

## WPLYW pH NA ZDOLNOŚĆ WIAZANIA AZOTU ATMOSFERYCZNEGO PRZEZ *Acetobacter diazotrophicus*

*Justyna Klama, Alicja Niewiadomska, Dorota Swędrzyńska*

Katedra Mikrobiologii Rolnej,  
Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu

### Wstęp

W glebie występuje wiele gatunków drobnoustrojów spełniających znaczącą rolę w obiegu pierwiastków w środowisku naturalnym. Najważniejszymi wśród nich są bakterie wiążące azot atmosferyczny, współzyskując z roślinami motylkowatymi [MORA, LARA 1988]. Jednak poza tą grupą drobnoustrojów dużą rolę w światowym rolnictwie odgrywają również bakterie wolnożyjące lub wchodzące w ścisłe asocjacje z różnymi gatunkami roślin uprawnych, zwane endofitami [MAĐRZAK 1995].

*Acetobacter diazotrophicus* jest gatunkiem bakterii endofitycznej, występującej powszechnie pod uprawami roślin charakterystycznych dla tropikalnego klimatu, takimi jak: trzcina cukrowa, słodkie ziemniaki, sorgo oraz różne gatunki traw, pod którymi efektywnie wiąże azot atmosferyczny, pokrywając w znacznym stopniu zapotrzebowanie roślin na ten pierwiastek [BALDANI 2000].

Wszystkie mikroorganizmy są zdolne do przeprowadzania swoich funkcji życiowych tylko w określonym zakresie pH środowiska. Większość drobnoustrojów jest dość wrażliwa na zmiany stężenia jonów wodorowych i rozwija się w dość wąskim zakresie pH. Określone stężenie jonów wodorowych może nie wpływać bezpośrednio na wzrost bakterii lecz modyfikować ich właściwości fizjologiczne.

Wiele dotychczasowych badań potwierdziło, że różnorodne czynniki środowiskowe wpływają na aktywność enzymatyczną drobnoustrojów. Enzymem odpowiadającym za proces wiązania azotu u bakterii jest nitrogenaza. Wykazano, że aktywność nitrogenazy jest uwarunkowana wieloma czynnikami, m.in. stężeniem jonów wodorowych w środowisku [NORDULT, URETA 2002].

Celem przeprowadzonego eksperymentu było zbadanie wpływu różnych zakresów stężeń jonów wodorowych na aktywność wiązania azotu przez *Acetobacter diazotrophicus* oraz określenie granicznych zakresów pH dla tego gatunku bakterii.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych. W doświadczeniach wykorzystano szczep bakterii *Acetobacter diazotrophicus* nr 5601, hodowany

na pożywce G20. Zarówno szczep bakterii jak i skład podłoża hodowlanego pochodziły z Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów i Kultur Komórkowych w Braunschweigu.

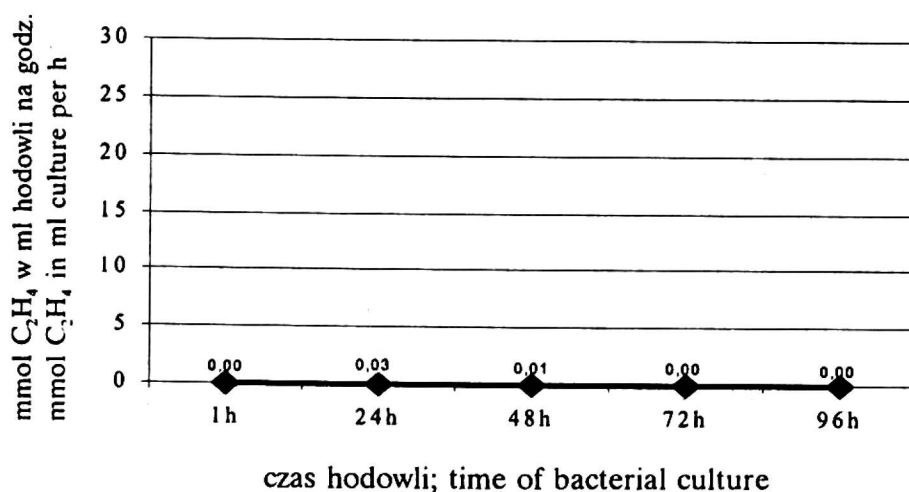
Dla określenia aktywności nitrogenazy zastosowano pożywkę półpłynną D-limitowaną węglem wg DÖBEREINER [1980].

W przygotowanej pożywce D-limitowanej węglem zmieniono pH do badanych poziomów, tj. do 2, 3, 4, 5, 7, 9 i 11 regulując odpowiednie poziomy stężenie jonów wodorowych odważkami analitycznymi kwasu solnego oraz wodorotlenku sodu. Pomiar pH wykonywano przy użyciu pehametru. Hodowle prowadzono w jałowych buteleczkach, tzw. „penicylinówkach” o pojemności 10 cm<sup>3</sup>, do których rozlano po 5 cm<sup>3</sup> półpłynnej pożywki D-limitowanej węglem. Na powierzchni pożywek nawarstwiano po 1 cm<sup>3</sup> inokulatu *Acetobacter diazotrophicus* o gęstości  $n \times 10^8$ , który uzyskano przez zmycie jałową solą fizjologiczną powierzchni 3-dniowych skosów. Badanie aktywności nitrogenazy przeprowadzono w pięciu terminach, tj. po 1, 24, 48, 72 i 96 godzinach prowadzonej hodowli. Założono po 5 buteleczek dla każdego poziomu pH w kolejnych terminach.

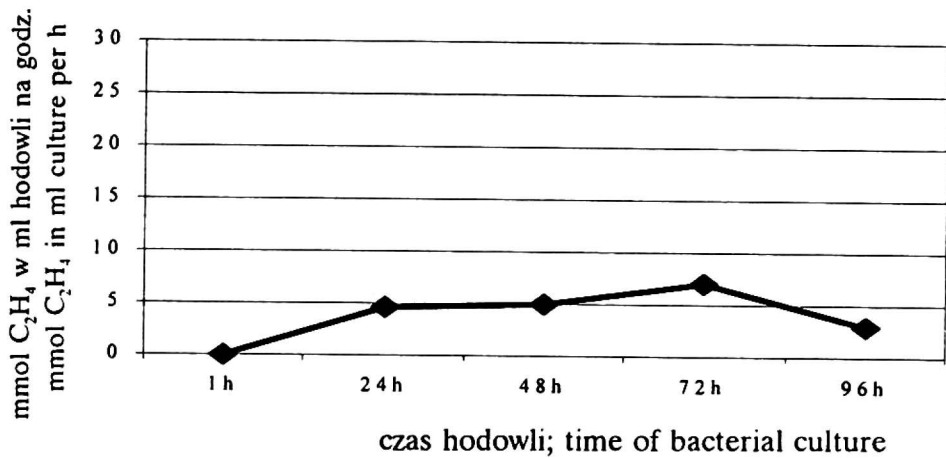
Do szczelnie zamkniętych gumowymi korkami buteleczek zawierających zawiesiny bakterii wstrzyknięto acetylen w ilości 10% objętości fazy gazowej. Następnie oznaczano zdolność wiązania azotu metodą acetylenową, polegającą na redukcji acetyleny do etylenu przez kompleks nitrogenazy, przy użyciu chromatografu gazowego CHROM 5, po 1, 24, 48, 72 i 96 godzinach od wstrzyknięcia acetyleny [SAWICKA 1983]. Kontrolę obecności endogennego etylenu stanowiły „penicylinówki” zawierające pożywkę bez inokulatu bakterii. Wyniki wyrażono w nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> w 1 ml hodowli w czasie 1 godziny.

## Wyniki i dyskusja

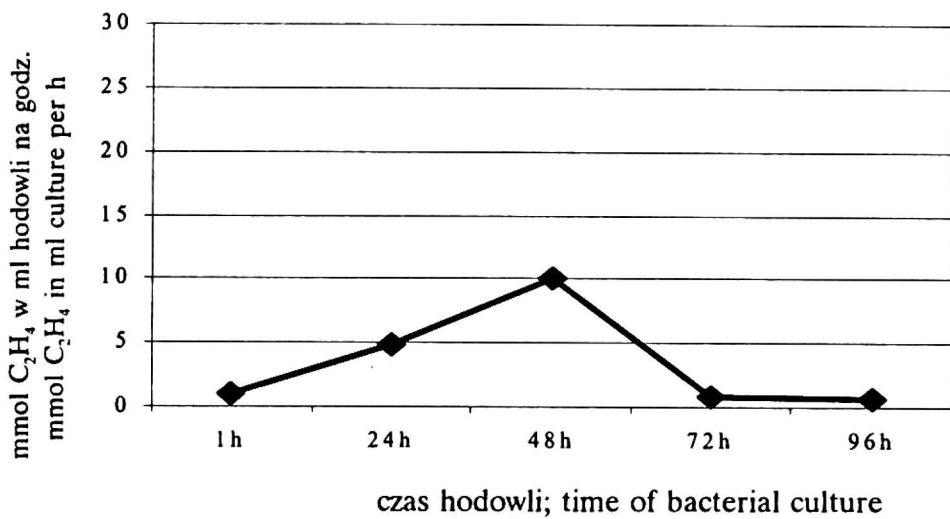
Uzyskane wyniki aktywności nitrogenazy badanego szczepu bakterii w kolejnych poziomach pH przedstawiono na wykresach 1–7.



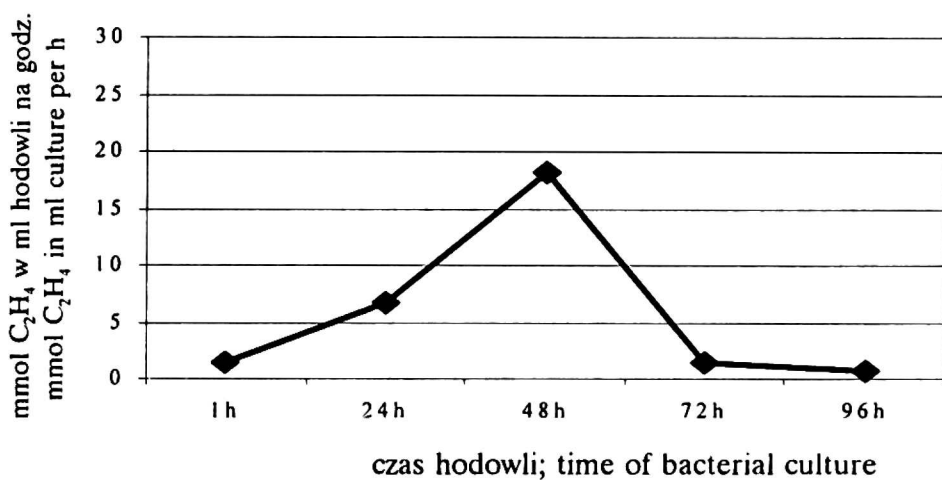
Rys. 1. Aktywność nitrogenazy *Acetobacter diazotrophicus* przy pH 2  
 Fig. 1 *Acetobacter diazotrophicus* nitrogenase activity at pH 2



Rys. 2. Aktywność nitrogenazy *Acetobacter diazotrophicus* przy pH 3  
Fig. 2. *Acetobacter diazotrophicus* nitrogenase activity on pH 3



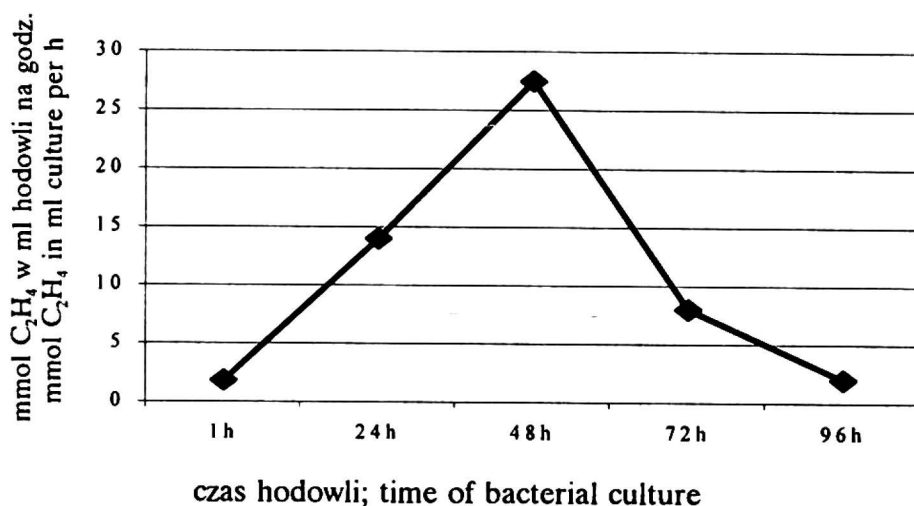
Rys. 3. Aktywność nitrogenazy *Acetobacter diazotrophicus* przy pH 4  
Fig. 3. *Acetobacter diazotrophicus* nitrogenase activity on pH 4



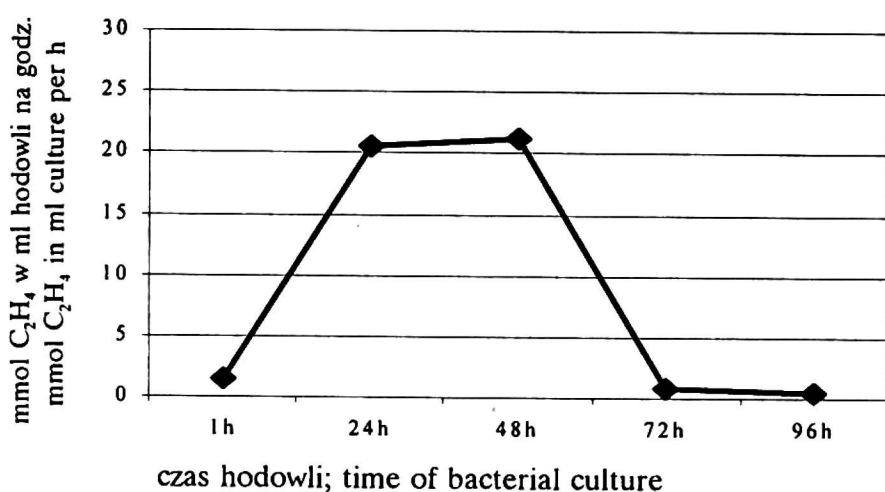
Rys. 4. Aktywność nitrogenazy *Acetobacter diazotrophicus* przy pH 5  
Fig. 4. *Acetobacter diazotrophicus* nitrogenase activity on pH 5

Wyniki wskazują, że zarówno wiek hodowli, jak i odczyn podłoża miały znaczący wpływ na aktywność nitrogenazy badanego szczepu bakterii. Aktywność analizowanego enzymu stopniowo wzrastała w kolejnych godzinach hodowli, osiągając najwyższą wartość we wszystkich poziomach pH po 48 godzinach od założenia.

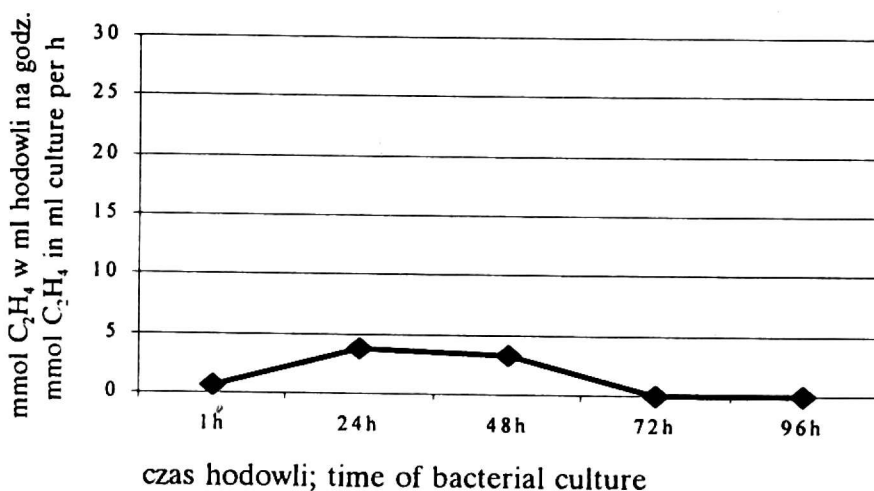
nia doświadczenia, z wyjątkiem pH 3, gdzie maksymalną aktywność enzymu zanotowano po 72 godzinach. Charakterystyczny rozkład aktywności nitrogenazy *Acetobacter* zależy najprawdopodobniej od charakterystycznych faz wzrostu drobnoustrojów.



Rys. 5. Aktywność nitrogenazy *Acetobacter diazotrophicus* przy pH 7  
Fig. 5. *Acetobacter diazotrophicus* nitrogenase activity on pH 7



Ryc. 6. Aktywność nitrogenazy *Acetobacter diazotrophicus* przy pH 9  
Fig. 6. *Acetobacter diazotrophicus* nitrogenase activity on pH 9



Rys. 7. Aktywność nitrogenazy *Acetobacter diazotrophicus* przy pH 11  
Fig. 7. *Acetobacter diazotrophicus* nitrogenase activity on pH 11

Czas do 48 godziny hodowli można uważać za okres tzw. logarytmicznego wzrostu. Natomiast widoczny spadek aktywności enzymu w 72 godzinie może świadczyć o przejściu hodowli w stan zamierania. Powodem takiego stanu mogło być wyczerpanie źródeł energii w podłożu lub zmiana panujących w nim warunków, wydzielanie toksycznych metabolitów oraz toksyczne działanie acetyleny [KUNICKI-GOLDFINGER 2001].

*Acetobacter diazotrophicus* jest bakterią wydzielającą znaczne ilości kwasu octowego do podłoża [CAVALCANTE, DÖBEREINER 1988]. Z badań PAN'A i VESSEY'A [2002] wynika, że optymalny poziom pH dla rozwoju tego szczepu mieści się w przedziale 4,0–5,0. Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia maksymalne wartości aktywności nitrogenazy uzyskano na podłożu o pH 5,0–9,0. Ciągła kontrola odczynu środowiska podczas całego czasu trwania hodowli wykazała zwiększenie stężenia jonów wodorowych z pierwotnego pH 5 do 4,5, a z początkowego pH 7 i 9 na 4,5 i 5,0. Zjawisko to może być spowodowane intensywniejszym wytwarzaniem deaminaz aminokwasów w wyższych wartościach pH, prowadzących do wytworzenia kwasów przez odszczepienie grup aminowych o odczynie zasadowym [KUNICKI-GOLDFINGER 2001].

Interesującym wydaje się fakt, że na podłożach o pierwotnie ustawionym pH 4 *Acetobacter* nie wykazał maksymalnej aktywności enzymatycznej, a po zakwaszeniu podłoża do podobnego stężenia jonów wodorowych własnymi metabolitami (w tym przypadku głównie kwasem octowym) aktywność szczepu okazała się najwyższa. Fakt ten można tłumaczyć charakterystyczną dla każdego gatunku specyfiką wymagań, od których zależy wydajność metaboliczna drobnoustrojów. Analizowany przypadek wskazuje na to, że czynnik zakwaszający podłoże może mieć wpływ na katalizowane enzymatycznie procesy zachodzące w komórkach mikroorganizmów.

W odczynach silnie zasadowych zanotowano niższą aktywność nitrogenazy. Wynika ona stąd, że ilości wytwarzanego przez *Acetobacter diazotrophicus* kwasu octowego okazały się niewystarczające do obniżenia pH podłoża do poziomu optymalnego dla tego szczepu.

Do analizy statystycznej wykorzystano program Statistica PL, ver. 6.0. Bazę danych utworzono w programie MS Excel 2000. Analiza wariancji wymaga, aby dane podlegały rozkładowi normalnemu z jednakową wariancją. Natomiast wyniki uzyskane w doświadczeniu nie spełniają tych wymagań. W związku z powyższym została przedstawiona wyłącznie graficzna eksploracja wyników.

## Wnioski

1. Zarówno termin, jak i odczyn podłoża miały zdecydowany wpływ na poziom związanego azotu przez *Acetobacter diazotrophicus*.
2. Aktywność nitrogenazy badanych bakterii zmieniała się w czasie dając najwyższe wartości po 48 godzinach hodowli.
3. Najbardziej optymalnym stężeniem jonów wodorowych w warunkach hodowli laboratoryjnych dla *Acetobacter diazotrophicus* okazało się podłoże o pH od 5,0 do 9,0.

## Literatura

- BALDANI J.I. 2000. *The sugarcane story – reasons for succes in Brazil*. Proceed. of the 8th Int. Symp. on Nitrogen Fixation with non-legumes, Australia: 171.
- CAVALCANTE V.A., DÖBEREINER J. 1988. *A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane*. Plant and Soil 108: 23–31.
- DÖBEREINER J. 1980. *Forage grasses and grain crops. Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. Eds. Bergersen F., Jahn Willey and Sons, New York: 12–19.
- KUNICKI-GOLDFINGER W. 2001. *Życie bakterii*. PWN Warszawa: 64–67.
- MADRZAK C.J. 1995. *Molekularne mechanizmy symbiozy Rhizobiaceae z roślinami motylkowatymi*. Wyd. AR Poznań: 19–25.
- MORA J., LARA F. 1988. *Nitrogen metabolism: an overview*, w: *Nitrogen sources control of microbial processes*. Eds. Sanchez-Esquivel S., CRC Press, Inc.: 1–20.
- NORDULT S., URETA A. 2002. *Evidence for conformational protection of nitrogenase in Acetobacter diazotrophicus*, w: *Nitrogen fixation, global perspectives*: 436.
- PAN B., VESSEY J.K. 2002. *Effects of sucrose, pH, temperature and mineral nitrogen on growth and nitrogenase activity of Gluconobacter diazotrophicus on soil medium*, w: *Nitrogen fixation, gobal perspectives*, CAB Int: 463.
- SAWICKA A. 1983. *Ekologiczne aspekty wiązania azotu atmosferycznego*. Roczn. AR w Poznaniu 138: 103–115.

**Słowa kluczowe:** *Acetobacter diazotrophicus*, endofity, pH, nitrogenaza, wiązanie azotu

## Streszczenie

Szereg różnorodnych czynników wpływa na aktywność enzymatyczną mikroorganizmów. Również nitrogenaza, enzym odpowiadający za wiązanie azotu u *Acetobacter diazotrophicus* zależy od różnorodnych zmian środowiska. Jednym z tych czynników jest poziom pH. Dlatego też celem badań było określenie wpływu różnych poziomów pH na aktywność wiązania N<sub>2</sub> przez bakterie i wyznaczenie granicznych poziomów stężenia jonów wodorowych dla tego szczepu. Bakterie hodowano w różnych zakresach pH od 2 do 11 na półpłynnym podłożu bezazotowym. Aktywność nitrogenazy w poszczególnych hodowlach oznaczano metodą redukcji acetyleny do etylenu z użyciem chromatografu gazowego. Ilości etylenu oznaczano po 1, 24, 48, 72 i 96 godzinach hodowli.

Najwyższe wartości aktywności nitrogenazy zanotowano po 48 godzinach hodowli badanego szczepu. Najlepszym podłożem dla *Acetobacter diazotrophicus* okazała się pożywka o pH w zakresie 5,0–9,0.

INFLUENCE OF pH ON *Acetobacter diazotrophicus*  
DINITROGEN FIXATION POSSIBILITY

*Justyna Klama, Alicja Niewiadomska, Dorota Swędrzyńska*  
Department of Agricultural Microbiology,  
Agricultural University, Poznań

Key words: *Acetobacter diazotrophicus*, endophytes, pH, nitrogenase, nitrogen fixation

Summary

The different environmental factors are influencing on enzymatic activity of microorganisms. Also the nitrogenase, an enzyme responsible for dinitrogen fixation in *Acetobacter diazotrophicus* depends of different natural changes in environment. One of them is the pH level. Therefore, the objective of this experiment was to recognize possibilities of the influence of the different pH ranges on N<sub>2</sub> fixation activity and determine the border levels of pH for this bacteria strain.

The bacteria were grown in different pH range from 2 to 11 on a semi-fluid medium without nitrogen. Nitrogenase activity in cultures was estimated by acetylene to ethylene reduction method using gas chromatograph. The amounts of the ethylene in the cultures were determined after 1, 24, 48, 72 and 96 hours. The highest result of nitrogenase activity were recorded in 48-hour cultures. The best solution for *Acetobacter diazotrophicus* was a medium with pH range 5.0–9.0.

Dr Justyna **Klama**  
Katedra Mikrobiologii Rolnej  
Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego  
ul. Wołyńska 35  
60-637 POZNAŃ  
e-mail: jklama@owl.au.poznan.pl