

## **ГИДРОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ**

**В. Е. КОРЕЛОВ**

(Кафедра микробиологии)

**В статье содержатся новые сведения о гидролитической активности клубеньковых бактерий в процессе внедрения их в ткань растения-хозяина.**

Ферментативная полигалактуроназная гипотеза внедрения клубеньковых бактерий в ткань корня бобового растения [9] появилась на базе предположения Гильтнера [14] о возможности размягчения стенок корневых волосков в присутствии ризобий. Гипотеза исходит из того, что в месте инфекции локально возрастает активность полигалактуроназы, синтезируемой растением при воздействии гомологичного штамма бактерий. По мнению Каллахама [11], гидролитические ферменты образуются скорее клубеньковыми бактериями, чем растением. Рассматривая процесс инфицирования в динами-

ке, он пришел к заключению, что клубеньковые бактерии, выделяя гидролазы, вызывают местную деградацию клеточной стенки растения. Вместе с тем продолжающийся непрерывный рост клеточной стенки в виде купола над возникающими при перемещении ризобий зонами гидролиза создает впечатление инвагинации клеточной стенки [12].

Наличие гидролаз обнаружено у многих фитопатогенных микроорганизмов [5]. Эти ферменты часто индуцибельны и действуют в последовательности пектиназа → гемицеллюлаза → целлюлаза. Можно считать дока-

занным, что фитопатогены проникают в ткань растения с помощью гидролаз. Что касается клубеньковых бактерий, то в отношении их длительное время существовало мнение [10] об отсутствии гидролаз у ризобий. Однако методами, которыми пользовалась Мак Кой, можно было выявить лишь высокий уровень активности ферментов. Инфекция же бобового растения клубеньковыми бактериями — исключительно тонкий сбалансированный процесс. Если бы клубеньковые бактерии обладали чрезвычайно высокой гидролитической активностью, это вызвало бы плазмолиз чувствительных корневых волосков и, возможно, процесс инфицирования прекратился бы раньше, чем происходило внедрение ризобий.

Появление новых чувствительных методов определения ничтожных количеств гидролитических ферментов [8] послужило основанием для исследования целлюлолитической и пектинолитической активности клубеньковых бактерий.

### Методика

Использовали клубеньковые бактерии люцерны *Rhizobium meliloti* штаммы 87, 132, 422, 26, 34, 1723, 425а, СХМ-1; люпина — *B. lupini* штаммы 359а, 368, 610; сои — *B. japonicum* штаммы 2491, 6346, 2490 и *R. leguminosarum* штаммы 245, 250. Контрольными культурами были *Agrobacterium radiobacter* В-152, *Erwinia herbicola* В-73, *Pseudomonas putida* В-34 (ИБФМ РАН).

Клубеньковые бактерии выращивали на бобовом отваре и минерально-дрожжевой среде с пектином (0,5 и 1,0%) свекловичным и яблочным (Нальчикская кондитерская фабрика).

Вкус пектина слабокислый, цвет сероватый, влажность 14%, рН 1% водного раствора 3,9, время осаждения 5 мин, посторонних примесей и запаха нет.

Суммарную пектинолитическую активность определяли интерферометрически [2], полигалактуроназную — по увеличению количества восстанавливающих альдегидных групп методом Лифшица [1] и вискозиметрически на вискозиметре Освальда методом Фэруса [9], пектинметилэстеразную активность — методом Смита [13]. Присутствие пектолитических ферментов в культурах обнаруживали также, используя метод Хенкина с соавторами [7].

Среда для ризобий содержала: маннит — 1 г/л, дрожжевой экстракт — 0,1, пектин — 2,5 г/л. Стерильные диски фильтровальной бумаги насыщали клеточной суспензией и помещали на чашки с этой средой. Через 2—3 нед при комнатной температуре негидролизованый пектин осаждали 2% раствором гексадецилтриметиламмонийбромидом. Фильтрат подвергали осаждению сульфатом аммония, используя концентрации с интервалом 20%. Затем наличие пектинолитических ферментов определяли чашечным методом по Динглу с соавторами [6]. Пектин (0,5%) растворяли в фосфатно-лимонном буфере (0,1 М, рН 5,2), содержащем 2% агара. Агар растворяли отдельно в буфере, а затем смешивали с раствором пектина. В смесь добавляли 625 мг азида натрия на 1 л для предотвращения развития микроорганизмов. Осадок (после обработки фильтрата сульфатом аммония) растворяли в 2 мл дистиллированной воды, наносили капли (0,05 мл) на пектиновый агар в чашках и инкубировали в течение 2 сут при температуре 37°C, наблюдая за образованием зон гидро-

лиза визуально и после обработки 2% гексадецилтриметиламмонийбромидом или раствором Люголя.

При использовании модифицированного метода Хьюббела с соавторами [8] клетки клубеньковых бактерий перед исследованием выращивали на среде, содержащей  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и  $\text{MgSO}_4$  по 0,2 г/л, маннит — 1,0 г/л, микроэлементы — по Федорову [3]. Источник азота —  $\text{NaNO}_3$  из расчета 5 г/л; pH поддерживали с помощью 10% раствора  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  на уровне 6,0. Для индукции фермента применяли полисахариды: карбоксиметилцеллюлозу — 1 г/л, целлюлозу — 5 г/л Walsetn(14), целлобиозу — 5 г/л. С бобового агара клетки вносили в сосуды с указанной выше средой и инкубировали на качалке при 28°C в течение 5 дней (быстрорастущие) и 8 дней (медленнорастущие). Затем культуры центрифугировали при 4°C, суспендировали в 0,1 М фосфатно-лимонном буфере (pH 5,0), обрабатывали УЗ в течение 2 мин и снова центрифугировали. Супернатанты использовали для определения ферментативной активности.

Кроме того, штаммы на ферментативную активность проверяли чашечным методом [6], используя клетки, выращенные на целлобиозе или целлюлозе.

В чашки разливали агаризованную (1,5%) среду с целлобиозой или целлюлозой (1,0 г/л) в фосфатно-лимонном буфере. Зоны гидролиза выявляли 0,1 н. йодом в 95% этаноле. В случае отсутствия фермента супернатанты 10-кратно концентрировали диализом против поливинилпирролидона.

### Результаты и их обсуждение

Пектинолитическая активность, определяемая методом Рухлядьевой и Кретиной, была обнаружена только у контрольных музейных культур: у

*R. putida* она варьировала в пределах 40, *E. herbicola* — 20, *A. radiobacter* — 10 условных единиц на 1 г (у. е/г). Ни у одного штамма клубеньковых бактерий в возрасте 2 сут (для быстрорастущих) и 5 сут (для медленнорастущих) пектинолитическая активность не была установлена. Вместе с тем у 2-недельных культур *R. meliloti* (шт. 87, 123) пектинолитическая активность оказалась равной 15. Методы Лившица и вискозиметрический по Фэреусу для определения полигалактуроназной активности и метод Смита для определения пектинметилэстеразной активности также не дали положительных результатов у всех 17 культур. Подобные данные получены А. Шатта [4].

Более чувствительный метод Хенкина позволил с достаточной четкостью выявить пектинолитическую активность, хотя была она весьма слабой. Так, зоны гидролиза у *R. meliloti* (шт. 26, 87, 422,34), *B. lupini* (шт. 610), *R. leguminosarum* (шт. 245, 250) и *B. japonicum* (шт. 6346) в 2- и 5-суточном возрасте (для быстро- и медленнорастущих культур) варьировали в диапазоне 4—7 мм; у *R. meliloti* (шт. 26, 1723, 425а, СХМ-1), *B. lupini* (395, 368), *R. leguminosarum* (шт. 0610), *B. japonicum* (шт. 2490, 2496) — 8—12 мм. Для примера: у *R. putida* зоны гидролиза составляли 18—25 мм, у *R. meliloti* (шт. 132) пектинолитическая активность отсутствовала.

При использовании метода Дингла [6] наивысшая активность была обнаружена во фракции, полученной с использованием 60% концентрации сульфата аммония, в 1-й фракции (концентрация 0—20%) она выявлялась лишь в виде следов. Пектинолитическая активность не коррелировала со степенью эффективности штаммов. Малоэффективные штаммы *R. meliloti* 26

и 34 характеризовались практически такой же ферментативной активностью, как и эффективные.

Проверка пектинолитической активности в динамике развития культур показала, что она увеличивается с возрастом не у всех штаммов. Более того, у некоторых она даже снижается, например, у *R. meliloti* (шт. СХМ-1), *B. lupini* (шт. 368) она снизилась почти в 2 раза соответственно на 10-е и 15-е сутки.

При определении целлюлолитической активности методом Дингла у одного из исследованных 17 штаммов не выявлено сколь-либо видимых зон гидролиза на чашках с агаризованной средой, содержащей целлюлозу или целлобиозу. Аналогичные результаты для *R. trifolii* получены в опытах Молина с соавторами [11].

Однако, применив методику диализа супернатантов, полученных из центрифугированных культур, обработанных затем УЗ [12], у ряда супернатантов гидролитическую активность удалось обнаружить. Наиболее высокой она была у *B. lupini* (шт. 610,359а, 368) и *B. japonicum* (шт. 6346) — 12—15 мм, меньше у *R. meliloti* (у всех 6 штаммов, кроме штамма 132, у которого она отсутствовала) — 7—8 мм, у остальных культур зоны гидролиза целлюлозы и целлобиозы — 4—6 мм. Зависимости от возраста культур не установлено.

Итак, можно полагать, что гидролитическая активность клубеньковых бактерий, очевидно, может быть достаточно результативной в процессе внедрения клеток ризобий в ткань растения-хозяина. Хотя она очень невысока у чистых культур на питательных средах, но в момент локального контакта ризобий с клеточной стенкой корнево-

го волоска, компоненты которой могут служить субстратами для ризобий, гидролитическая активность, по-видимому, достигает уровня, вполне достаточного, чтобы клетки смогли проникнуть в ткань растения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Лифшиц Д. Б.* Унифицирование метода определения активности ферментных препаратов. Киев: Укр. НИИ НТИ, 1967. — 2. *Рухлядьева А. П., Кретинина Г. Г.* Интерферометрический метод определения пектинолитической активности. — Ферментная и спиртовая пром-сть, 1968, № 2, с. 16—18. — 3. *Федоров М. В.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: Гос. изд. с.-х. лит., 1957. — 4. *Шамма А. М.* Процесс инфицирования клевера и люцерны клубеньковыми бактериями разной степени конкурентоспособности. — Автореф. канд. дис. М.: ТСХА, 1975. — 5. *Cooper R. J.* Cell wall biochemistry related to specificity in host-plant pathogen interactions / Ed. B. Solheim, J. Raa, Univ. Oslo, 1977, p. 163—212. — 6. *Dingle J., Reid W., Solomons L.* — J. Sci. Food Agric., 1953, vol. 3, 4, p. 149—155. — 7. *Hankin I., Lucker M., Sands D.* — Appl. Microbiol., 1971, vol. 22, p. 205—209. — 8. *Hubbel D., Morales V., Umali Jarcia M.* — Appl. En. Microbiology, 1978, vol. 35, № 1, p. 210—213. — 9. *Lijunggren H., Fähræns Y.* — J. Yen. Microbiol., 1961, vol. 26, p. 521—528. — 10. *McCoy E.* — Proc. Roy. Soc. Y., Ser. B., 1932, vol. 110, p. 514—533. — 11. *Molina E. M., Morales V., Hubbel D.* — Appl. En. Microbiol., 1979, vol. 38, № 6, p. 1186—1188. — 12. *Nutman P. S.* — Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc., 1956, vol. 31, p. 109—151. — 13. *Smith W. A.* — J. Yen. Microbiol., 1958, vol. 18, p. 33—41. — 14. *Yilther W.* Formation of nodules. Mich. Agron. Exptl. Stat., Ann. Rept, 1915, vol. 28, p. 206—207.

Статья поступила 3 августа 1993 г.

## SUMMARY

New information about hydrolytic activity of nodule bacteria in the process of introducing them into host-plant tissue is given in the paper.