

Aspergillus niger 菌의 分生胞子에 관한 電子顯微鏡的 研究

蘇 仁 永

(1969. 6. 30. 接受)

(成均館大學校 生物學科)

The electron microscopic studies on conidio spores of *Aspergillus niger*

So In Young

(Dept. of Biology, Sung Kyun Kwan University)

ABSTRACT

Conidio spores of *Aspergillus niger* (strain No. NRRL 330) cultured on potato dextrose agar media were studied by electron microscopy, using the thin sectioning techniques. Conidio spores to be sectioned were fixed by triple methods with $K_2Cr_2O_7$, Glutaraldehyde and OsO_4 . After dehydrated with alcohol, the specimens were embedded in metacrylate and epon resin media, and thinly sectioned by Porter-Blum MT-2. After sectioned these specimens were negative-stained with uranyl acetate and observed by Hitachi HS-6 electron microscope.

The results of this experiment were summarized as follows.

1. The structures of spore wall system seem to be formed 4 layers; exosporium, basal layer, spore coat and unit cell membrane. The protuberance of spore surface that was looked like hair appears to be protruded from the basal layer.
2. The 3 layers of unit cell membrane was constituted outer layer membrane, inner layer membrane and inter-mediate light layer.
3. The structures of intra cytoplasmic membrane appear as spiral form which was consisted of 3 layers membrane system; outer membrane, inner membrane, and intermediate layer, which has pits.
4. The cement substance of spore coat and cortex may be changed quantitatively by physiological state in cell.
5. In some cases, we observed that the ribosome was transformed into poly ribosome group, and the storage materials and the protein crystals were changed variously. It has been suggested that the morphological change of some cytoplasmic materials may be caused by some specialized function of the physiological stage.

緒 論

微生物 胞子の 膜系構造는 高等植物의 細胞膜보다 복잡하게 되어 있으며 細胞質體의 構造와 物質은 種에 따라서 또는 細胞의 生理狀態에 의해서 많은變化가 있는 것으로 最近 많이 보고되고 있다.

TADASHI HIRANO (1962)¹⁷은 yeast의 미세구조 관찰에서 核은 50Å 두께의 二重核膜에 核膜孔이 있고, 核質속에는 仁과 chromatin 物質이 존재하고, 또한 細胞質속에는 電子密度가 적은 ribosome과 mitochondria의 存在를 보고했다. JAMES M, HYDE (1966)⁹는擔子胞子の 관찰에서 두개의 核과 二重核

膜에 核膜孔이 존재하고, 細胞質속에는 mitochondria, vesicular-body, ribosome의 grouping이 보이며, 原形質膜은 안쪽으로 속 들어가면서 陷沒되어 있다고 보고했다. 또 R.E. REICHDE(1967)¹⁶ 등은 Blastocladialla의 游走子の 관찰에서 二重膜系 構成의 kinetosome과 脂質顆粒은 vesicle의 變化에 따라서 그의 모양이 변한다고 했다.

BETTY J. MOBERLY(1966)⁸ 등은 炭疽熱菌의 胞子の 膜系構造를 관찰하고서 다음과 같이 報告하였다. exosporium의 基層에는 毛狀의 돌기가 붙어있고, spore coat와 cortex 및 core membrane 사이에는

parasporal inclusion body가 있으며 core wall 안에는 nucleoplasm, ribosome, 顆粒性物質 등이 있고, mesosome이 core membrane에 接近하는 狀態를 發芽生理로서 說明하였다. 또 TSUTOMU USHIJIMA (1967)²⁰은 膜系構成의 研究에서 外層은 不規則한 3層의 膜으로 되었고, 이 膜은 outer layer와 inner layer가 20~30Å 정도이고 中間의 inter mediate layer는 30~40Å이며, 細胞 表面에는 dense crust라고 하는 突出部位가 50~200Å로 나와있다. 또 內部の unit cytoplasmic membrane도 3層으로 되었고, 細胞 膜의 outer membrane과 cytoplasmic membrane의 사이에는 한층 혹은 두층의 bridges모양의 物質이 안쪽으로 합입되면서 이들 사이를 연결시키는 모양을 관찰했다. 細胞質속에는 小胞體와 비슷한 beaded cords가 nuclear fibrils와 結合되면서 原形質膜 쪽으로 이동하는 것을 보고했다. SUGANUMA(1968)¹은 mesosome이 細胞質속에서 존재하고 核과 細胞質 사이의 生理的 연락관계를 한다고 보고했고, PATRICIA M. BUCKLEY(1966)¹⁵ 등은 小胞體, mitochondria, storage-body, 磷脂類 內容物을 보고했다. 그 외에도 PATRICIA L. WALVE (1967)¹⁴은 golgi-cisternae, vesicle, 小胞體, mitochondria, 眼點顆粒, cytoplasmic vacuoles 등의 內容物을 관찰 보고 했다.

*Aspergillus*의 電子顯微鏡的 研究은 H. HIEUKA (1968)⁸가 孢子表面의 突起모양의 差異로서 品種間의 分類를 시도하였고, 朴(1968)²¹ 등은 分生孢子의 모양으로 分類를 시도하였다. 이 以外에 內部 微細構造에 대해서는 아직 보고 된바가 없다. 따라서 本人은 孢子의 發芽生理에 따라서 일어나는 內容物의 變化를 관찰하는 실험의 第一報로서 *Aspergillus niger*의 分生孢자를 休止期 狀態에서 관찰한 微細構造를 보고하는 바이다.

본 실험을 지도 편달하여 주신 成大 生物學科 李 載斗 博士와 建大 生物學科 李 培成 博士께 감사를 드립니다.

實驗材料 및 方法

供試材料는 *Aspergillus niger* (strain No. NRRL 330)을 potato dextrose agar media에서 29±1°C에서 10日間 培養後 形成된 分生孢자를 遠心分離시켜 實驗材料로 하였다. 實驗方法으로는 TODAGO HASHIMOTO (1966)¹⁸ 등의 方法에 의해서 K₂Cr₂O₇, OsO₄, glutaraldehyde의 三重固定方法을 使用하였다. 脫水는 alcohol過程을 거쳐 methacrylate 및 epon 樹脂로서 包埋하여 超切片하여 uranyl acetate로 電子染色을 하여 관찰하였다. 이때 使用한 microtome은

Porter-Blum MT-2이고 관찰한 電子顯微鏡은 HITACHI HS-6로 하였다.

實驗果結

*Asp. niger*의 分生孢자를 單離시켜 그대로 관찰하여 보면 많은 突起가 孢子의 表面에 돌출되어 있고, 가운데는 電子密度가 다른 圓型的 物質이 나타나고 주위에 vacuole와 같은 흰 部分이 나타난다(Fig. 1).

孢자를 切斷하여 보면 圓型和 橢圓型的 二型이 나타나며, spore wall, cortex, cytoplasmic membrane으로 膜系를 形成하고, 細胞質속에는 核, osmiphilic body, polyribosome grouping, storage body, 液胞, 顆粒 등을 관찰할수 있다(Fig. 3.4.5.). 또 ribosome이 유리된 狀態와 응집되어 poly-ribosome grouping 상태가 가끔 나타나고 있다(Fig. 6). 細胞質은 cytoplasmic strand의 얽힌 網狀構造로서 마치 小胞體와 같은 인상을 주고 있다(Fig. 7). 核은 1 또는 2核을 볼 수 있으며 仁은 뚜렷하지 않았다(Fig. 8).

膜系 構造를 보면 外層에 exosporium과 두터운 exosporium basal layer가 있으며 이곳에서 外部로 돌기가 나와 있고, 이 돌기의 속은 빈 것 같이 보인다. 다음 층은 밝은 spore coat로서 內容物質은 孢子의 生理狀態에 따라서 量의 變化를 나타내고 있다. cell membrane은 3層으로 構成되었고, inner layer와 outer layer의 사이에 inter mediate light layer를 볼 수 있다(Fig. 10). cytoplasmic membrane도 unit membrane으로서 3層으로 構成되었고 이들은 나선상을 이루고 있다. middle layer는 부푸려져서 液胞狀으로 보이며 나선상의 들어간 곳이 pit 같이 보인다. 이것은 흡사 vesicle body나 mesosome의 形成 初期와 같이 나타나고 있다(Fig. 11, 12). Fig. 11에 分布되고 있는 顆粒物質은 孢子가 圓型에서 橢圓型으로 進行됨에 따라 더욱 많아지고 뚜렷하게 나타나고 있다.

考 察

本 實驗의 結果에 나타난 뚜렷한 點은 膜系의 構造가 다른 研究者들 보고와 다소 差異點이 나타난 點이다. Fig. 11, 12에서 보여주는 것같이 原形質膜은 3層으로 되어 있으며 이 膜들은 나선상으로 꼬여 있다는 點이다. 또한 이 나선상으로 꼬인 안쪽의 들어간 部分이 pit 같이 보인다. 이것은 MERCEDES R, EDWARDS(1962)¹¹ 등이 *Actinomyces bovis*의 pit 관찰에서 endoplasmic membrane은 안쪽으로 꼬이면서 둥근 주머니 모양을 이루는 경우도 있고 또한

microvesicle-body를 둘러싸고 있는 경우, 또 細胞質 안으로 함입하면서 vesicle body를 形成하는 경우가 있다고 보고했으나 이것은 vesicle body와 膜系形成과의 관계를 설명한 것이다. 또 TSUTOMU·USHIJI-IMA(1962)²⁰은 bacteriodes의 細胞膜과 細胞質膜의 관찰에서 細胞膜은 80Å의 3층의 膜이며 胞子 주위에 突出物을 形成하여 50~200Å 크기의 dense crust를 形成짓고, 細胞質膜도 80Å 두께의 3층으로 된 unit membrane이며 이것은 때때로 bridges를 形成하여 細胞膜과 細胞質膜 사이를 연결하면서 細胞質 안으로 함입하여 들어가는 것을 볼수 있다고 하였다. 그러나 本 實驗에서 나타난 細胞質膜이 나선상으로 規則있게 꼬인 點과는 차이가 있다.

胞子の 外膜系 構成(Fig. 6. 9. 10.)은 exosporium 밑에 basal layer가 두텁게 자리잡고 있으며 이곳에서 돌기가 돌출하여 나가는 것 같다. 또 basal layer의 밑에 spore coat가 밝게 보이나 이곳은 cement物質이 있어서 그 細胞의 生理狀態에 따라서 量的 변화를 가져오는 것으로 본다. 細胞膜도 3層으로 되어 있으며 中間의 inter mediate light layer가 存在하고 있으며 原形質膜과의 사이에는 cortex物質이 존재하고 있다. BETTY, J.(1966)⁸ 등은 膜系構成은 exosporium, spore coat, cortex, core wall로 構成되고 突起는 exosporium basal layer에서 생기며 exosporium과 core membrane, spore coat 사이에는 parasporal inclusion body가 존재함을 주장하였다. 또 N. E. TSCHERNY(1966)²⁹은 cell wall은 600~700Å 정도이고 plasma membrane은 3층으로 구성되어 있고, inner layer는 細胞質 밑에 붙어있고 outer layer는 cell wall과 결합되어 가운데 밝은 inter space로 구별이 되고 이들 각 층은 100~110Å 범위에서 변화를 가져온다고 했다. GINA PURELIS(1967)⁵은 休止期의 胞子膜 관찰에서 膜은 1.3μ 두께의 複合 構造說을 주장하여 5층의 外膜系, 2층의 세멘트물질, 1층의 內膜으로서 3部分을 주장했다. 本 實驗에서의 突起의 生成層, 세멘트 물질, light layer 등은 上記 보고들과 일치하고 있다.

細胞質속의 內容物은 HERBERT VOELZ(1966)⁶와 PATRICIA M.(1966)¹⁵ 등의 보고를 종합하여 보면 phospho-lipid inclusion와 같은 inclusion material은 生理狀態에 따라서 增減하는 것을 볼수 있고, 空胞도 發芽에 따라서 增加한다고 보고 했다. polyribosome의 形成은 ribosome의 生理的 變化에 따라서 나타나는 것으로 볼수있다. protein 結晶의 構造는 dense body의 形成과 비슷하고, 이것은 cytoplasmic

architecture(cytoplasmic 이 꼬인것)을 설명해 준다. 이 꼬임에서 나타나는 single strand는 단백질 결정의 구조와 흡사하나, dense body는 strand의 농축으로 형성되는 것이다. 이런 dense body는 strand에 포함된 풍부한 RNA物質의 密集된 결과로서 나타나는 것으로 보고 되었다. 本 實驗에서도 Fig. 5. 6.에서 유리된 ribosome들이 눈에 띄고 있으나 이것이 진전되어서 Fig. 3. 4.에서 보여주는 바와 같이 storage body와 polyribosome들의 증가를 보여주고 또한 Fig. 7의 현저한 cytoplasmic strand가 농축되면서 細胞質의 樣相을 만들고 있어서 dense body의 증가와 vacuole의 증가 양상을 나타내고 있다(Fig. 3. 4. 5.). 核과仁은 二核性만을 관찰했으나 이것은 R.E. REICHL(1967)¹⁶과 JAMES, M.(1966)⁸ 등의 보고와 같다. 小胞體, 미토콘드리아 등은 관찰하지 못하였으나 이것은 種에 따라서, 生理代謝에 따라서, 또 D.N.A. 및 胞子形成 過程에서 多少의 差異가 나타난다고 보고 되고 있다(3. 6. 14.).

結 論

Aspergillus niger (strain No. NRRL 330)의 分生胞子를 $K_2Cr_2O_7$, OsO_4 , glutaraldehyde의 三重固定法을 使用하여 methacrylate 및 epon樹脂에 包埋하여 切斷後에 uranyl acetate의 電子染色을 거쳐 관찰한 결과는 다음과 같았다.

1. 膜系構成은 exosporium, basal layer, spore coat, unit cell membrane의 4층으로 되었고 basal layer에서 表面에 突起를 나타내고 있는 것 같다.

2. Unit cell membrane은 outer layer, inner layer, inter mediate light layer의 3층으로 構成되어 있는 것 같다.

3. Plasma membrane은 3층으로 되었으며 inter mediate layer를 中央에 두고 나선상의 꼬임을 보인다.

4. Spore coat와 cortex층의 物質은 細胞의 生理狀態에 따라서 量的 變化를 나타내고 있는 것 같았다.

5. Cytoplasm內에는 ribosome과 polyribosome의 전환을 볼수있고, 또한 storage materials, protein crystals의 內容物은 生理狀態에 따라서 構造的 변화를 일으키는 것 같았다.

REFERENCES

1. ATSUSHI SUGANUMA. (1968). Electron microscopic studies of Staphylococci by serial section. J. Electron microscopy, 17, 4, 315.
2. ATSUSHI SUGANUMA.(1966). Study on the

- fine structure of *Staphylococcus aureus*. J. Electron microscopy, 15, 4, 257—261.
3. BETTY, J. MOBERLY, F. SHAFI and PHILIPP GERHARDT. (1966). Structural details of Anthrax spore during stage of transformation into vegetative cells. Jour. Bacteriology, 92, 1, 220—228.
 4. BRACKER, C.E., and C.M. WILLIAMS. (1966). Comparative ultrastructure of developing sporangia and asci in fungi. 16th International congress for electron microscopy, vol. 2, 307.
 5. GINA PURELIS SKUCAS. (1967). Structure and composition of the resistant sporangial wall in the fungus *Allomyces*. Amer. J. Bot., 54, 9, 1152—1158.
 6. HERBERT VOELZ. (1966). *IN VIVO* induction of polysomes by limiting phosphate and the structural consequences in *Myxococcus xanthus*. 16th International congress for electron microscopy, vol. 2, 255.
 7. HIROSHI KUSHIDA. (1961). A new embedding method for ultra thin section using a methacrylate resin with three dimensional polymer structure. Jour. Electron microscopy, 10, 3, 64—67.
 8. IIZUKA, H. (1968). Use of a Scanning electron microscopy for the examination of *Aspergilli*. Jour. Electron microscopy, 17, 3, 264.
 9. JAMES, M. HYDE, et al. (1966). Ultrastructure of Basidio spore and mycelium of *Lenzites saepiaria*. Jour. Bacteriology, 92, 4, 1218—1227.
 10. LCDR JUDE R., M.C. HAYES, et al. (1966). The fine structure of *Neisseria meningitidis*. 16th International congress for electron microscopy, vol. 2, 289.
 11. MERCEDES R. EDWARD and MORRIS A. GORDON. (1962). Membrane system of *Actinomyces bovis*. 15th International congress for electron microscopy, Vol. 2, UU-3.
 12. MING CHUNG LIU CHEN. (1962). The fine structure of *Streptomyces cinnamomnsis*. 15th International congress for electron microscopy, Vol. 2, UU-5.
 13. OSUMI, M., and T. KATOH. (1966). Relation between respiratory system formation in yeast cell. 16th International congress for electron microscopy, Vol. 2, 301.
 14. PATRICIA L. WALNE. (1967). The effects of Colchicine on cellular organization in *Chlamydomonas*. II. Ultrastructure. Amer. J. Bot., 54, 5, 564—577.
 15. PATRICIA M. BUCKLEY, et. al. (1966). Electron microscopic of *Botry cinrea* conidia. Jour. Bacteriology, 91, 5, 2037—2044.
 16. REICHLER, R.E., and M.S. FULLER. (1967). The fine structure of *Blastocladiella emersonii*. Amer. J. Bot., 54, 1, 81—91.
 17. TADASHI HIRANO. (1962). The fine structure of the nuclear apparatus in *Saccharomyces*. 15th International Congress for electron microscopy, Vol. 2, UU-4.
 18. TODAYO HASHIMOTO and NAGAYUKI YOSHIDA. (1966). Osmium tetra oxide fixation for the ultrastructure studies of fungi. Jour. Electron microscopy, 15, 2, 99—101.
 19. TSCHERNY, N.E. (1966). The ultrastructure of intracytoplasmic membrane systems in cell of *Saina lutea*. 16th International congress for electron microscopy, Vol. 2, 239.
 20. TSUTOMU USHIJIMA. (1967). Fine structure of strictly anaerobic nonspore forming Gram-negative Bacilli. I. *Bacteroides insolitus*. Japan J. Microbiol., 11, 4, 275—287.
 21. 朴允仲, 崔宇永. (1967). Cellulase 生産菌에 관한 연구. Cellulase 生産菌의 同定 및 Cellulase 生産條件에 對하여, 忠南大學 大學院 學位論文集 1967 年度.

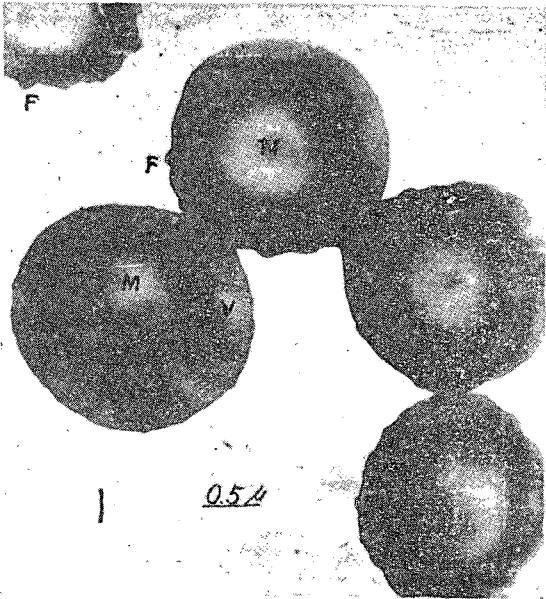


Fig. 1. General views of non-sectioned conidio spores. Appeared on Fringes (F) on surface, and dense light area (M) and light spots like vacuole (V) × 8,000

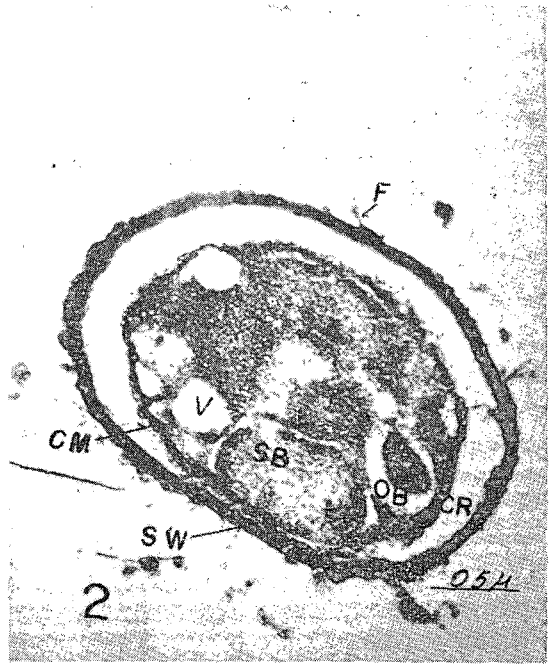


Fig. 2. General views of sectioned conidio spores. Showed various inclusion materials. OS; Osmophilic body. SB; Storage body. CR; Cortex. SW; Spore wall. CM; Cytoplasmic membrane. V; Vacuole. × 30,000

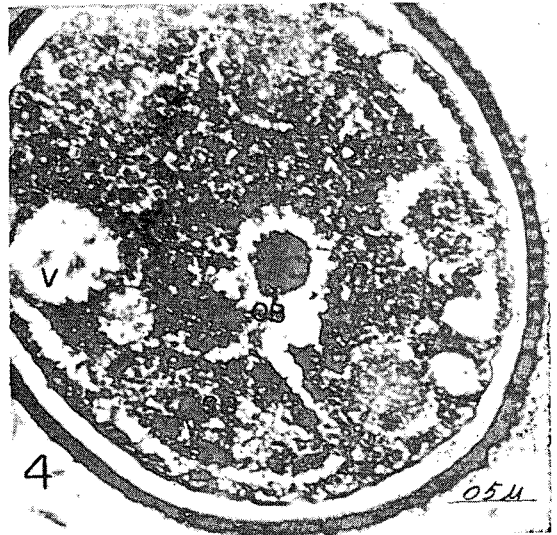
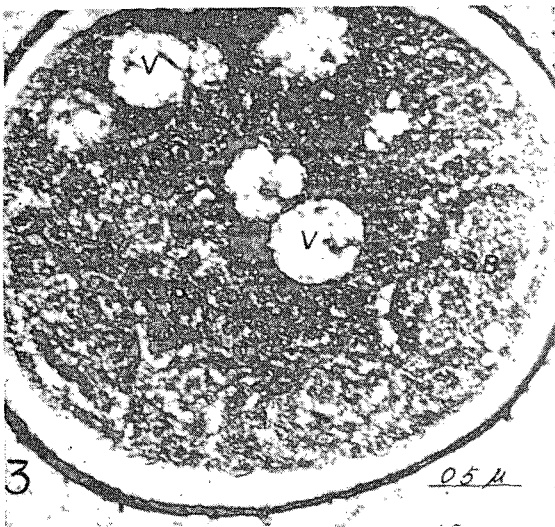


Fig. 3-4. Polysomes, storage body and osmophilic body are showed variously type and appears many vacuoles. × 25,000

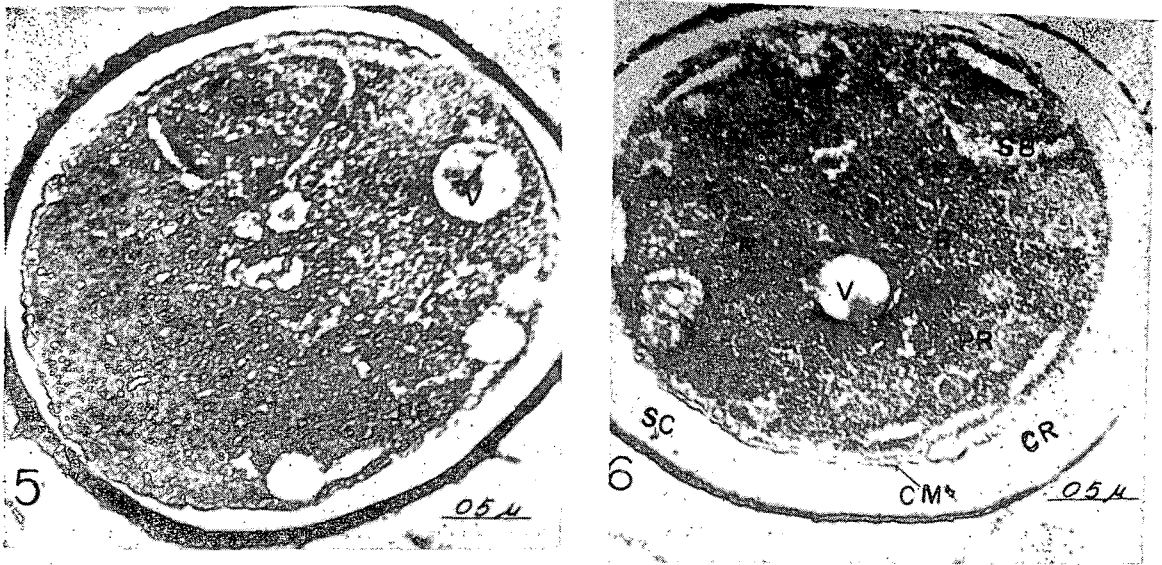


Fig. 5-6. Showed the cytoplasmic materials and spore wall system. CR; Cortex. CM; Cytoplasmic membrane. SC; Spore coat. PR; Poly ribosomes. R; Ribosome. $\times 25,000$



Fig. 7-8: Appeared the cytoplasmic materials were changed various type. CT; Cytoplasmic strand. CL; Cortex layer. $\times 25,000$

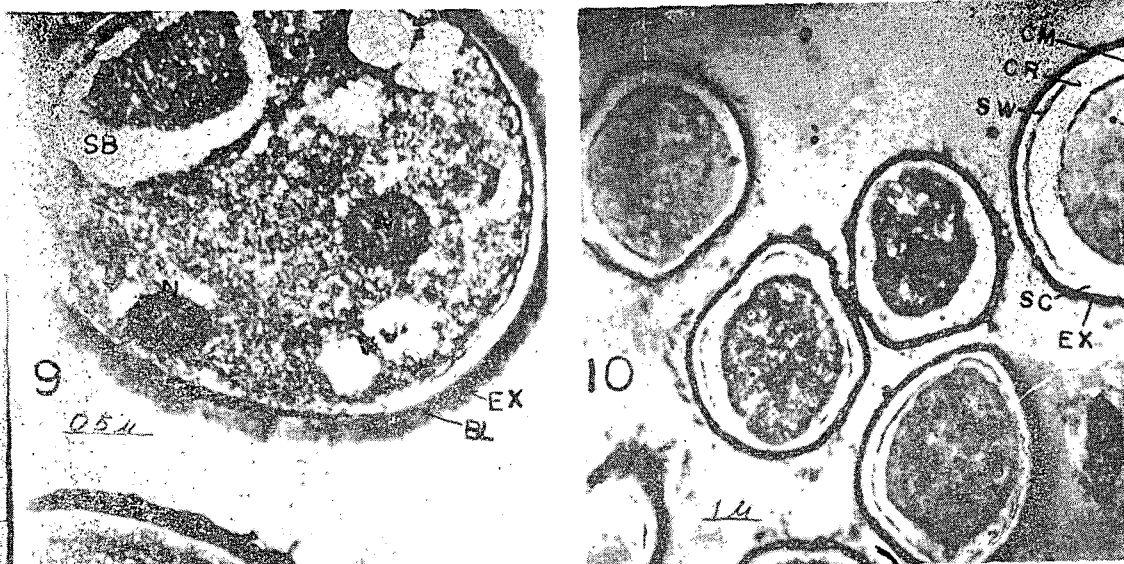


Fig. 9-10. Views of spore wall and membrane systems. Ex; Exosporium. BL; Basal layer. CW; Cell membrane. SC; Spore coat. CM; Cytoplasmic membrane. $\times 25,000$
 $\times 8,000$

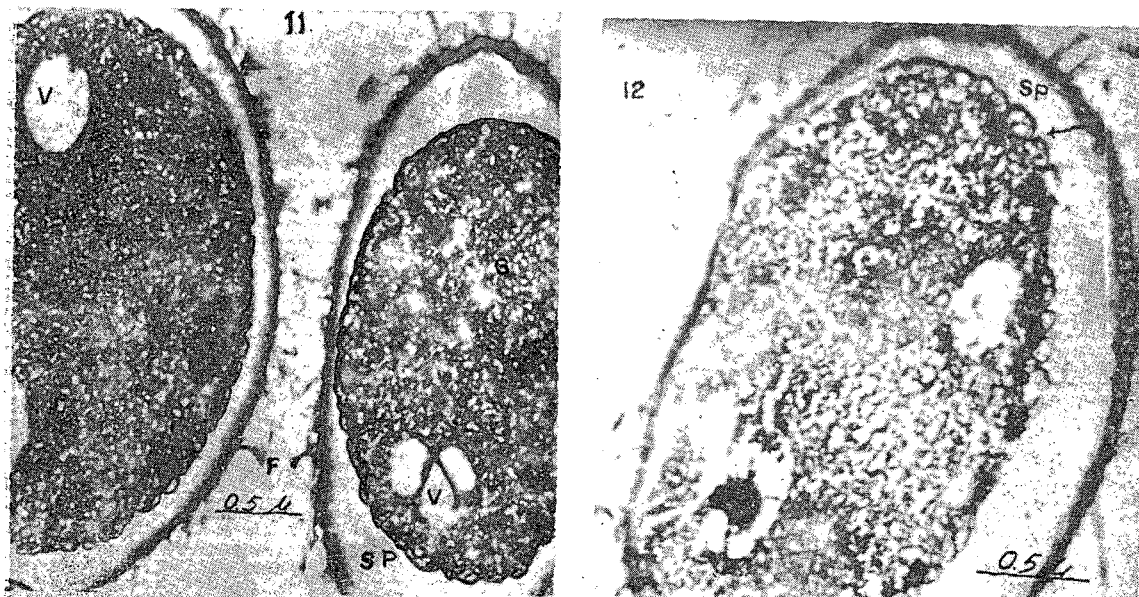


Fig. 11-12. Showed the spiral form of intra-cytoplasmic membrane and distribution of many protein crystals. $\times 25,000$ $\times 35,000$