

ANNA STRZELEC

WPŁYW WĘGLA I AZOTU NA NAMNAŻANIE *RHIZOBIUM*  
W PŁYNNYCH HODOWLACH

Zakład Mikrobiologii Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach

## WSTĘP

Jednym z czynników decydujących o efektywności szczepienia roślin motylkowatych jest wysokie miano komórek *Rhizobium* w szczepionkach. Jest ono szczególnie ważne w przypadku gdy szczepiona roślina jest uprawiana na glebie zawierającej specyficzne dla niej, autochtoniczne szczepy *Rhizobium*. Szczepy autochtoniczne charakteryzują się na ogół słabą aktywnością wiązania  $N_2$ , ale jako lepiej przystosowane do bytowania w danej glebie niż szczepy wprowadzane w szczepionkach stanowią dla nich silną konkurencję w zakażaniu roślin [21]. Wysoka liczebność komórek *Rhizobium* w szczepionce zwiększa konkurencyjność wprowadzanego w niej szczepu w stosunku do szczepów autochtonicznych [20, 21].

Miano komórek *Rhizobium* w szczepionce zależy od intensywności namnażania tych bakterii w płynnych hodowlach matek bakteryjnych oraz od ich przeżywalności po wprowadzeniu hodowli na nośnik szczepionki, którym w polskiej nitraginie jest pył z węgla brunatnego [20].

Na intensywność wzrostu hodowli matek bakteryjnych wpływa skład pożywki hodowlanej, zwłaszcza zaś rodzaj i ilość składników pokarmowych będących źródłem C i N.

Zdolność wykorzystania przez szczepy *Rhizobium* różnych rodzajów cukrów jako źródła C zależy od gatunku tych bakterii, a w obrębie gatunku od właściwości szczepu [4, 12, 26, 27]. Gatunki wolno rosnące są na ogół znacznie bardziej wyspecjalizowane w wykorzystywaniu różnych źródeł C niż gatunki szybko rosnące [27]. Rodzaj znajdującego się w podłożu źródła C może wpływać na aktywność nitrogenazy [14] i tym samym oddziaływać na efektywność szczepionek [5, 6].

Najlepiej wykorzystywanym przez *Rhizobium* źródłem azotu są aminokwasy, a niektóre z nich, np. cysteina i metionina, są konieczne do

zapoczątkowania wzrostu tych bakterii [9, 11]. W pożywkach hodowlanych stosowanym najczęściej źródłem N jest ekstrakt drożdżowy lub woda drożdżowa, zawierająca w 100 ml od 50 do 60 mg N aminokwasowego [26]. Na wzrost *Rhizobium*, oprócz rodzaju źródła N, wpływa również jego koncentracja w podłożu. Stwierdzono, że zbyt duża koncentracja związków azotowych w podłożu może oddziaływać niekorzystnie na namnażanie tych bakterii i powodować zmiany w budowie ich komórek [19, 22], natomiast zbyt mała ilość N w podłożu może ograniczać intensywność wzrostu *Rhizobium*.

Celem pracy było określenie składu podłoża optymalnego dla intensywnego namnażania się w nim szczepów *Rhizobium* służących jako szczepy mateczne do produkcji nitraginy.

#### MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Przedmiotem badań były szczepy reprezentujące różne gatunki *Rhizobium*, pochodzące z Kolekcji Zakładu Mikrobiologii IUNG w Puławach, które były lub są używane jako szczepy mateczne do produkcji nitraginy (tab. 1). Szczepy te przechowywane są w temperaturze  $+5^{\circ}\text{C}$ .

Badania wpływu składu podłoża na intensywność namnażania badanych szczepów *Rhizobium* prowadzono w płynnych hodowlach na zmodyfikowanej pożywce Thorntona, zawierającej jako źródło C różne rodzaje i ilości cukrów, a jako źródło N różne ilości ekstraktu drożdżowego. Niektóre serie pożywek wzbogacano dodatkowo glutaminianem sodu (tab. 1).

Oznaczenia składu pożywek:

— cukier (g/l): A — 10, B — 20, C — 30;

— ekstrakt drożdżowy — Ed (g/l): 1 — 0,4, 2 — 0,8, 3 — 1,2, 4 — 2,0, 5 — 4,0;

— glutaminian sodu — G1Na (g/l): a — 1,0, b — 2,0.

Hodowle półmatek bakteryjnych badanych szczepów przygotowano szczepiąc odpowiednie serie pożywek płynnych (tab. 1) 3-5-dniowym ich wzrostem na skosach agarowych z pożywką A1 z mannitolem. Po 3-5 dniach inkubacji w termostacie ze stałym wytrząsaniem oznaczano zmętnienie hodowli na spektrofotometrze przy długości fali  $480\ \mu\text{m}$ .

Hodowle matek bakteryjnych prowadzono w 100 ml kolbach Erlenmajera zawierających 25 ml pożywki płynnej (tab. 1). Do każdej kolby jako inokulum wprowadzano 2 ml hodowli półmatki bakteryjnej. Hodowle inkubowano przez 14 dni w temperaturze  $28^{\circ}\text{C}$  wytrząsając je 4 godziny dziennie. Bezpośrednio po zaszczepieniu pożywek oraz po 1, 3, 7 i 14 dniach inkubacji hodowli oznaczano ich zmętnienie i czystość.

Każda seria doświadczalna założona była w trzech powtórzeniach (rys. 1-5).

Tabela 1

Schemat doświadczeń — Scheme of experiments

| Nr doświadczenia<br>Experiment No. | Szczepy <i>Rhizobium</i><br><i>Rhizobium</i> strains   | Hodowla półmatki bakteryjnej<br>seria pożywki<br>ekstynkcja hodowli<br>Culture of bacteria half-mother<br>nutrient medium series<br>culture extinction                            | Hodowla matki bakteryjnej<br>rodzaj cukru<br>seria pożywki<br>Culture of bacteria mother<br>sugar kind<br>nutrient medium series |
|------------------------------------|--|---|--|
| 1                                  | 2  | 3   | 4  |
| I                                  | <i>Rh. trifolii</i> C-37<br><i>Rh. leguminosarum</i> P   | A1 z glukozą —<br>A1 with glucose<br>0,320<br>0,320   | glukoza — glucose<br><br>A1, B1, B2, B4, B5, C5  |
| II                                 | <i>Rh. trifolii</i> C-37<br><i>Rh. leguminosarum</i> P<br><i>Rh. meliloti</i> Thp  | B1 z glukozą —<br>B1 with glucose<br>0,240<br>0,260<br>0,260  | glukoza — glucose<br><br>B1, B1a, B1b, C1b, B2,<br>B2a, B4, B4a, B5, C5  |
| III                                | <i>Rh. trifolii</i> C-37<br>C-77<br>X<br><i>Rh. meliloti</i> 108<br>LC 310<br>Thp<br><i>Rh. leguminosarum</i> Og<br>P<br>Fa-65<br>308<br>312<br><i>Rh. lupini</i> Cz<br>271<br>T1<br><i>Rh. japonicum</i> 94p<br>31b/138 | A1 z glukozą —<br>A1 with glucose<br>0,120<br>0,280<br>0,240<br>0,260<br>0,160<br>0,140<br>0,330<br>0,105<br>0,065<br>0,170<br>0,210<br>0,120<br>0,120<br>0,150<br>0,080<br>0,350 | glukoza — glucose<br><br>A1, A1a, B1, B1a, B2, B3,<br>B4   |

## WYNIKI BADAŃ

W ustalaniu składu podłoża optymalnego dla namnażania szczepów *Rhizobium* używanych do produkcji nitraginy, szczególną uwagę zwrócono na określenie optymalnej koncentracji w podłożu ekstraktu drożdżowego oraz na możliwość wykorzystywania przez te bakterie glutamianu sodu jako dodatkowego źródła N. Badano ponadto wpływ na

cd. tabeli 1  
(Continued)

| 1     | 2  | 3                          |                 |   | 4  |       |
|-------|--|----------------------------|-----------------|---|--|-------|
| IV    | <i>Rh. trifolii</i> X<br>C-37  | B1-glukoza — B1-sacharoza  |                 | glukoza — glucose<br><br><i>B1, B1a, B2, B3</i><br><br>sacharoza — saccharose<br><br><i>B1, B1a, B2, B3</i> |  |       |
|       |  | B1-glucose — B1-saccharose |                 |   |  |       |
|       |  | 0,290                      | 0,300           |   |  |       |
|       |  | 0,230                      | 0,150           |   |  |       |
|       | <i>Rh. meliloti</i> Thp<br>LC-310  | 0,190                      | 0,220           |   |  |       |
|       |  | 0,190                      | 0,220           |   |  |       |
|       | <i>Rh. leguminosarum</i> P<br>Og<br>Fa-65<br>308<br>312<br>312p<br>D-141 | 0,250                      | 0,250           |   |  |       |
|       |  | 0,380                      | 0,380           |   |  |       |
|       |  | 0,180                      | 0,240           |   |  |       |
|       |  | 0,200                      | 0,180           |   |  |       |
|       |  | 0,270                      | 0,200           |   |  |       |
|       |  | 0,230                      | 0,170           |   |  |       |
|       |  | 0,360                      | 0,320           |   |  |       |
|       | <i>Rh. phaseoli</i><br>F-11<br>F-66                                      | 0,220                      | 0,160           |   |  |       |
| 0,120 |  | 0,170                      |                 |   |  |       |
| V     | B1<br>glukoza  | B1<br>arabinoza            | B1<br>galaktoza | B1<br>sacharoza   | glukoza, arabi-<br>noza,<br>galaktoza, sa-<br>charoza<br>glucose, arabi-<br>nose,<br>galactose, sac-<br>charose<br><i>B1, B2, B3</i> |       |
|       | glucose  | arabinose                  | galactose       | saccharose  |  |       |
|       | <i>Rh. lupini</i> 271  | 0,540                      | 0,305           | 0,530   |  | 0,170 |
|       | <i>Rh. japonicum</i> 94p   | 0,520                      | 0,310           | 0,470   |  | 0,160 |

Objaśnienia symboli — Explanation of symbols

Cukier — Sugar (g/l): A-10, B-20, C-30

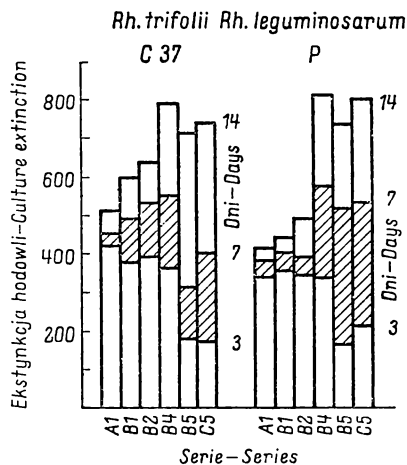
Ekstrakt drożdżowy — Yeast extract (g/l): 1 — 0,4, 2 — 0,8, 3 — 1,2, 4 — 2,0, 5 — 4,0

Glutaminian sodu — Sodium glutamine (g/l): a — 1,0, b — 2,0

ich namnażanie różnych rodzajów i różnych ilości cukrów służących jako źródło C i energii (tab. 1).

#### Doświadczenie I (rys. 1)

Hodując szczepy *Rh. trifolii* C 37 i *Rh. leguminosarum* P w płynnej pożywce Thorntona, zawierającej różne ilości glukozy i ekstraktu drożdżowego, stwierdzono, że zwiększenie ilości cukru z 10 do 20 g na litr pożywki (serie A1 i B1) oraz z 20 do 30 g na litr (serie B5 i C5) wpływało w stosunkowo niewielkim stopniu na intensywność wzrostu obu szczepów. Znacznie większy wpływ na namnażanie badanych szczepów miała ilość w pożywce ekstraktu drożdżowego. W hodowlach na pożywce z 0,4 i 0,8 g Ed na litr zapotrzebowanie *Rhizobium* na azot pokryte było jedynie w pierwszych dniach inkubacji, natomiast w drugim tygodniu hodowli intensywność namnażania była w tych seriach znacz-



Rys. 1. Wpływ różnych ilości w pożywce glukozy (A, B, C) i ekstraktu drożdżowego (1, 2, 4, 5) na intensywność namnażania szczepów *Rhizobium* (doświadczenie I). Wyniki podano jako średnie wartości ekstynkcji hodowli matek bakteryjnych. Objaśnienia: ilość cukru (g/l): A — 10, B — 20, C — 30; ilość ekstraktu drożdżowego — Ed (g/l): 1 — 0,4, 2 — 0,8, 3 — 1,2, 4 — 2,0, 5 — 4,0

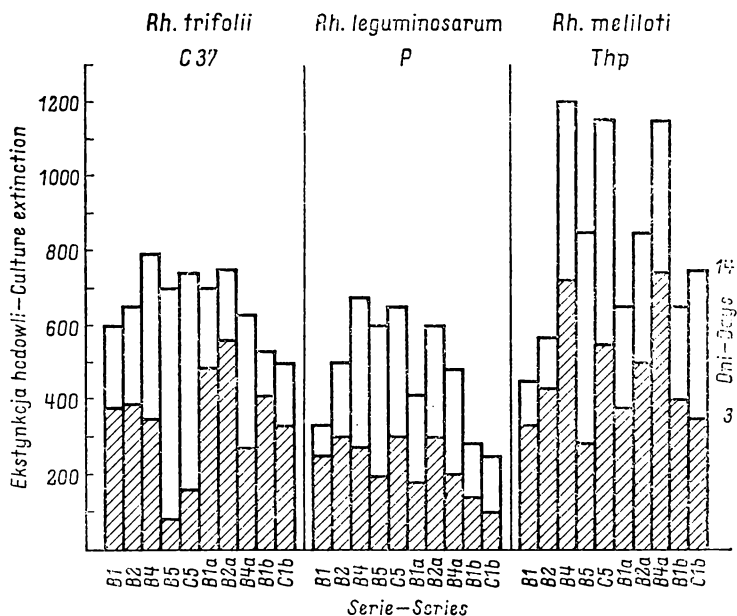
Fig. 1. Effect of different amounts of glucose (A, B, C) and the yeast extract (1, 2, 4, 5) in the nutrient medium on the *Rhizobium* strains proliferation intensity (Experiment I). Results are presented as mean values of the culture extinction of bacteria mothers. Explanations: sugar content (g/l): A — 10, B — 20, C — 30; yeast extract amount — Ed (g/l): 1 — 0.4, 2 — 0.8, 3 — 1.2, 4 — 2.0, 5 — 4.0

nie mniejsza niż w seriach B4 i B5 z 2,0 i 4,0 g Ed. Po dwóch tygodniach inkubacji największą wartość ekstynkcji miała hodowla na pożywce z 2,0 g Ed (seria B4) i tylko nieznacznie mniejszą w seriach z 4,0 g Ed (B5, C5). W hodowlach na pożywkach zawierających duże ilości Ed stwierdzono w pierwszych trzech dniach inkubacji wyraźne zahamowanie tempa wzrostu badanych szczepów w porównaniu z ich wzrostem na pożywce z 0,4 i 0,8 g Ed. Dodatek do badanych serii pożywek 10 g/l glutamianu sodu powodował całkowite zahamowanie w nich rozwoju *Rhizobium*.

W czasie inkubacji badanych szczepów stwierdzono znaczne zmiany odczynu hodowli. Wielkość i rodzaj tych zmian zależały od rodzaju szczepu i składu pożywki. W hodowlach szczepu *Rh. leguminosarum* P, niezależnie od składu podłoża, obserwowano wyraźny spadek pH, przy czym po 14 dniach inkubacji nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi seriami. Natomiast w hodowlach szczepu *Rh. trifolii* C 37 na pożywkach A1, B1, B2 i B4 następowało silne zakwaszenie podłoża, a w seriach B5 i C5 jego alkalizacja.

#### Doświadczenie II (rys. 2)

Uzyskane wyniki potwierdziły, że Ed w koncentracji niższej niż 2,0 g/l pożywki nie pokrywał zapotrzebowania badanych w tym do-

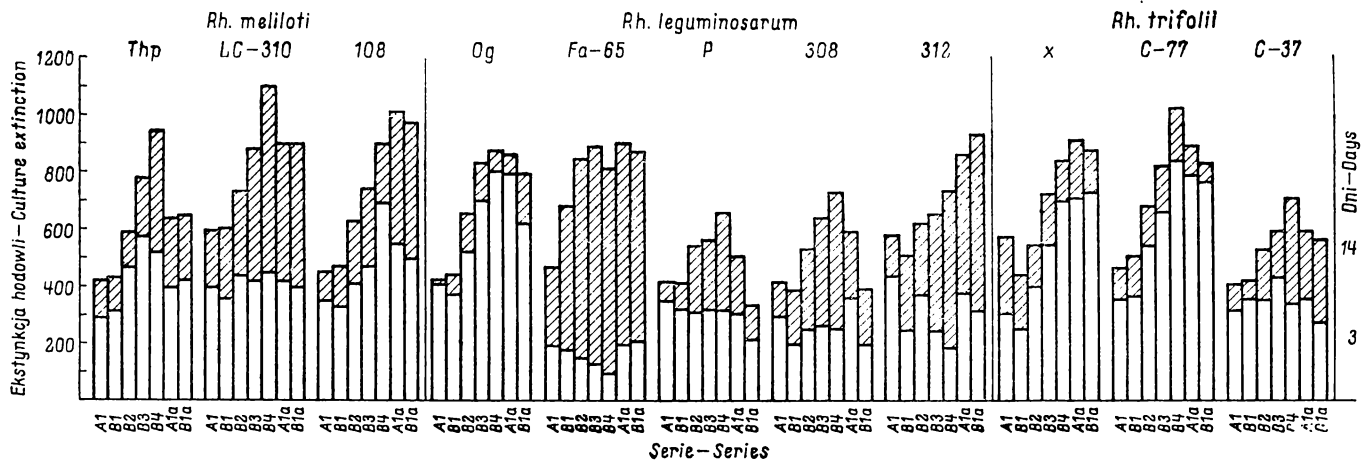


Rys. 2. Wpływ różnych ilości w pożywce glukozy (B, C), ekstraktu drożdżowego (1, 2, 4, 5) i glutaminianu sodu — GNa (g/l): a — 1,0, b — 2,0 na namnażanie szczepów *Rhizobium*. Doświadczenie II. Objasnienia jak na rys. 1

Fig. 2. Effect of different amounts of glucose (B, C), yeast extract (1, 2, 4, 5) and sodium glutamate — GNa (g/l): a — 1.0, b — 2.0 in the nutrient medium on the *Rhizobium* strains proliferation (Experiment II). Explanations see Fig. 1

świadczeniu szczepów *Rhizobium* na azot. Optymalne warunki rozwoju znalazły one w pożywce z serii B4, zawierającej 2,0 g *Ed* na liter. Podwojenie koncentracji *Ed* w pożywce (seria B5) powodowało zmniejszenie intensywności namnażania tych szczepów, szczególnie w pierwszych dniach inkubacji. Najwyraźniej było to widoczne w hodowli szczepu Thp, który najsilniej reagował na zwiększanie koncentracji *Ed* w podłożu. Zwiększenie ilości glukozy z 20 do 30 g na liter w pożywce zawierającej 4,0 g *Ed* zwiększało, począwszy od pierwszych dni inkubacji, wartość ekstynkcji hodowli. Badane szczepy wykorzystywały glutaminian sodu jako dodatkowe źródło N. Dodatek 1 g GNa do pożywki zawierającej 0,4 i 0,8 g *Ed* na 1 liter wyraźnie zwiększał wartość ekstynkcji hodowli tych szczepów. Jednak podwojenie koncentracji GNa (2,0 g/l) w pożywce zawierającej 0,4 g *Ed* powodowało, niezależnie od koncentracji w niej cukru, zmniejszenie wartości ekstynkcji hodowli szczepu C 37 i P i to zarówno w stosunku do serii B1 i B1a, jak też do pozostałych serii.

W czasie inkubacji badanych szczepów we wszystkich kombinacjach stwierdzono zakwaszenie podłoża.



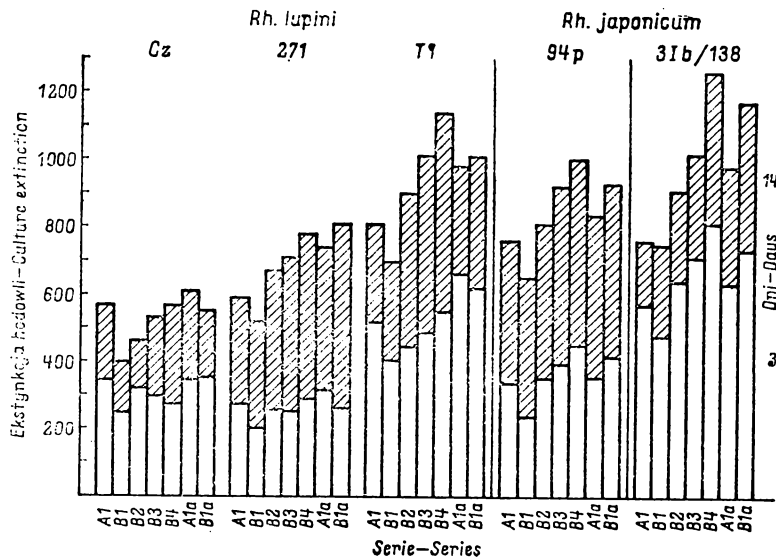
Rys. 3a. Wpływ różnych ilości w pożywce glukozy (A, B), ekstraktu drożdżowego (1, 2, 3, 4) i glutaminianu sodu ( $\alpha$ ) na namnażanie szybko rosnących gatunków *Rhizobium* (doświadczenie III). Objaśnienia jak na rys. 1

Fig. 3a. Effect of different amounts of glucose (A, B), yeast extract (1, 2, 3, 4) and sodium glutamate ( $\alpha$ ) in the nutrient medium on proliferation of quickly growing *Rhizobium* strains (Experiment III). Explanations see Fig. 1

Rys. 3b. Wpływ różnych ilości w pożywce glukozy (A, B), ekstraktu drożdżowego (1, 2, 3, 4) i glutaminianu sodu ( $\alpha$ ) na namnażanie wolno rosnących gatunków *Rhizobium* (doświadczenie III). Objaśnienia jak na rys. 1

Fig. 3b. Effect of different amounts of glucose (A, B), yeast extract (1, 2, 3, 4) and sodium glutamate ( $\alpha$ ) in the nutrient medium on proliferation of slowly growing *Rhizobium* strains (Experiment III). Explanations see Fig. 1

b)



### Doświadczenie III (rys. 3a i 3b)

W hodowlach na pożywkach zawierających różne ilości glukozy i ekstraktu drożdżowego, wzbogaconych dodatkowo glutaminianem sodu, badano intensywność wzrostu 16 szczepów reprezentujących różne gatunki *Rhizobium*. Szczepy te różniły się znacznie intensywnością wzrostu hodowli półmatek bakteryjnych (pożywka A1), tabela 1. Nie stwierdzono jednak zależności pomiędzy intensywnością namnażania poszczególnych szczepów w hodowlach półmatki a matki bakteryjnej. W hodowlach matek bakteryjnych, wraz ze zwiększeniem ilości w pożywce ekstraktu drożdżowego, następował wzrost wartości ekstynkcji. Natomiast na intensywność wzrostu bardzo mały wpływ miało zwiększenie w pożywce ilości glukozy. Wszystkie szczepy wykorzystywały glutaminian sodu jako dodatkowe źródło N, przy czym efektywność ich wzrostu w obecności glutaminianu była właściwością szczepową.

### Doświadczenie IV (rys. 4a i 4b)

Porównując wykorzystanie glukozy i sacharozy przez 18 szczepów z różnych gatunków *Rhizobium*, stwierdzono, że szczepy reprezentujące gatunki szybko rosnące wykazują znacznie mniejsze różnice w wykorzystywaniu obu cukrów jako źródła C i energii niż gatunki wolno rosnące — *Rh. lupini* i *Rh. japonicum*, dla których sacharoza była zdecydowanie gorszym źródłem C niż glukoza. Wśród szczepów szybko rosnących stwierdzono znacznie mniejsze różnice w wykorzystaniu obu cukrów, lecz na ogół sacharoza była nieco lepiej wykorzystywana niż glukoza, co szczególnie wyraźnie obserwowano w hodowlach szczepów *Rh. phaseoli*. W hodowlach badanych szczepów zarówno na pożywkach z glukożą, jak i sacharozą, wartość ekstynkcji na ogół zwiększała się wraz ze wzrostem w podłożu ilości ekstraktu drożdżowego. Wyjątek stanowiły szczepy *Rh. phaseoli*, których najintensywniejszy wzrost stwierdzono w seriach B2.

Wprowadzenie 1 g glutaminianu sodu na 1 l pożywki zawierającej 0,4 g *Ed* wyraźnie zwiększało intensywność wzrostu badanych szczepów. Wyjątek stanowiły szczepy *Rh. phaseoli*, których ekstynkcja hodowli na pożywce B1a była niższa niż na pożywce B1.

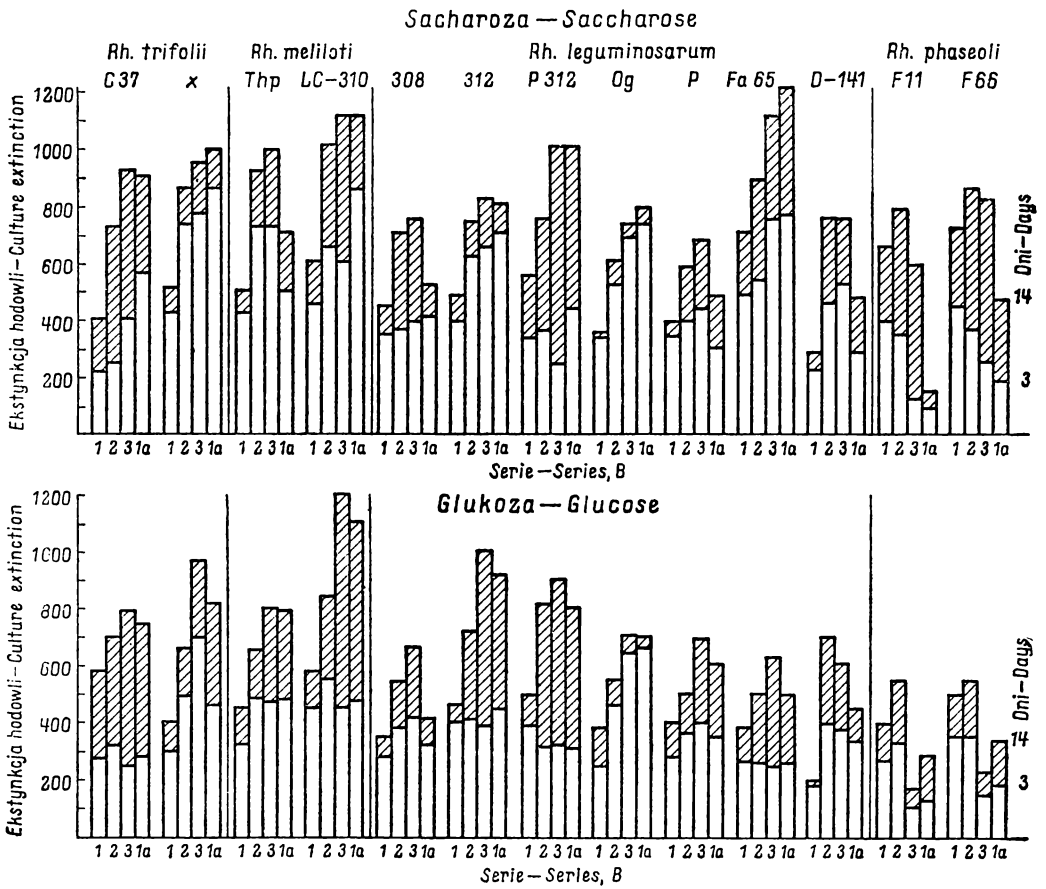
### Doświadczenie V (rys. 5)

Duże różnice w wykorzystaniu glukozy i sacharozy przez szczepy wolno rosnące skłoniły nas do porównania intensywności ich wzrostu

Ryc. 4b. Wpływ glukozy (B) oraz różnych ilości ekstraktu drożdżowego (1, 2, 3) i glutaminianu sodu (a) na namnażanie wolno rosnących gatunków *Rhizobium* (doświadczenie IV). Objasnienia jak na rys. 1

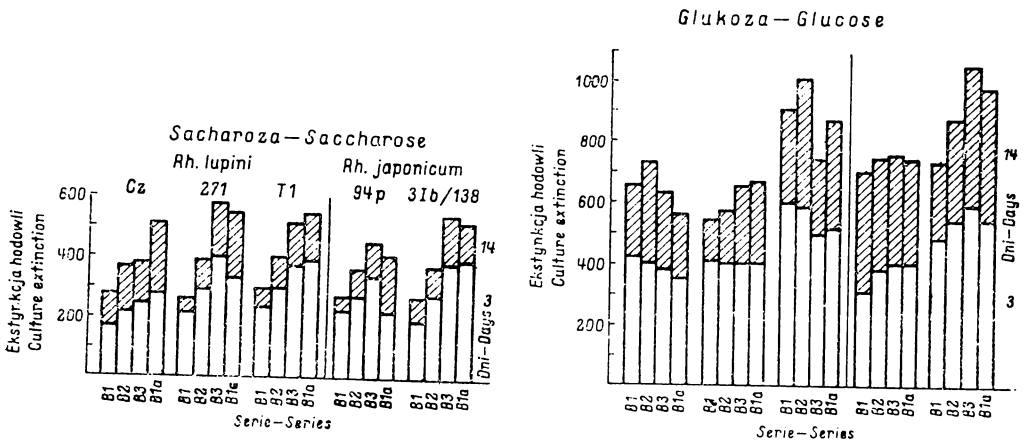
Fig. 4b. Effect of glucose (B) and saccharose (B) and of different yeast extract (1, 2, 3) and sodium glutamate amounts (a) on proliferation of slowly growing *Rhizobium* strains (Experiment IV) Explanations see Fig. 1





Rys. 4a. Wpływ glukozy (B) i sacharozy (B) oraz różnych ilości ekstraktu drożdżowego (1, 2, 3) i glutaminianu sodu ( $\alpha$ ) na namnażanie szybko rosnących gatunków *Rhizobium* (doświadczenie IV). Objasnienia jak na rys. 1

Fig. 4a. Effect of glucose (B) and saccharose (B) and of different yeast extract (1, 2, 3) and sodium glutamate amounts ( $\alpha$ ) on proliferation of quickly growing *Rhizobium* strains (Experiment IV). Explanations see Fig. 1



na pożywkach z czterema cukrami. Uzyskane wyniki potwierdziły, że glukoza jest dla tych bakterii bardzo dobrym źródłem C. Równie dobrze rosły one na galaktozie, natomiast zdecydowanie najgorszym źródłem C była dla nich sacharoza. Wartość ekstynkcji w hodowlach na pożywce z sacharozą była 3-4-krotnie niższa od wartości z hodowli z glukozą lub galaktozą. W hodowlach badanych szczepów na pożywce z arabinozą i galaktozą stwierdzono zakwaszanie podłoża, natomiast na pożywkach z sacharozą — alkalizowanie podłoża. W hodowlach na pożywkach z glukozą nie odnotowano zmian odczynu. Intensywność wzrostu badanych szczepów wyraźnie zwiększała się, niezależnie od wykorzystywanego przez nie źródła C, wraz ze wzrostem koncentracji w podłożu ekstraktu drożdżowego. Wraz ze wzrostem ilości *Ed*, w podłożu z sacharozą zwiększał się zasadowy odczyn hodowli badanych szczepów, a w hodowlach na pożywce z galaktozą zmniejszało się zakwaszenie podłoża.

#### DYSKUSJA WYNIKÓW

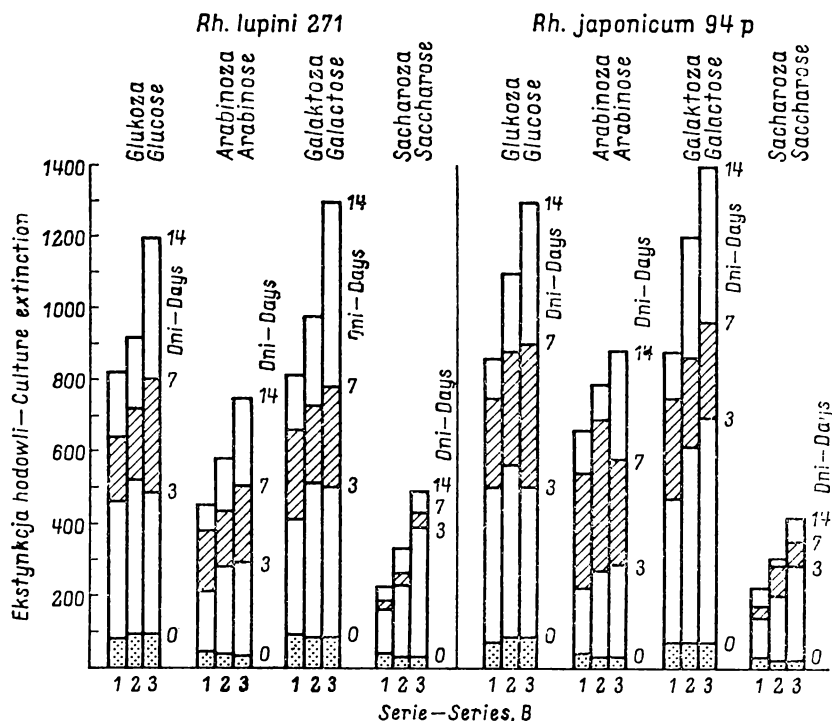
Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały zależność pomiędzy rodzajem i ilością w podłożu źródeł C i N a intensywnością namnażania badanych szczepów *Rhizobium*.

Gatunki szybko rosnące wykorzystywały zarówno glukozę, jak i sacharozę, przy czym sacharoza była przez nie lepiej wykorzystywana niż glukoza, co szczególnie wyraźnie stwierdzono w hodowlach *Rh. phaseoli*. Znacznie większe różnice w wykorzystywaniu różnych cukrów wykazały gatunki wolno rosnące, dla których sacharoza była najgorszym źródłem C. Było to zgodne z wynikami badań Martinez de Dretsa i in. [15], którzy wykazali, że wolno rosnące *Rhizobium* nie mają enzymów inwertazy i fosforylasy sacharozy i tym samym nie mogą wykorzystywać dwucukrów jako źródeł C, natomiast gatunki szybko rosnące indukują inwertazę rozczepiającą sacharozę.

Wykazany w naszych badaniach (rys. 5) intensywny wzrost szczepu *Rh. lupini* i *Rh. japonicum* na pożywce z galaktozą nie potwierdza wyników uzyskanych przez Neala i Walkera [16], którzy stwierdzili, że szczepy *Rh. japonicum* wykorzystywały arabinozę, natomiast nie rosły na pożywce z galaktozą. Przypuszczalnie zdolność wykorzystania cukrów jest właściwością nie tylko gatunkową, ale i szczepową.

Metabolizm węglowodanów w komórkach *Rhizobium* nie jest całkowicie poznany [2]. Występuje w nim wiele zjawisk dotychczas nie wyjaśnionych, np. zjawisko katabolicznej represji obserwowane u szczepów *Rh. trifolii* [18] lub odnotowany w hodowlach *Rh. meliloti* wzrost diauk-syczny [23].

Wood i Cooper [25] wykazali, że na metabolizm węglowodanów w



Rys. 5. Porównanie wpływu różnych cukrów (B) i różnych ilości ekstraktu drożdżowego (1, 2, 3) na namnażanie wolno rosnących gatunków *Rhizobium* (doświadczenie V). Objaśnienia jak na rys. 1

Fig. 5. Comparison of the effect of different amounts of sugar (B) and yeast extract (1, 2, 3) on proliferation of slowly growing *Rhizobium* strains (Experiment V). Explanations see Fig. 1

komórkach *Rhizobium* wpływa odczyn pożywki hodowlanej. Badając namnażanie *Rh. trifolii* w pożywce arabinozo-galaktozo-glutaminianowej stwierdzili pH-zależny, diauksyczny wzrost tych bakterii, będący reakcją wynikającą z metabolizmu glutaminianu. Są również dane, że metabolizowany mógł być także cukier [25]. Wiadomo, że w hodowlach *Rhizobium* — w wyniku nagromadzania wytwarzanych w procesach metabolicznych kwasów lub zasad — mogą wraz ze wzrostem gęstości hodowli następować zmiany wartości pH. Zmiany te z kolei powodują zmiany w metabolizmie komórek. Również w hodowlach badanych przez nas szczepów stwierdziliśmy znaczne zmiany odczynu, które zależały od składu pożywki i właściwości szczepu.

Gwałtowne zmiany pH hodowli *Rhizobium* obserwuje się niekiedy mimo stosowania w pożywkach glutaminianu sodu jako buforu pH. Tłumaczone to jest możliwością wykorzystywania przez te bakterie glutaminianu sodu jako źródła N, C i energii. W miarę wykorzystywania

glutaminianu przez komórki *Rhizobium* następuje redukcja buforowych właściwości pH pożywki i tym samym zwiększa się w podłożu ilość kwasów i zasad. Z chwilą, gdy gęstość komórek osiąga wartość  $10^6 - 10^7$  przekroczona zostaje buforowa pojemność podłoża i wartość jego pH gwałtownie zmienia się [24]. Podobne zjawisko obserwowaliśmy również w hodowlach na pożywce z glutaminianem sodu niektórych badanych przez nas szczepów. Istnieją ponadto dowody możliwości wykorzystywania glutaminianu jako źródła N, C i energii przez brodawki roślin motylkowatych. Optimum pH dla tych reakcji wynosi 6,0 - 7,0 [17].

Zdolność wykorzystywania glutaminianu jako źródła N potwierdziły wyniki badań Lehnintera [13]. Stwierdził on, że oksydacyjna deaminacja glutaminianu przez dehydrogenazę glutaminianową prowadzi do powstania alfa-ketoglutaranu i amoniaku, który może być wykorzystywany jako źródło N.

W naszych badaniach *Rhizobium* hodowano w pożywkach z ekstraktem drożdżowym jako podstawowym źródłem witamin i azotu. Ekstrakt ten jest najczęściej stosowanym źródłem N dla bakterii brodawkowych i uważa się go, obok kazeiny, za najdostępniejsze dla nich źródło tego pierwiastka, gdyż zawiera potrzebne do ich rozwoju aminokwasy [9, 11, 16].

Intensywność wzrostu badanych przez nas szczepów zależała w bardzo dużym stopniu od ilości ekstraktu drożdżowego znajdującej się w pożywce hodowlanej. Powszechnie zalecana do hodowli *Rhizobium* pożywka Thorntona, zawierająca 0,4 g *Ed* na litr, nie zaspokaja w pełni zapotrzebowania na N badanych szczepów, co szczególnie wyraźnie widoczne było podczas dłuższej ich hodowli. Na ogół wartość ekstynkcji badanych hodowli zwiększała się wraz ze wzrostem koncentracji ekstraktu drożdżowego. Optymalna dla ich wzrostu okazała się dawka 2,0 g *Ed* na litr pożywki. Podwojenie tej dawki wyraźnie hamowało rozwój *Rhizobium* w pierwszych dniach inkubacji, po czym następował intensywny ich wzrost. Po 14 dniach inkubacji wartość ekstynkcji tych hodowli była znacznie wyższa niż w seriach z 0,4 i 0,8 g *Ed* na litr i tylko nieznacznie niższa w hodowlach na pożywce z 2,0 g *Ed* na litr.

Badane przez nas szczepy wykorzystywały glutaminian sodu jako dodatkowe źródło azotu. Dodatek 1,0 g *G1Na* na litr pożywki zawierającej 0,4 i 0,8 g/l ekstraktu drożdżowego wyraźnie zwiększał intensywność namnażania tych szczepów. Wyjątek stanowiły szczepy *Rh. phaseoli*, których najintensywniejszy wzrost obserwowano w pożywce z 0,8 g ekstraktu, a wprowadzenie 1 g glutaminianu do pożywki z 0,4 g ekstraktu hamowało ich namnażanie.

Na ogół uważa się, że zbyt wysoka koncentracja N w podłożu może wywołać zmiany w metabolizmie *Rhizobium* i w budowie ich komórek oraz powodować obniżenie żywotności szczepów, co w efekcie prowadzi do utraty zdolności wiązania przez nie wolnego azotu we współżyciu

z roślinnym gospodarzem [10, 19]. Zalecana dla tych bakterii koncentracja azotu wynosi 140  $\mu\text{g/ml}$  pożywki [8]. *Rhizobium*, po rozpoczęciu wzrostu w obecności aminokwasów, może wykorzystywać jako źródło azotu również inne formy N, w tym N mineralny, np. N amonowy [7, 8, 25, 26] lub azotanowy [7, 16]. Rodzaj źródła N jest czynnikiem warunkującym tempo ich namnażania [13].

W niniejszej pracy uzyskano odpowiedź co do składu płynnej pożywki zapewniającej intensywne namnażanie badanych szczepów *Rhizobium*.

#### LITERATURA

- [1] Bergersen F. J. The growth of *Rhizobium* in synthetic media. Austr. J. Biol. Sci. 1961, 14 s. 349.
- [2] Elkan G. H., Kuykendall L. D. Carbohydrate metabolism. (In:) Nitrogen Fixation. V. 2., *Rhizobium* Ed. Broughton W. J. 1982. Clarendon Press, Oxford s. 147.
- [3] Fred E. B., Baldwin I. L., McCoy E. Root nodule bacteria and leguminous plants. Univ. of Wisconsin, Madison 1932.
- [4] Germida J. J. Growth of indigenous *Rhizobia* in soils amended with organic nutrients. Trans. XIII Congr. Int. Soc. of Soil Sci. V. 2., Hamburg 1986 s. 574.
- [5] Gołębiowska J. Wpływ żywienia *Rh. trifolii* i *Rh. meliloti* różnymi związkami węgla na ich aktywność w symbiozie z rośliną. Acta Microbiol. Pol. 1952, 1, 4 s. 327.
- [6] Gołębiowska J., Wróbel T. Przydatność różnych podłoży do produkcji szczepionek dla roślin motylkowych. Acta Microbiol. Pol. 1952, 1, 4 s. 313.
- [7] Graham P. H., Parker C. A. Diagnostic features in the characterisation of the root-nodule bacteria of legumes. Plant and Soil 1960, 20, 3 s. 383.
- [8] Jensen H. L., Schröder M. Urea and biuret as nitrogen sources for *Rhizobium* spp. J. Appl. Bacteriol. 1965, 28, 3 s. 473.
- [9] Jordan D. C. Studies on the legume nodules bacteria. III. Growth factors requirements for effective, ineffective and parasitic strains. Can. J. Microb. 1952, 30 s. 693.
- [10] Jordan D. C., Coulter W. H. On the cytology and synthetic capacities of natural and artificially produced bacteroids of *Rhizobium leguminosarum*. Can. J. Microbiol. 1965, 11 s. 709.
- [11] Jordan D. C., San Clemente C. L. The utilization of peptides and L and D amino acids by effective and ineffective strains of *Rhizobium meliloti*. Can. J. Microb. 1955, 1 s. 659.
- [12] Larne T. A., Peterson J. B., Tajima S. Carbon metabolism in the legume nodule. Adv. in Nitr. Fix. R. 1984 s. 437.
- [13] Lehninger A. L. Biochemistry. Worth, New York 1975.
- [14] Lisova N. E. Level of nitrogenase activity in *Rhizobium* related to the plant metabolites. Abs. Int. Symp. Interrelationships between microorganisms and plants in soil. Libice CSR, ed V. Skradleta, June 22-27, 1987, 13.
- [15] Martinez de Drets G., Aries A., Rovira de Cutinella M. Can. J. Microbiol. 1974, 20 s. 605.

- [16] Neal O. R., Walker R. H. Physiological studies on *Rhizobium*. J. Bacteriol., 1935, 30 s. 173.
- [17] Poole P. S., Franklin M., Glenn A. R., Dilworth M. J. The transport of L-glutamate by *Rhizobium leguminosarum* involves a common amino acid carrier. J. Gen. Microb. 1985, 131 s. 1441.
- [18] Ronson C. W., Primrose S. B. Effect of glucose on polyol metabolism by *Rhizobium trifolii*. J. Bacter. 1979, 139 s. 1075.
- [19] Skinner F. A. i in. Effect of yeast extract concentration on variability and cell distribution in *Rhizobium* spp. J. Appl. Bacteriol. 1977, 43, 2 s. 287.
- [20] Strzelec A. Symbiotyczne wiązanie wolnego azotu. I. Znaczenie bakterii symbiotycznych, ich występowanie w glebach i szczepionki *Rhizobium* dla roślin motylkowatych. Post. Nauk Rol. 1988, 4 s. 17 - 30.
- [21] Strzelec A. Symbiotyczne wiązanie wolnego azotu. II. Wpływ właściwości biotycznych i odczynu gleb na zdolność konkurencyjną szczepów *Rhizobium* i ich symbiozę z roślinnym gospodarzem. Post. Nauk Rol. 1988, 5/6 s. 19 - 28.
- [22] Strzelec A. Selekcja szczepów *Rhizobium leguminosarum* aktywnych w symbiozie z bobikiem uprawianym na glebie kwaśnej nawożonej azotem. Roczn. Glebozn. 1987, 38, 4 s. 55 - 69.
- [23] Ucker D. S., Singer E. R. Catabolite — repression — like phenomenon in *Rhizobium meliloti*. J. Bacter. 1978, 136 s. 1197.
- [24] Wood M., Cooper J. E. Acidity, aluminium and multiplication of *Rhizobium trifolii*: effects of initial inoculum density and growth phase. Soil Biol. Biochem. 1988, 20, 1 s. 83.
- [25] Wood M., Cooper J. E. Acidity, aluminium and multiplication of *Rhizobium trifolii*: effects of temperature and carbon source. Soil Biol. Biochem. 1988, 20, 1 s. 89.
- [26] Vincent J. M. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Int. Biol. Progr. Blackwell Sci. Publ. Oxford 1970.
- [27] Vincent J. M. Root-nodule symbioses with *Rhizobium*. Biol. Nitrogen Fixation, Ed. A. Quispel, Amsterdam 1974 s. 268.

#### А. СТШЕЛЕЦ

### ВЛИЯНИЕ УГЛЕРОДА И АЗОТА НА РАЗМНОЖЕНИЕ *RHIZOBIUM* В ЖИДКИХ КУЛЬТУРАХ

Отдел микробиологии Института агротехники, удобрения и почвоведения в Пулавах

#### Резюме

Исследовали влияние состава питательной среды на интенсивность размножения штаммов *Rhizobium* используемых для производства прививок для бобовых растений. Штаммы, разных видов *Rhizobium* выращивали на модифицированной жидкой питательной среде Торнтонна, содержащей в качестве источника С разные виды и количества сахаров, а в качестве источника N — разные количества дрожжевого экстракта, а в некоторых сериях дополнительно глютамат натрия.

Установлена четкая зависимость между видом и количеством источников С и N в питательной среде и интенсивностью размножения клеток исследуемых штаммов.

Быстро растущие виды *Rhizobium* использовали как источник С равным образом сахарозу и глюкозу, причем сахароза использовывалась лучше особенно в культурах штаммов *Rh. phaseoli*. Более значительные различия в способности использования разных сахаров показывали медленно растущие виды *Rhizobium*, для которых сахароза была заметно худшим источником С, чем глюкоза и галактоза, а также арабиноза.

Установлена четкая зависимость между интенсивностью размножения исследуемых штаммов в жидкой питательной среде Торнтона и содержанием в ней дрожжевого экстракта. Нормальное количество дрожжевого экстракта (0,4 г/л) не покрывало потребностей исследуемых штаммов в азоте, особенно в случае их длительной культуры. Густота культуры в общем повышалась по мере новышения и концентрации дрожжевого экстракта в питательной среде до 2,0 г/л.

Исследуемые штаммы использовали глютамат натрия как дополнительный источник N. Прибавка глютамата в количестве 1 г/л питательной среды содержащей 0,4 и 0,8 г/л дрожжевого экстракта обычно заметно повышала интенсивность размножения исследуемых штаммов.

A. STRZELEC

CARBON AND NITROGEN EFFECTS  
ON PROLIFERATION OF *RHIZOBIUM* IN LIQUID CULTURES

Department of Microbiology, Institute of Soil Science and Plant Cultivation  
at Puławy

S u m m a r y

The effect of the nutrient medium composition on the proliferation of *Rhizobium* strains used for production of inoculants for leguminous plants was investigated. Various *Rhizobium* strains were cultivated on a modified Thornton's liquid nutrient medium containing as the C source different kinds and amounts of sugars, while as the N source — different amounts of yeast extract and in some series additionally of sodium glutamate were applied.

A distinct relationship between the kind and amount of C and N sources in the nutrient medium and the intensity of the strains proliferation has been found.

The quickly growing *Rhizobium* strains used as the C sources both saccharose and glucose; the saccharose being better utilized, particularly in the cultures of *Rhizobium phaseoli* strains. Much greater differences in the ability of utilizing various sugars showed the slowly growing *Rhizobium* strains, for which saccharose constituted a distinctly worse source of C than glucose and galactose as well as arabinose.

A distinct relationship between the proliferation intensity of the strains tested on the Thornton's liquid nutrient medium and the amount of yeast extract in it has been proved. A normal yeast extract amount in the medium (0.4 g/l) did not cover the N demand of the strains tested, particularly during their longer incubation. In general the culture density increased along with increasing yeast extract concentration in the medium up to 2.0 g/l. Sodium glutamate was utilized by the strains tested as an additional N source. An addition of sodium glutamate in the amount of 1 g/l of the nutrient medium containing 0.4 and 0.8 g/l of the yeast extract increased usually distinctly the proliferation intensity of the strains tested.

Doc. dr hab. Anna Strzelec  
Zakład Mikrobiologii IUNG  
24-100 Puławy, Osada Pałacowa

Praca wpłynęła do redakcji w grudniu 1988 r.