УДК 579: 632.35

ОСОБЕННОСТИ РОСТА БАКТЕРИЙ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ОЖОГ ЛИСТЬЕВ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР, ПРИ ПЕРВИЧНОМ ВЫДЕЛЕНИИ *IN VITRO*

Шевченко С.И., к.б.н., и.о. доцента, Кармышев Ю.В., аспирант

Мелитопольский государственный педагогический университет

При первичном выделении бактерий ожога листьев плодовых деревьев на питательную среду происходит разрушение вегетативной структуры бактериальной клетки и появление электронно-прозрачных форм. Активация бактериальной хромосомы приводит к формированию внутри формы гранулярной цитоплазмы с агрегированными участками - полирибосомами, где происходит сборка вегетативной бактериальной клетки, способной к бинарному делению *de novo.*

Ключевые слова: ожог листьев, питательная среда, бактерии, de novo.

Шевченко С.І., Кармишев Ю.В. ОСОБЛИВОСТІ РОСТА БАКТЕРІЙ, ЩО ВИКЛИКАЮТЬ ОПІК ЛИСТКІВ ПЛОДОВІХ КУЛЬТУР, ПРИ ПЕРВИННОМУ ВИДІЛЕННІ *in vitro* / Мелітопольський державний педагогічний університет, Україна

При первинному виділенні бактерій опіку листків плодових дерев на поживне середовище відбувається руйнування вегетативної структури бактеріальної клітини та поява електронно-прозорих форм. Активація бактеріальної хромосоми призводить до формування усередині форми гранулярної цитоплазми з агрегованими ділянками — полірибосомами, де відбувається збирання вегетативної бактеріальної клітини здатної бінарного поділу *de novo.*

Ключові слова: опік листків, поживне середовище, бактерії, de novo.

S. I. Shevchenko., J.V. Carmishev FEATURES OF BACTERIA GROWTH, WHICH INVOKE SCALD OF LEAF FRUIT CULTURES, AT PRIMARY ABJECTION in vitro / Melitopol state pedagogical university, Ukraine

At primary abjection of bacteria of a leaf scald of fruit trees of arbors on nutrient envirovment there is a destruction vegetative structure of bacterial cell and appearance of the electron-lucent forms. The activation of bacterial chromosome results in formation inside the form granular cytoplasm with the aggregated parts - polyribosomes, where there is an assembly of vegetative bacterial cell, which is capable to binary division *de novo.*

Key words: leaf scald, nutrient environment, bacteria, de novo.

На юге Украины в деревьях черешни, сливы, абрикоса с симптомами ожога листьев (ОЛ) и персика с симптомами некроза прививочного узла нами были выявлены бактерии с необычным типом развития. Они присутствовали в клетках корневой, боковой и верхушечной меристемах растений. Колонии бактерий также обнаружены в проводящих системах ксилемы и флоемы молодых и одревесневших побегах. Связь развития патогена с меристемными клетками растения резко отличает их от других известных фитопатогенов. Отсутствие роста возбудителей (ОЛ) на обычных бактериальных средах требовало подбора их компонентов. Было установлено, что это связано с медленным ростом бактерий и наличием периода “адаптации” их к питательной среде при первичном выделении *in vitro* [1].

Неудачные попытки выращивать таких патогенов на питательных средах и виявление их внутри растительной клетки дало нам основание отнести их к риккетсиеподобным бактериям [2]. Сближает их с риккетсиями и тип развития в пораженной клетке. Бактерии размножаются в цитоплазме и ядре, вызывая деструкцию всей протоплазмы растительной клетки [3].

Такое внутриклеточное развитие выявленого нами возбудителя, имеет родство с развитием истинных риккетсий, которые в пораженной клетке строят свои морфологические структуры способные к бинарному делению, во время подготовительной “*эклипс – фазы”*. Во время этой фазы, когда риккетсии морфологически и серологически не выявляются, происходит накопление необходимых компонентов для формирования будущих морфологических структур возбудителя. Все это указывает на то, что первичные клетки риккетсий образуются в пораженных клетках *de novo* [4]. Эти данные дают возможность для перспективного изучения аналогичных форм патогенов.

Целью нашей работы было изучение особенностей ультраструктуры патогенов при первичном выделении из пораженных тканей растения в период их “адаптации” к питательной среде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выявление внутритканевой микрофлоры больных деревьев проводили на модифицированной агаризованной питательной среде ВС-ZE. Питательная среда содержала на 1л дистиллированной воды 5 г дрожжевого экстракта, 6 г казеина, 2 г водорастворимого крахмала, 3 г глюкозы, 2 г KH_2PO_4, 0,5 г MgO_4, 0,4 г хлорноватистокислого калия, 15 г бакто-агара, pH среды 6,8 [5].

Для ультрамикротомии выращенные колонии бактерий покрывали 1% коллодием, затем теплым агаром. Фиксировали 5%-ным глютаральдегидом в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0 и 1%- осмиевым фиксатором по Милонингу [6]. После обезвоживания в спиртах растущей концентрации, образцы заливали в эпоны при ступенчатой полимеризации. Срезы, полученные на ультрамикротоме “Tesla BC-490A”, монтировали на палладиевые сетки без подкладки, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу [7]. Просматривали в электронном микроскопе ЭМВ –100БР при инструментальном увеличении 5000-40000Х.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При первичном выделении возбудителя заболеваний на питательную среду, видимые формы колоний можно было наблюдать только после длительного срока инкубирования. Через 2-3 недели разложенные образцы обрастают бактериальной массой в виде узкого слизистого пояска вокруг них. При использовании растертой ткани больного дерева, а также выдавленного клеточного сока из молодых побегов, наблюдаются отдельные одиночные колонии за такой же промежуток времени. Одиночные колонии при первичном выделении встречаются крайне редко, в большинстве случаев вокруг участков тканей образуется бесформенная бактериальная масса. После суспендирования таких колоний в физиологическом растворе и повторном высеве на твердую питательную среду через 1-3 суток формируются одиночные колонии. Бесцветные колонии имели форму низких пирамид и достигали размеров от 0,2 до 0,8 мм в диаметре. Аналогичные формы колоний были характерны и для других косточковых и травянистых растений нашего региона (2). В серийных пассажах клеток из молодых колоний временных изменений в появлении колоний не наблюдается, что свидетельствует о наличии периода “адаптации” к питательной среде при первичном их выделении.

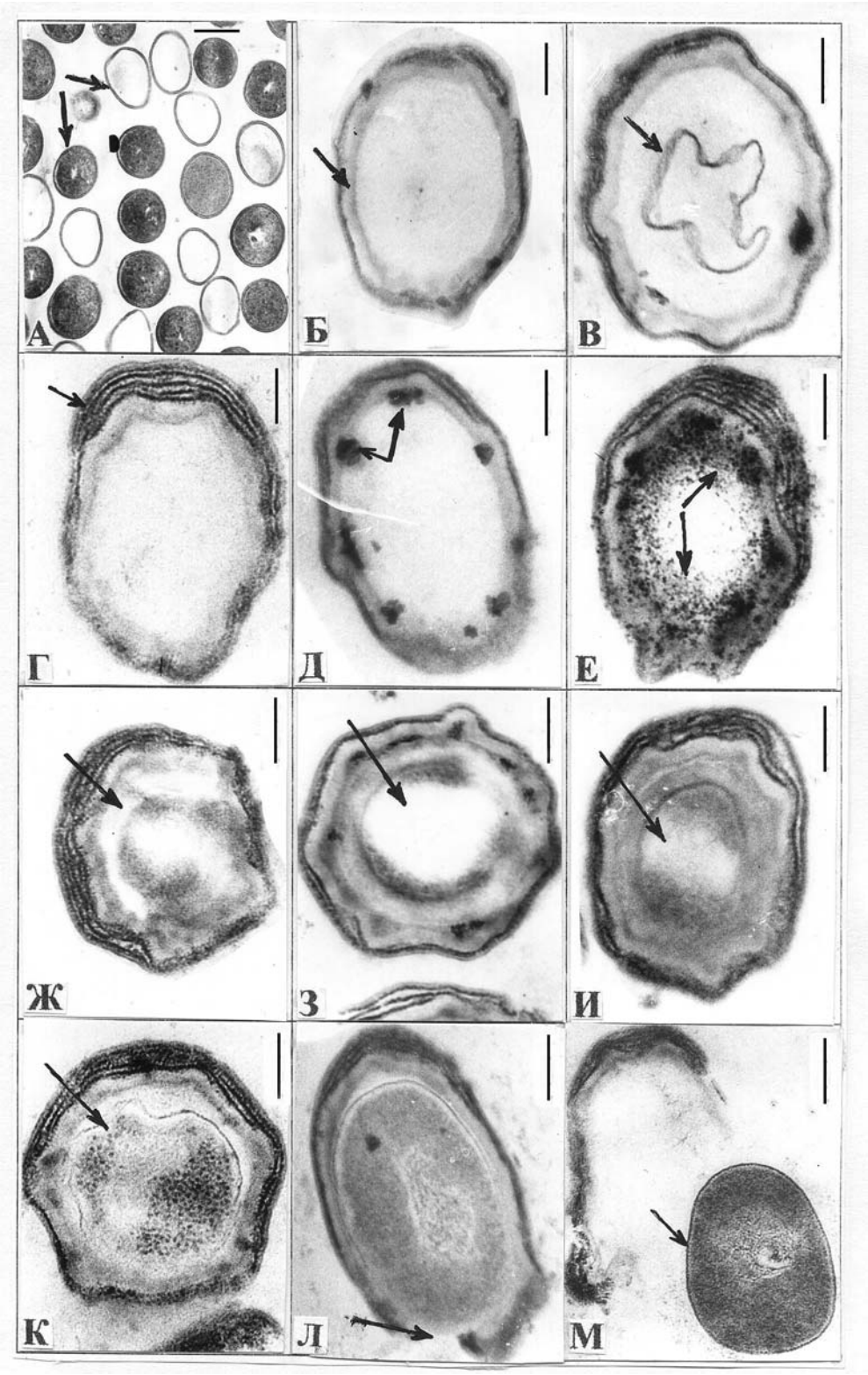
По результатам микроскопических исследований при первичном выделении возбудителя в первые 7-10 дней не наблюдали вегетативных бактериальных клеток способных к бинарному делению. На электронограммах присустствовали остатки растертой растительной массы и отдельные прозрачные бактерииподобные формы. Только через 10-12 дней инкубирования наблюдаются бактериальные клетки формирующие первичные колонии. Такие клетки присутствуют на протяжении всего периода роста колоний бактерий. После 30 дней культивирования рост колоний отсутствует. Средняя часть колоний имеет более плотный спектр цвета по отношению к периферической. Ультраструктура клеточных стенок не проявляет мембранных структур, характерных для вегетативных бактериальных клеток, приобретает дополнительную электронную плотность. В клетках с длительным термином культивирования практически отсутствует бинарное деление. Большинство из них теряют электронную плотность, протоплазма становится прозрачной (рис. 1. А, стрелка).

Таким образом, наблюдаются одинаковые клеточные формы, характерные для начального этапа первичного выделения и для клеток колоний, завершивших свой цикл развития. При первичном выделении в залитых образцах для ультрамикротомии присутствуют остатки растительной ткани и клеток возможных возбудителей болезни, что препятствует анализу этих событий. Для моделирования первичного выделения клетки старых колоний были перенесены на свежую питательную среду. На протяжении первых 4-5 дней большинство клеток сохраняют овальные электронно-плотные и электронно-прозрачные формы. В дальнейшем происходят изменения в клетках по пути увеличения электронной плотности и появление типичных бактериальных клеток.

Первым этапом дифференцировок прозрачных форм можно выделить появление в них промежуточного слоя, отделяющего центральную элетронно-прозрачную зону от плотных покровов стенки (рис. 1.Б, стрелка). Клеточные стенки бактерий приобретают дополнительную электронную плотность. Видимых клеточных циклов в этих периодах не наблюдается. В следующем этапе можно наблюдать появление кольцевых нитевидных структур с диффузными спиралевидными участками (рис.1. В, стрелка). Далее кольцевые структуры в центральной зоне исчезают, появляются многослойные зоны с равномерной упаковкой, ассиметрично расположены на одном из участков клеточной стенки (рис. 1. Г, стрелка). Определяющим этапом есть появление гранулярных электронно-плотных концентрических зон, расположеных по внутреннему периметру промежуточного слоя клетки (рис.1. Д, стрелка). Это приводит к накоплению вокруг концентрических зон в прозрачной зоне клетки из электронно-плотного гранулярного материала (рис.1.Е,стрелка). Далее центральная часть клетки постепенно дифференцируется на электронно-прозрачные и электронно-плотные слои, где происходит появление внутренней кольцевой мембраны (рис.1.К, З, И, стрелка). Заключительным этапом дифференцировки электронно-прозрачных форм есть появление бактерииподобных структур в ее середине, за тем следует

растворение покровов первичной структуры и выход вновь сформированной вегетативной бактериальной клетки наружу (рис.1. К, Л, М, стрелка). Такие клетки являются основой для формирования будущих колоний патогена.

На основе полученных данных следует, что при первичном выделении бактерий а также при пересеве бактериальных клеток старых колоний происходит перестройка всей структуры инициальной формы, накопление необходимых компонентов для строительства новой вегетативной клетки, способной к



бинарному делению. Поэтому наличие периода “адаптации” к питательной среде при первичном выделении, может объясняться как строительство и появление новых батериальных клеток.

Рис. 1. Этапы сборки новой вегетативной клетки бактерий (ОЛ) *in vitro* (объяснение в тексте).

(А. Линия – 0,5 мкм; Б-М. Линия – 0,1 мкм)

Наличие подготовительного периода необходимого для ”адаптации” к питательной среде характерно и для других “ограниченных ксилемой бактерий”, вызывающие аналогичные симптомы на деревъях. Такой период характерен при идентификации вирулентных штаммов от момента инокуляции в здоровые растения до появления характерных симптомов. Однако, протяженность периода связывали с видом патогена, температурными условиями и переносчиком [8].

Подготовительный период характерен и для риккетсий - облигатных внутриклеточных паразитов человека и животных. Исследование ранних стадий инфекции L-клеток *Coxiella burneti*, проведенное с помощью гистохимического метода и методом флуоресцирующих антител выявило падение титра *C. burneti,* в течении 2-6 часов после заражения. Вегетативные формы, способные к бинарному делению появлялись лишь через 8-12 часов У риккетсий были описаны явления, которые не укладывались с известными свойствами бактерий - исчезновение организмов во время “адаптации” и “реактивация” невидимых до этого паразитов после индуцированных изменений в клетках [9].

Аналогичные электронно-прозрачные формы бактерий были в естественно-инфицированных гвоздичных растениях на Суматре, которые связаны с дегенерацией ограниченных ксилемой бактерий [10]. Вакуолизированные риккетсии часто появляются на поздних стадиях внутриклеточной инфекции. Измененные (анормальные) формы можно рассматривать как цитопатологию микроорганизма [11].

Вакуолизированные формы характерны не только для дегенеративных бактерий, они могут указывать на наличие тончайших микрофибрилл ДНК и активных синтетических процессов происходящих в них. Такие формы были отмечены на ранних этапах внутриклеточного развития *Rickettsia tsutsugamushi* . Во время “*эклипс-фазы”* в гранулярной цитоплазме L-клеток происходило появление прозрачных зон и сборка в них первичных рикетсий *de novo* без каких либо предшественников. Считается, что свободная ДНК в прозрачных зонах клетки-хозяина служит “матрицей” для сборки риккетсий. Гранулярный материал цитоплазмы содержит рибосомальные частицы [3].

Кольцевые нитевидные структуры с диффузными участками, могут представлять собой ДНК-подобные формы в периоде деконденсации (рис.1.В). Активная ее форма ассоциируется вдоль клеточной стенки, что приводит к появлению электронно-плотных гранулярных масс (рис.1Д.Е). Известно, что рибосомы способны к агрегации, образуют регулярно повторяющиеся структуры называемые полирибосомами, эргосомами или полисомами. Они представляют собой агрегаты, осуществляющие синтез белка. Свободные не связанные с ДНК полисомы в бактериях почти не встречаются. Синтез РНК происходит в основном в цитоплазме вдоль мембран но не в центральной области нуклеоида [12].

Аналогичные формы, подобные бактериям *in vitro*, были отмечены нами *in vivo* при электронно-микроскопическом изучении включений в тканях растений инфицированных риккетсиеподобными бактериями. Во внутриклеточных зонах с гранулярным материалом наблюдались овальные тельца с трехслойной оболочкой, в сердцевине которых, заметны тонкие нитевидные формы. Они также упакованы вдоль клеточной стенки и видна их кольцевая структура [3].

ВЫВОДЫ

Суммируя полученные результаты, можно сделать заключение, что при первичном выделении происходит разрушение вегетативной структуры клетки-предшественницы. Активация бактериальной хромосомы приводит к появлению гранулярной цитоплазмы с агрегированными участками – полисомами, где происходит сборка вегетативной бактериальной клетки *de novo* без каких-либо клеток-предшественников. Процесс сборки происходит на “матрице” активной хромосомы, все новообразования в клетке предшественнице могут служить “фабрикой“ синтеза структурных элементов для новой клетки. Несмотря на то, что полученные нами результаты требуют дополнительных исследований, можно сделать предположение о прерывистом жизненном цикле этих бактерий, подобный таковому у вирусов, которые теряют свою структурную идентичность на некоторой стадии их роста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гвоздяк Р.И., Шевченко С.И., Садовский Ю.П. Изучение возбудителя ожога листьев черешни // Микробиол. журн., 1990. - 52, N2. - С. 70-77.

2. Садовский Ю.П., Шевченко С.И. Электронно-микроскопическое изучение меристематических тканей плодовых деревьев, пораженных риккетсиеподобными бактериями // Цитология и генетика.-1988, -22, N6.- С.3-8.

3. Садовский Ю.П., Шевченко С.И. Электронно-микроскопическое изучение включений в тканях растений, инфицированных риккетсиеподобными бактериями // Цитология и генетика.-1991,-25, N3.- С.7-12

4. Hase T. Developmental sequence and surface membrane assembly of rickettsiae // Ann. Rev. Microbiol.- 1985.- 39. P. 69-81.

5. Raju B.C., Wells J.M., Nyland G. Plum leaf scald: Isolation culture, and pathogenicity of the causal agent // Ibid.-1982.-71, N11-P. 1156-1161.

6. Miloning G. Advantages of a phosphate buffer for OsO_4 solution in fixation // J.Appl. Physiol.1961.-32, N7.- P. 1637.

7. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as on electronopaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol.- 1963.- N 2. – P. 208-212.

8. Hopkins D.L. Xylella fastidiosa: xylem-limited bacterial pathogen of plants // Ann. Rev. Phytopathol. 1989. – 27. P. 271-290.

9. Kordova N., Kovacova E. Исследование ранних стадий инфекции L-клеток Coxiella burneti, проведенное с помощью гистохимического метода и метода флуоресцирующих антител // Acta virol. 1968.- N12.- P.23-30.

10. Bennett C.P.A., Jones P. and Hunt P. Isolation, culture and ultrastructure of a xylem-limited bacterium associated with Sumatra disease of cloves // Ibid.-1987.- N 36.-P.45-52.

11. Авакян А.А., Попов В.Л. Риккетсии и хламидии: сравнительная электронномикроскопическая характеристика // Acta virol. 1984.- N 28.- P.159-173.

12. Kleppe K., Ovebo S., Lossius J. The bacterial nucleoid.- J. General Microbiol., 1979, vol.112, P.1-13.