

Ф. С. Матевосян, А. Д. Налбандян

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ДЕГИДРОГЕНАЗ *Rhizobium japonicum* В УСЛОВИЯХ СИМБИОЗА И В ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЕ

Дегидрогеназы клубеньковых бактерий изучались многими исследователями с целью разрешения ряда вопросов, касающихся биохимии фиксации молекулярного азота и дифференциации штаммов, отличающихся азотфиксирующей активностью (Доросинский и др., 1966, 1971; Кретович и др., 1969а, б; Ромейко, 1972; Новикова, 1973, и др.). Авторами установлена зависимость между азотфиксирующей активностью клубеньковых бактерий и их дегидрогеназной активностью.

Однако некоторым исследователям не удалось обнаружить корреляцию между дегидрогеназной активностью чистых культур клубеньковых бактерий и их эффективностью в симбиозе (Шильникова, Агаджанян, 1965а, б; Шемаханова, Олейников, 1971, и др.).

Многочисленные исследования по установлению характера взаимосвязи активности дегидрогеназ с интенсивностью симбиотической фиксации азота проводились на различных видах: *Rh. phaseoli*, *Rh. lupini*, *Rh. trifolii*, *Rh. leguminosarum* и т.д. (Федоров, Нице, 1961; Кретович и др., 1969; Доросинский и др., 1971; Ромейко и др., 1972, и др.). Однако работ по дегидрогеназной активности *Rh. japonicum* встречается мало.

В связи с расширением посевных площадей под сою и увеличением потребности в нитрагине появилась необходимость разработки микробиологических и биохимических методов для определения активности штаммов в лабораторных условиях.

Целью настоящей работы было изучение ряда специфических дегидрогеназ штаммов клубеньковых бактерий сои, отличающихся азотфиксирующей активностью, для выявления коррелятивной связи между азотфиксирующей и дегидрогеназной активностью.

Исследования велись со штаммами клубеньковых бактерий сои, полученными из ВНИИ с/х микробиологии: №№ 648, 648, 649 — эффективные и №№ 640, 642 — неэффективные. Эффективность и азотфиксирующая активность указанных штаммов изучались нами в условиях вегетационного опыта на речном песке, обогащенном питательной смесью Прянишникова (минеральный азот 0,25% от нормы).

Эффективность, азотфиксирующая и дегидрогеназная активность штаммов изучались в стадии бутонизации растений. Урожай зеленой массы и вес клубеньков учитывались у 10 растений. Общий азот в растениях и клубеньках определялся по Кьельдалю.

Дегидрогеназная активность определялась по концентрации трифенилформазана (ТФФ, в мг на 100 мг биомассы), образующегося при восстановлении трифенилтетразолий хлорида (ТТХ). Оптическая плотность определялась на фотоэлектроколориметре (ФЭК — 56), с зеленым светофильтром.

Нами изучались как специфические: α — кетоглутарат (ГДГ), сукцинат (СДГ), малатдегидрогеназы (МДГ), так и "бессубстратные" дегидрогеназы (Шмидт, 1964).

Для определения дегидрогеназной активности клубеньковых бактерий в симбиозе, гомогенат свежевыделенных клубеньков, растертый с фосфатным буфером pH — 7,4 в ступке, процеживался через три слоя полотна и центрифугировался при 300 g с целью осаждения растительных клеток клубеньковой ткани. Надосадочная жидкость центрифугировалась при 5000 g для осаждения клеток клубеньковых бактерий.

В чистых культурах клубеньковых бактерий сои дегидрогеназная активность определялась через 48 часов культивирования в условиях аэрации на среде следующего состава (в %): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,05; K_2HPO_4 — 0,05; MgSO_4 — 0,02; NaCl — 0,02; кукурузный экстракт — 0,3; маннит — 2; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — следы. Клетки бактерий отделялись центрифугированием при 5000 g.

Результаты исследований

Инокулированные эффективными штаммами клубеньковых бак-

Таблица 1

Эффективность и азотфиксирующая активность
Rh. japonicum в условиях вегетационного опыта

№№ штаммов	Вес над-Вес клу- земной беньков, г, части, г		Общий азот, % надземная клубеньки часть	
646	50,4	4,62	2,7	10,9
648	40,0	2,32	3,2	6,94
649	70,1	2,20	3,3	7,0
640	30,1	1,36	1,9	4,42
642	31,2	1,60	2,1	5,72
Контроль	31,6	0	2,0	0

Таблица 2

Активность специфических и "бессубстратных" дегидрогеназ Rh. japonicum в условиях симбиоза (ТФФ, мг)

№№ штаммов	α -кетоглутарат дегидрогеназа	Сукцинатде- гидрогеназа	Малатде- гидрогеназа	"Бессубст- ратная" де- гидрогеназа
646	0,68	0,49	1,31	0,40
648	1,29	1,32	-	0,31
649	0,69	0,71	1,32	0,35
640	0,58	0,41	-	0,36
642	0,51	0,30	1,25	0,26

Таблица 3

Активность специфических и "бессубстратных" дегидрогеназ Rh. japonicum в чистой культуре (ТФФ, мг):

№№ штаммов	α -кетоглутарат- дегидрогеназа	Сукцинатде- гидрогеназа	Малатдегид- рогеназа	"Бессубстрат- ная" дегидро- геназа
646	1,20	0,90	1,83	0,63
648	1,41	1,51	-	0,40
649	0,80	0,86	1,52	0,39
640	0,60	0,44	-	0,40
642	0,62	0,66	1,36	0,45

Примечание: (-) - не исследовано.

терий сои (№№ 646, 648, 649) растения имели крупные клубеньки и интенсивную зеленую окраску. Вес клубеньков и надземных частей у них был соответственно в 1,4-3 и 1,3-2,3 раза больше, чем у желтовато-зеленых растений, инокулированных неэффективными штаммами (№№ 640, 642). Клубеньки у последних мелкие, разбросанные по всей корневой системе. Растения, инокулированные неэффективными штаммами, по сравнению с контролем, прибавку урожая не дали. Полученные данные по эффективности штаммов соответствуют данным ВНИИ с/х микробиологии (Доросинский, 1975).

У эффективных штаммов содержание общего азота в надземных частях составляло 2,7-3,3%, а в клубеньках - 7,0-10,9%, тогда как содержание общего азота в растениях, инокулированных неэффективными штаммами составляло соответственно 1,9-2,1 и 4,42-5,72% (табл. 1).

Изучение дегидрогеназной активности штаммов *Rh. japonicum* показало, что при эффективном симбиозе субстратспецифическая дегидрогеназная активность выше, чем при неэффективном. Как видно из данных табл. 2, у эффективных штаммов активность ГДГ в 1,2-2,5, а активность СДГ - в 1,2-4,4 раза выше, чем у неэффективных штаммов.

При определении "бессубстратных" дегидрогеназ клубеньковых бактерий сои коррелятивная связь между ферментативной активностью и эффективностью штамма не выявлена. Активность "бессубстратных" дегидрогеназ во всех изученных штаммах значительно ниже, чем субстратных.

Дегидрогеназы клубеньковых бактерий *Rh. japonicum* изучались и в чистой культуре. Данные, представленные в табл. 3, показывают, что активность ГДГ у эффективных штаммов в 1,3-2,3, СДГ - в 2-3,4 и МДГ - в 1,3 раза выше, чем у неэффективных штаммов. "Бессубстратная" дегидрогеназная активность не зависит от эффективности штамма.

Выводы

1. Активность специфических дегидрогеназ клубеньковых бактерий сои коррелирует с эффективностью штамма.
2. Активность "бессубстратных" дегидрогеназ, изученных штаммов значительно ниже субстратных.

Ֆ. Ս. Մաթևոսյան, Ա. Զ. Նալբանդյան

ՄԱՔՈՒՐ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՑՈՒՄ ԵՎ ՍԻՄԲԻՈԶԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ
RHIZOBIUM JAPONICUM - Ի ՍՊԵՑԻՖԻԿ ԴԵԻԴՐՈԳԵՆԱԶԻ
ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Ուսումնասիրվել է սոյայի պալարաբակտերիաների էֆեկտիվ և ոչ էֆեկտիվ շտամների դեհիդրոգենազային ակտիվությունը:

Ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ թիթեռնածաղկավոր բույսերի հետ սիմբիոզի պայմաններում սոյայի պալարաբակտերիաների դեհիդրոգենազային ակտիվությունը (սպեցիֆիկ սուբստրատների առկայությամբ) կորելացվում է այդ բակտերիաների էֆեկտիվության հետ: Նույնպիսի օրինաչափություն նկատվում է նաև մաքուր կուլտուրայում:

Էկզոգեն սուբստրատի բացակայության պայմաններում ուսումնասիրված սոյայի պալարաբակտերիաների դեհիդրոգենազային ակտիվությունը նկատելիորեն ցածր է սուբստրատ դեհիդրոգենեզային ակտիվությունից:

ЛИТЕРАТУРА

- Доросинский Л. М. 1975. Успехи микробиологии, 10.
Доросинский Л. М., Загорье И. В., Бузиашвили Д. М. 1966. Микробиология, 35, 2.
Доросинский Л. М., Загорье И. В., Макарова В. И. 1971. Микробиология, 40, 6.
Кретович В. Л., Евстигнеева З. Г., Асеева К. Б., Заргарян О. Н., Мартынова Е. М. 1969а. Изв. АН СССР, сер. биол., №2.

Кретович В. Л., Евстигнеева З. Г., Романов В. И.,
Шорошева Т. Г., Бородин Ю. С., Самсонова С. П.
1969б. Микробиология, 38, 2.

Новикова А. Т. 1973. Микробиология, 42, 4.

Ромейко И. Н., Дубовенко Е. К., Малинская С. М.
1972. Микробиология, 41, 2.

Федоров М. В., Нице Л. 1961. Микробиология, 30, 3.

Шемаханова Н. М., Олейников Р. Р. 1971. Микробио-
логия, 40, 3.

Шильникова В. К., Агаджанян К. Г. 1965а. Изв. ТСХА, в. 3.

Шильникова В. К., Агаджанян К. Г. 1965б. Докл.
ТСХА, в. 103.

Шильникова В. К., Поглазова М. Н., Агаджанян
К. Г. 1967. Изв. ТСХА, в. 5.

Шмидт Э. Ф. 1964. Микробиология, 33, 2.