

М. Г. Шамцян, Е. Н. Аввакумова

КАПСУЛЬНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ГОРОХА И ИХ ПОЛИПЛОИДНЫХ ФОРМ

Качественный и количественный состав внеклеточных полисахаридов клубеньковых бактерий часто изучался в связи с вопросами проникновения и вирулентности (Ljunggren, Fahraeus, 1959; Ljunggren, 1961; Macgregor, Alexander, 1972), иммунохимии (Dudman, 1964; Lorkiewicz, Russa, 1971) и таксономии (Humphrey, Vincent, 1959; Graham, 1965; Zevenhuizen, 1971). В литературе имеются единичные и противоречивые сообщения об исследованиях внеклеточных полисахаридов в связи с эффективностью азотфиксации. Бейли с соавторами (Bailey et al., 1971) сообщает, что у штаммов *Rhizobium*, симбионтов культур *Lotus*, наличие или отсутствие внеклеточных полисахаридов коррелирует с их эффективностью. Налбандян с соавторами (1975) не нашел зависимости между синтезом полисахаридов у клубеньковых бактерий эспарцета, гороха, люцерны, сои и их эффективностью. Не установлено также связи между эффективностью и количеством глюконовой кислоты у мутантов клубеньковых бактерий люцерны и клевера (Francis, Alexander, 1974).

В литературе отсутствуют цитохимические исследования капсульных полисахаридов у штаммов клубеньковых бактерий, различающихся по эффективности. Все вышесказанное послужило основанием для проведения цитохимических исследований полисахаридов капсулы клубеньковых бактерий гороха и их мутантов, обладающих различной симбиотической эффективностью.

В качестве объектов исследования использовались штаммы клубеньковых бактерий гороха различной эффективности - №№36, 65, 68, 123, 140, 144, 227а и мутантные, полиплоидные формы штамма №123 - №№123а, 123а₆₀, 123аа₄₈, 123ак₉, 123к₄₉, 123к₅₉, 123ак₃₁ и 123ас₃₆. Полиплоидные формы клубеньковых бактерий гороха получены с помощью полиплоидогенов колхицина и камфоры, а также при совместном выращивании их с азотобактером.

Вещества полисахаридной природы выявлялись реакцией Шифф-иодная кислота (ШИК). Кислые мукополисахариды дифференцировались с помощью метакроматического окрашивания толудиновым синим, а нейтральные мукополисахариды - при наличии метакромазии после сульфатации. Гиалуроновая кислота окрашивалась альциановым синим по Сиддмену. Специфичность окрашивания контролировалась обработкой гиалуронидазой. Реакции и окраски в основном воспроизведены по руководству Пирса (1962).

Препараты просматривались световым микроскопом марки NU (Zeiss).

Результаты исследований

Основные результаты цитохимических исследований собраны в табл. 1. Окрашивание толудиновым синим 3 - суточных культур клубеньковых бактерий выявляет наличие узкой метакроматически окрашенной капсулы у штаммов №№68, 123, 144 и 227а, а также у полиплоидных мутантов №№ 123аа₄₈, 123ак₃₁, 123ак₉, 123а, 123к₅₉, что указывает на наличие в капсуле кислых мукополисахаридов. В старых культурах (20-суточных) капсулированных клеток становится больше, слой капсулы - значительно шире (рис. 1.) Метакроматическое окрашивание кислых мукополисахаридов чаще наблюдается во внешнем слое капсулы. Кислые мукополисахариды в капсуле 20-суточных культур найдены у всех изученных природных штаммов. У мутантов они были обнаружены лишь у трех штаммов - 123а₆₀, 123ак₃₁, 123ак₉.

Сульфатация вызывает усиление метакроматического эффекта и выявляет нейтральные мукополисахариды. Нейтральные мукополисахариды выявлены только у штамма №36 в 20-суточной культуре, а у полиплоидных мутантов слабое метакроматичес-



Рис. 1 . Капсула клеток клубеньковых бактерий гороха, штамм 144: а - 3-суточная культура: б - 25-суточная культура. Ок-
рашивание толуидиновым синим. Увеличение в 3500 раз.

кое окрашивание после сульфатации обнаружено у всех штаммов в 3 - суточной культуре и у пяти штаммов в старой культуре. Появление нейтральных мукополисахаридов в капсуле у мутантов, в отличие от исходного штамма №123, говорит об изменениях, происшедших в клетках, в результате мутагенеза.

С помощью окрашивания альциановым синим обнаружено наличие капсулированных клеток у всех изученных культур *Rhizobium leguminosarum* как природных, так и мутантных штаммов. Капсула при этом окрашивается с разной интенсивностью. Предварительная обработка препаратов гиалуронидазой заметно снижает восприимчивость капсулы к альциановому синему и указывает на наличие гиалуроновой кислоты. Гиалуроновая кислота была выявлена в капсуле у всех штаммов в 3-суточной культуре, а у штаммов №68, 123, 227a - в 20-суточной культуре. У полиплоидных мутантов гиалуроновая кислота в капсуле не обнаружена только у штаммов 123ак^{9 49} и 123 ак³¹ - 3-суточной культуры и у четырех штаммов (123ак^{9 49}, 123ак³¹, 123к⁵⁹ и 123ас³⁶) - в 20-суточной культуре.

Результаты реакции ШИК указывают на отсутствие ШИК - положительных веществ в капсуле клеток 3-суточных культур у природных штаммов и на слабо-положительную реакцию у мутантов. В старых культурах встречаются скопления капсулированных клеток со слабой ШИК - положительной реакцией капсульного материала.

Таким образом, из примененных нами методов наиболее пригодными для выявления капсульного материала клубеньковых бактерий оказались методы с применением толуидинового синего и альцианового синего, которые превосходили реакцию ШИК. Отрицательная или слабо-положительная реакция ШИК капсульного вещества вызвана, очевидно, частичным или полным вымыванием веществ полисахаридной природы во время проведения реакции.

В некоторых случаях восприимчивость капсулы к альциановому синему не сопровождается метакроматическим окрашиванием толуидиновым синим. Вероятной причиной этих расхождений может быть различная чувствительность методов. В отдельных случаях низкая концентрация кислых мукополисахаридов может быть недостаточной для получения метакроматического эффекта.

Таблица 1

Полисахариды капсулы* клубеньковых бактерий
гороха и их полиплоидных форм

Компоненты капсулы	Возраст культур (сутки)	Природные штаммы							неэф-фективные 36
		эффективные				малоэффективные			
		65	68	123	144	140	227a		
кислые	3	-	+	+	+	-	+	-	
мукополисахариды	20	+	+	+	+	+	+	+	
гиалуроновая кислота	3	+	+	+	+	+	+	+	
нейтральные	20	-	+	+	-	-	+	-	
мукополисахариды	3	-	-	-	-	-	-	-	
	20	-	-	-	-	-	-	+	

Мутанты								
		эффективные				малоэф-фективные		неэф-фективные
		123a	123aa	123ак	123ак ^a	123a	123к	123ас
		60	48	31	9	49	58	36
кислые	3	-	+	+	+	+	+	-
мукополисахариды	20	+	-	+	+	-	-	-
гиалуроновая кислота	3	+	+	-	-	+	+	+
нейтральные	20	+	+	-	-	+	-	-
мукополисахариды	3	+	+	+	+	+	+	+
	20	+	+	-	-	+	+	+

* + - положительная реакция
- - отрицательная реакция

Выводы

1. В капсуле клубеньковых бактерий гороха содержатся кислые мукополисахариды, в том числе и гиалуроновая кислота, а также нейтральные мукополисахариды.

2. Между отдельными штаммами клубеньковых бактерий гороха наблюдаются различия по наличию тех или иных полисахаридов.

3. Наличие или отсутствие указанных полисахаридов в капсуле не коррелирует с эффективностью штаммов в симбиозе. Сходные результаты были отмечены и раньше для клубеньковых бактерий кормовых бобов, но для небольшого количества штаммов (Аввакумова и др. 1970).

4. Повышение плоидности штаммов под воздействием полиплоидогенов вызвало изменения в содержании полисахаридов в капсуле у мутантов. Но и в этом случае не найдено связи между содержанием полисахаридов в капсуле и их эффективностью в симбиотических условиях.

Մ. Գ. Շամցյան, Ե. Ն. Ավակումովա

ՈԼՈՒԻ ՊԱԼԱՐԱՐԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ՊՈԼԻՊԼՈԻԴ
ԶԵՎԵՐԻ ԿԱՊՍՈՒԼԱՑԻՆ ՊՈԼԻՍԱԽԱՐԻԴՆԵՐԸ

Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Աշխատանքը նվիրված է տարբեր էֆեկտիվություՆ ունեցող ոլոսի պալարաակտերիաների և նրանց պոլիպլոիդ ձևերի ցիտոքիմիական հետազոտությանը:

Ուսումնասիրությանը արդյունքները ցույց են տալիս, որ պալարաակտերիաների կապուլաները պարունակում են չեզոք և թթվային մուկոպոլիսախարիդներ, վերջիններին թվում է հիալուրոնաթթու: Պալարաակտերիաների առանձին շտամների միջև բոս վերոհիշյալ պոլիսախարիդների առկայության նկատվում են տարբերություններ, որոնք սակայն չեն կորելացվում նրանց էֆեկտիվության հետ:

Պոլիպլոիդոգենների կիրառամբ ստացված ձևերի մոտ նշվում են պոլիսախարիդների պարունակության փոփոխություններ:

ЛИТЕРАТУРА

- Аввакумова Е. Н., Розанова Л. И., Шамцян М. Г. 1970. Биол. журнал Армении. 23, 5.
- Налбандян А. Д., Бабаян Г. С., Саядян Н. М. 1975. Тезисы докл. 5 съезда ВМО. Ереван.
- Пирс Э. 1962. Гистохимия [М., Изд. ИЛ.
- Bailey R. W., Cereenwood R. M., Craig A. 1971. J. Gen. Microbiol., 65, 3.
- Dudman W. F. 1964. J. Bacteriol., 88, 3.
- Francis A. J., Alexander M. 1974. Soil Sci., 118, 1.
- Graham P. H. 1965. J. Microbiol. and Serol., 31, 4.
- Humphrey B. A., Vincent J. M. 1959. J. Gen. Microbiol., 21, 3.
- Ljunggren H. 1961. Nature, 191, 4788.
- Ljunggren H., Fahraeus G. 1959. Nature, 184., 4698.
- Lorkiewicz Z., Russa R. 1971. Plant and soil, spec. vol.
- Macgregor A. N., Alexander M. 1972. Plant and soil, 36, 1.
- Zevenhuizen L. P. T. M. 1971. J. Gen. Microbiol., 68, 2.