

مقایسه ساختمان باسیلهای اسپوردار هوازی با میکروسکپ الکترونی

دکتر محمد نایبی * دکتر پریرخ کهن *

مقدمه

امکان اینکه در یک خانواده از باکتریها آنها را به وسیله مرفولوژی از همدیگر تشخیص داد، از زمان قدیم گزارش شده است. اخیراً با توسعه میکروسکپ الکترونیکی میتوان این تفاوتها را به وضوح دید. باسیلهای اسپوردار هوازی از نظر اندازه و شکل اسپور و طرز قرار گرفتن آن با همدیگر متفاوتند (۱-۳). تغییر شکل این باسیلهای کم و بیش بدرجه حرارت، pH و تغذیه آنها بستگی دارد.

تفاوت باسیلهای هوازی اسپوردار قبل و بعد از اسپودار شدن به وسیله رنگ آمیزی گزارش شده است (۲) ولی تفاوتهای آناتومی این دو دسته به وسیله میکروسکپ الکترونیکی قابل مطالعه میباشد. مطالعه اسپورها به وسیله میکروسکپ الکترونی، برای اولین بار به وسیله رابینو Rabinow گزارش گردیده است (۲).

چندین سال قبل انواع باسیلهای واسپور آنها با متمد میکرو-

سکپ الکترونیکی مطالعه شده است (۵ و ۴).

امروزه با استفاده از متدهای رنگ آمیزی منفی (Neg. stain) و سایه دار کردن (Shadowing) امکان مطالعه دقیق ساختمان باسیلهای واسپور آنها هست (۶-۷-۸). در این کار ما سعی کردیم علاوه بر متدهای بالا از تکنیک جدیدی با اسم فریز ایچینگ (Freeze Etching) استفاده کنیم و با بکار گرفتن میکروسکپ الکترونیکی، باسیلهای هوازی اسپوردار را با همدیگر مقایسه نموده فرق هر کدام را مشخص نمائیم که در آینده برای تشخیص این باکتریها کمک شایانی خواهد نمود.

مواد و مواد لازم

تهیه باسیلهای :

باسیلهائی که در این آزمایشها مورد استفاده قرار گرفته از دانشگاهها و افرادی گرفته شده است که در تابلوی صفحه بعد گزارش میشود.

محل اخذ باکتریها	تیپ باکتری	اسم باکتری
دانشگاه تبریز بخش باکتریولوژی	۷۰۰۴	Bacillus Cereus
مرکز پزشکی رضا پهلوی	۴۳۴۲	Bacillus Cereus
دانشگاه میشگان - بخش لابراتوار	۶۴۵۹	B. Megaterium
دانشگاه میشگان - بخش لابراتوار	۱۵۵۱	B. Megaterium
دانشگاه سیراکوس - بخش باکتریولوژی	U.C.	B. Polymyxa
دانشگاه میشگان - بخش باکتریولوژی	۹۹۴۵ A	B. Licheniformis
دانشگاه ماساچوست	۹۲۳۳	B. Subtilis
دانشگاه ملی ایران - آزمایشگاه جرجانی	۱۲۳۰۰	B. Sphaericus
دانشگاه تبریز - دپارتمان باکتریولوژی	۱۱۰۰	B. Anthracis
دانشگاه میشگان - دپارتمان باکتریولوژی	Sterne	B. Anthracis
دانشگاه میشگان - دپارتمان باکتریولوژی	A,B	B. Macroides and B. Stearothermophilus

نمونه و تکثیر باسیلهای:

تمام باسیلهای در محیط کشتهای اختصاصی (۹) و محیط کشت آنگوست آگار دار دیفکو کشت داده شدند. برای اینکه تولید اسپور به وسیله باسیلهای سرعت انجام گیرد، به محیط کشتها نیترات سدیم و کلرور منیزیم بمقدار ۲ میلی گرم در لیتر اضافه گردید؛ تمام محیط کشتها در درجات حرارت ۳۷ و ۳۵ درجه بمدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و دوره انکوباسیون تا ۴۸ ساعت ادامه داشت.

میکروسکپ الکترونیکی:

برای اینکه نمونه برای مطالعه با میکروسکپ الکترونیکی آماده شود، اول با استفاده از متد فریزایچینگ فیلم های نازکی از نمونه ها تهیه و به وسیله OSO4 ثابت گردید (۱۰-۱۱) و در روی گرید های مسی قرار گرفتند. نمونه ها با استفاده از متد های سایه دار کردن و رنگ آمیزی منفی (۱۰) و با استفاده از میکروسکپ الکترونیکی GM6 مورد مطالعه قرار گرفتند. عکس های الکترونی به وسیله دستگاه عکس برداری کدک با استفاده از فیلم های ۳۵ میلی عملی گردید که نتایج حاصله از مطالعه این فتوگرافها بقرار زیر میباشد:

نتیجه

سلولهای بدون اسپور Vegetative Cells

۱- غشاء خارجی:

غشاء خارجی باسیل B. Fastidious بطور مرتب

قرار گرفته اند و از فیبرهای توی هم رفته تشکیل شده اند (اشکال ۲ و ۳) که انتظار چنین مرفولوژی را از این باسیلهای داشتیم؛ ولی در رنگ آمیزی ساده وارونگی هائی در غشاء خارجی دیده میشود که به وسیله میکروسکپ الکترونی چنین وارونگی مشاهده نشد. شبیه این مرفولوژی در باسیل B. Macroids نیز مشاهده گردید (اشکال ۵-۸-۹-۱۱) و در این باسیل غشاء خارجی و طرز قرار گرفتن واحد های تشکیل دهنده غشاء خیلی واضح و روشنتر از باسیل فاستیدیوز بود. غشاء داخلی

B. Macroids خیلی واضح تر از غشاء داخلی B. Fastidious مشاهده میشود (شکل ۹). علاوه بر قسمت لایه داخلی، یک لایه گلبولر خارجی نیز در نوع Fastidious P دیده میشود (شکل ۸). از مطالعه مرفولوژی این باسیل بنظر میرسد که B. Fastidious A غشاء خارجی تکمیلی ندارد (شکل ۶). غشاء خارجی B. Fastidious A خیلی کلفت تر از نوع A دیده میشود (شکل ۷). چنین وضعی در غشاء خارجی باسیلهای B. Polymyxa دیده نمیشود. در این باسیل لایه خارجی بطور مرتب و گلبولی قرار گرفته است (اشکال ۱۱-۱۲ و ۱۳). چنین مرفولوژی گلبولر (Globular) در باسیل شاربن نیز دیده میشود (اشکال ۱۵ و ۱۶)؛ ولی لایه خارجی باسیل شاربن بصورت سیگمانته مشاهده گردید. در باسیل شاربن غشاء خارجی از سه لایه تشکیل شده است که بصورت گلبولر روی هم

۴- اسپورها:

مطالعه نمونه تهیه شده اسپور *B. Fastidious* نشان میدهد که اسپور این باسیل غشاء خارجی وسیعی دارد که بامند. های دیگر غیر از *Frozen Etched* دیدن آنها غیر ممکن میباشد. (اشکال ۳۵-۳۶ و ۳۷) غشاء اسپور این باسیلها از لایه های متعددی تشکیل شده اند که زیر اگزوسپور قرار دارند و ترکیباتشان شاید از فیبرهایی باشد که بخوبی در شکل (۳۵) نمایان است و از روی هم قرار گرفتن این فیبرها اسپور تشکیل میشود (شکل ۳۶). روی هم قرار گرفتن این لایه ها باعث مقاوم شدن اسپور در مقابل عوامل فیزیکی و شیمیایی میشود (شکل ۳۷). چنین لایه هایی در باسیل *B. Fastidious* و باسیل *S. Subtilis* (شکل ۳۸) و باسیل *B. Licheniformis* (شکل ۳۹ و ۴۰) نیز دیده میشود. در بعضی از باکتریها مانند باسیل *B. Anthracis* و *B. Cereus* (اشکال ۴۳-۴۴ و ۴۱-۴۲) تغییر یافته و بطور منظم روی هم قرار ندارند؛ همینطور در باسیل *B. Megaterium* این لایه ها کاملاً روشن نیستند (اشکال ۵۱-۵۲). در بعضی از باسیلها مانند:

B. Polymyxa, *S. Ureae*, *B. Stearothermophilus*, *B. Sphaerulus* (اشکال ۴۸-۴۹-۴۷-۵۳).

درجست

غشاء خارجی:

ساختمان غشاء خارجی بعضی از باکتریها (۱۴-۱۳-۱۲) قبلاً گزارش شده است. ساختمان غشاء و خارجی باسیل پلی-میکزا *B. Polymyxa* بوسیله هوری ۱۵-۱۶ مورد مطالعه قرار گرفته است.

آزمایشهای ما، ضمن تأیید گزارشهای هوری، ساختمان مشابه باسیل پلی میکزا را در باسیلهای *B. Fastidious*، *B. Macroides* نشان داد مطالعاتی که بوسیله گروه ما انجام گرفت غشاء باسیلهای *B. Subtilis*، *B. Licheniformis*، *B. Sphaericus*، *B. Psychrophilus*، *B. Megaterium*، ساختمان مشخصی نداشتند. ساختمان غشاء خارجی سلولهای گرام مثبت بامند رنگ آمیزی منفی *Negative Staining* و سایه دار کردن *Shadowing* نیز مورد مطالعه قرار گرفت ولی نتایج حاصله با *Freeze Etching* لایه های غشاء خارجی باسیل شاربن و *S. Subtilis* کاملاً مشخص بود.

بامند *Freeze Etching* انواع متعدد مزوزوم های موجود در باسیلهای بی هوازی مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج حاصله نشان دهنده این بود که وزیکولهای غیر از مزوزوم

قرار گرفته اند. غشاء خارجی باسیل *B. Psychrophilus* نیز بصورت گلبولری است (شکل ۱۷) ولی وقتی این باسیل بصورت اسپور درمی آید، اندازه اش بزرگتر شده و فاصله مراکز گلبولرها نسبت به یکدیگر بیشتر میگردد (اشکال ۱۸ و ۱۹). باسیل اسفاریکو *B. Sphaericus* مثل باسیل پسی کورفیلوس *B. Psychrophilus* اسپور مدوری ایجاد کرده و مشخصات غشاء خارجی شان شبیه همدیگر میباشد. این دو در موقع جوانه زدن ساختمان مشخصی ندارند ولی وقتی بصورت فورم اسپری درمی آیند، دیواره خشن و کلفتی دارند (شکل ۵۵). فورم دیگر غشاء خارجی را باسیل *B. Megaterium* و باسیل لشنی فورمیز *B. Licheniformis* دارند که تفسیر طرح ساختمان غشاء خارجی این باسیلها برای ما میسر نبود (اشکال ۲۰ و ۲۱). کوکسی هوازی سارسینا *Sarcina-Ureas* و باسیل استرترمو فیلوس هر دو، غشاء خارجی مشبك توی هم رفته دارند.

۲- غشاء پلاسما:

در تمام باسیلهایی که مورد مطالعه قرار گرفته اند، غشاء پلاسما زیر غشاء خارجی قرار گرفته و سطح بیرونی این غشاء کاملاً مشخص و واضح میباشد (اشکال ۳-۴-۵-۹-۱۶-۱۷ و ۲۲). قسمت بیرونی غشاء پلاسما معمولاً از واحد های مخصوصی بقطر ۵ تا ۱۵ میلی میکرون تشکیل شده است (اشکال ۲۲-۲۰-۱۵-۱۱-۹-۴-۳)؛ ولی در لایه داخلی غشاء پلاسما، چنین واحدهایی دیده نشد (شکل ۲۳).

۳- مزوزوم ها:

در نواحی مختلف غشاء پلاسما ارگانهای باس مزوزوم دیده میشوند که در بعضی از باسیلها بصورت ساختمان منظمی قرار گرفته و تعدادشان محدود میباشد (اشکال ۱۷-۱۲-۳۲ و ۳۳) مزوزومها در بعضی از باسیلها تعدادشان زیاد و بیشتر قسمت های غشاء پلاسما را اشغال کرده اند و ساختمان مشبکی دارند (اشکال ۲۷-۲۴-۲۸). در بعضی از باسیلها ارگانهای مزوزوم محوطه بزرگی را اشغال کرده اند و حتی بطرف غشاء خارجی نیز پیشرفت نموده اند (اشکال ۳۹ و ۳۲). مزوزومها در باسیل *B. Cereus* بطور وارونه روی هم قرار گرفته اند (اشکال ۳۰ و ۳۲). منشاء مزوزومها از مطالعه باسیل *S. Ureas* مشخص میشود و معلوم میگردد که مزوزومها منشاء غشاء خارجی دارند (شکل ۳۳). مطالعه منشاء مزوزومها در باسیل *B. Megaterium* نیز چنین عقیده ای را تأیید میکند (اشکال ۲۱-۲۳-۳۵).

اسپورها از لایه هائی با سم کت Coat اسپور تشکیل شده اند که باعث مقاوم شدن آنها در مقابل عوامل فیزیکی و شیمیائی میشود.

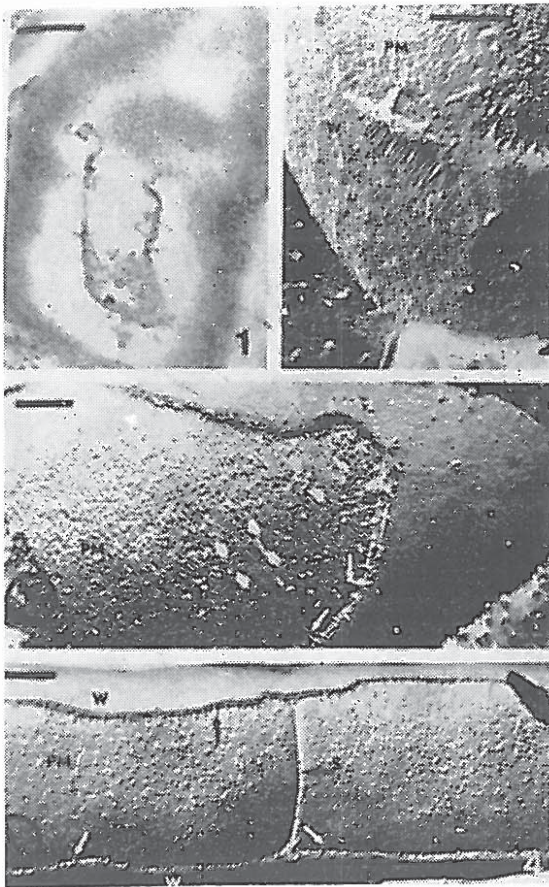
درغشاء این باسیلها وجود دارد؛ در صورتیکه متدهای کلاسیک قادر به نشان دادن اینها نبود. ساختمان اسپورها نیز با این متد مورد مطالعه قرار گرفتند که تقریباً با استثنای باسیلهای مگاتریوم و اسفاریکوس تمام اسپورها ساختمان یکسانی داشتند. تمام

SUMMARY

1. The existence of differences and similarities in the surface features not only of different organisms or groups but also within given species has been demonstrated by a variety of techniques.
2. The different reactions of various organisms to the Gram stain might well be taken as one piece of evidence, the use of the electron microscop and associated preparative techniques (including direct shadows, thin sections, negative stains, and freeze-etches) provided clear indications and details for such variations.
3. Many of these preparative procedures when used alone, however, do not provide adequate views, and thereby sufficient information, to permit the desired comprehension of the three dimensional nature of the cell surface.
4. Direct shadows or the preparation of carbon replicas by the use of metals of fine grain (e.g., platinum-carbon) afford the opportunity to determine the characteristics of cell surfaces and to provide clearer understanding of the nature of such surfaces than is possible with negative staining. It is thus possible to observe, for example, not only gross morphological features but also globular or meshlike surfaces with these techniques; clearly, however, only exposed surfaces can be viewed. When spores of *B. polymyxa* and *B. fastidiosus* are compared by means of the carbon replica the utility of the freeze-etching approach, particularly for analysis of surface structures and their component layers, becomes readily apparent.

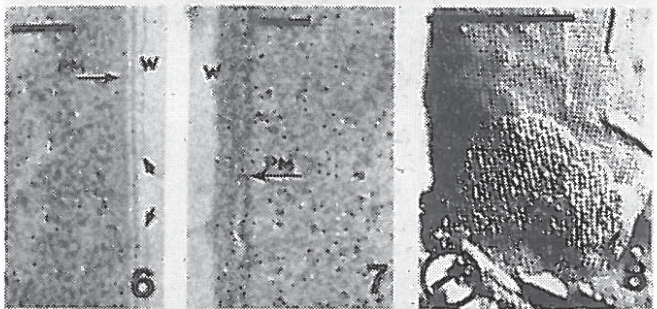
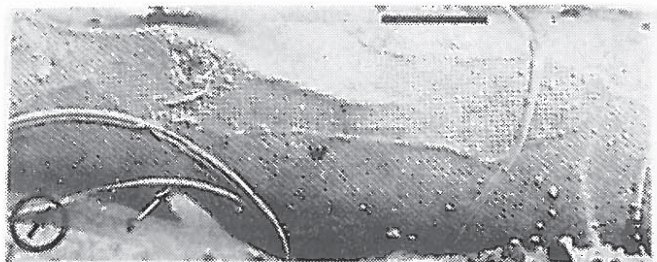
REFERENCES

1. Smith, N. R., R.E. Gordon, and F.E. Clark. 1952. Aerobic sporeforming bacterial. U.S Dept. Agr. Monograph no. 10.
2. Robinow, C.F. 1960. Morphology of bacterial spores, their development and germination, p. 207-248. In I.C. Gunsalus and R.Y. Stanier (ed), The bacteria, vol. 1. Academic press Inc., York.
3. Murrell, W. G. 1967. The biochemistry of the bacterial endospore, p. 133-254. In A.H. Rose and J.F. Wilkinson (ed), Advances in microbiology. Academic Press Inc. New York.
4. Knaysi, G., R. F. Baker, and J. Hillier. 1947. A study, with the high-voltage electron microscope, of the endospore and life cycle of *Bacillus mycoides*. J. Bacteriol. 53:525-537.
5. Knaysi, G., and J. Hillier. 1949. Preliminary observations on the germination of the endospore in *Bacillus megatherium* and the structure of the spore coat, J. Bacteriol. 57:23-29.
6. Nermut, M. V., and R. G. E. Murray. 1967. Ultrastructure of the cell wall of *Bacillus polymyxa*. J. Bacteriol. 93:1949-1955.
7. Thornley, M. J., R.W. Horne, and A. M. Glauert. 1965. The fine structure of *Micrococcus radiodurans*. Arch. Mikrobiol. 51:267-289.
8. Ellar, D.J., and D. G. Lundgren. 1967. Ordered substructure in the cell wall of *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. 94:1778-1780.
9. Leadbetter, E.R., and S. C. Holt. 1968. The fine structure of *Bacillus fastidiosus*. J. Gen. Microbiol. 52:299-307.
10. Holt, S. C., and E. R. Leadbetter. 1967. Fine structure of *Sporocytophaga myxococcoides*. Arch. Mikrobiol. 57:199-213.
11. Giktm S.C., H. G. Truper, and B. J. Takacs. 1968. Fine structure of *Ectothiorhodospira mobilis* strain 8113 thylakoids: Chemical fixation and freeze-etching studies. Arch. Mikrobiol. 62:111-128.
12. Salton, M. R. J., and R. C. Williams. 1954. Electron microscopy of the cell walls of *Bacillus megatherium* and *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. Biophys. Acta 14:455-458.
13. Salton, M.R.J. 1964. The bacterial cell wall, Elsevier, Amsterdam.
14. Murray, R. G. E. 1968. Bacterial cell wall anatomy in relation to the formation of spheroplasts and protoplasts, P. 1-18. L. B. Guze (ed), Microbial protoplasts, spheroplasts and L. forms. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
15. Nermut, M. V., and R. G. E. Murray. 1968. The substructure of the outer layer of *Bacillus polymyxa* cell wall. Z. Allg. Mikrobiol. 8:195-204.



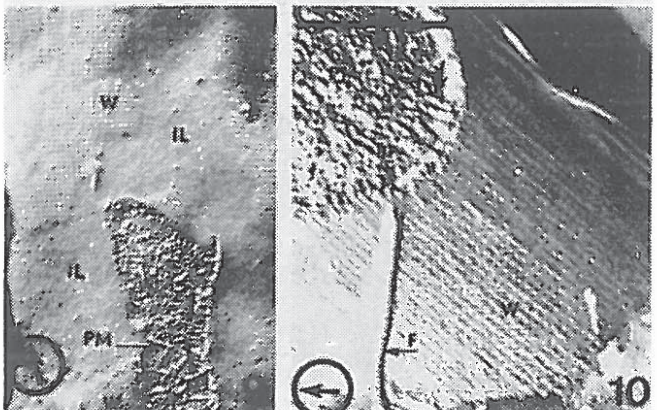
شکل (۱) برشی از باسیل بدون اسپور فاستیدیوس (B. Fastidious) که بامتد رنگ آمیزی منفی (Negative Stain) رنگ شده است.

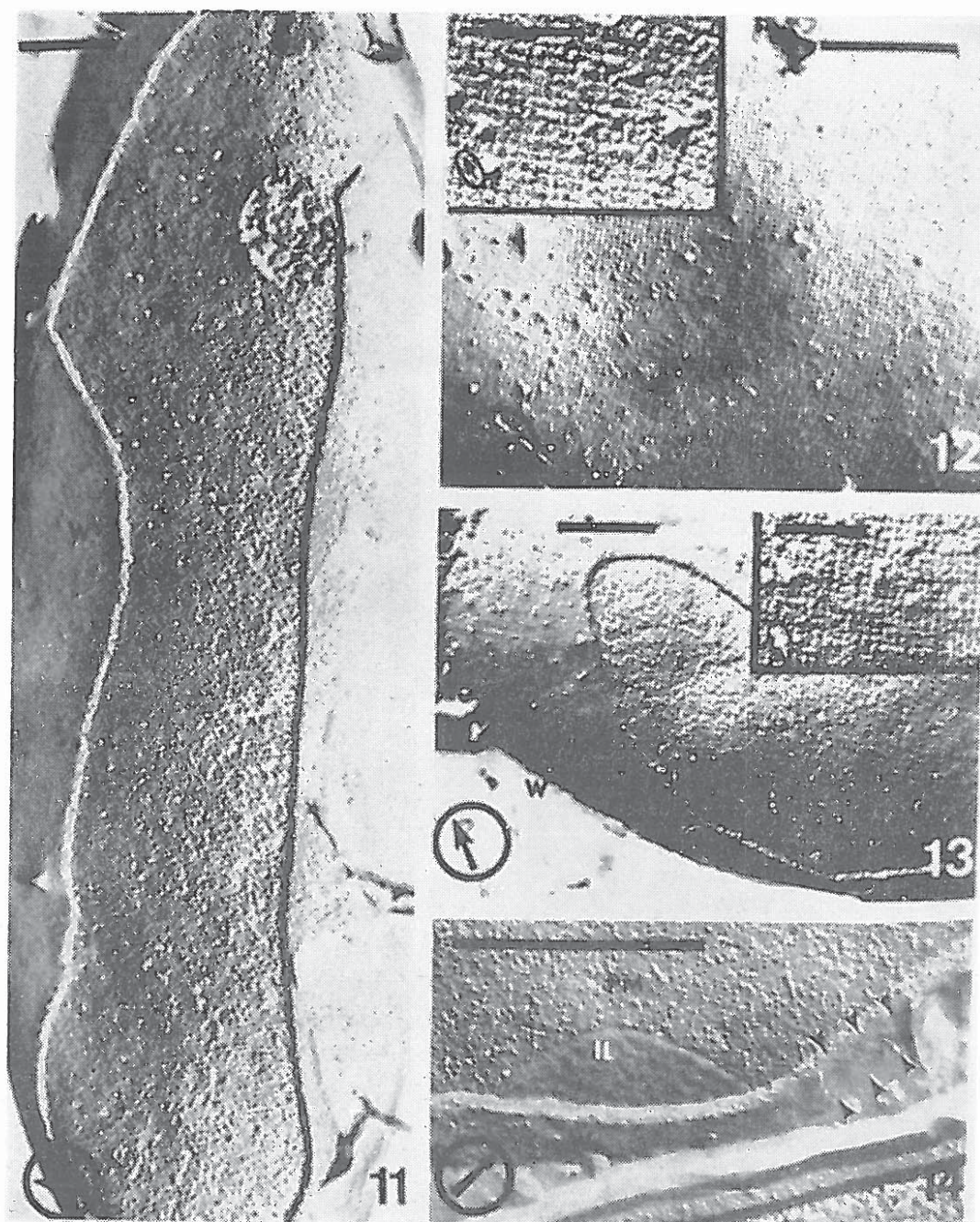
شکل (۲-۴) - برشی از باسیل بدون اسپور فاستیدیوس (B. Fastidious) را نشان میدهد که با متد فریز ایچینگ (Freeze Etch) تهیه شده است. در این اشکال، غشاء خارج (W) = غشاء سیتوپلاسمی (PM) = و سکن خارجی (S) = علامت گذاری شده است.



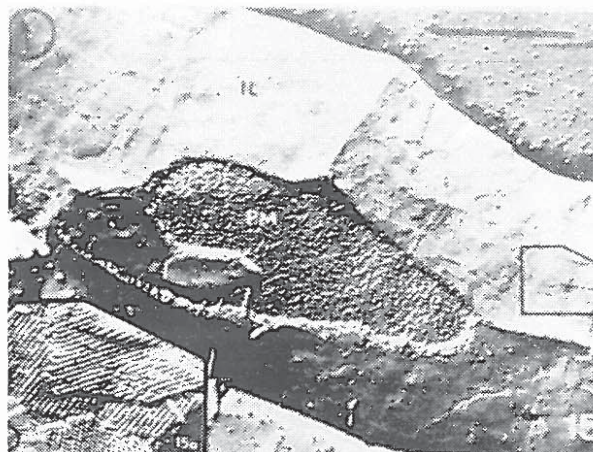
شکل (۵) برشی از باسیل بدون اسپور ماکروئید (B. Macroides) است.

شکل (۶) باسیل ماکروئید را که بامتد رنگ آمیزی منفی (Negative Stain) تهیه شده نشان میدهد. شکل (۸) - باسیل ماکروئید نوع P را که متد فریز ایچینگ تهیه شده نشان میدهد. شکل (۱۰۹) - باسیل ماکروئید نوع A که بامتد فریز ایچینگ تهیه شده است.

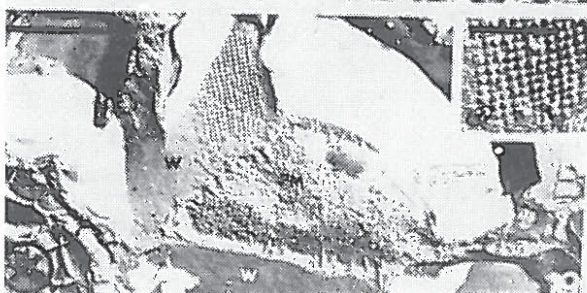
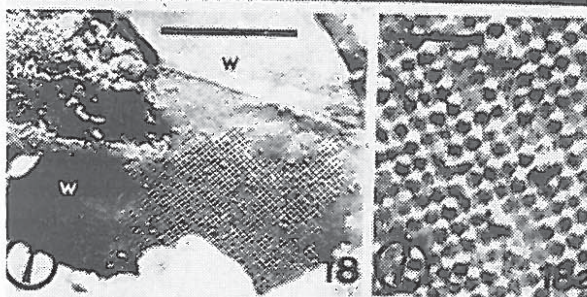
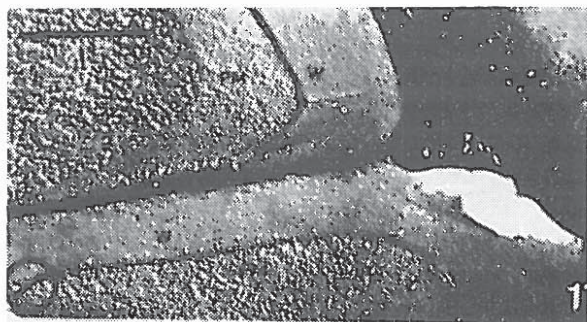
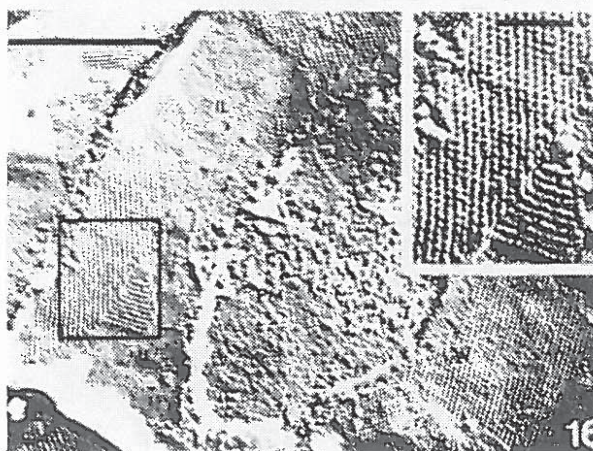




اشکال (۱۱-۱۴) - برشی از باسیل بدون اسپور پلی-
میگز (B. Polymyxa) میباشد که مزوزومها مشخص است.

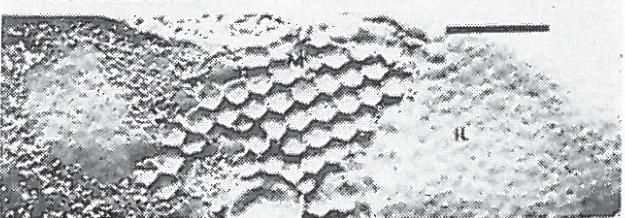
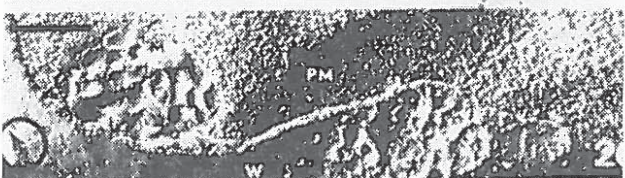
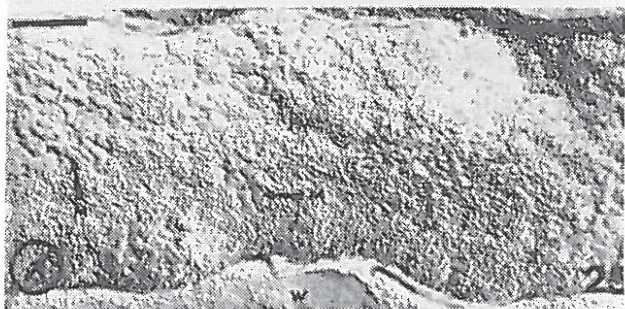
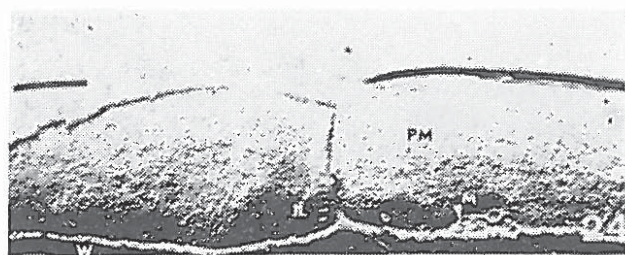
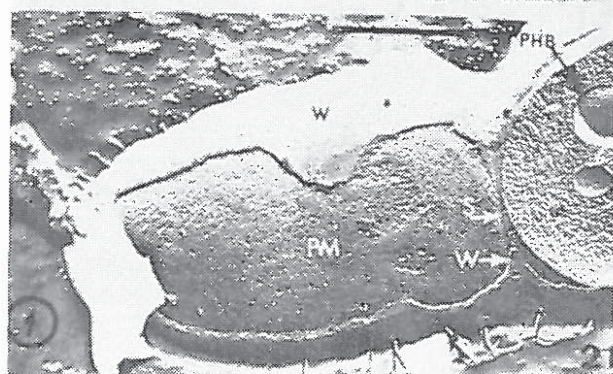
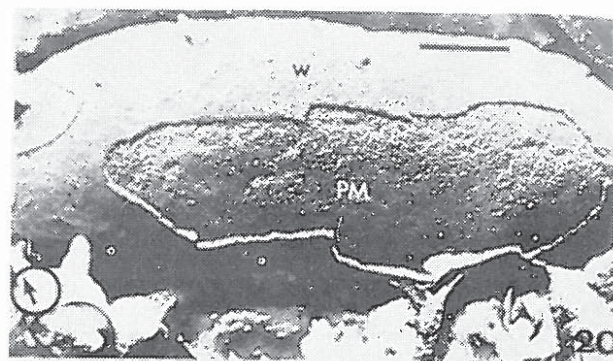


اشکال (۱۵-۱۶) - برشی از باسیل بدون اسپور شاربن
(B.Anthraxis) را نشان میدهد که متد فریز ایچینک تهیه
شده است.

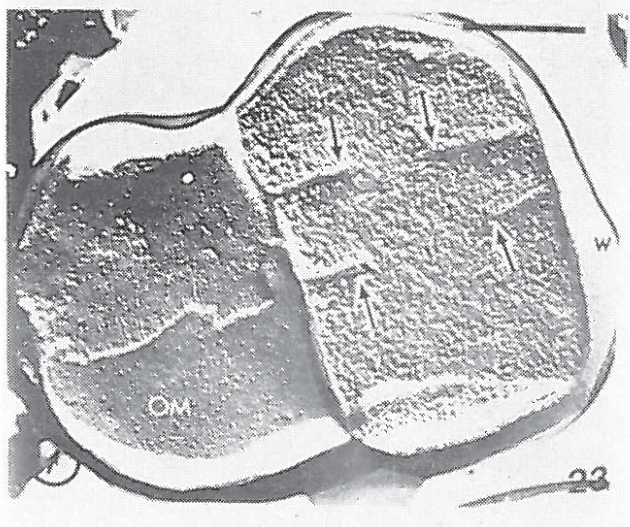
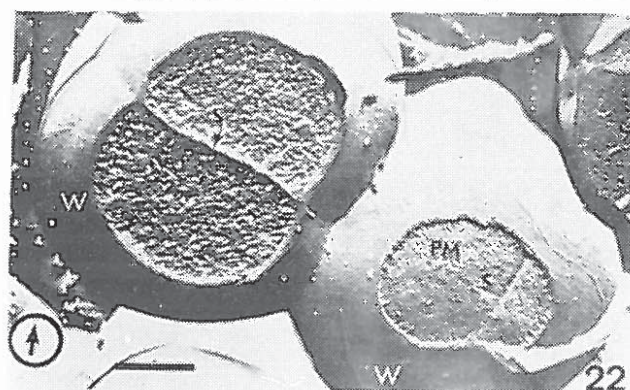


اشکال (۱۷-۱۹) - برشی از باسیل بدون اسپور پی -
کروفیل (B.Psychrophilus) که بامتد فریز ایچینک تهیه
شده است.

اشکال (۲۱ و ۲۰) - باسیل بدون اسپور مگاتریوم که برش داده شده است و گرانولهای PHB (Poly-B-Hydroxybutyrate) بخوبی نمایان است.



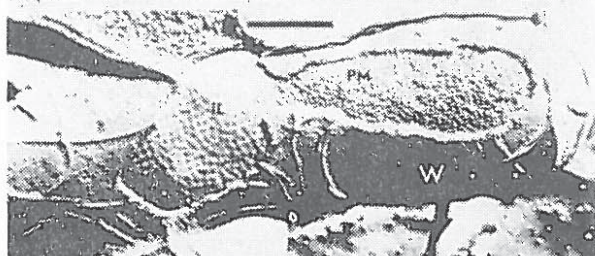
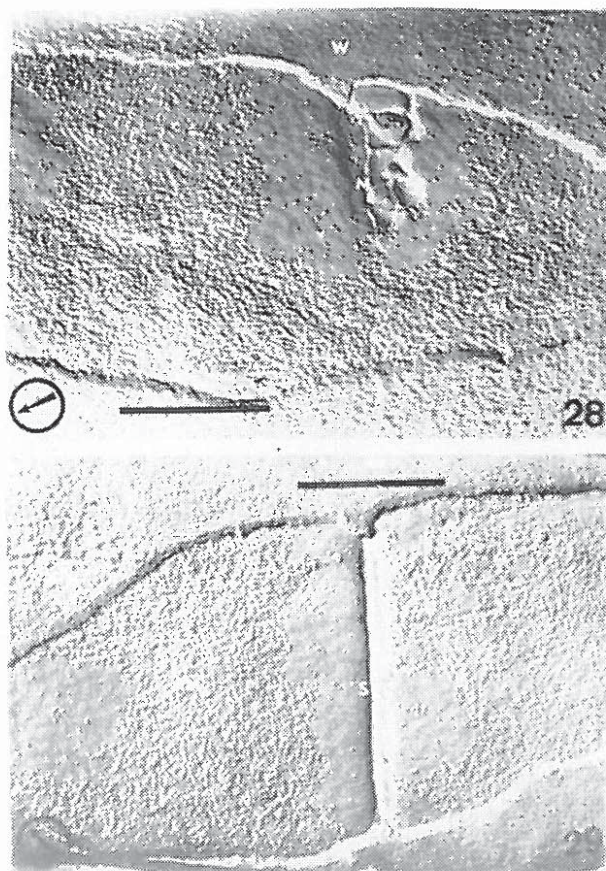
اشکال (۲۴-۲۷) - نشان دهنده برشی از باسیل سیریس (B.Cereus) است که M نشان دهنده محل مزوزوم و IL نشان دهنده لایه داخلی است.



اشکال (۲۲ و ۲۳) - برشی از باکتری سارسینا اورا (S.Ureae) است که بامتد فریز! چینگ تهیه شده است آروها نشان دهنده بندهایی در باکتری و OM نشان دهنده قسمت داخل غشاء پلاسما میباشد.

اشکال (۲۸ و ۲۹) - نشان دهنده برشی از باسیل سریس
(B.Cereus) است که پارتيكها در اطراف مزوزوم ها
مشخص نیستند.

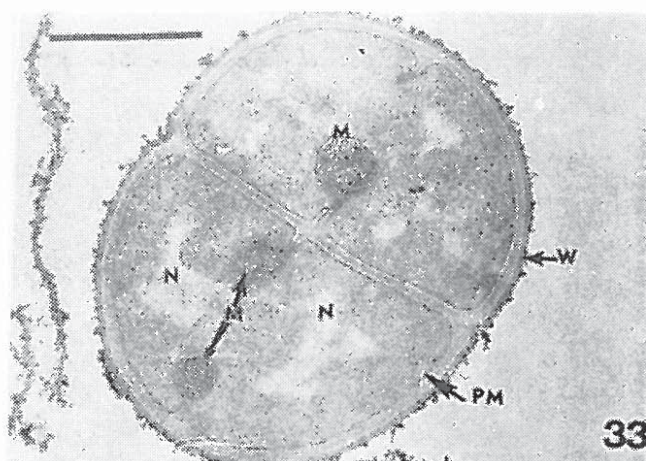
→



اشکال (۳۰-۳۱) - نشان دهنده برشی از باسیل سریس
(B. Cereus) است که مزوزومهای وارونه و پارتيكهای
سطحی را نشان میدهد.

شکل (۳۲) - نشان دهنده برشی از باسیل سریس
(B.cereus) است که بطور منظم پارتيكهای مشخصی را نشان
میدهد.

←



33

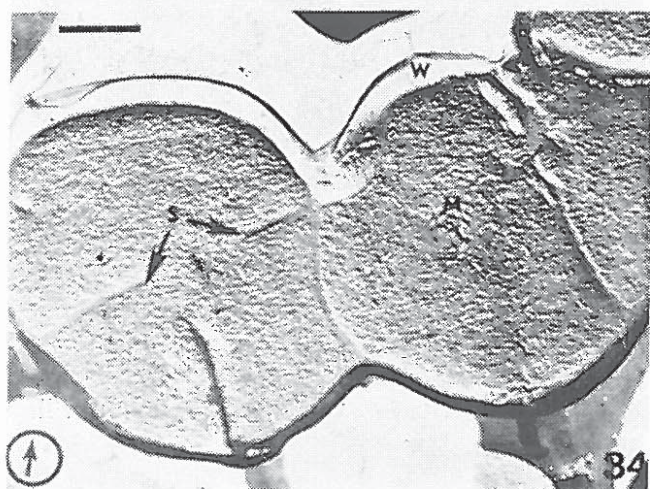
شکل (۳۳) - برش نازی از (S.Ureae) را نشان

میدهد و مشخص کننده محل مزوزمهاست .

شکل (۳۴) - برشی از (S.Ureae) که بامتد فریز-

ایچینک تهیه شده که بندهای (Septa) غشاء دیده میشود.

←



34

اشکال (۳۷-۳۵) - برشی از اسپور باسیل فاستیدیوس (B.Fastidious) است .

Spore Coat = لایه‌هایی از کت اسپور

Ridges Spore = قسمت انتهای اسپور

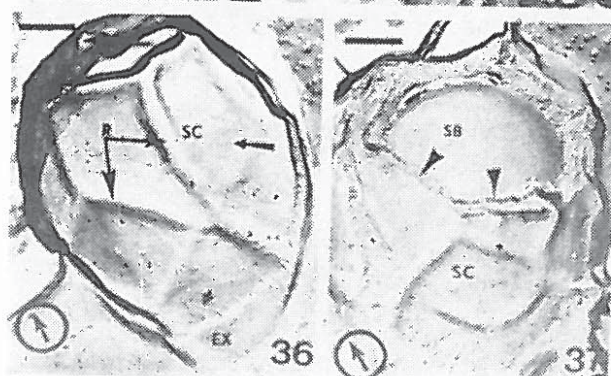
Exosporium = قسمت خارجی اسپور

Spore Body = بدن اسپور

→

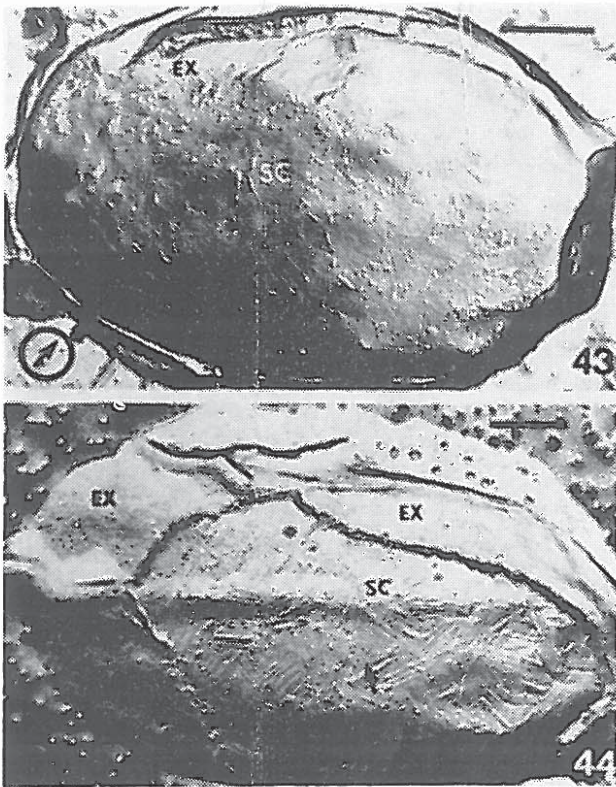


35

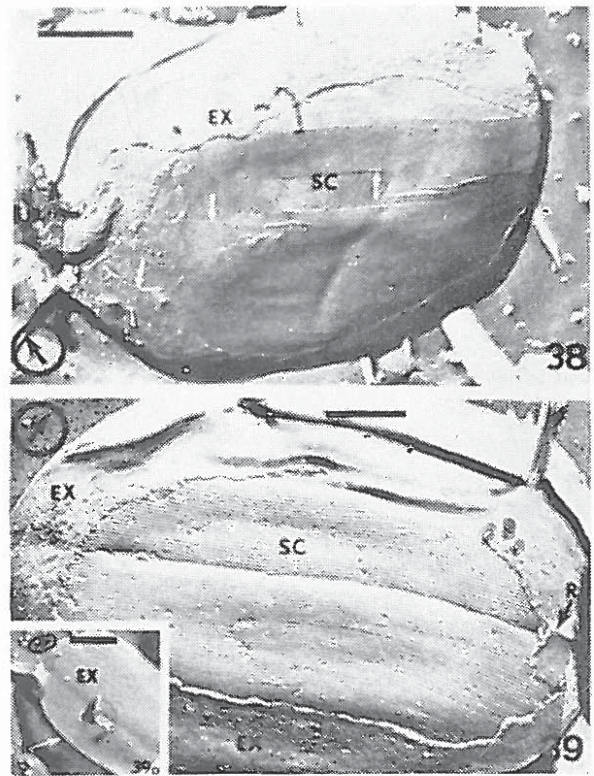


36

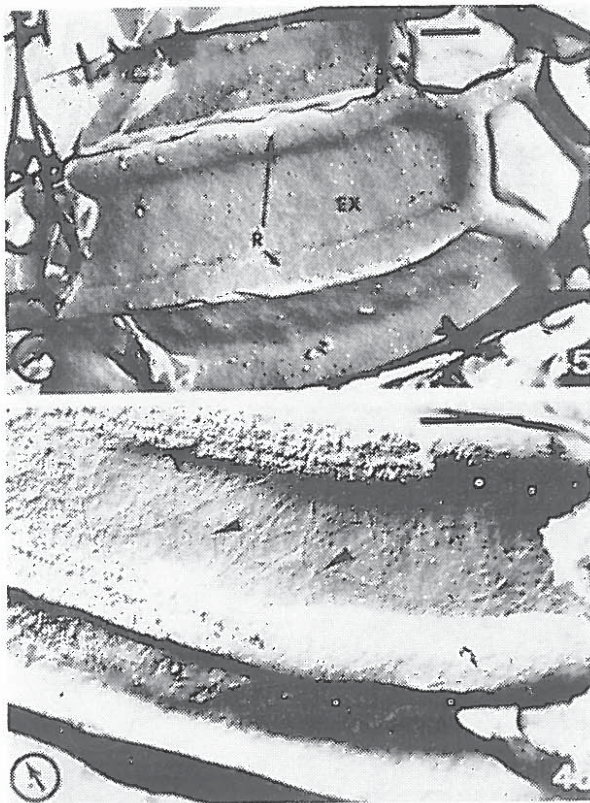
37



اشکال (۴۳-۴۴) برشی از اسپور باسیل سریس *B. Cereus* که بامتد فریز ایچینک تهیه شده است.



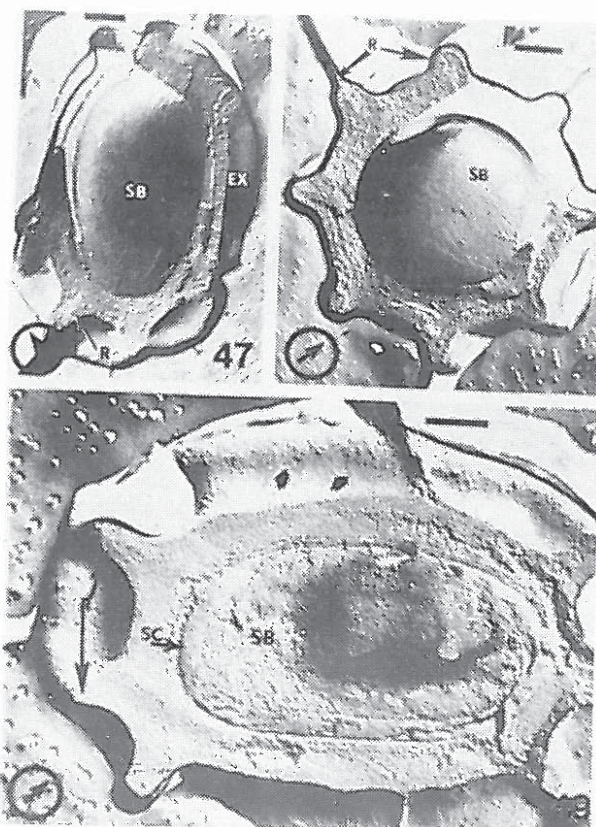
اشکال (۳۸-۳۹) - برشی از اسپور باسیل سو بتیلیس (*B. Subtilis*) که متد فریز ایچینک تهیه شده است.



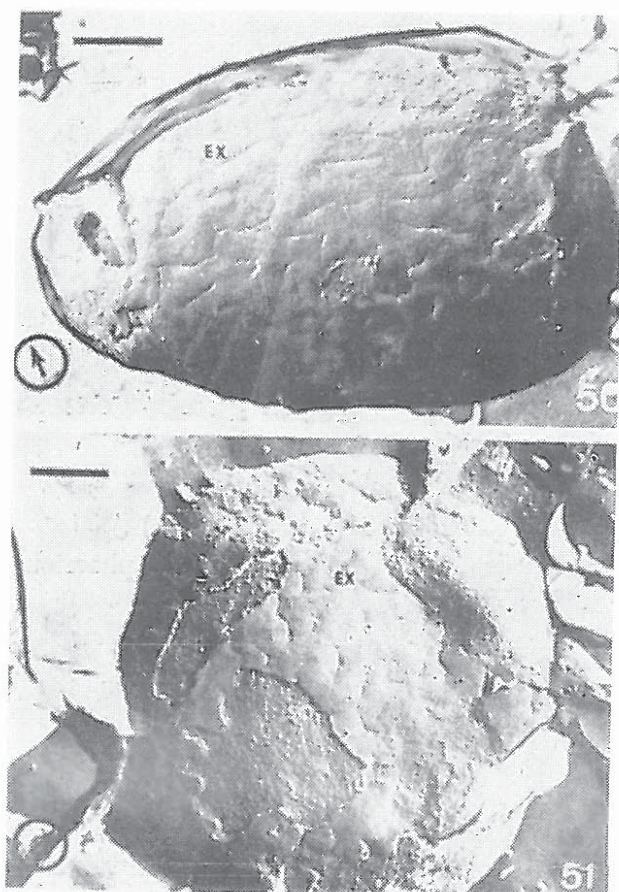
اشکال (۴۵-۴۶) - برشی از سطح خارجی اسپور باسیل پلی میکزا (*B. Polymyxa*) است که با متد فریز ایچینک تهیه شده است.



اشکال (۴۰-۴۲) - برشی از اسپور باسیل لچنی فورمیز (*B. Licheniformis*) که بامتد فریز ایچینک تهیه شده است.



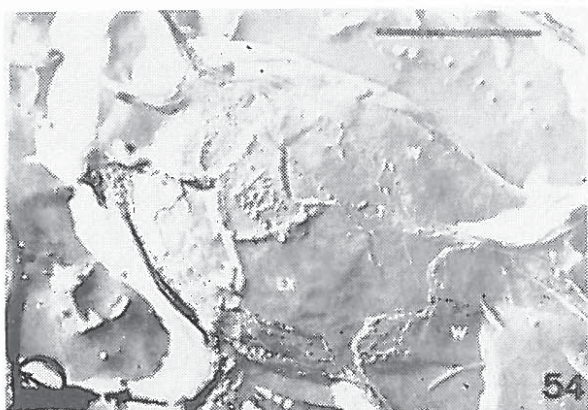
اشکال (۴۷-۴۹) - برشی از اسپور باسیل پلی میکزا
است که بامتدفریز ایچینک تهیه شده است.



اشکال (۵۰-۵۱) - برشی از اسپور باسیل متاتریوم
می باشد که بامتدفریز ایچینک تهیه شده است.

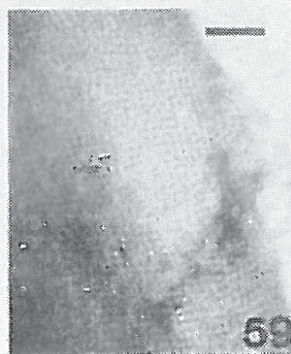
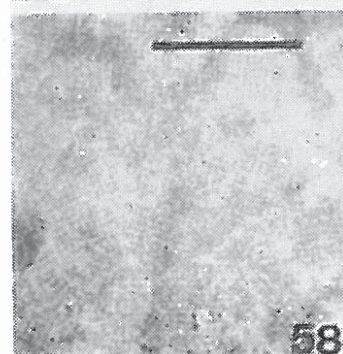
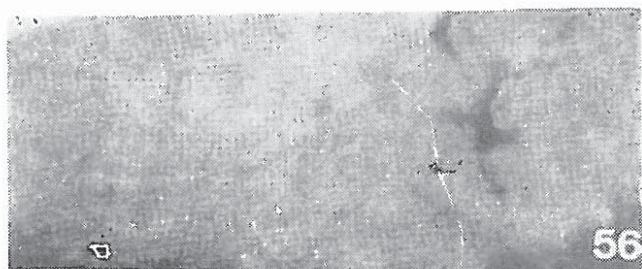
شکل (۵۲) - برشی از اسپور باسیل مگاتریوم را نشان
میدهد که قسمت خارجی اسپور مشخص است.

→



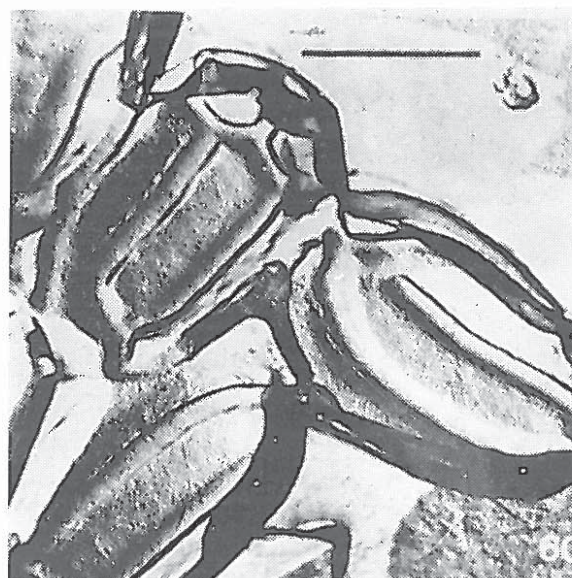
اشکال (۵۴-۵۵) - برشی از اسپور باسیل اسفاریکوس
(B.S phaericus) میباشد.

←



اشکال (۵۶-۵۹) - برشی از اسپور باسیلهای پلی میکزا
ماکروئید - فاستیدیوس و سیریس میباشد که بامتدنگ آمیزی
منفی (Negative Stain) تهیه شده است .

←



اشکال (۶۰-۶۱) کرین رپلیکه از اسپور باسیل پلی میکزا
و باسیل فاستیدیوس را نشان میدهد .

→