

Teresa URBANIK, Jolanta KOŁTUN,
Zbigniew LORKIEWICZ

**Asymbiotyczne wiązanie azotu przez *Rhizobium trifolii* T37
w obecności 2-fenyletanolu**

Ассимбиотическое связывание азота *Rhizobium trifolii* T37 в присутствии
2-фенилэтанола

Asymbiotic Nitrogen Fixation by *Rhizobium trifolii* T37 in the Presence
of 2-phenylethanol

W opublikowanych do tej pory pracach na temat asymbiotycznego wiązania azotu przez hodowle *Rhizobium* opisywano wpływ różnych czynników na efektywność tego procesu. Spośród najważniejszych można wymienić: stężenie tlenu, skład pożywki, pH, temperaturę, dynamikę wzrostu hodowli, źródło azotu związanego, źródło węgla i inne składniki niezbędne w metabolizmie *Rhizobium* (1, 5, 6, 10).

Badano również procesy zachodzące w brodawkach roślin motylkowych przy przejściu wegetatywnych form *Rhizobium* w aktywnie wiążące azot bakteroidy; wśród nich stwierdzono zmiany w kompleksie ściana komórkowa—membrana cytoplazmatyczna (9, 13).

We wcześniejszych badaniach (7) wykazano, że szczep *Rhizobium trifolii* T37 zakażający koniczynę wiąże azot w pożywce syntetycznej w warunkach *in vitro*. Próbowano wyjaśnić, czy zmiany morfologiczne i fizjologiczne komórek *Rhizobium*, wywołane działaniem niektórych czynników, będą miały wpływ na proces asymbiotycznego wiązania azotu. Spośród wielu czynników wpływających na morfologię i właściwości fizjologiczne bakterii wybrano 2-fenyletanol (PEA) i zbadano jego działanie na hodowlę *Rhizobium trifolii* wiążącą azot *in vitro*. Czynniki te wywierają działanie na różne procesy komórkowe, ale mechanizm wywoływanych przez niego efektów nie jest jeszcze dokładnie wyjaśniony. Wiadomo, że

PEA wywołuje zmiany zarówno w membranie cytoplazmatycznej, jak i w zewnętrznej membranie zawierającej lipopolisacharyd. W stężeniach nietoksycznych PEA powoduje: zahamowanie inicjacji biosyntezy DNA (przy równoczesnej nie zmienionej syntezie RNA i białek), zmiany w potencjale jonowym membrany cytoplazmatycznej powodujące wyciek pewnych substancji z cytoplazmy. Fenyloetanol i fenoksyetanol wywierają na *Escherichia coli* efekt letalny, hamują syntezy makromolekularne (DNA, RNA, białka) i powodują wyciekanie składników wewnątrzkomórkowych (2, 3, 12).

W niniejszej pracy badano wpływ fenyloetanolu na wzrost *R. trifolii* T37 w płynnej pożywce syntetycznej i aktywność redukcji acetylenu.

MATERIAŁY I METODY

Szczep bakteryjny: *Rhizobium trifolii* T37 (7):

Podłoża: 1) stałe Thorntona (Th), 2) płynne (11) z dodatkiem 50 mM D-arabiny.

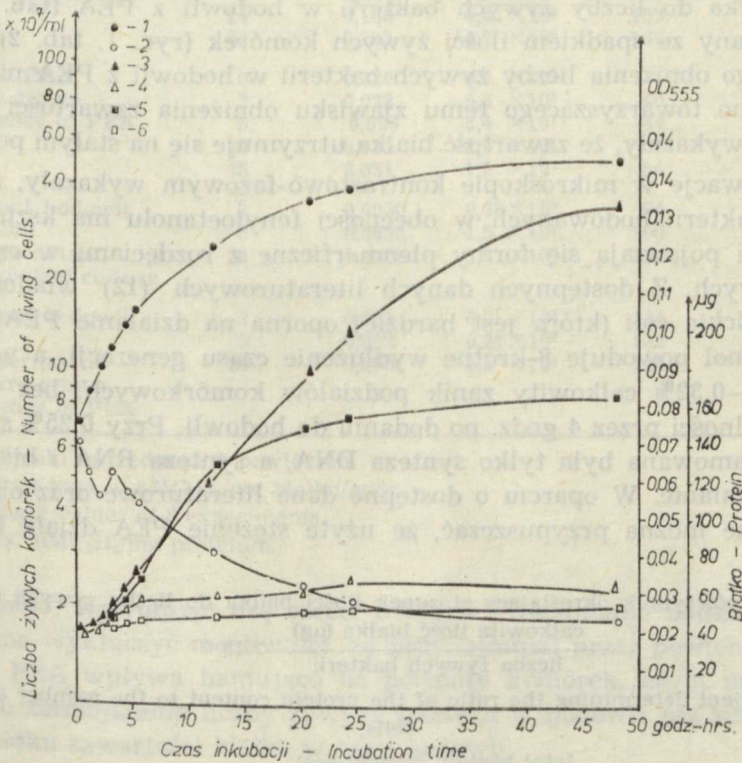
Do 5 ml pożywki płynnej (11) wprowadzano uszko ezy szczepu *R. trifolii* T37 ze stałego podłoża Th i hodowano z wytrząsaniem w temp. 28°C przez 18 godz. Następnie przenoszono hodowlę do świeżej pożywki w stosunku 1:10 (hodowla kontrolna) oraz do pożywki zawierającej 2-fenyloetanol w stężeniu końcowym 0,25% v/v i inkubowano bez wytrząsania w temp. 28°C. Po czasie: 0, 3, 5, 12, 24 i 48 godz. inkubacji w obu hodowlach oznaczano: gęstość optyczną (OD_{535}), liczbę żywych bakterii (metodą posiewów), całkowitą zawartość białka i aktywność nitrogenazy. W części doświadczeń wyżej wymienione oznaczenia przeprowadzono również w supernatantach badanych hodowli otrzymanych po odwirowaniu bakterii przy 10 tys. obrotów/min. przez 15 min.

Całkowitą ilość białka oznaczano metodą Lowry (8). Zawartość białka w supernatantach mierzono wobec kontroli z pożywką (bez i z dodatkiem 0,25% v/v fenyloetanolu).

Oznaczanie aktywności nitrogenazy. Próbkę zawierającą 5 ml badanych hodowli *Rhizobium* w 20 ml probówkach zamykano korkami gumowymi, usuwano powietrze i wprowadzano azot (zanieczyszczenie azotu tlenem usuwano przy użyciu płuczki z zasadowym roztworem pirogallolu) z acetylenem 10% v/v. Tak przygotowane próbki inkubowano bez wytrząsania w 28°C przez 2 godz. Po tym czasie oznaczano zawartość acetyleny i etylenu na chromatografii gazowej GCHF 18.3-4 z detekcją płomieniowo-jonizacyjną na kolumnach (4 mm×2 m) wypełnionych Porapakem T (4). Aktywność nitrogenazy obliczano na podstawie procentu konwersji acetyleny do etylenu i wyrażano w nM powstającego etylenu w przeliczeniu na mg białka na godzinę (nM C_2H_4 /mg białka/godz.). Jako kontrole stosowano próbki z samą pożywką oraz hodowlę bez acetyleny.

WYNIKI I DYSKUSJA

Przebadano wpływ fenyloetanolu w stężeniu 0,25% v/v na wzrost szczepu *R. trifolii* T37 w pożywce syntetycznej (11). Wyniki pomiarów liczby żywych bakterii, gęstości hodowli (OD) przy 555 nm oraz zawartości białka w hodowli kontrolnej i z PEA przedstawia ryc. 1. Z krzywych gęstości optycznej i liczby żywych bakterii wynika, że do ok. 18 godziny (od momentu odmłodzenia) stopniowo wzrasta liczba bakterii w hodowli kontrolnej, a po tym czasie utrzymuje się prawie na stałym poziomie. Przebieg krzywej obrazującej wyniki pomiarów całkowitej ilości białka po określonych czasach inkubacji jest podobny. Natomiast obec-



Ryc. 1. Kinetyka wzrostu *R. trifolii* T37 w pożywce syntetycznej (11) bez i z dodatkiem 0,25% 2-fenyloetanolu; 1 — liczba żywych bakterii w hodowli kontrolnej, 2 — z PEA, 3 — gęstość optyczna (OD₅₅₅) hodowli kontrolnej, 4 — z PEA, 5 — zawartość białka w hodowli kontrolnej, 6 — z PEA

The kinetics of growth of *R. trifolii* T37 on synthetic medium (11) in absence and presence of 0.25% 2-phenylethanol; 1 — number of living cells in control culture, 2 — in presence of PEA, 3 — optical density (OD₅₅₅) in control culture, 4 — in presence of PEA, 5 — protein content in control culture, 6 — in presence of PEA

ność 0,25% PEA wywołuje spadek liczby bakterii, z wyjątkiem 3 godziny, kiedy zauważono lekki wzrost liczby żywych komórek. Ten mały szczyt stwierdzano zawsze w 6 niezależnych potwórzaniach. W porównaniu z hodowlą kontrolną liczba żywych bakterii w pożywce z feniloetanołem jest dwukrotnie niższa (po 3 godz.) i dwudziestokrotnie niższa po 24 godz. inkubacji.

Z porównania przebiegu krzywej wzrostu bakterii w pożywce z feniloetanołem z całkowitą zawartością białka mierzoną po określonych czasach inkubacji (ryc. 1) wynika, że ilość białka utrzymuje się na stałym poziomie mimo wyraźnego spadku liczby żywych bakterii w miarę przedłużania czasu inkubacji (tab. 1). Wzrost współczynnika zawartości białka do liczby żywych bakterii w hodowli z PEA (tab. 1) był skorelowany ze spadkiem ilości żywych komórek (ryc. 1, tab. 2). Mimo wyraźnego obniżenia liczby żywych bakterii w hodowli z PEA nie zaobserwowano towarzyszącego temu zjawisku obniżenia zawartości białka; pomiary wykazały, że zawartość białka utrzymuje się na stałym poziomie.

Obserwacje w mikroskopie kontrastowo-fazowym wykazały, że większość bakterii hodowanych w obecności feniloetanolu ma kształt wydłużony i pojawiają się formy pleomorficzne z rozdęciami w częściach biegunowych. Z dostępnych danych literaturowych (12) wiadomo, że u *Escherichia coli* (która jest bardziej oporna na działanie PEA) 0,25% feniloetanol powoduje 8-krotne wydłużenie czasu generacji, a w stężeniu 0,28—0,32% całkowity zanik podziałów komórkowych, bez zmiany przeżywalności przez 4 godz. po dodaniu do hodowli. Przy 0,25% stężeniu PEA zahamowana była tylko synteza DNA, a synteza RNA i białek nie ulegała zmianie. W oparciu o dostępne dane literaturowe oraz obserwacje własne można przypuszczać, że użyte stężenie PEA działa letalnie

Tab. 1. Współczynnik określający stosunek ilości białka do liczby żywych bakterii:

$$\frac{\text{całkowita ilość białka } (\mu\text{g})}{\text{liczba żywych bakterii}} \times 10^{-8}$$

The coefficient determining the ratio of the protein content to the number of living cells:

$$\frac{\text{total protein content } (\mu\text{g})}{\text{number of living cells}} \times 10^{-8}$$

Czas inkubacji (godz.) Time of incubation (hours)	Hodowla kontrolna Control culture	Hodowla z PEA Culture in presence of PEA
3	7,8	15
5	7,0	26
24	6,9	52
48	6,9	56

Tab. 2. Wpływ fenyletanolu (0,25%) na aktywność redukcji acetylenu przez *R. trifolii* T37 *The effect of 2-phenylethanol (0.25%) on acetylene reduction activity of *R. trifolii* T37 *

Próbka Sample	Czas inkubacji (godz.) Time of incubation (hrs.)	Gęstość optyczna OD ₅₃₅ Optical density OD ₅₃₅	Liczba żywych bakterii Number of living cells	Całkowita ilość białka (μg) Total protein content (μg)	Aktywność nitroge- nazy ** Nitro- genase activity **
Hodowla kontrolna Control culture (without PEA)	0	0,020	$0,7 \times 10^8$	—	—
	3	0,025	$1,2 \times 10^8$	47	85
	5	0,034	$1,9 \times 10^8$	67	33
	24	0,100	$4,4 \times 10^8$	153	4,0
	48	0,133	$4,7 \times 10^8$	164	3,0
Hodowla z PEA Culture grown in presence of PEA	0	0,020	$6,3 \times 10^7$	—	—
	3	0,022	$5,3 \times 10^7$	40	0,3
	5	0,026	$3,4 \times 10^7$	44	64,4
	24	0,033	$2,0 \times 10^7$	51	101,8
	48	0,031	$1,9 \times 10^7$	54	43,3
Supernatant hodowli kontrolnej The supernatant of the control culture	3	0,0030	$0,28 \times 10^7$	84	0,5
	5	0,0035	$1,5 \times 10^7$	100	3,3
	24	0,0120	$3,9 \times 10^7$	122	2,8
Supernatant hodowli z PEA The supernatant of culture grown in presence of PEA	3	0,003	$0,3 \times 10^7$	144	3,0
	5	0,002	$0,27 \times 10^7$	136	4,5
	24	0,006	$1,5 \times 10^7$	128	4,2

* Wyniki są średnią z 6 powtórzeń.

** Wyrażona w nMC₂H₄/mg białka/godz.

* Mean values of 6 experiments.

** As: nMC₂H₄/mg protein/h.

na *Rhizobia*, wywołując lizę części bakterii i uwalnianie białka. Jednak nie można wykluczyć możliwości, że przynajmniej przez pewien czas inkubacji PEA wpływa hamująco na podziały komórek, czym można by wyjaśnić zmniejszanie liczby żywych bakterii w hodowli bez równoczesnego spadku zawartości białka w całej hodowli.

Aktywność nitrogenazy obu hodowli oznaczano metodą redukcji acetylenu do etylenu po określonych czasach inkubacji. Wyniki pomiarów zestawiono w tab. 2. Zdolność do redukcji acetylenu przez hodowlę z dodatkiem PEA pojawia się później w porównaniu z hodowlą kontrolną i jest wyższa w przeliczeniu na stałą ilość białka. Niestety, na podstawie otrzymanych wyników i dostępnych informacji o mechanizmie działania PEA (2, 3, 12) nie możemy wyjaśnić tego zjawiska. Ponieważ przypuszczano, że obecność fenyletanolu, oprócz zauważonych mikroskopowo zmian w mor-

fologii *Rhizobium*, wywołuje uwalnianie pewnych składników cytoplazmatycznych, przeprowadzono wirowanie badanych hodowli. W uzyskanych supernatantach stwierdzono obecność żywych bakterii, których ilość zależała od gęstości hodowli. W przypadku hodowli kontrolnej w supernatantach pozostawało 12—40 razy, a w hodowlach z PEA 2—17 razy mniej bakterii w stosunku do całych hodowli. Stwierdzono również obecność białka w badanych supernatantach: w hodowli kontrolnej ilość białka była proporcjonalna do pozostałych bakterii, natomiast w hodowli z fenoloetanolem więcej było białka mimo mniejszej ilości pozostałych bakterii (tab. 2). Częściowo potwierdzałoby to przypuszczenie, że prawdopodobnie dochodzi do uwalniania białka z komórek w obecności PEA. Pomiary zdolności redukcji acetyleny przez supernatanty wykazały, że ich aktywność jest nieznaczna i prawdopodobnie związana z obecnością żywych bakterii w supernatantach (tab. 2).

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że obecność 0,25% fenoloetanolu w hodowli *R. trifolii* T37, wiążącej asymbiotycznie azot, wywiera pośrednio wpływ na efektywność tego procesu. Działanie badanego czynnika jest wielokierunkowe i dotyczy zarówno zmian morfologicznych, jak i procesów fizjologicznych. Opierając się o przeprowadzone obserwacje i dane z piśmiennictwa, możemy przypuszczać, że uzyskane wyniki są efektem oddziaływania tego związku na syntezy makromolekularne lub na kompleks ściana komórkowa—membrana cytoplazmatyczna.

PIŚMIENNICTWO

1. Bergersen F. J., Turner G. L.: The Role of O_2 -Limitation in Control of Nitrogenase in Continuous Cultures of *Rhizobium* sp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **73**, 524—531 (1976).
2. Gilbert P., Beveridge E. G., Crone P. B.: Effect of Phenoxylethanol on the Permeability of *Escherichia coli* NCTC 5933 to Inorganic Ions. *Microbios* **75**, 11—26 (1977).
3. Gilbert P., Beveridge E. G., Crone P. B.: The Lethal Action of 2-phenoxylethanol and Its Analogues upon *Escherichia coli* NCTC 5933. *Microbios* **76**, 125—141 (1977).
4. Hardy R. W. F., Holsten R. D.: Symbiotic Fixation of Atmospheric Nitrogen. U. S. Patent 3704546 (1972).
5. Keister D. L., Evans W. R.: Oxygen Requirement for Acetylene Reduction by Pure Cultures of *Rhizobia*. *J. Bact.* **129**, 149—153 (1976).
6. Keister D. L., Rao V. R.: The Physiology of Acetylene Reduction in Pure Cultures of *Rhizobia*. Proceedings in the Second International Symposium. Recent Developments in Nitrogen Fixation. Acad. Press. Salamanca 1976, 419—430.
7. Lorkiewicz Z., Russa R., Urbanik T.: Nitrogen Fixation by *Rhizobium* in Pure Cultures. *Acta Microbiol. Polon.* **27**, 5—9 (1978).

8. Lowry O. H., Rosebrough J. N., Farr A. L., Randall R. J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265—275 (1951).
9. Pankhurst C. E., Craig C. E.: Morphology and Nitrogenase Activity of Agar Cultures and Root Nodules Formed by D-cycloserine-resistant Mutants of *Rhizobium* sp. Strain 32H1. *J. Gen. Microbiol.* **110**, 177—184 (1979).
10. Scowcroft W. R., Gibson A. H., Pagan J. D.: Nitrogen Fixation in Cultured Cowpea *Rhizobia*: Inhibition and Regulation of Nitrogenase Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **73**, 516—523 (1976).
11. Tjepkema J., Evans J.: Nitrogen Fixation by Free Living *Rhizobium* in a Defined Liquid Medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**, 625—628 (1975).
12. Treick R. W., Konetzka W. A.: Physiological State of *Escherichia coli* and the Inhibition of Deoxynucleic Acid Synthesis by Phenethyl Alcohol. *J. Bact.* **88**, 1580—1584 (1964).
13. Van Brussel A. A. N., Planque K., Quispel A.: The Wall of *Rhizobium leguminosarum* in Bacteroids and Free-living Forms. *J. Gen. Microbiol.* **101**, 51—56 (1977).

РЕЗЮМЕ

Штамм *Rhizobium trifolii* T37 обнаруживал способность связывания атмосферного азота при соответствующих условиях в синтетической питательной среде. Изучено влияние 0,25% фенилэтанола (PEA) на активность связывания азота. Установлено, что этот фактор оказывает тормозящее влияние на деление клеток. Добавка PEA не влияла на количество производимого белка. Относительная активность редукции ацетилена по сравнению с содержанием белка в культурах *Rhizobium*, размноженных в присутствии PEA, была выше, чем в контрольных культурах.

SUMMARY

The strain *Rhizobium trifolii* T37 was able under appropriate conditions to fix atmospheric nitrogen in synthetic medium. The effect of 0.25% 2-phenylethanol (PEA) on dinitrogen fixation activity was studied. It has been shown that this factor has an inhibitory effect on cell division. The level of protein produced remained unaltered in the presence of PEA. The activity of acetylene reduction, in ratio to the protein content of rhizobial cultures, grown in the presence of PEA, was higher than that in the control culture.

