

A *Pseudomonas stutzeri* aminosav felhasználása aerob viszonyok, valamint nitrát-légzés folyamán

PÁTKAI TAMÁS

MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete, Budapest

A *Pseudomonas stutzeri* szénhidrát-katabolizmusát aerob légzés és nitrát-légzés viszonyai között vizsgálva, SPANGLER és GILMOUR [6] azt találták, hogy a glükolízis és a pentózfoszfát ciklus működésében lényeges különbség nincsen. Azonban glukóz, vagy glukonát C-2, C-3, C-5, C-6 szénatomjából származó CO₂ mennyisége nitrát-légzés alatt jelentősen nő az inkorporáció rovására. Megfigyeléseik teljes összhangban vannak ELLIOT [1] eredményeivel, melyek szerint a *Ps. stutzeri*-ben az oxidatív foszforilálás során 1/2 O₂ felhasználásával 3 mol ATP, egy NO₃⁻-ion redukciója esetében csupán 2 mol ATP szintézisére van lehetőség. Ebből következik, hogy azonos energiamennyiség kinyeréséhez a TCA-ciklus többszöri reciklizációjára van szükség NO₃⁻-légzés közben, mint aerob légzés folyamán. Az idézett radiocémiai vizsgálatok valóban kimutatták a terminális oxidáció — ELLIOT kísérleti alapján valószínűsíthető — intenzitás fokozódását.

A TCA-ciklus fő táplálói a szénhidrátok mellett bizonyos aminosavak, ezért feltételezhető volt, hogy az aminosavak anyagcseréjén is különbségek vannak aerob légzés, illetve nitrátlégzés folyamán. Ilyen megfontolások alapján került sor az alábbi vizsgálatok elvégzésére.

Anyagok és módszerek

A felhasznált törzs a *Pseudomonas stutzeri* NRRL B-927 (CCEB 552) őrzse volt. Fenntartása a következő összetételű táptalajon történt: burgonya-őzet 125 g, NaCl 5,5 g, pepton 10,0 g, glicerol 10,0 ml, agar 15 g, desztillált víz 1000 ml-re. Aminosav-analízisekhez az alábbi táptalaj került felhasználásra: 0,15 m PO₄⁻-puffer, pH 7,4 1000 ml, Casamino Acids, Vitamin Free (DIFCO) 0,350%, nyomelem oldat (PFENNIG [4] szerint) 0,1%. Az anaerob kezeléseknél 2,0 g/l KNO₃-ot is tartalmazott a táptalaj. Sterilizálás 1,5 atm nyomáson 10 percig. Inkubáció 28 C°-on, 50 ml táptalajt tartalmazó Erlenmeyer-lombikokban történt, melyek az aerob kezeléseknél levegővel, az anaeroboknál 30 ppm-nél kisebb O₂-tartalmú N₂-el voltak átáramoltatva. A gázok sterilizálása hígított krómsavoldaton való átmosással történt, az áramlás sebessége rotameterrel ellenőrizve 20 ± 1 l/h volt mindkét esetben.

Hat nap inkubáció után a tenyészetek le lettek centrifugálva, a szuperatansból 5,0 ml-es minták szárazra párolva. A maradék a következő pufferrel (5,0 ml) volt extrahálva: Na-citrát 19,60 g, cc HCl 16,50 ml, tioldiglikol 20,0 ml, Brij 35 (20%) 4,50 ml, oktánsav 0,1 ml, forralt deszt. víz 1000 ml-re.

A *Ps. stutzeri* által képzett nyálka ilyen körülmények között nem oldódik, ez szűréssel el lett távolítva. Az így kapott víztiszta oldatok 0,6 ml-es részletei egy Bio-Chrom aminosavanalizátor oszlopaira kerültek, amely a „BioRad Accelerated Low Pressure System” szerint teljes kvalitatív és kvantitatív aminosav analízist végzett a mintákon.

Az egyes kezelésekből termelődött sejtömeg mérése Pye Unicam SP 800B spektrofotométeren, 660 nm hullámhosszon történt. Ehhez a méréshez tömény sejtszuszpenziók szárazanyag tartalmának és extinkciójának méréséből származó kalibrációs görbe készült, amely a 0,1–1,25 mg sejt/ml tartományban lineáris volt.

A munka során felhasznált vegyszerek a kereskedelemben kapható legjobb minőségűek voltak. Az aminosavanalízishez szükséges vegyszerek a „BioRad Laboratories” gyártmányai, a táptalajok alkatrészei DIFCO gyártmányúak voltak.

Eredmények és következtetések

A mért adatok összesítve az 1. táblázatban található, amelyből néhány fontosabb összefüggés azonnal szembetűnik. Legfontosabb, hogy a *Ps. stutzeri* szaporodása aerob viszonyok között nitrát hatására mintegy 10%-kal, aktív denitrifikációt folytatva több mint 80%-kal csökken. Ugyanakkor az egységnyi sejttömegre vonatkoztatott aminosavforgalom kerekén 25%-kal, illetve 200%-kal nő. A felhasznált nitráttal ekvivalens kationfelesleg növeli a pH-t, ami maga után vonja az E_H csökkenését.

Az aminosavfelhasználás nemcsak egészében növekszik nitrát hatására, hanem a felhasználás spektrumában is változások mutatkoznak. Ezekben az eltérésekben néhány többé-kevésbé bonyolult törvényszerűség ismerhető fel, melyeket célszerűnek látszik kezelésként tárgyalni.

Aerob légzés

Az 1. táblázat adatainak értékelését megkönnyíti, ha az egyes aminosavak százalékos részvételét tekintjük az adott keverékben, illetve a felhasználás egészében. Ilyen értelemben átszámítva a mért értékeket, a 2. táblázat adatait kapjuk (2. táblázat). (Meg kell jegyezni, hogy az adatok a ténylegesen adott aminosavmennyiségre vonatkoznak, ugyanis az alkalmazott kazeinhidrolizátum gyári közlés szerint, mintegy 40% szervesen kötött sót tartalmaz. E frakció főbb komponensei méréseink szerint a következők: Cl^- 22,2%, Na^+ 15,15%, K^+ 1,26%, Ca^{2+} 0,14%.)

Megállapítható, hogy aerob viszonyok között a *Ps. stutzeri* egyes aminosavakat a felhasználás szempontjából némi előnyben részesít. Összmennyiséget és felhasználásbeli eltolódásokat egyaránt szemelőtt tartva a glutamat, aspartat, a leucinok, alanin, glicin jelentősebb preferáltsága észlelhető. Ezzel szemben szerin, prolin, tirozin, fenilalanin kisebb mérvű, a többé-kevésbé bázikus hisztidin, arginin, lizin viszonylag nagyobb háttérbeszorulása figyelhető meg. Különösen a lizin felvétele alacsony, ha figyelembe vesszük, hogy az adott keverékben több van belőle, mint pl. aspartat, de felhasználása ebben a relációban az 50%-ot sem éri el.

A teljes aminosavfelhasználás 1 mg szárazanyagra vonatkoztatva 2,0499 mg, tehát a szárazanyag produkció 49,8%. Ez az adat jó egyezésben van SPANGLER és GILMOUR a bevezetésben említett dolgozatának adataival.

1. táblázat

 A *Ps. stutzeri* aminosavfelhasználása különböző kísérleti körülmények között

(1) Aminosav	(2) Adott aminosav mikromole/ml	(3) Felvett aminosav mikromole/mg szárazanyag		
		Aerob	Aerob + NO ₂	Anaerob + NO ₂
Asp	1,34	1,69	1,86	3,99
Thre	0,85	0,92	1,18	5,40
Ser	1,11	1,06	1,55	5,06
Glu	2,00	2,48	2,80	11,50
Pro	0,65	0,70	0,92	4,08
Gly	0,79	0,99	1,11	2,85
Ala	1,09	1,36	1,54	4,32
CySH	0,0059	0,0072	0,0084	0
Val	1,03	1,21	1,46	0
Met	0,42	0,45	0,59	2,30
i-Leu	0,79	3,20	3,70	0
Leu	1,87			0
Tyr	0,28	0,25	0,39	1,35
Phe	0,22	0,19	0,28	1,00
Lys	1,38	0,69	1,22	2,02
Hys	0,34	0,25	0,47	2,35
Arg	0,45	0,19	0,44	1,69
NH ₄ ⁺	1,26	1,15	1,18	7,05
Felvétel NH ₄ ⁺ nélkül mikro-				
mole		15,63	19,61	47,92
µg		2049,5	2561,3	6082,0
Sejttömeg mg/ml		0,800	0,710	0,145
pH az inkubáció végén		8,06	8,92	9,32
E _H az inkubáció végén mV		+ 288	+ 276	+ 212

2. táblázat

 A *Ps. stutzeri* aminosavfelhasználásának spektruma aerob viszonyok között

(1) Aminosav	(2) Adott %	(3) Felhasznált %	(4) Különbség
Asp	8,45	10,08	1,63
Thre	5,35	5,48	0,13
Ser	7,00	6,31	-0,69
Glu	12,61	14,80	2,19
Pro	4,09	3,69	-0,40
Gly	4,97	5,90	0,93
Ala	6,86	8,10	1,24
CySH	0,03	0,04	0,01
Val	6,50	6,70	0,20
Met	2,64	2,68	0,04
i-Leu	4,97	19,05	2,28
Leu	11,80		
Tyr	1,76	1,49	-0,27
Phe	1,38	1,13	-0,25
Lys	8,70	4,11	-4,59
Hys	2,14	1,49	-0,65
Arg	2,84	1,13	-1,71
NH ₄ ⁺	7,90	6,85	1,05
Összesen ...	99,99	99,03	

Aerob légzés nitrát jelenlétében

Ez a kezelés némi magyarázatra szorul, hiszen a nitrát-légzés anaerob folyamat. Azonban az eddigi vizsgálatok szerint az aerob légzésről a nitrát-légzésre való áttérés nem egy határozott oxigéntenziónál ugrásszerűen, hanem folyamatos átmenettel történik. (LENHOFF és munkatársai [3]).

Ezért feltételezhető, hogy amennyiben a nitrát-légzés szubsztrátszinten változásokat okoz, ezek az egyébként elsősorban aerob légzést folytató sejt anyagcseréjében, ha kismértékben is, de érvényesülnek.

A mért adatok igazolták ezt az elképzelést. Mindenek előtt a szaporodás kismérvű csökkenése észlelhető, megnövekedett aminosavforgalom mellett. Szárazanyag termelés az aminosavfelhasználás 40,0%-ára csökken. Az aminosavfelhasználás spektrumában lényeges változás következik be, az aminosavak többségét az adott keverék arányai szerint veszi fel. Az aerob viszonyok között észlelt felhasználásbeli különbségek elmosódnak, csak a fenilalanin, arginin, lizin felvételének viszonylag alacsony szintje marad jellemző.

Nitrát-légzés

Anaerob viszonyok között a vizsgált törzs szaporodása nagymértékben csökken, ugyanakkor az aminosavfelhasználás rendkívüli módon fokozódik. Az 1 mg szárazanyagra vonatkoztatott aminosavfelhasználás 6,082 mg (1. táblázat) tehát a teljes aminosavforgalomnak csupán 17,3%-a fordítódik testcélra. Ez lényegesen alacsonyabb érték SPANGLER és munkatársai [6] által a *Ps. stutzeri* szénhidrátkatabolizmusának vizsgálata közben megfigyeltéknél. Ennek ellenére nincsen feltétlen ellentmondásban velük, mivel az idézett szerzők más törzssel és lényegesen eltérő kísérleti feltételek között nyerték azokat. Elsősorban a kísérletek időtartamának jelentős különbsége (néhány óra, ill. 6 nap) okozhatja ezt az eltérést.

Az egyes aminosavak felhasználását külön-külön tekintve megállapítható, hogy felvételük sem koncentrációjukkal, sem egyszerű fizikai-kémiai tulajdonságaikkal nem arányos. Anaerob/aerob hányadosokat számítva az asparagin, glicin, alanin, lizin, kisebb háttérbeszorulása, hisztidin és arginin átlagnál nagyobb felvételfokozódása észlelhető. Ezek a változások részben a koncentrációviszonyokkal magyarázhatók és nem látszanak túlzottan jelentősnek. Megjegyzésre érdemes viszont, hogy a glutaminsav az összes aminosavfelhasználásban 27,5%-ban részesedik, ami adott mennyiségéhez képest is feltűnő és összhangban áll a törzs tenyésztése során megfigyelt „glutamatkedvelésével”.

Négy aminosavat, nevezetesen a valint, leucint, i-leucint és ciszteint nitrát-légzés közben a törzs nem veszi fel. Az előbbi három változatlan formában, a cisztein pedig a mintafeldolgozás során cisztinné oxidálódva teljes egészében visszamérhető. Az említett aminosavak felhasználásának megszűnése összefüggésben lehet a *Ps. stutzeri* már régen megfigyelt telepstruktúra-változásaival. Ugyanis a friss izolátumok ráncos, száraz, koherens kolóniákat képeznek. Röviddel a faj leírása után, még a múlt században, elsőként KÜNNE-MANN [2] számol be mukoid variánsok fellépéséről. Ezt a disszociációt először VAN NIEL és ALLEN [8] hozzák összefüggésbe az aerob illetve denitrifikációt folytató életmód változásaival. Szerintük a jellemző koloniastruktúra többé-kevésbé stabilizálható nitrát-tartalmú táptalajokon való tenyésztéssel. Idővel

azonban egyre nagyobb lesz a mukoid típusok száma. STANIER és munkatársai [7] szerint az eredeti struktúrát a mukoid mutánsok egy része visszanyeri, ha néhány nemzedéken keresztül aktív denitrifikációra kényszerítjük. Saját tapasztalataink megerősítik e megfigyeléseket, továbbmenően az említett változások hideg-sokkal való kiválthatóságát is észleltük.

Összegezve, különböző környezeti hatásokra a *Ps. stutzeri* a sejtfal-szintézis (ezen keresztül a telepstruktúra) változásával is reagál. A megváltozott sejtfal az egyes aminosavak felvételében különbségeket okozhat, mint azt SHOCKMAN és munkatársai [5], valamint más szerzők antibiotikumokkal, UV-sugárzással, ozmotikus sokkal, stb. szembeni érzékenységgel kapcsolatban már többször kimutatták.

Összefoglalás

1. Aerob viszonyok között a kazeinhidrolizatum komplex aminosavkeverékéből a *Ps. stutzeri* valamennyi aminosavat hasznosítja. Glutamat, asparat, a leucinok, alanin, glicin kissé előnyben részesül, míg a bázikus aminosavak, nevezetesen a hisztidin, arginin, lizin háttérbe szorulnak. Az inkorporáció megközelíti az 50%-ot.

2. Aerob viszonyok között, nitrát hatására az inkorporáció csökken. Az egyes aminosavakat az adott keverék arányai szerint veszi fel, csupán a fenilalanin, arginin, lizin felhasználása kisebb mérvű.

3. Nitrát-légzés közben négy aminosavat (Val, Leu, i-Leu, CySH) a vizsgált törzs nem hasznosít.

A többi aminosav —különösen a glutamat — felhasználása erősen nő az inkorporáció rovására. Az egyes aminosavak felhasználása sem koncentrációjával, sem egyszerű fizikai-kémiai tulajdonságaikkal nem arányos.

4. A kapott eredmények összhangban állnak azokkal a más oldalról nyert következtetésekkel, melyek szerint denitrifikáció közben a TCA-ciklus reciklizációja fokozódik.

Irodalom

- [1] ELLIOT, L. F.: Phosphorus metabolism in *Pseudomonas stutzeri*. Ph. D. Thesis. Oregon State University. Corvallis. 1965.
- [2] KÜNNEMANN, O.: Über denitrifizierende Mikroorganismen. Die Landwirtsch. Versuchsstationen **50**. 65—113. 1898.
- [3] LENHOFF, H. M., NICHOLAS, D. J. D. & KAPLAN, N. D.: Effects of oxygen, iron and molybdenum on routes of electron transfer in *Pseudomonas fluorescens*. J. Biol. Chem. **220**. 983—995. 1956.
- [4] PFENNIG, N.: Eine vollsynthetische Nährlösung zur selektiven Anreicherung einiger Schwefelpurpurbakterien. Naturwissenschaften **48**. 136. 1961.
- [5] SHOCKMAN, G. D., KOLB, J. J. & TOENNIES, G.: Relations between bacterial cell wall synthesis, growth phase, and autolysis. J. Biol. Chem. **230**. 961—977. 1958.
- [6] SPANGLER, W. J. & GILMOUR, C. M.: Biochemistry of nitrate respiration in *Pseudomonas stutzeri*. I. Aerobic and nitrate respiration routes of carbohydrate catabolism. J. Bact. **91**. 245—250. 1966.
- [7] STANIER, R. Y., PALLERONI, N. J. & DOUDOROFF, M.: The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. J. Gen. Microbiol. **43**. 159—271. 1966.
- [8] VAN NIEL, C. B. & ALLEN, M. B.: A note on *Pseudomonas stutzeri*. J. Bact. **64**. 413—422. 1952.

Érkezett: 1969. december 22.

Utilization of Amino Acids by *Pseudomonas Stutzeri* under Aerobic Conditions and During Nitrate Respiration

T. PÁTKAI

Research Institute of Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

Summary

1. In the case of aerobic conditions the *Ps. stutzeri* utilises all amino acids from the complex mixture of casein hydrolysate. Glutamate, aspartate, the leucins, alanine were more preferable, while the more or less basic amino acids, namely histidine, arginine, lysine less so. The incorporation was about 50%.

2. Under aerobic conditions, with added nitrate, the incorporation decreased. Each amino acid is utilised according to the ratio in the given mixture, except phenylalanine, arginine, lysine which seemed to be less preferable.

3. During nitrate respiration four amino acids were not utilised by this strain. (Val, Leu, i-Leu, CySH.) The utilisation of the remaining highly increased to the disadvantage of incorporation. The uptake of the amino acids did not correlate either their concentrations, or with simple physico-chemical properties.

4. These results are in agreement with results obtained by other authors from different aspects, to which the recyclicalisation of the TCA cycle increases during nitrate respiration.

Table 1. Utilization of amino acids by *Ps. stutzeri* under different experimental conditions. (1) Amino acid. (2) Amino acid added, micromole/ml. (3) Amino acid utilised, micromole/dwt.

Table 2. Utilization of amino acids by *Ps. stutzeri* under aerobic conditions. (1) Amino acid. (2) Added, percent. (3) Utilised, percent. (4) Difference

Aminosäureverbrauch von *Pseudomonas stutzeri* unter aeroben Verhältnissen und im Laufe von Nitrat-Atmung

T. PÁTKAI

Forschungsinstitut für Bodenkunde und Agrikulturchemie der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest

Zusammenfassung

1. Unter aeroben Verhältnissen verwendet *Ps. stutzeri* alle Aminosäuren des Kaseinhydrolysates. In diesem Vorgang werden aber das Glutamat, Aspartat, die Leucine, das Alanin und Glycin von *Ps. stutzeri* in geringem Masse bevorzugt, während die basischen Aminosäuren, und zwar das Histidin, Arginin und Lysin zurückgedrängt werden. Die Inkorporation ist nahe zu 50%.

2. Auf Wirkung von Nitrat nimmt die Inkorporation unter aeroben Verhältnissen ab. Die einzelnen Aminosäuren werden in dem Verhältnis aufgenommen, in dem sie in dem Hydrolysat zugegen sind, nur der Verbrauch von Phenylalanin, Arginin und Lysin ist geringer.

3. Während der Nitrat-Atmung werden vom untersuchten Stamm vier Aminosäuren (Val, Leu, i-Leu, CySH) nicht aufgenommen. Der Verbrauch der übrigen Aminosäuren — insbesondere des Glutamates — nimmt auf Kosten der Inkorporation stark zu. Der Verbrauch der einzelnen Aminosäuren steht weder mit ihrer Konzentration, noch mit ihren einfachen physikalisch-chemischen Eigenschaften im Verhältnis.

4. Die gewonnenen Ergebnisse stehen mit den anderseitigen Folgerungen im Einklang, demnach sich die Recyklicalisation des TCA-Cyklus im Laufe der Denitrifikation steigert.

Tab. 1. Aminosäureverbrauch des *Ps. stutzeri* unter verschiedenen Versuchsbedingungen. (1) Aminosäure. (2) Aminosäure-Gabe mikromole/ml. (3) Menge der aufgenommenen Aminosäure, mikromole/mg Trockensubstanz.

Tab. 2. Spektrum des Aminosäureverbrauches von *Ps. stutzeri* unter aeroben Verhältnissen. (1) Aminosäure. (2) gegeben, %. (3) verbraucht, %. (4) Differenz.

Использование аминокислот *Pseudomonas stutzeri* в аэробных условиях и в процессе нитратного дыхания

Т. ПАТКАИ

Научно-исследовательский институт почвоведения и агрохимии АН Венгрии, Будапешт

Резюме

1. В аэробных условиях *Pseudomonas stutzeri* использует все аминокислоты из гидролизата казеина. В первую очередь используются глутамат, аспарат, лейцин, аланин, глицин. Использование щелочных аминокислот, аргинина, лизина, гистидина идет медленнее. Инкорпорация (включение в белки) приближается к 50-ти процентам.

2. В аэробных условиях под влиянием нитратов инкорпорация снижается. Поступление отдельных аминокислот в клетку идет по концентрационному градиенту, только усвоение фенилаланина, аргинина, лизина проходит ниже значения концентрационного градиента.

3. При нитратном дыхании исследованный штамм не потребляет 4-х аминокислот (Валин, лейцин, изолейцин, цистеин). Использование остальных аминокислот особенно глутамата сильно возрастает в ущерб инкорпорации. Использование отдельных аминокислот не соответствует ни их концентрациям, ни их простым физико-химическим свойствам.

4. Полученные результаты исследований совпадают с результатами исследований других сторон метаболизма, по которым в процессе денитрификации возрастает рециклизация цикла трикарбоновых кислот.

Табл. 1. Использование аминокислот *Ps. Stutzeri* в различных условиях опыта. (1) Аминокислота. (2) Данная аминокислота в микромоль/мл. (3) Усвоенная аминокислота в микромоль/мл сухого вещества.

Табл. 2. Спектр усвоения аминокислот *Ps. Stutzeri* в аэробных условиях. (1) Аминокислота. (2) Данная аминокислота в %. (3) Усвоенная аминокислота в %. (4) Разница.