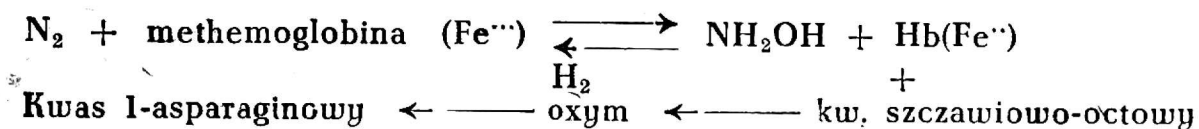


A. NOWOTNY—MIECZYŃSKA

## OBECNY STAN BADAŃ NAD HEMOGLOBINĄ W ROŚLINACH

W roku 1947 Virtanen<sup>1</sup> ogłosił wyniki swoich pierwszych badań nad czerwonym pigmentem zawartym w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych. Fiński uczony stwierdził, że badane przez niego brodawki grochu były zabarwione na kolor czerwony wtedy tylko, gdy roślinę uprzednio zaszczepiono aktywnym szczepem bakterii *Rhizobium*. W przypadku, gdy szczepy użyte do zakażenia były słabo- lub nieaktywne, brodawki korzeniowe rośliny były bezbarwne i nie spełniały swej roli wiązania atmosferycznego azotu. Virtanen badał ten barwik spektroskopowo i znalazł, że jest to związek mający naturę hematynową, ale różny od barwnej komponenty krwi zwierząt kręgowych. Różnica ta, według niego, polegałaby przede wszystkim na większej łatwości barwika czerwonego brodawek korzeniowych do zamiany w methemoglobinę, czyli do przemiany żelaza dwuwartościowego w żelazo trójwartościowe. Ta zdolność samoutlenienia się czerwonego pigmentu brodawek roślin motylkowych podczas pełnienia funkcji wiązania wolnego azotu byłaby, według Virtanena, jego cechą specyficzną, nie spotykaną w świecie zwierzęcym. Na podstawie wyników swych badań Virtanen tworzy własną teorię wiązania atmosferycznego azotu, według której hemoglobina odgrywałaby rolę nosiciela i przekaźnika tlenu, a cały proces polegałby na cyklicznej zmianie wartościowości żelaza; proces ten, w myśl hipotezy Virtanena, przebiegałby według następującego równania:



Działalność hemoglobiny w brodawkach polegałaby na: 1) ułatwieniu czynności oddechowych bakterii i 2) utlenieniu azotu molekularnego, przy równoczesnej zmianie ładunku elektrycznego żelaza hemoglobiny. Badania fińskiego biochemika wykazały, że barwik czerwony czynnych brodawek korzeniowych składa się z hemoglobiny i methemoglobiny, podczas gdy zdrowa krew zwierząt kręgowych zawiera zaledwie ślady methemoglobiny. Ilościowy stosunek tych dwu składników nie jest stały: waha się w zależności od wieku rośliny, a nawet od pory dnia, a więc od natężenia światła. Na podstawie powyższych badań Virtanen dochodzi do wniosku, że składnik proteinowy w czer-

<sup>1</sup> Postępy Wiedzy Rolniczej z. 1 — 2, str. 166. „Biologiczne wiązanie azotu“ Anna Nowotny-Mieczyńska.

wonym pigmentcie brodawek jest w inny sposób złączony z grupą prostetyczną niż w hemoglobinie krwi zwierząt ssących.

Badania Virtanena podejmuje z kolei Keilin i stwierdza, że czerwony pigment brodawek jest nie tylko połączeniem „podobnym“ do hemoglobiny, ale związkiem identycznym z hemoglobiną krwi zwierząt kręgowych; widmo absorbcyjne tego połączenia znajduje się bowiem przy tej samej długości fal co i barwny składnik krwi zwierząt ssących. Widmo czerwonego pigmentu brodawek zmienia się pod wpływem zetknięcia z tlenem i cechuje się tymi samymi smugami, co widmo absorbcyjne oksyhemoglobiny. Byłoby to dowodem, że barwik czerwony brodawek ulega odwracalnemu utlenowaniu, czyli zamianie na oksyhemoglobinę bez zmiany wartościowości żelaza. Nie znalazł jednak Keilin w czerwonym barwiku soi methemoglobiny ani wtedy, gdy roślina znajdowała się w warunkach normalnego oświetlenia, ani gdy ją zacieniono. Virtanen dlatego znalazł w pigmentcie czerwonym methemoglobinę, dowodzi Keilin, ponieważ operował ekstraktem barwika z grochu, którego brodawki szczególnie obfitują w oksydazy. Wyodrębniony przez Virtanena produkt został utleniony do methemoglobiny pod wpływem chinonów powstałych w czasie ekstrakcji. Badania swoje streszcza Keilin w następujący sposób: wewnątrz brodawek korzeniowych, spełniających funkcje wiązania wolnego azotu, znajduje się barwnik czerwony identyczny z hemoglobiną krwi zwierząt kręgowych i przejawiający w nich działalność oksigenacyjną wyrażoną we wzorze:  $\text{HbO}_2 \rightleftharpoons \text{Hb} + \text{O}_2$ . Keilin polemizuje z Virtanensem i zbija jego hipotezę o roli hemoglobiny w procesie wiązania wolnego azotu w następujący sposób: 1) twierdzenie Virtanena, że kwas szczawiowo-octowy może redukować methemoglobinę nie odpowiada prawdzie, ponieważ kwas szczawiowo-octowy nie jest zdolny do redukcji methemoglobiny, ani żadnego innego hematynowego połączenia, 2) mechanizm rozkładu hydroksylaminy jest bardziej skomplikowany niż to pokazano w równaniu Virtanena, 3) według fińskiego badacza przyswajanie wolnego azotu w brodawkach zależne jest od cyklicznej zmiany wartościowości żelaza: założenie to jest błędne, ponieważ a) w czynnych brodawkach korzeniowych znajduje się tylko mieszanina hemoglobiny i oksyhemoglobiny, b) hemoglobina posiadająca wybitne zdolności utleniania i odutlenia jest równocześnie bardzo słabym katalizatorem i z tego powodu jest rzeczą wątpliwą, aby reakcje oksydoredukcyjne mogły być katalizowane przez ten właśnie związek. W dalszych swoich pracach Keilin wykazał, że wyodrębniona przez niego z brodawek soi hemoglobina daje z tlenkiem węgla charakterystyczne połączenie, które podobnie jak oksyhemoglobina jest połączeniem nietrwałym i w atmosferze wolnej od tlenku węgla rozkłada się z powrotem na tlenek węgla i hemoglobinę. Keilin stwierdził, że asymilacja wolnego azotu bywa natychmiast zahamowana, gdy rośliny motylkowe znajdują się w atmosferze o niskim ciśnieniu parcjalnym tlenku węgla. Zjawisko to podobne jest do tego, które zachodzi w ustroju człowieka, gdy tlenkowęgłowa hemoglobina traci zdolność odwracalnego łączenia się z tlenem, a tlenek węgla blokuje rozprowadzanie tlenu przez oksyhemoglobinę po organizmie. Byłoby to dowodem, wnioskuje Keilin, że hemoglobina brodawek korzeniowych jest w nieznanym sposobie związana z całym aparatem symbiotycznego wiązania wolnego azotu.

*Czerwony pigment brodawek a procesy oddychania Rhizobium*

Jak już wyżej wspominaliśmy, jednym z założeń *Virtanena* (9) było przypuszczenie, że między innymi rola barwika czerwonego w brodawkach polega na ułatwieniu czynności oddechowych bakterii *Rhizobium*. Podobną koncepcję wysunął przed *Virtanenem* japoński biochemik *Kubo*. Badaniem tej sprawy zajął się współpracownik *Keilina* — *Smith* (7) i obalił dowodzenie *Virtanena* i *Kubo* na podstawie teoretycznych rozważań i własnych doświadczeń. *Smith* rozważając możliwości wpływu hemoglobiny na pobieranie tlenu przez uwięzione w brodawce, w jej tkance bakteroidalnej, bakterie, dochodzi do wniosku, że możliwość taka mogłaby istnieć tylko wtedy, gdyby: 1) hemoglobina posiadała zdolność ruchu w brodawce, a nic przecie nie wskazuje na to, aby taki ruch się odbywał, 2) gdyby obecność hemoglobiny w brodawkach oddziaływała bezpośrednio na stopień zespolecia tlenu z enzymami oddechowymi.

*Smith* twierdzi, że tlen atmosferyczny wnika przez dyfuzję do brodawek korzeniowych i w pewien swoisty sposób współdziała w przyswajaniu atmosferycznego azotu. Współdziałanie może być pośrednie albo bezpośrednie: bezpośrednie przez udział w mechanizmie wiązania wolnego azotu, pośrednie przez wyzwolenie energii przy spalaniu węglowodanów. Te dwa czynniki mogłyby jednak również dobrze występować równocześnie. Czy jednak hemoglobina bierze udział w pobieraniu tlenu przez *Rhizobium*? Na to pytanie odpowiada badacz negatywnie na podstawie przeprowadzonych przez siebie doświadczeń, których wyniki dadzą się streścić w następujący sposób:

1. Stopień pobierania tlenu jest niezależny od tego, czy w grę wchodzi brodawki czynne, tj. wiążące atmosferyczny azot, czy też nieczynne, czyli niezdolne do wykonywania powyższych funkcji.

2. Przeprowadzenie całej zawartej w brodawkach hemoglobiny w tlenko-węglową hemoglobinę (przez co straciła zdolność odwracalnego łączenia się z tlenem, czyli utlenowania i odtlenowania) nie ma żadnego wpływu na ilość pobranego tlenu przez czynne, świeżo odcięte od korzeni brodawki roślin motylkowych. Wyniki powyższe byłyby więc dowodem, że hemoglobina brodawek korzeniowych roślin motylkowych nie odgrywa roli nosiciela i przenośnika tlenu.

Jak jednak wytłumaczyć fakt, że hemoglobina niewątpliwie stymuluje do pewnego stopnia pobieranie tlenu przez *Rhizobium*? *Smith* rozważając przyczyny tego zjawiska dochodzi do wniosku, że być może, *Rhizobium* ma, tak jak i wiele innych bakterii, zdolność rozkładania hemoglobiny i korzystania z niej jako ze źródła azotu; być może, przypuszcza *Smith*, że przy tym rozkładzie stopień nasilenia pobierania tlenu, odpowiadający metabolizmowi spoczynkowemu, wzrasta w sposób charakterystyczny dla fazy podziału i mnożenia się komórek, co z kolei pobudza *Rhizobium* do energiczniejszego pobierania tlenu.

*Little* i *Burris* (3) doszli do wniosku, że hemoglobina wyodrębniona z krwi zwierząt wyższych stymuluje pobieranie tlenu przez *Rhizobium* hodowane poza tkanką roślinną w stopniu silniejszym niż hemoglobina brodawek korzeniowych. Zjawisko to tłumaczą wyższym, być może, powinowactwem do tlenu czerwonego barwika krwi aniżeli pigmentu roślin motylko-

wych. Są to jednak tylko domysły doświadczalnie jeszcze nie uzasadnione i sprawa stymulacji pobierania tlenu przez *Rhizobium* w obecności czerwonego barwika czeka dopiero na rozwiązanie.

#### *Hemoglobina i Rhizobium w stanie wolnym*

Sprawa asymilacji wolnego azotu przez *Rhizobium*, podczas ich bytowania poza tkanką roślinną, jest wciąż jeszcze zagadką intrygującą zarówno mikrobiologów, jak i biochemików. Dlatego też niebawem po ogłoszeniu pierwszych prac nad hemoglobina w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych uczeni zaczęli zastanawiać się, czy wolno żyjące *Rhizobium* nie uda się skłonić do wiązania molekularnego azotu, jeżeli dostarczymy im ekstraktu czerwonego barwika wyosobnionego z brodawek korzeniowych ich roślinnego gospodarza. Pytanie takie nasunęło się również i Virtanenowi i pierwsze próby przeprowadzone w tym kierunku dały pozytywne wyniki. Virtanen pospieszył się z ogłoszeniem ich, niebawem jednak musiał je odwołać, ponieważ okazało się, że jego preparaty hemoglobinowe nie były dostatecznie oczyszczone; po otrzymaniu wyższego stopnia czystości wyekstrahowanego pigmentu wszystkie następne próby spełżyły na niczym.

Badania te z kolei podjęli Niss i Wilson (5), Shirley i Tove (6) i wykazali, że czyste, sterylne kultury *Rhizobium* lub też świeżo pobrane z brodawek korzeniowych zawiesiny symbiotycznych bakterii nie asymilowały atmosferycznego azotu, nawet wówczas, gdy: a) dodawano im roztwór hemoproteinowy krwi zwierząt kręgowych, b) zasilono *Rhizobium* roztworem hemoglobiny zwierząt kręgowych, c) do ekstraktu hemoglobinowego z brodawek korzeniowych dodawano kwasu szczawiowo-octowego, kwasu ketoglutarynowego lub kwasu cytrynowego. Badacze wysnuli stąd wniosek, że hemoglobina nie jest jedynym czynnikiem, którego brak w pożywce uniemożliwia proces niesymbiotycznego wiązania azotu przez *Rhizobium*.

#### *Chemizm zielonego pigmentu brodawek korzeniowych*

W okresie przekwitania i dojrzewania rośliny motylkowej zjawia się w brodawkach korzeniowych zielony barwik, który nie mieszając się z pigmentem czerwonym powoli i stopniowo ruguje go z brodawki, aż w końcu całe wnętrze narośli wypełnione jest tylko przez barwik zielony. Jest to okres, kiedy asymilacja wolnego azotu stopniowo maleje, a okres ten kończy się, kiedy w brodawkach brak już hemoglobiny. Virtanen (9), który jeden z pierwszych zastanawiał się nad naturą tego barwika, twierdził we wstępnych swoich badaniach, że decydującą rolę przy zmianie czerwonego barwika w zielony odgrywa kwas askorbinowy; jego doświadczenia przeprowadzone *in vitro* wykazały, że hemoglobina i methemoglobina brodawek gwałtownie zmieniają kolor czerwony na zielony w temperaturze pokojowej, jeżeli roztwór zawiera kwas askorbinowy i nadtlenek wodoru. Być może, przypuszczał Virtanen, w okresie dojrzewania roślin motylkowych znika z brodawek korzeniowych substancja, która przedtem zapobiegała przemianie barwika czerwonego w zielony; substancją tą mógłby być kwas szczawiowo-octowy lub jakiś inny czynny w brodawkach związek. Virtanen przypuszcza, że jest to mieszanina chromoproteinowa (białko złożone cechujące się obecnością jakiegoś barwika jako grupy prostetycznej) rozpuszczalna



w wodzie, o zawartości 0,28% Fe; w późniejszych badaniach (11) fiński biochemik określił zielony barwik jako *choleglobinę*. Choleglobina jest to związek, co do którego biochemicy wciąż jeszcze nie mają pewności, czy pierścień porfirynowy jest w nim zamknięty, czy już pęknięty. Połączenie to, otrzymane z hemoglobiny krwi zwierząt kręgowych pod wpływem kwasu askorbinowego w obecności atmosferycznego tlenu, daje ze słabym kwasem zielony barwik zwany *biliwerdyną*.

*Virtanen* przypuszcza, że w zielonym pigmentie brodawek pierścień porfirynowy jest już pęknięty; nie ma jednak pewności, w jakiej formie znajduje się w tym barwiku żelazo i w jaki sposób odbywa się tam przypuszczalna oksydacja jonu żelazawego. Badacz ten stwierdził jednak, że pigment zielony pod wpływem słabych kwasów daje połączenie, które zidentyfikował z *biliwerdyną*, ponieważ związek przez niego w ten sposób otrzymany posiada widmo absorbcyjne przy długości fali 665  $\mu$  i 355  $\mu$ , czyli podobnie jak widmo czystej *biliwerdyny* otrzymanej z krwi. Jak wiadomo *bilirubina* jest związkami o barwie brunatnoczerwonej, natomiast *biliwerdyna* jest wyraźnie zielona i spotykamy ją niejednokrotnie jako domieszkę *bilirubiny* w żółci zwierząt ssących. Tak *bilirubina* jak i *biliwerdyna* odznaczają się już strukturą bilanową, a przejście hemu w te dwa połączenia polega na trzech podstawowych reakcjach: 1) na odszczepieniu hemu od globiny i 2) na odszczepieniu żelaza związanego z układem porfirynowym, 3) przerwaniu pierścienia porfirynowego; według *Marchlewskiego*, proces zamiany hemu w *bilirubinę* nie jest jeszcze dokładnie zbadany z punktu widzenia chemicznego, jednak udział *biliwerdyny* w tych reakcjach nie ulega wątpliwości. Tak więc zielony barwik brodawek korzeniowych roślin motylkowych, czyli *choleglobina* (nazwana przez *Virtanena* *legcholeglobina*), byłby pierwszym spotkanym w świecie roślinnym precursorem pigmentów żółciowych, a dalsze badania nad tworzeniem się i rozpadem hemoglobiny brodawek korzeniowych rzuciłyby wiele światła, sądzi *Virtanen*, na cały chemizm przeobrażania się hemoglobiny krwi zwierząt ssących w barwiki żółciowe. W ten więc sposób sprawa chemizmu zielonego barwika brodawek korzeniowych, twierdzi fiński badacz, byłaby na podstawie powyższych badań całkowicie wyświetlona.

Jednakże w związku z powyżej opisanymi badaniami *Virtanena* autorce niniejszego nasuwa się następujące pytanie: *Virtanen* badał brodawki z roślin, które w 6 tygodniu ich rozwoju przeniósł do ciemnego pomieszczenia, czyli ominął naturalny cykl rozwojowy brodawek i badał barwik, który powstał nagle i w sposób sztuczny. Czy więc barwik utworzony w takich warunkach jest identyczny z barwikiem zielonym, który tworzy się w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych w okresie przekwitania roślin i zawiązywania strąków, a więc przy normalnym przebiegu wegetacji roślin?

Poważne zastrzeżenia przeciwko wynikom badań *Virtanena* wysunął również *Smith* (8); uczony ten niejednokrotnie zaobserwował, że nieaktywne szczepy *Rhizobium* nie wytwarzają w brodawkach czerwonego pigmentu, natomiast brodawki zawierają od początku barwik zielony. Nie mógł on powstać z hemoglobiny, bo jej w brodawkach nie było. Jakie więc jest jego pochodzenie? Sprawa zielonego barwika w brodawkach wymaga jeszcze dalszych gruntownych badań.

### Wpływ kwasu askorbinowego na pigmentację brodawek korzeniowych

Punktem wyjścia do tych badań były opublikowane w r. 1948 wyniki doświadczeń *Virtanena* o raptownej zmianie czerwonego pigmentu brodawek w zielony, pod wpływem kwasu askorbinowego i nadtlenku wodoru. Autorka niniejszego referatu usiłowała w Instytucie Puławskim powtórzyć badania *Virtanena*, jednak wszelkie usiłowania w tym kierunku spełzły na niczym; postanowiono przeto zbadać wpływ kwasu askorbinowego nie na odciętych brodawkach, jak to robił *Virtanena*, ale na żywej, rozwijającej się roślinie w okresie jej najenergiczniejszego przyswajania wolnego azotu.

Doświadczenie to przeprowadzono w następujący sposób: groch, który w warunkach kultur piaskowych doszedł do stadium zawiązywania pąków, przenoszono do kultur wodnych zaopatrzonych w całkowitą pożywkę mineralną z wyjątkiem azotu. Stwierdzono, że brodawki korzeniowe wszystkich roślin doświadczalnych były w tym czasie krwistoczerwone i barwika zielonego w brodawkach nie zaobserwowano na żadnej z doświadczalnych roślin. Doświadczenie podzielono na trzy serie:

1) seria kontrolna, do której kwasu askorbinowego nie dodawano wcale,

2) seria druga z kwasem askorbinowym dodawanym co trzy dni w ilości 2 ml 1% roztworu w okresie 18 dni trwania doświadczenia,

3) seria trzecia, w której dawka kwasu askorbinowego wynosiła po 5 ml 1% roztworu również stosowana co trzy dni.

Po upływie dwu tygodni rozwój roślin i stan pigmentacji ich brodawek przedstawiał się w następujący sposób:

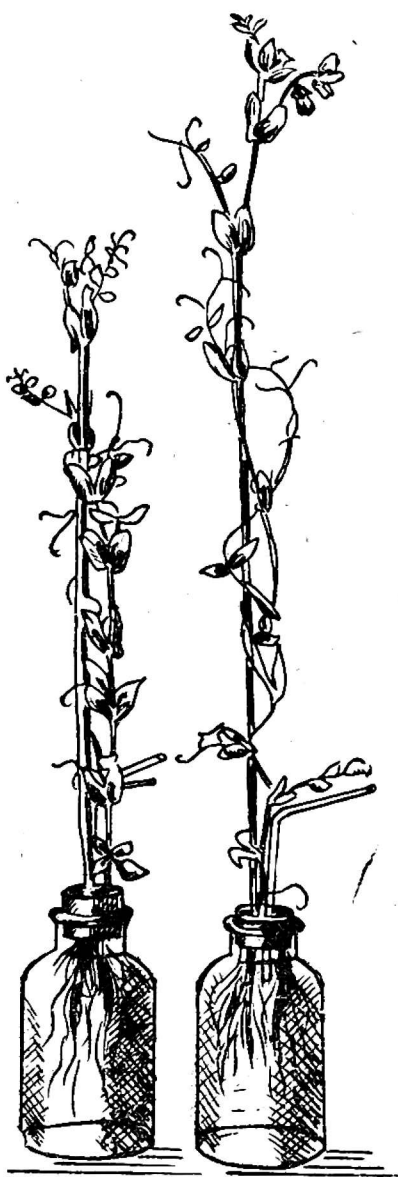
1) (kontrola). Rośliny zawiązują strąki, ich brodawki w większości są całkowicie zielone, niektóre czerwonozielone, całkowicie czerwonych brodawek brak (rys. 1a).

2) Rośliny kwitną i zawiązują wciąż nowe pąki, ich międzywęzła są wydłużone, brodawki bez wyjątku krwistoczerwone. Nie zaobserwowano w tej serii ani jednej brodawki z zielonym zabarwieniem (rys. 1b).

3) Rośliny wykazują objawy wędnięcia, są jasnozielone, a ich brodawki korzeniowe są w stanie rozkładu.

Po 18 dniach rośliny mierzono, ważono i oznaczano w nich ilość ogólnego azotu, przy czym analizowano każdą roślinę oddzielnie. Każda seria składała się z 8 roślin. Dane pomiarów i analiz zebrano w tab. I.

Jak wynika z tych danych, rośliny karmione, mniejszą dawką kwasu askorbinowego przyswoiły tę samą ilość wolnego azotu co i rośliny kontrolne, pomimo że brodawki tych roślin wciąż były niezmiennie czerwone, a okres kwitnienia tych roślin był wyraźnie przedłużony. Zachowana w stanie nie-



Rys. 1a Rys. 1b

zmienionym hemoglobina brodawek najwidoczniej nie wpłynęła na większą energię wiązania molekularnego azotu, pomimo zwiększonej energii rozwoju samej rośliny. Zjawisko to przemawiałoby za tym, że kwas askorbinowy jako czynnik silnie redukujący uchronił, być może, hemoglobinę ustroju roślinnego przed utlenieniem, ale nie spowodował wzmocnienia aktywności *Rhizobium*.

Tab. 1

S e r i e	Śr. wysokość roślin		Śr. s. m. roślin		Ilość N ogól. w 1 roślinie		
	cm	%	g	%	%	mg	%
1 kontrola . . . . .	50	100	1,37	100	2,22	25,0	100
2 kw. askor. 2 ml . . . . .	62	123	1,93	140	1,71	25,7	103
3 „ „ 5 ml . . . . .	48	96,4	1,30	95	1,73	19,1	72

#### Badania nad wpływem soli kobaltu na pigmentację brodawek

Bezpośrednim bodźcem do badań nad wpływem chlorku kobaltowego na rozwój roślin motylkowych i pigmentację ich brodawek było niedawno opublikowane odkrycie witaminy B<sub>12</sub>. Substancja ta, wyosobniona w stanie czystym w 1948 r. w dwu niezależnie od siebie pracujących laboratoriach, zawiera około 13% azotu i 4% kobaltu związanego organicznie. Struktura tego związku nie jest dotychczas poznana dokładnie, wiadomo jednak, że jest to (z dotychczas poznanych) jedna z najsilniej działających biologicznie substancji. Witamina ta wzmaga produkcję komórek krwi w głównej tkance krwiotwórczej, jaką jest szpik kostny; podczas typowej niedokrwistości przy złośliwej anemii produkcja czerwonych ciałek krwi jest w jakiś sposób upośledzona; zastrzyknięcie do organizmu połączenia kobaltowego p. n. witaminy B<sub>12</sub> leczy tę anemię. Ponieważ zaś wnioski zaczerpnięte z obserwacji poczynionych w świecie zwierzęcym często z powodzeniem przenosimy na świat roślinny, przeto i obecnie autorka niniejszego podjęła próby spotęgowania produkcji hemoglobiny w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych przez wprowadzenie do pożywki tych roślin lub wprost do ich tkanki jonu kobaltowego; przypuszczała, że być może, tą drogą uda się podnieść aktywność bakterii asymilujących symbiotycznie wolny azot. Jeżeli bowiem kobalt jest częścią składową jednej z najsilniejszych krwiotwórczych witamin, to być może roślina posiada zdolność włączania tego elementu w system pobudzający lub bezpośrednio produkujący barwną komponentę krwi, tj. hemoglobinę. Substancja ta według obecnego stanu badań jest nieodłącznym czynnikiem symbiotycznego wiązania atmosferycznego azotu. Badania przeprowadzono trzema sposobami:

1) karmiono rośliny motylkowe roztworem chlorku kobaltowego poprzez korzenie (5 mg CoCl<sub>2</sub> w 2 ratach w ciągu wegetacji: na początku i w okresie poprzedzającym kwitnienie).

2) wstrzykiwano roztwór CoCl<sub>2</sub> wprost do tkanki roślinnej (ca 5 mg CoCl<sub>2</sub> w 2 porcjach analogicznie jak w 1).

3) dodano do hodowli samych bakterii *Rhizobium* (użytych później do zakażenia rośliny) roztworu  $\text{CoCl}_2$  (kultury rozwijały się tylko w granicach stężenia  $\text{CoCl}_2$  od  $n/5\ 000$  do  $n/10\ 000$ ).<sup>1</sup>

Stosowano też dwa różnej aktywności szczepy *Rhizobium*; przypuszczano, że być może pożywka z udziałem soli kobaltu w stężeniu  $n/5\ 000$  —  $n/10\ 000$  wpłynie na zwiększenie aktywności szczepu słabszego.

Roślinami doświadczalnymi były: groch, lucerna, seradela i łubin. Rośliny te wyjmowano z piasku w okresie poprzedzającym kwitnienie i porównywano zabarwienie brodawek roślin, które otrzymywały w taki czy inny sposób sól kobaltową, z brodawkami roślin kontrolnych (tzn. bez dodatku kobaltu). We wszystkich badanych przez nas roślinach znaleziono wyraźne zmiany w pigmentacji brodawek: w brodawkach łubinu i seradeli pigment czerwony był wybitnie mocniejszy niż w kontroli, w brodawkach lucerny był szczególnie jaskrawy w odróżnieniu od matowej czerwieni brodawek kontrolnych.

W okresie dojrzewania rośliny zbierano, suszono i analizowano na zawartość azotu. Stwierdzono, że w warunkach opisywanego doświadczenia zarówno ogólny rozwój rośliny, jak i energia przyswajania wolnego azotu nie uległy zmianie pod wpływem soli kobaltu bez względu na sposób podawania go roślinie. W niektórych wypadkach obserwowano słabą stymulację wzrostu roślin, zwłaszcza we wczesnym okresie, w innych działanie hamujące. W każdym razie wyniki badań z kobaltem nie uprawniają nas do wyciągania pozytywnych wniosków o wpływie kobaltu na metabolizm zbadanych roślin. Zaobserwowane zmiany w pigmentacji brodawek przypisać można, być może, redukującemu działaniu soli kobaltowej podobnie jak w wypadku działania kwasu askorbinowego. Działanie to mogłoby polegać na uchronieniu czerwonego pigmentu brodawek przed utlenieniem i na zachowaniu barwika w stanie nie utlenowanej hemoglobiny. To „utrwalenie“ czerwonego pigmentu w brodawkach nie wpłynęło i w tym wypadku na zwiększoną energię przyswajania molekularnego azotu.

#### *Hemoglobina w brodawkach czynnych i nieczynnych*

S m i t h (8) oznaczał ilość hemoglobiny w brodawkach wytworzonych pod wpływem aktywnego i pod wpływem nieczynnego szczepu *Rhizobium*. Badania te prowadził na soi i na fasoli w okresie poprzedzającym kwitnienie i znalazł u fasoli: 0,072 mg hematyny na 1 g św. m. brodawek czynnych, 0,0087 mg hematyny na 1 g św. m. brodawek nieczynnych.

Ta wielka różnica całkowitej ilości hematyny w brodawkach czynnych i nieczynnych, czyli wytworzonych pod wpływem szczepów aktywnych i nieaktywnych, pozwala wnioskować, że różne szczepy posiadają różną zdolność do produkowania łącznie z rośliną połączeń hematynowych. Brodawki nieczynne zawierają w przybliżeniu 10-krotnie mniejszą ilość hematyny niż brodawki czynne; skąd jednak pochodzi i ta nie wielka ilość hematyny w tych brodawkach? S m i t h przypuszcza, że są to połączenia cytochromowe, których pewna część została podczas ekstrakcji brodawek wylugowana wodą. Autor ten przypuszcza, że w brodawkach nieaktywnych znajdu-

<sup>1</sup> Była to inicjatywa dr J. Gołębiowskiej, która hodowała *Rhizobium*.



je się obok cytochromów jakaś nie zidentyfikowana hematyna lub też ślady hemoglobiny zbyt małe, aby je można zaobserwować. Tak więc istotnymi cechami brodawek nieczynnych byłyby: 1) rozpad tkanki bakteroidalnej, 2) brak hemoglobiny i 3) niezdolność asymilowania wolnego azotu. Te trzy cechy występują równocześnie i mogą być spowodowane: 1) brakiem lub ubóstwem boru w pożywce, 2) zaciemnieniem rośliny przez okres około 12 dni i 3) ukończeniem cyklu rozwojowego rośliny. Na ogół wiąże się to z wadliwą dostawą węglowodanów do korzeni roślin motylkowych.

Doświadczenia puławskie, prowadzone niezależnie od badań S m i t h a, wykazały, że pod wpływem zaciemnienia rośliny motylkowej zaszczerpionej aktywnym szczepem bakterii *Rhizobium*, trwającym około 12 dni, czerwone zabarwienie brodawek korzeniowych zmienia się w wypadku łubinu na czerwono-brązowe, a zgniłozielone u grochu. Obcięcie nadziemnej części rośliny wywoływało podobne zmiany w pigmentacji brodawek, przy czym proces ten przebiegał znacznie szybciej. Nadto stwierdzono, że równoczesne z zaciemnieniem rośliny lub pozbawieniem jej pędów zasilenie jej roztworem maltozy czy glukozy do pewnego stopnia zapobiega powyższym zmianom w pigmentacji brodawek. Obserwacje te byłyby dowodem, że synteza hemoglobiny w brodawkach odbywa się dopóty, dopóki wystarczy węglowodanów w korzeniach roślin motylkowych. Z chwilą wyczerpania się tego źródła następuje, być może, rozkład hemoglobiny w brodawkach; tworzą się produkty rozkładu komponenty barwnej hemoglobiny i równocześnie nodulacja i asymilacja azotu ustają.

Jaka jest jednak przyczyna zmiany barwika czerwonego w zielony, co obserwujemy w okresie przekwitania roślin i zawiązywania strąków badanych przez nas roślin motylkowych? Na podstawie poczynionych na licznych roślinach obserwacji autorce niniejszej pracy wydaje się, że zmiana barwika czerwonego w zielony wiąże się ściśle ze zmianami w plazmie komórek *Rhizobium*. W tym czasie, kiedy barwik zielony wypiera z brodawki pigment czerwony, energia wiązania wolnego azotu stopniowo maleje, a cały proces przyswajania wolnego azotu kończy się, gdy brodawkę korzeniową całkowicie opanuje barwik zielony. Zmniejszenie energii wiązania wolnego azotu jest, jak wiadomo, następstwem zmiany formy bakterii „roboczych“ w formę bakterii coraz to mniej czynnych „senilnych“. Powstawanie zielonego barwika mogłoby być w bezpośrednim związku z przemianą bakterii aktywnych w nieżywotne. Czy jednak znikanie hemoglobiny na korzyść zielonego barwika jest następstwem przemiany czynnych w nieczynne, czy też sprawa ma się odwrotnie? Przypuszczenie pierwsze wydaje się prawdopodobniejsze. Gdyby proces przemiany barwika czerwonego w zielony był procesem czysto chemicznym, jak twierdzi V i r t a n e n, to ten ostatni pigment nie mógłby się tworzyć raptownie, a często nawet „skokowo“, jak to zaobserwowała autorka w wypadku seradeli; są to oczywiście domysły wymagające potwierdzenia przez ścisłe badania. Jeżeliby jednak przypuszczenie to okazało się słuszne, to o mechanizmie tworzenia się hemoglobiny w brodawkach decydowałaby forma bakterii czynnych, o mechanizmie zaś zielonego barwika — forma bakterii senilnych.

Mikrobiologowie radzieccy z F i e d o r o w e m (1) i M i s z u s t i n e m (4) na czele nie przywiązują do odkrycia hemoglobiny w bro-

dawkach tak wielkiej wagi, jak to czynią *Virtanen* i *Keilin*; *Fiedorow* skłania się raczej do poglądu, że hemoglobina nie odgrywa roli w całym mechanizmie wiązania wolnego azotu przez system rośliny motylkowej — *Rhizobium*. Według niego mechanizm symbiotycznego wiązania molekularnego azotu jest tego samego typu co mechanizm azotobaktera czy *Clostridium*, które asymilują bez udziału hemoglobiny. Czynniki hamujące wiązanie wolnego azotu przez bakterie niesymbiotyczne oddziałują bowiem w ten sam sposób na proces wiązania atmosferycznego azotu przez *Rhizobium*. Fakt, że wciąż jeszcze nie udało się badaczom skłonić wolno żyjące *Rhizobium* do przyswajania atmosferycznego azotu, przypisuje *Fiedorow* tylko nieodpowiednio dobranemu stosunkowi węgla do azotu w pożywce; z chwilą gdy ten optymalny stosunek uda się wypośrodkować, sprawa przyswajania wolnego azotu przez *Rhizobium* żyjące poza tkanką roślinną będzie rozwiązana.

Czy więc hemoglobina istotnie bierze udział w mechanizmie wiązania azotu w systemie bakterie — rośliny motylkowe? Z badań *Smitha* wynikałoby, że choć barwik czerwony posiada wszelkie cechy hemoglobiny krwi zwierząt kręgowych, tj. własność luźnego i odwracalnego łączenia się z tlenem, to jednak barwik ten z właściwości tej nie korzysta i udziału w pobieraniu tlenu przez uwieżone w tkance bakteroidalnej bakterie nie bierze. Nie byłby więc nosicielem i przenośnikiem tlenu w brodawkach. Orientacyjne badania przeprowadzone w Instytucie Puławskim wykazały, że zahamowaniu tworzenia się zielonego barwika w brodawce, a więc przedłużeniu trwania pigmentu czerwonego pod wpływem takich czynników redukujących, jak kwas askorbinowy czy chlorek kobaltawy, nie towarzyszył przedłużony okres funkcjonowania aparatu symbiotycznego wiązania wolnego azotu; rośliny przyswoiły tyleż samo azotu co i rośliny kontrolne. Jeżeli udałoby się zgromadzić więcej tego rodzaju dowodów, wówczas będzie to znaczyło, że udział hemoglobiny w mechanizmie wiązania wolnego azotu nie jest nieodzowny. W takim razie hemoglobinę w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych należałoby uważać tylko jako produkt w tórnym asymilacji molekularnego azotu. Substancja ta nie uczestniczyłaby w mechanizmie wiązania azotu, a tylko wskazywałaby, że ten mechanizm w danym okresie rozwoju rośliny motylkowej jest czynny.

Jednakże rośliny motylkowe stanowią pierwszy znany nam wypadek występowania hemoglobiny w świecie roślinnym. *Keilin* twierdzi, że każda żywa komórka może być uważana za potencjalnego „nosiciela“ grupy prostetycznej hemoglobiny, ponieważ wszystkie organizmy tlenowe, łącznie z bakteriami i roślinami, zdolne są do syntetyzowania katalizatorów mających grupę hematynową. Według obecnego stanu badań hemoglobinę prawdziwą produkują tylko i wyłącznie rośliny motylkowe zaszczepione aktywnym szczepem bakterii *Rhizobium*. System rośliny — bakterie posiada najwidoczniej zdolność do produkowania tej wysoce specyficznej białkowej składowej hemoglobiny, jaką jest „globina“ posiadająca zdolność doskonale odwracalnego łączenia się z tlenem, czyli „utlenowania“ i „odtlenowania“. Jednakże rola, jaką ten barwik odgrywa w metabolizmie rośliny motylkowej, a w szczególności w procesach związanych z symbiotycznym wiązaniem wolnego azotu, wchodzi właściwie dopiero w początkową fazę badania.

## LITERATURA

1. F i e d o r o w M. B.: Puti powyzsheniya aktywnosti klubienkoych bakterji, Moskwa 1948.
2. K e i l i n D. i S m i t h J. D.: Nature, 1947. V. 159.
3. L i t t l e i B u r r i s R. H.: Journal of the American Chemical Society, 1947, 69.
4. M i s z u s t i n E. N.: Poczowowiedienje, 1949, 429.
5. N i s s H. F. i P. W. W i l s o n: Society for Experimental Biology and Medicine, 1947. 66.
6. S h i r l e y R. T o v e i P. W. W i l s o n: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1948, 59.
7. S m i t h J. D.: The Biochemical Journal, 1948, 44.
8. S m i t h J. D.: The Biochemical Journal, 1949, 44.
9. V i r t a n e n A. I., J u h o J e r m a, H i l k a L i n k o l a: Acta Chemica Scandinavica, 1947, 1.
10. V i r t a n e n A. I.: Annual Review of Mikrobiology, 1948, 483.
11. V i r t a n e n A. I. i J e r m a M i e t t i n e n: Acta Chemica Scandinavica, 1949, 17.