

УДК 595.121.08 + 591.69-7

**ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
МИКРОФЛОРЫ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ТЕГУМЕНТОМ ЦЕСТОДЫ  
EUBOTHRIUM RUGOSUM, ПАЗАРИТА КИШЕЧНИКА НАЛИМА**

© Л. Г. Поддубная

С помощью методов сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии была изучена симбионтная микрофлора, ассоциированная с поверхностью псевдофилидной цестоды *Eubothrium rugosum*, паразита кишечника налима *Lota lota*. Было выявлено 3 морфологических типа бактерий, локализованных как среди микротрихий, покрывающих тегумент проглоттид, так и над микротрихимальным бордюром. Локализации в межмикротрихимальном пространстве и тесное прилегание к микротрихиям удлинённых с тонкой клеточной стенкой бактерий 1-го типа предполагает, вероятно, их активное участие, наряду с микротрихиями, в пищеварительно-абсорбционных процессах, протекающих на поверхности тегумента *E. rugosum*. Для 2-го типа грамположительных палочковидных бактерий характерно внутриклеточное обособление дочерних протопластов за счёт образования клеточной перетяжки-перегородки с сохранением связи между дочерними клетками и дальнейшим их разделением узкой электронно-светлой зоной. 3-й тип бактерий — грамтрицательные микроорганизмы окружены обильным везикулярным материалом. Показана экструзия везикул с поверхности бактерий. Двум морфологическим типам грамположительных и грамтрицательных бактерий на поверхности *E. rugosum* соответствует 2 описанных ранее Извековой (2003а, б) физиологических типа микроорганизмов, способных либо поглощать аминокислоты из окружающей среды, либо выделять в нее протеолитические ферменты.

Современные физиологические исследования по микрофлоре кишечника рыб и цестод, паразитирующих в кишечном тракте рыб, свидетельствуют о существовании симбионтной микрофлоры, с различной степенью прочно-сти связанной с пищеварительно-транспортными поверхностями рыб и паразитирующих в них цестод и участвующей в процессах пищеварения как хозяина, так и паразита (Lee, 1980; Savadge, 1980; Кузьмина, Скворцова, 2002; Извекова, Лаптева, 2002, 2004; Извекова, 2003а, б). В результате жизнедеятельности симбионтной микрофлоры образуются аминокислоты, глюкоза, жирные кислоты, витамины (Шишова-Касаточкина, Леутская, 1979; Уголев, 1985), использование которых как хозяином, так и паразитом позволяет снижать их энергетические затраты на утилизацию белков и углеводов. Изучение протеолитической активности микрофлоры кишечника налима и паразитирующего в нем *Eubothrium rugosum* выявило наличие бактерий как поглощающих аминокислоты из окружающей среды, так и выделяющих протеолитические ферменты, причем оба процесса протекают в противофа-

зах (Извекова, 2003б). Работа по учету микрофлоры, ассоциированной с поверхностью *E. rugosum*, выполнялась Извековой и Лаптевой (2004) на смывах 7 фракций с поверхности данных цестод. Была показана равнозначная биомасса бактерий во всех фракциях у этого паразита по сравнению с меняющимся одноименным показателем у других исследованных ленточных червей.

Основная цель данной работы заключается в изучении морфологических типов бактерий, степени их ассоциации с пищеварительно-транспортной поверхностью цестоды *Eubothrium rugosum* с использованием трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Цестоды *Eubothrium rugosum* извлекались из пилорических отростков кишечника налима *Lota lota*, отловленного в Рыбинском водохранилище. Живых червей промывали в физиологическом растворе Хенка. Участки стробилы фиксировали в 3%-ном глютаральдегиде на какодилатном буфере при рН 7.2 в течение 3–5 сут. Постфиксацию проводили 1%-ным тетракидом осмия в течение 1 ч. Материал дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне. Для трансмиссионной электронной микроскопии червей заливали в эпон и аралдит. Ультратонкие срезы контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу и просматривали на трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100С при 80 кВ. Изучение объектов в сканирующем электронном микроскопе LEO-1420 проводили после высушивания материала в сжиженном CO<sub>2</sub> в критической точке.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Трансмиссионное электронномикроскопическое исследование поверхности стробилы цестод *E. rugosum* выявило 3 морфологических типа бактерий, ассоциированных с тегументом данного вида ленточных червей.

Первый тип бактериальных клеток был обнаружен среди микротрихий, покрывающих тегумент проглоттид *E. rugosum*. Данные прокариотные микроорганизмы погружены в микротрихимальный бордюру и находятся в тесном контакте с микротрихиями. На протяжении 7.86 мкм поверхности тегумента в микротрихимальном бордюру локализовано 7 бактериальных клеток данного типа (рис. 1, А, см. вкл.). Бактерии этого типа имеют вид удлиненных, тонких, слегка искривленных, суженных на полюсах клеток. Их длина составляет в среднем  $1.15 \pm 0.02$  мкм. Клеточная стенка микроорганизмов тонкая и электронно-плотная. Цитоплазма бактериальных клеток средней электронной плотности, в ней просматриваются скопления рибосом (рис. 1, Б).

Второй тип бактериальных клеток локализован выше микротрихимального бордюра (рис. 2, А, Б, см. вкл.). Это электронно-плотные клетки, имеющие форму палочек на продольном срезе и округлую — на поперечном (рис. 2, А–Ж). Размеры клеток колеблются в пределах  $1.37 \pm 0.08 \times 0.44 \pm 0.02$  мкм. Изучение ультратонких срезов показывает, что строение клеточной стенки этого типа бактериальных клеток сходно со строением клеточной стенки грамположительных бактерий (рис. 2, В, Г). Непосредственно к цитоплазматической мембране бактериальной клетки плотно прилегает гомогенный слой клеточной стенки, толщина которого составляет в среднем 30 нм. Электронно-микроскопические исследования показали,

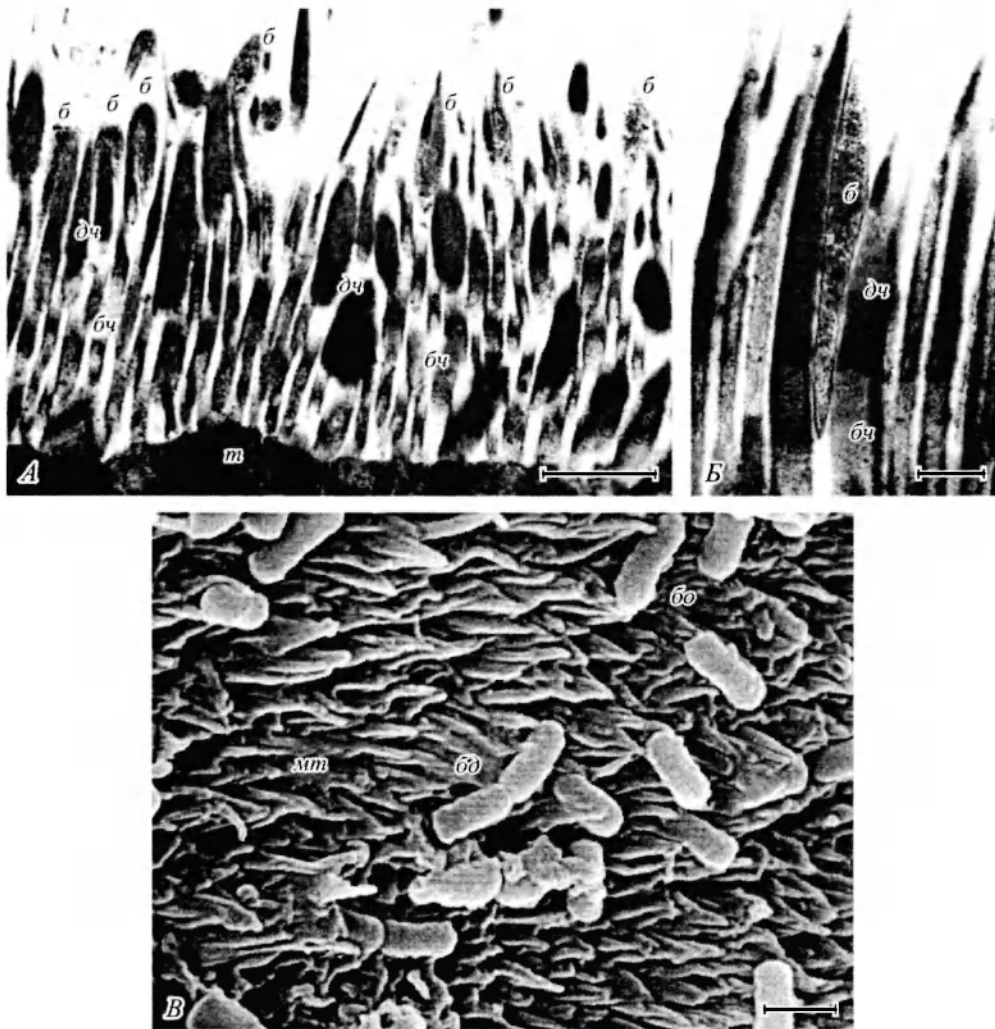


Рис. 1. Бактериальные клетки, ассоциированные с поверхностью *Eubothrium rugosum*.

*A* — тегумент проглоттиды, покрытый микротрихиями с локализованными между ними бактериальными клетками 1-го типа; *B* — бактериальная клетка 1-го типа в межмикротрихиальном пространстве; *в* — сканирующая фотография поверхности с микротрихиями и бактериальными клетками 2-го типа. *б* — бактериальная клетка, *бд* — делящаяся бактерия, *бо* — одиночная бактерия, *бч* — базальная часть микротрихий, *дч* — дистальная часть микротрихий, *mt* — микротрихии, *t* — тегумент. Масштабные линейки, мкм: *A* — 0.5, *B* — 0.2, *B* — 1.

Fig. 1. Bacteria associated with the tegument of *Eubothrium rugosum*.

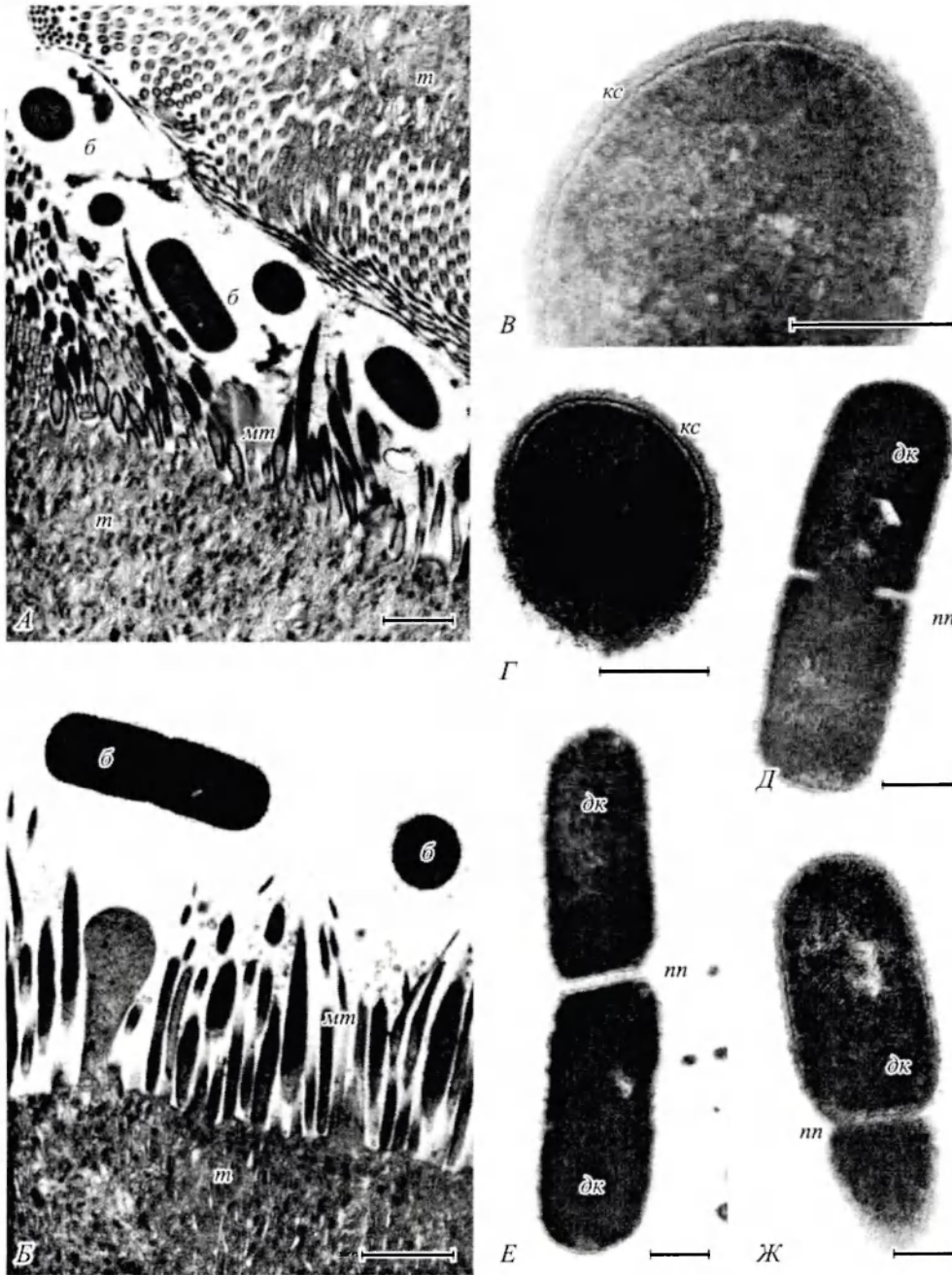


Рис. 2. Грамположительные бактерии, локализованные над микротрихимальным бордюром *E. rugosum*.

*A* — бактериальные клетки 2-го типа, локализованные в складке тегумента проглоттиды; *B* — продольный и поперечный срезы бактерий 2-го типа выше микротрихий тегумента; *B, Г* — поперечные срезы бактерий с клеточной стенкой, характерной для грамположительных прокариот; *Д* — начальные этапы образования клеточной перегородки-пергородки; *Е, Ж* — обособление дочерних протопластов за счет образования перегородки в виде узкой электронно-светлой зоны. *дк* — дочерняя клетка, *кк* — клеточная стенка, *nn* — перегородка-пергородка. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1. Масштабные линейки, мм: *A, Б* — 0.5; *В-Ж* — 0.2.

Fig. 2. Gram-positive bacteria localized over microtrichia of the tegument of *E. rugosum*.

что у бактерий поверхность клеточной стенки иногда носит волокнистый характер, причем рыхлая структура выявляется на одном из полюсов организма (рис. 2, Г). Гомогенная электронно-плотная протоплазма микроорганизмов богата рибосомами, которые благодаря высокой плотности упаковки маскируют все прочие клеточные структуры. Иногда в цитоплазме присутствуют участки низкой электронной плотности, являющиеся, возможно, местами накопления метаболитов (рис. 2, Д, Е). Можно наблюдать внутриклеточное обособление дочерних протопластов за счет образования клеточной перетяжки-перегородки, растающей снаружи внутрь, с сохранением связи между дочерними клетками (рис. 2, Д). Деление клеток начинается с образования септы. Рост цитоплазматической мембраны и клеточной стенки происходит центрипетально. Во время образования септы гомогенный слой клеточной стенки остается непрерывным. Выявлены дочерние бактериальные клетки, цитоплазматические мембраны которых расположены параллельно и разделены узкой электронно-светлой зоной (рис. 2, Е, Ж).

Третий тип бактерий локализован над микротрихимальным бордюром (рис. 3, А, Б, см. вкл.). Это округлые и овальные клетки размером  $0.97 \pm 0.04 \times 0.73 \pm 0.04$  мкм с цитоплазматическим матриксом средней электронной плотности и обилием везикулярного материала, окружающего их (рис. 3, А—Д). По ультраструктурной организации клеточной стенки третий тип бактериальных клеток относится к грамотрицательным бактериям. Снаружи ее покрывает наружная складчатая структура, напоминающая унитарную мембрану. Периплазматическое пространство между наружной и плазматической мембранами средней плотности. Отмечается наличие на поверхности клеток пузырьков различной плотности и размеров, что может свидетельствовать об экструсии метаболитов в окружающую среду (рис. 3, В—Д).

Сканирующее электронно-микроскопическое исследование выявило наличие бактериальных клеток, ассоциированных с поверхностными микротрихимальными структурами *E. rugosum* (рис. 1, В). Это достаточно крупные микроорганизмы палочковидной формы. Обнаружены как одиночные, так и делящиеся клетки размером до 1.5 мкм. Данные микроорганизмы мы отождествляем со вторым из описанных выше типов грамположительных бактерий.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Электронно-микроскопическое описание симбионтной микрофлоры гельминтов, паразитирующих в кишечнике рыб, дано в ряде работ для маритрематод (Morris, 1973; Aho et al., 1991; Hughes-Stamm et al., 1999) и кариофиллидных цестод (Poddubnaya, Izvekova, 2005). При этом были выявлены различные типы прокариотных организмов с различной степенью прочности, связанные с поверхностью гельминтов. Описаны бактериальные клетки, связанные с поверхностью гельминтов как с помощью специализированных структур, таких как крипты (Hughes-Stamm et al., 1999; Poddubnaya, Izvekova, 2005), туфты (Poddubnaya, Izvekova, 2005), так и микроорганизмы без прикрепительных образований (Morris, 1973; Aho et al., 1991; Hughes-Stamm et al., 1999; Poddubnaya, Izvekova, 2005). По мнению Бирюзова (1973), крипты и туфты обеспечивают не только прикрепление прокариотического организма к субстрату, но и являются структурами-капиллярами, участвующими в регуляции водно-солевого обмена между микроорганизмом и субстратом. Кроме специализированных прикрепительных структур, бактериальные клетки могут быть связаны с поверхностью симбионтного организма сила-

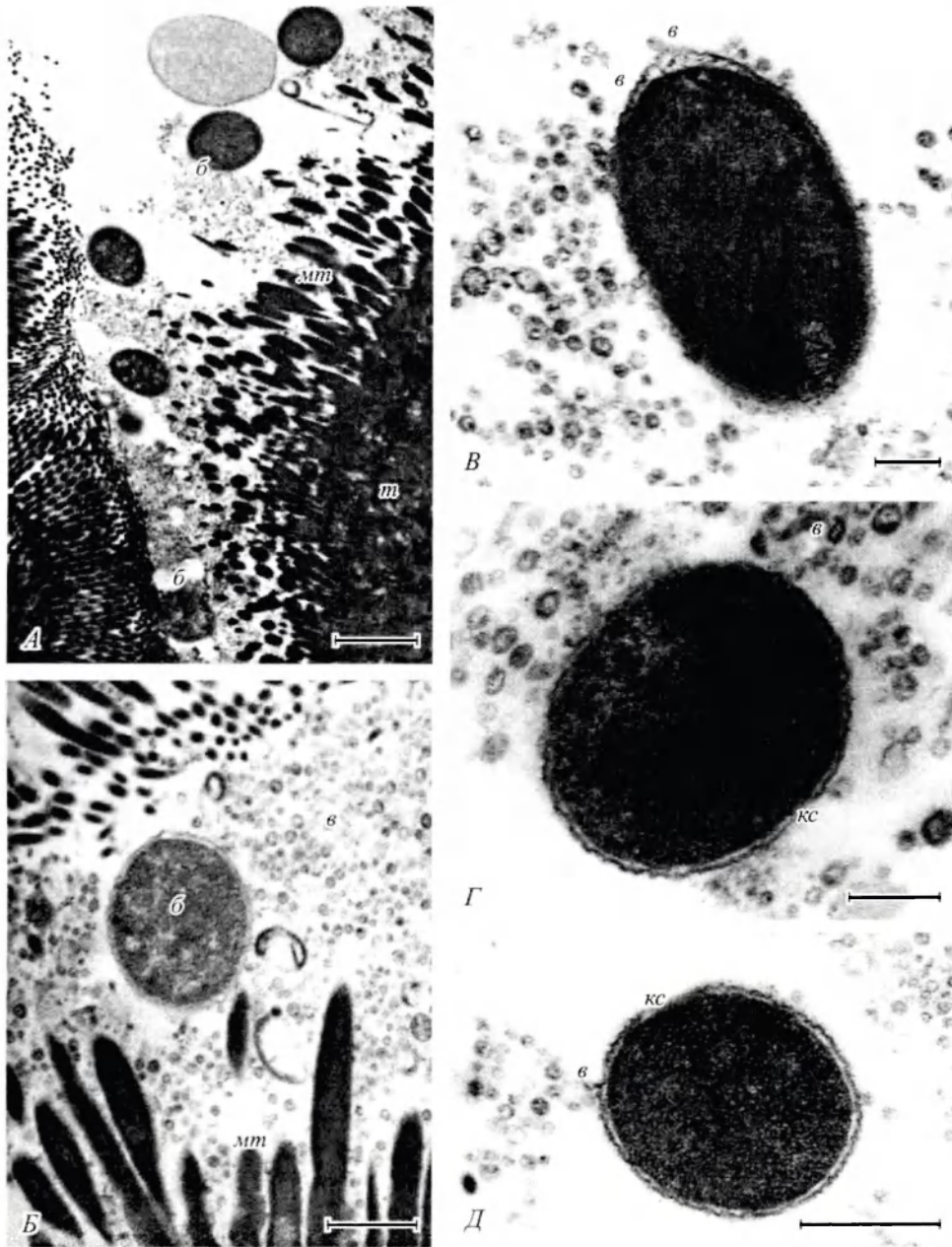


Рис. 3. Грамотрицательные бактерии, ассоциированные с поверхностью *E. rugosum*.  
 А, Б — бактериальные клетки 3-го типа, локализованные в складке тегумента проглоттиды; В, Г, Д — грамотрицательные бактерии, окруженные везикулярным материалом. в — везикулярный материал. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1 и 2. Масштабные линейки, мкм: А — 1; Б, Д — 0.5; В, Г — 0.2.

Fig. 3. Gram-negative bacteria associated with the tegument of *E. rugosum*.

ми поверхностного натяжения, силами Ван-дер-Ваальса и некоторыми другими физико-химическими связями (Beveridge, 1980).

Как показало электронно-микроскопическое исследование поверхности цестоды *E. rugosum* из кишечника налима, у изученного гельминта обнаружено 3 типа бактериальных клеток, ассоциированных с его тегументом. Выявленные микроорганизмы не имеют специализированных структур, но прочно связаны с пищеварительно-транспортной поверхностью *E. rugosum*. О прочности такой связи свидетельствуют данные исследований Извековой и Лаптевой (2004) по подсчету количества колоний бактерий, смываемых с пищеварительно-транспортной поверхности *E. rugosum* на протяжении 7 фракций с последующим их выращиванием на твердых питательных средах. Авторами было показано, что число бактерий у *E. rugosum* является величиной постоянной, а не уменьшается в последующем ряду 7 фракций, как это имеет место у двух других исследованных видов цестод — *Triaenophorus nodulosus* и *Ligula intestinalis*.

Обнаруженные у *E. rugosum* морфологические типы бактериальных клеток представляют интерес и для описания видового разнообразия симбионтной микрофлоры, ассоциированной с поверхностью гельминтов. Грамположительные бактерии, подобные клеткам 2-го типа, были отмечены ранее как симбионтные микроорганизмы для марит трематод *Gylienchis nahaensis* Хагесом-Стаммом и др. (1999). В то время как бактериальные клетки 1-го и 3-го типов ранее не были описаны в литературе.

Обширная биохимическая микробиологическая литература свидетельствует о большой работе, выполняемой бактериями (Безбородов, Астанович, 1984; Ботвинко, 1985; Прист, 1987, и др.). Продемонстрирована возможность участия ферментных систем бактерий в расщеплении различных пищевых субстратов (Лубянскене и др., 1989; Шивокене, 1989; Cahill, 1990). При их участии происходит разложение сложных органических веществ до простых минеральных соединений. Показано, что энтеральная микробиота обладает широким спектром гидролаз и способна синтезировать не только внутриклеточные, но и внеклеточные протеиназы, способные гидролизовать субстраты белковой природы (Лубянскене и др., 1989; Clements, 1997; Сафонова и др., 1999). Вокруг бактериальных клеток присутствует комплекс различных ионов и растворимых продуктов метаболизма клетки (от солей до энзимов), диффундирующих из бактериальной клетки во внешнюю среду. Была обнаружена также активность кислой фосфатазы у граммотрицательных бактерий в периплазматическом пространстве (Чернов и др., 1984).

Извековой и Лаптевой (2002) с использованием питательных сред различного состава было установлено, что с пищеварительно-транспортными поверхностями паразита и хозяина ассоциируются группы бактерий, обладающие протеолитической и амилолитической активностью и, следовательно, способные принимать участие в деградации биополимеров — белков и углеводов, продукты гидролиза которых могут поглощаться хозяином и паразитом. О существовании симбионтной микрофлоры, ассоциированной с пищеварительно-транспортными поверхностями *E. rugosum* и налима, указывается в работе Извековой (2003). Полученные автором данные свидетельствуют о существовании на поверхности *E. rugosum* 2 типов бактериальных клеток, способных либо поглощать аминокислоты из окружающей среды, либо выделять в нее протеолитические ферменты, при этом оба этих процесса протекают в противофазах. Эти физиологические данные согласуются с нашими электронно-микроскопическими наблюдениями. 2 выделенным физиологическим типам микроорганизмов соответствует, на наш

взгляд, 2 морфологических типа бактериальных клеток, грамположительные и грамотрицательные прокариоты. Приведенные результаты позволяют предположить, что грамотрицательные, экскретирующие везикулярный материал бактериальные клетки выделяют протеолитические ферменты и выступают как поставщики протеолитических ферментов, которые могут быть использованы в процессах пищеварения *E. rugosum*. Логично также предположить, что 2-й тип грамположительных палочковидных микроорганизмов может выступать как конкурент для паразита, поглощая аминокислоты из окружающей паразита кишечной среды. Локализация описанных в работе бактериальных клеток 1-го типа предполагает их участие, наряду с микротрихиями, в пищеварительно-абсорбционных процессах, протекающих на поверхности тегумента цестод.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 03-04-48271).

#### Список литературы

- Безбородов А. М., Астанович И. И. Секреция ферментов у микроорганизмов. М.: Наука, 1984. 70 с.
- Бирюзов В. И. Мембранные структуры микроорганизмов. М.: Наука, 1973. 136 с.
- Ботвинко И. В. Экзополисахариды бактерий // Успехи микробиологии. 1985. Т. 20. С. 79—122.
- Извекова Г. И. Активность протеаз микрофлоры пищеварительно-транспортных поверхностей кишечника щуки и паразитирующего в нем *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781) (Cestoda, Pseudophyllidea) // Биология внутренних вод. 2003а. № 3. С. 82—87.
- Извекова Г. И. Протеолитическая активность микрофлоры, ассоциированной с пищеварительно-транспортными поверхностями кишечника налима *Lota lota* и паразитирующего в нем *Eubothrium rugosum* // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2003б. Т. 39, № 5. С. 424—429.
- Извекова Г. И., Лаптева Н. А. Микрофлора пищеварительно-транспортных поверхностей кишечника щуки и паразитирующего в нем *Triaenophorus nodulosus* // Биология внутренних вод. 2002. № 4. С. 75—79.
- Извекова Г. И., Лаптева Н. А. Микрофлора, ассоциированная с пищеварительно-транспортными поверхностями рыб и паразитирующих в них цестод // Экология. 2004. № 3. С. 205—209.
- Кузьмина В. В., Скворцова Е. Г. Бактерии желудочно-кишечного тракта и их роль в процессах пищеварения у рыб // Успехи современной биологии. 2002. Т. 122, № 6. С. 569—579.
- Лубянской В., Вирбицкас Ю., Янкявичус К. Облигатный симбиоз микрофлоры пищеварительного тракта и организма. Вильнюс: Мокслас, 1989. 192 с.
- Прист Ф. Внеклеточные ферменты микроорганизмов. М.: Мир, 1987. 117 с.
- Сафонова М. Е., Астапович Н. И., Буряко И. А. Особенности роста и продукции внеклеточных протеиназ *Lactobacillus plantarum* ИМ-9/138 // Микробиология. 1999. Т. 68, № 4. С. 449—452.
- Уголев А. М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Л.: Наука, 1985. 544 с.
- Чернов Ю. В., Чураев М. Ю., Продеус Т. В., Гордеева Л. М. Электронно-цитохимическое выявление активности кислой фосфатазы у *Entamoeba histolytica* и сопутствующих ей бактерий кишечной флоры // Матер. Всесоюз. совещ. «Цитология микроорганизмов». Пушкино, 1984. С. 92—93.
- Шивокене Я. С. Симбионтное пищеварение у гидробионтов и насекомых. Вильнюс: Мокслас, 1989. 223 с.
- Шишова-Касаточкина О. А., Леутская З. К. Биохимические аспекты взаимоотношений гельминта и хозяина. М.: Наука, 1979. 279 с.



- Aho J. M., Uglem G. L., Moore J. P., Larson O. R. Bacteria associated with the tegument of *Clinostomum marginatum* (Digenea) // Journ. Parasitol. 1991. Vol. 77, N 5. P. 784–786.
- Beveridge T. J. Bacterial structure and its implications in the mechanisms of infection: a short review // Microbial Ecology. 1980. Vol. 19. P. 21–49.
- Cahill M. M. Bacterial flora of fishes: a review // Microbial Ecology. 1990. Vol. 19. P. 21–41.
- Clements K. D. Fermentation and gastrointestinal microorganisms. Gastrointestinal ecosystem and fermentations. Chapman and Hall. N. Y., 1997. Ch. 6. P. 156–198.
- Hughes-Stamm S. R., Cribb T. H., Jones M. K. Structure of the tegument and ectocommensal microorganisms of *Gylienchis nahaensis* (Digenea: Gylienchidae), an inhabitant of herbivorous fish of the great barrier reef, Australia // Journ. Parasitol. 1999. Vol. 85. P. 1047–1052.
- Lee A. Normal flora of animal intestinal surfaces // Absorption of microorganisms to surfaces / Ed. by G. Bitton, K. C. Marshall. A Wiley-Interscience Publication, John Wiley et Sons. N. Y.; Chichester; Brisbane; Toronto, 1980. Ch. 5. P. 145–174.
- Morris G. P. The morphology of associations between a trematode (*Megalodiscus temperatus*) and bacteria // Canad. Journ. Zool. 1973. Vol. 51. P. 1313–1314.
- Poddubnaya L. G., Izvekova G. I. Detection of bacteria associated with the tegument of caryophyllidean cestodes // Helminthologia. 2005. Vol. 42, N 1. P. 25–31.
- Savidge D. C. Colonization by and Survival of pathogenic bacteria on intestinal mucosal surfaces // Absorption of microorganisms to surfaces / Ed. by G. Bitton, K. C. Marshall. A Wiley-Interscience Publication, John Wiley et Sons. N. Y.; Chichester; Brisbane; Toronto, 1980. Ch. 6. P. 175–206.

Институт биологии внутренних вод РАН,  
пос. Борок, Ярославская обл.

Поступила 27 I 2005

ELECTRON MICROSCOPE INVESTIGATION  
OF BACTERIA ASSOCIATED WITH THE TEGUMENT  
OF THE TAPEWORM SPECIES *EUBOTHRIUM RUGOSUM*,  
A PARASITE OF THE INTESTINE OF BURBOT

L. G. Poddubnaya

*Key words:* bacteria, Cestoda, *Eubothrium rugosum*, burbot, electron microscopy.

SUMMARY

Bacteria associated with the tegument of the tapeworm species *Eubothrium rugosum* (Cestoda, Pseudophyllidea) parasitizing the intestine of burbot (*Lota lota*) were studied using transmission and scanning electron microscopy. Three morphological types of the bacteria were revealed. Bacteria of the first type are localized between microtrichia and fit to them closely. Bacteria of the second (gram-positive) and third (gram-negative) types are localized over microtrichia of the tegument and do not attach to the surface. Physiological functions of the bacteria are discussed.