

УДК 575.2.23.576.2.344

ЦИТОХИМИЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТНОЙ И ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ У ПОЛИПЛОИДНЫХ ФОРМ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

М. В. ОВСЕПЯН, С. А. АРУТЮНЯН

Изучена АТФазная и пероксидазная активность у полиплоидных форм клубеньковых бактерий гороха и люцерны в связи с пloidностью и специфичностью штаммов.

Выявлены различия по содержанию ферментов между полиплоидными и исходными штаммами.

Ключевые слова: пероксидаза, АТФаза, полиплоидные формы клубеньковых бактерий.

Известно, что источником энергии для азотфиксации служит АТФ, синтез которого связан с процессом окисления субстратов и дыхания. Одним из ферментов, участвующих в окислительных реакциях и дыхании, является пероксидаза. У бактерий, особенно клубеньковых, пероксидаза изучена довольно слабо. Имеется сообщение о пероксидазной и цитохромпероксидазной активности у бактериоидов люпина и арахиса [7, 9]. С другой стороны, освобождение энергии АТФ для азотфиксации катализируется ферментом АТФазой, активность которой коррелирует с активностью азотфиксаций [5, 6, 8]; поэтому изучение ферментов, участвующих в процессе азотфиксации, у полиплоидных форм клубеньковых бактерий с измененной специфичностью было бы полезным для выяснения вопросов специфичности штаммов. Как известно, полиплоидные формы микроорганизмов обладают повышенной активностью ряда ферментов (дегидрогеназы, каталаза) по сравнению с гаплоидными штаммами [2, 3, 10].

Целью настоящей работы являлось изучение пероксидазной и АТФазной активности у полиплоидных форм клубеньковых бактерий гороха и люцерны с измененной и неизмененной специфичностью.

Материал и методика. Объектами для исследований служили исходные и полиплоидные штаммы клубеньковых бактерий *Rh. leguminosarum*—5609 (исходный), 5616—5621 (полиплоидные), *Rh. meliloti*—5502 (исходный), 5520, 5521 (полиплоидные), выращенные на бобовом агаре в течение 1, 3, 6, и 24-х сут.

АТФазная и пероксидазная активность определялась цитохимическими методами. С этой целью готовились препараты—мазки, которые фиксировались соответствующим способом: для определения АТФазы—в формалине (30 мин) с последующей промывкой в проточной воде, для определения пероксидазы—в 10%-ном спирт—формалине (2 мин), также с промывкой в проточной воде. АТФазную активность определяли по свинцовому методу Бахштейна и Мейзеля [4]. В качестве субстрата использовалась двунариевая соль АТФ. Пероксидазная активность изучалась бензидиновым методом. Субстратом служила перекись водорода. Контрольные варианты на АТФазу и пероксидазу инкубировали в среде без субстратов [4]. Перед просмотром препараты докрашивались раствором лихтриона или метиленовым синим. Окрашенные препара-

ты просматривались под световым микроскопом NU-Zeiss при $\times 1000$. Активность фермента определяли путем подсчета клеток в популяции, обнаруживающих зоны ферментативной активности.

Подсчитывалось от 500 до 1000 клеток в 10—15-ти полях зрения. Для проверки пloidности изучаемых штаммов определялись размеры клеток и количество ДНК на клетку по методу Дише в модификации Де Ляматера [1]. Размеры клеток определяли путем измерения на фотографиях, сделанных в одном увеличении. Объем рассчитывался по формуле для эллипсоида вращения.

Результаты и обсуждение. В клетках клубеньковых бактерий гороха и люцерны были выявлены наличие и локализация зон ферментативной активности.

Зоны пероксидазной активности в клетках обнаруживались в цитоплазматической мембране и внутри клеток в виде мелких гранул, окрашенных от синего до бурого цвета. Пероксидаза найдена не во всех клетках популяции. Количество клеток с зонами пероксидазной активности колебалось от 1,5 до 79% в зависимости от возраста культуры и от штаммовых особенностей (табл. 1). У всех штаммов клубеньковых бактерий, как гороха, так и люцерны, пероксидазная активность в односуточных культурах выше, чем в трех- и шестисуточных. Таким образом, очевидно, что с увеличением возраста культуры активность пероксидазы снижается.

Таблица 1

Пероксидазная активность у полиплоидных форм клубеньковых бактерий

Штаммы	Показатели пloidности		Клетки в популяции с пероксидазной активностью, %		
	объем клетки, мкм ³	ДНК, мкг/млрд клеток	1 сут	3 сут	6 сут
Rhizobium leguminosarum					
5609 — исходный	0,23 — 0,68	3,6	46,0	31,5	1,5
5617 — полиплоидный	0,29 — 1,29	8,5	59,0	38,0	5,0
5619 — полиплоидный	0,47 — 1,71	15,9	76,3	60,0	8,0
5618 — полиплоидный	0,36 — 1,03	7,4	77,0	48,5	6,0
5620 — полиплоидный	0,39 — 2,18	9,2	73,2	40,0	4,5
5621 — полиплоидный	0,22 — 0,93	5,1	79,0	25,5	3,0
Rhizobium meliloti					
5502 — исходный	0,1 — 0,51	2,4	59,5	8,5	7,2
5520 — полиплоидный	0,29 — 0,84	3,5	66,0	20,1	7,2
5521 — полиплоидный	0,21 — 0,04	7,9	55,3	18,2	12,3

При сравнении штаммов в односуточном возрасте клеток с зонами пероксидазной активности у полиплоидных штаммов люцерны и гороха наблюдается больше, чем у исходных. Если у исходного штамма 5609 клеток с пероксидазной активностью—46%, то у полиплоидных—59—79%. У штаммов Rh. meliloti исключение составляет штамм 5521, по содержанию пероксидазы близкий к исходному штамму 5502, что можно объяснить замедленным ростом этого штамма. В трех- и шестисуточных культурах активность фермента ниже, но наблюдаемая закономерность сохраняется, т. е. все полиплоидные штаммы Rh. leguminosarum по сравнению с исходным обладают более высокой пероксидаз-

ной активностью. На 6-е сутки пероксидазная активность у полиплоидных штаммов в 2—4 раза выше, чем у исходного. Исключение в этом случае составляет гороховый штамм 5621, который в 3-суточной культуре имеет меньшую пероксидазную активность по сравнению с исходным. Подобная же закономерность наблюдается у штаммов *Rh. meliloti*.

У клубеньковых бактерий в чистой культуре отмечается некоторая зависимость между пероксидазной активностью и пloidностью штаммов; чем больше ДНК на клетку, чем крупнее клетки, тем выше пероксидазная активность. Особенно четко заметна эта корреляция на 6-е сутки роста, когда у полиплоидных штаммов пероксидазная активность сохраняется в большей степени, чем у исходных. Как видно из данных табл. 1, штаммы клубеньковых бактерий гороха содержат больше клеток, обладающих пероксидазной активностью, чем люцерновые штаммы в трехсуточном возрасте. Это, возможно, связано с размерами клеток, которые у *Rh. leguminosarum* больше, чем у *Rh. meliloti*. При сравнении специфичности штаммов к растению-хозяину (табл. 2) и содержания клеток с пероксидазной активностью (табл. 1) не найдено зависимости между этими признаками.

Цитохимические исследования АТФазы показали, что зоны активности этого фермента в клетках бактерий проявляются по полюсам клеток или вдоль клеточной оболочки.

Аденозинтрифосфатазная активность так же, как и пероксидазная, обнаруживалась не во всех клетках популяции. Результаты определения количества зон АТФазной активности представлены в табл. 2. Ко-

Таблица 2
Аденозинтрифосфатазная активность у полиплоидных форм клубеньковых бактерий

Штаммы	Показатели пloidности		Специфичность к растению-хозяину	Клетки в популяции с АТФазной активностью, %		
	объем клеток, мкм ³	ДНК мкг/млрд клеток		1 сут	4 сут	24 сут
<i>Rhizobium leguminosarum</i>						
5609 — исходный	0,23—0,68	3,6	горох	89,3	27,0	20,3
5616 — полиплоидный	0,61—1,79	6,5	горох	94,0	45,0	25,3
5617 — полиплоидный	0,29—1,29	8,5	горох, люцерна	93,4	43,0	25,4
5619 — полиплоидный	0,47—1,71	15,9	горох, люцерна	92,1	61,6	29,0
5618 — полиплоидный	0,36—1,03	7,4	горох, люцерна	96,8	71,4	25,4
5620 — полиплоидный	0,39—2,18	9,2	горох, люцерна	96,0	50,0	33,3
5621 — полиплоидный	0,22—0,93	5,1	горох	96,4	60,5	27,1
<i>Rhizobium meliloti</i>						
5502 — исходный	0,1 — 0,51	2,4	люцерна	72,0	36,3	18,2
5520 — полиплоидный	0,29—0,84	3,5	люцерна	94,3	59,0	15,0
5521 — полиплоидный	0,21—1,04	7,9	люцерна, горох	83,1	39,0	32,5

личество клеток с АТФазной активностью находится в зависимости от возраста культур: чем моложе культура, тем выше АТФазная активность. Почти у всех полиплоидных штаммов она несколько выше, чем у

исходных, и эта разница увеличивается по мере старения культур. Наиболее четки различия между полиплоидными и исходными штаммами в 4-суточной культуре, где АТФазная активность исходного штамма 5609 составляет 27%, а у полиплоидных культур—43—71,4%. У *Rh. meliloti* АТФазная активность исходного штамма 5502 равна 38,3%, а полиплоидов этого штамма—39—59%. При определении АТФазы было замечено, что количество ферментсодержащих клеток не связано со специфичностью штаммов; у полиплоидных штаммов с измененной специфичностью активность АТФазы почти такая же, как у штаммов с неизменной специфичностью.

Замечена связь между АТФазной активностью и плоидностью штаммов, которая характеризуется количеством ДНК на клетку. Штаммы, содержащие большее количество ДНК, т. е. большей плоидности, имели и большее количество клеток с АТФазой 5619. Очевидно, увеличение размера клеток у полиплоидных штаммов ведет к увеличению зон ферментативной активности.

Исследования выявили общие закономерности по наличию пероксидазы и АТФазы у культур *Rh. leguminosarum* и *Rh. meliloti*.

Наибольшее количество клеток с зонами ферментативной активности выявлено в молодых культурах; по мере их старения активность эта снижается.

Пероксидаза и АТФаза у полиплоидных форм клубеньковых бактерий по сравнению с исходными во все сроки культивирования отличаются большей активностью.

Не найдена корреляция между активностью пероксидазы и АТФазы у клубеньковых бактерий гороха и люцерны в чистой культуре и специфичностью штаммов к растению-хозяину. Различия, очевидно, можно наблюдать только в симбиотических условиях.

Институт микробиологии АН Армянской ССР

Поступило 16.IV 1982 г.

ԱՐԵՆՈՉԻՆԵՌՅՈՍՅԱՏԱԶԱՅԻՆ ԵՎ ԳԵՐՕՔՍԻԴԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ
ՅԻՏՈՔԻՄԻԱՆ ՊԱԼԱՐԱԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՊՈԼԻՊԼՈԻԴ ՁԵՎԵՐԻ ՄՈՏ
Մ. Վ. ՀՈՎՍԵՓՅԱՆ, Ս. Հ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

Ուսումնասիրված է առվույտի և ոլոռի պալարաբակտերիաների պոլիպլոիդ ձևերի ԱԵՖ-ազային և գերօքսիդազային ակտիվությունը՝ կապված պոլիպլոիդ հատկության և սպեցիֆիկության հետ:

Ելային և պոլիպլոիդ ձևերի միջև բացահայտված են որոշակի տարբերություններ:

THE CYTOCHEMISTRY OF ATP-ase AND PEROXIDASE ACTIVITY OF POLYPLOID FORMS OF NODULE BACTERIA

M. V. OVSEPIAN, S. H. HARUTIUNIAN

The ATP-ase and peroxidase activity of polyploid forms of nodule bacteria of peas and alfalfa has been studied in connection with specificity of strains.

The presence of enzymes correlates with polyploid strains.