonella. J. Bact. *64*, 679.
Zworykin V. K. et al. (1945). Electron Optics and the Electron Microscope. New York: John Wiley and Sons.

[1] Опубликовано в Bioch. et Biophys. Acta, 1956, 21, 3, 448—458. *Ред.*

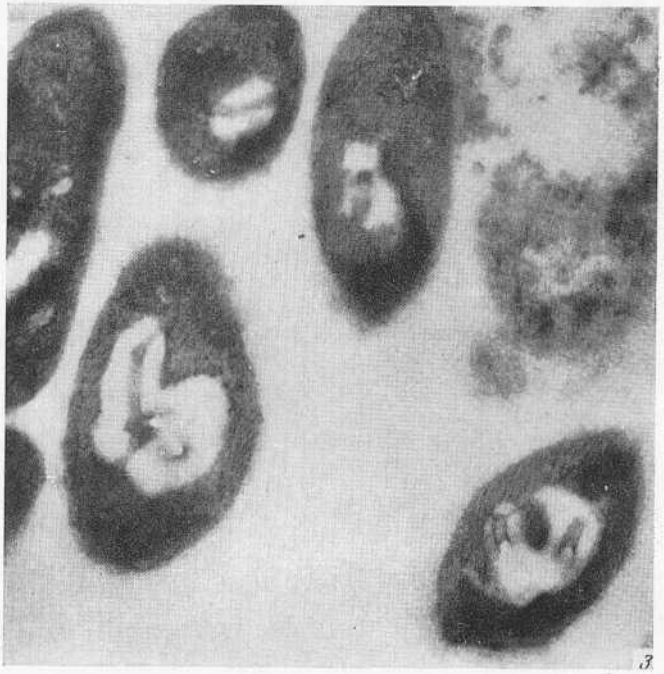


Таблица 1. Заливка метакрилатом.

1. Фиксация 1% раствором OsO_4 в течение 10—15 минут (см. стр. 296, А, 3). Увеличение в 21 000 раз. Обратите внимание на чрезмерно увеличенные и разорванные клетки с немногочисленными плотными волокнами «ядерного материала».
2. Фиксация 2% раствором формальдегида в течение 2 часов при температуре 37° (см. стр. 297, В, 3а). Увеличение в 21 000 раз. Обратите внимание на разбухание в областях вакуоли, рыхлую оболочку и гантелеобразное ядерное вещество. Контраст, в данном случае полученный без OsO_4, может быть сравнен с контрастом на микрофотографиях 1 и 3.
3. Фиксация 1% раствором OsO_4 в течение 2 часов при температуре 37° (см. стр. 296, А, 2а). Увеличение в 42 000 раз. Обратите внимание на целые клетки со слегка сморщенными оболочками, вместе с частью чрезмерно увеличенной клетки. Трубчатоподобные структуры в клетках, залитых метакрилатом, редки.

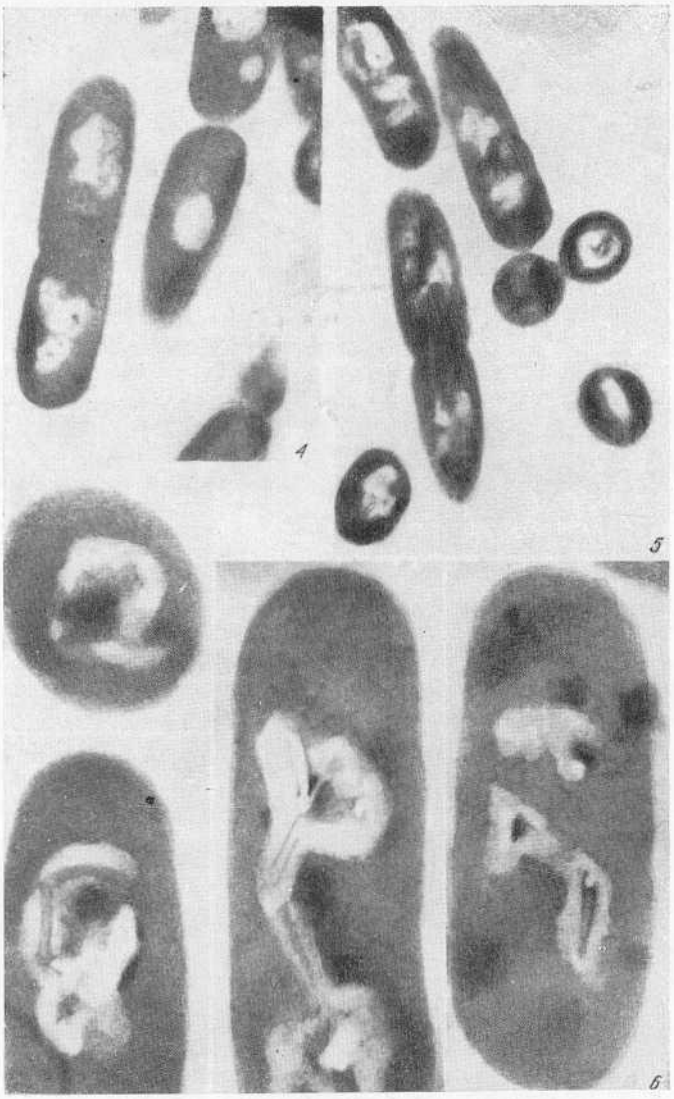


Таблица 2. Заливка смесью Ероху.

4. Фиксация 0,2 % раствором OsO_4 в течение 2 часов при температуре 37° с последующей обработкой 1 % раствором OsO_4 в течение 2 часов при температуре 37° (см. стр. 297, Б, 2). Увеличение в 21 000 раз. Отсутствие ясных признаков повреждения клеток, оболочки гладко прилегают. Вакуоли содержат решетчатые структуры, которые могут быть сравнены с соответствующими структурами на микрофотографиях 5 и 6.
5. Фиксация 0,2 % раствором OsO_4 в течение до 10 минут при комнатной температуре с последующей обработкой 1 % раствором OsO_4 в течение 2 часов при температуре 37° (см. стр. 297, Б, 1б). Увеличение в 21 000 раз. Вакуоли содержат трубчатые структуры и немногочисленные «решетки».
6. Фиксация 1 % раствором OsO_4 в течение 2 часов при температуре 37° (см. стр. 296, А, 2б). Увеличение в 42 000 раз. Размер и форма клеток и гладкой прилегающей оболочки могут быть сравнены с табл. 1.
3. Почти все ядерные структуры трубчаты; обратите внимание на экземпляры трубок, внутрь которых не проник ЕРО, и трубок, показывающих одинаковую ширину на всем протяжении.

ХРОМОСОМЫ У МИКРООРГАНИЗМОВ

Ч. ДЖ. ЭЛЛИОТТ

Сектор генетики Университета в Глазго

Цель данного сообщения симпозиуму — дать некоторые разъяснения бактериальной цитологии по одной детали, имеющей некоторое сходство с хромосомами высших организмов. Изучение строения и свойств хромосом относительно легко у организмов с крупными хромосомами. У микроорганизмов изучение свойств хромосомы более затруднительно. Это в значительной степени обязано техническим задачам, возникающим в связи с очень мелкими структурами, часто стоящими на границе разрешающей способности обычного оптического микроскопа. Но нельзя избежать впечатления, что более неудовлетворительное положение создалось в результате некоторого отсутствия понимания цитологии и особенно генетики у части авторов.

Обсуждению этой проблемы у бактерий поэтому необходимо предпослать оценку некоторых трудностей, встречающихся при изучении грибов, которые по сложности анализа стоят между высшими организмами с крупными хромосомами и бактериями, у которых ядра мелки. Будет выяснено, как усовершенствованные технические методы и сходный генетический анализ могут способствовать разъяснению цитологических вопросов.

ГРИБЫ

Брахимейоз

В качестве примера трудности цитологических исследований у грибов можно привести спор по поводу брахимейоза.

Гарпер (Harper) первоначально утверждал, что при развитии плодового тела в аскогонии ядра сливаются. Эта мысль была принята Гвинн-Воган (Gwinne-Vaughan), которая первая предположила, что два диплоидных ядра (возникающие после первого деления) сливаются в начальном аске, давая тетраплоид-

ное ядро. На протяжении трех делений в аске количество хромосом уменьшается в 2 раза, давая гаплоидные аскоспоры; этот процесс двойной редукции был назван брахимейозом. Например, у Pezizia (Humaria) rutilans Гвинн-Воган [Фрезер (Fraser), 1908] наблюдала 16 хромосом во время митоза в аскогенных гифах (предполагая диплоидное количество), 16 двухвалентных в первом делении в аске и 16 хромосом, расходящихся к каждому полюсу при втором делении. Она утверждала, что при третьем делении к каждому полюсу в анафазе отходит только 8 хромосом (предполагая гаплоидное количество). Следовательно, первое и третье деления аска были редукционными.

Равным образом утверждалось, что третье деление аска является редукционным у Patella (Lachnea) melaloma (Гвинн-Воган, 1937) и Ascobolus magnificus [Гвинн-Воган и Уилльямсон (Williamson), 1932]. Странно, однако, что у Pyronema confluens (P. omphalodes), у которой считалось, что вторая редукция возникает при втором делении, количество хромосом оставалось одним и тем же во второй и третьей анафазах (Гвинн-Воган и Уилльямсон, 1932). Наблюдения Гвинн-Воган были сделаны при изучении срезов, окрашенных гематоксилином Гейденгайна или тройной краской Флеминга.

Обоснованность этих наблюдений отрицалась многими микологами. Как показал Мертенс (Martens, 1946), данных для утверждения о наличии брахимейоза было недостаточно для того, чтобы доказать тип жизненного цикла, неизвестный у каких-либо других живых организмов. Цитология Peziza rutilans была вновь исследована в деталях Уилсон (Wilson, 1937). Этот организм имеет исключительно крупные для гриба ядра и представляется подходящим цитологическим материалом, так как Уилсон утверждала, что она видела четыре хроматида диплотеновой бивалентности. Она не нашла признаков брахимейоза; 16 бивалентностей наблюдались при первом делении и 16 хромосом — во всех остальных делениях. Следовательно, 16 — гаплоидное количество хромосом. Наблюдения Уилсон были выполнены на срезах, окрашенных гематоксилином или кристалвиолетом или по Фельгену.

Значительно позже цитология других видов, у которых, как утверждала Гвинн-Воган, обнаружен брахимейоз, была изучена при помощи методов раздавливания. Patella melaloma изучалась Олайв (Olive, 1949б, 1950), Pyronema confluens — Гиршем (Hirsch, 1950) и Ascobolus magnificus — Вудом (Wood, 1953). Пиронема также повторно исследовалась Уилсон (1952), применявшей как методы раздавливания, так и материал, полученный при помощи ультратонких срезов. Во всех случаях отсутствовали указания на брахимейоз, первое деление в аске было редукционным, а третье — митозом. Этот современный цитологический анализ доказал, что концепция брахимейоза несостоятельна.

Количество хромосом

В данное время немногие подсчеты хромосом у грибов могут считаться достоверными. Мертенс (1946) приводит случай Pyronema confluens, у которой до настоящего времени семь разных авторов насчитали пять различных количеств хромосом в пределах от 4 до 16. Уилсон (1952) показала сейчас определенно, что у этого организма имеется 12 хромосом. Олайв (1953) указал, что большое количество подсчетов хромосом, считающихся за две, может быть ложным вследствие скучивания хромосом вместе в две группы, особенно в анафазе, при неудовлетворительной фиксации или раздавливании (см. табл. 1, *2*, *b*).

Применяя технику раздавливания, Финчем (Fincham, 1949), а также Додж, Синглтон и Ролник (Dodge, Singleton, Rolnick, 1950) подсчитали количество хромосом у некоторых видов Neurospora; Уилсон (1952) и Эмерсон (Emerson), а также Уилсон (1954) нашли полиплоидные группы у Allomyces. Это были первые существенные вклады в сравнительные цитологические исследования грибов, давно уже известные среди высших организмов.

Методы раздавливания, которые применялись по отношению к высшим организмам около 25 лет, за последние 10 лет были использованы для изучения микроорганизмов. Важно, что наиболее значительный вклад в цитологию грибов был сделан не микологом, а генетиком кукурузы доктором Барбарой Мак Клинток (McClintock), которая применила к Neurospora технику, разработанную для исследования высших растений. Выше было показано, что значительный прогресс в цитологии грибов был достигнут при использовании этой техники.

Нейроспора

Хромосомы Neurospora crassus были изображены полностью в пахитеновой стадии Мак Клинток (1945) и Синглтоном (1953). При анализе слияния в пахитеновой стадии Мак Клинток (1954) определила наличие у одного штамма эквивалентного перемещения, известного из генетических доказательств, и обнаружила дополнительный сегмент у одной хромосомы второго штамма. Она также исследовала режим слияния в пахитеновой стадии фрагмента, имеющегося у третьего штамма. Крупное слившееся ядро и исключительное техническое умение допустили такую точность в анализе, которая приближалась к точности, возможной при исследовании кукурузы. Однако и Мак Клинток, и Синглтон установили, что результаты в их опытах значительно колебались в зависимости от того, какие штаммы брались для изучения. Это то, что должно было бы приходить на ум при всех исследованиях микроорганизмов и что может частично объяснить неудовлетворительный характер многих опубликованных работ.

Пол у Hypomyces

При работе с очень мелкими хромосомами может легко возникнуть ошибка в толковании результатов, если отсутствует генетический контроль. Подходящим примером является вопрос о поле у Hypomyces solani f. cucurbital. Имеются гермафродитные, мужские, женские и бесполые штаммы. Гирш (1949) нашла, что при скрещивании между гермафродитными штаммами в первой метафазе имеются четыре бивалента. При скрещивании между гермафродитными и мужскими или женскими штаммами она наблюдала три бивалента и один унивалент. Следовательно, гермафродитные штаммы имеют четыре хромосомы, а мужские и женские — по три каждый. Одна хромосома из четырех была крупная, одна очень мелкая и две — промежуточных размеров. Отсутствующая хромосома у мужских и женских штаммов принадлежала по размеру к промежуточным. При скрещивании мужского и женского штаммов обычно возникали два бивалента и два унивалента, но иногда — три бивалента. Отсюда Гирш сделала заключение, что из четырех хромосом одна, которая отсутствовала в мужском штамме, отличалась от отсутствовавшей хромосомы в женском штамме, но что хромосомы были частично гомологичны. Пол был определен по различным сегментам двух хромосом. Автор делает заключение, что нейтральные штаммы имеют две хромосомы и возникают из неразделяющихся двух и трех хромосом, которые дали бы гермафродитные штаммы с полным набором (комплектом) и нейтральные штаммы при наличии только одной и четырех хромосом.

К несчастью, это описание не согласуется с генетическими данными Эль-Ани (El-Ani, 1954). Он вскрывал аски после скрещивания мужского и женского штаммов и обнаружил 23 аска с соотношением мужских и женских хромосом 4:4 и 19—с соотношением 2:2:2:2 (мужские : женские : гермафродитные : нейтральные). По гипотезе Гирш, следовало бы ожидать соотношение 4:4 как гермафродитный:нейтральный в неразделившихся асках, что не случилось, и четыре типа в одном аске нельзя было бы предсказать. Эль-Ани считает, что мужской и женский пол должен определяться различными участками, разделенными некоторым расстоянием в одной хромосоме так, как это предполагалось Ганзеном и Снайдером (Hansen, Snyder, 1946). Истинная цитологическая картина, таким образом, не определена.

Aspergillus nidulans

Генетическое доказательство является решающим для наличия у некоторых грибов «парасексуального» цикла, включающего образование гетерозиготных диплоидов и отделение от них соматически диплоидных и гаплоидных рекомбинантов

[Понтекорво (Pontecorvo), 1954]. У Aspergillus nidulans диплоиды, возникающие путем слияния разноименных ядер в уравновешенном гетерокарионе между двумя штаммами, отмеченных биохимической недостаточностью и другими свойствами [Роупер (Roper), 1952], оказываются диплоидными по своему фенотипу и по соматической сегрегации, и в аскоспорах генетических маркеров, присутствующих в родительских штаммах; кроме того, диплоиды имеют диаметр конидий больший, чем диаметр конидий гаплоидов. Не представлялось возможным произвести цитологический анализ ядер гифов и обоснование диплоидного состояния в вегетативных тканях лишь генетическое. Аски с 16 спорами обнаружены в виде диплоидов и не были выявлены в виде гаплоидов. Однако встречались также аски с 8 спорами, иногда довольно часто, в перитекиях, возникающих из диплоидных штаммов (Понтекорво и Роупер, цитировано у Понтекорво, 1953).

Понтекорво и Роупер нашли, что аскоспоры диплоидов со значительной частотой 16-споровых аск были очень мало плодовиты, меньше чем 1 из 50 прорастающих, что мешало генетическому анализу. Они поэтому не были в состоянии показать генетически, имело ли место слияние двух диплоидных ядер с последующим тетраплоидным мейозом при развитии аска.

Цитологические наблюдения как над гаплоидами, так и над диплоидами были проведены Понтекорво (1953). Было прослежено развитие аска у гаплоидов и постоянно обнаруживались 4 бивалента в первой метафазе. У диплоидов, хотя и были видны многочисленные аски с наличием мейоза, большинство из них впоследствии дегенерировало. В первой метафазе расположение хромосом часто казалось сложным и их количество превышало четыре. Это было объяснено как доказательство тетраплоидного мейоза.

Здесь не место обсуждать в деталях дальнейшие наблюдения, сделанные мной, но можно отметить следующие детали. У гаплоидного дикого типа Aspergillus nidulans после слияния ядер в начальном аске (табл. 1, *1*, *a*) ядро немедленно подвергается мейозу. Ранняя мейотическая профаза у Neurospora показывает семь сокращенных бивалентов, которые удлиняются при условиях полного слияния, чтобы дать типичную картину пахитеновой стадии (Мак Клинток, 1945; Синглтон, 1953). Подобный процесс не обнаружен у Aspergillus. Ранние профазы показаны в табл. 1, *1*, *b*, *2*, *a*, *2*, *b*. Табл. 1, *3* показывает 2 клетки в диакинезе с 4 бивалентами. Диакинез и первая метафаза являются единственными стадиями, в которых возможно подсчитать хромосомы.

В первой анафазе между отделившимися хромосомами видны окрашенные нити («стебельчатое тело») (табл. 1, *2*, *b*). Это часто отмечалось у других грибов и иногда принималось за доказательство наличия гетерозиготности в результате извращений кроссинг-овера, дающего мост и фрагмент в первой анафазе (напри-

мер, Олайв, 1949а). Однако применявшийся здесь штамм был повторно выделен из одной конидии или аскоспоры. В перитехиях, образующихся в этих культурах, слившееся ядро в аске должно быть гомозиготным вследствие структурного расположения его хромосом.

Были сделаны наблюдения над однотипно плодоносящими диплоидными штаммами, в которых не было обнаружено 16-споровых аск, чем они отличались от исходных диплоидов, наблюдавшихся Понтекорво. Отдельные, случайно взятые, аскоспоры, изолированные при помощи микроманипулятора, дали 35% прорастания. Все они были гаплоидами того же типа, что и обнаруженный в скрещивании между двумя таплоидными штаммами, из которых возник диплоид. Это указывает, что вначале имел место простой мейоз отдельного диплоидного ядра, заключенного в аск. В первой метафазе в этом диплоиде наблюдались 4 бивалента (табл. 1, *4*). Хромосомы здесь крупнее, чем у дикого типа, но это может быть фенотипическим выражением диплоидии [ср. Томас (Thomas), 1936]. Табл. 1, *5* показывает 3 бивалента и 2 унивалента, а табл. 1, *6*, несмотря на сложный вид, может быть объяснена приблизительно как 4 бивалента. Наличие больше чем 4 хромосомных структур в диплоидах не обязательно может указывать на тетраплоидный мейоз, так как у дикого типа были обнаружены аски с 8 несомненными унивалентами.

Дрожжи

Дрожжи являются заведомо трудными цитологическими объектами. Не только потому, что имеются разногласия относительно того, какая структура в клетке представляет собой ядро, но даже среди авторов, которые придерживаются одного мнения в этом вопросе, не существует согласия относительно количества хромосом или даже относительно того, видимы ли они вообще. Единственно надежную информацию о состоянии клеток дает генетика. Положение у дрожжей является, таким образом, более близким к положению у бактерий, чем к положению у грибов, обсуждавшемуся в предыдущих разделах.

Мы должны были быть осторожными, принимая оценку, данную Линдегреном (Lindegren, 1949) цитологии Saccharomyces cerevisiae, так как описанное им поведение хромосом очень отличается от исключительно однородного поведения, известного у высших растений и животных. Наличие в вакуоли хромосом, один конец которых прикреплен к оболочке вакуоли, со свободным концом, «плавающим» в соке вакуоли; их последующее отделение от оболочки и дрожание (колебание) с быстрым броуновским движением; формирование 12 хромосом в одну пару комплексов — все это совершенно противоречит общим цитологическим опытам. Изменения в размере, испытываемые

«хромосомами» Линдегрена, замечательны. Трудно понять результаты некоторых из его методов окраски, но структуры, которые окрашиваются «красно-красно» фуксином и «светопреломляющие», неприемлемы в качестве хромосом, если «центросома» окрашивается в «пурпурно-красный» цвет, в который хромосомы нормально окрашиваются при применении техники Фельгена. «Центросома» Линдегрена рассматривается как ядро многими авторами, например Уинджом (Winge, 1951), ДеЛяматером (DeLamater, 1950), Леваном (Levan, 1947) и Мундкуром (Mundkur, 1954). Леван утверждает, что имеется около 10 хромосом, — значительно больше, чем находят другие авторы. В подтверждение такого большого количества он описал мелкие тельца, по-видимому, отлагающиеся на веретене «полиплоидов», образовавшиеся в результате обработки органическими веществами и имеющие одинаковые размеры с хромосомами диплоидного ядра. Фотографии ДеЛяматера, к сожалению, плохо воспроизведены. Он считает, что имеется четыре хромосомы. Мундкур изучал материал, фиксированный замораживанием-высушиванием, с последующим получением срезов и окрашиванием. Он обнаружил, что ядро при окраске гематоксилином Гейденгайна и по методу Фельгена представляет собой однородное тело. Отсутствовали признаки какой-либо внутренней дифференциации во время деления, которое имело место путем простого сжатия.

Убедительный доклад о цитологии дрожжей принадлежит Лейтцу (Leitz, 1951) относительно (Zygo) Saccharomyces priorianus. Он нашел три хромосомы в гаплоидных и шесть в диплоидных клетках и описал мейоз. Мейоз у Schizosaccharomyces octosporus был описан Уидра (Widra) и ДеЛяматером (1955).

В скрещивании, выполненном при помощи массовой комбинации между несомненно гаплоидными штаммами Saccharomyces cerevisiae, могут происходить ненормальные соотношения сегрегации, обязанные аскам, содержащим диплоидные аскоспоры [Ромэн, Хауторн и Дуглаз (Roman, Hawthorne, Douglas), 1951; К. Линдегрен и Г. Линдегрен, 1951]. Преимущественно во время роста культур, которые должны быть скрещены, имеет место ненормальная гибридизация клеток, подобная половому типу, дающая диплоидные клетки, которые сливаются, давая тетраплоидное ядро; последнее претерпевает мейоз, давая четыре диплоидные споры.

К. Линдегрен и Г. Линдегрен (1951) описали образование триплоидных и тетраплоидных штаммов Saccharomyces. Диплоидные аскоспоры из неправильных аск могут быть гомозиготными или гетерозиготными вместо полового типа. Гомозиготы могут быть скрещены с гаплоидами противоположного конъюгационного типа, давая начало нескольким триплоидам, или с диплоидными гомозиготами для противоположного типа, давая некоторые тетраплоидные клетки. Полиплоидные штаммы определены по размеру клетки и морфологии. Мундкур (1954) выпол-

нил цитологические исследования полиплоидных серий при помощи техники Линдегрена и нашел соответствие между размером ядра и степенью плоидии. Утверждалось, что имеется соответствие сухого веса клеточного содержимого, ДНК и РНК и метафосфата с плоидией [Огур (Ogur), Минклер (Minckler), К. Линдегрен и Г. Линдегрен, 1952], как и степени дыхания (Огур, 1954) и содержания азота (Огур, 1955).

Помпер и Буркхолдер (Pomper, Burkholder, 1949) описали выделение прототрофного диплоидного штамма после смешивания культур противоположных половых типов, отличающихся некоторыми биохимическими требованиями. Этот процесс был продолжен (Помпер, 1952) до выделения триплоидов как прототрофов путем смешивания диплоидного гомозиготного штамма (гены, определяющие некоторые боихимические потребности) с гаплоидным, с различными биохимическими потребностями. Таким же путем могут быть получены тетраплоиды. Генетический анализ таких триплоидов и тетраплоидов был описан Помпером, Дэниелсом (Daniels) и Мак Ки (McKee), 1954.

Летерьет и Эфрусси (Leterjet, Ephrussi, 1949) нашли, что переживающие линии дрожжевых клеток, облученных Х-лучами, специфически отличаются по гаплоидам и диплоидам. Это было использовано Помпером и др. (1954) в определении плоидии штаммов в процессе анализа их полиплоидной сегрегации.

Цитологические исследования полиплоидной сегрегации, проведенные Романом и др. (1951), а также Помпером и др. (1954), не кажутся завершенными. Но, учитывая трудности цитологии дрожжей, обсуждавшиеся выше, они в настоящее время не были очень полезны.

Коэффициенты ненормальной сегрегации, объясненные в терминах полиплоидного мейоза Романом и др. (1951), были истолкованы другим путем Уинджом и Робертсом (Roberts) (1954). В материале этих авторов аскоспоры, первоначально гаплоиды, претерпели спонтанную диплоидизацию. Коэффициенты ненормальной сегрегации появляются тогда, когда два гаплоидных несестринских ядра, возникшие из дополнительного митоза перед разграничением спор, включаются в одну аскоспору и сливаются, давая диплоидную гетерозиготу. Уиндж и Робертс опубликовали фотографии, демонстрирующие дополнительное деление одного или многих ядер, а также отсутствие ядер, включенных в аскоспоры.

Документация и объяснение результатов

Необходимо сделать здесь разъяснение относительно документации результатов цитологических исследований. Существенно использование фотографий, так как они снабжают нас более объективными доказательствами, чем рисунки, которые

неизбежно содержат элемент субъективности. Но то, что мы можем видеть на фотографиях, значительно меняется в зависимости от качества репродукции (ср. одни и те же фотографии у ДеЛяматера, 1953а, табл. 1 и 1953б, табл. 2). Фотографии необходимы также как показатель технической компетенции. Однако в некоторых случаях трудно оценить по одной фотографии достоверность интерпретации автора. Оценка цитологии Eremascus albus ДеЛяматером, Явербаумом (Yaverbaum) и Швартцем (Schwartz) (1953) обильно документирована фотографиями с многочисленными сериями оптических разрезов через одно ядро. Однако трудно видеть разницу между интерфазным ядром на рис. 1 этих авторов и изображениями прометафазы и анафазы на рис. 5, 6 и 8. Неясна разница между рис. 77—81 (зиготенная стадия) и рис. 117—120 и 121—123 (диакинез). Некоторые рисунки этих клеток были бы более полезны; без рисунка невозможно подсчитать 12 лептотеновых хромосом, о которых говорится, что они показаны на рис. 60—62. Опять-таки в работе Уидра и ДеЛяматера (1955) о Schizosaccharomyces octosporus трудно усмотреть разницу между состоянием, показанным на рис. 14—17 и рис. 29 (о которых сказано, что они представляют собой соответственно зиготенную стадию и первую метафазу!). Основная последовательность стадий, показанных у Schizosaccharomyces, однако, достаточно ясная; но их объяснение в терминах известных свойств хромосом у высших организмов кажется мне далеким от действительности. Несмотря на примечания Уидра и ДеЛяматера по этому поводу, следовало бы предпочтительно применять такие термины, как ранняя и поздняя профаза, чем зиготены и диакинез, для обозначения различных форм ядер.

БАКТЕРИИ

Вопросы строения и деления ядер

Робинау (Robinow, 1945) изучал ядра бактерий и их деление, применяя преимущественно метод гидролиза N-HCl при 60° по Пекарскому и окрашивая раствором Гимза. В таких препаратах, которые совпадают по результатам со специфическими методами окраски на ДНК, «основной хроматиновый элемент представляет собой (приблизительно) гантелеобразную палочку, которая делится продольно в плоскости более или менее параллельной короткой оси бактерии, в результате чего одна гантелеобразная форма дает начало двум целым дочерним гантелям» (Робинау, 1945, стр. 359). Клифтон и Эрхард (Clifton, Ehrhard, 1952) обратили внимание на отсутствие гантелеобразных конфигураций на своих замедленных фазово-контрастных киномикрографиях. Видно, что деление начинается с появления нарушения целостности хроматинового тела в стороне, сосед-

ней к клеточной стенке, прогрессирующего поперек тела, обычно давая U- или, реже, V-образную структуру, прежде чем происходит полное отделение.

Деляпорт (Delaport, 1951) настаивает на осторожном сравнении всех телец, имеющихся в клетке, — липидных, метахроматических и гликогенных зерен и т. д. Она нашла, что «ядерный элемент» представляет собой в большей степени «жидкое» тело, чем какое-либо из упомянутых выше, и может быть сжато или даже фрагментироваться при их наличии. Если подобные ядра вновь начинают делиться, трудно выяснить, насколько их строение сравнимо со структурой ядер у высших организмов. Необходимо упомянуть, что Мундкур (1954) считает, что ядро дрожжей может быть выведено из его шаровидной формы вакуолью.

Наиболее интересные результаты были получены после введения замораживающего обезвоживания [Бланк (Blank), Мак Карти (McCarthy) и ДеЛяматер, 1951] материала, гидролизированного и затем окрашенного тионином или азуром А в присутствии SO_2 [ДеЛяматер, 1951; ДеЛяматер и Мадд (Mudd), 1951; ДеЛяматер и Хантер (Hunter), 1951]. Техника этого метода была обсуждена ДеЛяматером (1953а). Великолепно репродуцированные фотографии Bacillus megaterium, полученные ДеЛяматером (1953б), не оставляют сомнений в том, что этот метод выявляет значительно больше в структуре бактериалной клетки, чем применявшиеся раньше методы. ДеЛяматер считает, что полученные им результаты указывают, что бактерии имеют структуру и свойства ядер, полностью сходные с таковыми высших организмов: «Чувствуется, что существенные структуры бактериального ядра во всех его фазах, как выявлено данными исследованиями, показывают исключительное сходство с ядром более крупных организмов. Эти находки ведут к тому, чтобы ввести бактерии цитологически в общую биологическую систему, в которой они находятся уже биохимически и к которой они, конечно, принадлежат» (ДеЛяматер и Мадд, 1951, стр. 511). Полагали, что деление ядер имеет место посредством внутриядерного митоза (ДеЛяматер, 1954). Возлагается большая надежда на то, что техника ДеЛяматера будет широко применяться и его наблюдения будут повторены исследователями независимо от принадлежности к той или иной школе.

Нет необходимости обсуждать различные возражения, которые были выдвинуты против объяснения ДеЛяматером ядерного строения и деления, например, Байссетом (Bisset, 1953, и др.).

Бетнер (Beutner, 1953) пытался сопоставить частоту различных типов ядерной конфигурации со стадией роста культуры и нашел, что «митотические» фигуры наиболее часты во время ранней логарифмической фазы роста. Это помогло показать, что конфигурации, о которых идет речь, действительно представляют

ядро в процессе деления. Более критическое изучение в этом направлении возможно при использовании синхронизированных культур. Маалое и Ларк (Maaløe, Lark, 1954) нашли, что если культуры Salmonella typhimurium, которые выращивались при 25°, перенести в температуру 37°, ядерное деление имеет место одновременно у большинства клеток в промежуток времени от 5 до 10 минут после повышения температуры. В цитологических исследованиях этого организма, сообщенных Ларком, Маалое и Ростоком (Rostock) (1955), образцы культуры извлекались и фиксировались через определенные интервалы; конфигурации ядер, обнаруженные на окрашенных препаратах, определялись как точка, клин, полоса и гантель. Было показано, что время, в которое конфигурации появляются после повышения температуры, указывает, что клин, полоса и гантель являются последовательными стадиями цикла деления ядра и что точки представляют собой покоящиеся ядра. Ядерное деление выглядит как «постепенный переход одного плотного тела через более неправильные структуры, описанные как "клин", "полоса" и "гантель", в два отдельных круглых тела» (стр. 324), схема, которая «должна вести к согласию» со схемой Робинау. Ядерные конфигурации типа, который ДеЛяматер считает митотическим, наблюдались случайно и не увеличивались заметно в частоте в период, когда количество ядер удваивалось. У Bacillus megaterium Чибалский и Хантер-Чибалская (Szybalski, Hunter-Szybalska) (1955) нашли, что воздействие на активно растущую культуру температуры 15° в течение 15 минут вызывает накопление метафазоподобных фигур — конденсированных ядер с отдельными мелкими зернами, располагающимися на их полюсах. Отделение сестринских хромосом наблюдалось вскоре после того, как культуры вновь были помещены при температуре 34°, и с этого времени деление становилось синхроничным, с метафазоподобными фигурами, обнаруживаемыми на протяжении «очень короткого» интервала между более рассеянными и нитевидными состояниями покоящейся стадии. Применение синхронизированных культур возлагает большие надежды на экспериментальный подход к проблемам деления ядра, которые должны иметь большой общий интерес.

Фитц-Джемс (Fitz-James, 1954) нашел, что содержание ДНК в культуре непрерывно возрастает в течение первых нескольких часов развития и считает это доказательством против митоза. Однако Уокер (Walker) и Иетс (Yates) (1952) показали, что содержание ДНК ядра в делящихся клетках тканевой культуры возрастает непрерывно во время интерфазы. В тканевых культурах высших животных и в растительных клетках продолжительность митоза коротка в сравнении с продолжительностью интерфазы [Харс (Hughes), 1952]. Доказательство быстрого митоза и длительной интерфазы у бактерий можно найти в исследованиях синхронизированных культур Маалое и Ларка (1954), а также

у Чибалского (1955). Так как можно ожидать некоторую недостаточность синхронизации в культурах Фитц-Джемса, его результаты ни в коем случае не могут считаться доказательством против митоза.

Фитц-Джемс (1954, стр. 470) устанавливает: «Хроматиновые структуры, видимые в начальных стадиях развития до того, как начинает повышаться содержание ДНК, выглядят в окрашенных препаратах, как триада зерен, часто соединенных по крайней мере в двух местах нежными нитями». В описании Уайта (White) (1954, стр. 13) структуры покоящегося ядра указывается, что во многих случаях интерфазные хромосомы имеют в микроскопических препаратах вид, обладающий малым сходством или отсутствием такового со структурой, которой, как они считают, обладает живая клетка. Соединяющие нити между хромосомами часто появлялись в старых работах по цитологии, но были несомненно артефактами.

Бетнер (1953, стр. 626) сделал замечательное утверждение, что «критерием для определения, делится ли ядро митотически в большей степени, чем амитотически, является образование метафазного веретена». Не наличие веретена, а специфический цикл поведения хромосом — вот что составляет сущность митоза. Мы говорим об «эндомитозе» и «колхициновом митозе», потому что хромосомы проходят через цикл уплотнения, деления центромеры и удлинения в отсутствие веретена [Пейнтер и Рейндорп (Painter, Reindorp), 1939; Леван, 1938].

Очень интересные вопросы, касающиеся построения бактериального ядра, возникают при сложной трансформации ядра, обнаруживаемой в различных условиях культивирования или вызванной ультрафиолетовым облучением, или инфекцией фагом [Келленбергер (Kellenberger), 1953], или антибиотиками [Келленбергер, 1953; ДеЛяматер, 1953б; ДеЛяматер, Хантер, Чибалский и Брайзон (Bryson), 1955]. Келленбергер описал процесс восстановления из форм, которые ядро принимает под влиянием различных культуральных условий до нормальной формы, обнаруживаемой во время логарифмической фазы роста в бульоне. Некоторые из ненормальных конфигураций распадаются на «полихромосомные формы», в которых «хромосомы» перегруппировываются и начинают делиться способом, наблюдаемым в быстро растущих бульонных культурах. Осевые палочковидные формы претерпевают сжатие, давая нормальные ядерные структуры. Объяснение нормального ядра Келленбергером сходно с объяснением Робинау. По ДеЛяматеру (1953б), восстановление из вызванной антибиотиком «полиплоидии» влечет сегрегацию ядерных элементов, а именно три хромосомы у Bacillus megaterium, остающиеся по-прежнему внутри ядерной оболочки сложного ядра, которое может затем образовать покоящееся ядро или переходить немедленно к метафазе митоза без удлинения хромосомы.

Доказательства полового процесса и мейоза у бактерий

Морфологическое обоснование наличия полового процесса у бактерий было дано в обзоре Хетчинсона (Hutchinson) и Стимпена (Stempen) (1954). Подобные наблюдения очень трудны, потому что ожидаемые явления встречаются нечасто.

Клинебергер-Нобл (Klieneberger-Nobel, 1951), основываясь на изучении фазово-контрастных и окрашенных препаратов, считает, что образование крупных тел в цикле осуществляется путем слияния мелких элементов, и утверждает (стр. 529), что когда бактериальная фаза зарождается из гигантских тел, «возникают новые расы, лучше приспособленные к неблагоприятным условиям (послужившим причиной возникновения L-форм), чем материнский организм». L-цикл, следовательно, рассматривается как половой и регенеративной процесс. Эта точка зрения не подкреплена доказательствами [Тюлянь (Tulasne), 1953]. Бактерии, которые возникли из L-форм, восстанавливают все морфологические, физиологические, биологические, антигенные и патогенные свойства исходного организма. Тем не менее допускается, что во время L-цикла могут также иметь место ядерные трансформации и генетическая рекомбинация (Тюлянь, 1953). Дайнс (Dines, 1946, 1947) наблюдал, что хотя контакт между двумя антагонистическими штаммами протея и необходим для образования крупных тел, бактерии, возникающие из крупных тел, имеют антигенные и антагонистические свойства только исходных штаммов. Стимпен и Хетчинсон (1951а, б) исследовали развитие крупных тел у протея при помощи фазово-контрастной замедленной микрокиносъемки и на окрашенных препаратах. Они не смогли найти доказательств полового происхождения этих структур.

Уэбб и Кларк (Webb, Clark, 1954) обнаружили крупные клетки у Micrococcus pyogenes, которые они считают диплоидами, подвергающимися мейозу.

Линдегрен (1942) изучал у микрококка процесс, который он считал мейозом.

ДеЛяматер (1953б) изобразил клетки Bacillus megaterium, в которых он мог сосчитать диплоидное количество хромосом, и другие клетки, которые, по его мнению, представляют мейотическую стадию.

ДеЛяматер (1953в) описал также конъюгирующие трубки между бактериальными клетками. Рис. 29 и 30 в указанной работе показывают спирально закрученную конъюгационную трубку с крупными ядрами на каждом конце; это несомненно может быть некоторым основанием того, чтобы считать их диплоидами. Мы согласны с Хетчинсоном и Стимпеном (1954), которые подчеркивали желательность исследования в живом состоянии развития структур, считающихся половыми.

Выводы. Наблюдения над генетически известным материалом

Альтернативы, так, как они есть по отношению ко взглядам ДеЛяматера на бактериальное ядро и митотическую природу его деления, не кажутся убедительными. Ледерберг и Тэтум (Tatum) (1953) говорят: «Для генетика трудно представить, как бактерия могла бы существовать без какого-то подобия митотического процесса, но детали последнего требуют критического и объективного определения»; и дальше — «хотя ядерные агрегаты, очень напоминающие митотические метафазы и анафазы, могут быть после непродолжительных поисков обнаружены, четкие объяснения цитологии E. coli зависят большей частью от обоснованности тех заключений, которые были выведены из технически совершенного материала» (стр. 172—173). А Уэбб и Кларк (1954, стр. 49) замечают относительно Micrococcus pyogenes: «Не кажется вероятным, что амитотическое деление могло бы иметь место, так как генетическая стабильность, обнаруживаемая этим организмом, указывает на постоянную редупликацию и передачу генетических детерминант дочерним клеткам. На основании доступных доказательств мы считаем, что митотическое деление может возникать, но что отсутствует разрушение ядерной оболочки во время прометафазы».

Технические усовершенствования должны привести к дальнейшим успехам, несмотря на то, что техника ДеЛяматера (1951) подает большие надежды и ее применение должно было быть продолжено. Робинау (1953), однако, считает, что ценность обезвоженных и просветленных препаратов была преувеличена.

Несомненно, следовало бы цитировать значительно больше работ, особенно в целях согласования цитологических доказательств с генетическими феноменами. Очень существенный вклад в бактериальную цитологию был сделан Ледербергом, Ледерберг, Зайндер (Seinder) и Ливли (Lively) (1951), которые наблюдали последовательную цитологическую разницу между клетками Escherichia coli, известными по генетическим обоснованиям как гаплоидные и диплоидные. У диплоидов ядра были крупнее и более «рассеянные», чем у гаплоидов, и хроматиновые структуры обычно были несомненно более сложными. Последовательно правильную классификацию плоидии следовало бы сделать цитологически, и двумя исследователями плоидия была предсказана цитологическим наблюдением и подтверждена генетически. Эти авторы были наиболее сдержанны в своих объяснениях цитологии. «Изученные до сих пор препараты не допускают каких-либо точных объяснений с позиций удвоения хромосом, и еще не исключено, что различия обусловлены принципиально лучшим расхождением и лучшей видимостью ядерной структуры в диплоидных клетках» (Ледерберг и др., 1951, стр. 426). «Определение, имеют ли диплоиды удвоенное количество, еще не

является предметом самостоятельного объективного подтверждения» (Ледерберг и Тэтум, 1953, стр. 173).

С обнаружением генетической рекомбинации у Bacillus megaterium [Чибалский, 1954; Иевербаум (Gaverbaum) и Хантер, цит. по ДеЛяматеру, 1953б] изучение бактериальной цитологии должно вступить в более точную и волнующую стадию.

ЛИТЕРАТУРА

Beutner E. H. (1953). The occurrence of mitosis in Bacillus megaterium and its relation to the growth cycle. J. Bact. *65*, 619.

Bisset K. A. (1953). Do bacteria have mitotic spindles, fusion tubes and mitochondria? J. gen. Microbiol. *8*, 50.

Blank H., McCarthy P. L. & DeLamater E. D. (1951). A non-vacuum freezing-dehydrating technic for histology, auto-radiography and microbial cytology. Stain Tech. *26*, 193.

Clifton C. E. & Ehrhard H.-B. (1952). Nuclear changes in living cells of a variant of Bacillus anthracis. J. Bact. *63*, 537.

DeLamater E. D. (1950). The nuclear cytology of the vegetative diplophase of saccharomyces cerevisiae. J. Bact. *60*, 321.

DeLamater E. D. (1951). A staining and dehydrating procedure for the handling of microorganisms. Stain Tech. *26*, 199.

DeLamater E. D. (1953а). Aspects of bacteria as cells and as organisms. Part II. Int. Rev. Cytol. *2*, 158.

DeLamater E. D. (1953б). Structure and division of the bacterial nucleus. Bacterial Cytology, Symp. 6th Congr. int. Microbiol., Rome, p. 108.

DeLamater E. D. (1953в). Cytologic evidence for the occurrence of cellular and nuclear fusion in Bacillus megaterium. Bull. Torrey bot. Cl. *80*, 289.

DeLamater E. D. (1954). Cytology of bacteria. Part II. The bacterial nucleus. Annu. Rev. Microbiol. *8*, 23.

DeLamater E. D. & Hunter M. E. (1951). Preliminary report of true mitosis in the vegetative cell of Bacillus megaterium. Amer. J. Bot. *38*, 659.

DeLamater E. D., Hunter M. E., Szybalski W. & Bryson V. (1955). Chemically induced aberrations of mitosis in bacteria. J. gen. Microbiol. *12*, 203.

DeLamater E. D. & Mudd S. (1951). The occurrence of mitosis in the vegetative phase of Bacillus megaterium. Exp. Cell Res. *2*, 499.

DeLamater E. D., Yaverbaum S. & Schwarc L. (1953). The nuclear cytology of Eremascus albus. Amer. J. Bot. *40*, 475.

Delaporte B. (1951). Observations on the cytology of bacteria. Advanc. Genet. *3*, 1.

Dienes L. (1946). Complex reproductive processes in bacteria. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. *11*, 51.

Dienes L. (1947). Further observations on the reproduction of bacilli from large bodies in Proteus cultures. Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., *66*, 97.

Dodge B. O., Singleton J. R. & Rolnick A. (1950). Studies on lethal E gene in Neurospora tetrasperma, including also chromosome counts in races of N. sitophila. Proc. Amer. phil. Soc. *94*, 38.

El-Ani A. S. (1954). The genetics of sex in Hypomyces solani f. cucurbitae. Amer. J. Bot. *41*, 110.

Emerson R. & Wilson C. M. (1954). Interspecific hybrids and the cytogenetics and cytotaxonomy of Euallomyces. Mycologia, *46*, 393.

Fincham J. R. S. (1949). Chromosome numbers in species of Neurospora. Ann. Bot., Lond., N. S., *13*, 23.

Fitz-James P. C. (1954). The duplication of bacterial chromatin. J. Bact. *68*, 464.

Fraser H. C. I. (1908). Contributions to the cytology of Humaria rutilans Fries. Ann. Bot., Lond., *22*, 35.
Gwynne-Vaughan H. C. I. (1937). Contributions to the study of Lachnea melaloma. Ann. Bot., Lond., N. S., *1*, 99.
Gwynne-Vaughan H. C. I. & Williamson H. S. (1931). Contributions to the study of Pyronema confluens. Ann. Bot., Lond., *45*, 355.
Gwynne-Vaughan H. C. I. & Williamson H. S. (1932). The cytology and development of Ascobolus magnificus. Ann. Bot., Lond., *46*, 653.
Hansen H. N. & Snyder W. C. (1946). Inheritance of sex in fungi. Proc. nat. Acad. Sci., Wash., *32*, 272.
Hirsch H. E. (1949). The cytogenetics of sex in Hypomyces solani f. cucurbitae. Amer. J. Bot. *36*, 113.
Hirsch H. E. (1950). No brachymeiosis in Pyronema confluens. Mycologia, *42*, 301.
Hughes A. F. (1952). The mitotic cycle. London: Butterworth.
Hutchinson W. G. & Stempen H. (1954). Sex in bacteria — evidence from morphology. In Sex in Microorganisms, ed. Wenrich D. H., Lewis I F. & Raper J. R., Washington: Amer. Ass. Advanc. Sci.
Kellenberger E. (1953). Les formes caractéristiques des nucléoides de E. coli et leurs transformations dues à l'action d'agents mutagènes-inducteurs et de bactériophages. Bacterial Cytology, Symp. 6th Congr. int. Microbiol., Rome, p. 45.
Klieneberger-Nobel E. (1951). The L-cycle: a process of regeneration in bacteria. J. gen. Microbiol. *5*, 525.
Lark K. G., Maaløe O. & Rostock O. (1955). Cytological studies of nuclear division in Salmonella typhimurium. J. gen. Microbiol. *13*, 318.
Latarjet R. & Ephrussi B. (1949) Courbes de survie de levures haploides et diploides soumises aux rayons X. C. R. Acad. Sci., Paris, *229*, 306.
Lederberg J., Lederberg E. M., Zinder N. D. & Lively E. R. (1951). Recombination analysis of bacterial heredity. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. *16*, 413.
Lederberg J. & Tatum E. L. (1953). Sex in bacteria — genetic studies, 1945—1952. Science, *118*, 169.
Leitz K. (1951). Beitrag zur Hefecytologie. Arch. Mikrobiol. *16*, 275.
Levan A. (1938). The effect of colchicine on root mitoses in Allium. Hereditas, Lund, *24*, 471.
Levan A. (1947). Studies on the camphor reaction of yeast. Hereditas, Lund, *33*, 457.
Lindegren C. C. (1942). Nuclear apparatus and sexual mechanism in a micrococcus. Iowa St. Coll. J. Sci. *16*, 307.
Lindegren C. C. (1949). The Yeast Cell, its Genetics and Cytology. St Louis: Educational Publishers.
Lindegren C. C. & Lindegren (1951). Tetraploid Saccharomyces. J. gen. Microbiol. *5*, 885.
Maaløe O. & Lark K. G. (1954). A study of bacterial populations in which nuclear and cellular divisions are induced by means of temperature shifts. In Recent Developments in Cell Physiology. Editor, J. A. Kitching. London: Butterworth.
McClintock B. (1945). Neurospora. I. Preliminary observations of the chromosomes of Neurospora crassa. Amer. J. Bot. *32*, 671.
McClintock B. (1954). Chromosome aberrations in Neurospora. Yearb. Carneg. Inst. *53*, 257.
Martens P. (1946). Cycle de développement et sexualité des ascomycètes — essai critique. Cellule, *50*, 123.
Mundcur B. D. (1954). The nucleus of Saccharomyces: a cytological study of a frozen-dried polyploid series. J. Bact. *68*, 514.
Ogur M. (1954). Respiration in a polyploid series in Saccharomyces. Arch. Biochem. *53*, 484.

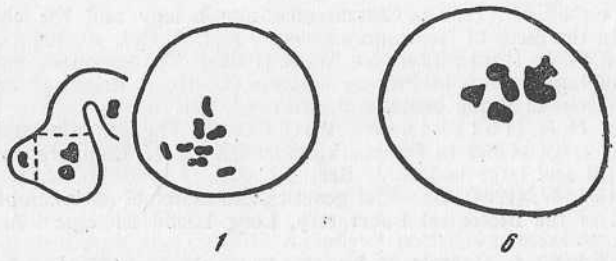
Ogur M. (1955). The rapid estimation of ploidi in cultures of Saccharomyces. J. Bact. *69*, 159.
Ogur M., Minckler S., Lindegren G. & Lindegren C. C. (1952). The nucleic acids in a polyploid series of Saccharomyces. Arch. Biochem. *40*, 175.
Olive L. S. (1949a). Karyogamy and meiosis in the rust Coleosporium veroniae. Amer. J. Bot. *36*, 41.
Olive L. S. (1949б). Cytological evidence opposing the theory of brachymeiosis in the ascomycetes. Science, *110*, 185.
Olive L. S. (1950). A cytological study of ascus development in Patella melaloma (Alb. & Schw.) Seaver. Amer. J. Bot. *37*, 757.
Olive L. S. (1953). The structure and behaviour of fungus nuclei. Bot. Rev. *19*, 439.
Painter T. S. & Reindorp E. C. (1939). Endomitosis in the nurse cells of the ovary in Drosophila melanogaster. Chromosoma, *1*, 276.
Pomper S. (1952). Isolation of triploid Saccharomyces cerevisiae. Nature, Lond., *170*, 892.
Pomper S. & Burkholder P. R. (1949). Studies on the biochemical genetics of yeast. Proc. nat. Acad. Sci., Wash., *35*, 456.
Pomper S., Daniels K. M. & McKee D. W. (1954). Genetic analisis of polyploid yeast. Genetics, *39*, 343.
Pontecorvo G. (1953). The genetics of Aspergillus nidulans. Advanc. Genet. *5*, 141.
Pontecorvo G. (1954). Mitotic recombination in the genetic systems of filamentous fungi. Proc. 9th Int. Congr. Genet. (Caryologia, suppl.), p. 192.
Robinow C. F. (1945). Nuclear apparatus and cell structure of rod-shaped bacteria. In Dubos, R. J. The Bacterial Cell. Cambridge, Mass: Harvard University Press.
Robinow C. F. (1953). Observations on the nucleus of resting and germinating spores of Bacillus megaterium. J. Bact. *65*, 378.
Roman H., Hawthorne D. C. & Douglas H. C. (1951). Polyploidy in yeast and its bearing on the occurrence of irregular genetic ratios. Proc. nat. Acad. Sci., Wash., *37*, 79.
Roper J. A. (1952). Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. Experientia, *8*, 14.
Singleton J. R. (1953). Chromosome morphology and the chromosome cycle in the ascus of Neurospora crassa. Amer. J. Bot. *40*, 124.
Stempen H. & Hutchinson W. G. (1951a). The formation and development of large bodies in Proteus vulgaris OX-19. I. Bright phase contrast observations of living bacteria. J. Bact. *61*, 321.
Stempen H. & Hutchinson W. G. (1951б). The formation and development of large bodies in Proteus vulgaris OX-19. II. Comparative cytology of bacilli and large bodies. J. Bact. *61*, 337.
Szybalski W. (1954). Bacterial genetics and action of antimicrobial agents. Report of the Biological Laboratory, Long Island Biological Association, *64*, 27.
Szybalski W. & Hunter-Szybalska M. E. (1955). Synchronisation of nuclear and cellular division in Bacillus megaterium. Communication to the 1955 Meeting of the Soc. of Amer. Bacteriologists (Bact. Proc., p. 36).
Thomas P. T. (1936). Genotypic control of chromosome size. Nature, Lond., *138*, 402.
Tulasne R. (1953). Le cycle L et les formes naines des bactéries. Bact. Cytology, Symp. 6th Congr. int. Microbiol., Rome, p. 144.
Walker P. M. B. & Yates H. B. (1952). Nuclear components of dividing cells. Proc. roy. Soc. B, *140*, 274.
Webb R. B. & Clark J. B. (1954). Cell division in Micrococcus pyogenes var. aureus. J. Bact. *67*, 94.
White M. J. D. (1954). Animal Cytology and Evolution, 2nd ed. Cambridge: University Press.

Widra A. & DeLamater E. D. (1955). The cytology of meiosis in Schizosaccharomyces octosporus. Amer. J. Bot. *42*, 423.
Wilson C. M. (1952). Meiosis in Allomyces. Bull. Torrey bot. Cl. *79*. 139.
Wilson I. M. (1937). A contribution to the study of the nuclei of Peziza rutilans Fries. Ann. Bot., Lond., N. S., *1*, 655.
Wilson I. M. (1952). The ascogenous hyphae of Pyronema confluens. Ann. Bot., Lond., N. S., *16*, 321.
Winge Ö. (1951). The relation between yeast cytology and genetics. A critique. C. R. Lab. Carlsberg, ser. Physiol., *25*, 85.
Winge Ö. & Roberts C. (1954). Causes of deviations from 2:2 segregations in the tetrads of monohybrid yeasts. C. R. Lab. Carlsberg, ser. Physiol., *25*, 285.
Wood J. L. (1953). A cytological study of ascus development in Ascobolus magnificus Dodge. Bull. Torrey bot. Cl. *80*, 1.

Таблица 1. Микрофотографии все в увеличении в 2250 раз раздавленного содержимого перитекий. Фиксация в растворе 1 : 3 уксуснокислого спирта, гидролиз в течение 5 минут при температуре 60° в NHCl, окраска в уксуснокислом орцеине.

1—3 — Дикий тип гаплоида Aspergillus nidulans.

1а — аск первоначально с двумя ядрами перед слиянием;
б — аск с слившимся ядром в очень ранней профазе;
с — аск с 8 унивалентами (диакинез?) (ср. схему внизу).
2а — аск с ядром в ранней мейотической профазе;
б — поздняя первая анафаза, показывающая «стебельчатое тело», а в нижней группе хромосом — явление, напоминающее только две хромосомы.
3. Два аска в диакинезе, показывающие 4 бивалента. *а* — ранняя мейотическая профаза.
4—6. Диплоидный штамм.
4. Первая метафаза, показывающая 4 бивалента.
5. Первая метафаза с несомненными 3 бивалентами и 2 унивалентами.
6. Первая метафаза сложного вида, но объясняемая как 4 бивалента (ср. схему внизу).



Объяснительные рисунки микрофотографий к табл. 1, *1—6*.

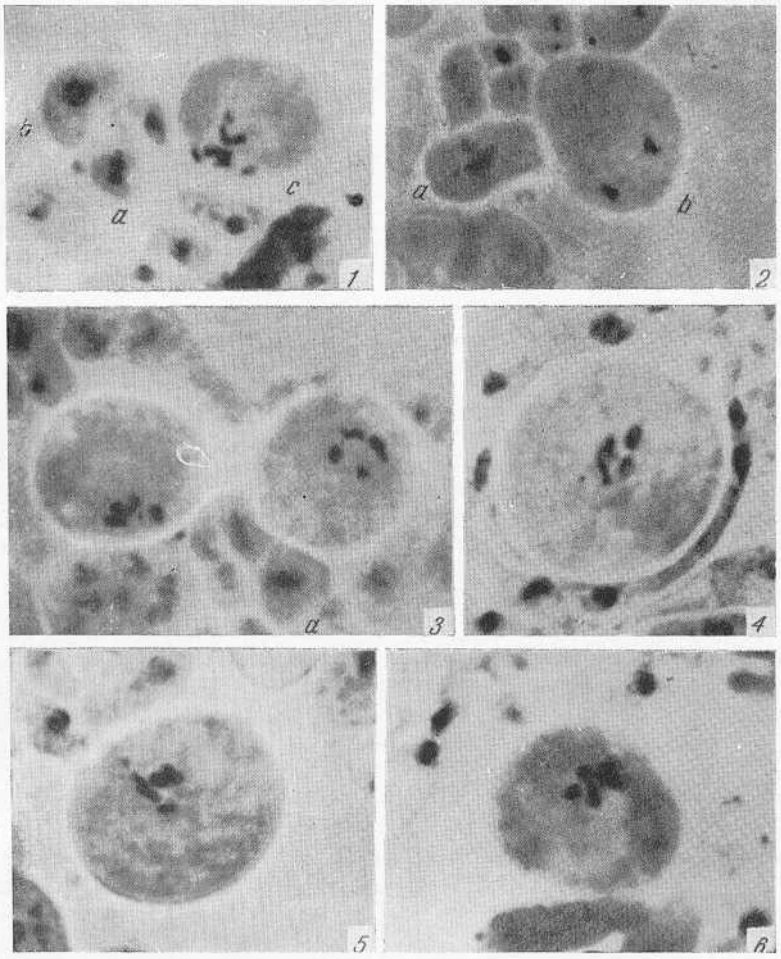


Таблица I.

ПОСТРОЕНИЕ ЦИТОПЛАЗМЫ БАКТЕРИЙ

ДЖ. Р. ДЖ. БРЕДФИЛД

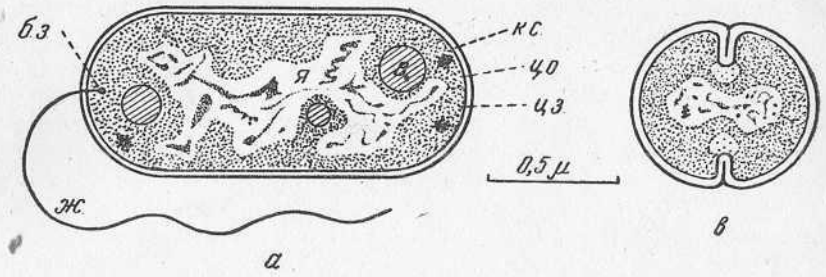
Кавендиш-лаборатория, Кембридж

В последнее время при изучении строения бактериальной цитоплазмы применялись три основных метода: а) наблюдения в оптическом микроскопе при помощи фазового контраста, ультрафиолетового света или в соединении с окраской метахроматиновых веществ и окислительных энзимов; б) механическое и химическое разрушение, сопровождаемое дифференцированным центрифугированием и биохимическим анализом отдельных фракций; в) электронно-микроскопическое изучение, в частности в ультратонких срезах.

Работы в нашей лаборатории были большей частью связаны с последним методом, но в последующем изложении будет сделана попытка сопоставить результаты всех трех направлений исследования. Ограниченный размер статьи, к сожалению, затрудняет упоминание о многочисленных современных данных и допускает лишь краткое их изложение. Материал, подлежащий обсуждению, наиболее удобно разделить на три основные части: а) материалы и методы, примененные в описываемых здесь оригинальных исследованиях; б) детальные соображения о структурах, о существовании которых в бактериальной протоплазме имеются прямые указания; в) структуры, имеющие значение в цитоплазме животных и растительных клеток, но пока еще не выявленные с несомненностью у бактерий.

МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И ОБЩАЯ СХЕМА БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Виды, из которых я приготовлял срезы, следующие: Staphylococcus aureus (Оксфордский штамм), Streptococcus lactis, паракишечная палочка D201H, Aerobacter aerogenes, Azotobacter vinelandii и Spirillum serpens. Дополнительно доктора Глауерт



а — схема идеального продольного среза через одножгутиковую бациллу, показывающая клеточную стенку *(к с)*, цитоплазматическую оболочку *(ц о)*, цитоплазматические зерна в 100—200 Å *(ц з)*, базальное зерно *(б з)* жгутика *(ж)*, волютиновые зерна *(в)* и ветвящееся ядро *(я)* без ядерной оболочки. Цитоплазматические зерна показаны обладающими различной плотностью, как это наблюдается на срезах. Основное вещество цитоплазмы между зернами не обозначено и не рассматривается здесь, так как, хотя оно, вероятно, содержит важные химические составные части, такие как растворенные энзимы, ничего определенного нельзя добавить к обзору, данному Найзи (1951). Показаны лишь наиболее часто встречающиеся включения; *b* — схема идеального продольного среза через делящийся кокк. Клеточная стенка и цитоплазматическая оболочка та же, что и у бациллы, и обе представлены во врастающей перегородке. Около внутреннего края последней имеется специализированная зона цитоплазмы. Остальная часть цитоплазмы состоит из достаточно равномерно расположенных зерен диаметром 100—200 Å, окружающих центральное ядро. У кокка неделящееся ядро кажется более близким к шаровидной форме, чем у бациллы. Во время деления у кокка ядро становится гантелеобразным, как показано на рисунке, но хроматин остается почти равномерно распределенным в нем и не кажется заметно более волокнистым, чем в неделящемся ядре (хотя осмиева кислота может сохранить строение ядра менее удовлетворительно, чем строение цитоплазмы). Не показаны центриоли или веретена, поскольку ничего такого, что можно было бы представить как таковые, до сих пор автором у бактерий обнаружено не было.

(Glauert) и Бриджер (Brieger) любезно предоставили в мое распоряжение свои многочисленные электронные микрофотограммы тонких срезов Mycobacterium phlei, а доктор Косслетт (Cosslett)— ее электронные микрограммы тонких срезов Chromobacter prodigiosum. Эти организмы были фиксированы в течение различного времени в 1% растворе осмиевой кислоты, забуференной до pH 7,2—7,4 уксуснокислым вероналом, как это рекомендовано Паладом (Palade, 1952), быстро промыты дистиллированной водой, обезвожены в восходящих концентрациях этилового спирта и пропитаны метакрилатом (чистый бутил-метакрилат или смесь трех частей бутил-метакрилата и одной части метил-метакрилата). В опытах с золотистым стафилококком было проверено действие хлористого натрия, прибавленного к фиксатору и к промывной жидкости, а в опытах с азотобактером фиксатор содержал такую же концентрацию сахарозы (2%), которая имелась в культуральной среде.

Знакомые с цитологией бактерий несомненно далеки от намерения изобразить «типичную» бактериальную клетку, очевидно не существующую. Тем не менее для удобства последующего изложения мы даем схематические срезы через воображаемую бактерию и воображаемого кокка, показывающие некоторые из структур, которыми они, вероятно, обладают (рис. 1). Кокк показан в состоянии деления.

Выдающаяся перспектива электронномикроскопических наблюдений в настоящее время заключается в том, что они подтверждают в общем плане (хотя и не в более детальных построениях) замечательное сходство бактерий с простейшими животными и растительными клетками. Все эти клетки имеют более или менее центрально расположенное ядро, содержащее бóльшую часть, если не всю, бактериальной деоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и окруженное цитоплазмой, обладающей специализированным поверхностным слоем или клеточной оболочкой. До настоящего времени у бактерий не была обнаружена ядерная оболочка; ядро у них часто имеет очень неправильную форму, разветвляясь в цитоплазме. Силы, обеспечивающие сохранение ядра как отдельной структуры, отграниченной от цитоплазмы, неизвестны. Зачастую у бактерий, таких как молодые паракишечные палочки [Бредфилд (Bradfield), 1954, рис. 6], оно как будто заполняет бóльшую часть клетки (соотношение ядра к цитоплазме равно 1 : 2) так, что цитоплазма ограничена в виде тонкого коркового слоя. У кокков, однако, ядро, как правило, относительно меньших размеров (рис. 1, *б*) и отношение ядра к цитоплазме редко превышает 1:10. В ядре часто видна выраженная волокнистая структура (табл. 1, *1*). В противоположность ядру цитоплазма выявляет малозаметное строение, если не считать многочисленных мелких зерен (рис. 1, *а, б;* табл. 1, *1б*) и иногда обнаруживающихся крупных волютиновых зерен. Такое положение вещей имеет склонность к изменению во время приготовления гомогенатов для биохимической обработки, так как обращающие на себя внимание ядерные волокнистые структуры довольно лабильны (их ДНК, будучи склонной к легкой деполимеризации, находится в зависимости от определенной степени концентрации соли в жидкости гомогената), тогда как цитоплазматические зерна очень устойчивы и могут быть очищены при помощи дифференцированного центрифугирования. Клеточные оболочки содержат по меньшей мере два слоя — наружный, клеточную стенку, имеющую механическое значение, и внутренний, цитоплазматическую оболочку, имеющую осмотическое значение. При делении клетки они растут в направлении к центру клетки после удлинения ядра и расщепления его на два (Бредфилд, 1956) без, насколько это можно обнаружить в настоящее время, какого-либо подобия митоза. Многие бациллы несут жгутики, базальные зерна которых погружены в цитоплазму, кнутри от клеточной стенки и плазматической оболочки. Заслуживает упоминания отсутствие в цитоплазме бактерий, срезы которых были сделаны до настоящего времени, эндоплазматической сетки и митохондрий, являющихся главными характерными особенностями цитоплазмы животных и растительных клеток.

Основные группы цитоплазматических структур рассматриваются в одном из последующих разделов.

СТРУКТУРЫ, СУЩЕСТВОВАНИЕ КОТОРЫХ У БАКТЕРИЙ УСТАНОВЛЕНО

1) *Мелкие зерна 100—200 Å в диаметре*

Все исследования в нашей лаборатории (Бредфилд, 1954, 1956) указывают, что основная часть протоплазмы у каждого изучавшегося вида состоит из мелких зерен, имеющих около 100—200 Å в диаметре. У золотистого стафилококка (табл. 1, *1*), например, зерна очень заметны, и мы никогда не видели более ясно выраженной цитоплазматической структуры (кроме вакуолей, описанных ниже в разделе 4). Зерна особенно заметны у кокков, подвергающихся лизису (табл. 1, *1 в*), как и волокнистое строение ядерного содержимого. У Aerobacter aerogenes цитоплазматические зерна также очень заметны и часто наполняют весь цитоплазматический ободок на срезах (табл. 1, *2*). У паракишечной палочки D201H, Spirillum serpens и Azotobacter vinelandii также может быть определена обильная зернистость такого же размера (табл. 1 и 2, *3*, *4*, *5*), хотя у этих трех видов мы иногда видели значительные массы, которые в некоторых случаях могли распадаться на скопления зерен диаметром 100—200 Å, а в некоторых случаях не распадались. Срезы Spirillum serpens труднее объяснимы, так как они имеют очень плохо различимые ядерные зоны и содержат мелкие неправильные аморфные массы размером в среднем около 500 Å; однако о качестве фиксации очень хорошо судить по целостности клеточной стенки и цитоплазматической оболочки и по факту, что ни та, ни другая не отделены искусственно от цитоплазмы вследствие сморщивания или разбухания, что мы находили в других случаях как чувствительный индикатор повреждения. У паракишечной палочки крупные тела встречаются редко и преимущественно на полюсах. Во многих случаях они могут распадаться на скопления более мелких зерен; являются ли эти скопления естественными или искусственными, мы не можем сказать. Только у паракишечной палочки мы произвели удовлетворительные сравнения между молодыми (6 часов роста на скошенном агаре) и старыми (произраставшими 2—3 недели на скошенном агаре) организмами. Цитоплазматические зерна старых организмов (табл. 1, *3*) выглядят заметно крупнее (в среднем 300 Å), чем зерна более молодых организмов (в среднем 200 Å) при идентичных условиях фиксации заливки. Цитоплазма у старых бактерий также составляет более значительную составную часть объема клетки, чем у молодых организмов (Бредфилд, 1954).

Сходная зернистая цитоплазма может быть обнаружена в срезах Bacillus cereus, снимки которых опубликованы Чепменом (Chapman) и Хилльe (Hillier) (1953), Escherichia coli [Бирч-Андерсен, Маалое и Сьострaнд (Birch-Andersen, Maaløe, Sjöstrand), 1953], на многих электронограммах срезов Mycobacterium phlei,

приготовленных Глуертом и Бриджером (не опубликовано) и на срезах Chromobacterium prodigiosum, приготовленных Косслеттом (не опубликовано). Наиболее трудны для изучения срезы микобактерий вследствие частого наличия волютиновых зерен и завитков ядра; но во всяком случае ясно, что здесь, как и на срезах всех других бактерий, виденных автором, бóльшая часть цитоплазмы состоит из зерен размером 100—200 Å.

В большинстве исследований, произведенных в нашей лаборатории, в качестве фиксатора применяли 1% раствор осмиевой кислоты, забуференный до pH 7,2—7,4 уксуснокислым вероналом, предложенный Паладом и найденный превосходным для сохранения цитоплазматической структуры (но не обязательно ядерной) в животных клетках. Однако цитоплазматические зерна приблизительно тех же размеров, что и зерна, найденные после фиксации осмием, выявляются отчетливо у золотистого стафилококка после фиксации в забуференном 4% растворе формальдегида, так что зерна не представляют собой частицы осмия или осмиевых соединений.

Дальнейшие доказательства реальности цитоплазматических зерен диаметром 100—200 Å были получены после анализа при помощи ультрацентрифугирования бактериальных гомогенатов. Шахман, Парди и Станье (Schachman, Pardee, Stanier, 1952) нашли, что гомогенаты Escherichia coli, золотистого стафилококка, Clostridium kluyveri и Pseudomonas fluorescens содержат три основных макромолекулярных компонента с константами осаждения около 40, 29 и 5 единиц Сведберга. Преимущественно те же фракции были найдены Вейбуллом (Weibull, 1953в) у Bacillus megaterium. Кроме того, Шахман и др. нашли, что зерна 40 S содержат много бактериальной рибонуклеиновой кислоты (РНК); сходные результаты были получены Вейбуллом, сопоставлявшим извлеченную РНК с вычисленным соотношением к проценту зерен, выпавших после различных сроков центрифугирования. Шахман и др. получили электронные микрограммы зерен 40 S и нашли, что они являются грубо шарообразными и обладают в среднем диаметром 150 Å, так что оказываются соответствующими зернам, обнаруженным на срезах. Эти авторы также ссылаются на работу Севага, Смоленса и Стерна (Sevag, Smolens, Stern, 1941) по Streptococcus pyogenes, содержащую выполненную Андерсеном раннюю электронограмму, в которой обнаруживаются мелкие плотные частицы постоянного диаметра, напоминающие размерами те, которые были найдены на срезах в цитоплазме кокков. Вполне вероятно, что особенно у таких бактерий, как кокки, у которых эти зерна образуют почти всю внутреннюю массу цитоплазмы (табл. 1, *1 b*), они содержат бóльшую часть обильной РНК, имеющейся в растущих бактериях. В электронномикроскопических исследованиях взвесей зерен диаметром 100—200 Å, приготовленных доктором Тиссьером (Tissières) из Aerobacter и Azotobacter, мы наблюдали не только

изолированные зерна, но также многочисленные скопления, содержащие каждое 10—20 зерен. Во время последовательного центрифугирования, как в опытах Вейбулла, эти скопления осаждаются быстрее, чем изолированные зерна, и, вероятно, поэтому на ранних этапах центрифугирования Вейбулл нашел больше осажденной РНК, чем можно было бы ожидать, если бы взвеси содержали только единичные зерна.

При изучении энзимов во фракциях зерен Тиссьер (1952, 1954 и неопубликованная работа) нашел, что бесклеточные взвеси отмытых цитоплазматических зерен диаметром 100—200 Å Aerobacter aerogenes и Azotobacter vinelandii содержат бóльшую часть сукциноксидазной активности этих организмов, включая по крайней мере два из цитохромов, найденных в целых клетках. Зерна, полученные из Azotobacter, могут окислять также фумарат, и при добавлении конечной надосадочной жидкости отмытые частицы обоих организмов могут выполнять многочисленные стадии цикла Кребса. К тому же Тиссьер и Слейтер (Slater) (1955) показали, что отмытые частицы Azotobacter осуществляют окислительное фосфорилирование (с сукцинатом, но не с фумаратом; отношение P:O = около 0,2). Неотмытые частицы дают большую этерификацию фосфата (отношение P:O = 0,8), так что в них должны быть энзимы или ко-факторы, способные достаточно стойко сопротивляться длительному приготовлению, но достаточно свободные для того, чтобы быть удаленными одним отмыванием (в 0,05 М фосфате pH 7). Добавление надосадочной жидкости вызывает более чем просто добавочное повышение как окислительного действия, так и этерификации фосфата. Дальнейшие доказательства наличия окислительных энзимных систем в цитоплазматических зернах диаметром 100—200 Å были опубликованы Станье, И. Ганзалус (Gunsalus) и К. Ганзалус (1953), Байллен (Billen) и Волкин (Volkin) (1954) и Рипеском (Repasce) (1954).

К сожалению, в настоящее время невозможно ответить на многочисленные вопросы, возникающие на данном этапе, например: а) сосредоточены ли РНК и сукциноксидаза в одних и тех же или различных частицах? б) имеются ли несколько сортов ферментативно отличающихся частиц? в) существует ли в их пределах непрерывный ряд размеров частиц с частотой пиков, соответствующей пикам при ультрацентрифугировании, или имеются лишь немногие точно определенные размеры? г) являются ли частицы саморепродуцирующимися или каждая развивается из более мелкого тела, образующегося где-то в клетке, возможно, в ядре? Факт, что фракция 40 S, содержащая бóльшую часть РНК и сукциноксидазы, хорошо определяется при ультрацентрифугировании, свидетельствует о том, что оба вещества присутствуют в одном и том же зерне. Во всяком случае ясно, что эти два вещества, даже если они расположены в различных зернах, находятся в тесной связи, в отличие от того, что имеет место в животных клетках, где оба сорта зерен оказываются

сосредоточенными на специальных оболочках — окислительные зерна на оболочках [внутренней и (или) наружной] митохондрий, а зерна РНК — на оболочках эндоплазматической сетки.

Подсчет гипотетического количества белковых молекул в каждом зерне решительно указывает, что должно быть несколько ферментативно различных сортов зерен. Принимая, что специфическая тяжесть равна 1,2, что белок составляет свыше 50% сухого веса и что последний составляет $^1/_3$ веса во влажном состоянии, зерно, имеющее в диаметре 200 Å, должно содержать около 14 молекул белка молекулярного веса 35 000. Эта цифра может быть достаточна для обеспечения набора молекул, составляющего бактериальную сукциноксидазную систему, но она с трудом включает вторую систему и была бы недостаточна даже для одного набора энзима и несущих молекул, составляющих цикл Кребса. Конечно, имеется значительное допущение в данных, выбранных для подобного вычисления, но даже принимая наличие 100% белка, зерно должно содержать лишь около 28 молекул данного молекулярного веса. Это решительно указывает на то, что имеются многочисленные, энзиматически различные типы зерен. Общее количество зерен диаметром 200 Å у бактерии 2 μ длиной и 1 μ шириной с отношением ядра к цитоплазме, равным 1:2, и принимая, что половина ее цитоплазмы состоит из зерен, должно быть около 10^5. Для кокка диаметром 0,5 μ с ядром, занимающим одну десятую объема клетки, и опять-таки принимая, что половина цитоплазмы состоит из зерен диаметром 200 Å, можно предположить наличие всего около 7×10^3 зерен.

Что касается колебания размера и способа возникновения зерен, анализ РНК, проведенный Байлленом и Волкиным (1954) для Escherichia coli B/r, находится в соответствии с неокасперсоновским взглядом [Касперсон (Caspersson), 1950] о мелких, богатых РНК частицах (возникающих из ядра), вырастающих путем образования или накопления энзимных белков, давая характерную вполне развившуюся величину, представленную 40 S-компонентом. Независимо от того, растут или нет частицы таким путем, результаты, полученные Рипеском (1954), вероятно, указывают, что они могут быть раздроблены ультразвуком на более мелкие кусочки с образованием растворимой сукциндегидрогеназы. Вайллен и Волкин нашли также, что в условиях их опытов грубые частицы обладают в 3 раза большей сукциноксидазной активностью, чем мелкие частицы, но что лишь последние могут синтезировать АТФ. Упомянутые зерна заметно отличаются как химически, так и по величине — грубые зерна не просто скопления мелких, как полагали раньше. Но д-р Тиссьер сообщил мне, что отмывание (по-видимому, посредством удаления ингибиторов) может значительно увеличить QO_2-фракции таких мелких частиц, так что наблюдающаяся разница могла не зависеть от разницы в действительном содержании энзима.

И возможно, что АТФ-синтезирующая способность фракции грубых частиц могла быть нейтрализованной неспецифическими фосфатазами, находящимися в оболочке клетки, фрагменты которой эта фракция несомненно должна содержать. Станье и др. (1953) нашли сходную энзиматическую активность [дегидрогеназы для L-фенилгликолевой (L-манделиковой), яблочной и янтарной кислот] как в грубых, так и в мелких частицах, полученных из Pseudomonas fluorescens, но так как их грубая фракция была выделена только при 22 000 g, кажется вероятным, что нежная фракция состояла главным образом из зерен диаметром 100—200 Å, а не из более мелких зерен, как они указывают. Они установили, что электронномикроскопическое исследование выявляет в их фракции грубых частиц частицы 100—1000 Å в диаметре, но, судя по нашим собственным исследованиям, мы должны полагать, что многие из крупных частиц состоят из скоплений зерен диаметром 100—200 Å. Однако мы не изучали этот организм, и вопрос должен остаться открытым в ожидании более подробного электронномикроскопического исследования.

Судя по размеру и содержанию ядра, «клеточные зерна», приготовленные из термофильный бактерий Джорджи (Georgi), Миллитцером (Millitzer), Бернсом (Burnes) и Хеотис (Heotis) (1951), представляются очень сходными с целыми протопластами.

Изучение широко распространенных цитоплазматических зерен порядка 100—200 Å только еще начато, и, к несчастью, одна возможность решения вопроса — наблюдение в оптическом микроскопе живых и окрашенных клеток — недоступна в силу его ограниченной разрешающей способности. Но имеется уже значительное соответствие между результатами электронномикроскопического исследования и данных ультрацентрифугирования, и последующая корреляция энзиматической активности фракций с их микроскопическим видом должна оказаться интересной, в частности, если возможно четко различать энзимную активность зерен и энзимную активность (если таковая существует) клеточной стенки и цитоплазматической оболочки. Последнее, однако, кажется трудно определяемым, поскольку представляется чрезвычайно вероятным, что «тень», полученная при лизисе протопласта, содержит не только цитоплазматическую оболочку, но также скопления 100—200 Å зерен, плотно приставших к ней, а цитоплазматическая оболочка выглядит (на срезах) настолько истонченной, что полное ее отделение от этих мелких зерен — не легкое дело.

2) *Волютиновые зерна*

Этот объект составляет один из наименее спорных разделов бактериальной цитологии, так как в настоящее время ясно, что существует обычный компонент бактериальной цитоплазмы, часто

называемый волютином, который обладает следующими свойствами: а) он встречается в форме почти совершенно ровно очерченных, почти круглых зерен, достигающих около 0,6 μ в диаметре; б) он окрашивается метахроматически различными красками или по Нейссеру смесью метиленовой синьки (или кристалвиолета) и бисмарк-браун и окрашивается при более низком pH, чем большинство других составных частей клетки; в) он является наиболее плотным для электронного потока веществом, обычно встречающимся в бактериальных клетках (в действительности в культурах многих видов при подходящих условиях он оказывается наиболее легко бросающимся в глаза компонентом) и при интенсивной бомбардировке электронами он адсорбирует так много энергии, что иногда улетучивается или разрушается, оставляя пустую оболочку; г) он содержит значительное количество полиметафосфата и, вероятно, других фосфорных соединений.

Кениг и Винклер (König, Winkler, 1948) показали, что классические метахроматические зерна Corynebacterium diphtheriae идентичны плотным для электронного потока зернам тех же организмов. Шмагер и Клудас (Schmager, Kludas, 1951) при своих фазово-контрастных исследованиях живых C. diphtheriae, по-видимому, наблюдали метахроматические зерна, что свидетельствует о том, что последние — подлинные структуры, а не артефакты. Дальнейшим доказательством реальности метахроматических зерен является тот факт, что они ясно видны на многих неопубликованных срезах микобактерий, выполненных Глауертом и Бриджером, и на наших собственных срезах Aerobacter, фиксированных в лучшем цитоплазматическом фиксаторе, известном в настоящее время (забуференный раствор осмиевой кислоты). Несомненно, в некоторых срезах имеют место артефакты, но они не касаются образования de novo крупных, резко ограниченных, шаровидных зерен, достигающих 0,5 μ в диаметре. Глауерт и Бриджер (1955), фотографируя одни и те же экземпляры сначала в оптическом микроскопе, после обработки по Нейссеру, а затем в электронном микроскопе, дали дальнейшие ясные доказательства, что метахроматические зерна и есть плотные для электронного потока тела. Они не отметили заметного снижения плотности после обработки рибонуклеазой в противоположность Р. Минку и А. Минку (R. Minck, A. Minck, 1949), работавшим с C. diphtheriae. По мнению авторов, нет оснований для взгляда, что метахроматические зерна являются митохондриями или стоят в связи с митохондриями [Мадд (Mudd), 1953, 1954], но этот вопрос будет обсуждаться ниже. Несомненно, Глауерт и Бриджер не нашли у M. phlei ясной связи между предполагаемой локализацией окислительно-восстановительных процессов (соли тетразола и янус зеленый B) и истинным положением плотных для электронного потока зерен. Это не удалось и Смиту, Уилкинсону и Дагиду (Smith, Wilkinson, Duguid, 1954), полу-

чившим непостоянный результат при применении тех же реактивов при исследовании Aerobacter и констатировавшим следующее: «Обычно лишь меньшинство клеток содержит окрашенные зерна и они не соответствуют по количеству, размеру или положению волютиновым зернам». Эти авторы приводят обширные данные относительно образования волютиновых зерен при широко варьирующихся условиях культивирования, обнаружив среди других фактов, что они появляются при недостатке азота или серы, но не при недостатке углерода, фосфора или калия. Они выявили строгий параллелизм между содержанием полиметафосфата и обилием волютиновых зерен, но рассчитали, что волютин может составлять по меньшей мере 20% объема клетки, тогда как полиметафосфат составляет лишь 1% сухого веса ее; это подчеркивает, что волютин содержит многое, помимо метафосфата.

Таким образом, достигнута, по-видимому, достаточно убедительная корреляция между метахроматическими волютиновыми зернами при исследовании в оптическом микроскопе окрашенных препаратов и крупными непрозрачными зернами, видимыми в электронном микроскопе. Остается изолировать и исследовать более или менее чистые волютиновые зерна при помощи дифференцированного центрифугирования (что, вероятно, не слишком трудно) соответствующих, богатых волютином исходных культур, приготовленных, например, с учетом данных Смита и др.

3) *Базальные зерна жгутиков*

Бактериальный жгутик — длинный нитевидный отросток, часто 3—4 μ длины и около 100 Å ширины, постоянной толщины на протяжении большей части своей длины. Во многих случаях было четко показано, что жгутик проходит своим проксимальным концом через клеточную стенку и цитоплазматическую оболочку, заканчиваясь маленьким базальным зерном, имеющим в диаметре около 400 Å. Многие превосходные электронные микрографии, показывающие эти образования, были опубликованы ван Итерсоном (van Iterson, 1953) и факт, что бактериальный жгутик берет свое начало внутри цитоплазмы, был подтвержден недавней работой по бактериальным протопластам (Вейбулл, 1953б), в которой у Bacillus megaterium, например, жгутики остаются прочно прикрепленными внутри протопласта после удаления клеточной стенки при помощи лизоцима. Мало что известно относительно функции, строения и происхождения основного зерна бактериальных жгутиков, хотя в общем предполагается, что, как и базальные зерна ресничек животных клеток, эти бактериальные зерна некоторым образом регулируют активность жгутиков, к которым они прикреплены. Каких-либо субструктур, сравнимых с таковыми, обнаруженными у ресничек

животных клеток (Бредфилд, 1955), до сих пор в базальных зернах и базальной части жгутика некоторых бактерий, изучавшихся в нашей лаборатории, выявлено не было (в работе с бактериями, не подвергавшимися срезам; пока еще не удалось обнаружить базальные зерна в срезах). Во всех группах, исследованных нами (бациллы, спириллы, спирохеты), жгутики являются значительно более резистентными к триптическому перевариванию, чем цитоплазма вообще; это же верно и в отношении базальных зерен, которые, например у Spirillum serpens, остаются хорошо заметными, хотя возможно и уменьшаются в размере после 3-часового переваривания. У этого вида имеется набор базальных зерен в основании каждого из двух полярных пучков жгутиков, образующих очень широкий, слившийся комок на каждом конце организма. Во время триптического переваривания протоплазма значительно сморщивается, отрываясь от каждого полюса и заканчиваясь в виде сжавшегося остатка в середине спавшейся клеточной стенки. При этом протоплазма тянет за собой скопление базальных зерен с каждого полюса и в одной такой переваренной клетке (табл. 2, *4b*) мы наблюдали нить, проходящую от базального зерна в центр клетки. Отдельные наблюдения таких переваренных клеток должны несомненно трактоваться с большой осторожностью, но не было бы неожиданностью обнаружение чего-либо аналогичного внутренней волокнистой системе реснитчатых протозоа у таких спирилл, чья сложная подвижность была замечательно иллюстрирована Пийпером, Крокером, Ван дер Уолтом и Севеджом (Pijper, Crocker, van der Walt, Savage, 1953). В нашей лаборатории были получены (и скоро будут опубликованы) несомненные доказательства того, что жгутики S. serpens проходят через клеточную стенку, кончаясь базальным зерном в цитоплазме, и что они не представляют собой простые выросты клеточной стенки, как это считают Пийпер и др.

(4) *Клеточная стенка, цитоплазматическая оболочка и структуры, ассоциирующиеся с клеточным делением*

Мало должно быть сказано относительно клеточной стенки, поскольку об этом объекте в данном симпозиуме докладывается отдельно Солтоном (Salton). С морфологической точки зрения имеются две основные интересные детали: а) клеточная стенка является наиболее периферическим, постоянно встречающимся поверхностным слоем, толщина которого колеблется между 100 и 300 Å, который во многих случаях сообщает бактерии характерную форму и который сохраняет эту форму после того, как клеточное содержимое удалено путем лизиса, хотя оно, конечно, тоже обладает некоторой степенью эластичности [Найзи (Knaysi), 1951]; б) пока при исследовании тонких срезов не было

обнаружено (за исключением, быть может, спириллы), что стенки бактериальных клеток состоят из двух или более отдельных слоев, как это было так замечательно показано у дрожжей [Норткот и Горн (Northcote, Hornes), и у простейших водорослей (табл. 2 и 3, *6a*, *b* и *d*).

Предполагается, что внутри бактериальной стенки существует цитоплазматическая оболочка. Байссет (1953) установил, что цитоплазматическая оболочка «относительно легко» окрашивается. На электронных микрограммах, напротив, цитоплазматическую оболочку относительно трудно увидеть. Все, что можно сказать в настоящее время, — что наиболее периферическая поверхность цитоплазмы, лежащая около клеточной стенки, иногда представляется более гладкой, непрерывной и однородно плотной, превышающей толщину около 50 Å (табл. 1 и 2, *1b*, *4a* и *b*), чем можно было бы ожидать, если бы цитоплазматической оболочки не было, и цитоплазма после удаления клеточной стенки состояла бы из голой массы зерен и т. п. Это общее заключение относится ко всем изученным нами видам. Очень часто, конечно, не имеется следа цитоплазматической оболочки и даже клеточная стенка трудно различима. Это, вероятно, случается тогда, когда плоскость среза проходит под скользящим углом через бактериальную поверхность; нельзя надеяться увидеть какой-нибудь заметный признак оболочки толщиной 50 Å на срезе, если последний не проходит приблизительно под прямым углом к оболочке. Клеточная стенка очень часто отделяется от клеточного содержимого при сокращении последнего; но цитоплазматическая оболочка почти всегда остается прикрепленной к цитоплазме и лишь редко случается, что она может быть обнаружена в виде отдельной структуры, как, например, на микрограммах Найзи (1951), а также Робинау и Меррея (Robinow, Murray, 1953). Но даже и на этих микрограммах структура, описанная как цитоплазматическая оболочка, может, возможно, быть таковой плюс некоторое количество приставшей к ней цитоплазмы.

Если, как представляется вероятным, толщина цитоплазматической оболочки составляет около 50 Å, т. е. лежит далеко за пределами разрешающей способности оптического микроскопа, невозможно сказать, может ли она окрашиваться сама без окраски примыкающей к ней цитоплазмы: «относительно легкая» окраска, которую ей приписывает Байссет (1953), почти наверное обязана окрашиванию поверхностных слоев цитоплазмы, часто богатой РНК. Автор не знает убедительного доказательства, подтверждающего утверждение Байссета (1953), что «внутренняя клеточная оболочка имеет высокое содержание нуклеопротеидов». Имеется цитоплазма с ее богатым содержанием зерен диаметром 100—200 Å, которые обычно содержат значительное количество РНК, хотя часто в бацилле цитоплазма ограничена крупным ядром до узкого коркового слоя 0,1—0,2 μ толщиной, который

при исследовании в оптическом микроскопе легко может быть принят за цитоплазматическую оболочку. Интересный и ценный подход к проблеме окраски цитоплазматической оболочки был предпринят Робинау и Меррей (1953), которые показали, что можно ограничить окрашивание викторией голубой (единственная краска, которая испытывалась ими) лишь цитоплазматической поверхностью, если оставлять организм в контакте с очень разбавленной краской всего на 20—40 секунд с предварительной протравой ртутными солями. На основании модельных опытов с золотой пленкой на тонких стеклянных волокнах они рассчитали, что слой, окрашивающийся викторией голубой у Bacillus megaterium толщиной в 1,5 μ, образован цитоплазматической оболочкой, имеющей толщину около 60 Å — величину, поразительно сходную с цифрой около 50 Å, определенной при электронномикроскопических наблюдениях, и очень близкую к 100 Å — цифре, предложенной Митчелом (Mitchell, 1949).

Предполагается, что цитоплазматическая оболочка образует поверхностный слой изолированных бактериальных протопластов и имеется в «тенях», приготовленных из последних. Если, например, Bacillus megaterium обработан лизоцимом в соответствующей концентрации сахарозы (Вейбулл, 1953б), клеточная стенка, определяющая палочковидную форму, удаляется и остающийся протопласт округляется в шар, который, повидимому, ограничен цитоплазматической оболочкой, хотя это и не было доказано. Лизис протопласта в буферном растворе, не содержащем сахарозы, дает взвесь вязкую (что обязано освобождению фибриллярной ДНК из ядра) и содержащую тени, совместно с цитоплазматическими зернами диаметром 100—200 Å. Судя по электронограммам теней, приводимым Вейбуллом, кажется, что каждая из последних состоит из цитоплазматической оболочки с различными количествами зерен диаметром 100—200 Å, приставших к ней, и что окислительная активность, которую некоторые исследователи обнаружили в тенях, скорее обязана приставшим мелким зернам, чем наличию очень высокой концентрации окислительных энзимных систем в тонкой цитоплазматической оболочке как таковой.

Пока мало что можно сказать в отношении специальных структур, ассоциирующихся с образованием перегородки во время деления клетки. Чепмен и Хиллье (1953), работая с Bacillus cereus, первые привлекли внимание к несомненной кольцевидной вакуоли, предшествующей образованию перегородок. Сходные вакуоли были обнаружены у Staphylococcus aureus, как указывается на рис. 1, *б*. Не остается сомнения, что детали фиксации и промывки влияют на размеры этих вакуолей, как, конечно, они влияют и на многие другие особенности бактериального строения. Но тот факт, что вакуоли появляются вообще после фиксации забуференным осмиевым фиксатором, которая вызывает более или менее однородную зернистость во всем остатке цитоплазмы,

указывает, что имеется отчетливая местная дифференциация цитоплазмы непосредственно перед выпячиванием клеточных стенок. Тонкие срезы S. aureus не выявляют следов «клеточной пластинки», описанной у Micrococcus pyogenes Уэббом и Клерком (Webb, Clark, 1954), а также ядерной оболочки в том виде, в каком они ее предполагают.

Разграничение клеточной стенки и цитоплазматической оболочки может быть видно более ясно в неполной перегородке делящихся нитей синезеленых водорослей (табл. 2, *6а*). Сходные, но менее легко воспроизводимые электронные микрографии были получены и для S. aureus (табл. 1, *1b*).

5) *Разнообразные метаболические зерна, включая пигментные зерна*

При электрономикроскопическом изучении гомогенатов Rhodospirillum rubrum Шахман, Парди и Станье (1952) наблюдали хорошо очерченные хроматофоры, в среднем 400 Å в диаметре и в количестве около 5000 в каждой клетке. Подобные хроматофоры отсутствовали у организмов, выросших в темноте. Должно быть, интересно знать, представляют ли собой эти хроматофоры гомогенные агрегаты фотосинтетических пигментов или они обладают одной или двумя пластинками, подобными обнаруженным у значительно более крупных хлоропластов цветущих растений [Лийон (Leyon), 1953; Стейнман (Steinman) и Сьостранд, 1955]. Возможно, многие фотосинтетические бактерии обладают сходными тельцами.

В дополнение к этим структурам и структурам, рассмотренным в предыдущих разделах, имеются многочисленные примеры цитоплазматических зерен, состоящих из промежуточных или конечных продуктов обмена веществ, таких, как частицы поли-β-гидроксимасляной кислоты, описанной у Bacillus megaterium Вейбуллом (1953в), недолговечные вакуоли Caulobacter vibrioides, богатые липоидом и РНК [Грула и Харстелл (Grula, Harstell), 1954], различные полисахаридные зерна, считающиеся гликогеном на основании их окрашиваемости йодом, и давно известные зерна и капли серы у серо-бактерий (Найзи, 1951). Осадки железа и марганца выявлены преимущественно в оболочках этих организмов [Прингсгейм (Pringsheim), 1949].

СТРУКТУРЫ, НАЙДЕННЫЕ В ЖИВОТНОЙ ЦИТОПЛАЗМЕ, НО ДО СИХ ПОР НЕ ВЫЯВЛЕННЫЕ У БАКТЕРИЙ

1) *Эндоплазматическая сетка*

Важным вкладом электронной микроскопии в животную цитологию было открытие, что многие клетки с резко базофильной цитоплазмой содержат хорошо развитый сложный прибор,

выглядящий на срезах в виде двойной оболочки с незначительной электронной плотностью между обеими оболочками и обильными плотными зернами на внешней поверхности каждой пары. Парные оболочки, видные на срезах, могут образовываться из продольных срезов трубок или срезов более широких «резервуаров», имеющих форму, подобную сплющенным мешкам, а весь аппарат в целом был назван Палад и Портером (Porter, 1954) эндоплазматической сеткой. Имеется важное, но еще не окончательное доказательство того, что цитоплазматическая РНК локализуется в этом аппарате, возможно, в зернах. Некоторые сорта клеток млекопитающих (например, кишечный эпителий) содержат в изобилии плотные зерна, не связанные с оболочками, но эти клетки тем не менее содержат эндоплазматическую сетку с присоединенными к ней зернами.

Имеющие диаметр 100—120 Å цитоплазматические зерна бактерий, описанные выше, напоминают по величине и содержанию РНК эндоплазматические сетчатые зерна (хотя они более сложны — по отдельности или в виде группы — тем, что содержат важные окислительные системы, независимые от эндоплазматической сетки). Но бактерии, изученные до сих пор, совершенно лишены эндоцитоплазматических мембран, сравнимых с таковыми животной эндоплазматической сетки. Замечательно, что, как можно было поэтому ожидать, содержание фосфолипидов в бактериальных зернах низкое (Биллен и Волкин, 1954) сравнительно с таковым у микросом животных клеток (25%). Виды, исследованные до настоящего времени автором, включают два вида кокков, три — бацилл и один — спирилл. Ни эти виды, ни микобактерии и хромобактерии, изученные другими исследователями в Кембридже, не содержали ни одиночных, ни двойных внутрицитоплазматических оболочек; но имеется, конечно, много других видов, ожидающих исследования, включая такие относительно сложные группы, как спирохеты, которые могут оказаться более высокодифференцированными, чем типы, изученные до сих пор. Насколько, однако, в настоящее время известно, внутри бактерий, по-видимому, не было выявлено ничего сходного с эндоплазматической сеткой. Она также лишена ядерной оболочки, которая, как показал Уотсон (Watson, 1955), на основании ее родства с эндоплазматической сеткой может, вероятно, рассматриваться как специализированное ответвление последней, включающее хроматин и ядерный сок.

С другой стороны, мы обнаружили, что у синезеленых водорослей — одной из групп, наиболее тесно примыкающей цитологически к бактериям — существует нечто, очень сходное с эндоплазматической сеткой животных клеток, хотя ядерная оболочка у них отсутствует. Табл. 2 и 3, *6a*, *b*, *c*, показывают продольные и косые срезы нитей Oscillatoria formosa, фиксированных в 1% растворе осмиевой кислоты, забуференном до pH 7,2—7,4. Выявляются две совершенно различные группы

парных оболочек; *а)* узкий комплект с оболочками около 30 Å толщиной и расстоянием между центрами, равным 100—150 Å; *б)* более широкий комплект с оболочками около 90 Å толщиной и расстоянием между центрами, равным 300—500 Å. Имеются плотные зерна, около 100 Å в диаметре, лежащие как между оболочками, так и свободно в цитоплазме, и напоминающие сообщение Шахмана и др. (1952) о том, что после центрифугирования гомогената синезеленых водорослей (вид не назван) в течение одного часа при 160 000 *g* они обнаружили весь хлорофилл в осадке и бóльшую часть пиоцианина в надосадочной жидкости. Каково бы то ни было значение внутриклеточного распределения зерен, однако более существенно выявление сложных цитоплазматических оболочек в одном из классов организмов, наиболее тесно примыкающих цитологически к бактериям. Синезеленые водоросли, вероятно, имеют совершенно зачаточные ядерные структуры, находящиеся более или менее на одном уровне с таковыми у бактерий, но в отношении развития внутрицитоплазматических оболочек бактерии оказываются значительно более простыми при сравнении этих двух групп.

2. *Митохондрии*

Мы подошли сейчас к одному из наиболее спорных вопросов в изучении бактериальной цитоплазмы, связанному преимущественно с работой Мадда (1953, 1954) и его сотрудников, которые считают, что у многих видов бактерий существуют митохондрии. Их доводы могут быть сведены к следующему: (а) если обрабатывать бактерий при соответствующих условиях солями тетразоля или реактивом Нади, или янусом зеленым В, внутри бактерий выявляются окрашенные пятна; (б) это служит доказательством окислительно-восстановительной активности в окрашивающихся участках; (в) поскольку митохондрии животных клеток содержат многие важные окислительно-восстановительные системы, окрашенные пятна в бактериях являются митохондриями.

Некоторые исследователи выразили серьезное сомнение относительно этих заключений. Без предубеждения к тем более ясным и убедительным доказательствам, которые могут быть еще приведены, взгляд этих авторов следующий. (а) Структуры, описанные до сих пор Маддом и его сотрудниками как бактериальные митохондрии, в некоторых случаях не обнаруживаются (будучи или цитохимическими артефактами, или «оптическими» артефактами, вытекающими из предела разрешающей способности оптического микроскопа); в тех же случаях, когда они обнаруживаются, они, оказывается, являются не митохондриями, а структурами совершенно иного сорта, такого, как волютин. (б) Структуры бактерий, содержащие окислительно-восстановительные системы, сходные с таковыми митохондрий животных

клеток, представляют собой цитоплазматические зерна размером 100—200 Å, и было бы в высшей степени ошибочным и нежелательным называть последние митохондриями, так как они очень глубоко отличаются от настоящих митохондрий по форме, размеру и строению.

Доводы в пользу существования бактериальных митохондрий зависят от большого количества допущений, из которых следующие два являются наиболее значительными: (а) окрашенные продукты появляются в каждом случае и остаются в месте их образования; (б) то, что выявляется при исследовании в оптическом микроскопе как окрашенное пятно, представляет собой структурную единицу бактерии. Имеется много доводов, что оба эти допущения необоснованы. Вейбулл (1953а), например, показал, что окрашенные формазаны, образующиеся, когда Bacillus megaterium вынуждается редуцировать соли тетразолия, появляются первоначально в виде мелких зерен, усеивающих весь организм и затем собирающихся вместе, образуя более крупные вторичные скопления, показанные Маддом и его сотрудниками на их микрофотограммах. Окрашенный конечный продукт реактива Нади хорошо известен как избирательно адсорбирующийся липоидными каплями, и это обстоятельство было подтверждено у бактерий Грула и Хартселл (1954), работавшими с Caulobacter vibrioides. Соли тетразолия и реактив Нади могут быть удовлетворительны гистохимически, но много строгих испытаний, подобных уточненным Даниелли (Danielli, 1953), должно быть выполнено с ними и с янус зеленой В, прежде чем какой-либо из этих реагентов может рассматриваться как удовлетворительный цитохимически. Янус зеленый В из всех трех дает наименее удовлетворительные результаты — фактически некоторые исследователи не смогли получить с этим реактивом сколько-нибуль положительные результаты. Мадд и его сотрудники сообщили о непостоянных результатах, полученных при применении янус зеленого В; во многих их работах они не смогли доказать два существенных положения относительно витальной окраски этим веществом — обратимое обесцвечивание и торможение ферментативными ядами. Структура в присутствии януса зеленого В может окрашиваться в зеленый цвет, а затем превращаться в красный или обесцвечиваться просто потому, что она сильно адсорбирует краску и содержит редуцирующие вещества. Даже если может быть обнаружено обратимое обесцвечивание и торможение ферментативными ядами, все же возможно, что заметная разница в количестве белка, приходящемся на квадратный микрон, может резко влиять на интенсивность окраски одним из этих реактивов в целой бактерии.

К тому же, даже если эти методы могут быть усовершенствованы настолько, чтобы исключить все указанные трудности, при работах по окрашиванию так называемых бактерийных митохондрий так, что можно быть уверенным, что употребляемые

реактивы надежно показывают локализацию окислительно-восстановительных систем, имеется все же камень преткновения в виде высказанного выше предположения (б) — точное структурное толкование окрашенных пятен. Оптические микрофотограммы бактерий вообще трудно выполнимы, и микрофотограммы Мадда и его сотрудников превосходны, насколько это возможно. Но они не могут идти дальше разрешающего предела видимости света и ввиду этого, а также факта, что окрашенные массы близки к разрешающему пределу, абсурдно заявлять, что «бактериальные митохондрии колеблются в пределах от продолговатых эллипсоидов и сфероидов, сходных по размерам с наименьшими митохондриями клеток млекопитающих, до сфероидов, находящихся значительно ниже предела микроскопического разрешения» (Мадд, 1953, 1954). За исключением крупных волютиновых зерен, на срезах бактерий, сделанных в нашей лаборатории, отсутствуют структуры, которые приближаются по размерам к мелким митохондриям клеток млекопитающих, а биохимический анализ фракций частиц, комбинированный с электронномикроскопическими наблюдениями, делает чрезвычайно вероятным, что бактериальные окислительно-восстановительные системы, реагирующие с реактивами на митохондрии, располагаются в зернах диаметром 100—200 Å, в обилии разбросанных во всей цитоплазме. По мнению автора, окрашенные массы, демонстрированные Маддом и его сотрудниками, во многих случаях являются искусственно образовавшимися скоплениями бактериальной цитоплазмы, содержащими большое количество зерен размером 100—200 Å, а в других случаях они состоят из скопления краски (например, формазанов) вокруг волютиновых зерен, как об этом можно судить по указанию на электронную плотность, ограничивающую оболочки и метафосфатное содержимое, в последующем определении бактериальных митохондрий: «Цитоплазматические зерна, плотные при электронномикроскопическом и фазово-контрастном исследовании, обладающие ограничивающими оболочками и координирующими системами окислительно-восстановительных энзимов; они содержат фосфолипоид и, по крайней мере в некоторых случаях, метафосфат» (Мадд, 1953; 1954). По поводу смешения волютиновых зерен и митохондрий следует заметить, что а) осторожное сравнение участков окрашенных митохондрий (что бы они ни значили) с местоположением плотных для электронного потока волютиновых зерен показывает, что чаще между ними отсутствует соответствие (Смит и др. 1954: Глауерт и Бриджер, 1955); б) если все же совпадение имеется, следовательно, все неопределенности в процессах окраски остаются и требуют контроля; в) что электронноплотные волютиновые зерна в некоторых случаях представляют собой преходящие тела, которые могут полностью отсутствовать у бактерий, обладающих очень активными окислительно-восстановительными системами. Вполне вероятно, что последующие электронномикроскопические

наблюдения смогут обнаружить цитоплазматические тельца, идентичные по размерам и расположению центрам митохондриальных окрасок и представляющиеся на срезах в виде дискретных единиц, с ограничивающими оболочками вместо неорганизованных масс мелких зерен; но современные исследования не обнаруживают подобных картин.

Конечно, допустимо считать, что название «митохондрион» может быть применено к индивидуальным зернам диаметром 100—200 Å, принимая во внимание утверждение, что «В настоящее время, однако, кажется предпочтительным считать даже мельчайшие цитоплазматические частицы с приведенными выше морфологическими и биохимическими свойстами за митохондрии, чем за микросомы» (Мадд, 1953, 1954). Конечно, следует избегать слова «микросомы», которое приобрело в известном смысле дурную славу в опытах с дифференцированным центрифугированием гомогенатов животных тканей [Бернар, Готье и Руйе (Bernhard, Gautier, Rouillet), 1954; Бредфилд, 1953]. Но применение слова «митохондрия» нежелательно даже в еще большей степени. Во-первых, что касается формы, то митохондрион — преимущественно нитевидный объект, как показывает его этимология, и термин был введен потому, что животные митохондрии обычно нитевидны; несомненно, что он неприменим для описания более или менее шаровидных зерен. Во-вторых, что касается размера, мелкий животный митохондрион по крайней мере в 1000 раз крупнее, чем частицы, имеющие 200 Å в диаметре. В-третьих, что касается структуры, животные митохондрии имеют наиболее замечательное и характерное строение с двойной внешней оболочкой и внутренними оболочками в виде пластинок или трубок, выступающих внутрь из наружной оболочки (табл. 3, 7). Могут быть небольшие структурные вариации [Бимс, Таизиан и Девин (Beams, Tahmisian, Devine), 1955; однако многие митохондрии на микрограммах этих авторов выглядят совершенно типичными], но одна и та же основная схема в настоящее время была обнаружена у совершенно различных клеток, и в общем современные электронномикроскопические наблюдения, как и прежние биохимические исследования изолированных митохондрий, послужили для подтверждения и подчеркивания концепции о «митохондрион» как о постоянной, характерной и вполне законченной органелле. С другой стороны, не установлено, что цитоплазматические зерна бактерий, имеющие 100—200 Å в диаметре, обладают какими-либо оболочками, наружными или внутренними, и для этого имеется мало пространства, так как они почти равны по размерам более крупным зернам, лежащим между внутренними оболочками митохондрий животных клеток. Кажется в высшей степени нежелательным расширять и извращать ясную концепцию о митохондриях, распространяя ее на бактериальные зерна, которые в такой степени отличаются по форме, размерам и строению. В самом деле, желательно подчеркнуть противоположную

точку зрения, что бактерии, насколько современные исследования это показывают, *не обладают митохондриями* (употребляя это слово в его точном и узком смысле) и что в бактериях бóльшая часть окислительно-восстановительных систем, вместо того чтобы быть включенной внутрь сложных органелл, локализуется на очень мелких зернах, имеющих 100—200 Å в диаметре. Зерна могут быть легко описаны на основании их величины, их седиментационной константы или их химизма. Только в том случае, если бы было показано, что эти зерна закономерно комбинируются вместе в реальные и сплоченные глыбки, включенные в оболочку или расположенные в некотором относительно постоянном и характерном узоре, можно было бы оправдать термин «митохондрия»; в настоящее время какие-либо доказательства подобного рода отсутствуют.

ВЫВОДЫ

В своей общей схеме бактерии напоминают животные и растительные клетки по наличию ядра, протоплазмы и клеточных оболочек. Соотношение ядра к цитоплазме колеблется в пределах от 1 : 2 до 1 : 10.

В бактериальной цитоплазме открыты следующие структуры: а) мелкие зерна, 100—200Å в диаметре, содержащие сукциндегидрогеназу, различные цитохромы и цикл энзимов Кребса, а также большую часть рибонуклеиновой кислоты (РНК), и часто образующие массу цитоплазмы; б) так называемые волютиновые зерна, которые окрашиваются метахроматически, содержат метафосфат, очень плотны для электронного потока и варьируют по своей величине от нескольких сотен ангстрем до 0,5 μ; в) базальные зерна жгутиков; г) разнообразные зерна и вакуоли, содержащие такие вещества, как сера, гликоген, РНК и липиды, включая поли-β-гидроксимасляную кислоту; д) важная в осмотическом отношении цитоплазматическая оболочка, которая в некоторых случаях достигает около 50 Å толщины, и лежащая наиболее кнаружи клеточная стенка, толщина которой колеблется от 100 до 300 Å. Компоненты (а) и (д) выявлены у всех шести видов, срезы которых были приготовлены автором, и, вероятно, имеются у большинства бактерий; (в) был выявлен у многих жгутиковых бактерий; (б) — довольно широко распространенный, колеблется соответственно условиям культивирования; компонент, обозначенный как (г), резко варьирует от вида к виду.

До сих пор не было показано, что бактерии содержат структуры, подобные эндоплазматической сетке и митохондриям, которые являются важными структурами у животных клеток. В отношении митохондрий автору представляется на основании всех организмов, изученных до настоящего времени, а) что структуры, описанные как бактериальные митохондрии или (1) не существуют или (2) существуют, но глубоко отличны по своему строению и химически от настоящих митохондрий; б) что у

бактерий не имеется телец, структурно подобных истинным митохондриям; в) что структуры, химически сходные с истинными митохондриями (по содержанию в них окислительных энзимов), представляют собой зерна диаметром 100—200 Å и что было бы в высшей степени ошибочным и нежелательным называть их митохондриями. В общем, следовательно, наиболее замечательное структурное отличие между бактериальной цитоплазмой и цитопластом животных и растений заключается в отсутствии у бактерий внутрицитоплазматических оболочек всех видов; окислительные зерна не включены в оболочки, чтобы образовать митохондрии; зерна, богатые РНК, не облечены в оболочки, чтобы образовать эндоплазматическую сетку; наконец, цитоплазма в целом не отделена от ядра ядерной оболочкой.

ЛИТЕРАТУРА

Beams M. W., Tahmisian T. N. & Devine R. L. (1955). Electron microscope studies on Malpighian tubes. J. Biochem. Biophys. Cytol. *1*, 201.

Bernhard W., Gautier A. & Rouiller C. (1954). La notion de „microsomes". Arch. Anat. micr. Morph. exp. *43*, 236.

Billen D. & Volkin E. (1954). The effect of X-rays on the macromolecular organisation of Escherichia coli. J. Bact. *67*, 191.

Birch-Andersen A., Maaløe O. & Sjöstrand F. S. (1933). High resolution electron micrographs of sections of E. coli. Biochim. biophys. Acta, *12*, 395.

Bisset K. A. (1953). Bacterial Cell Envelopes. In Bacterial Cytology, Symp. 6th Congr. int. Microbiol., Rome.

Bradfield J. R. G. (1953). New features of protoplasmic structure observed in recent electron microscope studies. Quart. J. micr. Sci. *94*, 351.

Bradfield J. R. G. (1954). Electron microscopic observations on bacterial nuclei. Nature, Lond., *173*, 184.

Bradfield J. R. G. (1955). Fibre-patterns in animal cilia and flagella. In Fibrous proteins and their biological significance. Cambridge: University Press.

Bradfield J. R. G. (1956) In Proc. Ist. Int. Congr. Electronmicroscopy.

Caspersson T. (1950). Cell Growth and Cell Function. London: Chapman and Hall.

Chapman G. B. & Hillier J. (1953). Electron microscopy of ultrathin sections of bacteria. 1. Cellular division in Bacillus cereus. J. Bact. *66*, 362.

Danielli J. F. (1953). Cytochemistry. London: Butterworth.

Georgi G. E., Millitzer W., Burns L. & Heotis J. (1951). On the existence of a cell granule in a thermophilic bacterium. Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., *76*, 598.

Glauert A. M. & Brieger E. M. (1955). The electron-dense bodies of Mycobacterium phlei. J. gen. Microbiol. *13*, 322.

Grula E. A. & Hartsell S. E. (1954). Intracellular structures in Caulobacter vibrioides. J. Bact. *68*, 498.

Iterson W. van (1953). Some remarks on the present state of our knowledge of bacterial flagellation. In Bacterial Cytology, Symp. 6th Congr. int. Microbiol., Rome.

Knaysi G. (1951). Elements of Bacterial Cytology, 2nd ed. Ithaca: Comstock.

König H. & Winkler A. (1948). Über Einschlüsse von Bacterien und ihre Veränderungen im Electronenmikroskop. Naturwissenschaften. *35*, 136.

Leyon H. (1953). The structure of chloroplasts. Exp. Cell Res. *4*, 371

Minck R. & Minck A. (1949). Sur la constitution du bacille diphtérique: Appareil nucléaire et granulations metachromatiques. C. R. Acad. Sci., Paris, *228*, 1313.
Mitchell P. (1949). The osmotic barrier in bacteria. In the Nature of the Bacterial Surface. edit. A. A. Miles & N. W. Pirie. Oxford: Blackwell.
Mudd S. (1953). The mitochondria of bacteria. In Bacterial Cytology, Symp. 6th Congr. int. Microbiol., Rome.
Mudd S. (1954). Cytology of bacteria. Annu. Rev. Microbiol. *8*, 1.
Northcote D. H. & Horne R. W. (1952). The chemical composition. and structure of the yeast cell wall. Biochem. J. *51*, 232.
Palade G. E. (1952). A study of fixation for electron microscopy. J. exp. Med. *95*, 285.
Palade G. E. & Porter K. (1954). Studies on the endoplasmic reticulum. J. exp. Med. *100*, 641.
Pijper A., Crocker C. G., van der Walt J. P. & Savage N. (1953). Flagellum and motility of Spirillum serpens. J. Bact. *66*, 628.
Pringsheim E. G. (1949). Iron bacteria. Biol. Rev. *24*, 200.
Repaske R. (1954). Succinic dehydrogenase of Azotobacter vinelandii. J. Bact. *68*, 555.
Robinov C. F. & Murray R. G. E. (1953). The differentiation of cell wall, cytoplasmic membrane and cytoplasm of Gram-positive bacteria by selective staining. Exp. Cell Res. *4*, 390.
Schachman H. K., Pardee A. B. & Stanier R. Y. (1952). Studies on the macromolecular structure of bacteria. Arch. Biochem. Biophys. *38*, 245.
Schmager A. & Kludas M. (1950). Morphologischen Studien an Corynebacterien mit dem Phasenkontrastmikroskop. Zentr. Bakt. Abt. I. Orig. *156*, 502.
Sewag M. G., Smolens J. & Stern K. G. (1941). Pigmented heavy particles from Streptococcus pyogenes. J. biol. Chem. *139*, 925.
Smith I. W., Wilkinson J. E. & Duguid J. P. (1954). Volutin production in Aerobacter aerogenes due to nutrient imbalance. J. Bact. *68*, 450.
Stanier R. Y., Gunsalus I. C. & Gunsalus C. F. (1953). The enzymatic conversion of mandelic acid to benzoic acid. II. Properties of the particulate fractions. J. Bact. *66*, 543.
Steinman E. & Sjöstrand F. (1955). The ultra structure of chloroplasts. Exp. Cell Res. *8*, 15.
Tissières A. (1952). Oxidation of glucose by a cell free preparation of Aerobacter aerogenes. Nature, Lond., *169*, 880.
Tissières A. (1954). Role of high molecular weght components in the respiratory activity of cell free extracts of Aerobacter aerogenes. Nature, Lond., *174*, 183.
Tissières A. & Slater E. C. (1955). Respiratory chain phosphorylation of Azotobacter vinelandii. Nature, Lond. (in the Press)[1].
Watson M. L. (1955). The nuclear envelope. J. Biochem. Biophys. Cytol. *1*, 257.
Webb R. B. & Clark J. B. (1954). Cell division in Micrococcus pyogenes var. aureus. J. Bact. *67*, 94.
Weibull C. (1953a). Observations on the staining of Bacillus megaterium with Tripheniltetrazolium. J. Bact. *66*, 137.
Weibull C. (1953б). The isolation of protoplasts from Bacillus megaterium by controlled treatment with lysozyme. J. Bact. *66*, 688.
Weibull C. (1953в). Characterization of the protoplasmic constituens of Bacillus megaterium. J. Bact. *66*, 696.

[1] Опубликовано в Nature, 1955, 176, 4485, 736—737. *Ред.*

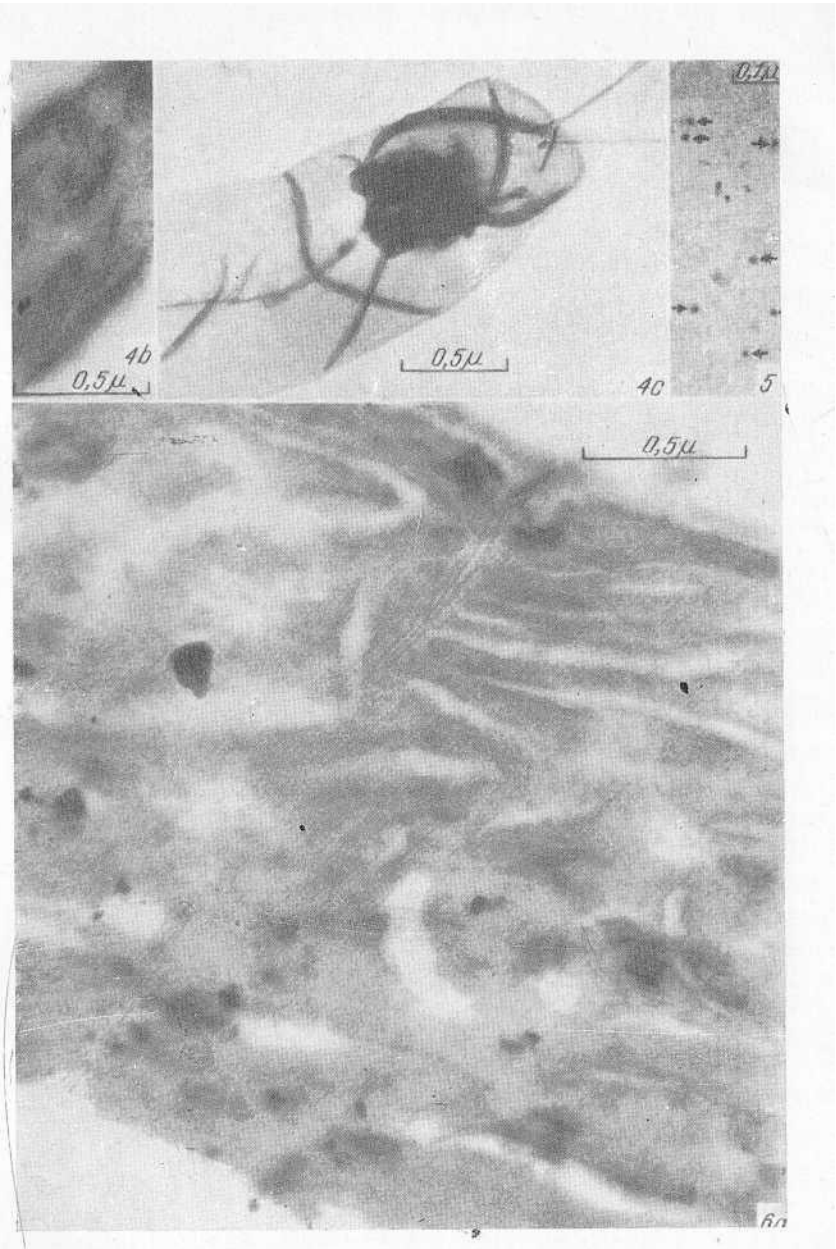


Таблица 2.

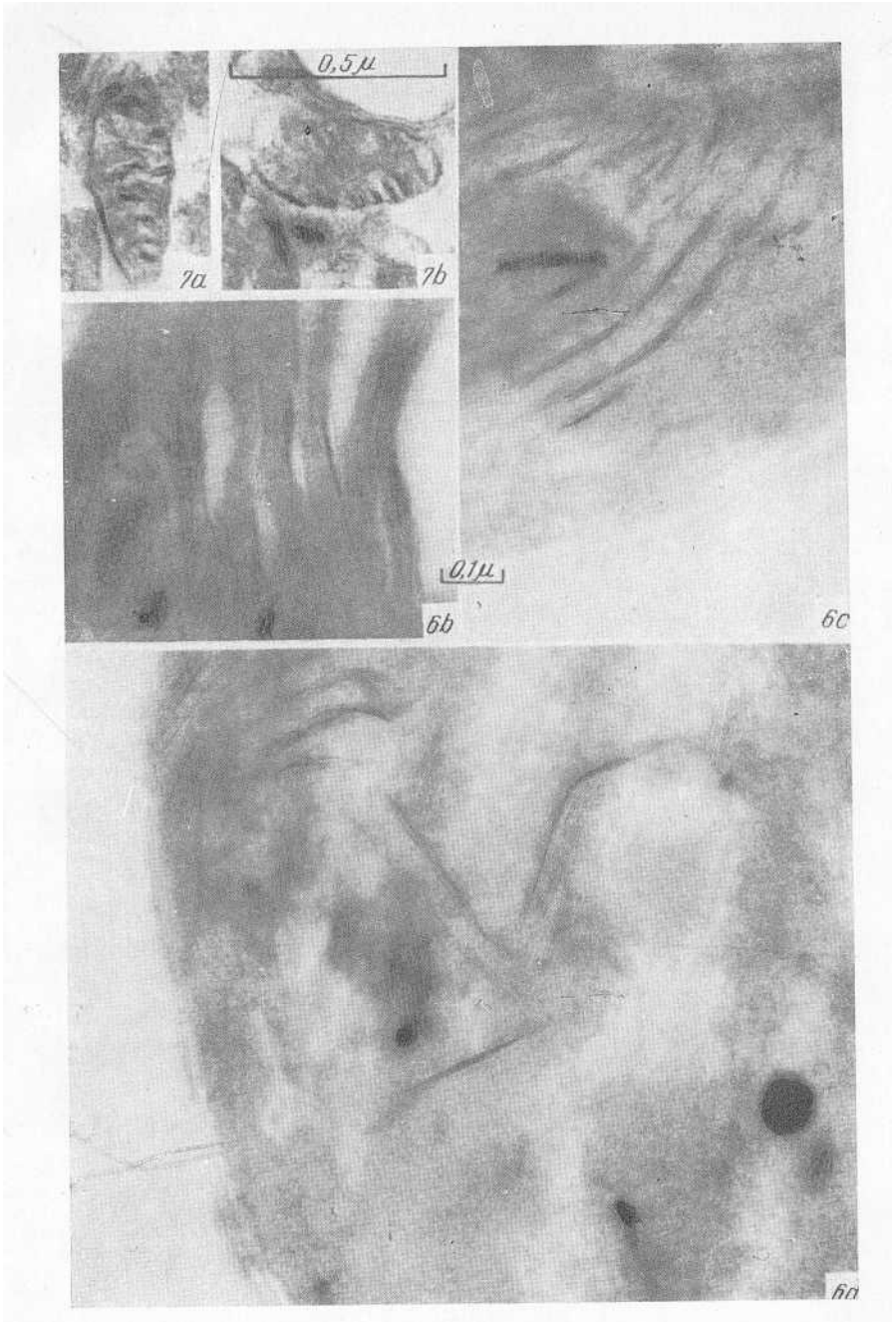


Таблица 3.

Таблица 1

1. Staphylococcus aureus. *a* — срез, показывающий более или менее нормальные соотношения ядра и цитоплазмы. Центральное ядро (бо́льшая часть которого менее плотная для электронного потока, чем цитоплазма после фиксации осмием) содержит волокнистый материал и окружено зернистой цитоплазмой. Темное пятно в последней — частично артефакт, возникший в процессе приготовления среза (по Бредфилду, 1954); *b* — срез, включающий несколько организмов, подвергшихся лизису, с цитоплазматическими зернами, более обособленными, и у которых легко обнаружить их выпадение; *c* — срез организма, значительно отличающийся от таковых на микрофотографиях *a* и *b*, выявляющий достаточно четкое различие между внешней клеточной стенкой и внутренней цитоплазматической оболочкой. Последняя как будто достигает толщины около 50 Å, хотя толщина на отпечатке в значительной мере зависит, конечно, от деталей фотографического процесса. Клетка показана в делении и в перегородке можно обнаружить три оболочки. Верхняя и нижняя соединяются у внутреннего края перегородки и являются цитоплазматическими оболочками; центральный слой — новая клеточная стенка, которая позже разделяется на два слоя — по одному для каждой дочерней клетки.

2. Aerobacter aerogenes. Скользящий срез через край организма, показывающий цитоплазму, целиком составленную из зерен диаметром 100—200 Å. Отслаивание клеточной стенки подчеркивается тем, что это скользящий срез.

3. Паракишечная палочка *D* 201 H. Срез организма из трехнедельной культуры, показывающий ветвящееся ядро (менее плотная зона) и зернистую цитоплазму; некоторые из зерен имеют в диаметре несколько более 200 Å (по Бредфилду, 1954).

Таблица 2

4. Spirillum serpens. *a* и *b* — срезы, показывающие зернистую цитоплазму. Все, что можно увидеть в цитоплазматической оболочке — это поверхность цитоплазмы под клеточной стенкой, находящуюся на месте, более значительно очерченном и непрерывном, чем можно было бы рассчитывать, если бы цитоплазма представляла собой голую массу зерен. Эти места, по-видимому, те, где срез проходит под более или менее прямым углом через очень тонкую цитоплазматическую оболочку. Срез, показанный на микрофотографии 1 (*c*), по-видимому, экваториальный, проходящий более или менее под прямым углом через окружность цитоплазматической оболочки. (*c*). Конец не подвергавшегося срезу переваренного трипсином организма. Все жгутики, кроме трех, утрачены. Крупная плотная масса около конца организма — масса базальных зерен, как мы это знаем по электронным микрограммам очень сходных, но менее переваренных организмов. Особый интерес этого организма заключается в несомненном наличии волокна, выходящего внутрь из массы базальных зерен, пересекающего различные изгибы в сплющенной клеточной стенке.

5. Azotobacter vinelandii. Изолированные, не напыленные цитоплазматические зерна (отмечены стрелками); диаметр около 160 Å. Препарат д-ра А. Тиссьера.

6. Oscillatoria formosa. *a* — продольный срез нити, показывающий широкую двойную оболочку (400—900 Å между центрами) в цитоплазме, сравнимую с эндоплазматической сеткой и содержащую крупные зерна. Срез также показывает хорошо отграниченную врастающую перегородку, содержащую более толстые (100—150 Å) цитоплазматические оболочки сверху и снизу и центральный слой, который, возможно, расщепляется на три отдельных слоя созревшей клеточной стенки; *b* — другой продольный срез широкой двойной оболочки; *c* и *d* — небольшие пространства поперечного косого среза, показывающего более узкую двойную оболочку, всего 100—150 Å между центрами (а также показывающего три слоя зрелой клеточной стенки).

Таблица 3

7. *a* и *b* — мелкие животные митохондрии (из слюнных желез личинки Chirononianas, показывающие, что даже в этих мелких органеллах, которые значительно сложнее, чем что-либо, найденное до сих пор в бактериальной цитоплазме, сохраняется характерное внутреннее строение.

Все рисунки, исключая *4*c и *5*, представляют электронные микрограммы при 70 или 80 KV ультратонких срезов организмов, фиксированных в забуфференном 1% растворе осмиевой кислоты и включенных в метакрилат.

ВКЛЮЧЕНИЯ У БАКТЕРИЙ

К. Л. ХЕННЕЙ

Научно-исследовательская лаборатория, Отдел агрикультуры, Лондон, Онтарио, Канада

Данный доклад не касается липидных шаров, волютиновых зерен, гликогена, отложений углекислого кальция, серы, которые часто описывались бактериологами-цитологами, а разбирает специфические включения, найденные у аэробных спорообразующих бацилл в период спорообразования. Сущность вопроса лучше всего может быть уяснена из описания опытов автора с Bacillus thuringiensis. Этот организм — вариант, как и B. anthracis и B. mycoides, повсеместно распространенного B. cereus. Он был первоначально изучен Берлинером (Berliner, 1911, 1915) и Маттесом (Mattes, 1927), которые отметили, что во время споруляции в каждой клетке наряду со спорой образуется второе тельце. Это второе тельце Берлинер назвал «Restkörper», или остаточное тельце, и предполагал, что оно образуется из вещества клетки, которое не было использовано для формирования споры. Он описал Restkörper как сферические вначале, а затем, при увеличении в размере, — ромбовидные. Маттес подтвердил наблюдения Берлинера и добавил, что тельце при росте изменяет направление оси споры таким образом, что последняя больше не совпадает с осью всей цепочки клеток. Это необычное явление — споры, лежащие в клетках косо, — отвлекло внимание позднейших исследователей и Restkörper были забыты. В 1946 г. Смит, Гордон и Клерк (Smith, Gordon, Clarke) описали B. thuringiensis как вид, идентичный B. cereus, за исключением того, что он патогенен для насекомых и споры у него имеют тенденцию к косому расположению, оставляя два комка протоплазмы после разрушения спорангия. В процессе изучения споруляции многочисленных аэробных спорообразователей, которые по своему описанию отклонялись цитологически от нормальных, Хенней (Hannay, 1953) видел свободные ромбовидные кристаллы в препаратах спорулирующих культур B. thuringiensis. В последующем было обнаружено, что эти кристаллы, многие из ко-

торых достигали величины спор, формировались в клетках во время споруляции и что каждая клетка содержала один кристалл и одну спору. Наименование было иное, но Restkörper были вновь открыты. Значение, придаваемое наличию органических кристаллических включений в этих организмах, будет обсуждено позже. Изучение литературы, сопрождавшееся исследованием многочисленных организмов, показало, что некоторые виды аэробных бацилл образуют включения в процессе споруляции. Так как форма включений у различных видов значительно варьирует, возникает потребность в некоторых определениях. Термин «параспоральные тельца» употребляется для обозначения включения, которое лежит рядом со спорой и формируется во время споруляции. Включения, напоминающие кристаллы, называются кристаллами; кристаллы же, о которых известно, что они являются белковыми, называются кристаллоидами. Различные морфологические формы параспоровых телец могут быть расставлены в ряд от правильных ромбовидных кристаллов. B. thuringiensis и овоидных, включенных в оболочку, медузообразных телец до амфорных включений у B. laterosporus. Эти формы изображены схематически на рис. 1.

Детальные данные в настоящее время имеются в отношении одного из них, B. thuringiensis, который и будет описан первым.

КРИСТАЛЛОИДНЫЕ ПАРАСПОРАЛЬНЫЕ ВКЛЮЧЕНИЯ BACILLUS THURINGIENSIS

Микроскопия

В оптическом микроскопе изображение полностью сформированных параспоральных телец легче и более точно, если используются их оптические свойства, чем при их тинкториальной характеристике. Робинау (Robinow), понимая, что трудность окраски зрелых спор внутри клеток приводит на фотографиях споровых культур к постоянно низкому уровню изображений, отказался от прямой окраски и использовал для дифференцировки спор от окружающей клеточной цитоплазмы преломляемость их в нигрозиновых пленках, не заключенных в какую-либо среду. Как и споры, параспоральные тельца обладают высокой светопреломляемостью и при наблюдении в незаключенных нигрозиновых пленках их резкие очертания и их блеск служат для отличия их от других веществ. Эта техника содействовала обнаружению включений. Как все методы, она имеет свои пределы и при изучении параспоральных телец более применима после того, как споруляция достигла момента, когда цитоплазма уменьшилась в своей оптической плотности. До этой стадии развития споруляции превосходные результаты могут быть получены при помощи фазово-контрастной микроскопии, но даже и при

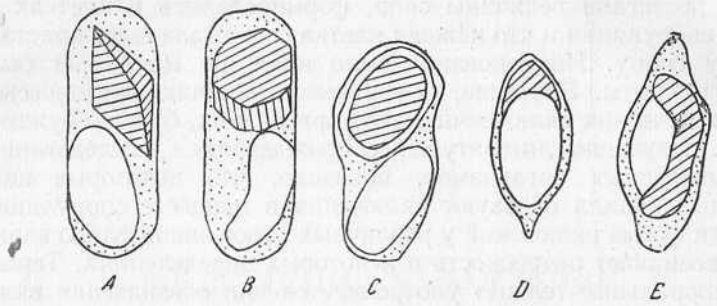


Рис. 1. Схемы различных форм включений, ассоциированных со спорами аэробных бацилл. Параспоральные тельца заштрихованы.

A — ромбовидное параспоральное тельце Bacillus thuringiensis Берлинер; *B* — кубовидно-ромбовидное параспоральное тельце. B. thuringiensis, выделенный д-ром Е. Стейнхаусом; *C* — включенное в оболочку параспоральное тельце. B. medusa, выделенный д-ром К. Робинау; *D* — параспоральное тельце. Варьирующая форма. B. popilliae Датки; *E* — челнокообразное параспоральное тельце B. laterosporus Лаубах.

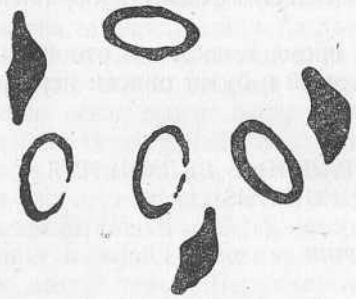


Рис. 2. Свободные кристаллы и споры Bacillus thuringiensis по Маттесу (1927).

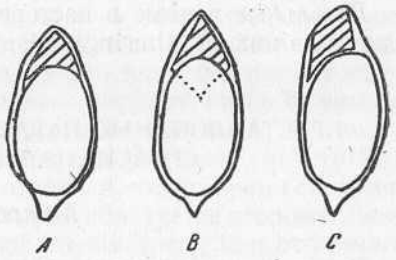


Рис. 3.

A — параспоральное тельце и спора Bacillus popilliae; *B* и *C* — два вида параспорального тельца, наблюдающиеся на препаратах B. popilliae, изолированного от зараженных насекомых.

помощи этой техники невозможно обнаружить начальное формирование параспорального тельца. Морфология включений была обогащена электронным микроскопом, но цитологическое изучение не было полным по тем же причинам.

Каждая спорообразующая клетка Bacillus thuringiensis содержит спору и по крайней мере одно параспоральное тельце. Размер этих включений значительно варьирует. Включения у большинства штаммов — правильные ромбовидные кристаллы (рис. 1—3, табл. 1, *1*), но Стейнхаус (Steinhaus, 1954) выделил штамм, в котором преобладали формы от ромбовидных до кубических. Как Берлинер, так и Маттес описали Restkörper как ромбовидные, и можно думать, что организмы, первоначально выделенные этими авторами, образовывали включения, сходные

с описанными Стейнхаусом. Однако Маттес включил в свое описание рисунки Restkörper, не оставляющие сомнения в том, что его штамм образовывал ромбовидные кристаллы и что наблюдения Стейнхауса являются новыми. Описывая бациллы, Хенней (1953) установил, что каждая клетка при споруляции содержит только один кристалл; Стейнхаус (1954), однако, сообщил, что отдельные клетки содержали два включения. Наблюдение, что клетки могут содержать два включения, было подтверждено. На среде Мортона (Morton) и Ингли (Engley, 1945) B. thuringiensis не образует споры, и при пересевах в течение некоторого времени на этой среде был получен рост, свободный от спор и включений. Небольшое количество такой культуры было рассеяно по поверхности питательного агара и культивирование производилось до тех пор, пока не была получена хорошо выраженная споруляция, но еще отсутствовали свободные кристаллы и споры. На препаратах, приготовленных с этих чашек, большинство бацилл содержало по два ромбовидных кристалла и по одной споре.

Любопытный феномен встречается при завершении споруляции: споры остаются внутри экзоспориума, но большинство кристаллов свободно. Многие клетки были исследованы в электронном микроскопе, но в экзоспориуме не удалось установить наличие разрывов, и мы не уверены, была ли свободная оболочка, в которой лежит спора и которая никогда не содержала кристалл, синтезирована во время споруляции, или оболочка является частью стенки старой вегетативной клетки и образование отверстия при удалении кристалла прошло незамеченным. Было подтверждено наблюдение Берлинера, что некоторые из Restkörper плотно прилегают к спорам.

Кристаллы легко окрашиваются большинством биологических красок, но особенное сродство они имеют к кислым краскам. Реактивом Милона кристаллы не окрашиваются настолько, чтобы увидеть в микроскоп какой-либо цвет. Раствором пунцового ксилидина в N/10 HCl они окрашиваются в бледный оранжево-красный цвет. Ртутный бромфенолблау — реактив, предложенный Деррамом (Darrum, 1950) для окраски белков и применяемый согласно методу Мазия, Брюера и Эльферта (Mazia, Brewer, Alfert, 1953), давал непостоянные результаты. Во время обработки в разведенной уксусной кислоте большая часть краски извлекается из кристаллов и неизвестно, адсорбирована ли остающаяся краска или она реагировала с белком. Кристаллы растворимы в разведенной щелочи, и полученный экстракт давал положительные пробы с реактивом Миллона, биуретовую и ксантопротеиновую при отрицательной пробе Молиша. Тинкториальные реакции и химические пробы указывают на небольшое количество свободных реагирующих групп в целых кристаллах.

Ромбовидные кристаллы были изучены в электронном микроскопе Хенней и Фитц-Джемсом (Fitz-James, 1955), и для

полноты деталей их работу необходимо принять во внимание. Кристаллы — правильной формы тетрагональные октаедры, лежат на плоской поверхности с проецирующейся в воздух верхушкой одной из пирамид (табл. 1, *5*). Напротив, ромбоидальные и кубические включения, образующиеся в новом штамме Bacillus thuringiensis, изолированном Стейнгаусом, имеют неправильную форму (табл. 1, *6* и *7*).

Кристаллы при исследовании в электронном микроскопе оказались крайне пластичными и подверженными различным искажениям. Острия многих напыленных ромбовидных кристаллов становятся зазубренными, а поверхность приобретает периодичность, которая не видна на ненапыленных включениях. При изменениях в интенсивности потока электронов кристаллы полностью разрушаются, частично разрываясь так, что полосы, видимые на поверхности кристаллов, проецируются на поддерживающую оболочку, или изменяются так, что некоторые кристаллы почти полностью превращаются как бы в скорлупу. Лучшая фотография скорлупы имеется в оригинальной работе; другой пример приводится в табл. 2, *8*. Авторы отмечают, что «зазубренные острия, ранее обнаруживавшиеся у кристаллов, теперь распадаются на параллельные ряды вещества, которое простирается вокруг углов кристалла. Отсутствует возможность выяснить, каждая ли пирамида составлена из одинакового количества рядов; примыкают ли две пирамиды друг к другу базальными рядами одинаковых размеров, или один базальный ряд является общим для обеих; тянутся ли ряды через весь кристалл и образуют ли они пластинку или спираль вокруг дефекта в центре кристалла». Несмотря на тот факт, что исчерченная поверхность была обнаружена только на напыленных препаратах, было сделано заключение, что периодичность скорее отражает структурную характеристику кристалла, чем является артефактом.

Обработка кристаллов разбавленным раствором едкого натра разрушает их, и крупные полосы, обнаруживаемые до обработки на поверхности, разрушаются. Никаких вирусоподобных частиц среди диспергированного щелочью белка не видно.

Кристаллы Bacillus thuringiensis не покрыты оболочкой. Было установлено, что если кристаллы обработать разбавленной щелочью, они по-прежнему, сохраняя свою форму, значительно увеличиваются в размере, затем теряют преломляемость и, наконец, исчезают, оставляя после себя скорлупу или оболочку (Хенней, 1953). В позднейшей работе Хенней и Фитц-Джемс (1955) нашли, что если прибавлять раствор едкого натра к водной взвеси кристаллов, они при pH 10—10,7 утрачивают свою преломляемость, разбухают, образуя тени, а при pH 12,5 полностью разрушаются. Авторы указали, что формы теней (табл. 2, *12*), которые, как было обнаружено, содержат весь азот кристалла, были в прежнем исследовании ошибочно приняты за оболочки.

Химический состав

Прежде чем произвести химический анализ включений, необходимо было разработать методы получения достаточного количества материала, свободного от спор, детрита и старых вегетативных клеток (Хенней и Фитц-Джемс, 1955). Трудность заключалась в отделении кристаллов при помощи дифференцированного центрифугирования, необходимого для применения других методов. Один метод был основан на щелочном фракционировании спорулирующей культуры и отделении диспергированного в щелочи вещества кристаллов от спор, остатков вегетативных клеток и их растворимых в щелочи компонентов. Были разработаны два метода получения целых кристаллов, свободных от других веществ: один был основан на механическом разрушении спор, а другой — на прорастании и автолизе спор. После каждого метода чистая взвесь кристаллов была получена путем повторного отмывания и дифференцированного центрифугирования.

Наиболее очищенные препараты кристаллического вещества содержали немного более чем 17% азота и не содержали фосфора. В кислотном гидролизате были обнаружены только α-аминокислоты: аргинин, лизин, аспарагиновая и глютаминовая кислоты, глицин, гистидин, аланин, пролин, серин, тирозин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, треонин и метионин. Проба на цистеин-цистин сделана не была. Триптофан был обнаружен в щелочном гидролизате.

Этот качественный анализ кристалла не отличается существенно от анализа аминокислот, найденных у Escherichia coli [Полсон и Уайкофф (Polson, Wyckoff), 1948], Т-бактериофага [Фрейзер и Джеррел (Fraser, Jarrel), 1953], или в ботулинистическом токсине [Булер, Шантц и Ламанна (Buehler, Schantz, Lamanna), 1947].

При добавлении раствора едкого натра к водной взвеси кристаллов они не диспергируются полностью ниже 12,2; выше этого значения pH они образуют бесцветный вязкий раствор и содержат вещество, осаждаемое трихлоруксусной кислотой. Если этот вязкий раствор центрифугировать при 10 000 g, образуется светлый желеобразный осадок, содержащий 84% общего азота; из 16% азота, остающегося в надосадочной жидкости, 89% было осаждено при прибавлении равного объема 20% трихлоруксусной кислоты. Ультрафиолетовый спектр как вязкого раствора целых кристаллов, так и фракции, которая не осаждалась при 10 000 g, был типичен для белка. Так как молекулярный вес этих двух белков был неизвестен, было удобно для сравнения выразить величину ультрафиолетовой адсорбции как ε (N). Обе фракции показали небольшую разницу в области 280 и 290 mμ. Не было известно, приводит ли обработка кристаллов к образованию двух веществ, и возникла необходимость некоторой кор-

реляции между методом диспергирования кристаллов и биологической пробой, такой, как токсичность для личинок насекомых или серологическая реакция.

Цитология

Цитологическое изучение включений в клетке только что начато.

В нашей лаборатории мы были сбиты с толку многообразием споруляции на питательном агаре и до сих пор не удалось найти удовлетворительный состав синтетической среды, который дал бы стойкий хороший рост, синхронную споруляцию с образованием здоровых спор и параспоральных телец у всех штаммов Bacillus thuringiensis. Изучение образования кристаллов во время споруляции могло быть облегчено, если бы было возможным производить сравнения с одновременным наблюдением над спорообразованием у штаммов бацилл, не образующих включения. Статьи Клинебергер-Нобл (Klineberger-Nobel, 1945) и Фльюэтта (Flewett, 1948), хотя и превосходные, но недостаточно исчерпывающие для того, чтобы служить сравнительным целям, и следует сожалеть, что эти авторы не продолжили свои исследования в этой области.

Характер споруляции этих образующих включений штаммов различен соответственно физиологическим условиям и методу засева среды. Если чашки с питательным агаром были засеяны спорулирующей культурой, споруляция была неустойчивая и имела место в клетках, содержащих четыре хроматиновых тельца, как у спорообразователей, описанных указанными выше авторами. Недавно был найден иной метод засева для того, чтобы получить более синхронную споруляцию на питательном агаре, споруляцию, возникающую у большинства клеток, когда в них имеется только два хроматиновых тельца. Техника этого метода следующая: рост 6-часовой культуры на питательном агаре был смыт дистиллированной водой, дважды промыт ею и вновь взвешен в дистиллированной воде до получения довольно мутной взвеси. Чашки Петри, содержащие 15 мл питательного агара Дифко, были подсушены при 32° в течение 15 минут и поверхность среды была засеяна 0,5 мл отмытой бактериальной взвеси. Чашки не помещали в термостат до тех пор, пока жидкость не впиталась в агар. Образование кристаллов и спор обычно начиналось в течение первых 16 часов и достигало полного развития после 21 часа культивирования при 32°. Рис. 1, 2, 3; табл. 1, *1* и табл. 3, *10* и *11* воспроизводят препараты, полученные указанным путем.

Цитологическая стадия споруляции, при которой начинается образование кристаллов, различна у клеток, содержащих четыре хроматиновых тельца, и у клеток, содержащих два тельца. В клетках, содержащих четыре хроматиновых тельца, кристалл

обычно может быть обнаружен одровременно с началом развития хроматинового тельца в спору на одном конце клетки. Хроматиновое тельце в этой стадии относительно мало, выглядит круглым и еще не сформировало видимую кольцеобразную структуру. Во время споруляции в клетках, содержащих два хроматиновых тельца, последние сохраняют свое расположение в клетке, и спора возникает на месте одного из них. В этих клетках кристаллы не видны до тех пор, пока спора не достигла значительных размеров, а хроматиновое тельце уже развилось в кольцевидную структуру и содержимое споры красится почти так же разномерно, как это изображено в табл. 3, *11*. Последующее различие между двумя типами споруляции было отмечено в реакции на окраску тех хроматиновых телец, которые, по-видимому, не содействовали споруляции. В клетках, содержащих четыре хроматиновых тельца, последние быстро теряли свою способность воспринимать краску, как только начиналась споруляция. В клетках, содержащих два хроматиновых тельца, остающееся тельце окрашивается хорошо до момента ясно выраженной споруляции и хроматин споры уже образовал кольцевую структуру. В общем можно сказать, что в этих условиях роста параспоральные тельца могут образоваться в споровых клетках, содержащих два или четыре хроматиновых тельца, и что рост кристалла представляется более тесно связанным с хроматиновыми тельцами, которые не содействуют споруляции, чем с какой-либо стадией развития споры. Эта связь не означает причину и следствие; потеря способности краситься у остающихся хроматиновых телец может соответствовать другим изменениям в клетке, имеющим непосредственное отношение к формированию включений. Фраза «рост кристалла» применяется потому, что начальное образование кристалла не было видно в оптическом микроскопе. Основной вопрос, как кристалл растет, должен следовать за более частным вопросом, в какой степени хроматиновые тельца, не образующие спор, связаны с формированием кристаллов. В стадии споруляции, показанной на табл. 3, *11*, можно видеть в оптическом микроскопе неокрашенную оболочку, которая, кроме того, что покрывает спору, кажется простирающейся под кристаллом. Спора вместе с этими мембранами выглядит скорее как уродливая сосулька. В настоящее время существуют три проблемы, связанные со споруляцией: связь кристаллов с хроматиновыми тельцами, оболочки, которые находятся под кристаллом, и, о чем упоминалось значительно раньше, сцепление некоторых включений со спорой.

Видимое указание на существование этих проблем дает электронная микрография ультратонкого среза, показывающая клетку, содержащую спору и кристалл (табл. 3, *10*). В верхнем правом углу показана часть споры. Внешние оболочки споры в этой отдельной клетке связаны с оболочкой, которая проходит от споры, под кристаллом, к концу клетки, где она образует

петлю. Предполагается, что хроматиновое тельце, которое не образовало спору, находится в пространстве, занятом петлей. Остаток того, что может быть оболочкой, можно видеть также над кристаллом. Изображение того же препарата в оптическом микроскопе до пропитывания метакрилатом представлено в табл. 3, *11*.

ЗНАЧЕНИЕ ВКЛЮЧЕНИЙ ОТНОСИТЕЛЬНО ТОКСИЧНОСТИ И ПАТОГЕННОСТИ

Инсектопатологи в нескольких странах изучали эндемическое заболевание личинок, вызванное аэробной спорообразующей бациллой. В каждой стране возбудитель получил различные наименования, но в настоящее время известно, что многие из этих организмов — варианты Bacillus cereus, которые, кроме наличия физиологических свойств B. cereus, патогенны для личинок насекомых и образуют кристаллоидные включения во время споруляции. Три наиболее хорошо изученных штамма — B. sotto, B. thuringiensis и B. cereus, var. alesti.

В Японии Ишивата (Ishiwata, 1902) изолировал от больных личинок шелковичных червей (Bombix mori L) организм, который он назвал Bacillus sotto («sotto» означает «внезапный распад»). Он показал, что старые культуры, выросшие на агаре, были токсичны при скармливании личинкам, в то время как бульонные культуры оказались безвредными (1906). Аоки и Шигасаки (Aoki, Chigasaki, 1915) отметили, что молодые вегетативные культуры не были ни токсичны, ни патогенны при энтеральном заражении, но вызывали заболевание при введении в полость тела. Они сделали вывод, что старые культуры содержат токсическое вещество, которое отсутствует в молодых культурах; позже они обнаружили, что токсическое вещество ассоциируется со спорулирующими культурами, а не со средой, на которой они росли. Токсическое вещество разрушается при обработке йодом, сулемой, формалином, спиртом или при кипячении культуры в течение 10 минут. Ясно, что с 1915 г. считали, что старые культуры B. sotto патогенны и содержат токсическое вещество, связанное со спорами.

В Германии Берлинер (1911) выделил от больной личинки Ephestia kuhniella аэробную спорообразующую бациллу. Он описал заболевание как «Schlaffsucht» (сонная болезнь), а возбудителя — как Bacillus thuringiensis (1915). Берлинер (1915) и Маттес (1927), подтвердившие исследования Берлинера, нашли, что вегетативные клетки обладают лишь незначительной патогенностью. Они не сообщили о существовании токсического вещества, ассоциирующегося со старыми культурами, и не придали какого-либо значения *Restkörper*, которые они наблюдали в спорообразующихся бациллах. Маттес (1927) установил, что рост *Restkörper* незначительно изменяет нормальное расположение спор таким образом, что их длинная ось уже не совпадает

с осью всей цепочки клеток. *Restkörper* были забыты, но угол, под которым споры лежат в клетках, запомнился и упоминался другими исследователями. Смитт и др. (1946) классифицировали B. thuringiensis как вариант B. cereus на том основании, что, за исключением патогенности для некоторых насекомых и тенденции спор лежать в косом положении в клетках, микроорганизм был неотличим от B. cereus. Стейнхаус (1951) нашел в полевых опытах, что B. thuringiensis, применяемый в виде порошка из высушенных спор, уменьшает популяцию личинок Colias philodice eurytheme Boisduval до катастрофического уровня. Хенней (1953) было привлечено внимание к наличию кристаллических включений в споровых клетках B. thuringiensis и других патогенных для насекомых микроорганизмов, близко относящихся к B. cereus. Было сделано предположение, что кристаллы могут некоторым образом находиться в связи с образованием токсического вещества, вызывающего септицемию у личинок насекомых.

Во Франции Пастер в 1870 г. писал, что заболевание «фляшерия» шелковичных червей сопровождалось размножением спорообразующихся организмов в зараженных личинках и что порошок, содержащий споры, сохранял инфекциозность еще после хранения на протяжении года. Туманов и Ваго (Toumanoff, Vago, 1951) выделили возбудителя и назвали его Bacillus cereus, var. alesti. Они описали прогрессирующие симптомы заболевания, такие, как вялость, паралич и смерть, однако эти симптомы варьировали в зависимости от количества культуры, проглоченной личинками (1952). Большие дозы вызывали быстрый смертельный исход, который авторы называли токсемией, малые дозы убивали более медленно с наличием септицемии. Туманов и Ваго подтвердили работу Аоки и Шигасаки (1951), установив, что в острых случаях токсемии проглоченные споры не прорастали. Они заключили: «Ils n'ont certenement pas le temps de s'y développer et la mort et l'intoxication doivent certenement être imputées à l'effet d'une substance toxique ou à une toxine soit sécrétée par les bacilles, dans le milieu, soit accumulée dans leur corps»[1]. В последующей работе, опубликованной в том же году (1953б), они сообщили, что молодые культуры не всегда были токсичны, но что спорулирующая культура вызывает токсемию и что токсическое действие может быть предотвращено предварительным нагреванием спорулирующей культуры при 120°. Гретые споры сохраняют их жизнеспособность и патогенность. Стейнхаус (1954), а также Туманов и Ваго (1954) обратили внимание на ромбовидные кристаллические включения у B. cereus, var. alesti.

[1] «Они, вероятно, не имели времени развиться и смерть и интоксикация скорее всего были обязаны токсическому веществу или токсину, либо выделяемому бациллами в среду, либо скопляющемуся в их телах» (1953а). *Ред.*

На североамериканском континенте Ангус (Angus, 1953, 1954а), работая с Bacillus sotto и личинками шелковичных червей, был первым, использовавшим наблюдение, что спорулирующие культуры содержат токсическое вещество и кристаллические включения. Ангус первым подтвердил работу Аоки и Шигасаки (1915), а затем с импонирующе прямым подходом к проблеме он установил взаимоотношение между взвесью спор и метаболизмом личинок. Отмытая спорулирующая культура B. sotto была взвешена в соке кишечника шелковичных червей и культивировалась при 28° в течение 6 часов, после чего смесь центрифугировали, надосадочную жидкость стерилизовали фильтрацией и фильтрат скармливали личинкам. Фильтрат вызывал паралич у личинок шелковичных червей; порция, прогретая при 100° в течение 30 минут, не оказывала действия. В противоположность данным Туманова и Ваго (1953б), водный экстракт спорулирующей культуры оказался нетоксичным. Вследствие того что сок кишечника шелковичных червей обычно имеет очень щелочную реакцию — pH 9,5—10, а при голодании pH может возрасти до 10—11, Ангус экстрагировал взвесь спор разбавленным раствором едкого натра. Стерилизованный экстракт вызывал паралич. Приблизительно в это же время Ангус получил данные, что B. thuringiensis и некоторые близко стоящие штаммы во время споруляции образуют растворимые в щелочи кристаллические включения, а микроскопическое изучение B. sotto обнаружило, что и внутри этого организма образуются сходные кристаллы. Косвенное доказательство относительно роли, которую кристаллические включения могут играть в этиологии параличей и септицемии, было получено путем сравнения действия на личинки смеси, содержащей кристаллы и споры, спор, свободных от кристаллов, и щелочного экстракта, приготовленного из взвеси спор и кристаллов . Эти фракции испытывали на личинках как скармливанием, так и введением в полость тела. Результаты приведены в табл. 1.

Последующие доказательства роли кристаллов как источника токсического вещества были получены, когда Ангус, обнаружив, что соотношение прорастающих и лизирующихся спор значительно колеблется в разных сериях, скармливал личинкам порции взвесей, содержавшие различные соотношения кристаллов и спор. Токсичность колебалась прямо пропорционально содержанию кристаллов и не зависела от количества спор (1954а). Используя модификацию одного из ранних методов, разработанных Хенней и Фитц-Джемсом (1955) для отделения диспергируемого в щелочи кристаллического белка от спор, вегетативного детрита и его растворимых в щелочи компонентов, Ангус выделил из спорулирующей культуры токсический белок (1954б). При энтеральном введении 0,5—1 г на 1 г веса личинки белок вызывал через 6 часов паралич и гибель через 24 часа, но при введении в полость тела оказался нетоксичным. В то время как раствор

токсической смеси инактивировался при нагревании до 55° в течение 15 минут, водная взвесь целых необработанных кристаллов оставалась еще токсичной, будучи прогрета в течение часа при 80°.

Таблица 1

Результат скармливания и инъецирования личинкам Bombyx mori L фракций обработанной щелочью культуры Bacillus sotto (Ангус, 1954а)

Исходная культура	Методы заражения личинок	
	скармливание	инъекция
Споры и кристаллы (1×10^5 спор на 1 личинку)	Паралич через 4 часа, септицемия через 12 часов	Септицемия через 12 часов без паралича
Культура, обработанная щелочью		
1) Споровая фракция (1×10^7 спор на 1 личинку)	Без изменений	Септицемия через 12 часов
2) Надосадочная жидкость	Паралич через 4 часа без септицемии	Без изменений
3) Надосадочная жидкость после диализа	Паралич через 4 часа без септицемии	» »
4) Надосадочная жидкость, прогретая при 70° в течение 30 минут	Без изменений	» »

Исследования соотношения между патогенностью, токсичностью и наличием включений были ограничены в группе cereus немногими бациллами, уже отобранными по их вирулентности, и показательными видами насекомых, отобранными по их восприимчивости. Перспектива успеха исследования улучшилась, когда Стейнхаус (1954) испытал 51 штамм спорообразующих бактерий как на патогенность, так и на наличие включений. Этот 51 штамм включал Bacillus thuringiensis, B. ephestia, B. laterosporus, B. alvei, B. sphaericus, B. subtilis, B. firmus, B. circulans, B. cereus (из других источников, помимо больных насекомых), B. megaterium, B. mycoides и B. pumilis. Бациллы были скормлены и введены в полость тела группам гусениц alfalfa и гусениц buckeye. Из 51 штамма бацилл 11 штаммов B. thuringiensis оказались наиболее вирулентными и были единственными культурами из числа относящихся к B. cereus содержащими включения; спорообразователи, полученные из источников иных, чем больные насекомые, были большей частью непатогенными. Через 2 часа после поедания спорулирующей культуры B. thuringiensis оба вида насекомых выявили признаки поноса и рвоты; четырьмя часами позже они были поражены частичным параличом, а через 3 дня гусеницы alfalfa погибли от общей септицемии; однако личинки buckeye были менее чувствительны к инфекции.

Восприимчивость большого ассортимента видов насекомых к взвесям кристаллов и спор B. sotto, а также к частично очищенному белку включений испытывалась Ангусом (1954б) (табл. 2). Эти предварительные исследования указывают на взаимосвязь токсичности с видами насекомых, имеющими высокий pH кишечника. Однако токсичность белка диспергированных в щелочи кристаллов и белка целых кристаллов и спор была ограничена идентичными видами и, вероятно, можно предположить, что щелочное содержимое кишечника, которое диспергирует кристаллы, не является, следовательно, единственным условием, необходимым для того, чтобы белок оказался токсичным.

Таблица 2

Чувствительность личинок насекомых с различной щелочностью средней кишки к споровым культурам и токсину (Ангус, 1954б)

Виды насекомых	Максимальная pH средней кишки	Относительная чувствительность[1] после поедания	
		целых культур	токсина
Bombyx mori	10,0	++++	++++
Nymphalis antiopa	9,4	+++	+
Porthetria dispar	9,3	+++	++
Anisota rubicunda	9,3	+++	++
Anisota sanatoria	9,6	+++	Не проверено
Datana integerrima	9,0	+++	» »
Galleria mellonella	8,0	Отрицательная	Отрицательная
Diprion hercynae	8,3	»	»
Neodiprion americanus banksianae	7,7	»	»
Neodiprion abietus	8,5	»	»
Neodiprion sertifer	8,2	»	»

[1] Степени чувствительности от ++++ (высокочувствительные) до + (малочувствительные).

Исследования токсичности включений при применении в виде смеси кристаллов и спор могут быть усложнены двумя факторами, которые заслуживают пристального внимания. Туманов и Ваго (1952) нашли, что некормленные личинки чувствительнее к токсемии, чем те, которые только что питались, а Хеймпел (Heimpel, 1954) нашел, что лецитиназа, выделяемая Bacillus cereus, токсична для многих насекомых, в частности для тех, у которых pH средней кишки лежит между 7 и 8. Несмотря на то, что pH средней кишки шелковичных червей лежит вне этих пределов, лецитиназа может оказывать некоторое токсическое действие, если применяется в достаточном количестве или скармливается в смеси с кристаллическими включениями. Лецитиназа, полученная из B. cereus, var. alesti, оказалась, по данным Туманова, Ваго и Гладилина (Gladiline, 1954), очень токсичной при инъецировании в личинки шел-

ковичных червей, но лишь слегка токсичной при энтеральном введении. Было установлено, что имеется варьирующий треугольник: хозяин, микроб и включения. Так как пределы вариаций этих сторон до сих пор еще ясно не определены, а количество и степень их взаимодействия неизвестны, трудно расценивать относительное значение каждого из них. Внутри каждой из варьирующих величин имеются свои вариации, которые должны быть приняты во внимание.

Насекомое-хозяин. Принадлежность к тому или иному виду; возраст и время контакта с бациллами, спорами и включениями; питание; наличие энзимов в кишечнике; щелочность кишечника; чувствительность к заражению и инфекции; общие условия окружающей среды.

Бациллы. Принадлежность к тому или иному штамму; возраст; вегетативные клетки; спорулирующие клетки; споры; прорастающие споры; способность спор к прорастанию и лизису; энзимы в вегетативных клетках, например фосфолипаза; наличие некристаллизованного токсического вещества; культуральная среда; резистентность к неблагоприятным условиям в кишечнике насекомого; вирулентность.

Включения. Источник; влияние культуральных условий, в которых находится бактерия, на химические, физические и токсические свойства включений.

Рассмотрение даже немногих из вариаций, имеющихся у каждого компонента треугольника, выявляет настолько большое количество взаимоотношений, что патолог при планировании своей работы должен учитывать, что он будет нуждаться в анализе вариантов для того, чтобы разобраться в своих результатах.

Наиболее патогенными для насекомых членами группы Bacillus cereus являются те варианты, которые, обладая общими физиологическими свойствами группы, образуют кристаллоидные включения во время споруляции. Центр тяжести был перенесен со склонности спор к косому расположению в клетках на наличие включений. Значение включений должно быть расценено с двух различных, но в конечном счете близких точек зрения. Первая — отношение включений к бактериальной клетке, причины их образования и их связь с другими компонентами клетки; вторая — взаимоотношение включений с личинками восприимчивых насекомых, возможное превращение включений в вещество, вызывающее параличи, и отношение токсического вещества к инвазии бактерий в ткани личинки. Не было опубликовано ничего, касающегося отношений включений к остальным частям бактериальной клетки, а сообщения, рассматривающие взаимоотношения включений с личинками, все еще скудны и ограниченны. Если чувствительным личинкам скармливать в среднем 0,5 μг белкового кристаллического материала на 1 г веса тела, у них через несколько часов наступает паралич, и личинки в конце концов погибают. Если тот же материал введен в полость

тела, личинки продолжают развиваться. Так как кристаллический материал является причиной параличей, следует сделать заключение, что материал, будучи введен в полость тела, не достигает необходимой для проявления его действия локализации или что он per se не токсичен. Возможно, что для того чтобы стать эффективным, он должен подвергнуться некоторым изменениям в кишечнике и окружающих клетках. Что растворение кристаллов не единственный фактор, необходимый для образования токсического соединения, вытекает также из тех опытов, в которых была установлена корреляция между токсичностью целого кристалла или даже диспергированного токсического материала и видами насекомых с высоким содержимым средней кишки pH. Те насекомые, у которых pH средней кишки высок, могут содержать энзимы, расщепляющие белок до токсического вещества, и большое упущение Ангуса (1953), обнаружившего, что кишечный сок освобождает из спорулирующей культуры токсическое при энтеральном введении вещество, заключается в том, что он не вводил подобное вещество в полость тела. Возможно, что вопрос является более сложным, и белок, изменяясь в кишечнике, дает продукт, имеющий сродство к некоторым компонентам энзимных систем в эпителиальных клетках кишечника и в мускульных или нервных тканях и поэтому подвергающийся воздействию этих систем. Паппенгеймер и Уилльямс (Pappenheimer, Williams, 1952) показали, что ткани шелковичного червя Cecropia, содержащие определенные цитохромы, оказались чувствительными к действию дифтерийного токсина, в то время как ткани, содержащие другие цитохромы, были резистентными. Позже эти авторы изучали активность цитохрома, который они выделили из средней кишки шелковичного червя Cecropia, и сделали вывод, что цитохром, вероятно, является ответственным за большинство CN-, CO- и антимицинрезистентных DPNH-окислений (Паппенгеймер и Уилльямс, 1954).

Было бы полезно, а возможно и необходимо до изучения механизма торможения ответить на два вопроса: 1) диспергирование кристаллоидов in vitro может сопровождаться значительной денатурацией. Может ли денатурация возникать in vivo и что является диспергирующим агентом в средней кишке? 2) После того как белок кристаллов диспергирован в средней кишке, превращается ли он в соединение, токсичное при введении в полость тела? Только тогда, когда будет пролит свет на эти процессы в кишечнике, станет возможным прямое выяснение природы токсичности.

В настоящее время единственное сообщение о связи включений с инвазией в ткани личинки принадлежит Ангусу (табл. I). Полученные результаты были несомненны: кристаллы и споры вызывают параличи и септицемию, одни споры не способны инфицировать личинки. Возможно, что в этих опытах высокая концентрация вводимого материала убивала личинок или вызы-

вала смертельное заболевание раньше, чем споры прорастали и бактерии проникали в ткани. В естественных условиях едва ли в личинки попадают массивные дозы спор и кристаллов, и вопрос «имеется ли связь кристаллов с образованием токсической субстанции, вызывающей септицемию личинок насекомых», остается неразрешенным. Было бы интересно знать, существует ли такая доза кристаллического вещества, которая, не убивая личинок, благоприятствует внедрению в ткани бактерий, образующих включения и соответственно не образующих включений Bacillus cereus, B. mycoides и авирулентных B. anthracis.

Первоначальные испытания патогенности и токсичности вегетативных клеток и спорулирующих культур были получены до того, как начали придавать значение наличию включений. Все эти данные нуждаются в повторном изучении, особенно те, которые касаются спор. Ангус недавно предположил, что для того, чтобы вызвать определенную степень параличей, необходимы значительно меньшие дозы смеси спор и кристаллов, чем в тех случаях, когда кристаллы испытываются отдельно (личное сообщение). В исследованиях Аоки и Шигасаки, а также Туманова, в которых большие дозы спор (по-видимому, смесь спор и кристаллов) вызывают параличи без сопутствующего роста бактерий, неясно, было ли учтено, что многие споры могли лизироваться или прорасти, но не развиться в вегетативные клетки.

До получения более полной информации о роли включений в соотношениях хозяина и паразита рассмотрение проблемы в правильной перспективе не будет возможным.

Другие формы параспоральных телец, челнообразные параспоральные тельца

Споры Bacillus laterosporus Лаубах после лизиса вегетативных клеток выглядят вкрапленными в челнообразное параспоральное тельце (табл. 4, *13*). Это параспоральное тельце отличается от ранее описанных по способности к окраске и по своему тесному контакту со спорами. Робинау нашел, что даже после гидролиза параспоральные тельца ярко окрашиваются по методу Гимза. Способ образования споры и тельца не известен, но тесная близость может возникнуть, если в начале споруляции более интенсивно развивается тельце, а затем вырастает спора и созревает внутри его. Процесс споруляции был описан Лаубахом, Райсом и Фордом (Laubach, Rice, Ford, 1916): «Когда организм разбухает и принимает веретенообразную форму, споры возникают в виде слегка окрашивающихся шариков. Протоплазма скоро разрушается, больше с одной стороны, чем с другой, так, что свободные споры, имеющие яйцевидную форму, сохраняют ободок протоплазмы с одной стороны, что придает им характерный вид. Когда споры созревают, они начинают

утрачивать свой ободок. Реже на концах спор остаются мелкие обрывки протоплазмы».

О том, что Bacillus laterosporus, вероятно, не являются единственным видом, способным образовывать челнообразные параспоральные тельца, было указано Смитом с сотрудниками (1946), которые писали: «В настоящем исследовании, однако, некоторые другие близкие виды, в частности B. brevis и B. circulans, временами образуют подобные споры, но количество таких спор в препарате никогда не бывает очень большим». Эти три организма имеют одно общее во внешности клеток во время споруляции: во всех случаях клетка разбухает и принимает форму веретена. Из всех трех только B. laterosporus ассоциируется с заболеванием насекомых.

Покрытые оболочкой параспоральные тельца

Д-р Робинау несколько лет назад выделил из коровьего навоза аэробный бацилл, являющийся цитологически одним из наиболее интересных членов этого рода. Этот организм был назван Bacillus medusa. При споруляции у него в клетках образуются сильно преломляющее параспоральное тельце и преломлящая спора; обычно образование одного начинается несколько раньше другого, но что возникает первым, установлено не было. В отличие от спор параспоральные тельца не содержат хроматинового зерна и не прорастают при помещении в свежую среду, но, подобно спорам, они покрыты плотной оболочкой (табл. 4, *12*), которая, как показал д-р Робинау при помощи электронного микроскопа, составлена из нескольких слоев. Обычно в оптическом микроскопе вещество, окруженное оболочкой, выглядит гомогенным, но в отдельных случаях видны неокрашивающиеся зоны. Раствор пунцового ксилидина в N-HCl окрашивает многие из параспоральных телец; те, которые не окрашиваются этой краской, резистентны к большинству методов окраски. Относительное количество окрашивающихся телец, по-видимому, зависит от среды, на которой росли микроорганизмы. Строго говоря, параспоральные тельца нерастворимы в щелочи. Однако бактерии, культивируемые на некоторых средах, образуют тельца, которые, будучи помещены в N-NaOH, разбухают и лопаются, освобождая свое содержимое; если же бактерии были выращены на других средах, тельца оказываются устойчивыми к обработке 10N-NaOH. Из микроскопических наблюдений создается впечатление, что параспоральные тельца, которые в конечном счете оказываются крупнее спор, продолжают расти после созревания спор и что во время роста имеется конкуренция между двумя тельцами за доступные материалы из общего источника снабжения. Многие среды, вероятно, благоприятствуют росту параспоральных телец, что ведет к образованию большого количества бобовидных спор, и в исключитель-

ных случаях споры могут лизироваться до окончательного формирования или даже, если они сформировались, могут прорасти.

На питательном или приготовленном из настоя сердечной мышцы агаре бактериальные клетки необычно длинные сравнительно с таковыми у Bacillus cereus; они растут в виде цепочек в хаотическом беспорядке, ассоциируясь с различными степенями лизиса, размеров клеток, содержания жира, диссоциации и образования вторичных колоний. Схематические изображения B. medusa на рис. 1, C и в табл. 4, *13* отражают бактериальный рост на полусинтетической среде, на которой рост более доступен контролю. Поверхность клеток покрыта слизистым слоем, который сбрасывается легче, чем этого можно было бы ожидать от обычной бактериальной капсулы. Подобно B. thuringiensis, эти бациллы выделяют во время споруляции вещества, которые неблагоприятно влияют на рост субкультур.

Если выращивать Bacillus medusa в большом объеме бульона и высеять на чашку после недельного культивирования, получаются колонии с разнообразными свойствами. Клетки некоторых колоний содержат включения, напоминающие таковые у B. thuringiensis. Обычно в этих клетках остальное содержимое лизировалось, и споры не видны.

Хотя были определены многие из физиологических свойств Bacillus medusa, не удалось установить родства с другими членами рода. Несмотря на то, что во многих отношениях Bacillus medusa сходен с B. cereus, они не образуют лецитиназу в бульоне с яичным желтком. Идентификация этого организма затрудняется его способностью образовывать включения, и исходный штамм, свободный от подобных включений, может обладать физиологическими свойствами, которые позволят отнести его к классифицированному члену рода. С другой стороны, он может быть аберрантом и не соответствовать типовым свойствам какого-либо из существующих видов.

Другой организм, который, если его параспоральное тельце включено в оболочку, может быть близко отнесен к Bacillus medusa, был описан в докладе Фаулера и Гаррисона (Fowler, Harrison) Американскому обществу бактериологов в 1952 г. Они сообщили, что ими был выделен «аэробный спорообразующий бацилл, напоминающий Bacillus cereus по размерам, характеру роста, типу образования спор и биохимическим признакам, образующий во время споруляции особое, менее преломляющее свет шаровидное тельце, прилегающее к споре во время ее последующего прорастания и, не принимая видимого участия в прорастании, часто остающееся прикрепленным к оболочке споры».

Химический состав этих параспоральных телец неизвестен, но наличие белка выявлено тинкториальными свойствами параспоральных телец Bacillus medusa. Ни тот, ни другой организм не патогенен для насекомых.

Включения Bacillus popilliae

Включения Bacillus popilliae Датки (Dutky) варьируют по форме от полушаровидных до конусообразных, но эта форма может быть обусловлена их ростом внутри ограничивающих пределов клетки. Благодаря любезности д-ра Стейнкрауса (Steinkraus) из Корнеллского университета я получил возможность просмотреть препараты этого организма и нашел, что немногие из спороносодержащих бацилл содержали ромбовидные кристаллы. В противоположность каким-либо культурам B. thuringiensis я видел, что кристаллы были зажаты между спорой и клеточной стенкой.

Датки (1940) так описал образование спор и параспоральных телец в клетке: «Когда клетка начинает разбухать, спора становится заметной в виде слегка преломляющей свет вакуоли, равной по размерам зрелой споре. Когда происходит спорообразование, вакуоль становится более преломляющей свет, пока не обнаруживается законченная спора. В этот момент клетка имеет выраженную веретенообразную форму, и спора располагается несколько терминально. Один конец клетки расширен и клетка становится больше грушевидной, чем веретенообразной. На расширившемся конце можно в это время наблюдать зерно, которое растет, пока не достигает почти половины размера споры. По мере развития зерна спора занимает более центральное положение; цитоплазма около споры становится все больше и больше преломляющей свет». Датки нашел, что параспоральные тельца не окрашиваются при применении большинства методов окраски, но что при окраске спор по Дорнеру воспринимает краску как спора, так и параспоральное тельце. Он также отметил, что преломляющие свет тельца были устойчивы при погружении в 10% раствор едкого натра.

Bacillus popilliae был изолирован Датки (1940) и был определен как организм, вызывающий молочную болезнь японского жука Popillia japonica. Сходный бацилл, вызывающий молочную болезнь у Odontria Zealandica, был изолирован Дамблтоном (Dumbleton, 1945). Было сообщено, что этот вид образует круглое параспоральное тельце.

ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Было показано, что большое количество различных видов аэробных спорообразующих бацилл образуют при споруляции параспоральные тельца. Из четырех видов, образующих параспоральные тельца — Bacillus thuringiensis, B. popilliae, B. laterosporus и B. medusa, первые два являются известными патогенными для насекомых микроорганизмами, третий ассоциируется с заболеванием насекомых, а четвертый пока еще служит

объектом успешных изысканий микробиологов. Форма параспоральных телец может варьировать как в пределах одного вида, так и между различными видами бацилл. Общее химическое строение телец еще не известно, но имеются указания, что некоторые из них являются белковыми. Параспоральные тельца B. thuringiensis высокотоксичны для личинок некоторых видов насекомых, и как результат этих токсических воздействий бациллы способны наводнять ткани личинок. Отношение параспоральных телец к патогенности у других видов бацилл не выяснено.

Каждая форма параспорального тельца и каждый вид образующих включения бацилл могут иметь различное выдающееся будущее. Рассматриваемые во всей совокупности, они подсказывают вопросы существенного значения. Упомянутое выдающееся будущее и возникающие вопросы определяются склонностями исследователя. К несчастью, количество сообщений о включениях и их формировании удручающе не соответствует их значению, и имеется опасность, что автор, хватаясь за соломинку, излагал личные взгляды в ложном направлении и в результате поставил неправильный вопрос.

Споры и включения Bacillus thuringiensis образуются в течение 5 часов. Выделение белковых кристаллов в пределах этого периода времени не является исключением. Кристаллы Шарко-Лейдена, описанные Шарко и Робэном (Charcot, Robin, 1853), а также Лейденом (1872), являются белковыми кристаллами, образующимися из эозинофилов, и считаются продуктами ядер. Эти кристаллы крупнее, чем бактериальные включения, и имеют размеры от 7 до 21 μ в длину, а в отдельных случаях сообщалось о длине, достигающей 96 μ [Айерс (Ayers), 1949; Дайв [Dawe) и Уилльямс, 1953]. В то время как в естественных условиях кристаллы формируются в результате деятельности бактерий на протяжении дней, можно вызвать их образование in vitro в течение нескольких минут или часов при помощи синтетических дезинфицирующих веществ или растворяющих агентов. Что бактерии могут превратить один кристаллический белок в другой без существенного вреда, было показано Линдестремом-Лангом и Оттесеном (Lindeström-Lang, Ottesen, 1947). В течение 5 часов 90% раствора игольчатых кристаллов овальбумина было превращено внеклеточной протеазой B. subtilis в измененный белок, который кристаллизовался в форме прямоугольных пластинок. В литературе не было обнаружено сообщений о бактериях, выделяющих ферменты, которые переводили бы их собственный белок в кристаллическую форму, но в последнее время появились работы, указывающие, что бактерии выделяют вещества, действующие специфически на них самих. Гринберг и Холворсон (Greenberg, Halvorson, 1955) нашли, что среда, в которой культивировали штаммы B. cereus или B. polymyxa, содержит в начале споруляции автолитическое вещество. Эти автолитические ве-

щества обладают отчетливой видовой специфичностью и лизируют клетки только тех видов, которые их продуцировали. Если весь материал для синтеза споры может быть получен из вегетативной клетки, эти автолитические вещества могут играть существенную родь в подготовке роста спор. Я допускаю, что, поскольку развивающаяся спора окружена преломляющими свет стенками, некоторые вещества высокого молекулярного веса внутри споры будут синтезированы из соединений низкого молекулярного веса, способных проходить через стенки спор. Кристаллические включения, с другой стороны, или синтезированы из мелких частиц, или образовались путем изменений, происходящих в уже существующем белке клетки. Насколько мы знаем, обе альтернативы могут быть применены к включениям B. thuringiensis, но что касается включений B. medusa, дело обстоит несколько иначе. Параспоральное тельце B. medusa вырастает быстро внутри плотной оболочки. Трудно представить, что полностью сформированные соединения проходят через оболочки, и кажется более логичным предположить, что вещество включений синтезируется внутри оболочки и что тельце продолжает расти до тех пор, пока синтезирующий механизм по каким-то причинам не остановится. Единственное другое тельце внутри бацилл, которое является активно синтезирующимся веществом и покрыто оболочкой, — это спора; очевидная ассоциация ведет к предположению, что само параспоральное тельце есть одна из зарождающихся спор. Отсюда логично задать такой вопрос относительно всех спорообразователей: почему, когда клетки во время споруляции содержат несколько хроматиновых телец, в каждой клетке развивается только одна спора? Вегетативные клетки, близкие к споруляции, могут находиться в положении, аналогичном клеткам ветвей деревьев, когда развиваются почки. Развивающаяся конечная почка задерживает рост других почек на ветке, но если конечная почка удалена, другие почки немедленно начинают расти. Влияние терминальной почки может быть воспроизведено путем ее удаления и воздействия индолуксусной кислотой на срезанную поверхность ветки. У вегетативных бациллярных клеток при соответствующих для споруляции условиях одно хроматиновое тельце может развиться в спору раньше других и выделять достаточную концентрацию вещества, которое тормозит формирование спор из других телец. Так как споры состоят из множества соединений, то большое количество энзимных систем должно быть привлечено к синтезированию соединий, и торможение некоторых процессов у образующих включения штаммов может еще допускать функционирование других процессов и из частично заторможенного хроматинового тельца может развиться включение. Мы до сих пор еще не знаем, развивается ли медузоподобное тельце из хроматинового, но, если это так, какое это может иметь значение при образовании кристаллических включений у B. thuringiensis? Может происходить анало-

гичный процесс, но, кроме того, окружающая оболочка может разрушиться или фактически еще не сформироваться и белок может быть изменен действием энзима так, что он кристаллизуется в клетке. Позволительно допустить одно, что образовавшийся белок близок к белкам, образовавшимся внутри спор.

Некоторые из этих предположений трудно подтвердить. Проблему необходимо рассматривать прежде всего как цитологическую в большей степени, чем биохимическую, и цитологические изменения в спорулирующей клетке образующих включения штаммов должны быть рассмотрены осторожно. Вероятно, в любой лаборатории можно было бы проверить существенную гипотезу — возникают ли у необразующих включения штаммов бацилл включения или споры из каждого хроматинового тельца внутри клетки? Таким образом, обсуждение заканчивается, как и началось, цитологической проблемой.

ЛИТЕРАТУРА

Angust T. (1953). Studies of Bacillus spp. pathogenic for silkworm. Progress Rep. Canada Dept. Agric., Science Service, Forest Biol. Div. *9*, (6), 1.

Angus T. (1954a). A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. Nature, Lond., *173*, 545.

Angus T. (1954б). Some properties of a bacterial toxin affecting insect larvae. Progress Rep. Canada Dept. Agric., Science Service, Forest Biol. Div. *10* (4), 2.

Aoki K. & Chigasaki Y. (1915). Ueber die Pathogenität der sog. Sotto Bacillen (Ishiwata). bei Seidenraupen. Mitt. med. Fak. Tokio, *13*, 419.

Ayers W. W. (1949). Production of Charcot-Leyden crystals from eosinophils with aerosol M. A. Blood, *4*, 595.

Berliner E. (1911). Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe. Z. ges. Getreidew. *3*, 63.

Berliner E. (1915). Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (Ephestia kühniella, Zell.) und ihren Erreger, Bacillus thuringiensis, n. sp. *Z*. angew. Ent. *2*, 29.

Buehler H. J., Schantz E. J. & Lamanna C. (1947). The elemental and amino acid composition of crystalline Clostridium botulinum type A toxin. J. biol. Chem. *169*, 295.

Charcot J. M. & Robin C. (1853). Observation de leucocythemie des SG. et Mem. de Soc. de Biol. *5*, 44.

Darrum E. L. (1950). A microelectrophoretic and microiontophoretic technique. J. Amer. chem. Soc. *72*, 2493.

Dawe C. J. & Williams W. L. (1953). Histochemical studies of Charcot-Leyden crystals. Anat. Rec. *116*, 53.

Dumbleton L. J. (1945). Bacterial and nematode parasites of soil insects. N. Z. J. Sci. Tech. *27*, 76.

Dutky S. R. (1940). Two new spore-forming bacteria causing milky disease of Japanese beetle larvae. J. agric . Res. *61*, 57.

Flewett T. H. (1948). Nuclear changes in Bacillus anthracis and their relation to variants. J. gen. Microbiol. *2*, 325.

Frazer D. & Jerrel E. A. (1953). The amino acid composition of T_3 bacteriophyge. J. biol. Chem. *205*, 291.

Greenberg R. A. & Halvorson H. O. (1955). Studies of an autolytic substance produced by an aerobic sporeforming bacterium. J. Bact. *69*, 45.

Hannay C. L. (1953). Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria. Nature, Lond., *172*, 1004.
Hannay C. L. & Fitz-James P. (1955). The protein crystals of Bacillus thuringiensis Berliner. Canad. J. Microbiol. *1*, 694.
Heimpel A. M. (1954). Investigations of the mode of action of strains of B. cereus Fr. and Fr., pathogenic for the larch sawfly (Pristiphora erichsonii Htg.). Thesis, Qeen's University, Kingston, Ontario, Canada.
Ishiwata S. (1902, 1906). Quoted by Aoki & Chigasaki (1915).
Klieneberger-Nobel E. (1945). Changes in the nuclear structure of bacteria, particularly during spore formation. J. Hyg., Camb., *44*, 99.
Laubach C. A., Rice J. L. & Ford W. W. (1916). Studies on aerobic spore-bearing non-pathogenic bacteria. J. Bact. *1*, 493.
Leyden E. (1872). Zur Kenntnis des Bronchial-Asthmas. Virchows Arch. *54*, 324.
Lindeström-Lang K. & Ottesen M. (1947). A new protein from ovalbumin. Nature, Lond., *159*, 807.
Mattes O. (1927). Parasitäre Krankheiten der Mehlmottenlarven und Versuche über ihre Verwendbarkeit als biologisches Bekämpfungsmittel. Ges. Beförd. gesam. Naturw. Sitzber., Marburg, *62*, 381.
Mazia D., Brewer P. A. & Alfert M. (1953). The cytological staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue. Biol. Bull., Woods Hole, *104*, 57.
Morton H. E. & Engley F. B. (1945). The protective action of dysentery bacteriophage in experimental infections in mice. J. Bact. *49*, 245.
Pappenheimer A. M. & Williams C. M. (1952). The effects of diphtheria toxin on the Cecropia silkworm. J. gen. Physiol. *35*, 727
Pappenheimer A. M. & Williams C. M. (1954). Cytochrome b_5 and the dihydrocoenzyme 1-oxidase system in the Cecropia silkworm. J. biol. Chem. *200*, 915.
Pasteur L. (1870). Études sur la maladie des vers à soie (flacherie), pp. 226—240. Gauthier-Villars. Quoted by Toumanoff (1954).
Polson A. & Wyckoff R. W. G. (1948). The amino acid content of bacteriophage. Science, *108*, 501.
Smith N. R., Gordon R. E. & Clarke F. E. (1946). Aerobic mesophilic spore-forming bacteria. Misc. Publ. U. S. Dep. Agric. no. 559. Issued 1952 as Aerobic sporeforming bacteria, U. S. Dep. Agric., Agricultural Monograph no. 16.
Steinhaus E. A. (1951). Possible use of Bacillus thuringiensis Berliner as an aid in the biological control of the alfalfa cater-pillar. Hilgardia, *20*, 359.
Steinhaus E. A. (1954). Further observations on Bacillus thuringiensis Berliner and other sporeforming bacteria. Hilgardia, *23*, 1.
Toumanoff C. & Vago C. (1951). L'agent pathogène de la flacherie des vers à soie endémique dans la région des Cevénnes; Bacillus cereus var. aleste var nov. C. R. Acad. Sci., Paris, *233*, 1504.
Toumanoff C. & Vago C. (1952). La nature de l'affection des vers à soie due à Bacillus cereus var. alesti et les modalités d'action de ce bacille. Ann. Inst. Pasteur, *83*, 421.
Toumanoff C. & Vago C. (1953a). Étude histopathologique des vers à soie atteints de Bacillus cereus var. alesti. Ann. Inst. Pasteur, *84*, 376.
Toumanoff C. & Vago C. (1953b.) Recherches sur l'effet toxique de Bacillus cereus var. alesti vis-à-vis des vers à soie. Ann. Inst. Pasteur, *84*, 623.
Toumanoff C. (1954). A propos d'un caractère différentiel de Bacillus cereus var. alesti Toum. et Vago, agent pathogène de la flacherie infectieuse des vers à soie. Ann. Inst. Pasteur, *87*, 486.
Toumanoff C., Vago C. & Gladiline C. (1954). Recherches sur l'effet toxique de Bacillus cereus var. alesti vis-à-vis des vers à soie. Ann. Inst. Pasteur. *86*, 438.

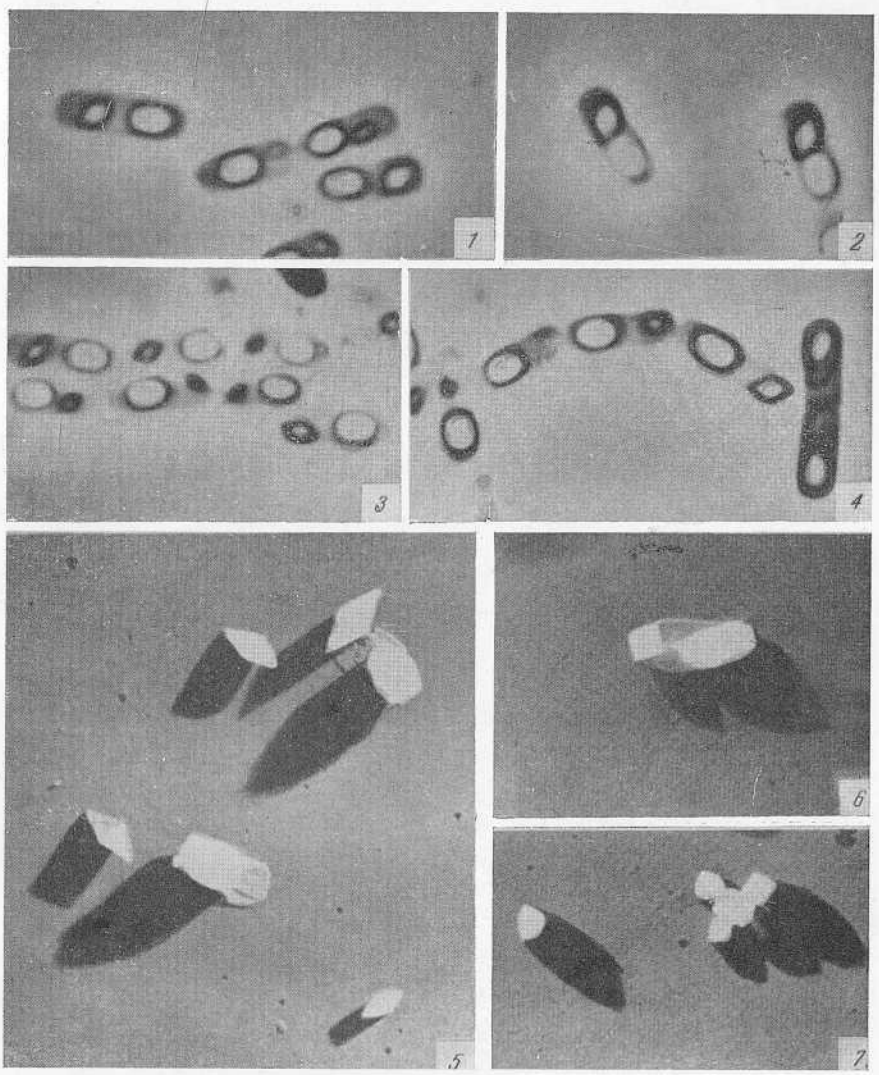


Таблица 1.

1—4. Кристаллы и споры в клетках Bacillus thuringiensis. Каждая клетка содержит одну преломляющую свет спору и дин преломляющий свет кристалл. Фазовый контраст. Фотография д-ра Робинау. Увеличение в 3600 раз.

5. Свободные кристаллы и споры. B. thuringiensis. Негативный отпечаток электронной микрографии напыленного золотом препарата. Увеличение в 7500 раз.

6. Клетка, содержащая спору и кубовидный кристалл. Штамм B. thuringiensis № 16-1-1, изолированный и описанный д-ром Стейнгаусом (1954). Негативный отпечаток электронной микрографии напыленного золотом препарата. Увеличение в 7500 раз.

7. Свободные кубовидный и ромбовидный кристаллы, продуцируемые штаммом B. thuringiensis № 16-1-1. Негативный отпечаток электронной микрографии напыленного золотом препарата. Увеличение в 7500 раз.

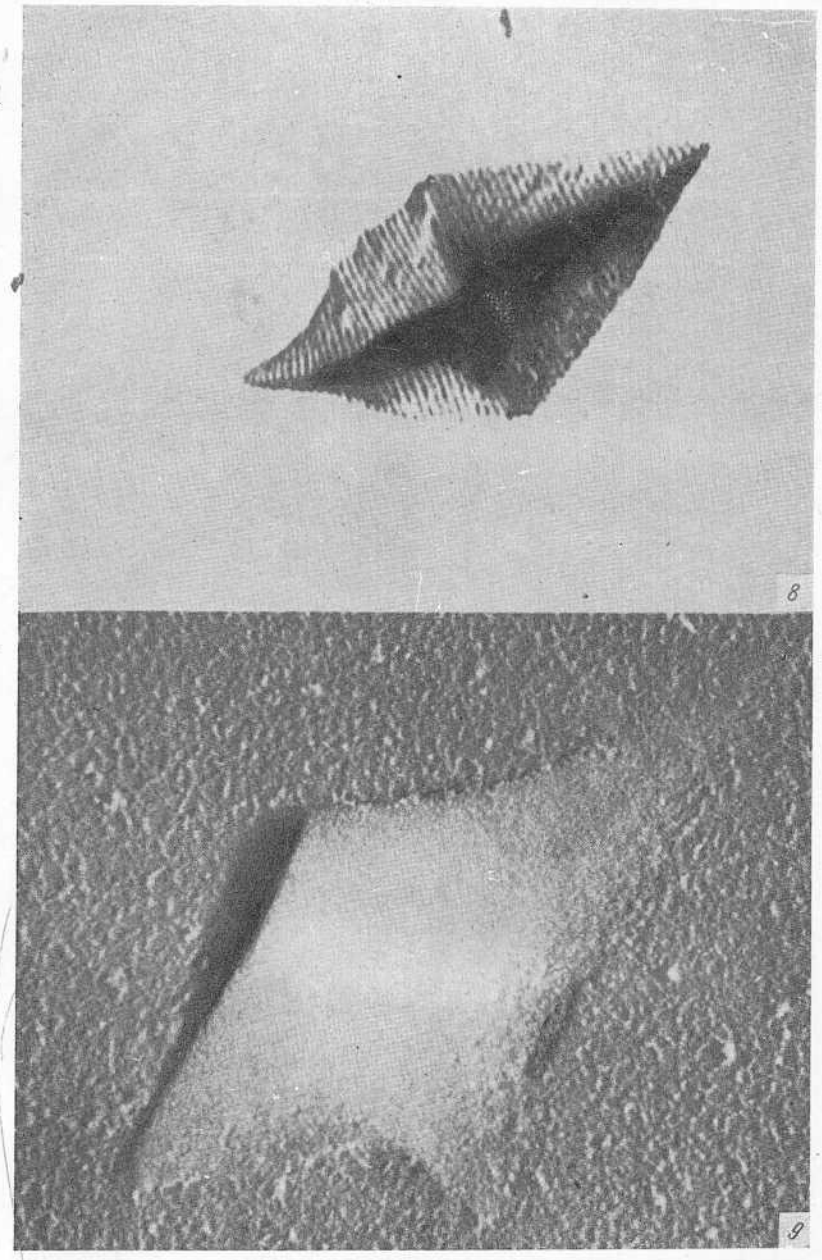
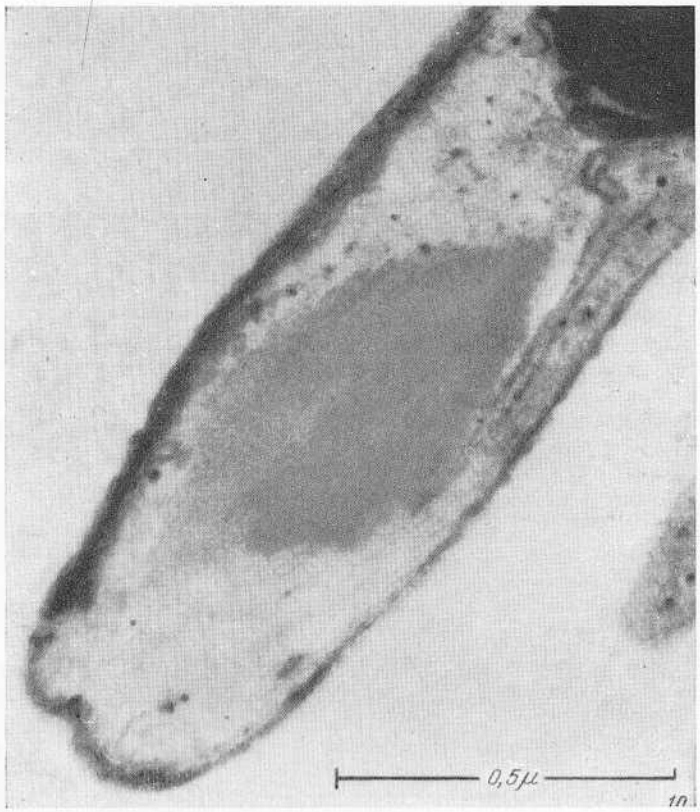


Таблица 2.

8. Оболочка белкового кристалла. Bacillus thuringiensis. Позитивный отпечаток электронной микрографии напыленного палладием препарата. Увеличение в 54 000 раз.

9. Белковый кристалл после обработки 0,02 М раствором углекислого натрия. Негативный отпечаток электронной микрографии напыленного ураном препарата. Увеличение в 25 000 раз.



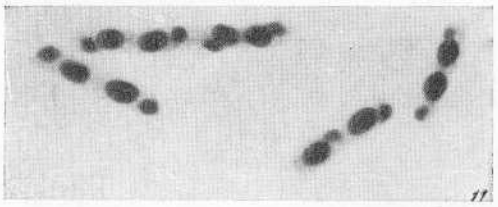
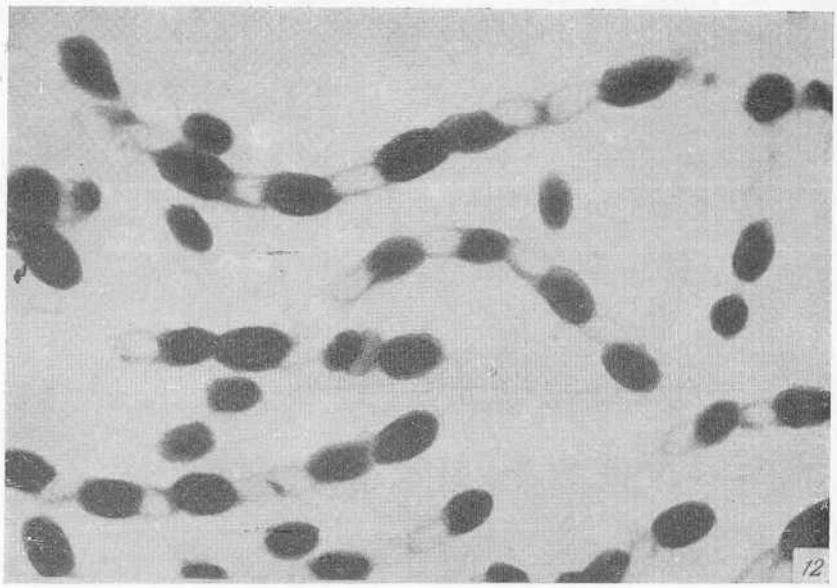


Таблица 3.

10. Электронная микрография ультратонкого среза Bacillus thurigniensis, показывающая часть клетки, содержащей кристалл и спору. Часть споры показана в верхнем правом углу. Внешняя оболочка споры в данной клетке тесно связана с оболочкой, которая проходит от споры под кристаллом к концу клетки, где она образует петлю. Хроматиновое тельце, которое не образовало спору, предполагалось найти в пространстве, занятом петлей. Взвесь клеток была фиксирована осмием, залита в метакрилатовую смолу; срезы были получены при помощи микротома Портера-Блюма. Увеличение в 94 000 раз.

11. Микрофотография (оптический микроскоп) того же препарата до заливки в метакрилат. Клетки B. thuringiensis в начальной стадии споруляции. Содержимое спор окрашено однородно. Около каждой споры по одному развивающемуся кристаллу. OsO_4, HCl, Гимза, недифференцировано. Увеличение в 3600 раз.



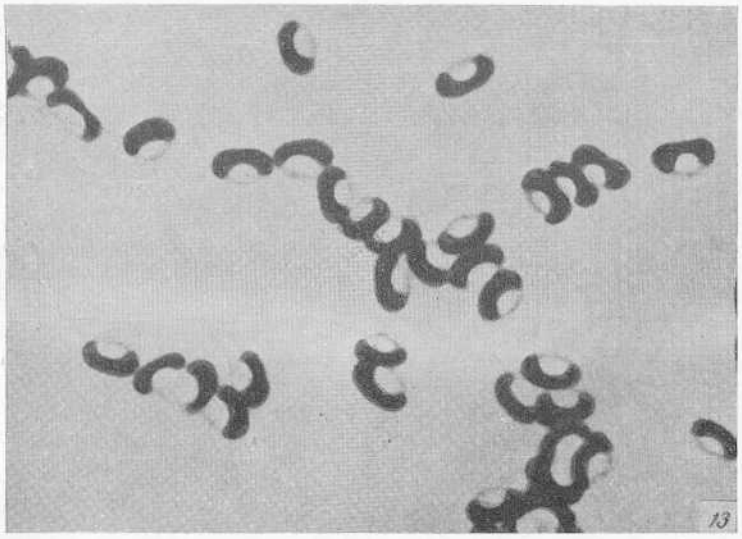


Таблица 4.

12. Цепочка клегок, содержащих неокрашенные светопреломляющие споры и интенсивно окрашенные, включенные в оболочки параспоральные тельца. В каждой клетке содержится по одному параспоральному тельцу и по одной споре. Бациллы выращены на полусинтетической среде Bacillus medusa. Изолированная д-ром Робинау. Разбавленный карболовый фуксин. Увеличение в 3600 раз.

13. Споры и параспоральные тельца B. laterosporus. Каждая неокрашенная светопреломляющая спора включена в метахроматически окрашенное челнообразное параспоральное тельце. Препарат и фотография д-ра Робинау. Окраска по Гимза. Увеличение в 3600 раз.

СТРОЕНИЕ И РАЗВИТИЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ДЛИННЫХ ФОРМ БАКТЕРИЙ

У. Х. ХАГС

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ К. Е. ЧЕЛЛИС

Институт Райта-Флеминга, Госпиталь св. Марии, Лондон

Существование микробов, отличающихся по внешнему виду от типичных, было обнаружено и описано многими сотнями исследователей. Здесь невозможно дать обзор некоторых ранних работ и это уже было сделано с большими подробностями Ленисом (Lohnis, 1921). Авторы этих ранних работ разделялись на две группы: большинство, которое рассматривало изменения морфологии как доказательство существования жизненного цикла у бактерий, и меньшинство [например, Фишер (Fischer), 1903], рассматривавшее их как чисто инволюционные. Эти две школы продолжают существовать и сейчас и мостик между ними еще не переброшен. Энли Уокер и Меррей (Ainley Walker, Murray, 1904) одни из первых установили, что, действуя на тифозные палочки метилвиолетом, можно вызвать изменения, обычно описываемые как спонтанные. С тех пор были выявлены многие другие действующие подобным образом и доступные проверке агенты, и эта сторона проблемы была освещена в обзоре Дайнса и Вейнбергера (Dines, Weinberger, 1951). Положение в период между обзором Лениса и обзором Дайнса удовлетворительно изложено Валиным и Альмаденом (Wahlin, Almaden, 1939).

Вследствие распространенной ошибки в обозначении важно определить точно, что такое «длинная форма» и что может быть справедливо названо L-формой. Хотя Streptobacillus moniliformis имеет почти такую же внешность, как и ненормальные формы у других организмов, желательно исключить этот микроорганизм из данного обсуждения, поскольку слишком большое внимание к нему нарушает перспективу. К сожалению, в прошлом многие, включая автора, неправильно поняли употребление Клинебергер-Нобл (Klieneberger-Nobel) термина «L-форма», считая его синонимом «крупных тел». Правильнее было бы

Таблица 1

Методы индуцирования длинных форм у различных организмов

Организм	Провоцирующий агент	Автор
Escherichia coli	Пенициллин, стрептомицин, ауреомицин, хлоромицетин и терамицин	Пальвертафт (Pulvertaft) (1952)
	Бактериофаг	Горрил и Челляйс (Gorrill, Challice) (1955)
	Рицинолеат натрия	—
	Аминокислоты	Роулей (Rowley) (личное сообщение)
	Ультрафиолетовые лучи	Челляйс и Горрил (1954)
	Хлорамфеникол и антисыворотки	Вурека (Voureka) (1951)
	Стрептомицин	Стабблфелд (Stubblefield) (1947)
E. coli communis	Изменения pH	Валин и Альмаден (Wahlin, Almaden) (1939)
Aerobacter aerogenes	Недостаток фосфора и азота; наличие углекислого кальция; изменение pH в кислую зону; 2% хлористый литий	Дагид (Duguid) (1948)
		Валин и Альмаден (1939)
Salmonella typhi	Метилвиолет, фуксин, метилгрюн и метиленовая синька	Энли Уокер и Меррей (Ainley, Walker, Murray) (1904)
	Изменение pH	Валин и Альмаден (1939)
	Пенициллин	Дайнс (Dines) (1948a)
	Антитело и комплемент	Дайнс, Вейнбергер и Медоф (Weinberger, Madoff) (1950)
	Карбоксилметоксиламин глицин	Дайнс, Вейнбергер и Медоф (1950)
	Среда с тяжелой водой	Ченс и Венделл (Chance, Wendell) (1946)
S. typhimurium	Фуразолидон	Гобсон (Hobson) (личное сообщение)
Другие салмонеллы	Изменения pH	Валин и Альмаден (1939)
	Аминокислоты	Дайнс и Замечник (Zamecnic) (1952)
	Свежевыделенные	Вайнбергер, Медоф и Дайнс (1950); Тейлор и Харс (Taylor, Hughes) (не опубликовано)
Shigella	Свежевыделенные	Вейнбергер и др. (1950)
S. sonnei S. flexner	Изменения pH; безазотистая среда; глицерин	Валин и Альмаден (1939)
Proteus vulgaris	Пенициллин	Флеминг, Воурека, Кремер и Харс (Fleming, Voureka, Kramer) (1950)

Организм	Провоцирующий агент	Автор
	Пенициллин, стрептомицин, ауреомицин, хлоромицетин	Пальвертафт (1952)
	Пенициллин	Тюлянь (Tulasne) (1949)
	1—2% карболовая кислота	Мольтке (Moltke) (1927)
		Браун и Соломон (Braun, Solomon) (1918)
Vibrio cholerae	Глицин и аналин	Гордон и Гордон (Gordon, Gordon) (1943)
	Пенициллин	Флеминг и др. (1950)
	Низкая температура и подсохшая среда	Альмквист (Almquist) (1922)
Bacillus mycoides	Безазотистая среда	Найзи и Бекер (Knaysi, Baker) (1947)
B. cereus	Пенициллин, стрептомицин, ауреомицин, хлоромицетин	Пальвертафт (1952)
Clostridium welchii	Пенициллин, отсутствие магния	Гарднер (Gardner) (1940); Уэбб (Webb) (1948)
C. tetani и др.	Пенициллин	Дайнс (1950)
Brucella abortus	2% хлористый литий	Валин и Альмаден (1939)
Haemophilus influenzae	Аминокислоты	Дайнс и Замечник (1952)
	Плотная среда	Дайбл (Dible) (1924)
Corynebacterium diptheriae	Подсохшая среда	Альмквист (1922)
	Пенициллин	Дайнс (1948б)
Bacterioides		
Streptococcus haemolyticus	Концентрация NaCl 0,25—0,1 М и другие электролиты	Шарп (Sharp) (1954)
S. viridans	Пенициллин	Дайнс (1948б)
Haemophilus pertussis	Иммунитет	Уайттлер (Wittler) (1952)
Bacterium lactis aerogenes	Резорцин, м-крезол	Спрей и Лодж (Spray, Lodge) (1943)
	Натрий рицинолеат и γ-лучи	Генрици (Henrici) (1925) и др. (1937)

[Палвертафт (Pulvertaft), 1952] ограничить применение термина «L-формы» теми формами S. moniliformis и других организмов, которые постоянно остаются в цикле, и описывать ненормальные формы, возвращающиеся в исходное состояние, как длинные формы или крупные тела, придерживаясь всегда этих описательных терминов. Из дальнейшего будет видно, что L-формы и длинная форма применяются как синонимы во многих современных статьях по данному вопросу, и необходимо устанавливать, к какой частной номенклатурной школе каждый автор принадлежит.

Даже описательный термин «длинная форма» нуждается в определении, так как колебания в размере встречаются и

при нормальном развитии культуры. Разница между длинной формой и клеткой, которая отличается только размером, но в других отношениях нормальна, отражается морфологически в ее способе деления. Крупная нормальная клетка в благоприятной окружающей среде делится на две равные дочерние клетки; при соответствующих условиях длинная форма может делиться более чем в одной точке, давая вместо двух большее количество клеток, обычно отличающихся одна от другой по размеру — явление, подобное плазмотомии у простейших. Различие не абсолютное, и этот критерий должен применяться разумно. Наличие одной или двух анормальных клеток в культуре, в частности свежевыделенной, вполне обычно. Точно так же в каждой культуре с преобладающими анормальными формами, каким бы причудливым ни было большинство клеток, часто можно обнаружить небольшое количество нормальных клеток. Этот постоянный переход от нормального к анормальному обязан колебанию в чувствительности индивидуальных клеток в чистой культуре, даже если они находятся в тесном родстве [Хагс (Hughes), 1953б, 1955б]. Когда Дагид (Duguid, 1948) встречался с такой смесью нормальных и анормальных бацилл, он относился к культуре как к промежуточной.

Установлено, что очень широкий ряд организмов дает длинные формы. Табл. 1, составленная на основании современной литературы, дает убедительное подтверждение этого. Coccaceae могут быть включены, но измененное реагирование этих родов делает их менее пригодным для работы. Длинные формы несомненно существуют у энтерококков, и Дайнс, которому вначале не удавалось показать что-либо похожее у стрептококков, в настоящее время получил положительные результаты (1953).

Этот список, взятый вместе со списком Лениса (1921), показывает, что в него включены почти все члены семейства Schizomycetes.

ИНДУЦИРУЮЩИЕ АГЕНТЫ

Табл. 1 показывает также, что существует три основных класса агентов, вызывающих появление длинных форм в культурах: (1) разнообразные яды, включая антибиотики; (2) голодание; (3) физические травмы. В первом классе наиболее ранним примером является, вероятно, действие метилвиолета на тифозные бациллы (Энли Уокер и Мерреи, 1904), наиболее поздний пример — большинство антибиотиков (Палвертафт, 1952; Дайнс и Вейнбергер, 1951). Во втором классе азотное голодание [Дагид, 1948; Найзи и Бекер (Knaysi, Baker), 1947] оказывается таким же эффективным, как и антибиотики. Не всегда ясно, который из двух возможных агентов является ответственным за появление отдельной длинной формы. Возможно, что многие работники неумышленно употребляли смешанные стимулы. Даже если

были применены антибиотики, и, возможно, во многих исследованиях, подчеркивается, что длинные формы чаще появляются на голодных средах или после длительного культирования без пересевов или на высыхающих средах. Здесь наибольшее влияние может оказать азотное голодание. В других случаях прибавляются вещества, которые могут действовать как ингибиторы для одного организма, будучи в то же время источником энергии для других. Глицерин является хорошим примером этого (Валин и Альмаден, 1939). Аминокислоты представляют особый интерес. Роулей (Rowley, 1953) показал, что на химически определенной среде некоторые из аминокислот тормозят развитие штаммов Escherichia coli и что это действие может быть нейтрализовано прибавлением минимальных количеств других аминокислот. Он, однако, не обратил внимания на факт, что заторможенные штаммы превращались в длинные формы при воздействии соответствующих аминокислот и что они дают реверсию в нормальные бациллы при восстановлении благоприятных условий. Аминокислоты следуют непосредственно за антибиотиками по той легкости, с которой они индицируют длинные формы. Дж. Гордон и М. Гордон (1943), применяя глицин и аналин, вызывали образование длинных форм у Vibrio cholerae в то время как Дайнс и Замечник (Zamecnic) (1952) нашли, что глицин, метионин, фенилалалин, триптофан и тирозин эффективны для различных организмов.

Третья группа менее специфичных травм включает физические агенты. Изменение pH в щелочную зону является причиной образования длинных форм Shigella sonnei, а в кислую зону — Salmonella typhi (Валин и Альмаден, 1939). Эффективно действует также замораживание (Дайнс, 1942; Клинебергер-Нобл, 1954б) и облучение β- и γ- лучами [Леа, Хейнс и Кулсон (Lea, Haines, Coulson, 1937]. Ультрафиолетовый свет [Горрил и Челляйс (Gorill, Challice, 1954; Челляйс и Горрил, 1954] должен быть рассмотрен особо, так как он имеет двойное воздействие. Он может быть эффективен сам по себе, но может и индуцировать образование бактериофага, который также является причиной появления длинных форм. Морфологически длинные формы, вызванные одним путем, неотличимы от таковых, вызванных другим или тем и другим вместе. Кроме того, комплемент и антитело вызывают этот эффект у S. typhi (Дайнс, Вейнбергер и Медофф, 1951), но также вызывают реакцию между антигеном и антителом.

По-видимому, мало внимания обращалось на наличие длинных форм в свежем патологическом материале. Они часты в гное, мокроте и моче у нелеченных больных, так же как и после лечения антибиотиками, когда их появление можно предвидеть. Они появляются в моче больных пиелитом и циститом после применения аутовакцины и легче фагоцитируются, чем нормальные бактерии. Дайнс и Вейнбергер (1951) приводят доказательства

того, что культура в длинной фазе менее вирулентна, чем исходный штамм.

Все воздействия, вызывающие образования длинных форм, более или менее повреждающие, но важно отчетливо представлять, что некоторые длинные формы также появляются на ранних этапах развития культуры в искусственных средах, обычно рассматриваемых как адекватные их потребностям. У салмонелл, например, Вейнбергер, Медофф и Дайнс (1950) описали некоторое количество таких клеток в свежевыделенной культуре. Дайнс и Вейнбергер (1951) считают, что они редко встречаются среди салмонелл. Это не соответствует моим собственным наблюдениям, так как даже в штаммах, изменившихся в лаборатории, например S. 2297/53, приготовленном Стокером, рассевы молодых культур на чашки показывают наличие подобных форм [Хагс и Тейлор (Hughes, Taylor), не опубликовано]. Они, конечно, могут быть легче получены при химической обработке (Энли Уокер и Меррей, 1904; Альмквист, 1922; Валин и Альмаден, 1939; Дайнс и Замечник, 1952). У Escherichia coli количество естественно возникающих длинных форм может быть повышено при помощи селекции (Хагс, 1953а). В более поздних исследованиях (Хагс, 1955а) было найдено, что если скудно растущие колонии E. coli были отобраны при помощи микроманипулятора, оказалось возможным выделить штамм, вообще растущий с трудом в обычных культуральных условиях. У такого селекционированного штамма не только колонии очень мелки по сравнению с таковыми исходного штамма, но многие клетки совсем не развиваются в колонии и вырастают в виде настоящих длинных форм. Последние, однако, возобновляют нормальный рост при пересеве в бульон с блоков питательного агара в масляной камере, где они развивались.

Выше было высказано предположение, что некоторые длинные формы возникают в молодых культурах при нормальных условиях. Из этого не следует, что если отдельный штамм организма может легко расти на среде, то питательные свойства этой среды оптимальны для каждой индивидуальной клетки штамма. В литературе по этому вопросу можно найти указания о различиях в поведении индивидуальных клеток. Это было сделано на основании изучения вариаций в одной клетке и можно легко показать, что при клеточном делении две дочерних клетки реагируют различно на одну и ту же степень воздействия (Хагс, 1955б). Появление длинных форм в свежевыделенной культуре не следует рассматривать как нечто более нормальное, чем если среда умышленно приготовлена неблагоприятной по отношению к большинству клеток культуры. Превосходной иллюстрацией этого положения являются опыты, в которых стрептомицин не дается нуждающемуся в данном антибиотике штамму [Пейн и Финленд (Paine, Finland), 1948]. В этом случае многие клетки также становятся длинными, хотя обычный, не содержащий стрепто-

мицина агар не может рассматриваться как неподходящая среда.

Вероятно, имеются основания для предположения, что наличие некоторого количества длинных форм в культуре является показателем несоответствия или токсичности среды и что количество этих форм пропорционально этому несоответствию или токсичности. Там, где это представляет собой преходящий феномен и длинные формы не обнаруживаются в субкультурах, они будут устранены селекцией, и штамм в целом может считаться адаптированным вследствие гибели чувствительных клеток. Если считается желательным изучать наличие длинных форм в культурах, то важно, чтобы повторное изучение имело место во время первых часов роста, так как лизис и зарастание нормальными мелкими формами затемнит картину. Неправильно, что длинные формы не образуются в жидких средах, однако они очень быстро замещаются мелкими, хорошо адаптированными формами, делаются незаметными и наконец лизируются.

Свермеры вульгарного протея нуждаются в специальном обсуждении. Этот организм особенно подходит для изучения индуцированных длинных форм и крупных тел, так как он очень легко реагирует на влияние многих агентов. Это было описано Гаузером (Hauser, 1885). Трудно, если не невозможно обнаружить какую-либо разницу в морфологии между индуцированными длинными формами и спонтанными свермерами. Среди последних можно обнаружить часть шаров. Было высказано предположение, что образование свермеров вызывается накоплением продуктов обмена веществ колонии или истощением азота в среде. Цикл роста для этого организма может, таким образом, быть следующим: мелкие формы, размножаясь, образуют колонию, которая уменьшает содержание усвояемого азота и выделяет продукты обмена веществ; окружающая среда становится менее благоприятной, и чувствительные клетки развиваются в длинные формы, которые подвижны на агаре или других плотных средах, они движутся прочь от колонии, пока не достигают свежего пространства, где окружающая среда соответствует исходной; здесь они распадаются на мелкие формы, которые затем начинают новый цикл. Степень ненормальности, проявляющейся свермерами, будет зависеть от их индивидуальной чувствительности и концентрации метаболитов. Частный вариант этого процесса обнаруживается тогда, когда два несовместимых штамма роятся один по направлению к другому (Дайнс, 1949). В этом случае длинные формы и шары образуются там, где оба штамма сближаются.

Мольтке (Moltke, 1947) пришел к двум выводам относительно свермеров. Первый вывод, — что они не способны размножаться и должны обязательно погибнуть и что размножение колонии зависит от запаса мелких форм, которые сопровождают свермеров из глубины колонии. Второе заключение состояло в том, что среда в результате роста микробов не становится токсичной, так

как колония может распространяться через агаровый блок, на котором был предварительно получен рост, после чего блок был освобожден от организмов, промыт и вмонтирован в свежую среду.

Эти два вывода нуждаются в проверке. Жизнеспособность клеток в культуре не постоянна. Если исследуется жизнеспособность в молодой бульонной культуре, 95% или больше клеток дадут образование колоний. Если исследуются свермеры из колонии, развившейся на агаре, их нежизнеспособность более высока, как показывают приводимые ниже опыты.

Молодая бульонная культура Proteus vulgaris была рассеяна на чашки с хорошо подсушенным питательным агаром и на агаровые блоки и посев помещен в термостат. Количество организмов делящихся, растущих, но не делящихся или показывающих признаки лизиса, определялось в микроскоп. Через определенные промежутки времени приготовлялись последующие блоки путем приготовления части края колонии взвеси организмов в бульоне и нанесения этой взвеси на блоки. Последние в свою очередь инкубировались и подсчитывались тем же путем. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Жизнеспособность свермеров Proteus vulgaris на различных стадиях роста

	Процент		
	делящихся	неделящихся	лизирующихся
Нормальные мелкие формы	92	7	1
18-часовые свермеры	19	26	55
48-часовые свермеры	1	—	99

Это не означает, что в роящейся колонии отсутствует запас мелких клеток, а повсюду непрерывно падает только жизнеспособность длинных клеток. Случается также, что последние жизнеспособные клетки отлагаются роящейся культурой на ее краю и являются наиболее четко выраженными деталями при исследовании в микроскоп.

Деление постоянно имеет место во время стадии роения, и мелкие, относительно нормальные формы возникают из свермеров глубоко в колонии, так что в конце роения только клетки, у которых деление тормозится, признаются длинными, те же, которые лучше адаптированы, успевают уже разделиться.

Наличие токсических веществ также нуждается в дополнительном рассмотрении. Если организмы выращиваются на целлофановых кружках на агаровых чашках и кружки после роения снимаются, возможно вновь засеять чашку и получить рост там, где были диски, или вызвать обратное роение от края. При

применении фильтровальной бумаги результаты получаются различные и при наличии предварительного роста имеется тенденция торможения роения. Эта методика не так удовлетворительна, как с более однородной мембраной, так как организмы проходят через бумажку и остаются рассеянными на светлом в других отношениях участке. Кроме того, хорошо известно, что роение тормозится высокими концентрациями агара; у моего штамма 4,5% агара останавливали совершенно роение, и во всех опытах должно иметь место некоторое постепенное подсыхание и увеличение концентрации среды в чашках Петри. Роение может быть обнаружено на сухой среде только при концентрациях агара, равных после высушивания 1—4%. Простое роение без образования длинных форм имеет место на среде, содержащей меньше 1% агара. При концентрации свыше 4% агара длинные формы хотя и появляются, но не могут двигаться и давать характерное явление «роя». Остается мало сомнений в том, что роящиеся протеи находятся под влиянием неблагоприятного окружения и что они представляют собой пример индуцированных длинных форм.

При объяснении опытов, в которых в культуре индуцируются длинные формы, мы находимся в более благоприятном положении, чем были прежние исследователи, и применяемая в настоящее время техника допускает проверку опытным путем некоторых умозрительных предположений. Прежние методы основывались на окрашенных препаратах, приготовленных через различные интервалы после высева на чашки. Ненормальные формы, в частности шары и длинные формы с шаровидными расширениями, чрезвычайно хрупки и методы приготовления мазков, аналогичные применяемым в обычных бактериологических исследованиях, разрушают многие из этих форм и дают ложную картину в целом. Модификация этого метода — техника отпечатков на покровных стеклах Лединга ма, Клинебергер-Нобл и других — явилась значительным усовершенствованием, но такие препараты дают статическую картину, и хотя могут быть сделаны повторные отпечатки и их последовательность тщательно зарегистрирована, нет оснований полагать, что формы, обнаруженные в серии позже, происходят из форм, виденных раньше, если период генерации неизвестен и возраст исходного посевного материала также не определен; образцы, взятые через 5 часов культивирования, могут содержать более молодые формы, чем образцы, взятые через 20—30 минут. Второй недостаток старых методов заключается в том, что убивание, фиксация и окраска клеток вызывают сморщивание цитоплазмы, которая может быть изменена в большей степени, чем клеточная стенка или перегородка; уменьшение диаметра может достигать у целой клетки 30% и даже больше у содержимого, которое может отделяться от стенки. Росс (Ross, 1953) изучал сморщивание в процессе фиксации животных клеток аналогичными резуль-

татами. В-третьих, у бактерий трудно установить точно, какие клетки в культуре были живые и какие мертвые или отмирающие до того, как они были окрашены. Наконец, так как клетки в культуре делятся обычно в различные отрезки времени, окрашенные препараты-отпечатки показывают все стадии в одно и то же время. Попытки синхронизировать деление во всех клетках культуры были сделаны Бирч-Андерсеном, Ларком, Маалое и Сьострандом (Birch-Andersen, Lark, Maaløe, Sjöshand 1954).

РАЗВИТИЕ ДЛИННЫХ ФОРМ

Длительное наблюдение развивающейся клетки ведет начало преимущественно от работ Орскова (Ørskov). С появлением современного фазово-контрастного оборудования другие исследователи получили возможность развивать метод Орскова и производить серийные фотографии или замедленные микрокиносъемки и таким образом непосредственно устанавливать последовательность развития отдельных клеток или небольших групп [Флеминг, Вурека, Крамер (Fleming, Voureka, Kramer) и Хагс, 1950; Клинебергер-Нобл, 1952б; Палвертафт, 1952; Хагс, 1953а, б]. Стадии разития различных анормальных форм из мелких организмов как будто не изучались систематически этим путем другими исследователями и последующее описание основано преимущественно на цитированных выше и моих собственных неопубликованных работах. Большинство наблюдений произведено над Proteus vulgaris, подвергнутым воздействию пенициллина.

Развитие Proteus vulgaris в критических концентрациях антибиотика

Если молодая культура перенесена в неблагоприятное окружение, то последующий процесс определяется многочисленными факторами. Провоцирующий агент (или неполноценность среды) должен быть так оттитрован, чтобы некоторый рост имел место; некоторые агенты, особенно пенициллин, могут быть применены в пределах широкого ряда разведений, но в отношении других агентов, обладающих критической концентрацией, небольшой избыток оказывается смертельным с самого начала, тогда как концентрация несколько более низкая не дает эффекта. Подобные низкие концентрации, не дающие эффект вначале, становятся действительными при старении культуры, усиливаясь изменениями среды.

У Proteus vulgaris, даже если культура была незадолго до опыта получена из одной клетки, у отдельных клеток может быть выявлено различие (Хагс, 1953а,б, 1955а, б). В то время как одни развиваются в типичные длинные формы, другие лизи-

руются, а некоторые могут быть относительно незатронутыми. Поэтому метод отбора проб через различные интервалы, заменяющий концентрацию внимания на небольшой группе клеток и наблюдение за их индивидуальным развитием, не рекомендуется.

а) *Стадия удлинения*

Если наблюдать Proteus vulgaris в критической концентрации антибиотика в микроскопе, первое видимое изменение сказывается в непрерывном удлинении. Увеличение толщины менее четко. В этих концентрациях редко происходит деление, за исключением некоторых клеток, которые могут находиться в состоянии деления при переносе из нормальной среды.

Удлиненный организм подвижен и при переносе в нормальную среду развивается нормально. Под фазовым контрастом он или однородно непрозрачен, или имеет чередующиеся темные и светлые участки. Активность жгутиков, даже у неподвижных клеток, обнаруживается движением мелких частиц или «мертвых» организмов в непосредственной близости к ним, особенно если эти частицы располагаются между спиралями извитой нити: спирали вращаются в одном направлении, беспорядочно разбросанные частицы — в противоположном. Свободно плавающие формы иногда собирают свои жгутики в пучки, которые могут быть легко обнаружены в течение короткого времени в оптическом микроскопе, особенно если один организм проходит между двумя другими, остающимися неподвижными, или если спиралевидная клетка вращается при наличии лишь небольшого расстояния между завитками. Движение жгутиков более быстрое, чем колебание свободно плавающего организма (Флеминг и др., 1950; Флеминг, 1950).

б) *Образование вздутий*

Последующее развитие заключается в колбовидном расширении части нити. Колбы представляют собой утолщение на одном конце или по длине организма в совершенно случайном положении и имеют оптическую плотность, ничем не отличающуюся от таковой остальной части нити. Обычно весь организм, включая вздутие, жизнеспособен при устранении действия антибиотика. В нормальной среде нить со своим вздутием, как и другие жизнеспособные формы, распадается на многочисленные единицы, которые после этого нормально делятся, становясь короче при каждом делении до тех пор, пока они не оказываются неотличимыми от клеток исходного штамма, из которого длинные формы произошли. Если колбовидное расширение располагается по длине нити, одно из первых делений проходит через

середину этого расширения, давая две палицеобразные дочерние клетки, и некоторое время после этого последние могут отличаться от остальных клеток.

в) *Стадия дегенерации*

Последующее развитие сопровождается определенными необратимыми изменениями, которые могут содержать объяснение феномена. Колбовидные вздутия расширяются и постепенно становятся менее темными, показывая сетчатую структуру. Из содержимого клетки развиваются волокна, отделяющиеся одно от другого прозрачными пространствами, образуя сетку, которая может быть замещена грубыми зернами. Это то явление, которое в окрашенных препаратах привлекало к себе так много интереса и интерпретировалось как часть жизненного цикла, в котором колбы считались плодоносными телами, спорангиями или другими репродуцирующими структурами. Некоторые исследователи, включая Найзи (1951), собирали серии фотографий или рисовали диаграммы, иллюстрирующие стадии образования колб из петли нити, слияние перекрещивающихся сторон петли в кольцо, развитие этого кольца в колбу и образование мелких форм внутри колбы. Я не смог подтвердить это в серийных фотографиях и фильмах. Наоборот, колбы развивались из утолщения по длине нити, и отсутствовала необходимость в образовании спиралей для их образования. Если нить с прикрепленной к ней крупной колбой перенесена в нормальную среду, она быстро начинает делиться, но колба при этом разрывается, освобождая содержащийся в ней материал в виде аморфного детрита. Все нормальные клетки в культуре после этого происходят из непрозрачных нитей и никогда не было обнаружено возникновение их из обломков колб. Некоторые колбы, в которых развилась сетчатая структура, представляют собой мертвые или умирающие формы. Вадас и Юхас (Vadász, Juhász, 1955) сообщили, что из полностью развившихся колб сальмонелл могут возникать нормальные организмы.

В клетках, подвергающихся и дальше неблагоприятным воздействиям, колбы продолжают увеличиваться и в одной нити могут появиться многочисленные вздутия, не обязательно все в одной и той же стадии развития. Мелкая непрозрачная форма и крупная сетчатая могут быть связаны нитью, лишь немногим более широкой, чем нормальные нити. Организм еще подвижен, как и все остальные, и движения его жгутиков координированы. Он может распадаться, по-видимому, скорее путем лизиса сегмента, не обязательно содержащего колбу, чем при помощи нормального деления. Если колба разрывается, содержимое нити может также выливаться наружу, и вся клетка в целом погибает.

Некоторые нити показывают сетчатую структуру, подобную таковой у колб, ассоциирующуюся с утолщением, однородным

по всей длине. Такие нити, подобно колбам при пересеве, нежизнеспособны и в конце концов лизируются. Клетки без темных пятен не делятся и у немногих нормальных организмов, появляющихся в субкультурах, можно обнаружить сохранившиеся темные сегменты. Хотя колбовидные расширения и прозрачные нити быстро лизируются при пересеве в нормальную среду и в конце концов лизируются, если их оставить без пересева, и хотя они чрезвычайно хрупки, все же не все из них могут считаться мертвыми, так как подвижность жгутиков иногда сохраняется в течение многих часов после того, как способность к репродукции полностью утрачена. Совершенно круглые организмы с немногими частицами материала, представляющего исходную структуру внутренности клетки, могут иметь жгутики, ритмично движущиеся или собирающиеся в связки наподобие волосяных кос, колеблющиеся и способствующие продвижению обреченной клетки.

Я убежден, что в культурах, которые я изучал, ни одна клетка, показывающая при фазово-контрастной микроскопии прозрачную сетчатую конфигурацию внутреннего строения, не была полностью жизнеспособна и что наличие такого строения является доказательством необратимой дегенерации.

Непрозрачные клетки могут быть разрушены механически или щелочью и содержимое может вытечь наружу, образуя неопределенное скопление непрозрачной жидкости и оставляя остаток клетки прозрачным. В жидкости из этих клеток невозможно различить при помощи оптического микроскопа какую-либо структуру; отсутствует ядро с определенной оболочкой или другие форменные элементы.

ИЗУЧЕНИЕ ПРИ ПОМОЩИ ЭЛЕКТРОННОГО МИКРОСКОПА

Предполагали, что электронный микроскоп может выявить структуры, лежащие ниже разрешающей способности оптического микроскопа. Смит, Мадд и Халлье (1948) уже сообщили свои наблюдения над культурами Streptobacillus moniliformis, и их ультратонкие срезы являются контролем для наших собственных наблюдений (1954). Мы полагаем, что эти исследователи и Сьостранд (Бирч-Андерсен и др., 1954) пока представили наиболее истинную картину внутреннего строения бактерий. Методы, которые мы применяли, включают ультратонкие срезы так же, как напыленные препараты целых клеток (Чаллис и Хагс, 1954; Чаллис, 1954).

Клетки, подвергшиеся наименьшему воздействию, ничем не отличаются от нормальных коротких форм, за исключением длины (табл. 1, *5* и *6*); в напыленных препаратах они показывают наличие такой же высоты, как и ширины. Колбы и сегменты нитей, соответствующие прозрачным анаголичным формам в

прижизненных препаратах, представляются сплющенными и клеточное содержимое выглядит в виде сетки или распавшимся на фрагменты. После напыления они кажутся распластанными на поддерживающей оболочке (табл. 1, *7*).

На срезах бактерий выявляются дальнейшие детали. Удовлетворительные результаты могут быть получены только в том случае, если уделяется много внимания тому, чтобы избежать артефактов, вызванных сморщиванием. Мы считаем, что истинная картина может быть получена лучше всего в том случае, если взвесь организмов, выросших в бульоне или на плотной среде, отмывается от белков и полипептидов путем центрифугирования в изотоническом буферном растворе и затем фиксируется в осадке изоосмотическим раствором осмиевой кислоты (Палад, 1952).

При применении этого метода отсутствует большая разница между внешним видом, наблюдаемым в электронном микроскопе и при помощи фазового контраста, и имеется значительное соответствие с окрашенными препаратами-отпечатками Клинебергер-Нобл или культурами на покровном стекле Флеминга. Мы нашли, что чем более осторожно фиксированы клетки, тем меньше структур они выявляют на срезах и тем лучше содержимое прилежит к клеточной стенке.

Поверхностные и косые срезы показывают, что существует потенциальное пространство между собственно клеточной стенкой и тем, что обычно называется внутренней ограничивающей оболочкой. Это пространство при несовершенных методах фиксации значительно увеличивается и ошибочно, как мы считаем, интерпретировалось как существование цитоплазматического пространства. Оно не видно у живых организмов, но легко может образоваться как на высушенных пленках, так и во влажных препаратах при обработке кислотой. Нормальные срезы проходят через содержимое клетки, более поверхностные — показывают, что материал полностью наполняет клетку (табл. 2, *9*). Срезы, проходящие через середину клетки, часто выявляют несимметричное пространство, проницаемое для лучей. Это — важная деталь снимков Хиллье и Сьостранда. Это пространство или вакуоль видны при фазово-контрастной микроскопии; оно представляет собой светлую полосу в конфигурации молодых длинных форм. Ничего соответствующего ему не было обнаружено на окрашенных препаратах. Подобное явление обнаруживается при помощи интерферентного микроскопа [Доддс (Dodds), личное сообщение]. Срезы длинных форм как из роящихся культур, так и из обработанных ингибиторами выявляют детали, близко соответствующие напыленным препаратам целых клеток и живым фазово-контрастным препаратам. Длинные формы, которые представляются однородно непрозрачными при фазовом контрасте, обладают теми же внутренними структурами, что и нормальные бациллы. Те, которые имеют пестрый вид, пока-

зывают повторяющуюся смену светлых и темных полос и наводят на мысль о спиральном строении (табл. 2, *10*). Клетки с прозрачными утолщениями или сегментами показывают фрагментацию клеточного содержимого, пряди и узлы непрозрачного материала разделяются промежутками, в которых ничего не обнаруживается (табл. 2, *11*). Наивысшая стадия образования колб часто ассоциируется с разрывом стенки клетки и часто можно видеть только пустую оболочку. Заслуживает внимания, что после того, как это случается, остается мало специфического детрита и не обнаруживается ничего, что можно было бы считать митохондриями, ядром или какими-либо другими форменными структурами.

Наиболее важный факт, выявленный на срезах, касается самой клеточной стенки. У здоровых контрольных клеток и у длинных форм, которые можно считать сохранившими жизнеспособность, эта стенка однородно плотная и гладкая, а в колбовидных расширениях и в утративших жизнеспособность сегментах обнаруживается шероховатость, слоистость или истонченность (табл. 2, *12*). Мы считаем, что в этом заключается существенная разница между жизнеспособными клетками и клетками, необратимо поврежденными. Стенка у нежизнеспособных клеток перестает быть эффективным осмотическим барьером и все появляющиеся структуры, волокнистость и узловатость содержимого, представляют собой гидратацию; эти изменения того же происхождения, что и при повреждении антибиотиками и другими химикалиями, голоданием, фагом или Х-лучами или ультрафиолетовым светом. Что это так, может быть также выведено из сравнения морфологических изменений, обнаруженных и описанных у длинных форм и крупных шаров с изменениями, о которых сообщалось под названием плазмолиза и плазмоптиза. Фишер (1900) показал типичные крупные формы, вызванные действием уксусной кислоты. При нейтрализации кислоты они исчезали. Эта работа была подтверждена Гарбовским (Garbowski, 1907) и Рейхелем (Raichel, 1928), которые применяли гипотонические растворы и дистиллированную воду (см. обзор Найзи, 1951). Хотя эти авторы рассматривают наблюдавшийся ими феномен как обязанный осмотическому эффекту, было отмечено, что при воздействии нормального раствора азотнокислого калия колбы возникали лишь через 15—20 минут. Штапп и Зиха (Stapp, Zycha, 1931) получили сходные результаты, применяя сернокислый магний. Колебания в резистентности отдельных клеток к одной и той же осмотической концентрации оказываются в тесной связи с их резистентностью к антибиотикам.

Наблюдения Вейбулла (1953) с лизоцимом могут быть объяснены как другой пример следствия ослабления клеточной стенки. Протопласты, которые он фотографировал и к которым еще были прикреплены жгутики, имеют тот же вид, что и клетки, подвергнутые действию дистиллированной воды, или наиболее выра-

женные сферические формы, возникающие при действии пенициллина.

Возможно, что если бы Дайнс (1949) интересовался в большей степени плазмолизом, а не L-формами и длинными формами, он объяснил бы действие водопроводной воды на протея скорее как пример первого, чем последнего феномена. Кажется, мало оснований сомневаться, что преодоление осмотического барьера клеточной стенки, первично ли, при прямом действии гипотонических растворов, или путем разрушения стенки химическими или другими агентами, вызывает морфологические изменения, которые неотличимы друг от друга.

СПОНТАННОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ КУЛЬТУР, ПОДВЕРГНУТЫХ ДЕЙСТВИЮ АНТИБИОТИКОВ

Многие авторы отмечали появление мелких клеток в поздних стадиях развития культуры. Были предложены различные объяснения этого явления. Те авторы, которые видели жизненный цикл в развитии длинных форм и шаров, считали мелкие клетки завершением этого цикла. Серийные фотографии или замедленные микрокиносъемки, однако, показали такую последовательность: в старых культурах, где многие из длинных форм образовали колбовидные утолщения и дегенерировали, а другие представляли собой лишь пустые оболочки, остаются некоторые клетки, содержащие сегменты, еще темные при фазово-контрастной микроскопии и еще жизнеспособные при пересеве. Эти сегменты, даже если они остаются в неблагоприятных условиях, отделяются один от другого, но не нормальным делением, а путем лизиса промежуточных частей. Затем может случиться одно из двух. Если токсический агент нестабилен, как, например, пенициллин, его концентрация падает до тех пор, пока не прекращается тормозящее действие на оставшиеся селекционированные сегменты, которые продолжают рост так, как если бы они были пересеяны на более благоприятную среду, и скоро начинают превосходить численностью отмершие клетки, находящиеся вместе с ними. Если, однако, токсический агент стабилен, несмотря на то, что его концентрация не падает, некоторые из сохранившихся элементов приобретают резистентность, достаточно высокую для того, чтобы дать им возможность расти; эти элементы размножаются, пока не начинают преобладать. Менее резистентные клетки постепенно лизируются и исчезают.

Во время развития мелких форм в старых культурах случайные сочетания дают обоснования для теорий жизненного цикла, обязанные лишь тому, что не была прослежена непосредственно последовательность единиц и что в распоряжении исследователя имелись только окрашенные препараты. Первый пример этого показан в табл. 1, *4*. Это часть серий фотографий, снятых для того, чтобы проследить восстановление клеток после прекра-

щения действия пенициллина (Флеминг и др., 1950). Было бы резонным предположить, если бы это были фиксированные препараты и не было бы других оснований для того, чтобы идти дальше, что крупные колбы лопнули, освобождая многочисленные мелкие палочки. Тем не менее все эти палочки развились из короткой нити, приставшей на конце колбы (табл. 1, *1*). Этот вводящий в заблуждение факт — общий для всех восстанавливаемых культур.

Второй пример был бы даже более трудно объясним при исследовании фиксированных и окрашенных препаратов. Он имеет место тогда, когда очень мелкие формы содержатся внутри крупных колб. Невозможно разъяснить это иначе, чем тем, что мелкие формы лежат над или под колбой, как мне удалось это наблюдать в некоторых случаях при исследованиях в живом состоянии подвижных мелких форм внутри колбы при ограничении их подвижности стенками колбы. Длинные формы могут быть также обнаружены как непрерывно вращающиеся внутри колб. В случае мелких форм это наблюдалось в старой культуре в стадии восстановления. Хвостики колб отделяются и образуют мелкие клетки, тогда как некоторые из колб лизируются, другие остаются в виде пустых оболочек с отверстиями в них, через которые для мелких форм возможно найти проход. Это зависит не от беспорядочного движения мелких форм, проходящих случайно через относительно мелкие отверстия, а от специфической особенности недавно отделившихся клеток в растущей культуре. Немедленно после деления все клетки, как правило, движутся одна к другой или к остальной части колонии. Нормально движение у двух клеток, отделившихся одна от другой, выражается в движении от положения полюсной связи (одна за другой) в положение параллельное. Если рядом с ними оказывается длинная форма или колба, это движение после разделения отклоняется и они следуют к новой поверхности, имеющейся здесь. Колония, которую они образуют, уже не компактна и кругла, а вытягивается. Этот тропизм к поверхностям направляет их к отдельным отверстиям в стенке колбы и они проникают внутрь ее при следующем делении. С этого времени деление начинает совершаться внутри колбы, и в подвижных культурах клетки, оказывающиеся снаружи, рано или поздно передвигаются прочь, в то время как находящиеся внутри оказываются пойманными. Вращение длинных форм в колбе может возникать в культуре во всякое время и является, вероятно, очень частым феноменом. Всякий, кто знаком с приготовлением агаровых блоков, знает, какие незначительные препятствия достаточны для изменения конфигурации длинных форм. Они всегда следуют линии наименьшего сопротивления и показывают также отклонение для того, чтобы следовать вдоль поверхности, находящейся перед ними. Если передний конец длинной формы отклоняется для встречи с задним концом, он должен пройти вдоль нее, образуя хорошо

известную спираль, и может вращаться часы и дни подряд. Некоторые длинные формы, встречая шаровидные формы, которые развиваются, проходят вдоль их поверхности и, направляясь в отверстие, могут быть пойманы внутри шара[1].

КОЛОНИИ ДЛИННЫХ ФОРМ

Существуют, наконец, колонии длинных форм. Нелегко это утверждать, поскольку никто пока не проследил их развитие из одной клетки. Появление колонии показано в табл. 2, *13* и сравнено с колонией мелких форм (табл. 2, *14*) из той же культуры и соседнего поля. Можно видеть, что она образована из длинных и колбовидных форм и четко отличается по чувствительности от остальной части культуры, которая образует крупные колонии нормальных мелких форм. При пересеве в бульон она реверсирует в мелкие формы, но колонии этого типа в руках Тюляня, Дайнса и Клинебергер-Нобл действительно развивались даже при устранении пенициллина и других провоцирующих условий. Законно на данном этапе рассматривать эти колонии как селекционированные культуры, у которых была воспитана чувствительность к условиям обычного агара. Что некоторые организмы сохраняют длинноклеточные колонии только на агаре — не удивительно, так как возможно селекционировать организмы, которые плохо адаптируются к плотной среде. Только такие отборные колонии представляют собой истинные L-культуры. Их основная характеристика заключается в том, что они не восстанавливают нормальной морфологии в повторных субкультурах.

Присутствие длинных форм и крупных колб в культуре является мерилом несоответствия среды для поддержания существования некоторой части или всей культуры. Мы наблюдаем в микрокосмосе законы селекции и адаптации. В наших посевах имеются многочисленные индивидуумы, не способные существовать на искусственных средах; они лизируются и обычно не обнаруживаются и не описываются. Кроме того, многие могут расти, но не могут делиться; это длинные формы. В нитях, которым они дают начало, имеются отдельные сегменты, которые отличаются по своей устойчивости один от другого; приспособленные лучше других образуют центр будущего роста и возрождения, менее приспособленные дают начало дегенеративным колбам. В посеве также имеются клетки, соответственно адаптированные с самого начала, они вырастают в виде мелких форм и быстро заполняют культуру. Нити, образующиеся раньше,

[1] Весь процесс проникновения подвижных нормальных клеток и длинных форм внутрь «колб» через имеющиеся в последних щелевидные отверстия, описываемый автором, весьма проблематичен. Более проблематичен во всяком случае, чем объяснение появления мелких клеток внутри «колб» их развитием из способной к регенерации зернистости. *Ред.*

скоро становятся незаметными, и субкультуры как будто не содержат их, пока не применяется специальная техника получения одноклеточных культур, которая позволяет выделить штамм, растущий очень скудно и составленный преимущественно из длинных форм, подобных исходной клетке.

Вместо того, чтобы допускать первичную токсическую причину изменений и факт, что колбы и прозрачные формы — определенно дегенеративные образования [Хейлмен (Heilman), 1941], возможно предполагать, что для организма имеется преимущество во временном пребывании в длинной фазе, так как это может сильно повысить естественную степень вариабильности культуры, тем самым давая любой возможный шанс для появления резистентных индивидуумов.

ВЫВОДЫ

Длинные и крупные формы обнаружены почти у всех бактерий. Это может означать, что они являются или стадиями в жизненном цикле, или формируются в результате травмы. Последний взгляд подтверждается в данной работе. Травмы, дающие этот эффект, могут быть подразделены на химические агенты, недостаточность питания и физические условия. Организмы и индивидуальные клетки варьируют в своей чувствительности к отдельным воздействиям.

Электронная микрография тонких срезов подтверждает взгляд, что дегенерация стенки и гидратация содержимого клетки являются существенными изменениями, вызывающими развитие крупных форм. Эти изменения необратимы.

Возобновление нормального роста в культурах и образование здоровых коротких форм зависят от присутствия в длинных нитях сегментов с повышенной резистентностью, способных сохранять жизнеспособность. Из них регенерирует культура.

ЛИТЕРАТУРА

Ainley Walker E. W. & Murray W. (1904). The effect of certain dyes upon the cultural characters. Bzit. med. J. ii, 16.

Almquist E. (1922). Variation and life cycles in pathogenic bacteria. J. infect. Dis. *31*, 483.

Braun H. & Solomon R. (1918). Die Fleckfieber Proteusbazillen. Z. Bakt. *82*, 243.

Birch-Andersen A., Lark K. G., Maaløe O. & Sjöstrand F. S. (1954). A study of sections of bacteria undergoing synchronous nuclear division. Proc. int. Congr. Electronmicroscopy, London, 1954.

Challice C. E. (1954). The electron microscope, with particular reference to its use in biological research. Part II. Histological techniques for electron microscopy. Lab. Practice, *3*, 279.

Challice C. E. & Gorrill R. H. (1954). Some observations on the morphological changes in E. coli accompanying induction by ultra violet light. Biochim. biophys. Acta, *14*, 482.

Challice C. E. & Hughes W. H. (1954). Proc. int Congr. Electronmicroscopy, London.
Chance H. L. & Wendell C. A (1946). The influence of heavy water on the growth, morphology and fermentative reactions of Eberthella coli. J. Bact. *51*, 547.
Dible J. H. (1924). The haemophilic bacteria of the normal throat: their types and incidence. J. Path. Bact. *27*, 151.
Dienes L. (1942). Significance of large bodies and development of the L-type of colonies in bacterial cultures. J. Bact. *44*, 37.
Dienes L. (1948a). Isolation of L-type colonies from typhoid bacilli with the aid of penicillin. Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y., *68*, 589
Dienes L. (1948б). The isolation of L-type cultures from Bacteroides with the aid of penicillin and their reversion into the usual bacilli. J. Bact. *56*, 445.
Dienes L. (1949). The development of Proteus cultures in the presence of penicillin. J. Bact. *57*, 529.
Dienes L. (1950). Isolation of L type cultures from Clostridia. Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., *75*, 412.
Dienes L. (1953). L. type cultures isolated from streptococci. Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., *83*, 579.
Dienes L. & Weinberger H. J. (1951). The L-forms of bacteria. Bact. Rev. *15*, 248.
Dienes L., Weinberger H. J. & Madoff S. (1950). The transformation of typhoid bacilli into L-forms under various conditions. J. Bact. *50*, 755.
Dienes L., & Zamecnic P. C. (1952). Transformation of bacteria, intro L-forms by amino acids. J. Bact. *64*, 770.
Duguid J. P. (1948). The influence of cultural conditions on the morphology of Bacterium aerogenes, with reference to nuclear bodies and capsule size. J. Path. Bact. *60*, 265.
Fischer A. (1900). Die Empfindlichkeit der Bakterienzelle und das Bakteriecide serum. Z. Hyg. InfectKr. *35*, 1.
Fischer A. (1903). Vorlesungen über Bakterien, 2nd edit. Jena: G. Fischer.
Fleming A. (1950). Further observations on the motility of Proteus vulgaris grown on penicillin agar. J. gen. Microbiol. *4*, 457.
Fleming A., Voureka A., Kramer I. R. H. & Hughes W. H. (1950). The morphology and motility of Proteus vulgaris and other organisms cultured in the presence of penicillin. J. gen. Microbiol. *4*, 257.
Garbowski L. (1907). Gestaltsänderung und Plasmoptyse. Arch. Protistenk. *9*, 53.
Gardner A. D. (1940). Morphological effects of penicillin on bacteria. Nature, Lond., *146*, 837.
Gordon J. & Gordon M. (1943). Involution forms of the genus Vibrio produced by glycine. J. Path. Bact. *55*, 63.
Gorrill R. H. & Challice C. E. (1955). Further observations on the electron microscope changes following induction of E. coli K. 12. Biochim. biophys. Acta, *16*, 82.
Hauser G. (1885). Über Fäulnisbakterien und deren Beziehungen zur Septicaemie, p. 99. Leipzig: Tag.
Heilman F. R. (1941). A study of Asterococcus muris. J. infect. Dis. *69*, 32.
Henrici A. T. (1925). On cytomorphosis in bacteria. Science, *61*, 644.
Hughes W. H. (1953a). The origin of the L-form variants in anaerobic cultures of Bacterium coli. J. gen. Microbiol. *8*, 307.
Hughes W. H. (1953б). In Adaptation in Micro-organisms, p. 250. Edit. E. F. Gale & R. Davies. Cambridge: University Press.
Hughes W. H. (1955a). The inheritance of differences in growth rate in Escherichia coli. J. gen. Microbiol. *12*, 265.
Hughes W. H. (1955 б). The differences in antibiotic sensitivity of closely related single cells of Proteus vulgaris. J. gen. Microbiol. *12*, 269.
Klieneberger-Nobel E. (1951a). Filterable forms of bacteria. Bact. Rev. *15*, 77.

Klieneberger-Nobel E. (1951б). The L-cycle: a process of regeneration in bacteria. J. gen. Microbiol. *5*, 525.
Knaysi G. & Baker R. F. (1947). Demonstration, with the electron microscope, of a nucleus in Bacillus mycoides grown in a nitrogenfree medium. J. Bact. *53*, 539.
Knaysi G. (1951). Elements of Bacterial Cytology, 2nd ed. New York. Comstock.
Lea D. E., Haines R. B. & Coulson C. A. (1937). The action of radiation on bacteria. Proc. Roy. Soc. B, *123*, 1.
Löhnis F. (1921). Studies upon the life cycles of bacteria. Mem. nat. Acad. Sci. *16*, 335.
Moltke O. (1927). Contributions to the Characterisation and Systematic Classification of Bact. proteus vulgaris (Hauser.) Copenhagen: Levin and Munksgaard.
Paine T. F. & Finland M. (1948). Observations on bacteria sensitive to, resistant to and dependent upon streptomycin. J. Bact. *56*, 207.
Palade G. E. (1952). A study of fixation for electron microscopy. J. exp. Med. *95*, 285.
Pulvertaft R. J. (1952). The effect of antibiotics on growing cultures of Bacterium coli J. Path. Bact. *64*, 75.
Raichel B. (1928). Ueber den Einfluss osmotisch wirksamer Mittel auf die Bakterienzelle. Arch. f. Protistenk. *63*, 333.
Ross K. F. A. (1953). Cell shrinkage caused by fixatives and paraffin wax embedding in ordinary cytological preparations. Quart. J. micr. Sci. *94*, 125.
Rowley D. (1953). Inhibition of E. coli straings by amino acids. Nature, Lond., 171, 80.
Sharp J. T. (1954). L. colonies from haemolytic streptococci: new technique in the study of L forms bacteria. Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., *87*, 94.
Smith W. E., Mudd S. & Hillier J. (1948). L-type variation and bacterial reproduction by large bodies as seen in electron micrograph studies of Bacteroides funduliformis. J. Bact. *56*, 603.
Spray G. H. & Lodge R. M. (1943). The effects of resorcinol and of M-cresol on the growth of Bact. lactis aerogenes. Trans. Faraday Soc. *39*, 424.
Stapp C. & Zycha H. (1931). Morphologische Untersuchungen an Bacillus mycoides: ein Beitrag zur Frage des Pleomorphismus der Bakterien. Acrh. f. Mikrobiol. *2*, 493.
Stubblefield E. (1947). Globulus and stranded forms of B. coli on streptomycin agar. J. Bact. *54*, 81.
Tulasne R. (1949). Existence of L-forms in common bacteria and their possible importance. Nature, Lond., *164*, 876.
Vadász J. & Juhász I. (1955). Plasma globules of Salmonella enteritidis (var. danysz) arising under the influence of penicillin and their reversion to the original bacillary forms. Nature, Lond., *176*, 169.
Vourek A. (1951). Production of bacterial variants in vitro with cloramphenicol and specific antiserum. Lancet, i. 27.
Wahlin J. G. & Almaden P. J. (1939). Megalomorphic phase of bacteria. J. infect. Dis. *65*, 147.
Webb M. (1948). The influence of magnesium on cell division. J. gen. Microbiol. *2*, 275.
Weibull C. (1953). The isolation of protoplasts from Bacillus megaterium by controlled treatment with lysozyme. J. Bact. *66*, 688.
Weinberger H. J., Madoff S. & Dienes L. (1950). The properties of L-forms isolated from Salmonella and the isolation of L-forms from Shigella. J. Bact. *59*, 765.
Wittler R. G. (1952). The L-form of haemophilus in the mouse. J. gen. Microbiol. *6*, 311.

Таблица 1.

1—4. Регенерация крупных форм при устранении фактора, под влиянием которого они возникли. Электромикрография. Увеличение в 600 раз. Колбовидные расширения дегенерируют; нормальные клетки возникают из более нормальных элементов в хвостике клетки.
5. Нормальные бактерии, данные для сравнения с измененными формами на микрофотографиях *6—8*. Электромикрография. Увеличение в 7000 раз.
6. Длинные формы Escherichia coli B., вызванные действием ультрафиолетового света, показывают плотную структуру жизнеспособных клеток. Электромикрография. Увеличение в 7000 раз.
7. Вызванные действием пенициллина формы, показывающие сплющивание нежизнеспособных клеток. Электромикрография. Увеличение в 10 000 раз.
8. Сплющенная длинная форма с колбовидным сегментом в середине и явно жизнеспособный тип. Электрономикрография. Увеличение в 10 000 раз.

Таблица 2.

9—12. Электрономикрографии.
9. Срез контрольных нормальных клеток. Увеличение в 7000 раз.
10. Срез свермера Ptoteus vulgaris, показывающий чередующийся узор более или менее плотного материала. Увеличение в 7000 раз.
11. Вызванные действием пенициллина формы, показывающие развитие сетчатой структуры. Увеличение в 10 000 раз.
12. Дегенерирующие формы, показывающие расслоение клеточной стенки и распад содержимого. Увеличение в 7000 раз.
13. Колония крупных форм на агаре. Увеличение в 120 раз.
14. Колония мелких вариантов, состоящая из нормальных форм, и край нормальной колонии. Увеличение в 120 раз.

ADTI
AXB.-RESURS MARKAZI
INV № 6742

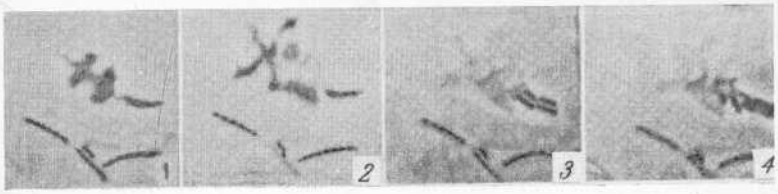
28764

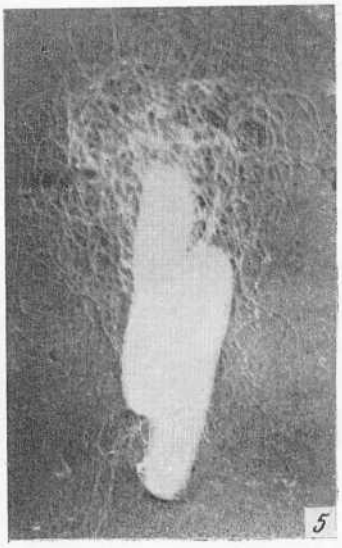
БИБЛИОТЕКА
ГОСУ 1959
МЕДИЦИНСКАЯ
г. АНДИЖАН

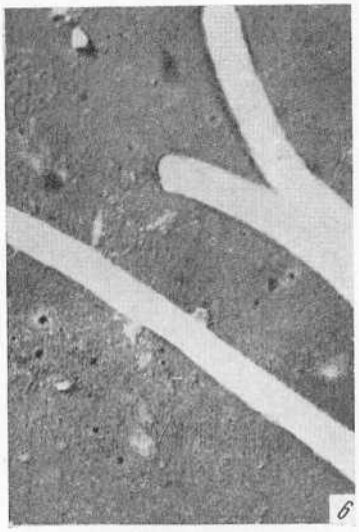
Редактор *Г. П. Калина*
Техн. редактор *Н. А. Бульдяев* Корректор *В. Н. Самсонова*
Переплет художника *Я. А. Маликова*

Сдано в набор 28/II 1959. г. Подписано к печати 22/X 1959 г.
Формат бумаги 60×92 $^1/_{16}$=24,50 печ. л. + 1,75 печ. л. вкл.
(условных 26,25 л.) 25,85 уч.-изд. л. Тираж. 4000 экз. Т 11661 МН-72

Медгиз, Москва, Петровка, 12
Заказ 1083 Типография Кошшута Будапешт
Цена 13 р. 40 к. Переплет 2 р.







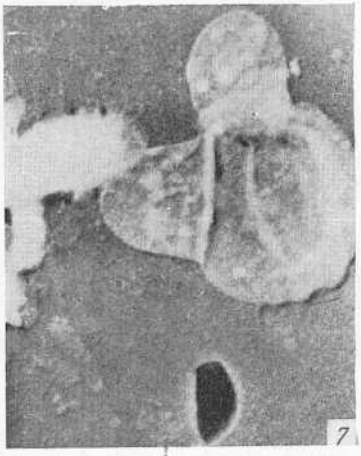
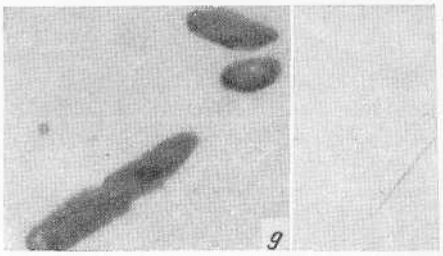
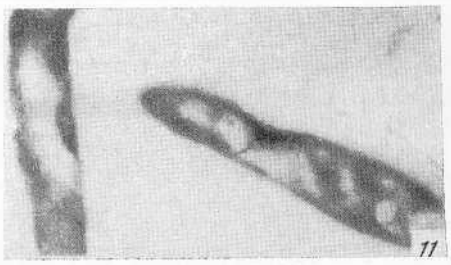
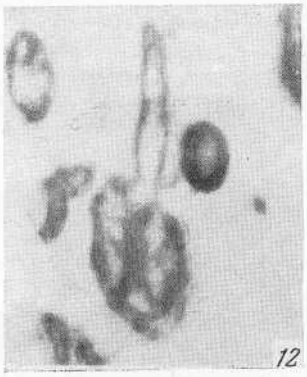
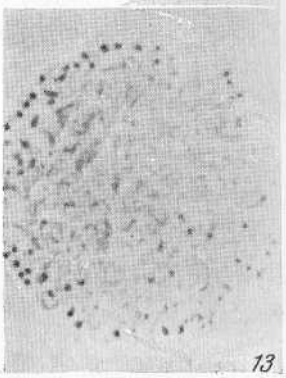


Таблица I.









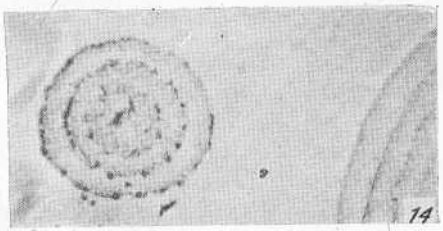


Таблица 2.