

*J. Marszewska-Ziemięcka, T. Wróbel*

## SZCZĘPIONKI BAKTERYJNE DLA ROŚLIN MOTYLKOWYCH

Z Zakładu Mikrobiologii Rolniczej IUNG w Puławach

Problem szczepionek bakteryjnych dla roślin motylkowych zaczął interesować naukę rolniczą z końcem XIX wieku, jako bezpośredni wynik odkrycia zjawiska współżycia tych roślin z bakteriami asymilującymi wolny azot i uzyskania czystych hodowli tych organizmów (H e l l r i e g e l i W i l f a r t h, P r a ż m o w s k i, B e i j e r i n c k). Z uwagi na ich odrębne właściwości biologiczne oraz na ich znaczenie ekonomiczno-rolnicze studia nad bakteriami *Rhizobium* są wciąż aktualne i podejmują je liczne pracownie w różnych krajach. Piśmiennictwo w tej dziedzinie jest bardzo liczne. Świadczą o tym obszerne monografie pojawiające się w różnych odstępach czasu i dążące do krytycznego zestawienia dotychczasowych osiągnięć i poglądów (F r e d, B a l d w i n i M. M c C o y, 1932; J. Z i e m i ę c k a, 1937; A l l e n i A l l e n, 1950; F i ó d o r o w, 1952; A. N o w o t n y - M i e c z y ń s k a i J. G o ł ę b i o w s k a, 1962 i in. P. też Sprawozdanie z Konferencji PTM, 1959). Świadczy o tym też ukazujące się od 1956 r. wydawnictwo powielane pt. „*Rhizobium Newsletter*”, przeznaczone na użytek wewnętrzny setek pracowników zajmujących się w różnych krajach tą bakterią i jej współżyciem z roślinami.

W obecnym naszym artykule staramy się przedstawić wybrane wyniki badań wykonanych w ciągu bieżącego 20-lecia nad bakteryjnym symbiontem-*Rhizobium*, nad jego współżyciem z roślinami i nad szczepieniem nim różnych uprawnych roślin motylkowych. Nieco szerzej omówimy przy tym badania polskie.

### K l a s y f i k a c j a *Rhizobium*

Podział rodzaju *Rhizobium* na różne grupy fizjologiczne, uznawane za odrębne gatunki oparty jest dotychczas na zdolności szczepów tej bakterii do wnikania i rozmnażania się w korzeniach określonych rodzajów roślin motylkowych, w wyniku czego powstają charakterystyczne narośle-bro-

dawki korzeniowe. W zależności od tego w Systematyce Bakterii Bergey'a (wydanie z r. 1957) rozróżnia się następujące gatunki *Rhizobium*:

1. *Rh. leguminosarum* Frank — wywołujące powstawanie brodawek na korzeniach rodzajów *Pisum*, *Lathyrus*, *Vicia* i *Lens*;
2. *Rh. phaseoli* Dangeard — na korzeniach *Phaseolus*;
3. *Rh. trifolii* Dangeard — na korzeniach *Trifolium*;
4. *Rh. lupini* Schroeter — na korzeniach *Lupinus* i *Ornithopus*;
5. *Rh. japonicum* Kirchner — na korzeniach *Soja max.*; oraz
6. *Rh. meliloti* Dangeard — na korzeniach *Melilotus*, *Medicago* i *Trigonella*.

Nie uwzględniono w tym wydaniu szczepów (gatunków?) *Rhizobium* powodujących powstawanie brodawek na korzeniach licznych innych rodzajów roślin motylkowych, dziko rosnących lub uprawianych. A znamy przecież ponad 10 000 gatunków należących do rodziny *Leguminosae* i wiemy, że tylko u niektórych z pomiędzy nich nie stwierdzono możliwości współżycia z *Rhizobium*.

Ten „klasyczny” podział *Rhizobium* na 6 grup jest dotychczas podstawą przy wyrobie odrębnych szczepionek dla wymienionych w nim rodzajów roślin. Podział ten jest jednak kwestionowany przez różnych współczesnych badaczy (M a n i l, 1963). Dawniejsze kryteria, na których go oparto, nie są już wystarczające w świetle dzisiejszych badań. Przede wszystkim zdolność wnikania do korzeni roślin i powodowania wytwarzania się na nich brodawek, a więc wirulencja (po ang.: „infectiveness”) szczepów *Rhizobium* nie przesądza o tym, czy rozpleniając się w brodawkach mogą asymilować w nich azot atmosferyczny, przerabiając go na pokarm azotowy dla roślin. Mogą bowiem być pod tym względem aktywne („efficient”) w różnym stopniu, przy czym zdarzają się nawet szczepy wręcz pasożytnicze, które rozwijając się w roślinie na jej koszt, nie dostarczają jej wcale azotu (tzw. szczepy nieaktywne, czyli „inefficient strains”).

Na dodatek najnowsze badania Bjälve'go (1963) wykazały, że szczepy *Rhizobium* wyodrębnione z nieaktywnych brodawek jednego rodzaju roślin (np. z *Phaseolus multiflorus*) mogą wytwarzać aktywne (uzdolnione do wiązania wolnego azotu) brodawki na niektórych innych roślinach (np. na *Trifolium repens*).

Wybór szczepów „macierzystych” do produkcji skutecznie działających na rośliny szczepionek *Rhizobium* omówiony będzie szerzej w dalszym ciągu naszego artykułu. Od razu jednak podkreślamy, że stopień ich „aktywności” w symbiozie z rośliną ma dla tej produkcji kapitalne znaczenie. Oznaczenie zdolności symbiotycznej poszczególnych szczepów *Rhizobium* nie jest jednak łatwe. Wynika to z faktu, że bakterie te mogą asymilować wolny azot tylko podczas swego współżycia z rośliną, natura

więc tej ostatniej wpływa również na nasilenie procesu asymilacyjnego w brodawkach korzeniowych.

W tej dziedzinie prowadzi N u t m a n od kilkunastu lat wnikliwe badania nad różnymi gatunkami koniczyny pod względem ich zdolności do nodulacji w obecności różnych szczepów *Rh. trifolii*. Określa też nasilenie procesu wiązania wolnego azotu podczas powstającego współżycia. Okazało się, że australijskie gatunki koniczyny (np. *Trifolium subterraneum* lub *Tr. glomeratum*) wymagają do tego innych szczepów *Rh. trifolii* niż gatunki uprawiane w Europie, a nawet w obrębie gatunku koniczyny czerwonej trafiają się jej rody odporne na zawiązywanie symbiozy. Podobne badania przeprowadza też cała plejada mikrobiologów australijskich (V i n c e n t, 1962). Wybór do tych badań koniczyny nie jest przypadkowy, ale wynika z konieczności wszechstronnego zbadania tej rośliny w krajach, w których stanowi ona główną podstawę produkcji paszy. W USA W r ó b e l i A l l e n (1961) stwierdzili również, że różne gatunki, a nawet odmiany koniczyny wymagają dla dobrego plonowania odrębnych szczepionek *Rh. trifolii*. Ci ostatni autorzy nie znajdują potrzeby stosowania różnych szczepów *Rh. meliloti* do wywołania skutecznego efektu symbiozy tej bakterii z różnymi odmianami lucerny w USA. Jednakże w obszernej pracy uczonych radzieckich (K r a s i l n i k o w i M e ł k u n o w a, 1963) stwierdzono, że niektóre gatunki lub odmiany lucerny plonują dobrze tylko pod wpływem określonych szczepów *Rh. meliloti*. U nas G o ł ę b i o w s k a i S y p n i e w s k a (1963), zajmując się współżyciem łubinów i seradeli z *Rh. lupini*, nie stwierdziły różnic między różnymi ich gatunkami i odmianami pod względem reagowania na szczepy tej bakterii.

Ci i inni autorzy nie pomijają naturalnie znaczenia warunków klimatycznych i natury środowiska glebowego dla nasilenia współżycia roślin z *Rhizobium*. Np. G r a h a m (1951) podkreśla wpływ klimatu, panującego w różnych strefach geograficznych na różnicowanie się zdolności symbiotycznej szczepów *Rhizobium* w obrębie gatunku *Rh. trifolii*.

Dążąc do zmodernizowania klasyfikacji *Rhizobium* stosuje się obok oznaczania jego zdolności współżycia z różnymi gatunkami roślin, także badanie licznych cech fizjologicznych tych bakterii w ich czystych hodowlach. G o s t k o w s k a (1963) i inni autorzy zwracają też uwagę na wpływ natury stosowanych pożywek hodowlanych na zdolność asymilacyjną *Rhizobium* w symbiozie z rośliną. Na podstawie oznaczenia wielu cech (np. oporności na antybiotyki, zdolności fermentowania cukrów itd.) dzieli S m i t h (1958) rhizobia zaliczane do wyżej wymienionych 6 „klasycznych” grup jedynie na 3 grupy, mianowicie na: 1) *Rh. meliloti*, 2) *Rh. trifolii*, *leguminosarum* i *phaseoli* oraz 3) na różne inne gatunki tej bakterii, wymagające dalszego ich zróżnicowania. Podkreśla się zawsze odrębność bakterii lucerny od innych grup (gatunków?) *Rhizobium*. Natomiast

według G r a h a m a (1958) *Rh. meliloti* spokrewnione jest z niektórymi rodzajami bakterii glebowych (*Agrobacterium radiobacter*, *A. tumefaciens*), które nie wykazują zdolności wiązania wolnego azotu.

Zatrzymamy się nieco dłużej nad współczesnymi próbami klasyfikowania *Rhizobium* na podstawie budowy antygenowej i pokrewieństw serologicznych między szczepami tej bakterii oraz nad użyciem do tego celu ich wrażliwości na różne szczepy fagów. Ciekawe te badania są już w Polsce dość rozwinięte.

### Badania serologiczne

K l e c z k o w s k i i T h o r n t o n (1944), V i n c e n t i M a r s h a l l (1942—1954), K l e c z k o w s k a, N u t m a n i B o n d (1944), S z t e r n (1953), D r o ż a ń s k a (1959—1963) i in. starali się odpowiedzieć na pytanie, czy istnieją pokrewieństwa antygenowe między różnymi grupami i szczepami *Rhizobium*. Najwięcej badań przeprowadzono dotychczas nad bakteriami koniczyny, grochu i lucerny, oznaczając z pomocą różnych metod serologicznych pokrewieństwa ich antygenów H i O. Na podstawie wyników aglutynacji krzyżowej podzielili wymienieni autorzy *Rhizobium* na grupy: 1) bakterii koniczyny, grochu i wyki i 2) bakterii lucerny, V i n c e n t i w s p. dodali do tego, 3) grupę bakterii łąbinu, soi i cowpea (*Vigna sinensis*). Przy tym używając antygeny 0 podzieliła ostatnio D r o ż a ń s k a (1963) grupę *Rh. lupini* na bakterie łąbinu i bakterie seradeli. Stwierdzono jednak na ogół, że nawet w obrębie jednej grupy bakterii, którą stanowi *Rh. trifolii*, nie wszystkie szczepy mają jednakową budowę antygenów. Szczególnie różnorodna jest według D r o ż a ń s k i e j budowa w tej grupie jej antygeny somatycznego. Przy próbach klasyfikacji serologicznej u innych niż wyżej wymienione grupy *Rhizobium* otrzymano dotychczas wyniki rozbieżne.

Na ogół badania te powinny być jeszcze znacznie rozszerzone, obejmując większą niż dotychczas liczbę szczepów *Rhizobium*. Być może, iż uda się wówczas ustalić, jak dalece pokrewieństwa serologiczne między różnymi gatunkami tej bakterii łączą się z ich zdolnością do „krzyżowego” („cross inoculation”) zakażenia różnych rodzajów roślin motylkowych, a więc do powodowania ich brodawkowania. Dotychczas też V i n c e n t et al. (1951, 1954) nie znalazł u poszczególnych szczepów zależności między właściwościami serologicznymi i zdolnością asymilowania wolnego azotu.

Badacze australijscy (patrz V i n c e n t, 1962) stwierdzają przy tym, że budowa antygenowa jest stałą cechą szczepową. Określanie jej może więc mieć duże znaczenie podczas badania mutantów, zwłaszcza takich, które tracą zdolność zakażenia roślin (por. badania genetyczne L o r -

kiewicz et al.). Nadto według M. Read (1953) można z pomocą metod serologicznych odróżniać szczepy bakterii koniczyny, wprowadzane w szczepionkach od bytujących w glebie szczepów rodzimych tej bakterii.

### Typowanie szczepów *Rhizobium* z pomocą fagów

Robione są też próby podzielenia szczepów *Rhizobium* na grupy (gatunki?) na podstawie litycznego oddziaływania na ich komórki szczepów fagów wyodrębnionych z korzeni różnych roślin motylkowych (Laird, 1932; Dorosinskij, 1941; Kleczkowski i Thornton, 1944; Demolon, 1951; Marshall i Vincent 1954; Kleczkowska, 1957; Roslycky, 1962; w Polsce — Kowalski i Staniewski, 1959—1963).

I tu wyniki cytowanych autorów okazały się rozbieżne. Należałoby jeszcze te badania rozszerzyć, używając do nich większej ilości szczepów fagów i *Rhizobium*. Na uwagę zasługują już jednak następujące wyniki badań: 1) według Marshalla i Vincenta (1954), Kleczkowskiej (1957) i u nas Staniewskiego i Kowalskiego (1962) szczepy *Rh. trifolii* i *Rh. leguminosarum* (z brodawek grochu i wyki) należąc do jednej grupy serologicznej, równocześnie należą do jednego „fagotypu” czyli podlegają litycznemu działaniu wspólnych dla nich fagów; 2) podział szczepów *Rhizobium* na podstawie ich wspólnej wrażliwości na określone szczepy fagów nie pokrywa się z ich podziałem na podstawie wywoływania brodawkowania roślin.

Dużo pracy wkładają w badania nad rhizobiofagami Kowalski, Staniewski i wsp. Stwierdzając tak samo, jak inni autorzy pospolite występowanie fagów pod uprawami roślin motylkowych, wyodrębnili oni z korzeni 9 rodzajów roślin motylkowych około 100 szczepów fagów wirulentnych. Stosując je do typowania *Rhizobium* stwierdzili, że szczepy fagów otrzymane z *Rh. trifolii* miały najniższy zasięg zdolności litycznej, gdyż oddziaływały w tym kierunku tylko na bakterie koniczyny, grochu i wyki. Najbardziej poliwalentne były fagi uzyskane dla bakterii grochu i wyki. Nie lizowały one tylko bakterii fasoli. W ogóle *Rh. phaseoli* odznaczało się najslabszą wrażliwością na fagi, gdyż nawet tylko niektóre fagi wyodrębnione dla tego gatunku bakterii mogły rozpuszczać ich komórki. Wąski zakres wrażliwości miały też bakterie soi i bobiku. Autorzy ci rozróżnili dotychczas następujące 7 „fagotypów” *Rhizobium*: 1) bakterie koniczyny, grochu i wyki, 2) grochu, wyki i bobiku, 3) grochu, wyki, lucerny i łubinu, 4) wyki, seradeli i łubinu, 5) seradeli i soi, 6) soi i grochu, 7) fasoli. Podział ten wynika z odrębnej wrażliwości na fagi różnych szczepów *Rhizobium* w obrębie zbadanych jego grup.

Pracując nadal nad lizotypią *Rhizobium* zajmują się nadto K o w a l s k i i S t a n i e w s k i bliższym poznaniem samych fagów, oznaczając ich pokrewieństwa serologiczne między sobą, wrażliwość ich na różne czynniki fizyczne i chemiczne i określając zarazem ich skłonność do mutacji. Prace ich powinny pomóc w rozklasyfikowaniu samych fagów wg ich natury. Na razie sprawę przydatności fagów do klasyfikowania rodzaju *Rhizobium* skomplikowały jeszcze wyniki badań R o s l y c k y' e g o (1962). Badacz ten wyodrębnił z bakterii glebowej *A. radiobacter* fagi, które oprócz tych bakterii mogą rozpuszczać takie komórki bakterii lucerny i koniczyny.

### Badania genetyczne

Wobec znanego zjawiska dużej zmienności *Rhizobium*, które może między innymi wyrażać się w przemianie jego uzdolnień do współżycia z rośliną, liczne badania prowadzone są nad powstawaniem mutantów tych bakterii. (J o r d a n, 1952, K l e c z k o w s k a, 1950—1962; R. B a l a s s a, 1954, 1961 — patrz G. B a l a s s a, 1963; S c h w i n g h a m e r, 1961, 1962; L o r k i e w i c z et al. 1963; Ż e l a z n a, 1963).

Ogólnym celem tych prac jest dopomożenie w wyświetleniu, na czym polega zdolność poszczególnych szczepów do wywoływania nodulacji na korzeniach i do efektywnej symbiozy z określonymi roślinami, przy czym za pomocą metod genetycznych wykonywane są próby otrzymywania szczepów pod tym względem aktywnych. Stosuje się w tym celu naświetlanie komórek bakterii promieniami UV lub X, oddziaływanie antybiotykami i metodę transformacji. Użycie łagodnych fagów do transdukcji jest dopiero projektowane, bada się natomiast mutanty przeżywające działanie fagów rozpuszczających komórki.

Do przekonania się, czy z pomocą tych różnych sposobów uzyskano organizmy o nowych cechach służą różne „znaczniki” rozpoznawcze. Takim znacznikiem będzie np. rodzaj kolonii. A więc notowanie przy otrzymywaniu ze szczepów wyjściowych, które wytwarzają dużo śluzu i dają kolonie „gładkie” (forma S), szczepów wytwarzających kolonie „szorstkie” (forma R) lub „półszorstkie” (RF). Albo też znacznikiem będzie różnica w zdolności syntetyzowania pewnych aminokwasów lub zmiana w oporności na antybiotyki i na fagi i wreszcie — przemiana zdolności wiązania wolnego azotu.

Już w roku 1941 doniósł K r a s i l n i k o w o uzyskaniu z nie wirulentnych (nie zakażających roślin) szczepów *Rh. trifolii*, szczepów w tym kierunku uzdolnionych. Sposobem użytym przez niego była kilkumiesięczna hodowla szczepu nie wirulentnego w środowisku zawierającym przesącz z hodowli szczepu wytwarzającego brodawki na koniczynie.

Prace te bardzo rozwinęła R. B a l a s s a przy użyciu współczesnych metod genetycznych. Badania jej nad mutacjami i transformacjami zasługują na specjalną uwagę. Wykonując transformacje w populacjach *Rh. meliloti* (bakterie lucerny), *Rh. lupini* (b. łąbinu) i *Rh. japonicum* (b. soi) stwierdziła, że proces transformacji ich komórek wywołuje substancja jądrowa — kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA). Określiła przebieg i dynamikę tego procesu u badanych populacji. Udało jej się np. transformowanie szczepów bakterii soi i łąbinu przez oddziaływanie na nie preparatami DNA uzyskanymi z bakterii lucerny, a więc z pomocą czynnika transformującego pochodzącego z innego gatunku *Rhizobium*. W wyniku tego bakterie soi nabrały nowych właściwości i mogły wywoływać brodawkowanie na korzeniach lucerny, przy czym niektóre z transformantów mogły też zacząć wiązać wolny azot w symbiozie z tą rośliną. Natomiast transformowane bakterie łąbinu chociaż wywoływały nodulację na zaszczepionej nimi lucernie, w brodawkach tych jednak nie dawały wiązania wolnego azotu. Z dużo większą częstotliwością otrzymywała B a l a s s a transformanty przy użyciu jako dawcy i biorcy DNA szczepów należących do tego samego gatunku *Rhizobium*. Przetransformowane przez DNA z aktywnych szczepów *Rh. meliloti* szczepy nieaktywne tej bakterii nabierały w niektórych próbach zdolności wiązania wolnego azotu.

Zdając sobie sprawę, że w procesie wiązania wolnego azotu biorą wspólny udział *Rhizobium* i roślina, postawiła autorka pytanie, na jakiej podstawie i jak dalece mogą wpływać mutanty zarówno bakterii, jak roślin na ten proces. Badania w tym kierunku przekazała swoim następcom (B a l a s s a zmarła przed kilku latami). W związku z tym zajęto się w jej pracowni wywoływaniem mutacji w brodawkach korzeniowych, tj. w organach, w których zachodzi współzycie bakterii z rośliną. Otrzymano mutanty w wyniku wstrzykiwania penicyliny do brodawek. B a l a s s a przywiązywała dużą wagę do badania wzajemnego oddziaływania na siebie mutantów nieaktywnych, wewnątrz gatunkowych i heterologicznych.

W tym samym co w pracowni B a l a s s y kierunku idą też badania w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej w Lublinie. Przeprowadziła w nim Ż e l a z n a (1963) rozległe badania nad transformacjami *Rhizobium*. Jako dawców DNA użyła mutanty *Rhizobium* odporne na streptomycynę. Otrzymała przeszło 100 preparatów DNA z takich mutantów bakterii koniczyny, grochu, wyki, bobiku, łąbinu i lucerny. Zanalizowała skład chemiczny poszczególnych preparatów. Biorcami ich miały być szczepy *Rhizobium* należące również do licznych gatunków tej bakterii. Częstotliwość transformacji uzyskana wśród szczepów należących do gatunku *Rh. leguminosarum* wynosiła  $10^{-6}$ . Różne szczepy *Rh. trifoli* były najlepszymi dawcami i biorcami homologicznego DNA. Częstotliwość transformacji w tej grupie dochodziła do  $5 \times 10^{-3}$ . W przeciwieństwie do wyników B a l a s s y

znalazła Żelazna duże pokrewieństwa genetyczne między szczepami bakterii koniczyny, gdyż wszystkie użyte przez nią szczepy transformowały się prawie z jednakową częstotliwością pod wpływem tego samego preparatu DNA. Jakkolwiek udało się Żelaznej otrzymać odporne na streptomycynę mutanty przy użyciu preparatów DNA z różnych innych gatunków *Rhizobium*, były one znacznie mniej częste. Np. DNA uzyskane z niektórych szczepów bakterii grochu transformowało szczepy bakterii koniczyny i lucerny z częstotliwością  $10^{-7}$ . W toku są badania nad innymi niż oporność na streptomycyną cechami otrzymanych transformantów *Rhizobium*.

Ljunggren (1961) wyosobnił ze szczepu *Rh. trifolii*, który wywoływał na koniczynie normalne brodawkowanie, określony polisacharyd i następnie oddziałwał nim na szczep *Rh. trifolii* ewirulentny. W wyniku tego szczep ten zmienił swoje właściwości antygenowe i nabrał zdolności do powodowania nodulacji na tej roślinie. Okazało się następnie (Ljunggren, 1961; Lange i Alexander, 1961), że w preparacie polisacharydowym znajdował się DNA, który powodował transformację.

U nas Lorkiewicz et al. (1963) zajęli się bliżej mutacjami u *Rh. trifolii*. Mutanty te powstawały spontanicznie, lub pod wpływem promieni UV lub też erytromycyny. Znacznikiem stwierdzającym ich powstanie był typ wytwarzanych przez nie kolonii (formy Sm, RF i R, czyli gładkie, półszorstkie i szorstkie) oraz uzdolnienia do fermentowania różnych cukrów. Powstające z form gładkich mutanty RF lub R nie zawierały antygenu W, w przeciwieństwie do form Sm, natomiast antygen P był u form szorstkich bardziej kompletny. W toku jest oznaczenie aktywności symbiotycznej tych mutantów.

Autorzy ci stwierdzili nadto z pomocą odbiałczonych preparatów kwasów nukleinowych, że właściwości antygenowe komórek bakterii koniczyny zależą od zawierającego glukozę polisacharydu identycznego z antygenem somatycznym (0), oraz że jeden ze składników antygenowych ich komórek miał charakter białkowy.

Dygdała (1960) prześledził dokładnie różnice morfologiczne i cytologiczne między komórkami *Rh. leguminosarum* normalnymi i tymi, które przeżyły działanie promieni gamma. Znalazł przy tym przechodzenie komórek w formy bakteroidalne, co normalnie występuje tylko w brodawkach korzeniowych.

Z pomocą promieni X otrzymał Jordan (1962) ze szczepów pasożytniczych bakterii lucerny korzystne mutanty, gdyż wiązały one wolny azot w symbiozie z tą rośliną. Nutman et al. otrzymali również pod wpływem ultrafioletu korzystne pod tym względem mutanty (p. Rothamsted Report z r. 1960). Natomiast Schwinghamer et al. (1961) pod wpływem promieni X lub UV uzyskał mutanty rozpoznane na podstawie



nabytej przez nie oporności na działanie streptomycyny, ale nie nabywającej powyższej zdolności asymilacyjnej. Widzimy więc, że badania nad wpływem promieniowania na powstawanie mutantów korzystnych dla efektywnej symbiozy należałoby jeszcze rozszerzyć. Warto zanotować, że ostatnio otrzymał S. M. Gupta z pomocą UV czerwonego mutantu *Rh. trifolii*, który dobrze nadaje się do badań genetycznych nad na ogół bezbarwnymi szczepami *Rhizobium*.

K l e c z k o w s k a, która od kilkunastu lat poświęca wiele badań rhibiofagom, otrzymała z ich pomocą mutanty *Rh. trifolii* odporne na fagi. Większość tych mutantów miała zarazem ujemną cechę zaniku efektywności symbiotycznej z koniczyną, w przeciwieństwie do utrzymywania się na ogół tej cechy u mutantów opornych na streptomycynę otrzymanych pod wpływem wysokich dawek tego antybiotyku (K l e c z k o w s k a i G u p t a, 1961).

Wobec pospolitego występowania fagów w glebach pod uprawami roślin motylkowych, zwłaszcza długoletnimi, wyraził swego czasu D e m o l o n (1935) pogląd, że zjawiska tzw. „zmęczenia” gleby przypisać należy nadmiernemu rozmnożeniu się fagów niszczących *Rhizobium*. K l e c z k o w s k a (1950, 1960) sądzi jednak, że przyczyną tego jest wywoływanie niekorzystnych mutacji *Rhizobium* przez fagi wirulentne. Sprawą tak częstego „wykoniczyniania się” upraw koniczyny czerwonej warto by się zająć z tego punktu widzenia.

### Fagi „łagodne” (temperate) i zjawisko lizogenii

Fagi łagodne, które mogą być wbudowane do genomu komórek bakterii, bywają używane do badań genetycznych nad niektórymi rodzajami bakterii dzięki możliwości przenoszenia z ich pomocą różnych cech genetycznych z jednych komórek na drugie czyli dzięki tzw. transdukcji.

Dopiero niedawno (M a r s h a l l, 1956) wykryto obecność fagów łagodnych u rodzaju *Rhizobium* i dopiero w roku 1961 Ö r d ö g h i S z e n d e donieśli o częstej obecności tych fagów w szczepach *Rh. meliloti*. K o w a l s k i i S t a n i e w s k i (informacja osobista) stwierdzili to samo, sprawdzając wyzwalanie się fagów łagodnych z komórek bakterii lucerny spontanicznie lub pod wpływem naświetlania tych komórek promieniami UV. Według K o w a l s k i e g o i S t a n i e w s k i e g o około 75% zbadanych przez nich szczepów bakterii lucerny zawierało fagi łagodne. Autorzy ci sądzą też, że lizogenia jest u *Rhizobium* zjawiskiem powszechnym. Zajmują się obecnie pokrewieństwami między uzyskanymi szczepami fagów, ich zdolnością do lizogenizacji oraz ich przydatnością do wywoływania zjawiska transdukcji. Zastosowania szczepów fagów łagod-

nych do badań genetycznych nad *Rhizobium* należy oczekiwać w niedalekiej przyszłości.

Innym torem idą również ciekawe badania genetyczne Nutmana (p. Ziemińska, 1962). Zajmuje się on mianowicie roślinnym partnerem symbiotycznym, krzyżując między sobą różne gatunki koniczyn europejskich i egzotycznych i sprawdzając następnie, czy otrzymane ich krzyżówki nabywają zdolności wchodzenia w skuteczną symbiozę z szczepami *Rhizobium* o znanym, większym lub mniejszym stopniu aktywności asymilacyjnej. Np. szczepy *Rh. trifolii* korzystne dla koniczyny czerwonej (*Tr. pratense*) okazały się nie skuteczne, lub nawet ujemne dla australijskiego *Tr. glomeratum*. Ten ostatni gatunek jako samopylny jest bardzo przydatny do badań genetycznych.

Obok tego prowadzi Nutman badania nad sposobami uaktywnienia tych szczepów *Rhizobium*, które działają ujemnie na koniczynę czerwoną, gdyż pozbawione są zdolności symbiotycznego wiązania azotu. Okazało się, że kilkuletnie „pasażowanie” takich szczepów przez niektóre inne gatunki koniczyny zmienia ich naturę w korzystnym pod tym względem kierunku. Być może, iż otrzymuje się pod wpływem oddziaływania nowego środowiska roślinnego korzystne dla koniczyny czerwonej mutanty *Rhizobium*.

Na czym właściwie polega swoista, szczepowa zdolność *Rhizobium* do wywoływania nodulacji i współżycia tylko z określonymi rodzajami, gatunkami, czy nawet odmianami roślin motylkowych? Odpowiedź na to pytanie spodziewają się uzyskać Fähræus i Ljunggren (1961) po przeprowadzeniu wnikliwej analizy chemicznej i enzymatycznej komórek *Rhizobium* i tkanek roślin. Informacji mogą dostarczyć tylko żywe komórki, nie udało się, bowiem wywołać zjawiska brodawkowania pod wpływem szczepionek zabitych lub wyciągów z nich. Badacze ci stwierdzili już, że istnieje związek między wytwarzaniem poligalakturonazy i powstawaniem brodawek. Enzym ten wytwarzany jest tylko podczas współżycia *Rhizobium* z rośliną, bowiem żaden z partnerów symbiotycznych nie może go wytwarzać samodzielnie.

Ljunggren i Fähræus (1961) wykazali przy tym, że szczepy *Rh. trifolii* nieaktywne można uaktywnić przez dodanie do ich hodowli preparatu poligalakturonazy uzyskanego ze szczepu aktywnego symbiotycznie. Nadto szczepy *Rhizobium* należące do grup uzdolnionych do „krzyżowego zakażenia” w obrębie pewnych gatunków roślin, czyli tzw. „cross inoculation groups” (np. *Rh. lupini* wywołujące brodawkowanie zarówno u łubinu, jak u seradeli) wytwarzają określone polisacharydy.

Wiązanie wolnego azotu w brodawkach korzeniowych czyli „symbioza aktywna” zależy od obecności w tych organach hemoglobiny (tzw. „leghemoglobiny” wg Virtanena (1947). Jest to jedyny znany dotychczas

przypadek powstawania hemoglobiny w świecie roślin wyższych. Ten czerwony pigment wytwarzany jest przez samą roślinę, ale tylko w jej komórkach stykających się z *Rhizobium* czyli w tzw. tkance bakteroidalnej brodawek. Nasilenie procesu wytwarzania leghemoglobiny zależy od rodzaju lub odmiany rośliny, od natury zakażającego ją szczepu *Rhizobium*, od obecności Fe, także Cu i Co i od różnych czynników zewnętrznych. W brodawkach aktywnych gromadzi się też wit. B<sub>12</sub> (p. Allen i Allen, 1958). Wg Falka, Appleby i Porra (cyt wg Jordana, 1962) powstałe na korzeniach roślin brodawki nieaktywne nie mają zdolności wytwarzania składnika hemoglobiny — porfiryn. Powrócimy jeszcze do tej sprawy przy omawianiu wartości różnych metod służących do oceny aktywności szczepów *Rhizobium*.

Według dawniejszych autorów i współcześnie według Kefforda et al. (1960) możliwość rozwoju współżycia różnych szczepów *Rhizobium* z różnymi roślinami uzależniona jest też od zdolności wytwarzania pewnych auksyn. Za najważniejszą z pomiędzy nich uważają ci autorzy kwas indolo-octowy, który syntetyzują bakterie z dostarczanego im przez rośliny tryptofanu.

Nutman, który zajmuje się głównie naturą partnera roślinnego, wykazał, że przy wchodzeniu *Rhizobium* w symbiozę z rośliną ważną rolę odgrywa jej stożek wzrostu. Należy więc poznać bliżej w różnych roślinach skład chemiczny tej najżywotniejszej ich części. Proces wnikania *Rhizobium* do korzeni roślin i wywoływania tworzenia się na nich brodawek zależałyby według Nutmana od wytwarzania w liściach i liścieńkach substancji stymulujących i z drugiej strony od substancji hamujących zawartych w stożkach wzrostu.

Widzimy, że na temat zależności efektywnego współżycia bakterii z roślinami zebrano już znaczną ilość obserwacji i faktów, ale do wyjaśnienia, na czym polega zdolność wchodzenia w symbiozę różnych szczepów *Rhizobium* z różnymi gatunkami roślin mamy przed sobą jeszcze daleką drogę do przebycia. Do rozwikłania tej najistotniejszej sprawy pomogą nam zapewne najbardziej badania enzymatyczne i genetyczne.

## Metody określania aktywności szczepów *Rhizobium*

Tak samo, jak w innych przemysłach opartych na działalności drobnoustrojów (np. w browarnictwie czy produkcji kwasu cytrynowego) produkcja szczepionek dla roślin motylkowych zaczyna się od próbki zawierającej odpowiedni dla niej drobnoustrój, czyli od tzw. szczepionki macierzystej. W wytwórni szczepionek *Rhizobium* dla różnych grup roślin motylkowych ma podstawowe znaczenie wybór do produkcji takich szcze-

pów *Rhizobium*, które obok zdolności wnikania do korzeni roślin i wywoływania tworzenia się na nich brodawek, odznaczają się dużą aktywnością asymilacyjną w symbiozie z rośliną.

Możność szybkiego rozpoznania takich skutecznie działających szczepów *Rhizobium* w celu przeznaczenia ich do produkcji jest więc przedmiotem specjalnych badań różnych pracowni mikrobiologicznych.

Najsukuteczniejszym sposobem wyselekcjonowania dobrych szczepionek macierzystych *Rhizobium* w celu przekazania ich do masowej produkcji jest metoda wegetacyjna, z pomocą której oznacza się rodzaj brodawkowania i porównuje się oddziaływanie różnych szczepów *Rhizobium* na wysokość i jakość plonów roślin. Ale na wyniki takich doświadczeń wegetacyjnych trzeba czekać około 2 miesięcy, a wiadomo, że producent szczepionek nie może na nie czekać zbyt długo. Toteż poszukuje się wciąż możliwie najszybszych sposobów oceny wartości produkcyjnej szczepów *Rhizobium*. Dotychczasowe szybkie metody dzielą się na cytologiczne i biochemiczne.

B e r g e r s e n (1955) rozróżnia aktywne i nieaktywne szczepy *Rh. trifolii* na podstawie różnej budowy bakteroidów wytwarzanych przez nie w brodawkach korzeniowych *Trifolium subterraneum*. Przy tym ten sam gatunek koniczyny australijskiej z łatwością wykazuje, czy zaszczepiono go pożytecznym, czy też nieaktywnym szczepem. W przypadku korzystnego współżycia z *Rhizobium* zmienia barwę swych liści z purpurowej na zieloną, co nigdy nie zachodzi przy braku efektywnej nodulacji. (V i n c e n t, 1954; N u t m a n, 1960).

W hodowlach *in vitro* *Rh. leguminosarum* i *Rh. trifolii* znajduje G o s t k o w s k a (1963) różnice w zapotrzebowaniu pokarmowym ich szczepów aktywnych i nieaktywnych. Te ostatnie cechuje swoista potrzeba tiaminy i kwasu foliowego w pożywce. Szczepy słabo uzdolnione do wiązania azotu odznaczają się też silną zdolnością redukcji azotanów. Na ogół jednak nie znalazła G o s t k o w s k a dotychczas w hodowlach *in vitro* różnic fizjologicznych między szczepami słabo lub silnie wiążącymi wolny azot podczas współżycia z roślinami.

Jak już podano wyżej (p. prace V i r t a n e n a, 1947, także innych autorów) o skuteczności symbiozy poszczególnych szczepów *Rhizobium* świadczy skład chemiczny powstających pod ich wpływem brodawek. Szczepy pasożytnicze lub słabo wiążące wolny azot nie wywołują w brodawkach powstawania czerwonego pigmentu. Znaną jest też rzeczą, że w brodawkach pod tym względem nieaktywnych gromadzi się duży zapas węglowodanowego materiału oddechowego (Z i e m i ę c k a i in.).

W i e r i n g a i B a k h u i s (1957) zastosowali z powodzeniem metodę chromatograficzną do oznaczania składu aminokwasów w soku młodych roślin grochu. Już po upływie 3 tygodni wegetacji znaleźli pod tym wzglę-

dem różnice między roślinami zaszczepionymi szczepami *Rh. leguminosarum* o różnym stopniu aktywności. Mianowicie sok roślin zaszczepionych pożytecznymi dla nich szczepami zawierał duży komplet aminokwasów, podczas gdy w przypadku zastosowania szczepów nieaktywnych w soku młodych roślin znajdował się tylko kwas asparaginowy.

K ł o s o w s k a (1952), a następnie W r ó b e l (1957) badając potencjał oksydoredukcyjny w soku grochu i seradeli zaszczepionych różnymi szczepami stwierdzili zmniejszone nasilenie oddychania w roślinach współżyjących z mało aktywnymi szczepami *Rhizobium*.

W r ó b e l kontynuuje te badania, stosując do nich szczepy o różnej aktywności w symbiozie z lucerną (*Rh. meliloti*) i koniczyną (szczepy *Rh. trifolii*). Nasilenie oddychania w liściach tych roślin, już w wieku ich wynoszącym 2—3 tygodni, było dobrą wskazówką wartości symbiotycznej użytych szczepów. W toku są dalsze badania nad przydatnością tej metody do określania aktywności szczepów używanych do zakażenia różnych roślin motylkowych.

Zwracamy też uwagę czytelnika na wyżej opisane badania L j u n g g r e n a nad wytwarzaniem pod wpływem szczepów o różnej aktywności pewnych enzymów w brodawkach korzeniowych. Wszystkie te sposoby należałoby ze sobą porównać przy użyciu jednakowych organizmów roślinnych i bakteryjnych.

### W y r ó b s z c z e p i o n e k *Rhizobium*

Przypominamy, że różne grupy fizjologiczne (gatunki) *Rhizobium* można znaleźć w glebie, zwłaszcza pod uprawami odpowiadających im rodzajów roślin motylkowych. Przypominamy też, że liczne badania nasze i zagraniczne wykazały już, że nieraz brak jest jednak w glebie *Rhizobium* mogącego współżyć z określoną rośliną, lub że znajdują się w glebie zbyt małe ilości tej grupy bakterii dla zaszczepienia nią wszystkich roślin uprawianych na określonym terenie polowym, albo też że rodzime szczepy *Rhizobium* bywają wadliwe, tj. że nie wpływają skutecznie na plonowanie roślin. By zagwarantować uprawom dobre warunki ich rozwoju i plonowania należy więc, obok potrzebnych zabiegów agrotechnicznych stosować ich szczepienie dostateczną ilością takich komórek *Rhizobium*, które wywołując tworzenie się na korzeniach brodawek wiążą w tych utworach duże ilości azotu atmosferycznego.

Toteż szczepionki dla poszczególnych roślin motylkowych wytwarzane są od kilkadziesiąt lat we wszystkich krajach o wysokiej kulturze rolniczej. O wzmaganiu się tej produkcji świadczyła między innymi międzynarodowa wystawa szczepionek zorganizowana w r. 1960 przez państwa

Allen ó w Madison (USA) z okazji odbywania się tam w tym czasie międzynarodowego kongresu gleboznawczego. Np. według miarodajnego w tych sprawach Erdm ana (1961) w USA produkcja szczepionek *Rhizobium* wystarczała w r. 1939 do zaszczepienia nimi 2—3 milionów buszli ziarna siewnego, a następnie, ciągle wzrastając doszła w r. 1959 do ilości potrzebnej dla około 25 milionów buszli (1 buszel = 0,35 hektolitra).

Szczepionki *Rhizobium* wytwarzane są przez liczne firmy rządowe lub prywatne w bardzo wielu krajach. Na wielką skalę produkowane są w tak wielkich krajach rolniczych, jak USA i Związek Radziecki, ale nawet w małej Belgii jako w kraju o wysokiej kulturze rolniczej istnieją dwie firmy zajmujące się tą produkcją. Produkty poszczególnych wytwórni mają odrębne nazwy: np. Nitragina, Nodogen, Nodulaid, Radicin, Radibak i wiele in. W Polsce wytwórnia szczepionek powstała w r. 1954 i noszą one nazwę Polskiej Nitraginy.

Do wyrobu szczepionek używa się szczepów *Rhizobium* wyodrębnionych z dobrze rozwiniętych brodawek tego gatunku roślin, dla którego są przeznaczone.

Opracowane są normy produkcyjne. Są one podstawą dla kontroli wartości szczepionek, która wykonywa się w przeznaczonych do tego pracowniach mikrobiologicznych. Dobra szczepionka dla takiej czy innej rośliny motylkowej powinna zawierać nie mniejszą, niż określona przez normę liczbę żywych komórek *Rhizobium* i powinna być wytworzona ze szczepu macierzystego, który odznacza się zdolnością wywoływania brodawkowania na roślinach i wiązania we współzyciu z nimi dużej ilości azotu wolnego. Powinna też być przygotowana na takim podłożu, które nie tylko sprzyja mnożeniu się komórek, lecz także jest odpowiednie dla dłuższego przechowywania szczepionki w stanie czynnym. Ostatecznym kryterium przy ocenie wartości szczepionek jest naturalnie ich wpływ na plonowanie roślin.

Do masowej produkcji szczepionek używa się różnych podłoży. Np. w Polsce, w Związku Radzieckim i w Czechosłowacji stosuje się w tym celu odpowiednio dobraną glebę z dodatkiem określonej pożywki. Podłoże to zabezpiecza szczepionkę przed wysychaniem i dobrze chłonie mnożące się bakterie. W USA oprócz gleby stosuje się w licznych firmach torf jako podłoże, stosuje go też np. Szwecja. W niektórych krajach wytwarza się jeszcze „klasyczne” szczepionki agarowe lub płynne. Każda firma produkcyjna dobiera sobie we własnym zakresie takie czy inne podłoża i opracowuje sposób rozmnażania na nich bakterii.

Jak wiadomo, szczepionkami tymi szczepi się ziarno siewne w taki sposób, by mogło ono zatrzymać na sobie dostateczną ilość komórek *Rhizobium*.

Niektóre z firm amerykańskich, a przede wszystkim wielka firma nasienna Northrup King and Co., Nitragin Co. i inne opatentowały w ciągu ostatnich kilku lat nowy sposób szczepienia nasion (lucerny). Sposób ten odciążałby rolników od tego zabiegu, gdyż otrzymywaliby oni nasiona już zaszczepione czyli tzw. „preinoculated” lub „noculized seeds”. Sposób ten polega w zasadzie na powlekaniu nasion zawiesiną komórek *Rhizobium* zmieszaną z substancjami klejącymi i ochronnymi, a następnie na wysuszeniu pod obniżonym ciśnieniem zaszczepionego ziarna przeznaczonego na składowanie lub do bezpośredniej sprzedaży. Liczne jednak pracownie mikrobiologiczne wykazały z pomocą kontrolnych doświadczeń wegetacyjnych, że żywotność bakterii na ziarnach wysuszonych jest bardzo niewielka, zwłaszcza w warunkach wyższych temperatur otoczenia. Przed zastosowaniem tego sposobu w praktyce potrzebne byłyby jeszcze dalsze i wnikliwe badania.

Natomiast za ważną i dojrzewającą dzisiaj sprawę jest uważana możliwość przechowywania w stanie wysuszonym szczepionek macierzystych przy zastosowaniu do tego zabiegu liofilizacji. Przy dużej bowiem zmienności *Rhizobium* długotrwałe prowadzenie ich hodowli na agarze może powodować obniżanie się ich wartości symbiotycznej. Nadto zabieg liofilizacji wymaga znacznie mniej materiałów i nakładu pracy, niż ustawiczne przeszczepianie szczepów na nowe pożywki. Według Wróbla (1960), który od kilku lat prowadzi badania nad wpływem liofilizacji na przeżywalność i aktywność różnych szczepów *Rhizobium*, nawet 3-letnie przechowywanie bakterii łubinu, seradeli i lucerny nie wpłynęło ujemnie na dodatnie ich cechy symbiotyczne. Badania te są kontynuowane.

### F u n g i c y d y i *Rhizobium*

Wobec częstego stosowania zapraw do nasion niektórych roślin motylkowych w celu zniszczenia na nich grzybów pasożytniczych, powstało pytanie, czy można równocześnie stosować fungicydy i szczepionki *Rhizobium*, bez zabijania na nasionach tych ostatnich. Badania podjęte przez G o ł ę b i o w s k ą i J a k u b i s i a k ó w n ę (1963) oraz przez W r ó b l a (1963, p. Sprawozdania z odbytej w r. 1962 drugiej konferencji polskiej na temat *Rhizobium*) wykazały, że niektóre preparaty grzybobójcze, zwłaszcza thiuramowe stosowane w przyjętych stężeniach nie oddziałują szkodliwie na różne gatunki *Rhizobium* i że natomiast preparaty rtęciowe mogą hamować tworzenie się brodawek korzeniowych na zaszczepionych roślinach. Szczególnie wrażliwe okazały się bakterie łubinu. W celu przekonania się, jak dalece w warunkach naturalnych współżycie z *Rhizobium* różnych gatunków roślin motylkowych może być hamowane przez

poszczególne fungicydy rozpoczęto wspólnie z Doświadczalnictwem Terenowym badania polowe w tym kierunku. Powinny one wykazać, jakie preparaty można z powodzeniem stosować do zaprawiania nasion bez obniżania plonów roślin w wyniku utraty ich zdolności asymilowania wolnego azotu we współżyciu z *Rhizobium*.

### Wyniki doświadczeń polowych nad szczepieniem roślin motylkowych

Doświadczenia nad wpływem szczepienia na plony roślin motylkowych rozpoczęto już z końcem XIX wieku. W ciągu bieżącego 20-lecia wykonano ich już ogromną ilość w różnych krajach. Uwzględniano przy tym obok rodzaju roślin i natury szczepionki wpływ warunków klimatycznych, natury gleby, jej nawożenia i in. czynników. Wiadomo jest np., że nadmierne dawki nawozów azotowych hamują biologiczne wiązanie wolnego azotu w roślinach. Potwierdzenie tego dały obrady Międzynarodowego Kongresu Łąkarskiego w r. 1960 w Reading (p. Ziemięcka, 1962). Omówiliśmy te sprawy podczas pierwszej polskiej konferencji (1958) poświęconej *Rhizobium* (p. w sprawozdaniach z niej referat Wróbla). Dla przykładu przytoczymy tu obliczenia skuteczności szczepienia w niektórych krajach. W Związku Radzieckim, gdzie wykonano bardzo wiele doświadczeń polowych z różnymi szczepionkami, otrzymano zwyczajki plonów w około 75% doświadczeń. Przyrosty wynosiły dla poszczególnych roślin 7—60% (Rudakow, 1951; Bieriozowa, 1955). W Szwecji 99% doświadczeń polowych z szczepieniem lucerny i 97% doświadczeń z koniczyną dało wyniki dodatnie. Przyrosty plonów lucerny wahały się w szerokich granicach 15—900%, plonów koniczyny w granicach 3—300% (Bjälve, 1949). W Belgii, gdzie szczepi się lucernę zawsze, otrzymuje się średnio 20% zwyczajkę jej plonów i w niektórych rejonach zwyczajka ta dochodzi do 120%. Według kalkulacji handlowej szczepienie lucerny przynosi w tym kraju rocznie kilka milionów franków belgijskich czystego zysku (Manili Bonnier, 1955). Dodatni wpływ szczepienia na plony różnych upraw motylkowych notuje się też we wszystkich innych krajach rolniczych. Uwzględnia się przy tym nie tylko zwyczajki lecz także polepszanie się jakości plonów, oraz korzystny wpływ upraw szczepionych na rośliny następcze.

W Polsce doświadczenia polowe nad skutecznością szczepienia rozpoczęto w latach trzydziestych (Ziemięcka et al., 1937). Po II wojnie światowej wykonano liczne doświadczenia wazonowe i jeszcze — w porównaniu z innymi krajami rolniczymi — niezbyt wiele doświadczeń polowych. Przeprowadza się je ze wszystkimi uprawianymi u nas gatun-



kami roślin na różnych glebach i w różnych rejonach kraju, dzięki współpracy z doświadczalnictwem. Zwyżki plonów ziarna lub siana pod wpływem szczepienia otrzymano w latach 1946—1961 średnio w 75% doświadczeń. Najczęściej i najwdzięczniej reagowały na szczepienie, oprócz egzotycznej u nas soi, lucerna, łubin i seradela, których zwyżki plonów wynosiły średnio około 20%, w niektórych rejonach przekraczając 200%. (W r ó b e l, 1959; W r ó b e l i Z i e m i ę c k a, 1960). Zbyt mała liczba wykonanych dotychczas doświadczeń (ze wszystkimi roślinami uprawnymi w sumie kilkaset) nie upoważnia nas jeszcze do wyciągnięcia wniosków na temat skuteczności szczepienia poszczególnych ich gatunków w różnych rejonach kraju. Doświadczenia te są więc prowadzone nadal przez pracownię Puławską we współpracy z Zakładami Doświadczalnymi i z różnymi gospodarstwami, podlegając następnie ocenie statystycznej. Należy dodać, że z pomocą doświadczeń polowych wykonywanych przez nas stale od 1954 roku mogliśmy już stwierdzić, że Nitragina Polska działa na plony równie skutecznie, jak jej szczepionki macierzyste, dostarczane wytwórni przez pracownię Puławską (W r ó b e l i Z i e m i ę c k a, 1960).

Jak zaznaczyliśmy we wstępie naszego artykułu, szczupłość jego rozmiarów nakazała nam ograniczenie się tylko do niektórych zagadnień, związanych z naturą *Rhizobium* i jego współżycia z roślinami motylkowymi oraz do praktycznego ich zastosowania w rolnictwie. Staraliśmy się przedstawić tutaj jedynie główne kierunki i tendencje rozwojowe badań wykonywanych w ciągu bieżącego 20-lecia. Z konieczności musieliśmy pominąć w tym przeglądzie wiele ważnych osiągnięć z dziedziny właściwości fizjologicznych, potrzeb hodowlanych oraz ekologicznych *Rhizobium*, a nawet w nieco szerszym opisie badań genetycznych pominęliśmy też dorobek różnych autorów, by zbytnio nie rozpraszać uwagi czytelnika. Świadomie pominęliśmy też w naszym artykule tak ważny problem, jak natura chemiczna procesu wiązania wolnego azotu. Nowe hipotezy na ten temat znajdzie bowiem czytelnik w „Postęпах Mikrobiologii” w artykule A. Nowotny - Mieczyskiej z bieżącego roku. Szerzej omówione wyniki badań nad poruszonymi przez nas problemami i nad tymi, których nie mogliśmy tutaj przedstawić, można znaleźć w cytowanych przez nas monografiach i artykułach przeglądowych.

Pragniemy zwrócić uwagę na poważne — na tle dorobku światowego osiągnięcia badaczy polskich zwłaszcza w dziedzinach serologii, genetyki i badań nad fagami *Rhizobium*. Sprawy poświęcone tym i innym badaniom nad *Rhizobium* omawiamy w kraju na zwoływanych w tym celu konferencjach, a wyniki naszych badań ogłaszamy przeważnie w czasopiśmie „Acta Microbiologica Polonica” poświęconym mikrobiologii ogólnej, rolniczej i technicznej, lub w formie doniesień w mikrobiologicznej prasie zagranicznej. Prac polskich na temat bakterii symbiotycznych ro-

ślin motylkowych jest już tak wiele, że nie możemy ich wymienić w przeglądzie piśmiennictwa. Wykaz piśmiennictwa zawiera też w naszym obecnym artykule głównie spis monografii i artykułów przeglądowych autorów krajowych i zagranicznych.

Na zakończenie dodamy, że wielu autorów zadało sobie trud obliczenia, ile azotu przysparza rolnictwu uprawa roślin motylkowych w warunkach ich skutecznego współżycia z *Rhizobium*. Podane przez nich liczby wahają się w granicach 50—200 kg N na ha rocznie, w zależności od gatunku roślinnego i pomyślności zbiorów. W tych granicach oceniono też przyrosty azotu na łąkach i pastwiskach, dzięki obecności w nich koniczyny. Na podstawie danych Rocznika Statystycznego z roku 1963 spróbujemy obliczyć w grubym przybliżeniu, ile może zyskiwać polskie rolnictwo azotu, dzięki uprawie tych roślin i dbałości o warunki ich symbiozy z asymilatorami wolnego azotu. Jeżeli ostrożnie przyjmiemy dolną granicę przyrostów azotu, tj. + 50 kg N na ha, to na około 2 milionach ha upraw strączkowych na ziarno i na paszę wraz z około 4 milionami hektarów zajmowanymi przez nasze łąki i pastwiska rośliny te przysparzałyby w sumie około 300 tysięcy ton azotu rocznie\*.

Jakkolwiek obliczenie nasze ma jedynie wartość orientacyjną, to warto zanotować, że przy dzisiejszych niskich dawkach mineralnych nawozów azotowych (według Roczn. Statyst. w r. 1961 średnio po 18 kg N na ha) stosowanych na 14 mln ha pod uprawy zbożowe, okopowe i inne niemotylkowe, rolnictwo polskie otrzymywałoby obecnie z powietrza „za darmo” przynajmniej tyle azotu związanego biologicznie, co związanego chemicznie azotu fabrycznego.

Niechże to będzie wytłumaczeniem, dlaczego poświęcanie przez mikrobiologów polskich tak wielu badań współżyciu roślin motylkowych z *Rhizobium* wydaje nam się tak bardzo celowe i ważne dla przyszłości naszego rolnictwa.

#### Podziękowanie

Jesteśmy serdecznie wdzięczni kolegom z Lubelskiego Zakładu Mikrobiologii Ogólnej za dopomożenie nam w zredagowaniu naszego artykułu. W szczególności Doc. dr Z. Lorkiewicz i mgr I. Żelazna dostarczyli nam wykaz prac krajowych i zagranicznych z dziedziny genetyki *Rhizobium*, mgr M. Kowalski i mgr R. Staniowski — wykaz osiągnięć w badaniach nad rhizobiofagami, mgr D. Drożdżańska — z dziedziny serologicznej i mgr K. Gostkowska — opis badań własnych nad potrzebami pokarmowymi tej bakterii.

---

\* Według Prianisznikowa (1945) — w Związku Radzieckim ilość azotu pobieranego z powietrza przez rośliny motylkowe byłaby przeszło 10 razy wyższa niż u nas, zważywszy ogrom obszaru pod ich uprawami w tym państwie.

## WYBRANE PIŚMIENNICTWO

1. Allen Ethel K., Allen O. N., 1958: Biological aspects of symbiotic nitrogen fixation. Handbuch d. Pflanzenphysiologie, 8 : 48—118, Berlin.
2. Allen Ethel K., Allen O. N., 1961: The scope of nodulation in *Leguminosae* Recent Advances in Botany: 585—588.
3. Balassa G., 1963: Genetic Transformation of *Rhizobium*: A review of the work of R. Balassa. Bact. Rev., 27—2 : 228—241.
4. Bjälffve G., 1963: The effectiveness of nodule bacteria. Plant and Soil, XVIII, 1 : 70—76.
5. Bergersen F. J., 1960: Biochemical pathways in legume root-nodule nitrogen fixation. Bact. Rev., 24—2 : 246—250.
6. Erdman L. W., 1961: The future of preinoculated seeds. Farm Seed Research Conference: 7—14, Chicago.
7. Erdman L. W., 1959: Legume inoculation. USDA Farmers Bull. No 2003 : 3—16.
8. Fiodorow M. W., 1952: Biologiczeskaja fiksacija azota atmosfery, stron 671. Moskwa.
9. Fred E. B., Baldwin I., McCoy E., 1932: Root nodule bacteria and leguminous plants, stron 343. Madison.
10. Kleczkowska J. 1957—1962: p. sprawozdania z Dep. of Soil Microbiology w Reports of the Rothamsted Experim. Station.
11. Krasilnikow N. A., Mełkumowa T. A. 1963: Izmiencziwost kłubienkowych bakterii. Izw. Ak. N. S. S. S. R., nr 5 : 693—705. Moskwa.
12. Manil P., 1963: Les *Rhizobium* et la fixation symbotique de l'azote. Annales Pasteur, 105—1 : 19—45.
13. Nowotny - Mieczyska A., Gołębiewska J. 1960: Krążenie azotu w przyrodzie, stron 354. Warszawa, P. W. R. i L.
14. Nutman P. S., 1957—1962: p. sprawozdania z Dep. of Soil Microbiology w Reports of the Rothamsted Experim. Station.
15. Prianiszkow D. N., 1945: Azot w żizni rastienij i w ziemledielstwijsze SSSR, stron 197. Moskwa.
16. *Rhizobium* i jego współzycie z roślinami (*Rhizobium* and its symbiosis with leguminous plants) Sprawozdanie z Konferencji Sekcji Mikrobiologii Rolniczej Polskiego Tow. Mikrobiologów z dn. 26 i 27 listopada 1962 r. w Puławach. 1963: Acta Microb. Polon., XII, nr 3 : 155—210.
17. Symbiotyczne wiązanie wolnego azotu przez *Rhizobium* (Symbiotic fixation of free nitrogen by *Rhizobium*). Sprawozdanie z Konferencji Polsk. Tow. Mikrobiologów z dn. 16 i 17 grudnia 1958 r. w Puławach. 1959: Acta Microb. Polon., VIII, nr 3—4 : 209—339.
18. Wróbel Tł, Allen O. N., 1961: Wpływ szczepienia *Rhizobium trifolii* o różnej aktywności na uprawiane w Stanach Zjednoczonych odmiany koniczyn. Pamiętnik Puławski, 4 : 3—13; Wpływ różnych szczepów *Rhizobium meliloti* na różne odmiany lucerny. Ibidem: 15—24.
19. Vincent J. M., 1962: Australian studies of the root-nodule bacteria. A review. Proceed. of the Linnean Society of New South Wales: 8—38.
20. Ziemięcka J., 1937: Rozwój badań nad współzyciem mikroorganizmów z roślinami motylkowymi. Bibl. Puławska, nr 14, stron 36.

21. Ziemińska J., Wróbel T., 1960: Wyniki doświadczeń polowych nad wpływem szczepienia roślin motylkowych na ich plony w latach 1954—1958. Roczn. Nauk Roln. i L., 82—A : 201—209.
22. Ziemińska J., Wróbel T., 1963: Szczepienie roślin motylkowych w Polsce w latach 1959—1961. Streszcz. doniesienia na XV Zjeździe Polsk. Tow. Mikrobiologów w r. 1963 we Wrocławiu: 155.
23. Ziemińska J., 1962: Wycieczka naukowa do Anglii. Postępy Nauk Roln., nr 3:111—122; nr 4:73—78