

З. Г. ЕВСТИГНЕЕВА, К. Б. АСЕЕВА, Г. Л. ШАПОШНИКОВ,
член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ, Г. М. МОГИЛЬНИЦКИЙ,
К. А. КОЩЕЕНКО, член-корреспондент АН СССР Г. К. СКРЯБИН

ИММОБИЛИЗАЦИЯ БАКТЕРОИДОВ *RHIZOBIUM LUPINI* В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

В настоящее время из бактерий *Rhizobium japonicum* (^{1, 2}) и *Rhizobium lupini* (³⁻⁶) выделен фермент нитрогеназа, катализирующий реакцию восстановления N_2 и NH_3 в анаэробных условиях, в присутствии АТФ и АТФ-генерирующей системы, Mg^{2+} и донора электронов в виде восстановленного водородом раствора дитионита. Как показали проведенные нами опыты, нитрогеназа из бактериоидов люпина, так же как и нитрогеназа из бактериоидов сои (²), быстро теряет активность после ее выделения и очистки, особенно в присутствии даже незначительного количества кислорода (⁷). При необходимости иммобилизации лабильных ферментов, требующих для проявления активности нескольких кофакторов, применяют метод иммобилизации не фермента, а содержащих его интактных бактериальных клеток. Предварительные опыты показали, что бактериоиды *Rh. lupini* обладают высокой азотфиксирующей активностью, значительно более стабильной, чем выделенный фермент.

Целью настоящей работы явилась попытка включить в полиакриламидный гель интактные бактериоиды *Rh. lupini*, свежевыделенные из клубеньков, а также быстро замороженные в жидком азоте бактериоиды, хранившиеся при -20° в течение нескольких месяцев. В задачи работы входила проверка влияния условий иммобилизации на интенсивность азотфиксирующей активности бактериоидов и длительность ее сохранения в полученных гранулах геля.

В качестве опытного материала были использованы бактериоиды клубеньков люпина, выращенного из семян, инокулированных эффективным штаммом *Rh. lupini* 359a. Разрушение клубеньков проводили под струей аргона в гомогенизаторе при 8000 об/мин. в течение 1 мин. Гомогенат отжимали через плотную ткань. После центрифугирования при 5000 *g* под аргоном получали осадок, состоящий из бактериоидов. Азотфиксирующую активность бактериоидов определяли ацетиленовым методом, заменяя природный субстрат — молекулярный азот ацетиленом. Метод весьма удобен и широко используется для определения азотфиксирующей активности целых клубеньков, бактериоидов и нитрогеназы. Количество образующегося этилена определяли газохроматографическим методом на хроматографе «Хром-31». Разделение этилена и ацетилена проводили на колонке (3×2000 мм) из нержавеющей стали, наполненной порпаком N. Время удерживания этилена 1,8 мин., ацетилена 2,4 мин. при температуре обогрева колонки 90° , давлении 1 атм; объем вводимой пробы 1 мл. В качестве реакционных сосудов использовали пенициллиновые флаконы объемом 14 мл, которые вставляли в специальный герметичный блок (⁷). В промытые аргоном сосудики вносили 2 мл гранул геля с иммобилизованными бактериоидами или 1 мл суспензии бактериоидов. Гранулы и бактериоиды суспендировали в растворе, содержащем сукцинат натрия, растворенный в 0,1 *M* калийфосфатном буфере pH 7,0. На 100 мг бактериоидов добавляли 100 мкмол. сукцината. Газовая фаза сосудиков содержала 94% аргона и 6% кислорода. Реакцию начинали внесением при помощи шприца 1 мл ацетилена.

Прежде чем осуществить иммобилизацию бактериоидов в полиакриламидном геле нами были поставлены предварительные контрольные опыты. Поскольку в процессе формирования полиактиламидного геля бактериоиды находятся в соприкосновении с отдельными его компонентами, важно было установить их влияние на азотфиксирующую активность бактериоидов, с целью разработки режима полимеризации геля. В этих опытах в герметичные опытные сосудики, содержащие суспензию бактериоидов добавляли отдельные компоненты полимеризационной системы, а затем вводили ацетилен. Количество образующегося этилена определяли через 20 мин. и затем через 18 час.

Таблица 1

Влияние ТЕМЕД, ПА, А+МБА на азотфиксирующую активность неиммобилизованных бактериоидов *

Варианты опытов	20 мин. инкубации		18 час. инкубации	
	C_2H_4 на пробу, ммоль	C_2H_4 на 100 мг бактериоидов, ммоль	C_2H_4 на пробу, ммоль	C_2H_4 на 100 мг бактериоидов, ммоль
Суспензия бактериоидов	3,1	1,5	8,06	4,03
Суспензия бактериоидов+ТЕМЕД+ПА	—	—	0,78	0,59
Суспензия бактериоидов+А+МБА	—	—	1,69	0,84

* В опытах использованы свежeweделенные бактериоиды с невысокой активностью (конец периода вегетации люпина).

Таблица 2

Азотфиксирующая активность бактериоидов *Rh. lupini*, иммобилизованных в полиакриламидном геле *

Варианты опытов	C_2H_4 на пробу, ммоль	C_2H_4 на 100 мг бактериоидов, ммоль
Суспензия бактериоидов	236,5	139,1
Гранулы геля с иммобилизованными бактериоидами	6,2	32,6
Суспензия бактериоидов+гранулы геля без бактериоидов	188,1	110,6
Гранулы геля без бактериоидов	0	0
Гранулы геля с иммобилизованными бактериоидами	0	0

* В опыте использованы бактериоиды, хранившиеся в замороженном состоянии. Бактериоиды выделены из клубеньков люпина в стадии бутонизации растений.

Из приведенных в табл. 1 данных можно видеть, что ТЕМЕД+ПА, а также А+МБА вызывают ингибирование азотфиксирующей активности бактериоидов. В связи с этим нами был использован быстрый метод полимеризации геля, обеспечивающий минимально короткий срок соприкосновения бактериоидов с отдельными компонентами системы.

Для иммобилизации бактериоидов применяли систему, состоящую из акриламида и сшивающего агента N,N'-метиленабисакриламида (МБА) в соотношении 82 : 18. Катализаторами служили N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) и персульфат аммония (ПА). Акриламид (А) и МБА фирмы Реанал (Венгрия) перекристаллизовывали соответственно из хлороформа и ацетона.

В сосуд для полимеризации внесли 11 мл водного раствора МБА и акриламида в количестве 0,36 и 1,64 г. К раствору добавляли суспензию из 1,0 г сырой биомассы свежеприготовленных или размороженных бактериоидов в 3 мл сукцината натрия. К полученной смеси добавляли 2 капли ТЕМЕД (50,0% раствор) и 10 мг персульфата аммония в 2 мл воды. Общий

объем смеси составлял 20 мл. Полимеризацию проводили при 24–26° в течение 2–5 мин. Полученный 10,0% полиакриламидный гель был молочного цвета и обладал удовлетворительной прочностью. Полученный блок геля механически фрагментировали продавливанием через сито 20–30 меш и промывали декантацией тем же калийфосфатным буферным раствором до исчезновения невключившихся клеток (4–6 л раствора порциями по 300–400 мл, время сохранения осаждения гранул 1,5–2,0 мин.). Продолжительность процесса фрагментации составляла ~10 мин.

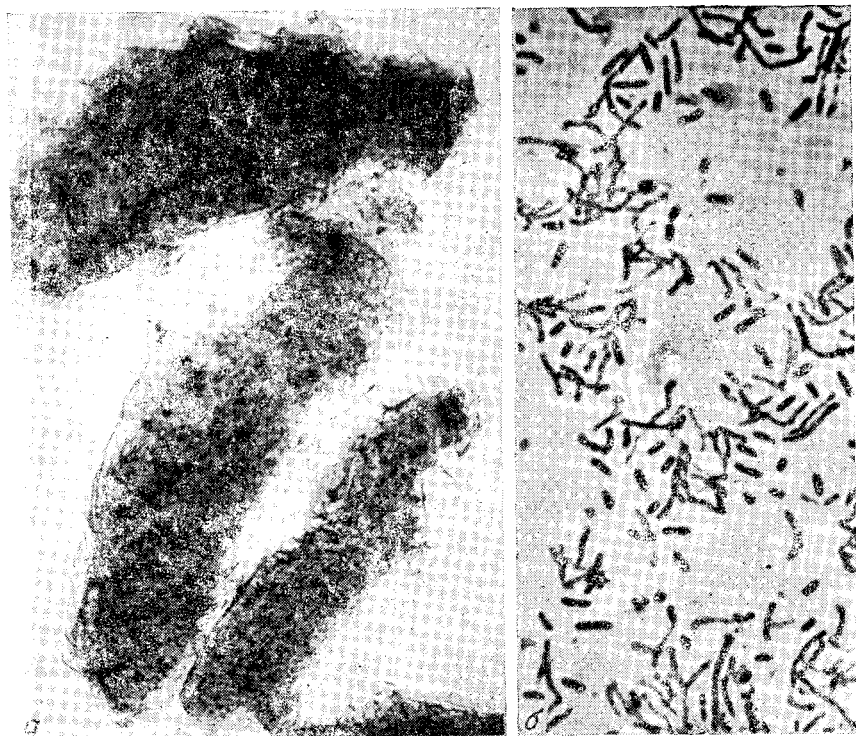


Рис. 1. Гранулы геля (а), ув. 50× и бактериоды *Rh. lupini* (б), ув. 1500×

Общая продолжительность процедуры получения гранул с иммобилизованными бактериодами составляла примерно 30 мин. Все операции по получению бактериодов и их иммобилизации в полиакриламидном геле проводили под током аргона или в специальной камере в атмосфере аргона.

С использованием данных методов полимеризации получен гель с иммобилизованными в нем бактериодами, а также аналогичный гель, но без бактериодов. Гранулы обоих видов геля, а также гранулы геля без бактериодов, но с добавленной суспензией бактериодов были помещены в реакционные сосудики герметичного блока. В каждый сосудик вносили 2 мл суспензии гранул в сукцинате или 2 мл суспензии неиммобилизованных бактериодов. В опыте по влиянию кислорода в реакционные сосудики вводили кислород. Во всех случаях реакцию начинали введением ацетилена. Каждый опыт проводили в девяти повторностях. Азотфиксирующую активность опытных и контрольных проб определяли через 80 мин. Результаты приведены в табл. 2.

Из табл. 2 можно видеть, что при данном методе иммобилизации активность иммобилизованных бактериодов составляет 23% от активности бактериодов в суспензии. Гранулы геля без бактериодов оказывают незначительное, ингибирующее действие на активность добавленной к ним суспензии бактериодов, а сами по себе гранулы геля не обладают способностью

восстанавливать ацетилен. Из данных варпанта 5 можно видеть, что в аэробных условиях иммобилизованные в геле бактериоиды полностью теряют активность. Следовательно, кислород легко проникает в гранулы, и иммобилизованные бактериоиды для сохранения их азотфиксирующей активности должны находиться в газовой среде с содержанием кислорода не выше 6%.

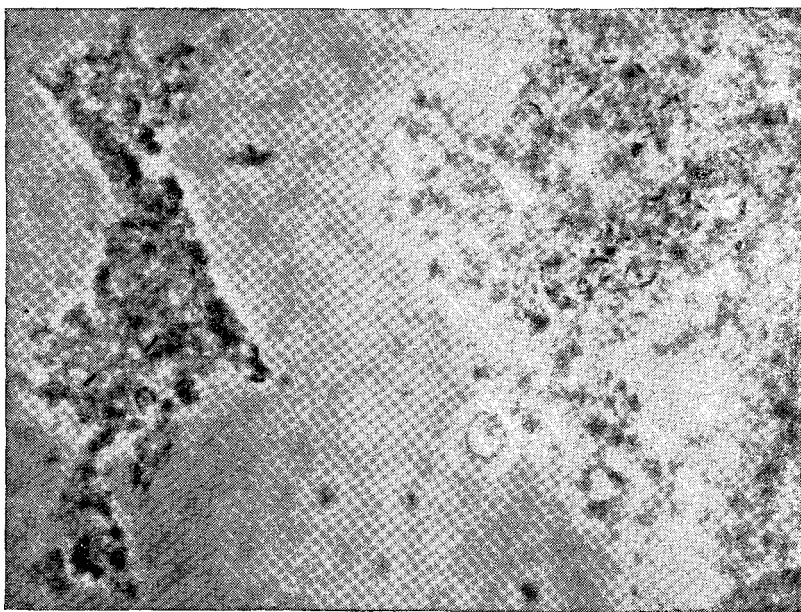


Рис. 2. Гранулы геля с включенными в них бактериоидами, ув. 1300×

На рис. 1 видны форма гранул геля (а) и бактериоиды *Rh. lupini* (б), выделенные из клубеньков люпина в период бутонизации растений. На рис. 2 представлены фрагменты гранул геля с включенными в них бактериоидами.

Таким образом, полученные в этой работе данные свидетельствуют о возможности иммобилизации активных бактериоидов *Rh. lupini* как свежевыделенных из клубеньков, так и хранившихся в замороженном состоянии. Необходимым условием для сохранения активности бактериоидов при иммобилизации является быстрая полимеризация геля, так как отдельные компоненты системы ингибируют активность бактериоидов.

Нами получены предварительные данные о полном сохранении азотфиксирующей активности бактериоидов в течение недели. Кроме того получены данные, указывающие на важную роль Mg^{2+} в стабилизации и увеличении активности иммобилизованных бактериоидов.

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

Поступило
4 II 1975

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пуццано

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. J. Evans, S. A. Russell, The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation, London — N. Y., 1971, p. 191. ² F. J. Bergersen, G. H. Turner, J. Gen. Microbiol., v. 53, 205 (1968). ³ В. Л. Кретович, З. Г. Евстигнеева и др., ДАН, т. 190, 1235 (1970).
- ⁴ I. R. Kennedy, Biochim. et biophys. acta, v. 222, 135 (1970). ⁵ А. В. Манорин, Е. П. Старченко, ДАН, т. 186, 975 (1969). ⁶ Я. В. Пейве, Б. А. Ягодин и др., ДАН, т. 197, 721 (1971). ⁷ К. Б. Асеева, З. Г. Евстигнеева и др., Изв. АН СССР, сер. биол., № 5, 751 (1973). ⁸ K. Mosbach, R. Mosbach, Acta chem. scand., v. 20, 2807 (1966).
- ⁹ Г. К. Скрыбин, К. А. Кошечко и др., Изв. АН СССР, сер. биол., № 6, 856 (1974).
- ¹⁰ Г. К. Скрыбин, К. А. Кошечко, В. И. Суровцев, ДАН, т. 215, 737 (1974).