

УДК 579.841.31.013

© 1989

ЗАВИСИМОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ ПОЛИ-β-ОКСИБУТИРАТА ОТ АКТИВНОСТИ НИТРОГЕНАЗЫ И ГИДРОГЕНАЗЫ У НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ *RHIZOBIUM*

Бонарцева Г. А., Мышкина В. Л., Загреба Е. Д.

Определено содержание поли-β-оксибутирата в клетках клубеньковых бактерий при выращивании их в условиях, индуцирующих активность нитрогеназы и способствующих рециклизации водорода. Показана обратная зависимость содержания поли-β-оксибутирата от активности нитрогеназы и прямая — от активности гидрогеназы.

Многие азотфиксирующие микроорганизмы синтезируют поли-β-оксибутират. Синтез и расход его тесно связан с энергетическими потребностями клетки.

Известно, что процесс фиксации молекулярного азота требует затраты большого количества энергии. У некоторых свободноживущих азотфиксирующих микроорганизмов установлена строгая обратная корреляция между интенсивностью азотфиксации и содержанием поли-β-оксибутирата [9]. В ряде публикаций Романова с соавт. [4, 5] приводятся данные для бактериоидов клубеньковых бактерий люпина и гороха о взаимосвязи обмена поли-β-оксибутирата с процессами азотфиксации и фотосинтеза. Ими показано, что сначала часть фотоассимилятов включается в поли-β-оксибутират, а затем используется на нужды азотфиксации.

Выделяющийся в процессе азотфиксации молекулярный водород в присутствии водородпоглощающей гидрогеназы может быть вторично вовлечен в энергетический обмен ризобий [6], что на $\frac{1}{3}$ снижает расход энергетического материала на процесс азотфиксации [7]. Кроме того, рециклируемый водород может быть использован микроорганизмами не только как донор электронов для нитрогеназы, но и для обеспечения ассимиляции CO_2 и других реакций восстановительного характера, в том числе связанных с синтезом запасных веществ [8, 9].

Целью работы было определение содержания поли-β-оксибутирата в некоторых штаммах *Rhizobium*, различающихся по способности рециклировать водород и восстанавливать ацетилен в оптимальных для данных процессов условиях.

Объекты и методы исследования

В работе использовали активные штаммы *Rhizobium japonicum* 646, *R. vigna* 164, *R. phaseoli* 673, *R. meliloti* 35 и малоактивные штаммы *R. phaseoli* 680, *R. meliloti* А₃. Штаммы 35, А₃ получены из Латвийской сельскохозяйственной академии (г. Елгава); все остальные исследованные штаммы получены из коллекции ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии ВАСХНИЛ. Коллекционные штаммы клубеньковых бактерий сои и вигны поддерживали на глюкозопептонной агаризованной среде (в г/л): пептон — 2, агар — 15, глюкоза — 20, дрожжевой экстракт — 2, рН 6,8—7,0; коллекционные штаммы клубеньковых бактерий фасоли, люцерны — на агаризованной гороховой среде (в г/л): горох — 50, K_2HPO_4 — 0,5, сахара — 5, рН 7.

Опыты по определению азотфиксации в чистой культуре клубеньковых бактерий проводили в анаэробных условиях в 50-мл флаконах на среде СS-7, способствующей индукции нитрогеназы в чистой культуре *Rhizobium* (в мМ): KH_2PO_4 — 2,2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,7; KCl — 0,9; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,14; глутамин — 2; инозит — 5,6; Na -сукцинат — 25; L -арабиноза или глюкоза — 25; (в мкМ): $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 58; H_3BO_3 — 82; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 3,5; KI — 6; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,8; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,4; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,4; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 54; Na_2 -ЭДТА — 54; никотиновая кислота — 41; V_5 — 2,4; V_1 — 15; рН 6,8. В каждый флакон помещали 25 мл среды. KNO_3 вносили из расчета 5 г/л (50 мМ). Посевным материалом для опытов служила 5-суточная культура, выращенная на агаризованной глюкозопептонной среде. В каждый флакон вносили 1 мл бактериальной суспензии плотностью по ФЭК 0,5 (кювета с длиной оптического пути 1 мм). После посева ватные пробки меняли на резиновые, эвакуировали воздух из флаконов, дважды промывали их Ag , затем заполняли газовой смесью состава: CO_2 — 0,03; C_2H_2 — 5%; остальное — Ag . Для равномерного перемешивания флаконы помещали на ротаторную качалку. Температура инкубации 30°. Образование этилена регистрировали на газовом хроматографе «Chrom-3» с пламенно-ионизационным детекто-

ром; колонка — силикагель АСК (длина 120 см, внутренний диаметр 5 мм); температура испарителя 80°, термостата — 50°. Расход газа-носителя (азота) — 40 мл/мин.

Определение активности гидрогеназы проводили методом восстановления 2,3,5-трифенилтетразолийсульфата [1]. Для этого культуры выращивали в 50-мл колбах на жидкой синтетической среде, способствующей индукции активности гидрогеназы в чистой культуре ризобий (в мг/л): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - 150$; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 150$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 250$; $\text{Fe-ЭДТА} - 28$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - 10$; $\text{H}_3\text{BO}_3 - 3$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 2$; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0,25$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,04$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,025$; $\text{KI} - 0,78$; инозит — 100; $\text{V}_1 - 10$; $\text{V}_6 - 1$; никотиновая кислота — 1; (г/л): сахароза — 0,5; L-арабиноза — 1; глюконат Na — 0,5; глутамат Na — 0,5; дрожжевой экстракт — 0,1; вода дистиллированная; pH 6,8; колбы помещали в эксикатор в атмосферу воздуха с водородом — 3%; температура инкубации 30°; время инкубации 5 сут. По окончании инкубирования часть биомассы использовали для определения в ней поли- β -оксибутирата; в другой ее части определяли активность гидрогеназы: для этого суспензию клеток концентрировали путем стерильного центрифугирования при 18 тыс. об/мин в течение 20 мин. Промывали и суспендировали клетки в небольшом количестве 0,1 М фосфатного буфера, pH 7. Получали густые суспензии плотностью по ФЭК $\sim 1,0$ (в кювете с длиной оптического пути 1 мм). Затем в химически чистые, стерильные пробирки помещали 1 мл суспензии отмытых бактериальных клеток и 1 мл 0,25%-ного водного раствора тетразолия; герметично закрывали резиновыми пробками с фольгой, взбалтывали и инкубировали в течение 24 ч в атмосфере водорода при 30°. После этого образовавшийся трифенилформазан из бактериальных клеток извлекали ледяной уксусной кислотой (1 мл, 1 ч), и затем формазан из уксуснокислого раствора переводили в 3 мл хлороформа при встряхивании (24 ч). Далее измеряли оптическую плотность окрашенного слоя на спектрофотометре СФ-16 при длине волны 250 нм. Одновременно были поставлены контроли для определения уровня восстановления 2,3,5-трифенилтетразолийсульфата за счет эндогенных запасов в отсутствие H_2 и на возможность восстановления 2,3,5-трифенилтетразолийсульфата молекулярным водородом в отсутствие клеток [1].

Содержание в клетках поли- β -оксибутирата (ПОМ) определяли методом инфракрасной спектроскопии [3]. Для этого биомассу бактерий отделяли центрифугированием от культуральной жидкости, дважды промывали стерильной водопроводной водой. Отмытую биомассу лиофилизировали, тщательно перемешивали и перемалывали с КВг, затем прессовали таблетки для снятия ИК-спектров. Спектры снимали на инфракрасном спектрофотометре ИК-20 (щелевая программа — 4; скорость регистрации 160 см/мин). Количество повторностей в каждом из вариантов опыта — 5. В таблицах приведены средние данные.

Размах варьирования не превышал при определении активности гидрогеназы $\pm 5\%$, при определении содержания ПОМ $\pm 10\%$, при определении активности нитрогеназы $\pm 3\%$.

Результаты и обсуждение

Содержание поли- β -оксибутирата в клетках медленно растущих штаммов клубеньковых бактерий в зависимости от активности нитрогеназы. Из табл. 1 видно, что исследованные штаммы *R. japonicum* 646 и *R. vigna* 164 при росте в анаэробных условиях на среде CS-7 синтезируют большие количества поли- β -оксибутирата — соответственно 21 и 18% к весу сухих клеток; активность нитрогеназы в этих условиях низка. При добавлении в среду нитратов в анаэробных условиях роста для медленно растущих культур наблюдалась ацетиленредукция [2]. Из данных, представленных в табл. 1, следует, что активность нитрогеназы у исследованных штаммов *R. japonicum* 646 и *R. vigna* 164 в присутствии NO_3^- в 10 раз выше, чем при выращивании их в тех же условиях без нитратов. Содержание поли- β -оксибутирата, напротив, в присутствии NO_3^- минимально. Приведенные данные показывают строгую обратную корреляцию между активностью нитрогеназы и содержанием поли- β -оксибутирата у исследованных штаммов. Вероятно, эта зависимость обусловлена расходом поли- β -оксибутирата на процесс азотфиксации в анаэробных условиях в присутствии нитратов.

Содержание поли- β -оксибутирата у разных по активности гидрогеназы штаммов клубеньковых бактерий. Из данных, представленных в табл. 2, видно, что штаммы *R. meliloti* 35 и *R. phaseoli* 673, обладающие высокой активностью гидрогеназы, содержат значительные количества поли- β -оксибутирата. Максимальному уровню активности гидрогеназы (92,3 мкг формазана/ч на 1 мг белка) у штамма *R. meliloti* 35 соответствует и максимально высокий уровень содержания поли- β -оксибутирата в клетке (21% к весу сухих клеток).

Штамм *R. phaseoli* 680, не имеющий H_2 -поглощающей гидрогеназы практически не содержит и поли- β -оксибутирата.

Таблица 1

Содержание поли-β-оксибутирата (ПОМ) и активность нитрогеназы *R. vigna* 164 и *R. japonicum* 646 в анаэробных условиях на среде CS-7 с NO₃⁻ и без NO₃⁻ (возраст культуры 8 сут)

Штамм	Среда CS-7 без NO ₃ ⁻		Среда CS-7 с NO ₃ ⁻	
	активность нитрогеназы, нмоль C ₂ H ₄ / мг сух. биом.	ПОМ, % к весу сухих клеток	активность нитрогеназы, нмоль C ₂ H ₄ / мг сух. биом.	ПОМ, % к весу сухих клеток
<i>R. vigna</i>	0,52	18	5,55	0,5
<i>R. japonicum</i> 646	0,15	21	2,00	0,9

Таблица 2

Содержание поли-β-оксибутирата в клетках *R. phaseoli* и *R. meliloti*, различающихся по активности гидрогеназы

Показатели	<i>R. phaseoli</i>		<i>R. meliloti</i>	
	673	680	35	A ₂
Активность гидрогеназы, мкг формазана/ч на 1 мг белка	27,6	0,0	92,3	7,8
ПОМ, % к весу сухих клеток	4,0	0,5	21,0	11,0

Приведенные данные показывают прямую корреляцию между активностью гидрогеназы и содержанием поли-β-оксибутирата у изученных штаммов *R. meliloti* и *R. phaseoli*.

Можно предположить, что наличие водородпоглощающей гидрогеназы дает изученным штаммам энергетический выигрыш за счет вторичного вовлечения молекулярного водорода в метаболизм и тем самым позволяет более эффективно использовать энергию, избыток которой накапливается в виде поли-β-оксибутирата.

Приведенные исследования по определению содержания поли-β-оксибутирата в клетках клубеньковых бактерий в связи с процессами азотфиксации и рециклизации водорода могут послужить основой для дальнейшего детального изучения синтеза и расхода поли-β-оксибутирата в зависимости от энергетических потребностей ризобий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бонарцева Г. А., Мышкина В. Л., Мишустин Е. Н. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1983. № 4. С. 553.
2. Бонарцева Г. А., Мышкина В. Л. // Микробиология. 1989. Т. 58. Вып. 2. С. 181.
3. Загреба Е. Д., Селиверстова Т. И., Гиновска М. К. и др. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1982. № 6. С. 906.
4. Романов В. И. // Успехи биол. химии. 1977. Т. 18. С. 211.
5. Романов В. И. Азотфиксация и метаболизм фотоассимилятов в клубеньках бобовых растений: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, 1987.
6. Dixon R. O. D. // Arch. Microbiol. 1972. V. 85. P. 193.
7. Evans H. J., Emerich D. U., Ruiz-Argueso T. et al. // Hydrogenases/Eds by Schlegel H., Schneider K. Gottingen. Golze E. 1978. P. 287.
8. Simpson F. B., Maier K. J., Evans H. J. // Arch. Microbiol. 1979. V. 123. P. 1.
9. Tal S., Oron Y. // Canad. J. Microbiol. 1985. V. 31. № 7. P. 608.

Институт микробиологии
АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
4.XI.1988

POLY β-HYDROXYBUTYRATE CONTENT AS A FUNCTION OF NITROGENASE AND HYDROGENASE ACTIVITIES IN SOME RHIZOBIUM STRAINS

Bonartseva G. A., Myshkina V. L., Zagreba E. D.

The content of poly-β-hydroxybutyrate was assayed in nodule bacterial cells grown under conditions which induced the activity of nitrogenase and favoured hydrogen recycling. This content directly depended on the activity of hydrogenase and was inversely proportional to the activity of nitrogenase.