

A borsó és bükköny gyökérgumóiból izolált nagy nitrogénkötő képességgel rendelkező rhizobium-törzsek fiziológiai sajátosságai

L. NITÁ

Központi Baktériumtrágya Állomás, Bukarest

Az előző dolgozatunkból ismert [6], hogy a borsó és bükköny rhizobium-törzsei különböző teljesítőképességgel rendelkeznek. Hasonló eredményekről számolnak be LOPATINA [5], LAZAREVA [4], BERJOZOVA és REMPE [1], FJODOROV és HLAVAČKOVA [2], FJODOROV és LÁSZLÓ [3], THORNTON [8], NUTMAN [7] és mások. Jóllehet a rhizobium-törzsek teljesítőképessége minden valószínűség szerint szoros kapcsolatban van azok fiziológiai sajátosságaival, azonban a különböző törzsek részletesebb fiziológiai jellemzésével kapcsolatban nincsenek adatok. Ebből kiindulva, célul tűztük magunk elé a borsó és bükköny gumóiból kiválasztott rhizobium-törzsek fiziológiai sajátosságainak tanulmányozását.

Kísérleti rész

A különböző aktivitással rendelkező rhizobium-törzsek között fennálló fiziológiai eltérések kimutatása céljából mesterséges táptalajon meghatároztuk a sejtanyag szintézisének gyorsaságát, valamint a légzés folyamatában résztvevő enzimek aktivitását. A sejtanyag szintézis gyorsaságával kapcsolatos kísérleteket különböző szén és nitrogénforrásokat tartalmazó táptalajokon végeztük. A C : N arányt 20 : 1 arányban állítottuk be. Szénforrásként egyes szénhidrátokat, alkoholokat és szerves savakat használtunk fel. Ezeket 0,1 M koncentrációban vittük be a táptalajba. Nitrogénforrás céljára nátrium nitrátot és ammonium kloridot alkalmaztunk. A táptalaj pH-jának állandóságát Sørensen-féle foszfát pufferrel biztosítottuk. Az inkubációt 500 ml táptalajt tartalmazó lombikokban végeztük, melyeket a vizsgált törzsek egyenlő mennyiségű sejtet tartalmazó 2 ml sejt szuszpenziójával oltottunk be. A beoltott lombikokat 80 napon át 28° C-os termosztátban inkubáltuk. A kísérlet befejezése után a baktérium sejteket 3500—4000 fordulatszámú centrifuga segítségével választottuk el a táptalajtól, majd Kjeldahl módszerével meghatároztuk a fehérje és nem fehérje nitrogén mennyiségét. A visszamaradó cukrot Bertrand módszerével mutattuk ki. A kísérlet eredményei az 1. táblázatban láthatók.

A táblázatból kielemezhető, hogy a különböző szén- és nitrogénforrásokon tenyésztett rhizobium-törzsek különböző mennyiségben szintetizálnak sejtanyagot. Az aktív nitrogénkötők laboratóriumi viszonyok között is intenzíven fejlődnek, több nitrogént tartalmaznak mint a kevésbé aktívak és a fehérje nitrogénnek az össznitrogénhez viszonyított aránya is jobb a jó teljesítőképességű törzsekénél. A fenti megfigyelések alapján feltételezhető, hogy az aktív nitrogénkötő rhizobium-törzseknel az energiaforrás oxidációjában résztvevő enzimrendszerek

1. táblázat

A borsó és búkköny rhizobium-törzsei által szintetizált sejtanyag mennyisége különböző C és N forrásokon

(1) A törzs száma	(2) Nitrogénforrás NaNO ₃				(3) Nitrogénforrás NH ₄ Cl			
	(4) A baktériumok szárazanyag súlya mg/l g szénforrás	(5) A fehérje és nem fehérje N mg/l g baktériumsúly			(4) A baktériumok szárazanyag súlya mg/l g szénforrás	(5) A fehérje és nem fehérje N mg/l g baktériumsúly		
		fehérje N	nem fehérje N	a fehérje N aránya a nem fehérje N-hez		fehérje N	nem fehérje N	a fehérje N aránya a nem fehérje N-hez
S z a h a r ó z								
248	12,8	14,43	2,12	6,80	12,1	13,38	2,34	5,74
13	14,5	15,25	1,97	7,77	13,5	14,84	2,16	6,85
32	15,6	13,39	1,81	7,40	12,9	13,81	2,11	6,86
33	13,7	11,67	1,74	6,72	11,5	12,88	2,28	5,67
134	14,5	13,18	1,82	7,24	11,1	13,37	2,16	6,20
G l u k ó z								
248	12,6	13,14	1,96	6,72	11,6	12,48	2,14	5,80
13	14,1	13,99	1,89	7,44	13,0	13,32	2,00	6,67
32	14,6	11,80	1,70	6,97	12,3	12,35	1,85	6,70
33	11,8	11,12	1,68	6,62	10,7	11,76	1,96	6,00
134	13,5	11,33	1,67	6,80	11,8	12,08	1,92	6,30
M a l t ó z								
248	11,2	8,88	1,34	6,63	10,7	8,52	1,68	5,00
13	12,8	10,07	1,43	7,02	11,6	9,63	1,67	5,77
32	12,3	10,55	1,55	6,80	11,8	8,77	1,53	5,76
33	10,6	7,42	1,44	5,85	10,2	7,62	1,58	4,84
134	11,0	8,70	1,40	6,24	11,3	8,36	1,64	5,10
G a l a k t ó z								
248	11,7	11,51	1,69	6,80	10,8	10,74	1,93	5,67
13	13,6	12,80	1,82	7,20	12,3	12,27	1,94	6,32
32	12,8	11,54	1,66	6,94	12,8	11,82	2,93	6,14
33	11,3	10,78	1,72	6,28	10,5	10,38	2,00	5,20
134	11,7	11,01	1,69	6,52	11,4	11,11	1,99	5,60

működése gyorsabb és nagyobb határfokkal tudják felhasználni az eloxidálódó energiaforrásokat, mint a kevésbé aktívak.

Az eredmények azt mutatják, hogy a szén- és nitrogénforrások jelentős mértékben befolyásolják a baktériumok testének összetételét, de fontos szerepe van az élő szervezet természetének is, mivel az döntő mértékben határozza meg egyik, vagy másik nitrogén, vagy szénforrás értékesítését, amely az egyes törzseknél különböző gyorsasággal megy végbe. Ide kell számítani továbbá, hogy a jó teljesítőképességű törzseknél a sejtek protoplazmája sokkal aktívabb állapotban van, mint a gyenge nitrogénkötő organizmusok esetében, mivel az előbbieknél a sejt anyagának összetételében nagyobb mennyiségben vesznek részt a fehérje anyagok. Ilyen esetben, mivel a protoplazma az összes szükséges enzimeket tartalmazza, megvan a lehetőség nemcsak az életfolyamatok

intenzív folyására, hanem arra is, hogy a szervezet gazdaságosabban használja fel az energiaforrást az oxidációs folyamatok során. Az energiaforrás nagyobb hatásokkal történő felhasználása viszont azt eredményezi, hogy a szervezet több nitrogént igényel, ami pedig a nitrogénkötés folyamatát fokozza.

Mivel az energiaforrás eloxidálása a légzés folyamatában történik, vizsgálatunk további részében tanulmányoztuk a borsó és bükköny gumóiból izolált rhizobiumok dehidráz és oxidáz rendszerének aktivitását.

A dehidráz rendszer aktivitásának tanulmányozása céljából a baktériumokat glukóz tartalmú szintetikus táptalajon szaporítottuk el. A kétnapos tenyészetet steril vízzel mostuk le kémcsövekben levő ferde agarról és meghatározott sejtszámot (5 milliárd/ml) tartalmazó szuszpenziót készítettünk. A dehidráz aktivitás meghatározására szolgáló Tunberg-csővekbe 20 ml 0,1 M koncentrációjú hidrogén donátort tartalmazó oldatot, 2 ml pH 6,9-es Sörensen-féle foszfátpuffert és 1 ml sejt-suszpenziót vittünk. Az aktivált hidrogén akceptoraként metilénkéket alkalmaztunk. A csövekből kiszivattyúztuk a levegőt és a dehidráz rendszer aktivitását a metilénkék elszíntelenedési gyorsaságából állapítottuk meg.

A kísérlet eredményeiből látható, hogy a dehidráz aktivitás az egyes rhizobium-törzseknél lényegesen különbözik egymástól (2. táblázat). Az aktív törzsek jelentősen rövidebb idő alatt képesek a metilénkéket tartalmazó oldatot elszínteleníteni, mint a kevésbé aktívak, mivel az előbbieknél az elszíntelenedés jóval előbb megkezdődik, tehát a jó teljesítőképességű törzsek sokkal aktívabb dehidráz rendszerrel rendelkeznek, mint a gyengébbek. Ugyanakkor érdemes megemlíteni, hogy a különböző energia források gyakorlatilag egyforma eredményeket adtak. A nitrogénkötő képesség, valamint a dehidráz aktivitás közötti párhuzamosságnak igen fontos gyakorlati jelentősége van, mivel lehetővé teszi a különböző rhizobium-törzsek előzetes értékelését. Ugyanis az aktív törzsek kiválasztásánál a hosszú és körülményes tenyészedenyvkísérleteket bizonyos fokig helyettesítheti a dehidráz aktivitás meghatározása.

A dehidráz rendszer aktivitásának és a sejtanyag szintézisének párhuzamosága rendkívül érdekes és minden valószínűség szerint azzal van kapcsolatban, hogy az oxidálható anyagból a dehidráz rendszer által aktivált hidrogén nemcsak a sejtanyag szintézise céljára szolgál energiaként, hanem a nitrogénkötés elsődleges termékeinek aminosavakig és fehérjevegyületekig történő redukációjához is biztosítja az energiát.

Munkánk további részében azt tanulmányoztuk, hogy milyen intenzitással képesek a különböző rhizobium-törzsek a molekuláris oxigént felhasználni. A vizsgálat céljára a baktériumokat nátrium-nitrát nitrogénforrást tartalmazó szintetikus táptalajon szaporítottuk el. A kétnapos tenyészetek sejtjeiből sűrű

2. táblázat

A borsó és bükköny rhizobium baktériumtörzsek dehidráz aktivitása
(A metilénkék elszíntelenedési ideje órákban van kifejezve)

H donátor	Rhizobium-törzsek				
	248	13	32	33	134
Glukóz	4	3	1,5	4	2,5
Maltóz	11	8	8	11	10
Laktóz	4	3	2	4	3
Mannit	6	4	5	8	6
Galaktóz	7	6	5	9	7
Glicerín	9	6	6	10	8
Tejsav	11	8	7	14	9
Citromsav	25	20	16	24	19
Borostyánkősav ..	12	8	7	12	10
Almasav	8	6	6	10	8
Borkősav	12	8	6	14	10
Ecetsav	14	10	10	16	12

szuszpenziót készítettünk, melynek 1 ml-e 5 milliárd sejtet tartalmazott. A sejt-légzést Warburg manometrikus módszerével határoztuk meg. Az egyes Warburg-edényekbe 2 ml sejtuszuszpenziót és 3 ml 0,1 M glukóz oldatot pipettáztunk. Az oxigén fogyasztást 4 órán át mértük a Warburg készülék 30° C-os hőmérsékletre felállított vízfürdőjében.

3. táblázat
A molekuláris oxigén elnyelésének aktivitása a rhizobium baktériumoknál

(1)		(2)		
		Az elnyelt O ₂ 4 óra alatt mm ³ -ben		
Törzsek		az egyes edényekben	közép-érték	az eredeti törzsek %-ban
a) A borsó rhizobium törzsei	13	87,8	88,6	247,0
		89,4		
	248	32,4 38,6	35,5	100,0
b) A bükköny rhizobium törzsei	32	95,3	97,6	175,0
		99,9		
	33	42,3 42,7	42,5	76,6
	134	54,0 57,0	55,5	100,0

A kísérlet adatai (3. táblázat) azt mutatták, hogy a különböző törzsek légzési aktivitása távolról sem egyforma. Azok a törzsek, melyek a pillangósvirágú növényekkel szimbiózisban legaktívabbak, nagyobb mennyiségű oxigént nyelnek el, mint a kevésbé aktívak. Ebből a szempontból az oxidáz enzimek a dehidráz rendszerhez hasonlóan viselkednek. Valószínű, hogy a jó teljesítőképességű törzseknél az egész enzimszisztem aktívabb állapotban van és a sejtek élettevékenysége ezeknél magasabb színvonalon megy végbe. Abból, hogy ezek gazdaságosabban használják fel a szénforrásokat a sejtanyag szintézise céljából, mint a kevésbé aktív szervezetek, az feltételezhető, hogy az előbbieket magasabb nitro-

génkötő képessége kapcsolatban van azokkal az enzimekkel, melyek részt vesznek a sejtekben végbemenő energetikai folyamatokban.

A fenti adatokból látható, hogy azok a rhizobium-törzsek, melyek a gumókban aktívan kötik meg a légköri nitrogént nemcsak abban különböznek a kevésbé aktív törzsektől, hogy gazdaságosabban használják fel a szénforrást a sejtanyag szintézisének, hanem a légzés folyamatában résztvevő dehidráz és oxidáz rendszer is jóval aktívabb az előbbinél.

A fenti vizsgálatokat a moszkvai Timirjavez Mezőgazdasági Akadémia Mikrobiológiai Tanszékén M. V. Fjodorov akadémikus irányítása alatt végeztük.

Összefoglalás

A borsó és bükköny különböző nitrogénkötő képességgel rendelkező rhizobium baktériumai egyes laboratóriumi körülmények között általunk meghatározott fiziológiai sajátosságokban különböznek egymástól.

A különböző szén- és nitrogénforrásokat tartalmazó szintetikus táptalajokra oltott rhizobium-törzsek nem egyformán szaporodnak. A jó teljesítőképességű törzsek különböznek a kevésbé aktívaktól az általuk szintetizált sejtanyag tömegében, valamint annak összetételében, illetve a fehérje és nem fehérje nitrogén arányában. A magasabb fehérjetartalommal rendelkező törzsek sejtjeinek protoplazmája aktívabb, gyorsabban oxidálják az energiaforrást és gazdaságosabban használják fel az oxidációs folyamatokban felszabaduló energiát.

A légköri nitrogén gumókban történő megkötésének intenzitása, valamint a dehidráz és oxidáz rendszer aktivitása között párhuzamosságot sikerült

kimutatni. Ez a megfigyelés, valamint a baktériumok sejtanyagának szintézisével kapcsolatos megállapításunk lehetővé teszi, hogy előzetes szelekciót végezzünk a különböző teljesítő képességű rhizobium-törzsek között, tenyészedény kísérlet beállítása nélkül. Azonban végleges értékelést csak olyan tenyészedénykísérletek adhatnak, melyeknél meghatározzuk a különböző törzsek által megkötött nitrogén mennyiségét.

Érkezett : 1963. július 12.

Irodalom

- [1] BERJOZOVA, E. F. & REMPE, E. H.: Metodika issledovanija klubenkovüh bakterij v kornevoj sziszteme bobovüh rasztenij. Mikrobiologija **21**. 416—422. 1952.
- [2] FJODOROV, M. V. & HLAVACKOVA, E.: Azotfixirujucsaja aktivnoszt' klubenkovüh bakterij lucernü. Izv. TSzHA (1) 61—78. 1956.
- [3] FJODOROV, M. V. & LÁSZLÓ, Gy.: Azotfixirujucsaja aktivnoszt' klubenkovüh bakterij goroha i viki v klubenkah v raznüe fazü razvitija bobovogo rasztenija. Izv. TSzHA (2) 61—82. 1956.
- [4] LAZAREVA, N. M.: Izmenenie aktivnoszti klubenkovüh bakterij v zaviszimoszti ot vozraszta i fazü vegetacii bobovogo rasztenija. Tr. Vsesz. Inszt. sz/h Mikrobiologii. **12**. 1951.
- [5] LOPATINA, G. V.: Effektivnoszt' inokulacii bobovüh v zaviszimoszti ot fazü razvitii rasztenij. Tr. Vsesz. Inszt. sz/h Mikrobiologii. **12**. 103. 1951.
- [6] NITA, L.: A borsó és bükköny gyökérgumóiban élő baktériumok nitrogénkötő aktivitása, valamint a nitrogén felhalmozódásának dinamikája a növényben. Agrokémia és Talajtan. **12**. 647—654. 1963.
- [7] NUTMAN, P.: Variation within strains of clover nodule bacteria in the size of nodule produced and in the „effectivity” of the symbiosis. J. Bact. **51**. 411—432. 1946.
- [8] THORNTON, H.: Effective and ineffective strains of legume nodule bacteria. Nature **160**. (3970) 654. 1945.

Физиологические особенности разных штаммов клубеньковых бактерий гороха и вики, обладающими резкой азотофиксирующей активностью

Л. НИЦЭ

Централная станция по бактериальным удобрениям, Бухарест
(Румыния)

Резюме

1. Штаммы клубеньковых бактерий гороха и вики, обладающие различной азотофиксирующей активностью в клубеньках этих растений, отличаются друг от друга рядом физиологических особенностей, определяемых в лабораторных условиях.

2. При развитии разных штаммов клубеньковых бактерий на синтетической питательной среде, в состав которой входят различные источники азота и углерода, сильные азотофиксирующие штаммы бактерий отличаются от слабых по продукции синтезируемых ими клеточных веществ, и в составе его содержится больше белка. Такие клетки, в которых содержание белка больше, отличаются более активной протоплазмой, и содержащиеся в ней ферменты быстрее окисляют энергетическое вещество и полнее используют в процессах синтеза биологически полезную энергию, освобождающуюся в окислительных процессах.

3. Полученные данные позволяют отделить более активные штаммы от менее активных и таким образом, получить предварительные результаты в определении их азотофиксирующей активности. Установленная параллельность между активностью фиксации молекулярного азота в клубеньках и активностью оксидаз и дегидраз в клетках клубеньковых бактерий гороха и вики, а так же и продуктивности синтеза клеточного вещества, дает возможность для предварительной оценки их азотофиксирующей активности, а вегетационные опыты, в которых определяются количества фиксированного ими азота, должны дать окончательную оценку.

Табл. 1. Продуктивность синтеза клеточного вещества у клубеньковых бактерий гороха и вики при их росте на различных источниках углерода и азота. (1) Штаммы. (2) Источник азота NaNO_3 . (3) Источник азота $\text{N}_{\text{H}_4\text{Cl}}$. (4) Сухая масса бактерий в мг. на 1 гр. использованного источника углерода. (5) Белковый и небелковый азот в мг. на 1 гр. бактериальной массы и отношение белкового азота к небелковому.

Табл. 2. Активность дегидраз у клубеньковых бактерий гороха и вики. (промежутков времени до конца восстановления метиленовой синью в часах).

Табл. 3. Активность поглощения молекулярного кислорода разными штаммами клубеньковых бактерий. (1) Штаммы: а) бактерии гороха, в) бактерии вики. (2) Потребление молекулярного кислорода за 4 часа опыта в мм^3 . (3) В отдельных сосудах. (4) В среднем. (5) В % от исходных штаммов.

Propriétés physiologiques des races de Rhizobium à grand pouvoir fixateur d'azote isolée des nodosités du pois et de la vesce

L. NITA

Station Centrale pour les Engrais de Bactéries, Bucarest (Roumanie)

Résumé

Les races de Rhizobium du pois et de la vesce à pouvoir de fixer l'azote différent se distinguent les unes des autres par des propriétés physiologiques déterminées par nous dans certaines conditions de laboratoire.

Les races de Rhizobium inoculées sur les milieux nutritifs synthétiques contenant diverses sources de carbone et d'azote ne se propagent pas uniformément. Les races à bon rendement diffèrent de celles, moins actives, par la quantité de la matière cellulaire synthétisée par elles et par sa constitution, c'est-à-dire par le rapport de l'azote protéinique et non protéinique. Le protoplasme des cellules des races à plus haute teneur en protéines est plus actif, oxyde plus rapidement la source d'énergie et utilise plus économiquement l'énergie libérée par les processus d'oxydation.

Nous avons réussi à démontrer une corrélation entre l'intensité de la fixation de l'azote atmosphérique dans les nodosités et l'activité du système oxydases-déshydrases. Cette observation ainsi que notre constatation concernant la synthèse de la matière cellulaire des bactéries, rendant possible de procéder à une sélection préalable entre les races de rhizobium à différents rendements, sans être obligés à recourir à des expériences en pots. Mais une évaluation définitive ne peut être obtenue que par des expériences en pots dans lesquelles nous avons déterminé la quantité d'azote fixée par les diverses races.

Nous avons exécuté ces recherches à la Chaire de Microbiologie de l'Académie Agronomique Timirjazev à Moscou sous la direction de l'Académicien M. V. Fjodorov.

Tableau 1. Quantité de la matière cellulaire synthétisée par les races de Rhizobium du pois et de la vesce sur diverses sources de C et N. (1) No-s des races. (2) Source d'azote NaNO_3 . (3) Source d'azote NH_4Cl . (4) Poids sec des bactéries en mg rapporté à 1 g de la source de carbone. (5) Azote protéinique et non protéinique mg/1g de bactérie et le rapport entre eux.

Tableau 2. Activité de déshydrogénation des bactéries du pois et du vesce (temps de la décoloration du bleu de méthylène en heures).

Tableau 3. Activité de l'adsorption de l'oxygène moléculaire par les bactéries de Rhizobium. (1) Races: a) Races du Rhizobium du pois, b) races du Rhizobium de la vesce. (2) Oxygène adsorbé en quatre heures mm^3 . (3) Dans les divers pots. (4) Moyenne. (5) En pour-cent des races originales.