

В. И. РОМАНОВ, С. Д. ТАПТЫКОВА,
член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ

О ЦИТОХРОМАХ ЭФФЕКТИВНЫХ И НЕЭФФЕКТИВНЫХ ШТАММОВ RHIZOBIUM

Исследование конечных этапов дыхания эффективных и неэффективных штаммов клубеньковых бактерий на уровне цитохромов представляет значительный интерес, поскольку из литературы известно о наличии прямой связи между составом цитохромов бактериальных компонентов клубенька и процессом азотфиксации. В частности, ранее было показано (1) и в дальнейшем подтверждено (2-3), что в бактериоидах «эффективных» клубеньков сои и люпина отсутствуют цитохромы группы а, тогда как в бактериях, выделенных из клубеньков, не фиксирующих азот, эти цитохромы обнаруживаются.

Ранее (4) нами был исследован качественный состав цитохромов эффективного и неэффективного штаммов *Rh. leguminosarum* и *Rh. trifolii*, причем различий между штаммами разной эффективности обнаружено не было. Задачей данной работы было количественное изучение цитохромов в этих же штаммах методом дифференциальной низкотемпературной спектрофотометрии.

Объектом наших исследований служили штаммы *Rh. leguminosarum* 86 — эффективный и 87 — неэффективный, которые мы получили из Всесоюзного научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии, а также штаммы *Rh. trifolii* 18—64 — эффективный и К-47 — неэффективный, полученные нами из Всесоюзного научно-исследовательского института бактериальных препаратов и микробиологических средств защиты растений*.

Среда и условия выращивания бактерий в наших опытах были такими же, как и ранее (6). Количественное определение цитохромов по низкотемпературным дифференциальным спектрам суспензий клубеньковых бактерий проводили по методу, предложенному Моховой, Таптыковой и Шароян (7). Этот метод имеет ряд преимуществ, так как спектры, полученные при температуре жидкого азота, отличаются значительной интенсификацией и сужением полос поглощения, а кроме того, этот способ позволяет существенно уменьшить трудности сравнения цитохромов в образцах с разной мутностью.

Спектры снимали на спектрофотометре, построенном на кафедре биохимии животных Московского университета Виноградовым и Евтодненко (8). Снимались дифференциальные спектры суспензий клеток, восстановленных гидросульфитом, против окисленных феррицианидом. Степень окисленности образца проверяли снятием его абсолютного спектра против замороженного раствора 0,3 М сахарозы.

Количество цитохромов рассчитывали по методу, предложенному Лисенковой и Моховой (9) с использованием расчетных длин волны и коэффициентов молярных экстинкций животных цитохромов (взяты из работы Евтодненко и Моховой (10)), и выражали в микромолях гема на 1 г белка. Белок в суспензии клеток определяли по Лоури (11) в модификации Мосолова и Скарлат (12).

* Пользуемся случаем, чтобы выразить нашу благодарность Л. М. Доросинскому и Ю. С. Бородулиной за любезно предоставленные штаммы.

На рис. 1 и 2 представлены низкотемпературные дифференциальные спектры суспензий интактных клеток эффективного и неэффективного штаммов клубеньковых бактерий клевера и бобов. На всех четырех спектрах отчетливо видны максимумы поглощения, характерные для цитохром-оксидазы (600 м μ), а также три максимума (560, 556 и 549 м μ) в области α -полосы поглощения цитохромов b и c. Максимум 560 м μ указывает на наличие цитохрома b; максимум 549 — цитохрома c. Эти результаты

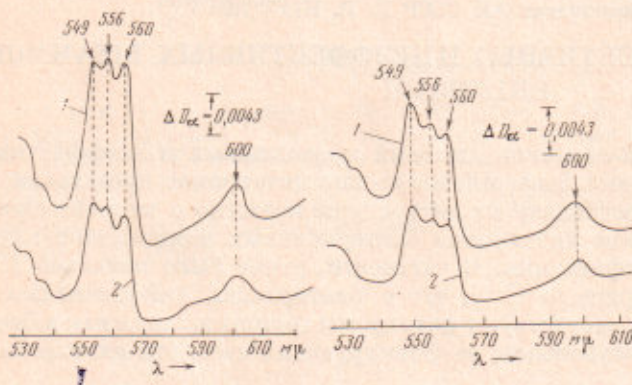


Рис. 1

Рис. 2

Рис. 1. Низкотемпературные дифференциальные спектры суспензий *Rhizobium trifolii*. Среда для замораживания: 0,3 M раствор сахаразы в 0,06 M фосфатном буфере pH 6,8. Восстановитель — гидросульфит, окислитель — феррицианид калия. Длина оптического пути 3 мм. Температура -196° . 1 — эффективный штамм 18-64 (0,72 мг белка в 1 мл), 2 — неэффективный штамм К-47 (0,75 мг белка в 1 мл)

Рис. 2. Низкотемпературные дифференциальные спектры суспензий *Rhizobium leguminosarum*. Условия измерения те же, что на рис. 1. 1 — эффективный штамм 86 (0,63 мг белка в 1 мл), 2 — неэффективный штамм 87 (0,69 мг белка в 1 мл)

совпадают с данными других авторов о цитохромах клубеньковых бактерий (^{2, 4}). Что касается максимума 556 м μ , то о его природе трудно говорить без дополнительных исследований. Эплбл (⁴), который также наблюдал его на низкотемпературном спектре эффективного штамма *Rh. japonicum*, считает, что он указывает на присутствие и второго компонента цитохрома b. Возможно, что наличие двух цитохромов b (560 и 556 м μ) является видовой особенностью бактерий *Rhizobium*.

Поскольку перечисленные компоненты обнаружены во

всех четырех штаммах, очевидно, что между эффективными и неэффективными штаммами, как это было показано и ранее (⁶), качественных различий нет. Количественные же различия между ними видны уже при рассмотрении спектров и подтверждаются данными табл. 1. Из таблицы следует, что содержание всех цитохромов в эффективных штаммах выше, чем в неэффективных. От опыта к опыту эта разница несколько менялась, но в среднем составляла не менее 30—40%.

Поскольку в настоящее время отсутствуют общие методы расчета концентраций цитохромов по спектру ослабления для мутных сред, в табл. 1 мы для сравнения привели данные Эплбл, который количественно определял цитохромы в суспензии эффективного штамма *Rh. japonicum*. Видно, что результаты наши и Эплбл в общем совпадают.

Итак, наши опыты по количественному определению цитохромов показали, что в эффективных штаммах содержится заметно больше всех цитохромов, в том числе и цитохромов a. Из этого следует, что отсутствие данного компонента (a) в бактероидах, выделенных из «эффективных» клубеньков, тесно связано со значительной перестройкой их электрон-транспортной цепи и является следствием симбиоза.

Сам факт повышенного содержания цитохромов в эффективных штаммах по сравнению с неэффективными подтверждает имеющиеся в литературе данные о том, что эффективные штаммы клубеньковых бактерий обладают более высокой активностью дыхания, чем неэффективные ((^{6, 13-15}) и др.).

Таблица 1

Содержание цитохромов в клетках эффективных (Э) и неэффективных (НЭ) штаммов клубеньковых бактерий *Rhizobium* (в микромолях гема на 1 г белка)

Бактерии	Цитохромы	λ_{max} , мμ	Опыт I			Опыт II			Опыт III			
			Э	НЭ	Э/НЭ	Э	НЭ	Э/НЭ	Э	НЭ	Э/НЭ	
<i>R. trifolii</i>	c	549	0,36	0,22	1,6	0,34	0,20	1,7	0,36	0,17	2,1	
	b(?)	556	0,49	0,30	1,8	0,48	0,27	1,6	0,47	0,24	1,9	
	b	560	0,49	0,36	1,3	0,48	0,26	1,8	0,50	0,28	1,9	
	a — аз	600	0,13	0,10	1,3	0,13	0,07	1,9	0,15	0,08	1,8	
<i>R. leguminosarum</i>	c	549	0,36	0,27	1,4	0,24	0,13	1,8	0,26	0,15	1,7	
	b(?)	556	0,43	0,30	1,4	0,27	0,17	1,6	—	—	—	
	b	560	0,43	0,32	1,3	0,27	0,15	1,8	0,24	0,11	2,2	
	a — аз	600	0,15	0,11	1,3	0,09	0,04	2,2	0,10	0,06	1,7	
<i>R. japonicum</i>	c	548	0,51	Данные Эпилби (*)								
	b	560	0,45									
	a — аз	598	0,15									

* Максимумы поглощения цитохромов при температуре жидкого азота.

Конечно, на основании дифференциальных спектров, полученных путем только «химического», а не «субстратного» восстановления и окисления цитохромов, трудно судить об истинном соотношении и роли компонентов в цитохромной системе каждого штамма. Однако наличие значительной разницы в содержании их в эффективных и неэффективных штаммах свидетельствует о том, что различия эти действительно имеют место.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
23 III 1970

Институт микробиологии
Академии наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. А. Appleby, F. J. Bergersen, *Nature*, 182, 4174 (1958). ² K. Tuzimura, J. Watanabe, *Plant and Cell Physiol.* (Tokyo), 5, 157 (1964). ³ С. А. Appleby, *Biochim. et biophys. acta*, 172, 71 (1969). ⁴ С. А. Appleby, *Biochim. et biophys. acta*, 172, 88 (1969). ⁵ С. С. Мелик-Саркисян, Н. В. Карапетян, В. Л. Кретович, *ДАН*, 188, 930 (1969). ⁶ В. Л. Кретович, З. Г. Евстигнеева и др., *Микробиология*, 38, 707 (1969). ⁷ Е. Н. Мохова, С. Д. Таптыкова, С. Г. Шароян, *Вопр. мед. хим.*, 14, 437 (1968). ⁸ А. Д. Виноградов, Ю. В. Евтодненко, *Вопр. мед. хим.*, 11, 99 (1965). ⁹ Л. Л. Лисенкова, Е. Н. Мохова, *Микробиология*, 33, 918 (1964). ¹⁰ Ю. В. Евтодненко, Е. Н. Мохова, В сборн. *Митохондрии, структура и функции*, «Наука», 1966, стр. 95. ¹¹ O. Lowry, N. Rosenbrough et al., *J. Biol. Chem.*, 193, 165 (1951). ¹² В. В. Мосолов, И. В. Скарлат, *Прикл. биохим. и микробиол.*, 1, 233 (1965). ¹³ В. Л. Кретович, В. И. Романов и др., *ДАН*, 187, 456 (1969). ¹⁴ H. Katznelson, A. Zagallo, *Canad. J. Microbiol.*, 3, 879 (1957). ¹⁵ Э. Ф. Шмидт, *Микробиология*, 33, 284 (1964).