

VIZSGÁLATOK A BALATONI *DICEROGAMMARUSOK* (CRUSTACEA, AMPHIPODA) SZÉNHIDRÁT-EMÉSZTÉSÉVEL KAPCSOLATOSAN

PONYI JENŐ

Érkezett : 1959. március 2.

A balatoni Amphipodákon végzett korábbi vizsgálatok és megfigyelések (PONYI 1956, 1957) kimutatták, hogy a *Dicerogammarusok* 1953-ban a tónak szinte minden élőhelyén igen nagy tömegben megtalálhatók. Balatonba kerülésük minden bizonnyal 1950 második felében történhetett, amikor a *Limnomysis benedeni* nevű hasadt lábú rákot betelepítették (WOYNÁROVICH 1955). Táplálékuk elsősorban detritusz (szerves törmelék), melyet nagyobb részt végtagjaikkal szűrnék ki a vízből. Ennek a tápanyagnak nagy része cellulóz, amely egy vízzel oldhatatlan, lassan leépülő, nagy tömegben termelődő és felhalmozódó poliszaharid. Ezt az anyagot természetes vizeink egyik igen fontos szénforrásának tekinthetjük, amely a magasabbrendű vízinövények, valamint a planktonszervezetek egy részéből származtatható (FELFÖLDY és F. KALKÓ 1958). Jelenlegi vizsgálatainknak a célja az volt, hogy eldöntsük, képesek-e a *Dicerogammarusok* a cellulóz emésztésére, ill. annak felhasználására.

Az irodalom tanúsága szerint a rákok szénhidrát emésztésével kapcsolatos vizsgálatok kevés kivétellel a folyami rákon (*Astacus*) történtek. Ezen állat gyomornedvéből amiláz, maltáz, invertáz (KRÜGER és GRAETZ 1928, WIERSMA és VAN DER VEEN 1928, ULLMANN 1932), továbbá egy hemicelluláz (BIEDERMANN és MORITZ 1898, BIERRY és GIAJA 1912), valamint a lihenáz (JEWELL és LEWIS 1918) jelenlétét mutatták ki. Újabban (RAY és JULIAN 1952) egy tengeri ászka (*Limnoria lignorum*) béltraktusában mutattak ki celluláz enzimet.

A vizsgálatok kevés száma miatt a fenti fermentek egy részének a jelentősége (pl. lihenáz) a táplálkozásban egyáltalán nem ismert, sőt a celluláz enzim létezését a rákok szervezetében kétkedéssel fogadják (BIEDERMANN és MORITZ 1898, BUDDENBROCK 1956).

A vizsgálatok módszerei és a kísérleti anyag előkészítése

A *Dicerogammarusok* béltraktusában jelenlevő celluláz enzim kimutatására lényegében kétféle módszert alkalmaztunk. Az egyik a cellulózbontás (aktivitás) mértékének méréséből, a másik annak bomlásából származó glukózváltozás vizsgálatából állt.

1. Az ún. cellulóz-aktivitás mérés nem újkeletű, mert már meglehetősen régen használják talaj, trágya stb. cellulóztartalom-változásának vizsgálatára (BARTHEL és BENGTSOON 1924, STEINER 1931). Ezek a módszerek lényegében

kétfélék, ugyanis vagy a cellulóz hozzáadása után keletkező CO_2 -t (FJODOROV 1952, WAKSMAN 1926), vagy pedig a vizsgálandó anyagban elhelyezett szűrőpapírcsik súlycsökkenését mérik (RUBENTSCHIK 1928, BAIER 1936, KUZNIAR 1956 stb.). Újabban (MÁRKUSNÉ 1954, FELFÖLDY és F. KALKÓ 1958) a visszamaradt cellulóz mennyiségét antron reagenssel határozzák meg.

A mi vizsgálati módszerünket a fenti szerzők alapján úgy állítottuk össze, hogy lehetőleg egyszerű, gyors és megközelítőleg pontos legyen, miután — eltekintve a folyamatok finomabb részleteitől — csupán a cellulózbontás tényét próbáltuk igazolni. Az aktivitás mérésére celofánt használtunk, mivel az könnyen beszerezhető, viszkozus eljárással készül, a tulajdonsága és minősége azonos, a kísérletek végén veszteség nélkül mosható, tisztítható stb. (MÁRKUSNÉ 1955). Kb. 20 mg-os csíkot (48 órán át exsikkátorban tartott, 4 tizedes pontossággal lemért) tettünk ki a vizsgált anyag hatásának, majd bizonyos idő elteltével (6 nap) megfelelő tisztítás (desztillált vizes fürdők, leecsetelés) és szárítás (levegőn szárítás + 48 óra exsikkátor) után analitikai mérleggel visszamértünk.

A vizsgálati anyagot a következőképpen készítettük el: Megfelelő számú (5—20—25) állatot homogenizáltunk, majd gumidugóval elzárt 100 ml-es ERLÉNMEYER-lombikokba mostuk át különböző pH-ra beállított pufferkeverékkel. A baktériumok elszaporodásának meggátolására toluol kezelést alkalmaztunk. A vizsgálatok alkalmával egyedül a citromsavas-foszfátpuffert használtuk, mert abban gyorsabb a cellulóz bomlása, mint pl. az acetát-pufferban (MÁRKUSNÉ 1955). Ez valószínűleg összefügg azzal az általános tapasztalattal, hogy az oldható foszfáttartalom növelése a kedvező foszforizálási feltételek miatt fokozza a cellulóz bomlását. Az inkubálás 28°C -on történt.

2. A cellulóz bomlásából származó glukózváltozás vizsgálatánál az anyag előkészítése lényegében megegyezik a fentiekkel. A különbség csupán annyi, hogy egyrészt az állatokat erre a célra megfelelő készülékben 48 óráig éhezettük — ugyanis ennyi idő alatt a hepatopankreaszban levő glikogén teljesen eltűnik, így az abból felszabaduló glukóz nem zavarja a vizsgálatot —, másrészt a celofáncsik helyett szűrőpapír darabkákat helyeztünk a készítménybe. A kontroll esetében a szűrőpapír berakását mellőztük. A cellulózbontás helyének megállapítása érdekében kidolgoztunk egy viszonylagosan gyors és jól bevált preparálási módszert, melynek alkalmazásával könnyűszerrel ki tudjuk venni az állat testéből a bélcsatornát és az azzal összefüggő májcsövet anélkül, hogy azok megsérüljenek. A bélcsatorna és a májcsövek szétválasztása után a vizsgálati anyagot a fentebb elmondottak szerint készítettük elő.

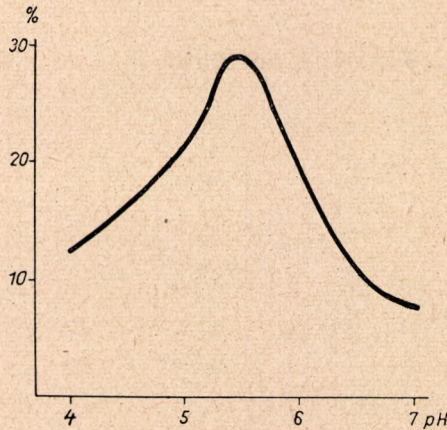
A 2. pontban leírt készítmények mindegyikéből időközönként azonos mennyiségű anyagot vittünk papírra, a szabad glukóz meghatározása céljából.

Kiegészítettük vizsgálatainkat még frissen gyűjtött, éheztetett (20 óra), valamint éheztetett (20 óra) és utána (20 órán keresztül) tiszta cellulózzal etetett állatok szabad glukózváltozásának vizsgálatával is. A megfelelő előkészítés után 70%-os alkoholban konzerváltuk azokat, majd homogenizálást és többszöri centrifugálást, valamint ismételt alkoholos átmosást alkalmazva papírkromatografikus eljárással vizsgáltuk.

A glukóz vizsgálatát általánosan ismert módszer szerint (CRAMER 1954, LINSKENS 1955) butanol-etanol-víz (4 : 1 : 5) oldószerrel, az előhívást pedig acetonos AgNO_3 oldattal végeztük.

A vizsgálatok eredményei

A *Dicerogammarus* cellulózbontó képességét tanulmányozva lényegében hasonló lefutású görbét kaptunk (1. ábra), mint MÁRKUSNÉ (1955), aki a csigákon végzett hasonló vizsgálatokat. A több mint 10 kísérleti sorozat



1. ábra. A *Dicerogammarus* cellulózbontó képessége különböző pH-jú foszfátpufferben, a celofánbomlás %-ában

Abb. 1. Zelluloseabbauende Fähigkeit des *Dicerogammarus* in Phosphatpuffern von verschiedenem pH, im Prozentsatz des Zellophanzerfalles

eredménye azt mutatja, hogy a vizsgált állatnál a cellulózbontó képesség optimális pH-ja 5,25—5,5 között van és a bevitt celofán mennyiségének megközelítően 30%-a bomlik le.

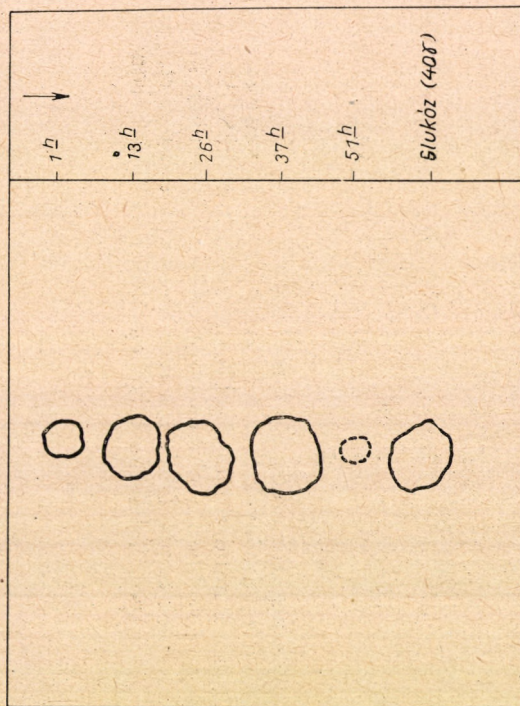
A glukóz vizsgálatok első részének eredményeit a 2., 3., 4. ábra szemlélteti. A 4-es pH-ra beállított készítményeknél a glukóz foltornak csak kis intenzitású növekedése állapítható meg, az 5,5 pH-nál a legerősebb, míg a 6,5 pH esetében már nem beszélhetünk foltorról, mert az első órában tapasztalt glukózképződés után a továbbiakban az csak nyomokban mutatható ki. Mindhárom esetben tapasztalt viszonyokat a foltok nagyságának összehasonlítása igen jól szemlélteti (1. táblázat).

1. táblázat

pH	idő	1h	13h	26h	37h	51h
4		0,8 cm ²	1,8 cm ²	2,7 cm ²	3,1 cm ²	—
5,5		1,3 „	3,2 „	3,8 „	4,8 „	5,1 cm ²
6,5		3,2 „	—	—	—	—

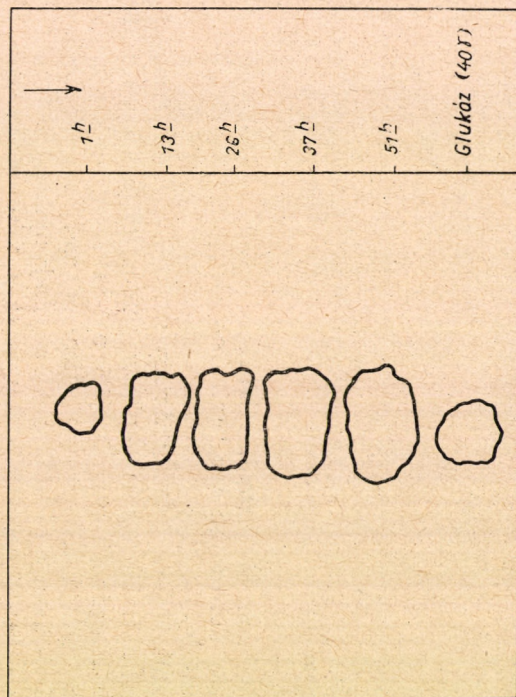
A kontrolek teljesen negatív eredményt mutattak.

Ha ezen adatokat, ill. eredményeket összehasonlítjuk az 1. ábrán szemléltetett vizsgálatokkal, akkor minden különösebb magyarázat nélkül érthető, hogy az 5,5 pH-jú készítményekben a glukóz növekedése, helyesebben képződése a legnagyobb, mert ezen pH feltételek szükségesek a celluláz enzim optimális működéséhez. A kapott foltok tehát egyedül a cellulóz lebontásából származnak.



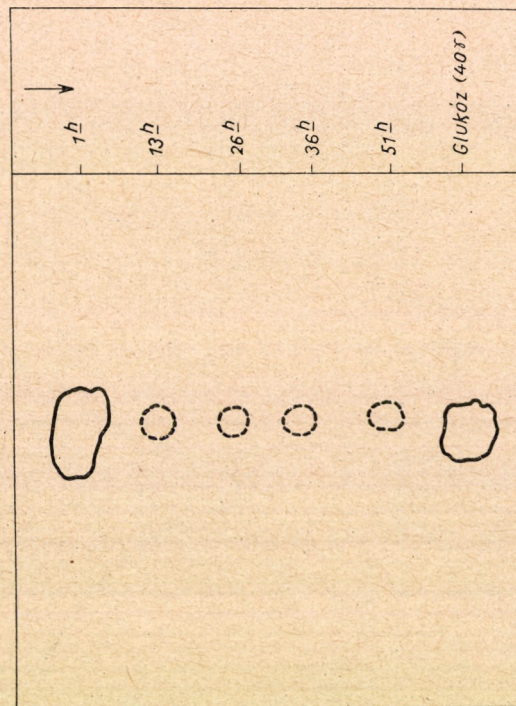
2. ábra. A cellulóz bomlásából származó glukóz változása, 51 óra alatt, 4 pH-jú foszfátpufferben.

Abb. 2. Veränderung der durch Zelluloseabbau erzeugten Glukose innerhalb 51 Stunden, in Phosphatpuffer von 4 pH.



3. ábra. A cellulózbomlásból származó glukóz változása, 51 óra alatt, 5,5 pH-jú foszfátpufferben.

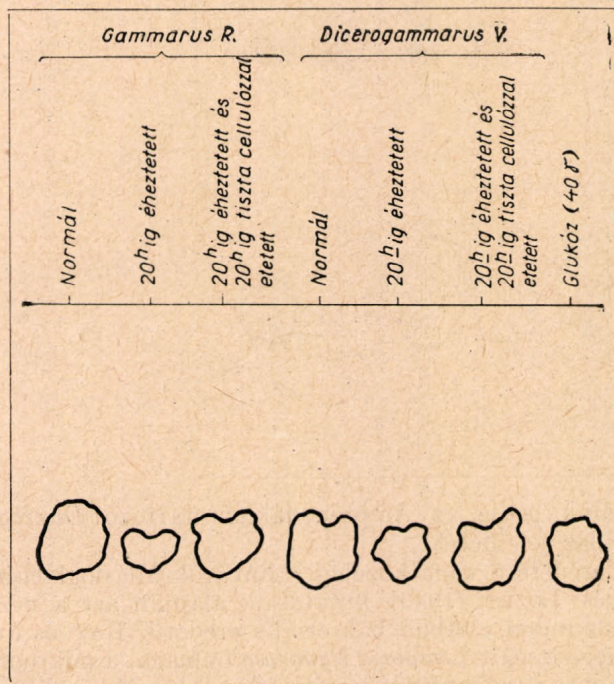
Abb. 3. Veränderung der durch Zelluloseabbau erzeugten Glukose innerhalb 51 Stunden, in Phosphatpuffer von 5,5 pH.



4. ábra. A cellulóz bomlásából származó glukóz változása, 51 óra alatt, 6,5 pH-jú foszfátpufferben.

Abb. 4. Veränderung der durch Zelluloseabbau erzeugten Glukose innerhalb 51 Stunden, in Phosphatpuffer von 6,5 pH.

A cellulóz bontásának ténye azokból a kísérletekből is kitűnik, amikor a frissen gyűjtött, az éheztetett, valamint ugyancsak éheztetett, de utána tiszta cellulózzal etetett állatoknál a szabad glukózt megvizsgáltuk. Erre a célra a *Dicerogammarus* mellett a *Gammarus roeseli*-t is felhasználtuk. Mindkét állatnál a 20^h éhezés alatt a szabad glukóz megközelítően a felére csökken, tiszta cellulózzal etetve újra felemelkedik elérve kb. a normál állatnál található mennyiséget (5. ábra).



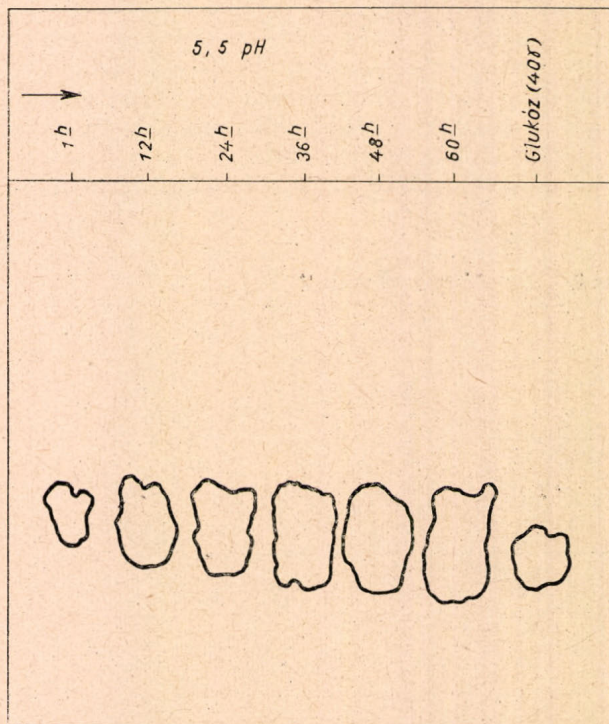
5. ábra. *Gammarus roeseli* és *Dicerogammarus villosus* szabad glukóz tartalma normál, éheztetett, valamint éheztetett és utána tiszta cellulózzal etetett állatoknál

Abb. 5. Freier Glukosegehalt von *Gammarus roeseli* und *Dicerogammarus villosus* bei normalen, bei hungernden sowie bei hungernden und nachher mit reiner Zellulose gefütterten Tieren

További vizsgálataink során megállapítottuk a bontási folyamatok helyét, ugyanis erre nézve 3 lehetőség adódott: a bélesatorna, a májcsövek vagy mindkettő. A bélesatornából előállított készítmények glukózkezelés szempontjából teljesen negatívak voltak, míg a májcsövekből készíttettek igen szépen mutatták a növekvő foltosort (6. ábra). A cellulózbontási folyamatok kétségtelenül az utóbbiban játszódnak le.

Az eredmények megbeszélése

Véleményünk szerint elegendőnek látszanak ezek a tények annak a bizonyítására, hogy a vizsgált állatok képesek a cellulózt bontani. Ez azért is volt fontos, mert egyes kutatóknak az a nézete (BIEDERMANN és MORITZ 1898, OPPENHEIMER 1925), hogy a rákokban csupán hemicelluláz található. Az újabb kutatások (RAY és JULIAN 1952) egy tengeri ászkában (*Limnoria*),



6. ábra. Magyarázat a szövegben
Fig. 6 Erklärung im Text

a mi vizsgálataink pedig az Amphipodákhoz tartozó *Dicerogammarus*-ban igazolják a celluláz jelenlétét.

Az enzim eredetére vonatkozólag a bűvárok állásfoglalása igen különböző. FLORKIN és LOZET (1949) kutatásaik alapján azt a nézetet vallják, hogy a celluláz minden esetben bakteriális eredetű. RAY és JULIAN (1952) szerint, az általuk vizsgált *Limnoria lignorum* önmaga, a mikroorganizmusoktól függetlenül képes a szóbanforgó enzimet termelni. Megemlítjük, hogy ezzel kapcsolatosan is végeztünk vizsgálatokat, azonban az eddigi adatokat nem találjuk elegendőnek a kérdés eldöntéséhez.

Úgy gondoljuk, hogy az ilyen irányú vizsgálataink fontos kiindulási alapot szolgáltatnak arra vonatkozólag, hogy a rekuperáló szervezetek milyen szerepet töltenek be a vízi élettérben lejátszódó bonyolult átépülési folyamatokban. A későbbi kutatásaink olyan lehetőségekkel kecsegtetnek, melyek szerint fényt deríthetünk arra vonatkozólag, hogy ezek az állatok mennyi cellulózhoz kötött energiát képesek pl. a Balaton számára visszamenteni (rekuperálni). Mindenesetre azt már tudjuk, hogy 100 db állat (élő súlyban 66 g) enzimje 6 nap alatt — in vitro — 13–14 mg tiszta cellulózt képes elbontani.

Összefoglalás

Az Amphipoda rákokhoz tartozó *Dicerogammarus villosus*-ról megállapítottuk, hogy képes cellulózt bontani. Ennek bizonyítása celluláz-aktivitás méréssel, továbbá a cellulóz lebontásából származó glukóz kimutatásával történt.

Az enzim legaktívabb 5,25–5,5 pH mellett.

A bontási folyamatok a hepatopankreaszban zajlanak le.

IRODALOM

- BAIER, C. R. (1936): Studien zur Hydrobakteriologie stehender Gewässer. — *Arch. f. Hydrobiol.* **29**, 183—264.
- BARTHEL, C. and BENGTSOON, N. (1924): Action of stable manure in the decomposition of cellulose in tilled soil. — *Soil. Sci.* **18**, 185—200 (cit. ap. FELFÖLDY 1958, 209 és 213).
- BIEDERMANN, W. und MORITZ (1898): Beiträge zur vergleichenden Physiologie der Verdauung. — *Pflügers Arch.* **73**, (cit. ap. BUDDENBROCK 1956, 174 és 176).
- BIERRY, H. und GIAJA, J. (1912): Untersuchungen über die Mannane, Galactane und Cellulosen angreifenden Enzyme. — *Biochem. Z.* **40**, (cit. ap. BUDDENBROCK 1956, 174 és 176).
- BUDDENBROCK, W. (1956): Vergleichende Physiologie. — *Birkhäuser Vlg. Basel u. Stuttgart* III + I—677.
- CRAMER, F. (1954): Papierchromatographie. — *Vlg. Chem. GMBH., Weinheim-Bergstr.* Nr. 64, 1—136.
- FELFÖLDY L. és F. KALKÓ ZSUZSA (1958): Cellulóz bontás mértéke a Balaton különböző biotópjaiban és annak mérése antron reagenssel. — *Annal. Biol. Tihany* **25**, 209—215.
- FJODOROV, M. V. (1952): Mikrobiológiai gyakorlatok. — *Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.* (Cit. ap. MÁRKUS L.-NÉ 1955, 207—214.)
- FLOKIN, M. et LOZER, F. (1949): Mise en évidence de bactéries cellulases dans le contenu intestinal de l'Escargot. — *Jour. de Physiol.* **41**, 178-A—179-A.
- JEWELL, M. E. and LEWIS, H. B. (1918): The occurrence of lichenase in the digestive tract of invertebrates. — *J. biol. Chem.* **33**, (cit. ap. BUDDENBROCK 1956, 174 és 178).
- KRÜGER, P. und GRAETZ, E. (1928): Die Fermente des Flusskrebs-Magensaftes. — *Zool. Jahrb. allg. Zool.* **45**, (cit. ap. BUDDENBROCK 1956, 174 és 178).
- KUZNIAR, K. (1956): Energia rozkladu blonniky w glebach lesnych. — *Ekologia Polska — Seria A* **4**, **2**, 21—34.
- LINSKENS, H. F. (1955): Papierchromatographie in der Botanik. — *Berlin—Göttingen—Heidelberg Springer-Vlg.* 1—253.
- MÁRKUS L.-NÉ (1954): Szénhidrátok meghatározása növényi anyagokban antron reagenssel I. — *Agrokémia és Talajtan* **3**, 227—234.
- MÁRKUS L.-NÉ (1955): Szénhidrátok meghatározása növényi anyagokban antron reagenssel II. Cellulázaktivitás mérése talajban és trágyában. — *Agrokémia és Talajtan* **4**, 207—216.
- OPPENHEIMER, C. (1925): Die Fermente und ihre Wirkungen. — *Georg Thieme (Vlg.) Leipzig* **1**, 1—775.
- PONYI, E. (1956): Ökologische, ernährungsbiologische und systematische Untersuchungen an verschiedenen Gammarus-Arten. — *Arch. f. Hydrobiol.* **52**, 368—387.
- PONYI, E. (1957): Untersuchungen über die Crustaceen der Wasserpflanzenbestände im Plattensee. — *Arch. f. Hydrobiol.* **53**, 537—551.
- RAY, D. L. and JULIAN, J. R. (1952): Occurrence of Cellulase in Limnoria. — *Nature* **169**, 32—33.
- RUBENTSCHIK, L. I. (1928): Zur Frage der aeroben Zellulosezersetzung bei hohen Salzkonzentrationen. — *Obl. Bakt. II.* **76**, 305—314. (*Bot. Zbl.* **16**, 426, 1930.)
- STEINER, M. (1931): Beiträge zur Kenntnis des Zellulose- und Chitinabbaues durch Mikroorganismen in stehenden Binnengewässern. — *75 Jahre Stella Matutina. Feldkirch 1931, Festschr.*, **2**, 367—402. (*Bot. Zbl.* **21**, 85, 1932.)
- ULLMANN, T. (1932): Über die Einwirkung der Fermente einiger Wirbellosen auf polymere Kohlenhydrate. — *Z. vgl. Physiol.* **17**, 520—536.
- WAKSMAN, S. A. (1926): Die Zellulose und ihre Zersetzung durch Mikroorganismen im Boden. — *Internat. agrik.-wiss. Rundsch. N. F.*
- WIERSMA, C. A. G. und VAN DER VEEN, R. (1928): Die Kohlenhydratverdauung bei *Astacus fluviatilis*. — *Z. vgl. Physiol.* **7**, 269—278.
- WOYNÁROVICH, E. (1955): Vorkommen der Limnomysis Benedeni Czern. im ungarischen Donauabschnitt. — *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.* **1**, 177—185.

UNTERSUCHUNGEN AN *DICEROGAMMARUS* ARTEN (CRUSTACEA, AMPHI-
PODA) AUS DEM BALATONSEE BEZÜGLICH DEREN KOHLEHYDRATEN-
VERDAUUNG

Jenő Ponyi

Zusammenfassung

Bezüglich des, zu den Amphipoden Krebsen gehörigen *Dicerogammarus villosus* wurde festgestellt, dass er imstande ist, Zellulose abzubauen. Der Beweis hiefür wurde durch Zellulose-Aktivitäts-Messungen sowie durch den Nachweis von, aus dem Abbau von Zellulose herstammender Glukose erbracht.

Das Ensim ist bei 5,25—5,5 pH am meisten aktiv.

Die Zersetzungsvorgänge erfolgen im Haepatopankreas.