

Е. Н. Аввакумова, М. Г. Шамцян

Цитохимические особенности клубеньковых бактерий сои

Морфологические, а также физиологические и биохимические свойства клубеньковых бактерий очень изменчивы и зависят не только от вида, но и от штамма *Rhizobium*.

Попытки связать отдельные свойства штаммов клубеньковых бактерий с их азотфиксирующей активностью были сделаны многими исследователями.

Так, отмечается большая величина клеток бактерий у эффективных штаммов (Федоров, Ласло, 1956; Ницэ, 1958).

Мелкумова (1957) не нашла такой закономерности для клубеньковых бактерий люцерны.

Установлена связь между слизиобразованием штамма и его азотфиксирующей активностью (Barooah, Sen, 1964). Более высокую дегидразную активность в чистой культуре у эффективных штаммов наблюдали Федоров, Ницэ (1961), Nita (1963), Шмидт (1964), Доросинский, Загорье, Бузинашвили (1966). Шильникова, Агаджанян (1965) не выявили связи между дыхательной активностью клубеньковых бактерий и их эффективностью. Не найдено корреляции между эффективностью и восстановительной способностью штаммов (Manil, Wernimont, 1961). Таким образом, результаты этих исследований иногда противоречивы.

Кроме того, наличие у штаммов клубеньковых бактерий тех или иных специфических полисахаридов в капсуле (Ljunggren, Fähræus, 1959; Ljunggren, 1961) имеет важное значение для вирулентности, а следовательно, и эффективности штамма.

В литературе встречается мало работ по изучению цитологии и цитохимии активных и неактивных штаммов клубеньковых бактерий. Задачей настоящего исследования является

изучение некоторых цитологических и цитохимических особенностей штаммов клубеньковых бактерий, с целью найти в дальнейшем связь между отдельными свойствами штаммов и их азотфиксирующей активностью.

Материалы и методика

Для исследования были взяты чистые культуры клубеньковых бактерий сои, 5 штаммов, № 631, 640, 642, 646, 647 различной активности (клубеньковые бактерии получены из Всесоюзного института сельскохозяйственной микробиологии, Ленинград).

Культуры выращивались на питательной среде для медленнорастущих клубеньковых бактерий (бобовый экстракт 1000 мл, $MgSO_4$ —0,5 г, K_2HPO_4 —0,5 г, $NaCl$ —0,2 г, $CaSO_4$ —0,1 г, маннит—20 г, молибден—следы).

Препараты-мазки приготавливались из 5- и 20-суточной культуры клубеньковых бактерий, фиксировались и проводились цитологические и цитохимические окраски и реакции. Для выявления клеточной стенки использовали окраску по Гутштейну, для ядерных элементов—раствор Гимзы после солянокислого гидролиза (Пешков, 1955)

Для цитохимического определения полисахаридов применялась реакция Шифф-йодная кислота (ШИК).

Для выявления природы ШИК-положительных веществ, реакция ШИК проводилась после экстракции липидов смесью метилового спирта, эфира и хлороформа, а также после обработки лизоцимом (для выявления мукополисахаридов) и гиалуронидазой (для выявления гиалуроновой кислоты). Для выявления метакроматической субстанции применяли окрашивание толуидиновым синим, для выявления кислых мукополисахаридов—окраску ализановым синим по Сиддмену, для гликогена—окраску йодным раствором Лисголя, для липидов—судан черный по Мак-Манусу; для выявления рибонуклеиновой кислоты—окраска пиронином по Браше при контрольной экстракции нуклеиновых кислот трихлоруксусной кислотой. Большинство цитохимических методов воспроизведено по

Пирсу (1962). Препараты просматривались со световым универсальным микроскопом Nu (Zeiss).

Результаты

По характеру роста на питательной среде исследуемые штаммы клубеньковых бактерий сои не отличались друг от друга, но по своим морфологическим признакам, размерам клеток, наличию бактероидных форм (рис. 1—5) штаммы уже в 5-суточной культуре имели заметные различия. Бактероидные клетки клубеньковых бактерий сои имели вид изогнутых палочек, реже разветвленной формы или уродливые, утолщенные с одного конца клетки.

Среди исследуемых штаммов особо выделяется штамм № 640 наличием мелких клеток и небольшим количеством бактероидов. Количество бактероидных клеток в возрасте 20 суток у всех штаммов увеличивается, однако штамм 640 и в этот период характеризуется малым количеством бактероидов.

По наличию нуклеоидов (ядерных элементов) в клетках, штаммы клубеньковых бактерий сои различались мало. Нуклеоиды были обнаружены в клетках бактерий у всех штаммов как в палочковидных, так и в бактероидных.

В мелких палочковидных клетках обычно наблюдалось по 1—2 нуклеоида, в бактероидных 3—4. В 20-суточной культуре окраска нуклеоидов была несколько слабее, но тем не менее достаточно хорошо выражена.

Изучение наличия и распределения полисахаридов в клетках клубеньковых бактерий сои у различных штаммов (см. таблицу) показало, что все изучаемые штаммы клубеньковых бактерий дали положительную реакцию ШИК, с помощью которой выявляются полисахариды. Полисахариды были найдены в клеточной стенке и в виде внутрицитоплазматических гранул, а также иногда диффузно распределены в цитоплазме.

При выяснении природы ШИК-положительных веществ оказалось, что положительную реакцию ШИК клеточной стенки в некоторых случаях можно отнести за счет наличия в

ней мукополисахаридов и гиалуроновой кислоты, так как после обработки препаратов лизоцимом и гиалуронидазой реакция ШИК была отрицательной или сильно ослабленной.

О наличии мукополисахаридов в клеточной стенке и, возможно, во внутреннем узком слое капсулы, непосредственно прилегающем к клеточной стенке, говорит и метакроматическое окрашивание этих структур клетки толудиновым синим (рис. 6—8) и окрашивание альциановым синим.

Окрашивание внутрицитоплазматических включений реактивом Шиффа можно отнести, в одних случаях, за счет окраски липидов, которые также могут дать положительную реакцию ШИК и, в других случаях, за счет наличия в клетках гликогена. Наличие липидов подтверждается окрашиванием их суданом черным, а наличие гликогена—окрашиванием раствором Люголя.

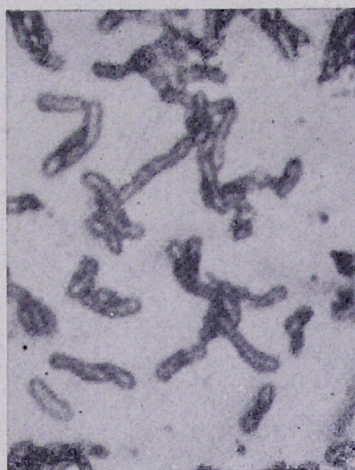
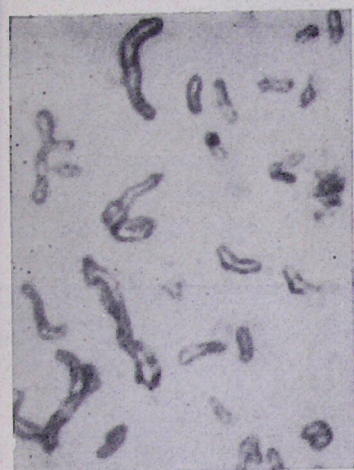
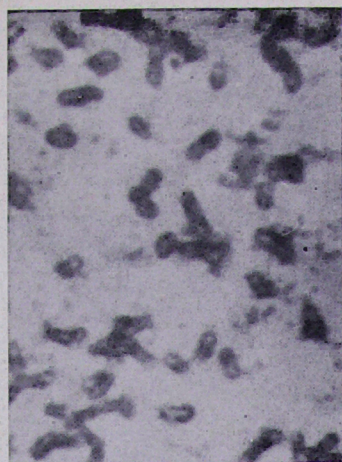
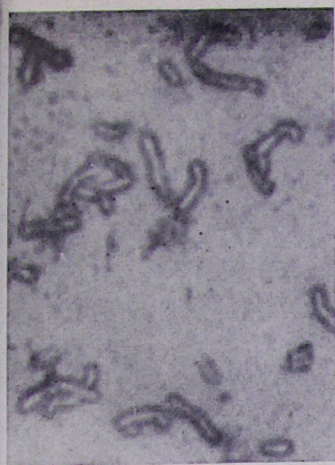
По наличию и распределению полисахаридов в клетках штаммы клубеньковых бактерий сои несколько различались.

Так, у штамма 642 не дала положительной реакции ШИК клеточная стенка. У штаммов 631 и 640 в 5-суточной культуре реактивом Шиффа (в реакции ШИК) цитоплазма окрасилась диффузно, в то время как у остальных штаммов такая окраска не наблюдалась. Путем предварительной обработки препаратов лизоцимом и гиалуронидазой с последующим проведением реакции ШИК в клеточной оболочке удалось обнаружить присутствие мукополисахаридов.

Мукополисахариды, в том числе и гиалуроновая кислота, были найдены в 5-суточной культуре у штамма 631, а в 20-суточной культуре—у штаммов 631, 646, 647.

В отношении наличия в клетках исследуемых штаммов гликогена (окраска раствором Люголя) можно отметить, что последний обнаруживался в очень незначительном количестве клеток в виде гранул только в 5-суточной культуре у всех исследуемых штаммов, кроме штамма 647, который не содержал гликогена в 5-суточной культуре. В 20-суточной культуре гликоген совсем не был найден.

Липиды были в клетках у всех штаммов клубеньковых бактерий, но количество клеток с липидными включениями



было неодинаковым. Наибольшее количество клеток, содержащих липиды, было у штаммов 646 и 647. У остальных штаммов количество клеток, содержащих липиды, было очень незначительным.

Штаммы различались также по наличию и локализации в клетках рибонуклеиновой кислоты (РНК). В 5-суточной культуре РНК (окраска пиронином по Браше) обнаруживалась или только в ядрах (штамм 631) или в ядрах и в цитоплазматической оболочке клетки (штаммы № 640, 642, 646 и 647).

У штамма 647 РНК, кроме того, была диффузно распределена в цитоплазме. В 20-суточной культуре РНК находилась в цитоплазматической оболочке и ядрах (штаммы № 631, 647) или в ядрах (штаммы № 640, 642, 646) и диффузно в цитоплазме № 640). Диффузное распределение в цитоплазме РНК и полисахаридов наблюдалось в различные периоды и у различных штаммов, поэтому их нельзя отнести к одним и тем же компонентам клетки, дающим ту или иную положительную реакцию.

При сравнительном исследовании палочковидных и бактериоидных клеток выясняется, что по наличию и распределению тех или иных полисахаридов, липидов и рибонуклеиновой кислоты они не различаются. Бактериоидные формы исследуемых штаммов характеризуются только большими размерами и большим количеством тех или иных внутрицитоплазматических включений. Иногда бактериоидные клетки бывают окрашены менее интенсивно, чем палочковидные.

Наличие нуклеоидов в бактериоидных клетках может служить, до некоторой степени, признаком их жизнеспособности и признаком способности их к делению.

Исходя из данных проведенного исследования, можно сделать некоторые выводы:

1. Между штаммами клубеньковых бактерий сои в чистой культуре наблюдаются некоторые различия в наличии и распределении в клетках полисахаридов, липидов и рибонуклеиновой кислоты.

2. Наличие и локализация полисахаридов, липидов и РНК

վ կлетках бактерий сои изменяются в связи с возрастом культуры.

3. Палочковидные («нормальные») клетки клубеньковых бактерий сои в чистой культуре мало отличаются от бактероидных форм по наличию и распределению в них тех или иных компонентов.

Различия между палочковидными и бактероидными клетками выражены в их размере и форме.

Это дает возможность предположить, что бактероидные клетки могут быть жизнеспособными и не всегда являются инволюционными образованиями.

4. Цитологические и цитохимические особенности, присущие отдельным штаммам клубеньковых бактерий сои, возможно удастся связать в дальнейшем с их азотфиксирующей активностью.

Ե. Ն. ԱՎԱԿՈՄՈՎԱ, Մ. Գ. ՇԱՄՏՅԱՆ

ՍՈՅԱՅԻ ՊԱՆԱՐԱՐԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԲՋՋԱՐԻՄԱԿԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Պալարարակտերիաների շտամներն էֆեկտիվության և առանձին հատկանիշների միջև փոխադարձ կապը հայտնաբերելու նպատակով հետազոտվել են սոյայի պալարարակտերիաների 5 շտամների (տարբեր ակտիվության) 5 և 20 օրական կուլտուրաների որոշ բջջարանական ու բջջարիմիական առանձնահատկությունները:

Բջջարանական ու բջջարիմիական մեթոդների օգնությամբ սոյայի պալարարակտերիաների մաքուր կուլտուրաներում ի հայտ են բերվել բջջապատեր, նուկլեոիդները, պոլիսախարիդները, մուկոպոլիսախարիդները, այդ թվում՝ հիալուրոնաթթուն: Կատարված հետազոտությունների արդյունքներից պարզվել է, որ սոյայի պալարարակտերիաների շտամների միջև ըստ բջիջներում պոլիսախարիդների, ճարպերի, ռիբոնուկլեինաթթվի առկայության և տեղարաշխման կան որոշ տարբերություններ:

Պոլիսախարիդների, լիպիդների, ռիբոնուկլեինաթթվի առկա-

յությունն ու տեղաբաշխումը փոփոխվում են, կապված կուտուրայի հասակի հետ:

Սոյայի պալարաբակտերիաների նորմալ-ձողաձև և բակտերոիդ ձևերի բջիջներում ըստ վերոհիշյալ կոմպոնենտների առկայության ու տեղաբաշխման տարբերություններ չեն նկատվում: Ձողաձև ու բակտերոիդ ձևերի միջև տարբերություններ նկատվում են նրանց չափերում ու ձևերում:

E. N. Avvakumova, M. G. Shamtsian

The cytochemical peculiarities of nodule bacteria of the soy-bean

Summary

An examination of the cytochemical peculiarities of nodule bacteria of the soy-bean in pure culture has enabled us to discover the differences between particular strains as to the presence and distribution in the cells of bacteria of polysaccharides, lipids and ribonucleic acid.

The pressence and localization of polysaccharides, lipids and ribonucleic acid in the cells of nodule bacteria of the soy-bean vary with the age of the culture.

The rod forms of nodule bacteria in pure culture are but slightly distinguished from the bacteroid ones as far as their cytochemical peculiarities are concerned. They differ only in size and form of the cells.

ЛИТЕРАТУРА

- Доросинский Л. М., Загорье И. В., Бузиашвили Д. М. 1966. Определение азотфиксирующей способности клубеньковых бактерий по активности ферментов. «Микробиология», XXXV, 2, 319.
- Мелкумова Т. А. 1957., Штаммовые особенности клубеньковых бактерий, выделенных из разных сортов люцерны, возделываемых в условиях Азербайджанской ССР. «Изв. АН СССР», Сер. биол., 5, 617.
- Ницэ Л. 1958. Азотфиксирующая активность клубеньковых бактерий гороха и вики и динамика накопления азота в бобовом растении. Канд. диссертация.
- Пирс Э. 1962. Гистохимия, ИЛ, М.
- Пешков М. А. 1955. Цитология бактерий, Изд. АН СССР, М.—Л.

- Федоров М. В., Ласло Д. 1956. Азотфиксирующая активность клубеньковых бактерий гороха и вики в клубеньках в разные фазы развития бобового растения. «Изв. тимирязевск. с.-х. акад.», № 2, 61.
- Федоров М. В., Нице Л. 1961. Физиологические различия между штаммами клубеньковых бактерий гороха и вики, обладающими разной азотфиксирующей активностью. «Микробиология», XXX, 473.
- Шильникова В. К., Агаджанян К. Г. 1965. Дыхательная активность различных штаммов клубеньковых бактерий. Д. ТСХА, 13, 329.
- Шмидт Э. Ф. 1964. Дифференциация штаммов клубеньковых бактерий на основании данных по определению активности «бессубстратных» дегидраз. «Микробиология», 33, 2, 284.
- Barooah P. P., Sen A. 1964. Nitrogen fixation by beijerinckia in relation to slime formation. „Arch. Microbiol.“ 48,4, 381
- Ljunggren H., Fahraeus G. 1959. Effect of Rhizobium polysaccharide on the formation of polygalacturonase in lucerne and clover. Nature 184, 4698, 1578
- Ljunggren H. 1961. Frausfer of virulence in Rhizobium trifolii, Nature 191, 4788, 623
- Manil P., Welnimont H. 1961. Action differentielle de diverses souches de Rhizobium sur des indicateurs de rH. „Antonie van Leeuwenhoek“, J. Microbiol. and Serol., 27, 1, 113
- Nitá L. 1963. A borso és büköny gyökérgumotból izolált nagy nitrogénkötő képességgel rendelkező Rhizobium—törzsek fiziológiai sajátosságai, Agrochem. es talaj., 12, 4, 655