

Az acetilénredukciós teszt alkalmazása a biológiai nitrogénkötés tanulmányozásában

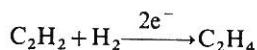
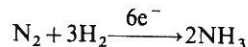
A HARDY és KNIGHT által 1967-ben leírt acetilénredukciós módszer [12] sokrétű alkalmazását bizonyítja az a tény, hogy HARDY, BURNS és HOLSTEN 1973-ban megjelent összefoglalója [13] már 200 cikken alapult. Az azóta eltelt 10 év a cikkek számának exponenciális növekedését eredményezte. A módszer felhasználási területe a nitrogenáz biokémiai vizsgálatától a N₂-kötő organizmusok, pillangós és nem pillangós szimbioták élettanának tanulmányozásán, a talajban, élővizekben, rizoszférában, filloszférában, sőt az emlősök emésztőrendszerében végzett laboratóriumi elemzéseken át a szabadföldi mérésekig terjed.

A módszer elméleti alapjai

Az acetilén gátolja a nitrogenáz-enzimrendszer N₂-kötését, ugyanakkor a nitrogenáz képes az acetilént etilénné redukálni. A képződött termék gázkromatográfiásan meghatározható [12]. Az acetilén gátló hatását SCHÖLLHORN és BURRIS 1966-ban [32], az acetilén-etilén redukciót ugyanabban az évben DILWORTH [8] írta le. A redukció jellemzői: a nitrogenáz katalizálta acetilénredukció egyetlen terméke az etilén — gázkromatográfiás, tömegspektrometriás és infravörös spektrometriás mérések szerint egyaránt. A reakció sztereospecifikus, csak *cis*-1,2-dideuteroetilén keletkezik a nehézvízben (D₂O) végrehajtott telítés során. Az etilén nem inhibitora a N₂-kötésnek, és a nitrogenáz nem redukálja tovább. A nitrogenáz katalitikus hatását csak anaerob körülmények között és megfelelő mennyiségű ATP jelenlétében tudja kifejteni. A nitrogenáz nem a teljes ATP

mennyiséget fordítja NH₃ képzésére, hanem egy részéből a H⁺-ionok hidrogéngázzá redukálásának energiaigényét fedezi.

Megállapították, hogy mind a N₂, mind a C₂H₂ redukálásért ugyanez az enzimerendszer felelős, de feltehetően eltérő mechanizmussal folyik a reakció [22, 24]. Ennek ellenére az acetilénredukciós módszerrel mért adat is alkalmas a N₂-kötés abszolút értékének meghatározására, ami pl. nitrogénmérleg számításánál lehet szükséges. Ehhez ismerni kell az átszámítási arányt. Az elméleti 3:1 arány az alábbi reakcióegyenletek alapján adódik.



A kísérleti úton kapott átszámítási tényezők széles intervallumban mozognak (2,3—6,9) (1. táblázat), ami arra mutat, hogy csak kellő mérlegelés alapján szabad átszámított értékeket használni.

Célszerű az acetilénredukciós aktivitás (az időegység alatt keletkezett C₂H₄ mólok száma) alkalmazása, mely objektíven tükrözi a nitrogénkötés mértékét, és átszámítási hibával sem terhelt.

Az acetilénredukciós eljárás előnyei: az ¹⁵N-módszernél 10³—10⁴-szer, a Kjeldahl-módszernél 10⁶—10⁷-szer érzékenyebb; egyszerű és gyors az analízis; nem igényel különleges mintaelőkészítést, gázkromatográfiásan nagy pontossággal határozható meg a reakciótermék, az etilén, mivel az acetilén belső standardként felhasználható; az etilén tárolás során nem bomlik; *in situ* mérések is kivitelez-

hetők hordozható műszer segítségével; a biológiai minta tartósítható, az aktivitás időbeli változása is nyomon követhető.

Hátránya a mérés során használatos gázok kvantitatív kezelésének igénye. Reprezentatív mintákat kell biztosítani, különösen talaj- és vízminták esetén fontos ez a baktériumpo-

terjedő intervallumban mozog a maximum helye, a vizsgált szervezettől függően [6, 26].

2. Fény — Fotoszintetizáló szervezetek számára a fény lényeges a N_2 -kötéshez. A fényintenzitás hatását vizsgálva megállapították, hogy az *Anabaena cylindrica* akciós spektruma megfelel a klorofill abszorpciós

1. táblázat

 C_2H_4/N_2 átszámítási tényezők N_2 -kötő rendszerekben

Vizsgált rendszer	Átszámítási tényező	Irodalmi hivatkozás
Nitrogénázpreparátum		
<i>Azotobacter vinelandii</i>	4,0	[15]
<i>Clostridium</i>	4,4	[8]
N_2 -kötő szervezetek		
Baktériumok		
<i>Azotobacter</i>	6,0	[2]
<i>Azotobacter</i>	3,8	[15]
<i>Klebsiella</i>	3,0	[2]
Algák		
<i>Anabaena cylindrica</i>	2,8	[37]
<i>Anabaena flos-aquae</i>	3,2	[37]
<i>Nostoc muscorum</i>	3,6	[37]
Pillangósok		
<i>Glycine max.</i>	6,6	[2]
<i>Glycine max.</i> ($p_{O_2} = 0,7$ atm)	3,0	[2]
<i>Glycine max.</i> ($p_{O_2} = 0,2$ atm)	6,2	[2]
<i>Glycine max.</i>	2,3	[17]
<i>Pisum arvense</i>	2,6	[28]
Talaj		
Ugar	6,9	[39]
Öntözött gyepek	4,2	[39]
Természetes növényzet	4,1	[39]
Búzaföld	4,3	[39]
Aerob talaj	3,0	[30]
Vízzel átitatott talaj	3,0	[30]

pulációk nagy változékonysága miatt. A minta mérése során a természetes hőmérsékleti, fény-, p_{O_2} - és nedvességviszonyokat kell reprodukálni, hogy valós értékek adódjanak. Emiatt ismernünk kell az acetilénredukciót befolyásoló tényezőket.

Az acetilénredukciót befolyásoló tényezők

1. Hőmérséklet — A hőmérséklet függvényében maximum görbe szerint változik az aktivitás. Általában a 20–30 °C-ig

spektrumának [10]. A napsugárzás hatását is megmérték, pillangósoknál [3, 15] és nem pillangósoknál egyaránt [43]. Azt találták, hogy az acetilénredukciós aktivitás egy napon belül változik, s maximuma dél körül van. Gümös növények sötét helyen tárolva 12–14 óra alatt vesztik el aktivitásukat. A csökkenés az alacsony cukortartalommal hozható kapcsolatba [15, 43, 44]. A levágtott gümők 5 óra alatt eredeti aktivitásuk 90%-át elvesztik. Glükóz valamint dikarbonsavak gümöbe juttatásával a kiindulási aktivitás megnövelhető, és több órán át fenntartható [20].

3. *Az oxigén parciális nyomása* — A nitrogén csak anaerob körülmények között aktív, ha oxigén éri irreverzibilisen inaktiválódik. Az aerob nitrogénkötő szervezetek a N_2 -kötéshez aerob, míg az anaerob szervezetek anaerob feltételeket igényelnek. A pillangósok gümői aerob körülmények között aktívak, a nitrogén oxigén elleni védelmét a leghemoglobin biztosítja [1]. Az acetilén telítési koncentrációja teljesen megszünteti a nitrogén H_2 -termelését, míg a N_2 telítési koncentrációja csak 75%-ban. Feltételezik, hogy a nitrogén által képződő H_2 funkciója *in vivo* az oxigén vízzé alakításához redukáló szert szolgáltatni a hidrogénazon keresztül, és így módon csökkenteni a nitrogén közelében a p_{O_2} -t [33, 35].

4. *A nitrogén parciális nyomása* — Ha egyszerre van jelen C_2H_2 és N_2 , akkor mindkét molekula verseng a nitrogén által katalizált reakció elektronjaiért.

Ha nem helyettesítik a levegőt inert gáz (Ar, He) és oxigén elegyével az acetilénredukciós mérés megkezdése előtt, akkor az aktivitás 10—20%-kal csökken [15].

5. *Az acetilén parciális nyomása* — Ha az acetilénkoncentráció alacsonyabb, mint a telítési, akkor az acetilénredukciós aktivitás arányos az acetilénmennyiséggel. A vizsgálatokhoz olyan acetilénkoncentrációt kell választani, amely ugyanolyan mértékben telíti a nitrogént, mint a légköri N_2 . A mérések során használatos 0,1—0,02 atm $p_{C_2H_2}$ kb. olyan telítést jelent, mint a légköri 0,8 atm p_{N_2} .

6. *Víz* — A gümők vízbe merítése az inkubáció alatt csökkenti az aktivitást [15, 34]. Az oxigénellátás csökkenésének a következménye ez feltehetően, mivel a p_{O_2} -t 0,8 atm-ra emelve visszaáll az eredeti aktivitás [36].

Talajminták esetében a nedvesség növelése az aktivitás emelkedését okozza [30].

7. *Háttér etilén* — Egyes növények, gombák, baktériumok termelnek kis mennyiségű etilént [11, 23, 45]. Az alacsony aktivitású talajmintáknál szükséges ezért olyan ellenőrző mérések elvégzése, ahol az inkubáció acetilénmentes közegben történik, és az ilyen módon keletkezett etilén mennyiségének ismeretében korigálni kell az acetilénredukciós teszt eredményét.

Módszertan

A reprezentatív átlag mintát gázbiztosan zárható inkubációs térben a vizsgálandó minta jellegének megfelelő gázeleggyel reagáltatják. Anaerob rendszereknél Ar (He) és C_2H_2 , aerob szervezeteknél Ar, O_2 , CO_2 és C_2H_2 összetételű gázeleggyel öblítik át az inkubációs teret. Szabadföldi kísérletek esetén a gázfázis cseréje helyett a mintateret kitöltő levegőhöz adják a kívánt mennyiségű acetilént [42]. *In situ* vizsgálatoknál az inkubáció hőmérséklete a szabadföldi hőmérséklet, laboratóriumi méréseknél 20—30 °C, ideje általában 30—60 perc. Hosszabb idejű inkubációk nem ajánlatosak, mert téves eredményeket hozhatnak létre [39]. Az inkubáció alatti fényintenzitás a természetes körülményeknek feleljen meg. Az inkubálás befejezésére legalkalmasabb a gázelegy eltávolítása. Használatos módszerek még ezenkívül: triklór-ecetsav vagy kénsav hozzáadása, fagyasztás, a gázatmoszféra felcserélése vízzel. A gázelegy elemzésére legmegfelelőbb az általánosan alkalmazott gázkromatográfiás eljárás. Koloniatöltetnek a Porapak márkanevű polimert használják. Előnyei a következők: a C_2H_2 és C_2H_4 hatékony elválasztása, nagy érzékenység (10^{-12} mól anyag még kimutatható), lineáris elemzőgörbe közel 6 nagyságrenden keresztül, óránként 10—15 minta analízise. Az elválasztott komponensek detektálására legalkalmasabb a lángionizációs detektor, mely egyszerű felépítésű, stabil működésű és biztosítja a megfelelő érzékenységet. Az analízis eredménye a következő formában adható meg: [C_2H_4 mólok száma/(idő · vonatkoztatási egység)]. A vonatkoztatási egységet a vizsgálandó minta jellege szabja meg, lehet talajtömeg, talajfelület, növényszám, gümőtömeg, fehérjetömeg.

Az acetilénredukciós teszt felhasználása a talajmikrobiológiai és agrokémiai kutatásban

Különbféle baktériumtörzsek hatékonyságának minősítésére, a törzsek szelektálásához, az optimális gazdanövény —

baktérium párosítás kiválasztásához széles körben használt indikációs paraméter az acetilénredukciós aktivitás [34].

Szimbioták esetén a baktériumtörzs kiválasztása a következő szempontok szerint történhet: 1. A N_2 -kötés hatékonysága; 2. H_2 -reciklizáció; 3. Ellenállóképesség az ásványi nitrogénnel szemben; 4. Versenyképesség; 5. Alkalmazkodás a környezeti feltételekhez; 6. Ellenállóképesség a biocidekkel szemben.

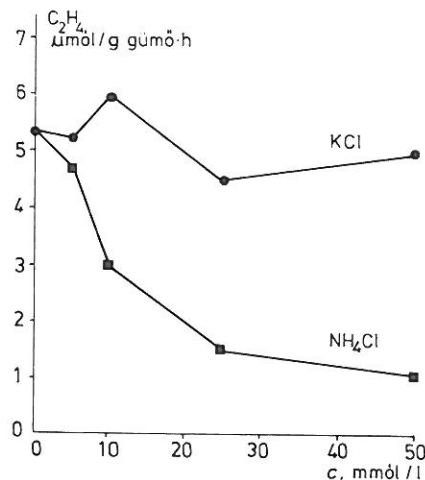
A gazdanövény szelektálására használatos szempontok: 1. Fotoszintetizáló képesség és hatékonyság; 2. Megnövekedett N_2 -kötő időtartam; 3. Kedvező C/N arány [31].

Számos szerző foglalkozott azzal, hogyan hatnak a különböző N-tápanyagok a N_2 -kötésre. A nitrátok a gümőképződést csökkentik [7]. Az ammóniumsók a nitrogénáshoz kapcsolódó szabályozó enzimrendszer működését befolyásolják. Hatásukra a nitrogénfixálás mértéke lecsökken. Az 1. ábra az NH_4Cl - és KCl -koncentráció hatását mutatja be borsó levágott gümőinek acetilénredukciós aktivitására. Az aktivitás meredeken csökken az NH_4^+ -koncentrációt növelve. A szabadon élő szervezetek (*Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella pneumoniae*) N_2 -kötésének szabályozása már részleteiben ismert [5, 40].

A szimbiotikus N_2 -kötés szabályozó mechanizmusa sok részletében felderítetlen még [9, 19, 25]. Ezzel a módszerrel újrazvizgálták a trágyázással bevitt nitrogén hatását a pillangósok N_2 -kötésére [14, 27, 28, 41].

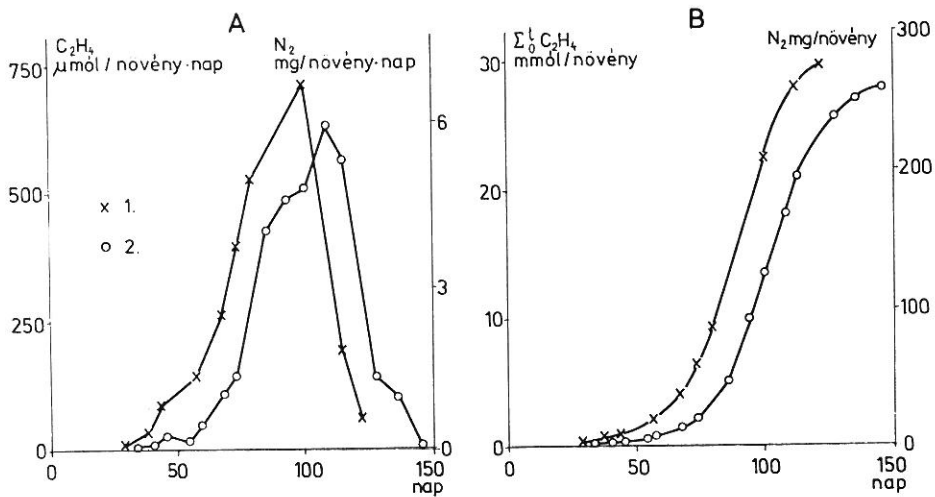
Borsó, szója, lóhere, lucerna, bab esetében a nitrogénműtrágyák gátolják a N_2 -kötést. Elképzelhető azonban az, hogy újabb nitrogénműtrágyák, melyek kompatibilisek a N_2 -kötő rendszerrel, erősen megnövelnék a terméshozamot [16]. A szimbiotikusan fixált nitrogén a gyakorlatban akár 85%-ra is növelhető, a talajból származó nitrogén felhasználása pedig arányosan csökkenthető a fotoszintézis teljesítőképességének fokozásával [4]. Borsónövények esetén az NH_4^+ és NO_3^- hatását fénybesugárzással és szénhidrát adagolásával ellensúlyozták [21].

Szabadföldi mérések esetén kívánatos, hogy hetenként vagy kéthetenként végezzenek méréseket lehetőleg több idényen át. Az USA keleti részében szabadföldön termesztett szója N_2 -kötésének idényprofilját mérték meg HARDY és m társai [17]. Haranggörbét kaptak eredményül, a N_2 -kötés mértéke pedig 80–105 kg N_2 /év/ha között mozgott. Az aktivitásokat kéthetenként mérték acetilénredukciós módszerrel. A megkötött N_2 mennyiségét a



1. ábra

A KCl - és NH_4Cl -koncentráció hatása borsó levágott gümőinek acetilénredukciós aktivitására. Az aktivitás mérése Tris-HCl pufferben (pH 7,4), 24 °C-on, 2–3 órával a sók hozzáadása után történt [19]



2. ábra.

A nitrogénkötés és a kor közötti összefüggés szabadföldön termesztett szója (1) és földimogyoró (2) esetében: A. N_2 -kötő aktivitás vs kor; B. megkötött N_2 vs kor [17]

következő összefüggés alapján határozták meg: megkötött N_2 (mg) = $\frac{C_2H_4 \text{ (mmol)} \cdot 28}{3}$,

(lásd 2. ábra). Talajok N_2 -fixáló képességét havonkénti elemzést végezve mérték meg az acetilénredukciós eljárással. A kanadai prérin 1 kg N_2 /év/ha aktivitást mérték PAUL és mtársai [30]. Kaliforniai talajok 2—5 kg N_2 /év/ha nitrogénkötést mutattak STEYN és DELWICHE adatai szerint [39]. A talajok általában alacsony aktivitásúak, energiaforrás vagy energiaforrás és N_2 -fixáló mikroorganizmus kombinációjával az aktivitást emelni lehet [17, 18]. Oxigénben szegény tavak, folyótorkolatok élővilágának fontos alkotói a kék-zöld algák, az üledékben pedig a nitrogénkötő baktériumok. A Mendota tóban (Wisconsin, USA) STEWART és mtársai mérték idényprofil [38]. Az aktivitás nagyon változó-kony volt, az algák heterociszta-tartalmával mutatott korrelációt. A számított évi nitrogénkötés 2,4 kg N_2 /év/ha volt. Magyar kutatók, OLÁH és mtársai széles körű mérésekkel vizsgálták élővizeink N_2 -kötését [29]. A Keszthelyi-öböl 70 kg N_2 /év/ha nitrogénkötést mutatott. Ez a magas érték is jelzi az öböl előrehaladott eutrofizációját, mely a foszforellátás függvénye.

Összefoglalás

A 15 éve kidolgozott acetilénredukciós teszt nagy elméleti és gyakorlati jelentőséggel bír a N_2 -kötés és a N-anyagcsere kutatásában. Felderítették az eljárás biokémiai alapjait, és a biológiai acetilénredukciót befolyásoló környezeti tényezőket. Megbízható, gyors és viszonylag egyszerű, sokoldalúan alkalmazható módszer került így módon a kutatók birtokába.

A biológiai és mezőgazdasági tudományok területén rendkívül széles skálát ölelnek föl az eljárás segítségével kutatott témák.

Irodalom

- [1] APPLEBY, C. A.: Leghemoglobin. In: The biology of nitrogen fixation. (Ed.: QUISP, A.) North-Holland Publ. Comp. Amsterdam—Oxford. 522—550. 1974.
- [2] BERGERSEN, F. J.: The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene-reduction assay. Aust. J. Biol. Sci. 23. 1015—1025. 1970.
- [3] BERGERSEN, F. J.: The biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legumes. In: Abstr. of

- Tenth Internat. Congr. Microbiol. Mexico. 220. 1970.
- [4] CHILD, J. J.: New developments in nitrogen fixation research. *Bioscience*. **26**. 614—617. 1976.
- [5] DAESCH, G. & MORTENSON, L. E.: Regulation of N_2 -fixation in *Clostridium pasteurianum*. *Bacteriol. Proc.* 132. 1968.
- [6] DART, P. J. & DAY, J. M.: Effects of incubation temperature and oxygen tension on nitrogenase activity of legume root nodules. In: *Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats*. (Eds.: LIE, T. A. & MULDER, E. G.) *Plant and Soil. Spec. Vol.* 167—184. 1971.
- [7] DAZZO, F. & BRILL, W. J.: Regulation by fixed nitrogen of host-symbiont recognition in the *Rhizobium-clover* symbiosis. *Plant Physiol.* **62**. 18—21. 1978.
- [8] DILWORTH, M. J.: Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **127**. 285—294. 1966.
- [9] DUKE, S. H. & HAM, G. E.: The effect of nitrogen addition on N_2 -fixation and on glutamate dehydrogenase and glutamate synthase activities in nodules and roots of soybeans inoculated with various strains of *Rhizobium japonicum*. *Plant Cell Physiol.* **17**. 1037—1044. 1976.
- [10] FAY, P.: Photostimulation of nitrogen fixation in *Anabaena cylindrica*. *Biochim. Biophys. Acta.* **216**. 353—356. 1970.
- [11] FREEDBAIRN, H. T. & BUDDENHAGEN, I. W.: Ethylene production by *Pseudomonas solanacearum*. *Nature*. (London). **202**. 313—314. 1971.
- [12] HARDY, R. W. F. & KNIGHT, E. JR.: ATP-dependent reduction of azide and HCN by N_2 -fixing enzymes of *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **139**. 69—90. 1967.
- [13] HARDY, R. W. F., BURNS, R. C. & HOLSTEN, R. D.: Applications of the acetylene — ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* **5**. 47—81. 1973.
- [14] HARDY, R. W. F. et al.: *In situ* N_2 fixation by the C_2H_2 — C_2H_4 assay. *Agron. Abs.* 93. 1968.
- [15] HARDY, R. W. F. et al.: The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* **43**. 1185—1207. 1968.
- [16] HARDY, R. W. F. et al.: Symbiotic N_2 fixation: age-activity relationship and differential inhibition by various fertilizers. *Agron. Abs.* 95. 1969.
- [17] HARDY, R. W. F. et al.: Biological nitrogen fixation: a key to world protein. In: *Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats*. (Eds.: LIE, T. A. & MULDER, E. G.) *Plant and Soil. Spec. Vol.* 561—590. 1971.
- [18] HEGAZI, N. A., VLASSAK, K. & MONIB, M.: Effect of amendments, moisture and temperature on acetylene reduction in Nile delta soils. *Plant and Soil.* **51**. 27—37. 1979.
- [19] HOUWAARD, F.: Effect of ammonium chloride and methionine sulfoximine on the acetylene reduction of detached root nodules of peas (*Pisum sativum*). *Appl. and Environ. Microbiol.* **37**. 73—79. 1979.
- [20] HOUWAARD, F.: Nitrogenase activity of pea bacteroids as affected by carbohydrates and ammonium chloride. *Plant and Soil.* **54**. 51—63. 1980.
- [21] HOUWAARD, F.: Influence of ammonium and nitrate nitrogen on nitrogenase activity of pea plants as affected by light intensity and sugar addition. *Plant and Soil.* **54**. 271—282. 1980.
- [22] HWANG, J. & BURRIS, R. H.: Binding sites of nitrogenase. *Federation Proc.* **27**. 639. 1968.
- [23] ILAG, T. & CURTIS, R. W.: Production of ethylene by fungi. *Science*. **159**. 1357—1358. 1968.
- [24] MCKENNA, C. E., BENEMANN, J. R. & TRAYLOR, T. G.: A vanadium containing nitrogenase preparation: implications for the role of molybdenum in nitrogen fixation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41**. 1501—1508. 1970.
- [25] MIFLIN, B. J. & LEA, P. J.: The pathway of nitrogen assimilation in pea plants. *Phytochem.* **15**. 873—885. 1976.
- [26] MOUSTAFA, E.: Cold lability of the nitrogen fixation system in excised leguminous nodules. *Phytochem.* **8**. 993—995. 1969.
- [27] MOUSTAFA, E., BALL, R. & FIELD, T. R. O.: The use of acetylene reduction to study the effect of nitrogen fertilizer and defoliation on nitrogen fixation by field-grown white clover. *New Zealand J. Agric. Res.* **12**. 691—696. 1969.
- [28] OGHOGHORIE, C. G. O. & PATE, J. S.: The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea (*Pisum arvense* L.). In: *Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats*. (Eds.: LIE, T. A. & MULDER, E. G.) *Plant and Soil. Spec. Vol.* 185—202. 1971.
- [29] OLÁH J. et al.: Nitrogénkötés sekély tavakban. *Akadémiai Kiadó. Budapest.* (Megjelenés alatt)
- [30] PAUL, E. A., MYERS, R. J. K. & RICE, W. A.: Nitrogen fixation in grassland and associated cultivated ecosystems. In: *Biological nitrogen*

- fixation in natural and agricultural habitats. (Eds.: LIE, T. A. & MULDER, E. G.) Plant and Soil. Spec. Vol. 495—507. 1971.
- [31] RENNIE, R. J.: Potential use of induced mutations to improve symbioses of crop plants with N₂-fixing bacteria. IAEA. Vienna. 1981.
- [32] SCHÖLLHORN, R. & BURRIS, R. H.: Study of intermediates in nitrogen fixation. Federation Proc. **24**, 710. 1966.
- [33] SCHUBERT, K. R. & EVANS, H. J.: Hydrogen evolution: A major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **73**, 1207—1211. 1976.
- [34] SCHWINGHAMER, E. A., EVANS, H. J. & DAWSON, M. D.: Evaluation of effectiveness in mutant strains of *Rhizobium* by acetylene reduction relative to other criteria of N₂ fixation. Plant and Soil. **33**, 192—212. 1970.
- [35] SMITH, L. A., HILL, S. & YATES, M. G.: Inhibition by acetylene of conventional hydrogenase in nitrogen-fixing bacteria. Nature. (London). **262**, 209—210. 1976.
- [36] SPRENT, J. I.: Effects of water stress on nitrogen fixation in root nodules. In: Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats. (Eds.: LIE, T. A. & MULDER, E. G.) Plant and Soil. Spec. Vol. 225—228. 1971.
- [37] STEWART, W. D. P., FITZGERALD, G. P. & BURRIS, R. H.: Acetylene reduction by nitrogen-fixing blue-green algae. Arch. Microbiol. **62**, 336—348. 1968.
- [38] STEWART, W. D. P. et al.: Nitrogenase activity in Wisconsin lakes of differing degrees of eutrophication. New Phytol. **70**, 497—509. 1971.
- [39] STEYN P. L. & DELWICHE, C. C.: Nitrogen fixation by nonsymbiotic microorganisms in some California soils. Environ. Sci. Technol. **4**, 1122—1128. 1970.
- [40] STREICHER, S. L. et al.: Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*: evidence for a role of glutamine synthetase as a regulator of nitrogenase synthesis. J. Bacteriol. **120**, 815—821. 1974.
- [41] VITOSH, M. I.: Substitution of acetylene for nitrogen in studies of biological nitrogen fixation. Chem. Eng. News. **24**, August 1970.
- [42] WOUGHMAN, G. J.: Field use of acetylene reduction assay for nitrogen fixation. Oikos. **22**, 111—113. 1971.
- [43] WHEELER, C. T.: The causation of the diurnal changes in nitrogen fixation in the nodules of *Alnus glutinosa*. New Phytol. **70**, 487—495. 1971.
- [44] WONG, P. et al.: Investigations into the pathway of electron transport to the nitrogenase from nodule bacteroids. In: Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats. (Eds.: LIE, T. A. & MULDER, E. G.) Plant and Soil. Spec. Vol. 525—543. 1971.
- [45] YOUNG, R. E., PRATT, H. K. & BIALE, J. B.: Identification of ethylene as a volatile product of the fungus *Penicillium digitatum*. Plant Physiol. **26**, 304—310. 1951.

KARDOS JÓZSEF
MTA Talajtani és Agrokémiai
Kutató Intézete, Budapest

Érkezett: 1983. január 18.