

## Babagaron tenyésztett rhizobiumbaktériumok morfológiája

MANNINGER ERNŐ

*MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete, Budapest*

A baktériumok rendszertani hovatartozásának megállapítására fontos szempont ezek morfológiája. Az a nagyszámú irodalom, amely a rhizobiумok morfológiájával foglalkozik, egymásnak igen ellentmondó adatokat tartalmaz, mind e mikroorganizmusok egyes sejtjeire, mind a sejtek tömegére, a telepekre vonatkozóan. Ez a tény természetesen bizonytalanná teszi e baktérium-csoport meghatározását és igen gyakran más fajokkal való összetévesztésre ad alkalmat. Tudjuk ugyanis, hogy a mikroorganizmusok meghatározásánál mekkora támpont az egyes sejtek mikroszkópi alakja és a kolóniák (telepek) különböző megjelenési formáinak, illetve jellegének szabatos ismerete.

Ennek megfelelően a későbbiek folyamán is két — külön az egyedi sejtek és külön a telepek megjelenési alakjait bemutató — részben tárgyaljuk e baktériumok morfológiáját.

Fő célunk volt különböző pillangósvirágú növényekből kitenyésztett és azokra visszaoltva ellenőrzött, fiatal, általában 24—72 órás, szilárd táptalaj (babagar) felületén nőtt rhizobiумok telepeit vizsgálat tárgyává tenni.

A rhizobiумokra vonatkozó eddig leirt morfológiai jellegek felhasználása nemcsak azért teszi bizonytalanná a határozási munkákat, mert még a szisztematikai (faji) beosztásuk sem tekinthető véglegesnek, hanem, mert még az azonos faji beosztást valló kutatók munkáiban is más-más morfológiai és kulturális bélyegeket olvashatunk ezekről a baktériumokról.

MIGULA [16] baktériumhatározója olyan egyetlen fajba sorolja a rhizobiумokat, amelyeknek képviselői 3—4  $\mu$  hosszúságú, 0,9  $\mu$  vastag, alig lekerített végű pálcikák. Utóbbiak lassú mozgásúak, mesterséges kultúrákban gyakran teljesen mozgásképtelennek találták.

Ugyancsak egyetlen fajnak tartja TOPLEY és WILSON [19] nomenklatúrája e baktériumokat, *Rhizobium leguminosarum* elnevezést ajánlva számukra. A könyv szerint mesterséges táptalajon is képesek e mikroorganizmusok a csillagónélküli coccus-alaktól a csillangós pálcán át a vacuolás pálcák alakjáig átalakulni. Más szerzők ennek az ún. fejlődési ciklusnak, illetve ennek egyes szakaszainak alakjait csakis meghatározott helyhez (pl. növények gumócskáinak belső szövetei stb.) kötik.

Valószínűnek látszik, hogy az utóbbi nézet a helyes. Saját vizsgálataink során is pl. bakteroid, illetve vacuolás formát mesterséges táptalajokon sohasem észleltünk, mindig csak pálcá-alakokat.

Ugyancsak TOPLEY és WILSON [19] baktériumhatározója szerint a rhizobiумok nem követelnek meg okvetlenül aerob viszonyokat a növekedéshez, mert találtak egy olyan baktérium-törzset, amely szigorú anaerob viszonyok mellett is nőtt (!?).

KRASZILNIKOV baktériumhatározója [12] 10 fajba sorolja ezeket és szerinte a Rhizobium-nemzetségre általában jellemzőek az olyan Gram-negatív, nem spórás baktériumok, amelyek a pillangósvirágú növények gyökerén képesek gumókat létrehozni. Szerinte is előfordul, hogy táptalajon a sejtek különböző alakokat (gömb, lombik, körte, stb.) mutathatnak előregedés vagy más körülmény hatására.

BERGEY [3] hat fajba sorolja e baktériumcsoportot. A rhizobium genusba általában  $0,5-0,9 \mu \times 1,2-3,0 \mu$  nagyságú, fiatalon mozgó pálcikákat sorol, amelyek Gram-negatívak, aerobok.

Meg kell jegyeznünk, hogy nemcsak a baktériumhatározókönyvek mutatják e baktériumok ellentmondó morfológiai jellegeit, hanem az egyes, e kérdéssel foglalkozó értekezések is. ERIKSSON [4] még gombafonalaknak tartja a pillangósvirágú növények gyökérgumóiban élő mikroorganizmusokat.

E baktériumok első pálcikaalakú megjelenéséről és a bakteroid alakjáról BEIJERINCK [2] számol be 1888-ban, majd morfológiájukkal már részletesebben foglalkozik HARRISON és BARLOW [7]. Ennek előtte már HARTLEB [8], HILTNER és STÖRMER [9] írják le, hogy e baktériumok fiatal sejtjeinek a protoplazmája anilin festékekkel egyenletesen színeződik, míg öreg sejtteknél rosszul festődő részleteket is találhatunk.

Még újabb munkákban is (pl. FJODOROV [5]) is azt olvashatjuk morfológiájukról, hogy a rhizobiumok méretei rendkívül csekélyek, *nagyságuk és formájuk igen változatos*.

Gyakran tapasztalhatunk ellentmondó adatokat a rhizobiumok telep-morfológiájára vonatkozóan is. Általában színtelen (egyes szerzők szerint helytelenül fehér) telepűeknek tartják a rhizobiumokat. Ezzel szemben FRANK [6] 10 mm átmérőjű, tojássárga, köralakú kolóniáknak írja le őket. Utóbbi esetben valószínűleg összetévesztés történt a gumó belsejéből (vagy felületéről) izolált baktériummal, hiszen még ma sem biztosan eldöntött, hogy élnek-e a gumók belsejében rhizobiumok mellett más, idegen fajú mikroorganizmusok vagy sem. Egyes kutatók, így BEIJERINCK [2], SIMON [18] és KLEIN [11] szerint a gumócskákban gyakran élnek pigmenttermelő baktériumok. Ilyen körülmények mellett valóban kétséges, hogy az irodalomban a rhizobiumok morfológiájaként leírt jellegek mennyire megbízhatóak, hiszen a legtöbb esetben nem ellenőrizték növényekre visszaoltva, hogy a vizsgált baktérium rhizobium-e vagy sem. Ezt a nézetet vallja ROSSI [17] is munkájában.

### Kísérleti rész

A baktériumokat különböző tájegységekről, illetve talajfélésegekről származó pillangósvirágú növények gyökérgumócskáiból izoláltuk. A talajok Arany-féle kötöttségi számának, a szénsavas ménytartalmának és a hidrolitos savanyúságának meghatározása a talajvizsgálatoknál használatos módon történt (BALLENEGGER [1]).

A nagyszámú (több száz) baktérium-tenyészetből választottuk ki a később vizsgált elv szerint azokat, amelyeknek szintenyészetben való előállítás után végeztük el a vizsgálatait.

Az egyes baktériumok szintenyészetéből egy kacsnyit steril vízben 30 percen át rázattunk, majd ebből ismét egy kacsnyit szélesztettünk Petri-csészékben előzőleg lemezzel merevedett babagar felületén (1000 ml babagar úgy készül,

hogy 50 g fehér babot egy éjjelen át desztillált vízben áztatunk, másnap 15 percig gyengén forraljuk. A szűrletben 2% (súlyszázalék) agart forralunk, pH-ját 7,2-re állítjuk be és szűrés után sterilizáljuk).

A Petri-csészéket a szélesített anyaggal termosztátban tartva 27°C-on, 48—72 óra után a lemezekon kinőtt telepeket 1 : 1-hez fényképeztük, majd vizsgálat tárgyává tettük a telepek növekedését, nagyságát, alakját, felületét, megjelenését, magassági fejlődését, szélét, színváltozását és konzisztenciáját.

Az egyes sejtek alakbeli tulajdonságának megfigyelésére ugyanilyen korú tenyészeteket tárgylemezen megfestettünk vizes gentiana-ibolyával 3—5 percen keresztül, majd mikroszkóp alatt immerziós tárgylencsével vizsgáltuk.

Minthogy a rhizobiumok eddig között morfológiai jellegei teljesen ellentmondóak, nagy számú gumó belsejéből izoláltunk mikroorganizmusokat és a leggyakrabban előforduló telepalakot, illetve típust tekintettük a rhizobiumbaktériumok képviselőinek.

1. táblázat

A különböző növényekből izolált rhizobiumbaktériumok származási helyeinek néhány adata

(1) A baktérium (növény) száma és gyűjtőhelye	(2) Arany- főle- kötött- ségi szám	(3) Hid- roli- tos aci- di- tás Y <sub>1</sub>	(4) Szén- savas mész- tar- talom %-ban	(5) Genetikai talajtípus	(6) A pillangós virágú növény, amelyből a bak- térium szár- mazik
I. Üszögpuszta (Baranya m)	45	5,2	0,90	a) agyagbemosódásos barna erdő- talaj, löszös homokon	Medicago sativa
II. Görcsöny (Baranya m)	46	5,4	0,26	b) barna erdőtalaj, huzamosabb szántóföldi művelés alatt	Trifolium pratense
V. Üszögpuszta (Baranya m)	47	4,2	0,00	a) agyagbemosódásos barna erdő- talaj, löszös homokon	Vicia villosa
VII. Kompolt (Heves m)	52	2,8	0,16	c) Csernozjom barna erdőtalaj homokon	Trifolium pratense
VIII. Kompolt (Heves m)	49	2,2	0,42	c) Csernozjom barna erdőtalaj homokon	Vicia villosa
IX. Öcsöd (Szolnok m)	54	8,6	0,00	d) agyagos réti talaj	Medicago sativa
XI. Iregszemcse (Tolna m)	46	3,3	0,68	e) mészlepedékes csernozjom	Medicago sativa
XII. Iregszemcse (Tolna m)	46	1,4	4,20	e) mészlepedékes csernozjom	Soja max
XXIII. Szigetvár (Baranya m)	43,4	2,0	1,28	a) gyengén fejlett agyagbemosó- dásos barna erdőtalaj löszön	Trifolium pratense
XXV. Szentkút (Baranya m)	46,4	4,0	0,16	a) agyagbemosódásos barna erdő- talaj, löszös homokon	Trifolium pratense
XXXVII. Sopron (Győr-Sopron)	30	—	2,50	b) barna erdőtalaj huzamosabb ideig szántóföldi művelés alatt	Trifolium pratense
XXXVIII. Sopron (Győr-Sopron)	30	—	2,50	b) barna erdőtalaj huzamosabb ideig szántóföldi művelés alatt	Medicago sativa

Az izolálási művelet különösen nagyobb gyökérgümöcskéik esetében hajtható végre aránylag egyszerűen, ahol az eddig leginkább alkalmazott és ajánlott izolálási módszereket félretéve [az eddigi módszerek lényege, hogy a gumók felületének letisztítása (esetleg utólagosan még gyenge kémiai fertőtlenítők alkalmazása) után azokat — leggyakrabban két tárgylemez között —

szétnyomják és a keletkezett nedvet kaccsal viszik táptalajra. Az ilyen kultúrák azonban nagyon vegyesek, mivel a gumók felületéről származó mikroorganizmusok egy része is rákerül a táptalajra], az általunk eljárt módon szinte azonnal szintenyészethet juthatunk. Az általunk alkalmazott módszert az ember- és állatorvosi mikrobiológiában sűrűn alkalmazzák valamely szervből baktériumok kitenyésztésénél. Lényege, hogy a gumók külső felületét lepörköljük, ott steril tüvel beszúrunk, miáltal legtöbbször csakis a gumó belsejéből nyerjük a baktériumokat.

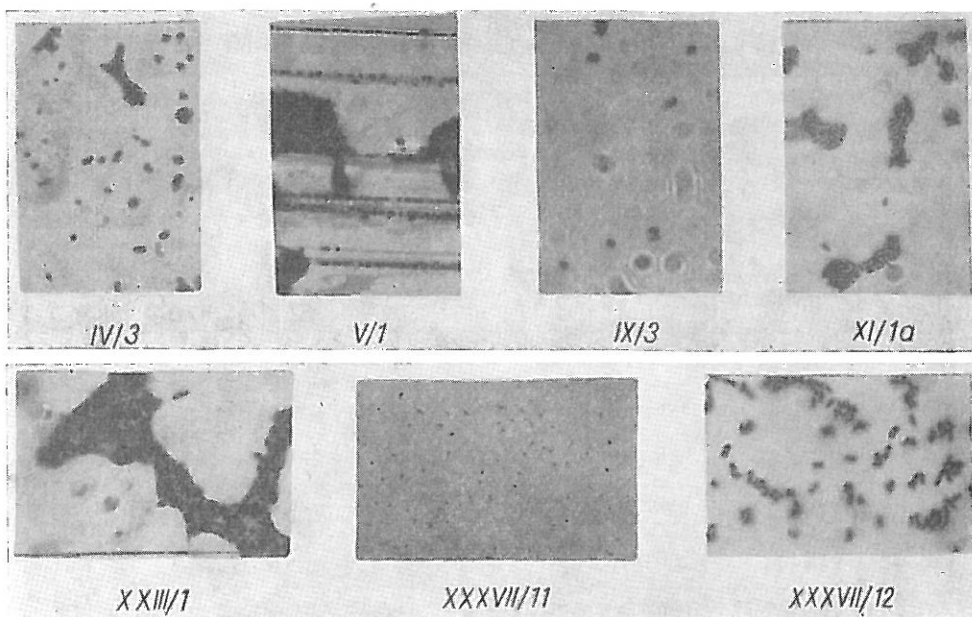
Természetesen apró gumócskáknál, amilyenek pl. a lóheréé, a lucernáé (gombostűfej nagyságú) ez kellő óvatosságot igényel, mert elővigyázatlanág esetében gyakran megeshetik, hogy a gumók belsejében is megsütjük a baktériumokat. Mindazonáltal így is előfordulhat, hogy a gumók belsejéből való kioltás alkalmával idegen csírákat izolálunk, különösen, ha a gumócskák szivacsos külső rétege valamilyen oknál fogva megsérült, miáltal fennáll annak lehetősége, hogy könnyen telepedhetnek beléjük más baktériumfajok. Éppen ezért is igyekeztünk mindig látszólag egészséges, friss gumócskákból izolálni a tenyészeteket. Kellő figyelemmel így azonnal szinte szintenyészetet nyerhetünk, amit ennek első szélesztése is igazol.

A rhizobium-baktériumok származási helyeik termőtalajának néhány adatát találjuk az 1. táblázatban. Ugyanitt feltüntettük az illető hely megyéjét, a talaj Arany-féle kötöttségi számát, a hidrolitos savanyúság számértékét, a szén-savas mésztartalmat százalékosan, a pillangósvirágú növény nevét, amelynek gyökérgumójából a baktériumokat izoláltuk, valamint a talajtípust. Az egyes lelőhelyek sorszámát római számokkal jelöltük, a szövegben és a táblázatokban, mert az egyes baktérium-törzseket jelöltük a tört nevezőjében arab számokkal.

Ezeket a baktériumokat visszaoltottuk saját növényükre és teljesítő-képességük (gümőképzés és nitrogénkötés) alapján győződünk meg, hogy valóban hatásos rhizobiumok-e. Ennél az oltóanyagok ellenőrző vizsgálatánál is használatos módszert (KERPELY, MANNINGER és ZÁMORY [10]) alkalmaztuk.

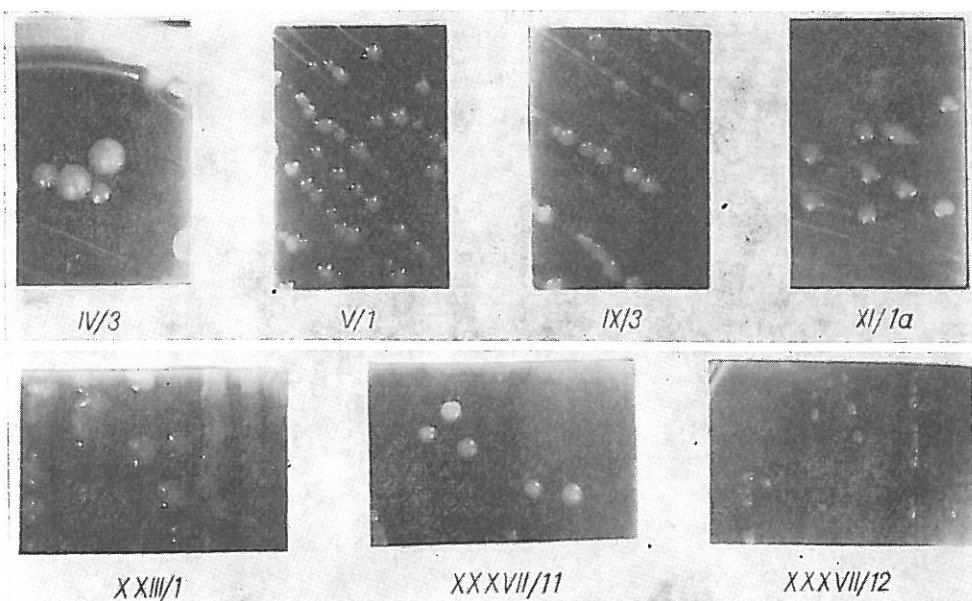
### Az eredmények megbeszélése

*Az egyes sejtek alakja közönséges mikroszkópon.* A sejtek alakját  $360 \times$ -os nagyításban ( $90 \times$ -es objektív és  $4 \times$ -es projekciós lencsével) vizsgáltuk, majd fotótechnikai úton felnagyítva  $900 \times$ -os nagyításban közöltük néhány baktérium-törzs fényképét (1. ábra). Ugyancsak vizsgáltuk Gram-féle festéssel szembeni viselkedésüket, valamint sötétlátóterben aktív mozgásukat. Valamennyi Gram-negatív és mozgóznak bizonyult. Az egyes sejtre vonatkozóan csak a csillangós voltukat vagy csillangó nélküliséget vizsgáltuk (aktív mozgást), míg a csillangók elhelyezkedését csillangófestési eljárással nem vizsgáltuk, mert a régebbi (HARRISON és BARLOW [7]) és újabb (LEIFSON és ERDMAN [14] valamint LEIFSON [13]) vizsgálatok sem találtak fajspecifitást a csillangók számától és elhelyezkedésüktől függően. Gyakran ugyanannak a fajnak két rhizobiumtörzsén más elhelyezkedésű és számú csillangót találtak. Valószínű oka lehet ennek, hogy a csillangófestési eljárással egybekötött fizikai beavatkozás következtében egyik-másik esetben letöredeznek ezek a finom képletek a baktérium testéről. Éppen ezért a további munkánk során tervbe vettük a valamivel finomabb kezelési módot lehetővé tevő elektronmikroszkópiai technika felhasználását erre a célra.



1. ábra

Az egyes baktérium-törzsek mikroszkópi képe. A római számok a származási helyek sorszáma (lásd a táblázatokban)



2. ábra

Az egyes baktérium-törzsek telepei (1 : 1)

## 2. táblázat

## Az egyes rhizobiumtörzsek sejtjeinek jellemző adatai

(1) A baktérium- törzs jelzése	(2) A vegetatív sejt nagysága	(3) Aktív mozgás	(4) Gram- festés	(5) Festett ké- szítményen szembetűnő a nyák- képzés
I/2	$1,5 \times 0,7 \mu$	+	—	
I/6	$1,5 \times 0,7 \mu$	+	—	
IV/3	$0,8-2,3 \times 0,6-0,8 \mu$	+	—	
V/1	$0,8-1,0 \times 0,6-0,8 \mu$	+	—	
VII/2	$2,0-2,2 \times 0,7-0,8 \mu$	+	—	+
VII/3	$2,0-2,1 \times 0,7-0,8 \mu$	+	—	
VII/4	$2,0-2,1 \times 0,7-0,8 \mu$	+	—	
VII/5	$2,0-2,2 \times 0,7-0,8 \mu$	+	—	
VIII/1	$1,8-2,0 \times 0,6-0,7 \mu$	+	—	+
VIII/2	$0,6-0,8 \times 0,3-0,4 \mu$	+	—	+
IX/3	$1,0-1,2 \times 0,6-0,8 \mu$	+	—	
XI/1a	$2,0-2,2 \times 0,7-0,8 \mu$	+	—	
XII/1	$1,8-2,0 \times 0,7-0,8 \mu$	+	—	
XXIII/1	$1,6-1,8 \times 0,6-0,7 \mu$	+	—	+
XXV/1	$0,8-1,0 \times 0,5-0,6 \mu$	+	—	
XXXVII/1	$1,4 \times 0,6 \mu$	+	—	
XXXVII/11	$0,7 \times 0,4 \mu$	+	—	
XXXVII/12	$1,5 \times 0,5 \mu$	+	—	
XXXVIII/6	$0,7 \times 0,4 \mu$	+	—	
XXXVIII/8	$2,3 \times 0,8 \mu$	+	—	
XXXVIII/9	$1,5 \times 0,7 \mu$	+	—	+

A festett baktériumok mikroszkópai vizsgálatakor megállapíthatjuk, hogy nincs mindig szembetűnő különbség a különböző pillangósvirágú növények gyökérgümőiből izolált baktériumok között, vagy még helyesebben az egyes



baktériumsejtek között található morfológiai különbségeket megtaláljuk ugyanabból a pillangósvirágú növényből izolált egyes baktérium-törzsek között is.

Az egyes baktérium-sejtek nagysága, illetve alakja általában igen változó: *hosszúságuk 1,2—2,3 μ közt, szélességük 0,4—0,8 μ között változik* (2. táblázat).

Általában megkülönböztethetünk Micrococcushoz hasonló rövid és tömzsi pálcákat (0,6—1,0 × 0,3—0,4 μ mérettel), ezeknél hosszabb és soványabb pálcikaalakokat (1,4—2,0 × 0,6—0,7 μ vegetatív sejt mérettel) és vastagabb, nagyobb pálcákat (2,3 × 0,8 μ-osokat).

A *baktériumok kolóniái* is igen különböznek nagyságban: 0,5—4,0 mm átmérőt érnek el szilárd *babagar* felületén 72 órás tenyészdő alatt 27° C hőmérsékleten (3. táblázat és 2. ábra). (A vizsgálatokat azért is végeztük babagaron, mert ezt a táptalajt használják fel széles körben rhizobiumok izolálására és szintézisük előállítására.)

3. táblázat

A rhizobium-törzsek növekedése 27 C° hőmérsékleten szilárd táptalajon (babagaron)

(1) A baktériumtörzs jelzése	(2) Szilárd táptalajon a kolónia		(1) A baktérium törzs jelzése	(2) Szilárd táptalajon a kolónia	
	nagysága m/m	alakja		nagysága m/m	alakja
I/2	0,8—2	T—K kerek	XI/1a	1,0—2	kerek
I/6	4,0	T—K kerek	XII/1	1,5—2	kerek
IV/3	1,0—4	kerek	XXIII/1	1,5—3	kerek
V/1	1,0—1,5	kerek	XXV/1	1,0—2	T—K kerek
VII/2	2,0—4	kerek	XXXVII/1	1,4	kerek
VII/3	1,0—1,5	kerek	XXXVII/11	2,0	kerek
VII/4	1,0—2	kerek	XXXVII/12	1,0	kerek
VII/5	1,0—2	kerek	XXXVIII/6	0,8—1,0	kerek
VIII/1	0,5—1,8	kerek	XXXVIII/8	3,0	kerek
VIII/2	1,0—2	kerek	XXXVIII/9	1,3	kerek
IX/3	1,0—2	kerek			

T—K = többé-kevésbé

Növekedése: felületi, Felülete: sima, Megjelenése: fénylő, nyálkás, Magassági fejlődése: magas domború, Széle: sima, épszelű, Színváltozás a táptalajon: nincsen, Konzisztenciája, elkenhetősége, elmozdíthatósága: könnyen (vajszerűen) elkenhető.

Közös jellemzőjük, hogy telepeik többé-kevésbé szabályos köralakúak (ettől csak csekély eltérés lehetséges), pigmentet sohasem képeznek babagaron, növekedésük felületi, megjelenésük fénylő, nyálkás, sima felülettel. Meglehetősen magas domború telepekben nőnek, ép szélekkel. Az összes megvizsgált baktérium-törzs telepe könnyen elmozdítható volt a táptalaj felületről és valamennyi M-teleptípusban növekedett.

Összefoglalás

A rhizobiumok egyes sejtjeire és telepeik morfológiájára igen ellentmondó irodalmi adatokat találunk. Ez oknál fogva célul tűztük ki különböző pillangósvirágú növényekből izolált, fiatal, általában 24—72 órás rhizobiumok

festett készítményeit és szilárd babagar táptalaj felületén nőtt telepeit kísérlet tárgyává tenni.

Az egyes sejtek vizsgálatához a baktériumokat gentiana-ibolyaoldattal 3—5 percig festettük és mikroszkópban nagyságukat megmérve, lefényképeztük őket.

Az egyes baktérium-sejtek nagysága, illetve alakja változó.

Az egyes baktérium-törzsek kolóniái is különböznek nagyságban: 0,5 mm—4,0 mm átmérőt érnek el *szilárd babagar* felületen 72 órás tenyésztési idő alatt 27° C hőmérsékleten.

Közös jellemzőjük, hogy telepeik babagaron szabályos köralakúak, ettől csak csekély eltérés lehetséges, pigmentet sohasem képeznek, növekedésük felületi, megjelenésük fénylő, nyálkás, sima felülettel. Meglehetősen magas domború telepekben nőnek, ép szélekkel. Az összes megvizsgált baktérium-törzs telepe könnyen elmozdítható volt a táptalaj felületén és valamennyi M-teleptípusban növekedett.

*Érkezett: 1962. március 1.*

### I r o d a l o m

- [1] BALLENEGGER, R.: Talajvizsgálati módszerkönyv. Mezőgazd. kiadó. Budapest 1953.
- [2] BEIJERINCK, M. W.: Botan. Ztg. **46.** 749. 1888. cit. LÖHNIS, F. [15].
- [3] BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore. 1957.
- [4] ERIKSSON, J.: Studier öfver Leguminos rotknölnar. Lund. 1874.
- [5] FJODOROV, M. V.: Biologiceszkaja fikszacija azot atmoszfériü. Szelyhozgiz. Moszkva. 1950.
- [6] FRANK, B.: Landw. Jahrb. **19.** 569. 1890 cit. LÖHNIS, F. [15].
- [7] HARRISON, F. C. & BARLOW, B.: Zbl. Bakt. II. Abt. **19.** 426. 1907. cit. LÖHNIS, F. [15].
- [8] HARTLEB, R.: Die Morphologie und systematische Stellung der sogenannten Knöllchenbakterien. Chem. Ztg. **24.** 887—888. 1900.
- [9] HILTNER, L. & STÖRMER, K.: Neue Untersuchungen über die Wurzelknöllchen der Leguminosen und deren Erreger. Arb. biol. Abt. kais. Gesundh.-Amts.
- [10] KERPELY, A., MANNINGER, E. & ZÁMORY, É.: Adatok hazai rhizobiumtörzsek teljesítőképességének elbírálásához. OMMI évk. **4.** 263—275. 1956—1957.
- [11] KLEIN, E.: J. Pathol. Bacteriol. **2.** 205—213. 1893. cit. LÖHNIS, F. [15].
- [12] KRASZILNYIKOV, N. A.: Opredelitely bakterij i aktinomictov. Izd. AN SSSR. Moszkva. 1949.
- [13] LEIFSON, E.: Atlas of Bacterial Flagellation. Acad. Press. New York. 1960.
- [14] LEIFSON, E. & ERDMAN, L. W.: Flagellar Characteristics of Rhizobium Species. Ant. Leewenhoek J. Bact. **24.** 97—110. 1958.
- [15] LÖHNIS, F.: Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie. Bornträger. Berlin. 1910.
- [16] MIGULA, W.: System der Bakterien. Jena. 1900.
- [17] ROSSI, G.: Zbl. Bakt. II. Abt. **18.** 289. 1907. cit. LÖHNIS, F. [15].
- [18] SIMON, J.: Jahresber. Ver. angew. Botanik. **5.** 140. 1907. cit. LÖHNIS, F. [15].
- [19] TOPLEY Y. & WILSON, Y.: The Principles of Bacteriology and Immunity. IV. Ed. Arnold. London. 1955.



## Морфология клубеньковых бактерий выращенных на бобово-агаровом питательном субстрате

Э. МАННИНГЕР

Научно-исследовательский институт почвоведения и агрохимии АН Венгрии, Будапешт

### Резюме

Морфология бактерий играет большую роль при определении их места в классификации. В литературе по вопросу морфологии клубеньковых бактерий отмечается много противоречивых данных об отдельных клетках, о массе клеток и о колонии этих микроорганизмов. Этот факт мешает определению этих бактерий и часто приводит к тому, что их часто смешивают с другими видами бактерий.

Нами были изучены 24—72 часовые, окрашенные препараты бактерий, изолированные из разных бобовых растений, и их колонии, выращенные на твердом бобово-агаровом питательном субстрате.

Выделение бактерий из клубеньков некоторых бобовых растений производили новым методом. Сущность этого метода заключается в том, что внешнюю поверхность клубенька прокалывали стерильной иглой и переносили микроорганизмы на питательную среду.

Для изучения отдельных клеток бактерий в течение 3—5 минут окрашивали их гентриано-фиолетовым раствором, измеряли под микроскопом и фотографировали (фотография 1—10, табл. 2).

Величина и форма отдельных клеток бактерий разная (табл. 2).

Колонии отдельных бактерий так же различаются друг от друга. За 72 часа, при температуре 27° С, при выращивании на твердом бобово-агаровом субстрате они достигают размера в диаметре 0,5—0,4 мм. (фото 11—20, табл. 3).

Характерно, что колонии на бобово-агаровом питательном субстрате имеют округлую форму, иногда с минимальными отклонениями, не образуют пигмента, рост их поверхностный, представляют собой блестящие слизистые глазки с гладкой поверхностью. Они растут на довольно высоких, выпуклых холмиках, имеют цельные края. Все изученные штаммы бактерий можно было легко передвинуть по поверхности питательного субстрата и все они росли в колонии типа -М.

*Табл. 1.* Место взятия бактерий, изолированных из разных растений. (1) Количество и место обитание бактерий. (2) Число связности почвы по Арань. (3) Гидролитическая кислотность. (4) Содержание углекислой извести в %. (5) Генетические типы а почвы: а) иллиммеризованная бурая лесная почва на лёссовидном песке, в) бурая лесная почва, окультуренная, с) иллиммеризованная бурая лесная почва на лёссовидном песке, d) черноземовидная лесная почва на песке, е) черноземовидная лесная почва на песке, f) глинистая луговая почва, g) псевдомицелярный чернозем, h) слабо развитая иллиммеризованная бурая лесная почва на лёссе. (6) Бобовые растения из которых выделяли бактерии.

*Табл. 2.* Характерные данные клеток штаммов клубеньковых бактерий. (1) Обозначение штаммов бактерий. (2) Размер вегетативной клетки (3) Активное движение. (4) Окрашивание по Граму. (6) На окрашенных препаратах наблюдается образование слизи.

*Табл. 3.* Рост штаммов клубеньковых бактерий, выращенного на поверхности бобово-агарового субстрата. (1) Штаммы бактерий. (2) Величина и форма колоний, выращенных на твердом питательном субстрате (колония 1 : 1). Рост-поверхностный. Поверхность-гладкая. Проявление-блестящее, слизистое. Рост в высоту-высокий, выпуклый, край-цельный. Изменение окраски на питательном субстрате-нет. Консистенция-легко смазывается.

*Рис. 1.* Вид под микроскопом штамма бактерий. (Римские цифры обозначают номер штамма бактерий. см. Таблицы.)

*Рис. 2.* Форма колоний отдельных штаммов бактерий.

## Die Morphologie der auf Bohnen-Nährboden gezüchtete Rhizobien

E. MANNINGER

Forschungsinstitut für Bodenkunde und Agrikulturchemie der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest

### Zusammenfassung

Wichtig ist für die Klassifizierung der Bakterien ihre Morphologie. Die grosse Zahl der Literatur, die sich mit der Morphologie der Rhizobien befasst, enthält widersprechende Angaben so in Bezug auf die einzelnen Zellen, wie auch auf die Kolonien. Wegen dieser Tatsache kann man diese Bakterien ungewiss identifizieren und es besteht die Möglichkeit, diese Bakterienarten mit anderen zu verwechseln.

Wir untersuchten darum die auf der Oberfläche des Bohnen-Nährbodens gezüchteten Kolonien und einzelne Zellen der Rhizobien. Die überprüften Rhizobien-Stämme wurden aus Wurzelknöllchen der Pflanzen verschiedener Standorte isoliert. Ihre Identifizierung erfolgte auf Grund ihrer biochemischen Merkmale und mit Hilfe von Gefässversuchen (Knöllchenbildung und Stickstoffbindung).

Wir isolierten die von den einzelnen Leguminosen stammenden Rhizobien mit einer bisher noch nicht empfohlener Methode. Das Wesen der bisherigen Methoden lag darin, dass man die Oberfläche der Knöllchen abspült und nachher die Knöllchen zerdrückt. Die so gewonnene Flüssigkeit wird mit einer Platinöse auf den Nährboden gebracht. Das Wesen der von uns angewandten Methode besteht darin, dass nach dem Abflammen der Oberfläche der Knöllchen, mit Hilfe einer steriler Nadel vom Inneren der Knöllchen die Bakterien auf den Nährboden bringt.

Zur mikroskopischen Untersuchungen der einzelnen Zellen wurden diese mit Gentianaviolette 3—5 Minuten lang gefärbt, dann ihre Grösse gemessen und photographiert.

Rhizobien-Bakterien sind Stäbchen, welche in ihrem morphologischen Verhalten Differenzen aufweisen (Tabelle 2). Auch die Kolonien der einzelnen Bakterien-Stämme sind von verschiedener Grösse: sie haben einen Durchmesser von 0,5—4,0 mm nach 72-stündiger Bebrütung bei 27° C auf Bohnennähragar (Tabelle 3). Die gemeinschaftlichen Merkmale der Kolonien sind auf den oben genannten Nährboden: sie wachsen rund, von dem nur wenig Abweichung möglich ist. Farbstoffbildung erfolgt niemals. Die Rhizobien besitzen glänzende, glattrandige Kolonien in Form von Schleimtropfen. Sie sind von der Oberfläche des Nährbodens leicht zu trennen und wachsen in M-Form.

*Tabelle 1.* Einige Angaben der Standorte von verschiedenen Leguminosen isolierten Rhizobien-Bakterien. — (1) Die Nummer und der Standort der Bakterien (der Pflanzen) — (2) Zahl nach Arany. — (3) Hydrolitische Azidität — (4) Kalkgehalt in % — (5) Bodentypen: a) Brauner Waldboden, mit eingewaschtem Ton. b) Schon längere Zeit landwirtschaftlich bearbeiteter brauner Waldboden c) Tschernozeembrauner Waldboden auf Sand — (d) Wiesenboden e) Tschernozem mit Kalküberzug (6) Leguminosen, von deren die Bakterien stammen.

*Tabelle 2.* Charakteristische Angaben der einzelnen Zellen der Rhizobien-Stämme. (1) Die Bakterien-Stämme. (2) Die Grösse der Bakterien Zellen (3) Beweglichkeit (4) Färbbarkeit nach Gram (5) Schleimbildung.

*Tabelle 3.* Das Wachstum der Rhizobien-Stämme auf festem Nährboden bei 27° C — (1) Bakterien-Stämme — (2) Kolonien auf festem Nährboden. Grösse in mm und Form (1 : 1) — Wachstum: oberflächlich, Oberfläche: glatt. Erscheinung: glänzend, schleimig. Wachstum: hoch, konvex. Rand: glattrandig. Farbstoffbildung auf dem Nährboden: negativ. Konsistenz: leicht vom Nährboden trennbar.

*Abb. 1.* Das mikroskopische Bild der einzelnen Bakterien-Stämme. Die römischen Zahlen sind die Nummern der Standorte (S. Tabellen).

*Abb. 2.* Die Kolonien der einzelnen Bakterien-Stämme.