

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ВОЛЮТИНА (МЕТАХРОМАТИНА) В КЛЕТКАХ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

В. К. ШИЛЬНИКОВА, В. А. СИГУТА
(Кафедра микробиологии)

В период наивысшей азотфиксации бобоворизобинальных культур в бактероидах клубеньковых бактерий отмечается высокое содержание волютина (или так называемых зерен Бабеша-Эрнста, метахроматинных частиц, полифосфатных гранул) [8]. Это дает основание предполагать о зависимости между содержанием волютина и степенью азотфиксирующей активности клеток. Вместе с тем имеются весьма разноречивые сведения о количественном содержании волютина в клетках клубеньковых бактерий разной степени эффективности [1, 15]. Вообще отсутствуют данные о его топографии в клетках в условиях чистых культур и симбиозе. По-разному трактуются его функции. Волютин считают запасным веществом подобно крахмалу, гликогену, жиру [16]; резервом неорганических фосфатов [21], донатором энергии и фосфатов [17], регулятором ферментативной активности роста и клеточного деления [15, 20], хранилищем пирофосфатов до использования его в процессе реактивации клеток [4]. Указанная разноречивость данных о волютине побудила нас к исследованию накопления его у различных по эффективности штаммов клубеньковых бактерий в условиях сапрофитного и симбиотрофного существования.

Объекты и методы исследований

Изучены эффективные (эф.) и неэффективные (неэф.) штаммы клубеньковых бактерий из коллекции ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (Ленинград, г. Пушкин): *Rhizobium lupini*, шт. 359а (эф.) и 400 (неэф.), *Rh. leguminosarum*, 245а (эф.), 224б (неэф.), 96 (эф. для кормовых бобов), *Rh. meliloti*, шт. 87 (эф. для люцерны, неэф. для кормовых бобов). Быстро- и медленно растущие штаммы выращивали на агаризованной среде [13] соответственно в течение 3 и 5 сут. Эффективность симбиотической азотфиксации штаммов изучали в вегетационных опытах в лаборатории искусственного климата и в теплице Опытной станции полеводства и льноводства Тимирязевской академии по схеме, описанной ранее [10]. Бактериоды из клубеньков люпина, гороха и кормовых бобов выделяли в период бутонизации — цветение по методу Бергерсена [11]. Эффективность штаммов клубеньковых бактерий, оцененная по урожаю и содержанию в зеленой массе общего азота, соответствовала их производственной характеристике.

Волютин в клетках, выросших *in vitro* и в бактероидах из клубеньков при бобоворизобинальном симбиозе, обнаруживали при

помощи метиленового синего по методу Мейера [9]. Морфологически конденсированные фосфаты выявляются не только метиленовым синим, но и некоторыми другими основными красителями (толуидиновым синим, нейтральным красным) в виде метахроматически окрашенных гранул [6, 18]. Метахромазия обуславливается полимеризацией неорганических метафосфатов, входящих в состав гранул волютина. Этим свойством, однако, и способностью окрашиваться основными красителями в клетке обладают, кроме волютина, и другие биополимеры [20]. Метод Мейера считается наиболее надежным методом выявления волютиновых гранул. Он основан на кислотоустойчивости волютина, благодаря которой волютин удерживает краситель даже при обработке 1 %-ным раствором серной кислоты [9]. Волютиновые гранулы могут быть удалены из клеток кипящей водой, они растворяются в 5 %-ной серной или хлорной кислотах, но не растворяются в эфире, хлороформе, этаноле, трипсине, пепсине, пикриновой и 1 %-ной серной кислотах. Если клетки фиксируются формальдегидом, осмиевой кислотой, этанолом или пламенем, то гранулы устойчивы к растворителям [17].

Целые клетки клубеньковых бактерий просматривали на электронном микроскопе УЭМБ-100Б после напыления хромом, ультратонкие срезы клубеньков готовили по методу Джордана и Гриньера [14].

Результаты и их обсуждение

В световом микроскопе при окраске по методу Мейера [9] волютин выявлен в клетках всех исследованных видов и штаммов клубеньковых бактерий. Он локализуется в цитоплазме клеток и имеет вид глобул разной величины иногда неправильной, угловатой или удлинненной формы. Эти включения менее рефрактивны, чем жировые капли или споры у бактерий [16].

Появление волютиновых гранул зависит от вида (рис. 1 и 2), возраста клеток и до некоторой степени — от состава питательной среды. Они образуются при азотном дисбалансе, присутствие фосфатов стимулирует их формирование [19]. Гранулы волютина могут располагаться терминально на одном или обоих полюсах клетки и находиться при этом в зонах фосфатной активности [8], в зонах аккумуляции полисахаридов, а если они располагаются центрально или субтерминально, то в зоне ядра в период предделения или деления клеток [20]. Вместе с тем размножение бактерий, видимо, не связано с присутствием во-

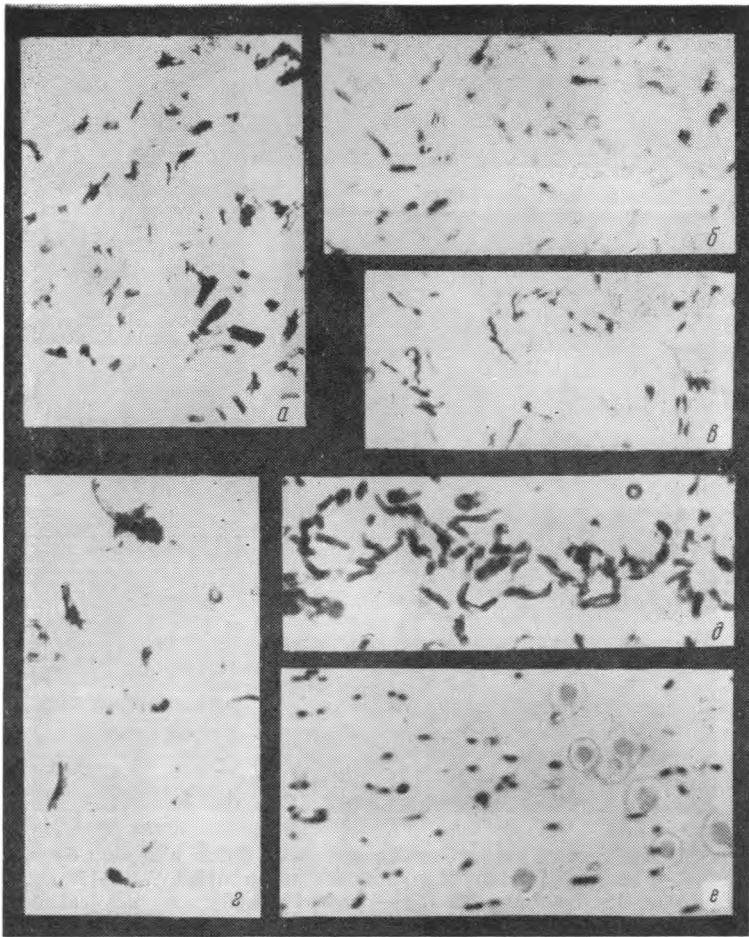


Рис. 1. Препараты клубеньковых бактерий люпина, шт. 400 (а); 359а (б); гороха, шт. 2246 (в, г), 245 (д), 96 (е); 32- (а, б) и 18-часовые (в, д) культуры и бактерионды из клубеньков гороха в период бутонизации — цветения (г). Окраска волютина по Мейеру, $\times 4170$.

люпина: его значительно больше в зрелых культурах и в бактериондных клетках клубеньковых бактерий. Вследствие этого полифосфатные гранулы скорее могут рассматриваться как хранители пирофосфата до использования его во время реактивации клеток [4]. У видов бактерий, формирующих споры, гранулы достигают значительных размеров непосредственно перед формированием споры и исчезают в процессе ее созревания [15]; накопление волютина в бактериоиде, возможно, предшествует стадии образования артроспор. У ряда микроорганизмов волютиновые гранулы накапливаются только при условиях, не благоприятствующих росту организма [5].

По мнению А. Н. Белозерского [2] и И. С. Кулаева [5], волютиновые гранулы — конденсированные неорганические фосфаты — полимеры, в которых молекулы ортофосфата линейно соединены между собой фосфоангидридными связями. Физиологически наиболее активные полифосфаты связаны с другими биополимерами клетки [2

12]. Низкополимерные кислоторастворимые фосфаты, находящиеся в свободном состоянии, откладываются в цитоплазме в виде волютиновых гранул и служат резервом макроэргического фосфата [5].

В клетках чистых культур *in vitro* волютин обычно выявлялся в форме многочисленных мельчайших капелек правильной формы, располагающихся пристенно. В бактериондах из клубеньков он имел форму грубых пятен неправильной формы, иногда маскирующих почти всю клетку, хотя приходилось наблюдать здесь и пристенное расположение гранул.

В клетках клубеньковых бактерий люпина из клубеньков растения-хозяина гранулы волютина приурочены скорее к полюсам, форма их глыбчатая, как бы размытая, хотя и при таких нечетких очертаниях просматриваются более яркие и контрастно окрашивающиеся центральные участки. У клеток клубеньковых бактерий люпина, шт. 359а (эф.) насчитывалось от 5 до 10—15 мелких точкообразных пристенных

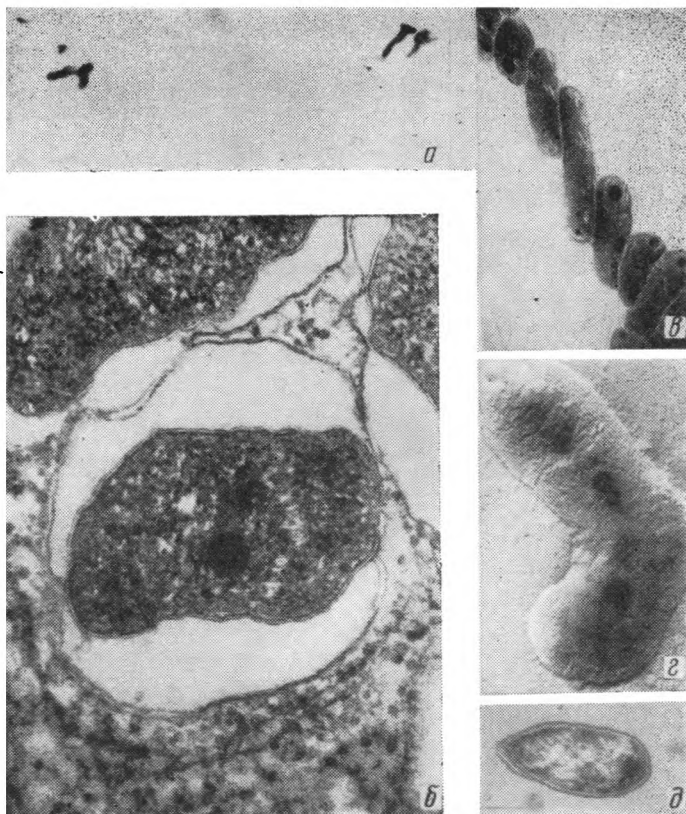


Рис. 2. Бактероиды из клубеньков кормовых бобов в период бутонизация — цветение (а), окраска волютина по Мейеру, $\times 4170$; клубеньковые бактерии люпина (б) — ультратонкий срез клубеньковой ткани, $\times 60000$; клевера (в, д) — целые клетки, напыление хромом. $\times 5600$ и $\times 12000$; клубеньковые бактерии акации г — ультратонкий срез, $\times 10000$.

капелек волютина (рис. 1, б). У клубеньковых бактерий люпина, шт. 400 (неэф.) расположение волютиновых капелек аналогичное, однако в ряде случаев у них наблюдалась тенденция к слиянию, а нередко между капельками боковых участков клетки возникали как бы перемычки и клетки приобретали почти полосатость или «опоясанность» (рис. 1, а). В препаратах клубеньковых бактерий гороха, шт. 224б и 245а (рис. 1, в—д), волютин выявлялся особенно четко: в клетках 18-часовых культур независимо от эффективности штамма он располагался пристенно мелкими гранулами — точками (рис. 1, в) или штрихами (рис. 1, д), сами клетки выглядели в большинстве случаев полыми чехлами, в отдельных участках которых концентрация волютина была больше или меньше и вследствие этого чехол то уплотнялся, то как бы весь растворялся. В клетках 18-часовых культур *Rh. leguminosarum*, шт. 96, специфичного для кормовых бобов (рис. 1, е), обнаружен волютин в виде гранул, занимающих центральное и даже иногда полярное положение, капельки нередко тесно примыкали друг к другу, образуя цепочку. Гранулы иногда довольно далеко отстояли

друг от друга; количество их на клетку варьировало от 1—2 до 7—8 (по длине клетки).

Волютин выявлялся не только в клетках, выросших *in vitro*, но и в бактероидах, выделенных из клубеньков гороха, люпина, сои и кормовых бобов в период бутонизация — цветение, когда, по мнению А. П. Петросян и Е. Н. Аввакумовой [8], его содержание в клубеньковых бактериях максимально. В наших опытах волютин в бактероидах (рис. 1, г и рис. 2, а) имел более грубую форму и занимал иногда почти всю клетку, наибольшие скопления его наблюдались в местах разветвлений бактероидов или на их концевых участках. Такая топография была характерна для всех видов клубеньковых бактерий независимо от эффективности исследуемых штаммов. В электронном микроскопе (рис. 2, б—д) глобулы волютина приобретали вид электроноплотных, четко контурированных образований сферической или эллипсоидной формы размерами 30—70 нм, как и у других видов микроорганизмов [3, 7]. В случае низкого содержания полифосфатов — основного компонента гранул — под электронным микроскопом удается даже разли-

чать их тонкозернистую структуру [4]. Однако в наших опытах как в клетках эффективных, так и неэффективных штаммов концентрация полифосфатов на средах была достаточно высокой и поэтому не было возможности выявить их тонкую структуру.

Выводы

1. При визуальном сопоставлении окрашенных метиленовым синим по методу

Мейера бактериоидов, выделенных из клубеньков растений при бобоворизобальном симбиозе, и клеток, выросших *in vitro*, выявлено, что содержание волютинина в первых значительно выше, чем в последних.

2. Корреляция между содержанием волютинина в клетках клубеньковых бактерий и эффективностью этих бактерий не установлено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аввакумова Е. Н. Новые данные о взаимоотношениях бобовых растений и клубеньковых бактерий. — В сб.: Биол. азот. и его роль в землед. М.: Наука, 1967, с. 77—89. — 2. Белозерский А. Н. О химической природе волютинина. — Микробиол., 1945, т. 14, № 1, с. 29—34. — 3. Бирюзова В. И. Мембранные структуры микроорганизмов. М.: Наука, 1973. — 4. Воробьева Л. И. Пропионовокислые бактерии и образование витамина В₁₂. М.: Изд-во МГУ, 1976. — 5. Кулаев И. С. Биохимия высокомолекулярных полифосфатов. М.: Изд-во МГУ, 1975. — 6. Мейсель М. Н., Миролубова Л. В. Сравнительное люминесцентное исследование строения бактерий. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1959, № 6, с. 865—878. — 7. Павлова И. Б. Субмикроскопическое строение некоторых видов бактерий, патогенных для человека. — Автореф. канд. дис. М., 1966. — 8. Петросян А. П., Аввакумова Е. Н. Обмен веществ клубеньковых бактерий в клубеньках. — В сб.: Вопр. микробиол. Ереван: Изд-во АН Арм. ССР, 1966, вып. III (XIII), с. 23—32. — 9. Пешков М. А. Цитология бактерий. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1955. — 10. Сигута В. А.,

Шильникова В. К. Избирательная растворимость красителей в липидах клубеньковых бактерий. — Изв. ТСХА, 1978, вып. 5, с. 11—19. — 11. Bergersen F. J. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, vol. 130, p. 304—312. — 12. Ebel J. P. — *Bul. Soc. Chim. Biol.*, 1952, vol. 34, N 3—4, p. 321—335, N 5—6, p. 491—505. — 13. Iswaran V., Sen Abhiswar, Apte R. — *Zbl. Bakteriologie. Parasitenk. Infektionskrankh. und Hyg.*, 1973, Abt. 2, Bd 128, N 1—2, S. 23—24. — 14. Jordan D. C., Grinyer J. — *Canad. J. Microbiol.*, 1965, vol. 11, N 4, p. 721—725. — 15. Katchman B. J., Fetty W. O. — *J. Bacteriol.*, 1955, vol. 69, N 5, p. 607—615. — 16. Lewis I. M. — *Bacteriol. Revs.*, 1941, vol. 5, N 3, p. 181—230. — 17. Mudd S., Yochida S. A., Koike H. — *J. Bacteriol.*, 1958, vol. 75, N 2, p. 224—235. — 18. Schaechter M., Trece E. L., DeLamater E. D. — *Exptl. Cell. Res.*, 1954, vol. 6, p. 361—366. — 19. Smith Y. W., Wilkinson J. F., Duguid J. P. — *J. Bacteriol.*, 1954, vol. 68, p. 450—469. — 20. Widra A. — *J. Bacteriol.*, 1959, vol. 78, N 5, p. 664—670. — 21. Winder F., Denney J. M. — *Nature*, 1954, vol. 174, p. 353—354.

Статья поступила 7 сентября 1981 г.

SUMMARY

Distribution and absolute content of volutin *in vitro* and under symbiosis in the cells of nodule bacteria of lupine, peas, fodder beans, lucerne, acacia have been studied by Mejer light-optic method and by electronic microscopy technique. It is found that higher amount of volutin is contained in bacteroids than in the cells of nodule bacteria grown in pure cultures. No correlation is found between the amount of volutin in the cells of nodule bacteria and its efficiency.