

## Antibiotikum-rezisztencia és szimbiózisos $N_2$ -kötő képesség *Rhizobium meliloti*-ban

BARABÁS ZOLTÁNNÉ

MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézete

A vad típusú *Rhizobium meliloti* lucerna-gazdanövényen szimbiózisban effektív nitrogénkötő rendszert hoz létre, a légköri nitrogént a növények által hasznosítható nitrogénvegyületekké alakítja.

A szimbiózisos nitrogénkötést meghatározó géneket és ezek működését *Rhizobium* mutánsok segítségével lehet megismerni. Egy részük nem képez gümőt a gazdanövényen — ezek a nodulációban hibás ( $Nod^-$ ) törzsek —, más részüknél gümőképzés van, de nitrogénkötés nincs, ezek az inaktív ( $Fix^-$ ) törzsek.

Azok a *Rhizobium* törzsek, amelyek mutáció révén rezisztensekké váltak bakteriofágokkal, bizonyos D-aminosavakkal, ill. egyes antibiotikumokkal szemben, sok esetben szimbiózisos tulajdonságaiban is megváltoztak:  $Nod^-$ , ill.  $Fix^-$  fenotípust mutattak [1, 3, 4, 5, 6, 7].

Kísérleteinkben az antibiotikum-rezisztencia és a szimbiózisos tulajdonságok összefüggését vizsgáltuk a *Rhizobium meliloti* 41 törzsben.

### *Spontán antibiotikum-rezisztens mutánsok előfordulásának gyakorisága Rhizobium meliloti* 41-ben

A kísérletben használt antibiotikumokat PANKHURST [5] szerint csoportosítottuk:

- I. Fehérjésintézt gátló;
- II. Nukleinsav-szintézt gátló;
- III. Sejtfa-, ill. membránszintézt gátló antibiotikumok;
- IV. Fehérjésintézt gátló antibiotikumok, amelyek azonban megváltoztatják a sejtfa permeabilitását, és gátolhatják az oxidatív foszforilálást.

Megvizsgáltuk a vad típusú *Rhizobium meliloti* 41 érzékenységet a különböző csoportokba tartozó antibiotikumokkal szemben, és a spontán rezisztens előfordulásának gyakoriságát az 1. táblázatban foglaltuk össze. Különböző volt a mutánsgyakoriság a két fehérjésintézt gátló antibiotikumnál; klóramfenikol esetén alacsonyabb szinten tudunk rezisztenseket izolálni, mint streptomocinnél. Hasonló különbség volt a két aminoglikozid antibiotikumnál; neomicint használva legfeljebb 100—200  $\mu\text{g/ml}$  antibiotikum-tartalmú lemezen nőttek ki telepek, míg kanamicinnél az 1000  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációnál is  $10^{-6}$ — $10^{-7}$  gyakorisággal jelentek meg a rezisztensek.

### *Az antibiotikum-rezisztens törzsek szimbiózisos tulajdonságai*

A rezisztens törzsek szimbiózisos sajátosságait kémcsőben, N-mentes agar-tápadaton tartott lucerna-csiranövényeken vizsgáltuk. Az inokulálást ugyancsak N-mentes tápadatba átvitt,  $5-8 \times 10^7$  baktériumot tartalmazó szuszpenzióval végeztük, egy csiranövényre számítva. A növényeket 22—24 °C-on tartottuk, 16 órás megvilágítás mellett. A kiértékelés 6 hetes korban történt. A gümőképzés szabad szemmel megfigyelhető volt, a nitrogén-aktivitást (effektivitást) acetilénredukció alapján gázkromatográfiásan határoztuk meg, és a vad típusú baktériummal inokulált növények értékeihez viszonyítottuk (2. táblázat).

Hiányos gümőképzést csak a klóramfenikol-rezisztenseknél kaptunk, az effektivitás csökkenése azonban kisebb-nagyobb mértékben jelentkezett a klóramfenikolon kívül a

1. táblázat

A különböző antibiotikumokkal szemben rezisztens spontán mutánsok gyakorisága *Rhizobium meliloti* 41-ben

Antibiotikumok	cc (µg/ml)	Spontán mutánsok gyakorisága
I. csoport		
Klóramfenikol	10	$10^{-5} - 10^{-4}$
	25	$10^{-7}$
	50	$10^{-8}$
Streptomycin	10	$10^{-5}$
	50	$10^{-6}$
	100	$10^{-7} - 10^{-6}$
	200	$10^{-7} - 10^{-6}$
II. csoport		
Rifampicin	10	$10^{-6}$
	25	$10^{-7} - 10^{-6}$
	50	$10^{-7}$
	100	$10^{-8} - 10^{-7}$
III. csoport		
Vankomicin	50	$10^{-6}$
	100	$10^{-6}$
IV. csoport		
Kanamicin	100	$10^{-1}$
	250	$10^{-1}$
	500	$10^{-7} - 10^{-6}$
	1000	$10^{-7} - 10^{-6}$
Neomicin	10	$10^{-4} - 10^{-3}$
	25	$10^{-5} - 10^{-4}$
	50	$10^{-6} - 10^{-5}$
	100	$10^{-7}$
	200	$10^{-8} - 10^{-7}$

Megjegyzés: Az antibiotikumot nem tartalmazó tápoldatban szaporított baktériumokat megfelelő hígításban különböző antibiotikumokat tartalmazó agarlemezekre szélesztettük. A 4 nap alatt kinőtt telepek számát az antibiotikumot nem tartalmazó lemezeken kifejlődött telepek számához viszonyítottuk.

rifampicin-rezisztensek között is. A streptomycinre és vankomicinre rezisztens mutánsok effektivitása nem csökkent a vadtypushoz viszonyítva.

Az effektívtásvesztés legerősebben a neomicin-rezisztens mutánsokban jelentkezett. 20 mutáns törzs közül — amelyek 100 µg/ml neomicinre voltak rezisztensek — 17 teljesen ineffektív vált. Egy ilyen neomicin-rezisztens mutáns szimbiózisos sajátosságait mutatja a 3. táblázat, összehasonlítva az inokulátlan növény, ill. a vadtypusú (neomicin-érzékeny)

2. táblázat  
Antibiotikum-rezisztencia és effektivitás *Rhizobium meliloti* 41-ben

Antibiotikum	cc ( $\mu\text{g/ml}$ )	Vizsgált klónok száma	Effektivitás, %			
			0—10	10—20	20—50	50
I. csoport						
Klóramfenikol	25	26	3	3	3	17
	50	18	1	3	3	11
Streptomycin	200	20	0	0	1	19
II. csoport						
Rifampicin	50	40	1	1	8	30
	100	38	1	1	13	23
III. csoport						
Vankomicin	50	20	0	0	0	20
	100	7	0	0	1	6
IV. csoport						
Kanamycin	500	30	0	2	3	25
	1000	32	1	0	4	27
Neomicin	50	20	0	0	3	17
	100	20	17	1	1	1

Megjegyzés: Az acetilénredukció alapján meghatározott effektivitást a vad típusú, antibiotikum-érzékeny baktériummal kapott értékhez viszonyítottuk, annak százalékában fejeztük ki.

baktériummal inokulált növény adataival. A gümők száma erősen megnövekedett, a száraz súly az inokulálatlan kontrolléval azonos, az acetilénredukcióval mért effektivitás nem éri el a vad típusúval kapott érték 1%-át. A szárazsúly-mérésekhez a növények sziklevele feletti részét használtuk, 24 óráig, 105 °C-on történő szárítás után.

A másik aminoglikozid antibiotikum — a kanamicin — a neomicinről eltérő eredményeket adott. A 30, 1000  $\mu\text{g/ml}$  kanamicint tartalmazó agar-lemezeiről izolált mutáns közül mindössze egy veszítette el az effektivitását.

#### *A neomicin-rezisztens törzsek effektivitásvesztésének lehetséges okai*

Határozott összefüggést találtunk a neomicin-rezisztencia és a szimbiózis nitrogénkötő képesség elvesztése között a *Rhizobium meliloti* 41 törzsben, azonban a neomicin hatásmódja, valamint a rezisztencia és az ineffektivitás összefüggése még nem tisztázott.

Kísérleteinkben a következő lehetőségeket vizsgáltuk:

1. A légzési lánc elektrontranszportja nem kapcsolódik az ATP-szintézissel. Így energiahiány lép fel, amely gátolja az antibiotikum felvételét, és gátolhatja az ugyancsak energiaigényes  $\text{N}_2$ -kötést is. Ilyen „uncoupled” jelleget figyeltek meg *Escherichia coli*-ban [2]. Mivel azonban a rezisztens törzsek a vad típusúval azonos mértékben hasznosították a borostyánkősavat, mint kizárólagos szénforrást, vegetatív szaporodásukban, ez nem lehetett a jelenség magyarázata.

2. A sejtfal, ill. a membrán permeabilitásának megváltozása. Jelzett aminosav-felvételi kísérletekkel nem tudtunk olyan mértékű permeabilitásváltozást kimutatni, amely az aminosav

3. táblázat

Vadtípusú (*R. m. 41*) és neomicin-rezisztens (Nm 100) *Rhizobium meliloti* szimbiózisos tulajdonságai

Baktérium	Gümő- szám/növény	Száraz súly, mg/növény	Effektivitás, %
∅	0	2,0	1
<i>R. m. 41</i>	3,3	5,5	100
Nm 100	28,3	1,8	1

Megjegyzés: A vadtípusú és a neomicin-rezisztens mutánsval kapott értékeket egymással és az inokulálatlan (∅) kontrollnövény értékeivel hasonlítottuk össze.

felvételét gátolta volna. Jelzett neomicin nem állt rendelkezésünkre, így az esetleges szelektív permeabilitásváltozás nem zárható ki.

3. Fénymikroszkópos vizsgálatok arra mutatnak, hogy a rezisztens törzsek egy részében a baktériumok nem alakulnak át nitrogénkötő bakteroidokká. A mikroszkópi képen nem láthatók a baktériumnál lényegesen nagyobb, elágazó formájú bakteroidok. Ez is lehet sejtfalváltozás következménye, mivel a bakteroidokká alakulás során a sejtfal általában elvékonyodik, átjárhatóbbá válik, és a merevebb sejtfal meggátolhatja a nitrogénkötő bakteroidok kialakulását.

Irodalom

- [1] HENDRY, G. S. & JORDAN, D. C.: Ineffectiveness of viomycin resistant mutants of *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* **15.** 671—675. 1969.
- [2] KANNER, B. I. & GUTNICK, D. L.: Use of neomycin in the isolation of mutants blocked in energy conservation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **111.** 287—289. 1972.
- [3] KLECZKOWSKA, J.: A study of phage resistant mutants of *Rhizobium trifolii*. *J. Gen. Microbiol.* **4.** 298—310. 1950.
- [4] PAIN, A. N.: Symbiotic properties of antibiotic-resistant and auxotrophic mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Appl. Bacteriol.* **47.** 53—64. 1979.
- [5] PANKHURST, C. E.: Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of fast- and slow-growing strains of *Rhizobium nodulating Lotus* species. *Can. J. Microbiol.* **23.** 1026—1033. 1977.
- [6] SCHWINGHAMER, E. A.: Association between antibiotic resistance and ineffectiveness in mutant strains of *Rhizobium* spp. *Can. J. Microbiol.* **10.** 221—233. 1964.
- [7] SCHWINGHAMER, E. A.: Loss of effectiveness and infectivity in mutants of *Rhizobium* resistant to metabolic inhibitors. *Can. J. Microbiol.* **14.** 355—367. 1968.