

## A talajban élő sugárgombák hatása az *Azotobacter chroococcum* fejlődésére természetes viszonyok között

SZEGI JÓZSEF

*Talajbiológiai Kutató Laboratórium, Sopron*

A természetben az egyes mikrobafajok között hasonlóan, mint a magasabbrendű élőlényeknél, éles harc folyik a létezésért. Ismeretes, hogy a patogén baktériumok nagy többsége a talajba jutva igen gyorsan elpusztul. Ugyancsak sok kutató megfigyelte, hogy a vetőmagvak baktériumos kezelése után egyes talajokban a gümőbaktériumok és az *Azotobacter* igen gyorsan elpusztulnak. Azok a tényezők, melyek kiváltják a baktériumok pusztulását a talajban, különbözőek. Egyes esetekben magyarázhatók kémiai okokkal (antiszeptikus anyagok fokozott felhalmozódása), más esetekben fiziko-kémiai okokkal (kedvezőtlen pH, rH-viszonyok, oxigénhiány stb.), azonban nem kevesebb jelentősége van az antagonista mikrobák által kiválasztott antibiotikus anyagok baktériumölő hatásának sem. Nand i [11], Grossbard [3, 4, 5], Krassilnikov [7, 8], Korenjako és munkatársai [6] Wright [17, 18, 19], Szabó és Marton [13], és mások a különböző talajokban antibiotikus anyagok felhalmozódását figyelték meg. Ezzel ellentétben Lewis [9], Waksman és Woodruff [16], Siminoff és Gottlieb [12], Martin és Gottlieb [10] az antibiotikumok talajbeli inaktivációjáról számolnak be.

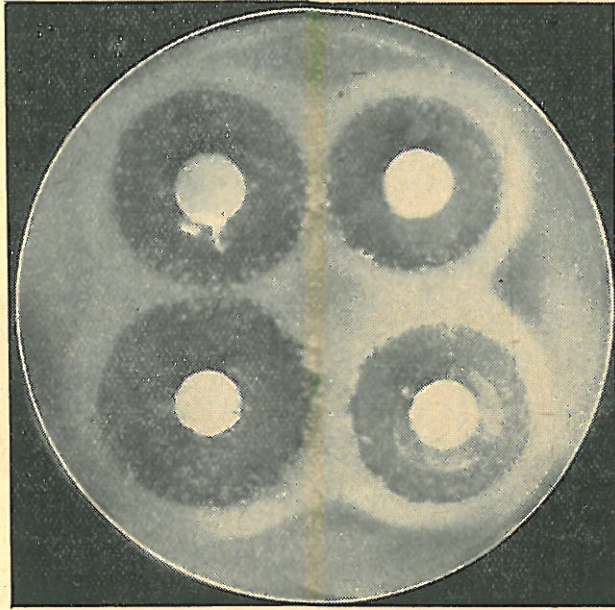
Mint ismeretes, mind az *Azotobacter* különböző fajai, mind a talajban élő sugárgombák a természetben igen elterjedtek s egyes talajok mikrobapopulációjának igen jelentős hányadát alkotják. Mindkét mikroba csoportnak fontos szerepe van a talajban végbemenő biológiai folyamatoknál. Az *Azotobacter* jelentős mennyiségű molekuláris nitrogént köt meg az atmoszférából, a sugárgombák pedig részt vesznek a talajba kerülő nehezen bomló anyagok, cellulóz, zsírok, viaszok, lignin, kitin és parafin mineralizációjában, sőt a humuszvegyületek lebontásában is. A sugárgombák igen magas százalékban antagonisták, s az általuk kiválasztott antibiotikus anyagokat igen elterjedten használják a gyógyászatban, sőt újabban a mezőgazdaságban is.

### Kísérleti rész

Munkám első részében annak megállapítását tűztem magam elé célul, hogy vajon a kísérletbe vont sugárgombák halmoznak-e fel antibiotikus anyagot a talajban, s ha igen, az *Azotobacter* milyen fokban érzékeny a felhalmozott antibiotikumokkal szemben. Munkám során két sugárgomba törzset használtam fel, melyeket T. K. Iljina, a Szovjetunió Tudományos Akadémiája Mikrobiológiai Intézetének tudományos munkatársa bocsátott rendelkezésemre. Megállapítottam, hogy ezek a törzsek Krassilnikov baktériumhatározója alapján legközelebb állanak az *Actinomyces longisporus* Krassilnikov 1941 fajhoz [14, 15], amely a longisporin nevű antibiotikumot termeli.

Az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzset Fjodorov professzor bocsátotta rendelkezésemre a Moszkvai Timirjavez Mezőgazdasági Akadémia Mikrobiológiai Tanszékének kollekcijából. Ez a törzs a Szovjetunióban igen elterjedt, s jóformán mindenütt megtalálható, ahol mikrobiológiai kutatómunka folyik. Igen magas effektivitású s 1 g glükózra 13—14 mg nitrogént köt meg az atmoszférából.

Agarblokk-teszt módszerrel megállapítottam, hogy az *Actinomyces longisporus* mindkét törzse (11-es és 20-as törzsek) igen erős antagonistái a kísérletbe vont *Azotobacter*-nek (1. ábra).



1. ábra

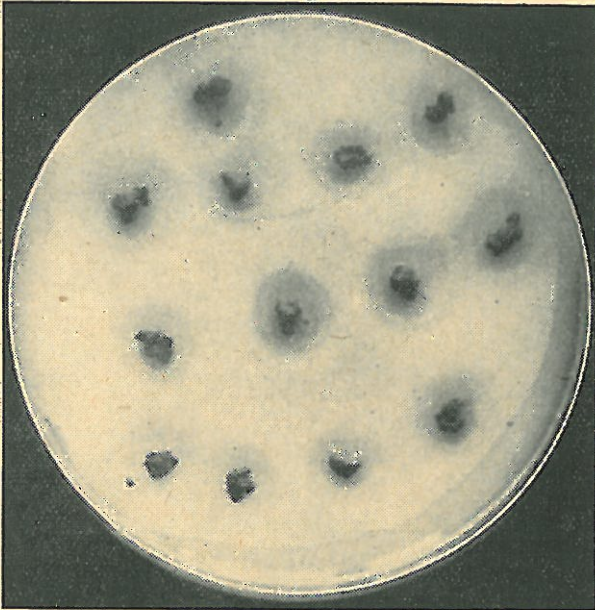
*Actinomyces longisporus* 20-as törzs antagonista hatása az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs fejlődésére

A Timirjavez Mezőgazdasági Akadémia kísérleti terének gyepes podzol talajából, melynek kémhatását előzőleg  $\text{CaCO}_3$  bevitelével (1,5%) pH 6,2-re emeltem fel, bemérettem 25—25 g-ot 100 ml-es Erlenmeyer-lombikokba. A kísérletet két ismétlésben állítottam be. A lombikok egy részéhez kiegészítő szénforrásként 2% glükózt, keményítőt és szalmalisztet adtam, a kísérlet másik variánsába nem vittem be kiegészítő energiaforrást. A keményítő és szalmaliszt bevitelére még a talaj sterilizációja előtt történt, a glükózt pedig a sterilizáció után pipettáztam be steril oldat formájában, a karamellizálás elkerülése végett.

A lombikokban levő talajt deszt. vízzel kissé megnedvesítettem s a lombikok egy részét másfél atmoszféra nyomás mellett 2 órán át autoklávban sterilizáltam. Ezután mind a steril, mind a nem steril lombikokat beoltottam az említett sugárgombák egyhetes tenyészetének spórasuszpenziójával. A spórasuszpenzióval bevitt víz mennyiségét úgy számítottam ki, hogy vele együtt a talaj nedvességtartalma a maximális vízkapacitás 60%-át érje el.

A lombikokat termosztátban 32 C° hőmérsékleten 14 napig inkubáltam. Közben, hogy a talaj kiszáradását megakadályozzam, időnként meghatározott mennyiségű steril deszt. vizet pipettáztam be az egyes lombikokba.

Az inkubáció végén megfigyeltem, hogy a steril talajt tartalmazó szerves anyagokkal gazdagított variánsok felszínén erős fehér hárttyát képeznek a sugárgombák. A szerves anyagokkal nem gazdagított steril talaj felszínén a sugárgombák telepeit apró fehér foltok alakjában lehetett megfigyelni. A nem steril variánsok felszínén a sugárgombák telepeit nem észleltem.



2. ábra

Az *Actinomyces longisporus* 20-as törzs által képzett antibiotikum aktivitása steril talajban

A kísérlet befejezésekor meghatároztam a lombikokban levő talaj antibiotikus aktivitását. A meghatározást kétféle módszerrel végeztem. Az első módszer lényege abban áll, hogy Petri-csészében előzőleg *Azotobacter*-rel beoltott szilárd táptalaj felszínére apró talajrögöcskéket helyeztem a vizsgálandó talajból (2. ábra). Az agarlemez F j o d o r o v által módosított N-mentes táptalajt tartalmazta [2]. A második módszerre azért volt szükség, hogy az egyes kísérleti variánsok antibiotikus aktivitását viszonyítani tudjam egymáshoz. Ugyanis a talajrögöcskék nem egyforma nagyságúak, ezért az általuk képzett gátló-zónák is különböznek egymástól. Minden lombikba bepipettáztam 10—10 ml steril deszt. vizet s a lombikok vattadugóit steril gumidugókkal cseréltem fel. A lombikokat egy órán át rázógépből rázattam s utána hat órán át állni hagytam. Miután a talajszuszpenzió leülepedett, steril pipetták segítségével a talaj felszínén levő vizet lepipettáztam, s lyuk-teszt módszerrel meghatároztam az antibiotikus aktivitást. Tesztbaktériumként itt is az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs szolgált a fent említett táptalaj felhasználásával (1. táblázat).

Amint a táblázatból látható, az *Actinomyces longisporus* mindkét törzse a szerves szénforrásokkal gazdagított steril podzol talajban az *Azotobacter*-rel szemben hatékony

antibiotikumot termel, mely aktív állapotban megőrződött. A kísérlet nem steril variánsaiban antibiotikum jelenlétét nem sikerült az általam alkalmazott módszerekkel kimutatni.

Munkám második részében azt akartam megállapítani, hogyan viselkedik az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs sugárgombákkal együtt steril és nem steril talajban.

A kísérletet egyrészt már az előbbi munkámból ismert *Actinomyces longisporus* 20-as törzssel, másrészt egy másik fajjal folytattam. Ez a sugárgomba az *Actinomyces floridae* Finlay 1952 fajhoz tartozik, s

I. táblázat

*Actinomyces longisporus* 11-es és 20-as törzsek által kiválasztott antibiotikus anyag hatása az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs fejlődésére (lyuk-teszt módszer)

Talajba bevitt szénforrás	<i>Act. longisporus</i> 11-es törzs		<i>Act. longisporus</i> 20-as törzs	
	steril	nem steril	steril	nem steril
	talajban a gátlózóna nagysága mm-ben			
Szénforrás bevitel nélkül	—	—	—	—
2% glükóz . . . .	3	—	4	—
2% keményítő . .	3	—	3	—
2% szalmaliszt .	1	—	2	—

Szabó István a soproni Talajbiológiai Kutató Laboratórium munkatársa bocsátotta rendelkezésemre. Az *Actinomyces floridae* faj a saválló baktériumokkal szemben igen effektív viomycin (kereskedelmi nevén viocin) antibiotikumot képezi.

Agarblokk-teszt módszerrel megállapítottam, hogy az általam kísérletbe vont *Actinomyces floridae* törzs huspepton-glükóz agaron csak igen jelentéktelen (2 mm) gátló-zónát képez, viszont a gátló-zóna körül az *Azotobacter* kifejezett stimulációs gyűrűje figyelhető meg. Fjodorov által módosított N-mentes táptalajon, melyhez nitrogénforrásként 1%  $\text{KNO}_3$ -t adtam, az *Actinomyces floridae* agarblokkja körül csak a stimulációs gyűrű figyelhető meg (3. sz. ábra).

Ugyanúgy, mint munkám első részében, 100 ml-es Erlenmeyer-lombikokba bementem 25—25 g-ot a korábban már említett talajtípusból. A talaj kémhatását, tekintve, hogy az *Azotobacter* erre igen érzékeny,  $\text{CaCO}_3$  segítségével pH 6,5-re emeltem fel. A hozzáadott mész mennyisége a talaj súlyának 2%-a volt. A kísérlet beállításának metodikája hasonló az előbbihez azzal a különbséggel, hogy itt csak két szénforrást, glükózt és szalmalisztet használtam fel.

A kísérlet különböző variánsait beoltottam az említett sugárgombák spóraszuszpenziójával, valamint az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs sejtsuszpenziójával. Kontrollként csak *Azotobacter*-rel beoltott lombikok szolgáltak.

Az *Azotobacter* sejtek számát közvetlenül a kísérlet beállítása után, valamint az azt követő tizedik, huszadik és harmincadik napon határoztam meg. A sejtszámlálást ahhoz a módszerhez hasonlóan végeztem, melyet Augier francia kutató 1956-ban leírt [1], azzal az eltéréssel, hogy táptalajként itt is a már korábban említett Fjodorov által módosított N-mentes táptalajt használtam fel. A módszer lényege abban áll, hogy a vizsgálandó talaj előzőleg rázatott vizes szuszpenziójából különböző hígításokat készítek, majd a hígítások 1—1 ml-jét kémcsövekben levő folyékony N-mentes táptalajra viszem át. A sejtszámlálást három ismétlésben végeztem. Kiindulva abból, hogy a legutolsó hígítás, ahol az *Azotobacter* a táptalajban még kinő, a szuszpenzió minden ml-jében egy *Azotobacter* sejtet tartalmaz, s ismerve a hígítás fokát, meg lehet határozni az *Azotobacter* sejtek számát. Ezt a módszert azért választottam, mivel a lemezöntéses módszerrel kapott *Azotobacter* sejtszám meghatározási eredmények kevésbé pontosak. Ugyanis agarlemezen az *Azotobacter* sokkal rosszabbul nő. Az álta-

lam végzett sejtszámlálási módszer nagyjából azonos értékeket ad a közvetlen mikroszkópos sejtszámlálás eredményeivel (2. táblázat).

A táblázat adataiból látható, hogy az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs sejtjeinek száma az *Actinomyces longisporus* 20-as törzsszel végzett együttes bevitel hatására jelentős mértékben csökken, függetlenül attól, hogy kiegészítő szénforrást tartalmazott-e a talaj, vagy nem. Különösen szembeűnő a különbség a kísérlet steril variánsainál, ahol az együttes bevitel esetében az *Azotobacter* sejtek száma az esetek többségében

2. táblázat

Az *Azotobacter* sejtek számának változása a talajban sugárgombákkal való egyidejű talajbavitel után

Szénforrások	Talaj sterilizálása	Kísérlet variációi	Azotobacter sejtek száma (ezrekben) 1 g talajban							
			Beoltáskor	<i>Actinomyces longisporus</i> 20-as törzs			<i>Actinomyces floridæ</i>			
				10 nap múlva	20 nap múlva	30 nap múlva	10 nap múlva	20 nap múlva	30 nap múlva	
Szénforrás bevitel nélkül	steril	<i>Azotobacter</i>	500	10 000	1 000	1 000	10 000	10 000	100	
		<i>Azotobacter</i> <i>Actinomyces</i>	500	100	10	1	10 000	1 000	100	
	nem steril	<i>Azotobacter</i>	500	1 000	100	100	10 000	10 000	100	
		<i>Azotobacter</i> <i>Actinomyces</i>	500	100	10	1	1 000	1 000	100	
	2% glükóz	steril	<i>Azotobacter</i>	500	1 000 000	100 000	10 000	100 000	10 000	100
			<i>Azotobacter</i> <i>Actinomyces</i>	500	10 000	1 000	1 000	100 000	10 000	1 000
nem steril		<i>Azotobacter</i>	500	10 000	10 000	1 000	10 000	1 000	10	
		<i>Azotobacter</i> <i>Actinomyces</i>	500	1 000	1 000	100	1 000	1 000	10	
2% szalmaliszt		steril	<i>Azotobacter</i>	500	10 000	1 000	1 000	1 000	10	1
			<i>Azotobacter</i> <i>Actinomyces</i>	500	1 000	100	1	10 000	100	1
	nem steril	<i>Azotobacter</i>	500	1 000	100	10	1 000	10	10	
		<i>Azotobacter</i> <i>Actinomyces</i>	500	100	10	10	1 000	100	10	

a kontrollnak egy század részéig csökken. Nem steril talajnál szintén megfigyelhető az *Azotobacter* sejtek számának csökkenése, bár itt a különbség a két variáns között valamivel kisebb.

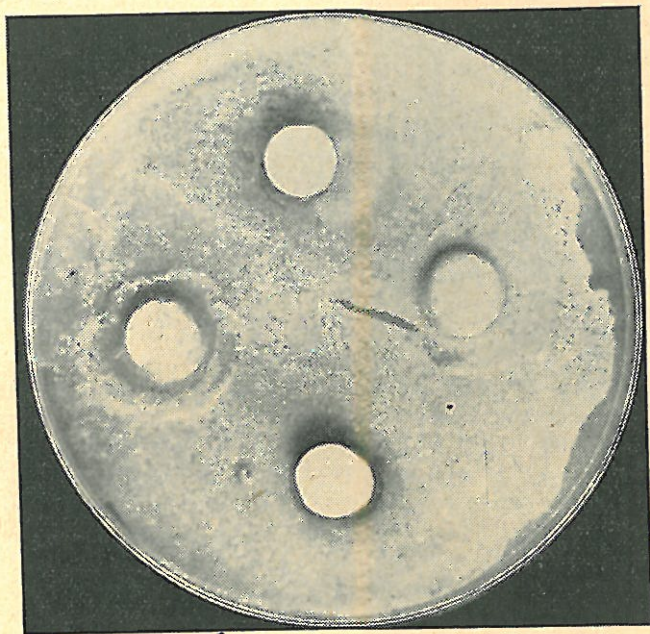
*Actinomyces floridæ* nem fejt ki számottevő hatást a talajban az *Azotobacter* sejtek számának alakulására.

A táblázatból kiemelezhető, hogy a steril talajban a sejtek száma jelentősen több, mint a kísérlet nem steril variánsainál, továbbá azt, hogy az *Azotobacter* sejtek száma mind a steril, mind a nem steril variánsok esetében a bevitel után igen erősen szaporodik, majd későbbiek folyamán fokozatosan csökken.

Kísérleteket folytattam annak megállapítására, hogy a tiszta antibiotikum készítmények a Timirjazev Mezőgazdasági Akadémia gyepes podzol talajába bevive milyen fokban s milyen tényezők hatására inaktíválódnak. Ezekről a kísérletekről egy másik dolgozatban fogok beszámolni.

## Eredmények megbeszélése

Mint a kísérlet adatai mutatják, az *Actinomyces longisporus* 11-es és 20-as törzs csak organikus energiaforrásokkal gazdagított steril talajban halmoz fel az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzsszel szemben hatékony antibiotikus anyagot. Véleményem szerint hiba lenne ezekből az adatokból olyan következtetést levonni, hogy az antibiotikus anyagok a talajban semmiféle szerepet nem játszanak, mivel különböző faktorok



3. ábra

*Actinomyces floridae* stimuláló hatása az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs fejlődésére

hatására inaktiválódnak. Ez az antidarwinista nézet különösen egyes nyugati mikrobiológusok munkáiban jut kifejezésre. Az a tény, hogy nem steril talajban antibiotikus anyagok felhalmozódását nem észleltem, csak részben magyarázható a kiválasztott antibiotikus anyag inaktivációjával. Mint ismeretes, nem steril talajban az egyes mikrobafajok között éles harc folyik a létezésért s a különböző mikrobacsoportok sikeresen konkurálnak mind az *Azotobacterrel*, mind a sugárgombákkal a táplálék megszerzésében. Ezt támassza alá az is, hogy nem steril talajban az *Azotobacter* sejtek száma jóval kevesebb, mint steril talajban, valamint a nem steril talaj felszínén a sugárgombák myceliumának fehér hárttyája sem figyelhető meg. Steril, de szerves anyagokkal nem gazdagított gyepes podzol talajban, annak tápanyagszegénysége nem teszi lehetővé a sugárgombák tömeges elszaporodását.

Hangsúlyozni kívánom, hogy az egyes mikroba-csoportok között igen bonyolult és sokoldalú kölcsönhatás alakul ki, s az általam alkalmazott kísérleti módszer távolról sem elég érzékeny ahhoz, hogy ezt a kölcsönviszonyt pontosan regisztrálni tudja. Valamivel érzékenyebbnek mutatkozik a második módszer, amely az *Azotobacter* sejtek számának alakulásával próbálja nyomon követni a sugárgombák hatását az előbbi fejlődésére. Itt már nemcsak a steril, hanem a nem sterilizált talajban is meg-

figyelhető az *Azotobacter* sejtek számának csökkenése *Actinomyces longisporus* 20-as törzssel való együttes bevitel hatására. Mivel az *Azotobacter*-rel szemben egészen gyenge antagonista, *Actinomyces floridiae*-val történő együttes beoltás nem váltja ki az *Azotobacter* sejteinek ilyen erős csökkenését, fel lehet tételezni, hogy az előbbi esetben sem elsősorban a tápanyagért folyó versengés, hanem az *Actinomyces longisporus* 20-as törzs által kiválasztott antibiotikus anyag az, amely elnyomja az *Azotobacter* fejlődését. A nem sterilizált talajban az *Actinomyces longisporus* által képzett antibiotikus anyag jóllehet a fenti módszerekkel már nem mutatható ki, azonban még elégséges ahhoz, hogy az *Azotobacter* szaporodását gátolja. Bár az antagonista sugárgombák gócszerű telepeinek zónáiból kikerülő antibiotikus anyagok sokszor inaktíválódnak, azonban, mint ahogy Krassilnikov [7] és mások rámutattak, a góccokon belül az antibiotikus anyagok megmaradnak aktív állapotban s fontos szerepük van az egyes mikrofafajok egymás közötti harcában.

A jelen dolgozatban közölt kísérleteket a Moszkvai Timirjavez Mezőgazdasági Akadémia Mikrobiológiai Tanszékén, M. V. Fjodorov professzornak, a Szovjetunió Mezőgazdasági Tudományos Akadémiája levelező tagjának irányítása alatt végeztem.

### Összefoglalás

A moszkvai Timirjavez Mezőgazdasági Akadémia kísérleti területének szerves anyagokkal gazdagított gypes-podzol talajában steril viszonyok között az *Actinomyces longisporus* 11-es és 20-as törzse antibiotikus anyagot halmoz fel. *Azotobacter chroococcum* 53-as törzssel előzőleg beoltott agarlemez felszínén a lyuk-teszt módszerrel vizsgálva ugyancsak elnyomja az *Azotobacter* fejlődését.

*Actinomyces longisporus* 20-as törzs *Azotobacter*-rel együtt a fenti talajba bevive mind steril, mind nem steril viszonyok között, elnyomja az utóbbi fejlődését.

*Actinomyces floridiae* nem fejt ki számottevő hatást a talajban az *Azotobacter* fejlődésére.

Érkezett: 1958. december 12.

### Irodalom

- [1] Augier, J.: A propos de la numeration des *Azotobacter* en milieu liquide. Ann. Inst. Pasteur. 91. 759—765. 1956.
- [2] Fjodorov, M. V.: Rukovodstvo k prakticeszkim zanyjátijám po mikrobiologii. Izd. Szel'hozgiz. Moskva. 1957.
- [3] Grossbard, E.: Production of antibiotic substance, on wheat straw other organic materials and in the soil. Nature. 161. 614. 1948.
- [4] Grossbard, E.: Antibiotic Production by Fungi on Organic Manures and in Soil. J. Gen. Microbiol. 6. 295. 1952.
- [5] Grossbard, E.: Factors influencing antibiotics production in the soil. Rap. et comm. Huitième congr. internat. bot. Paris. 68. 1954.
- [6] Korenjako, A. I., Artamonova, O. J. & Letunova, Sz. V.: Obrazoványije i szohranyényije antibioticeszkkih vescsesztv aktinomicetov v pocsve. Mikrobiologija. 24. 550—557. 1954.
- [7] Krassilnikov, N. A.: Aktinomicetü antagonisztü i antibioticeszkkih vescsesztva. Izd. A. N. SSSR. Moskva—Leningrad. 1950.
- [8] Krassilnikov, N. A.: Mikroorganizmü i plodorodie pocsvü. Izv. A. N. SSSR. szer. biol. 2. 14. 1954.
- [9] Lewis, J.: Bacterial antagonisms with special reference to the effect of *Pseudomonas fluorescens* on sporeforming bacteria of soils. J. Bacter. 17. 89. 1928.

- [10] *Martin, N. & Gottlieb, D.*: The production and role of antibiotics in the soil. III. Terramycin and aureomycin. *Phytopath.* 42. 294. 1952.
- [11] *Nandi, P. N.*: The influence of antibiotics on microorganisms in soil. Ph. D. Thesis. Univ. of London. 1948.
- [12] *Siminoff, P. & Gottlieb, D.*: The production and role of antibiotics in the soil. I. The fate of streptomycin. *Phytopath.* 41. 420. 1951.
- [13] *Szabó, I. & Marton, M.*: A sugárgombák kölcsönös antagonizmusa. *Agrokémia és Talajtan.* 4. 237—250. 1955.
- [14] *Szegi, J.*: Vzáimootnosényija mezdsu Azotobacter chroococcum i pocsvennümi aktinomyce-támi. *Dokladü T. Sz. H. A.* 34. 120—125. 1958.
- [15] *Szegi, J.*: Vzáimootnosényija mezdsu azotobakterom i pocsvennümi aktinomicetámi. Avto-referát disszertácii na szoiszkányie ucsonoj sztyeperi kandidáta biologiceseszkih nauk. Moszkva. 1958.
- [16] *Waksman, S. A. & Woodruff, H. B.*: The occurrence of bacteriostatic and bactericidal substances in the soil. *Soil Sci.* 53. 232. 1942.
- [17] *Wright, J. M.*: The production of antibiotics in soil. Production of gliotoxin by *Trichoderma viride*. *Ann. Appl. Biol.* 41. 280. 1954.
- [18] *Wright, J. M.*: The production of antibiotics in soils. III. Production of gliotoxin in wheatstraw buried in soil. *Ann. Appl. Biol.* 44. 461—466. 1956.
- [19] *Wright, J. M.*: Production of gliotoxin in soils. *Nature.* 177. 896. 1956.

## ВЛИЯНИЕ ПОЧВЕННЫХ АКТИНОМИЦЕТОВ НА РАЗВИТИЕ АЗОТОВАКТЕР ХРООКОССУМ В ЕСТЕСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

И. Сеги

Лаборатория почвенной биологии А. Н. Венгрии, Шопрон

### Резюме

В первой половине нашей работы мы поставили перед собой задачу установить накапливают ли в почве актиномицеты, использованные в нашем опыте, антибиотики и в какой степени азотобактер чувствителен к ним. В течение опыта нами были использованы два штамма актиномицетов, которые были получены у научного сотрудника Института микробиологии Академии Наук СССР Т. К. Ильиной. Оба штамма наиболее близко стоят к виду *Actinomyces longisporus* Krassilnikov 1941 и антибиотик, образуемый ими получил название лонгиспорин. По методу агарового блочка, нами было установлено, что данные штаммы являются сильными антагонистами против азотобактера (фото № 1). *Azotobacter chroococcum* (штамм № 53) был получен из коллекции кафедры микробиологии Т С Х А.

Наша работа проводилась на кафедре микробиологии Московской Тимирязевской сельскохозяйственной академии под руководством члена корреспондента ВАСХНИЛ профессора М. В. Федорова. В колбы Эрленмейера по 100 мл емкостью было добавлено 25 г. дерново — подзолистой почвы с полевой опытной станции ТСХА. В одну серию колб были добавлены в количестве 2% -а от веса почвы глюкоза, крахмал и соломенная мука, а в другую серию колб источник углерода не добавлялся. Почва доводилась до 60% максимальной влагоемкости и половина колб стерилизовалась в автоклаве при 1,5 атмосферах в течение двух часов; затем как стерильные так и нестерильные варианты опыта были заражены спорами *Actinomyces longisporus* штамма № 11 и № 20. После двухнедельной инкубации в термостате при 30° С была определена антибиотическая активность почвы. Определение проводилось двумя способами. Сущность первого способа состоит в том, что на поверхности агаровой пластинки, ранее зараженной азотобактером, разложили комочки из испытываемой почвы (фото № 2). Из размера зоны торможения, образованной вокруг комочков, можно установить антибиотическую активность почвы. Определялось также содержание антибиотического вещества в водной вытяжке почвы по методу луночного теста. В качестве тесторганализма здесь также был использован *Azotobacter chroococcum* (Таблица № 1). Как видно из фотографии и таблицы, оба штамма *Actinomyces longisporus* в стерильной почве, обогащенной разными источниками углерода, образуют антибиотическое вещество, влияющее на *Azotobacter chroococcum* (штамм 53). Во второй половине нашей работы было изучено поведение *Azotobacter chroococcum* (штамм № 53) при совместной инокуляции актиномицетами в почвенных условиях.



В опыт были включены в частности *Actinomyces longisporus* штамм № 20, использованный и в предыдущем опыте, а так же другой вид по видовой принадлежности *Actinomyces floridae*, который был получен у научного сотрудника Почвенно — биологической лаборатории Академии Наук Венгрии в городе Шопрон, Иштвана Сабо. Этот штамм на синтетической среде, по методу агарового блочка стимулирует развитие азотобактера (фото № 3). Так же как в первой половине нашей работы, почва с опытной станции ТСХА ранее перемешанная с 2% мела, была помещена в колбы Эрленмейера по 100 мл. емкостью, в каждую колбу 25 г. почвы. Реакция почвы была рН 6,5. Метод постановки опыта такой же, как и предыдущего опыта с той разницей, что здесь было использовано только два источника углерода, 2% глюкоза и соломенная мука. Стерильные и нестерильные варианты опыта были заражены суспензией спор актиномицетов и клеток азотобактера. Число клеток азотобактера в почве определялось во время инокуляции и после того по периодам на 10, 20 и 30-ый день. Определение проводилось путем высева различных разведений почвенной болтушки на жидкую безазотную среду по модификации М. В. Федорова (таблица № 2).

Опыт показывает, что в почве, как содержащей источник углерода, так и без него, при совместной инокуляции *Actinomyces longisporus* штамм № 20 с азотобактером, количество клеток азотобактера во много меньше, чем в отдельной культуре. Особенно большая разница появляется у стерильных вариантов. У нестерильных вариантов так же наблюдается снижение клеток азотобактера по сравнению с контролем.

На основе того, что *Actinomyces floridae*, который практически не является антагонистом против азотобактера, в почве не подавляет его развитие, можно предполагать, что снижение клеток азотобактера при совместной инокуляции *Actinomyces longisporus* штамма № 20 так же не является результатом конкуренции, происходящей между этими микроорганизмами в питании, а результатом выделения антибиотика *Actinomyces longisporus* штамма № 20.

Хотя в нестерильной почве нашим методом мы не могли установить присутствие антибиотика, так как наш метод не является достаточно чувствительным для его определения, однако мы считаем что в нестерильных условиях *Actinomyces longisporus* штамм № 20 так же образует антибиотик, подавляющий азотобактер. Было установлено Н. А. Красильниковым и другими авторами, что активность антибиотиков во многих случаях является только в микробных очагах в пределах этих зон поступающие антибиотики могут инактивироваться.

Рис. 1. Подавляющее влияние *Actinomyces longisporus* штамма № 20 на развитие *Azotobacter chroococcum* штамма 53.

Рис. 2. Активность нативного антибиотика, образуемого *Actinomyces longisporus* штамма № 20 в стерильной почве.

Рис. 3. Стимулирующее влияние *Actinomyces floridae* на развитие *Azotobacter chroococcum* штамма 53.

Таблица 1. Активность нативного антибиотика образуемого *Actinomyces longisporus* штамма № 20 в стерильной почве по методу точечного теста.

Таблица 2. Выживаемость клеток *Azotobacter chroococcum* штамма № 53. в почве при совместной культивации с актиномицетами.

## Effect of Soil *Actinomycetes* on the Development of *Azotobacter chroococcum* under Natural Conditions

J. SZEGI

Research Laboratory for Soil Biology of the Hungarian Academy of Sciences, Sopron

### Summary

The aim of our work was to elucidate whether or not the *Actinomycetes* studied produced any antibiotics in the soil, and if so, to what an extent *Azotobacter* is sensitive to the antibiotics accumulated. The two strains of *Actinomycetes* investigated were kindly supplied by T. K. Pina, Microbiological Institute of the Academy of Sciences of the SSSR. These strains are closely related to the species *Actinomyces longisporus* Krassilnikov, and the antibiotic produced by them is called longisporin. When studied by means of the agar-block test, the strains mentioned above exhibited a strong antagonistic effect against the *Azotobacter* investigated (Fig. 1.). The

strain No. 53 of *Azotobacter chroococcum* was supplied by the Microbiological Department of the Moscow Timiriazev Agricultural Academy, and the experiments conducted with this strain were supervised by M. V. Fedorov.

Soil samples of 25 g taken from the grassy podzol soil of the experimental field of the Timiriazev Agricultural Academy were put into 100 ml Erlenmeyer flasks. One part of the flasks was supplied with 2% glucose, starch and straw flour as carbon source, to the other part of them no energy source was given. The soil was moistened to 60 percentage of its original water capacity, then a part of it was sterilized for two hours in an autoclave under 1,5 atmospheric pressure, the other part, however, was not sterilized. Thereafter the flasks were inoculated with the spore suspensions of the strains No 11 and 20 of *Actinomyces longisporus* and placed for a fortnight at 30°C. The antibiotic activity was determined by two methods. The first method consisted of putting small soil clods of the sample tested on the surface of solid medium inoculated with *Azotobacter* (Fig. 2.). From the inhibition zone formed around the soil clods we were able to get some information on the antibiotic activity. For the determination of the antibiotic activity of the soil the agar cup method was also used. Here again *Azotobacter chroococcum* strain 53 served as a test organism (Table 1.). As seen from the photo and table, both strains of *Actinomyces longisporus* produced an efficient antibiotic against *Azotobacter* on sterile podzol soil enriched with organic energy sources.

A further aim of the experiments was to investigate the behaviour of *Azotobacter chroococcum* strain 53 on both sterile and non-sterile soils inoculated with *Actinomyces*.

For the experiment *Actinomyces longisporus* strain 20, known from earlier works, and a strain belonging to the species *Actinomyces floridae*, kindly supplied by István Szabó were used. This species, when tested on synthetic medium with the agar-block method had a stimulatory effect on the development of *Azotobacter* (Fig. 3.).

The methods used were the same as mentioned previously, however, the pH of the soil suspension was adjusted to pH 6,5 and only two carbon sources, i. e. glucose and straw flour were used.

Cell numbers of *Azotobacter* were determined simultaneously with the inoculation of the soil with the fungus and on the subsequent 10<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days, respectively. Cell number determination was carried out on nitrogen free medium according to Fedorov so, that from the previously shaken water suspension of the soil to be studied a dilution series was prepared and 1—1 ml of each dilution was transferred to a N-free medium (Table 2.). The table shows that cell number of *Azotobacter*, if inoculated together with *Actinomyces longisporus* strain 20, decreases to a considerable degree, regardless of whether the soil had been supplied with complementary carbon source or not. This difference is particularly striking under sterile conditions, however, under non-sterile conditions this difference can also be observed as compared to the control. Since *Actinomyces floridae* which is practically not antagonistic does not influence the cell number of *Azotobacter* in the soil, however, it can be suggested that in the former case the antibiotic produced by *Actinomyces longisporus* strain 20 does inhibit the development of *Azotobacter*. Though it must be stressed, that in consequence of the low sensitivity of our method, in non-sterile soil no antibiotic can be detected. Although antibiotics originating from colonies formed by antagonistic *Actinomyces* can be inactivated in many cases, in the inside of the centers, however, as shown by Krassilnikov and other workers [7, 8] they remain in an active form and play an important role in the competition of individual species of microbes.

Fig. 1. Antagonistic effect of *Actinomyces longisporus* strain 20 on the development of *Azotobacter chroococcum* strain 53.

Fig. 2. Activity of the antibiotic produced by *Actinomyces longisporus* strain 20 in sterile soil.

Fig. 3. Stimulatory effect of *Actinomyces floridae* on the development of *Azotobacter chroococcum* strain 53.

Table 1. Activity of the antibiotic produced by *Actinomyces longisporus* strain 20 in sterile soil tested by the agar-cup method.

Table 2. Effect of *Actinomyces* on *Azotobacter* cells in the soil.