

## Az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs és a talajban élő sugárgombák kölcsönhatása laboratóriumi viszonyok között

SZEGI JÓZSEF

MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézet, Budapest

Mind a sugárgombák, mind az *Azotobacter chroococcum* igen jelentős mennyiségben megtalálhatók a különböző talajokban és nagyon fontos szerepük van a talajban lejátszódó biológiai folyamatoknál. A sugárgombák részt vesznek a talajok nehezen bomló szerves anyagainak mineralizálásában. Közöttük nagy százalékban találhatók antagonisták, amelyek antibiotikus anyagokat választanak ki. Az antibiotikumoknak, mint Krassilnikov [10] és más kutatók megállapították, fontos szerepük van az egyes mikrobacsoportoknak a létért folytatott küzdelmében is. Az *Azotobacter* különböző fajtái, mint közismert, jelentékeny mennyiségű nitrogént képesek megkötni az atmoszférából a talajt ezáltal N-ben jelentős mértékben gazdagítják. Bár mindkét mikrobacsoport az egyes talajokban a mikroba-populációnak igen magas százalékát alkotja, a közöttük fennálló kölcsönös viszony mind ez ideig kevésbé tanulmányozott. Bacsinszkaja és Petroszján [3] még 1937-ben megállapították, hogy az *Azotobacter*-nek néhány sugárgomba-törzssel történő együttes tenyésztése folyamán mindkét mikrobacsoportnál megváltoztak bizonyos fiziológiai és morfológiai sajátosságok. A szerzők adatai szerint az *Azotobacter* által megkötött N mennyisége az együttes tenyésztés hatása alatt kétszer-háromszor volt kevesebb, mint a kontrol esetében. Ivuskin [8] szerint az *Azotobacter* által megkötött nitrogén mennyisége egyes antagonista sugárgombákkal végzett együttes tenyésztés hatására 20–40%-kal csökkent a kontrolhoz viszonyítva. Ruschmann [14], Nickel és Burkholder [11] Babak [2] és Szegi [15] ugyancsak megfigyelték, hogy egyes sugárgomba-törzsek erős antagonistái az *Azotobacter*-nek. Ezzel ellentétben más kutatók: Krassilnikov és Korenjako [9] Akshaibar és Achari [1] olyan sugárgomba-törzseket figyeltek meg, amelyek serkentik az *Azotobacter* elszaporodását és fokozzák az általa megkötött nitrogén mennyiségét. Korábbi vizsgálataim alkalmával sikerült megfigyelnem, hogy az „*Actinomyces floridæ* (*Act. floridæ* W. et al var *purpureus* Burk. et al.) 1951” fajhoz tartozó sugárgombával oltott a garbolköröng körül az *Azotobacter* jóllehet erőteljesebben szaporodott [16], viszont a N-kötés aktivitása kimutathatóan nem emelkedett.

### Kísérleti rész

Munkám első részében azt vizsgáltam, hogy a sugárgombákkal végzett együttes tenyésztés hogyan befolyásolja az *Azotobacter* által megkötött nitrogén mennyiséget. Kísérleteimhez 65 sugárgomba-törzset használtam fel. Ezek közül 64 törzset T. K. Iljina-tól, a Szovjetunió Tudományos Akadémiája tudományos munkatársától kaptam. Ezeket a törzseket a Moszkvai Timirjazev Mezőgazdasági Akadémia Kísérleti Telepének



gyepes podzol talajából izolálták. Egy törzset a Magyar Tudományos Akadémia soproni Talajbiológiai Laboratóriumának tudományos munkatársa, Szabó István bocsátott rendelkezésemre. A Szovjetunióban igen elterjedt *Azotobacter chroococcum* 53-as törzset a Moszkvai Timirjazev Mezőgazdasági Akadémia gyűjteményéből M. V. Fjodorov akadémikus adta át.

Az *Azotobacter* és a sugárgombák együttes tenyésztésére a Fjodorov által módosított nitrogénmentes táptalajt használtam fel [5]. A fenti táptalajból bemértem 30—30 ml-t 150 ml-es Erlenmeyer-lombikokba. Mivel a szénforrás glukóz volt, a táptalajt a karamellizálódás elkerülése végett fél atmoszféra nyomáson sterilizáltam 35 percen át. Sterilizáció után a lombikokat beoltottam az *Azotobacter* egynapos tenyésztének sejtuszuspenziójával, valamint a 65 sugárgomba-törzs egyhetes kultúráinak spóraszuspenzióival. Kontrolként szolgáltak a csak *Azotobacter*-rel beoltott lombikok. Az *Azotobacter*-rel be nem oltott steril táptalajt tartalmazó lombikokat a vegyszerekben levő nitrogén-szennyeződés, valamint az inkubáció folyamán a levegőből elnyelt nitrogén-tartalmú gázok meghatározására használtam fel.

A kísérlet kezdetén Thoma-kamrában közvetlenül mikroszkóp alatti sejtszámlálással meghatároztam a lombikokba bevitt *Azotobacter*-sejtek számát.

A lombikokat 32 C°-os termosztátban inkubáltam. Megfigyeltem, hogy az *Azotobacter* a táptalajban igen gyorsan elszaporodik és a táptalaj felületén a sejtek hártály képeznek. Az *Azotobacter*-rel egyidejűleg bevitt sugárgombák azonban kéthetes inkubáció után is csak igen lassan vagy egyáltalában nem is fejlődtek. Ennek magyarázatát abban látom, hogy kezdetben a sugárgombák azért nem tudtak fejlődni, mivel a táptalaj nem tartalmazott fejlődésükhöz szükséges kötött nitrogént. A későbbiek folyamán az igen gyorsan szaporodó *Azotobacter* választotta ki ugyan a táptalajba nitrogéntartalmú vegyületeket, azonban ugyanakkor elhasználta a táptalajból az energiaforrást és így a lassabban fejlődő sugárgombák számára már nem maradt szénforrás. A glukóz felhasználását a táptalajból Bertrand-módszerrel határoztam meg. Abból a célból, hogy a sugárgombák számára megfelelő életfeltételeket biztosítsak, steril pipetták segítségével a táptalajba ismételtén vittem be steril glukóz oldatot. A bevitt glukóz mennyisége a lombikokban levő táptalajnak két százaléka volt.

A glukóz másodszori bevitele után a táptalaj felszínén az *Azotobacter* sejtekből képződött hártályan megjelentek a sugárgombák telepei, először apró pontok formájában, majd az *Azotobacter* sejtjeinek hártályját felváltotta a sugárgombák micéliumainak hártályja. A színes pigmentanyagokat termelő törzsek megfestették az egész táptalajt. Mikroszkóp alatt megfigyeltem az *Azotobacter*-sejtek lizálódását a sugárgombák micéliumainak hatására. Miután Fehling-oldat segítségével megállapítottam, hogy a kultúrák a másodízben bevitt glukózt is felhasználták, a lombikok vattadugóit alkoholos lélegéttel sterilizált gumidugókkal cseréltem fel, majd a lombikokat egy órán át rázógéppben rázattam. Utána az egyes lombikokból 0,5 ml-t kémcsőbe vittem át, majd 9,5 ml vizet pipettáztam hozzá. Ilyen formán a kultúrából kivett 0,5 ml szuszpenziót 20-szorosára hígítottam fel, majd 5 percig rázattam. Ezután mikroszkóp alatt Thoma-kamrában meghatároztam az *Azotobacter*-sejtek számát. Az *Azotobacter* sejtjeinek száma sugárgombákkal végzett együttes tenyésztésnél 5—6-szor kevesebb volt, mint azokban a lombikokban, melyekbe csak *Azotobacter*-t vittem be.

Az *Azotobacter* által megkötött nitrogén mennyiségét Kjeldahl módszer segítségével határoztam meg. A kísérlet eredményeit az 1. táblázat mutatja. Amint a táblázatból kitűnik, míg az *Azotobacter* tiszta tenyésztésben 13, 42 mg nitrogént köt meg, addig sugárgombákkal együttes tenyésztésben az esetek többségében csak 8—10 mg-ot 1 g felhasznált glukózra számítva.



1. táblázat

Az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs együttes tenyésztése néhány talajban élő sugárgomba-törzsszel

(1) Kultúrák száma	(2) Azotobacterrel együtt tenyésztett sugárgomba- törzsek megnevezése	(3) Megkötött nitrogén mg-okban			(4) Sejtek száma 1 ml táptalajban milliókban, a kísérlet	
		30 ml táptalajban	Középérték	1 g felhasznált glukózára számítva	elején	végén
1	<i>Azotobacter chroococcum</i> tiszta tenyészetben	12,13 11,75	11,94	13,42	2,6	1260
2	1x törzs	7,87 6,36	7,11	7,93	2,6	288
3	3 <sub>11</sub> -es törzs	10,11 8,99	9,55	10,71	2,6	332
4	9 izb. A. törzs	7,41 7,41	7,41	8,31	2,6	254
5	2 izb. A. törzs	8,86 10,86	9,86	11,06	2,6	334
6	4 <sub>10</sub> -es törzs	10,83 10,96	10,89	12,78	2,6	208
7	23-as törzs	9,65 11,60	10,62	11,91	2,6	360
8	9 izb. A. törzs	8,06 7,28	7,67	8,63	2,6	253
9	10 <sub>1</sub> -es törzs	10,11 9,12	9,61	10,84	2,6	240
10	43 izb. A. törzs	8,33 9,65	8,99	10,30	2,6	208
11	Liz <sub>1</sub> törzs	8,33 8,33	8,33	9,31	2,6	284
12	Liz <sub>2</sub> törzs	8,06 6,80	7,43	8,32	2,6	227
13	44-es törzs	8,06 7,81	7,93	8,99	2,6	238
14	65-ös törzs	8,20 8,47	8,33	9,31	2,6	289
15	<i>Act. coelicolor</i>	9,94 10,11	10,02	11,18	2,6	372



1. táblázat (folytatása)

(1) Kultúrák száma	(2) Azotobacterrel együtt tenyésztett sugárgomba- törzsek megnevezése	(3) Megkötött nitrogén mg-okban			(4) Sejtek száma 1 ml táptalajban milliókban, a kísérlet	
		30 ml táptalajban	Középérték	1 g felhasznált glukózra számítva	elején	végén
16	10 <sub>3</sub> -as törzs	8,20 8,20	8,20	9,19	2,6	208
17	84 izb. A. törzs	8,20 8,89	8,54	9,63	2,6	380
18	11 <sub>2</sub> -es törzs	7,41 8,86	8,13	9,11	2,6	211
19	38-as törzs	10,11 8,51	9,31	10,41	2,6	338
20	2 <sub>10</sub> -es törzs	7,15 7,41	7,28	8,26	2,6	202
21	41-es törzs	8,50 8,81	8,65	9,70	2,6	238
22	7 <sub>11</sub> -es törzs	7,94 8,33	8,13	9,12	2,6	260
23	7 <sub>9</sub> -es törzs	7,94 8,20	8,07	9,05	2,6	314
24	10-es törzs	10,83 9,90	10,36	11,62	2,6	314
25	53-as törzs	10,56 9,91	10,23	11,50	2,6	301
26	22-es törzs	9,65 10,18	9,91	11,11	2,6	332
27	50-es törzs	8,50 9,60	9,05	10,15	2,6	260
28	12 izb. A. törzs	8,98 8,98	8,98	10,06	2,6	358
29	9-es törzs	10,84 10,53	10,68	11,97	2,6	320
30	78-as törzs	9,27 8,51	8,89	9,88	2,6	224
31	93-as törzs	8,66 8,66	8,66	9,71	2,6	280



1. táblázat (folytatása)

(1) Kultúrák száma	(2) Azotobacterrel együtt tenyésztett sugárgomba- törzsek megnevezése	(3) Megkötött nitrogén mg-okban			(4) Sejtek száma 1 ml táptalajban milliókban, a kísérlet	
		30 ml táptalajban	Középérték	1 g felhasznált glukózára számítva		
					elején	végén
32	52-es törzs	8,35 8,51	8,43	9,47	2,6	204
33	31-es törzs	9,44 7,26	8,35	9,35	2,6	248
34	63-as törzs	8,35 6,80	7,57	8,46	2,6	242
35	4-es törzs	8,35 8,35	8,35	9,36	2,6	209
36	66-os törzs	10,25 10,84	10,54	11,82	2,6	322
37	43 izb. A. törzs	7,26 7,87	7,55	8,48	2,6	347
38	15-ös törzs	12,26 12,26	12,26	13,75	2,6	490
39	43-as törzs	7,26 7,72	7,49	8,40	2,6	239
40	10 izb. A. törzs	8,19 8,35	8,27	9,28	2,6	296
41	42 izb. A. törzs	6,85 6,85	6,85	7,81	2,6	280
42	93-as törzs	8,66 9,05	8,85	9,92	2,6	240
43	Act. floridae	10,51 9,47	9,99	11,02	2,6	450
44	92-es törzs	9,05 8,08	8,56	9,57	2,6	208
45	81 izb. A. törzs	8,81 7,81	8,31	9,32	2,6	211
46	91x törzs	7,62 7,62	7,62	8,54	2,6	253
47	3 <sub>12</sub> -es törzs	8,50 8,04	8,27	9,27	2,6	353
48	10 <sub>4</sub> -es törzs	6,63 7,41	7,02	7,87	2,6	280
49	49-es törzs	11,15 12,10	11,62	13,03	2,6	695



1. táblázat (folytatása)

(1) Kultúrák száma	(2) Azotobacterrel együtt tenyésztett sugárgomba- törzsek megnevezése	(3) Megkötött nitrogén mg-okban			(4) Sejtek száma 1 ml táptalajban milliókban, a kísérlet	
		30 ml táptalajban	Középérték	1 g felhasznált glukózra számítva	elején	végén
50	18-as törzs	10,84 10,53	10,68	11,97	2,6	428
51	11 <sub>1</sub> -es törzs	10,84 10,84	10,84	12,14	2,6	684
52	75-ös törzs	9,44 9,27	9,35	10,43	2,6	281
53	33-as törzs	7,44 8,50	7,97	8,99	2,6	264
54	11 <sub>4</sub> -es törzs	7,10 7,10	7,10	7,96	2,6	190
55	31-es törzs	7,26 7,42	7,34	8,30	2,6	254
56	47-es törzs	8,51 8,51	8,51	9,65	2,6	211
57	11 <sub>3</sub> -as törzs	9,59 9,44	9,51	10,66	2,6	372
58	21-es törzs	9,59 9,90	9,74	10,92	2,6	260
59	20-as törzs	7,87 7,41	7,64	8,56	2,6	172
60	11-es törzs	6,95 7,24	7,09	7,95	2,6	220
61	8 <sub>2</sub> izb. A. törzs	7,87 6,79	7,33	8,11	2,6	384
62	51x törzs	11,46 11,15	11,30	12,67	2,6	912
63	62-es törzs	11,30 9,59	10,44	11,71	2,6	368
64	26-os törzs	8,66 9,93	9,29	10,30	2,6	281
65	77-es törzs	8,27 8,33	8,30	9,92	2,6	345
66	9 <sub>2</sub> izb. A. törzs	7,10 9,56	8,33	9,42	2,6	275



Munkám második részében azt tanulmányoztam, hogy az *Azotobacter* által a táptalajba kiválasztott nitrogéntartalmú vegyületeket hogyan tudják hasznosítani a sugárgombák. Már sok szerző, így Novogradskij [12], Horner és munkatársai [7], Blinkov [4], Rabotnova és Radionova [13], valamint Fjodorov [6] megfigyelték, hogy az *Azotobacter* az atmoszférából megkötött nitrogén egy részét kiválasztja a táptalajba s az így kiválasztott nitrogén kisebb vagy nagyobb mértékben felvehetővé válik más mikroba csoportok, illetőleg a magasabbrendű növények számára.

A kísérletbe a korábban említett 65 sugárgomba-törzs közül 5 törzset, valamint az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzset vontam be.

250 ml-es Erlenmeyer-lombikba bémértem 100—100 ml-t a Fjodorov által módosított nitrogénmentes táptalajból. Sterilizálás után a lombikokat beoltottam az *Azotobacter* sejtszuszpenziójával, majd 32 °C-os termosztátban inkubáltam. A kísérlet beállítása utáni hatodik naptól kezdve Bertrand-módszerrel mindennap ellenőriztem a táptalaj glukóz tartalmát. A beállítás utáni tizedik napon megállapítottam, hogy az *Azotobacter* néhány lombik kivételével teljesen felhasználta a glukózt a táptalajból. Ebben az időben az *Azotobacter* szaporodása és nitrogénkötése már befejeződött, mivel a táptalaj már nem tartalmazott energiaforrást, azonban a sejtek autolizise mikroszkóp alatt még nem volt megfigyelhető. Tehát a táptalajban található nitrogén nem a sejtek lebomlása következtében képződött nitrogéntartalmú bomlástermék, hanem elsősorban az élő *Azotobacter*-sejtek által a táptalajba kiválasztott nitrogéntartalmú vegyületek.

Az *Azotobacter*-sejteket centrifugálással elválasztottam a táptalajtól. A sejtek elválasztása 1 órán át 3000/sec. fordulatszám mellett történt. A sejtektől ilyenformán elválasztott kultúrfolyadékba ismételen 2 % glukózt, valamint 0,5% CaCO<sub>3</sub>-ot vittem be. A szerves savak közömbösítésére szolgáló CaCO<sub>3</sub> bevitelére azért vált szükségessé, mivel az eredetileg bevitt CaCO<sub>3</sub> centrifugálás közben az *Azotobacter*-sejtekkel együtt különválasztódott a táptalajból. Az így előkészített kultúrfolyadékot bémértem 250 ml-es Erlenmeyer-lombikokba. Minden lombik 100 ml táptalajt tartalmazott. A lombikokat 35 percen át 0,5 atmoszféra nyomás mellett sterilizáltam, majd beoltottam azokat az 5 sugárgomba-törzs egyhetes tenyészetének spóraszuszpenziójával. A kultúrákat 32 °C-os termosztátban 30 napon át inkubáltam. A termosztátban csak nitrogénmentes táptalajon fejlődő *Azotobacter* kultúrák voltak, nehogy a felszabaduló nitrogéntartalmú gázokat a táptalaj elnyelje s ezáltal hamis kísérleti adatokat kapjak.

Az inkubáció befejezése után a táptalaj felszínén fejlődött sugárgombamicéliumot ismert hamutartalmú standard szűrőpapír segítségével elkülönítettem a táptalajtól.

A micéliumtól elválasztott kultúrfolyadékot 100 ml-es mérőlombikokba ok vittem át s az inkubáció ideje alatt elpárolgott vizet desztillált vízzel pótoltam. A táptalajban Bertrand mikromódszerével meghatároztam a sugárgombák által fel nem használt glukóz mennyiségét. Kontrollként szolgáltak a sugárgomba spórákkal be nem oltott kultúrfolyadékokat tartalmazó lombikok.

Kjeldahl módszerével meghatároztam a sugárgombák által felvett, valamint a kultúrfolyadékban visszamaradt nitrogén mennyiségét. Ugyanezzel a módszerrel meghatároztam a táptalaj vegyületeinek nitrogén szennyeződését. Erre a célra *Azotobacter*-rel be nem oltott nitrogénmentes steril táptalaj szolgált, melyet a kísérlet beállításakor helyeztünk a termosztátba. A kísérlet eredményeit a 2. táblázat mutatja.

A táblázatból kitűnik, hogy az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs, amely 1 g glukózra vonatkoztatva 13 mg nitrogént köt meg a levegőből, a táptalajba csak 1,77 mg nitrogént választ ki. Ez a nitrogén mennyiség 14%-át teszi ki az *Azotobacter* által



## 2. táblázat

Az *Azotobacter* által a táptalajba kiválasztott nitrogén hatása néhány talajban élő sugárgomba fejlődésére

(1) Törzsek megnevezése	(2) A glukóz mennyisége g-okban			(3) A nitrogén mennyisége mg-okban						(4) sugárgombák által felhasznált nitrogén %-ban
	a táptalajban	a sugárgombák által felhasználva	a kultúr folyadékban	a micéliumban	összesen	1 g felhasznált glukózra átszámítva				
Kultúr folyadék sugárgombákkal való beoltás nélkül, kontrollként felhasználva	1,76 1,76	—	3,00 3,29	3,15	—	—	—	—	1,79	—
41 izb. A. sugárgombatörzs	1,60 1,48	1,54	0,22	2,39 2,20	2,29	0,94 0,88	0,91	3,20	1,82	35
20-as sugárgombatörzs	1,57 1,53	1,55	0,21	2,43 2,17	2,30	0,79 0,82	0,81	3,11	1,76	38
B 1. sugárgombatörzs	1,43 1,55	1,49	0,27	2,43 2,22	2,32	0,69 0,88	0,78	3,11	1,76	38
<i>Actinomyces floridae</i>	1,60 1,57	1,59	0,18	1,88 2,20	2,04	0,71 0,94	0,82	2,87	1,63	35
1 <sub>3</sub> -as sugárgombatörzs	1,60 1,53	1,57	0,20	2,27 2,20	2,24	1,04 1,04	1,04	3,28	1,86	31

megkötött nitrogénnek. A táblázat adataiból megállapítható továbbá, hogy a kísérletbe vont sugárgombák a viszonylag hosszú, egy hónapos inkubáció ellenére is csak 30—40 %-át képesek felhasználni az *Azotobacter* által a táptalajba kiválasztott nitrogénnek.

## Eredmények megbeszélése

Amint a kísérlet adataiból látható, az *Azotobacter*-sejtek száma igen erősen csökken sugárgombákkal végzett együttes tenyésztésben, a tiszta *Azotobacter* tenyészet sejtszámához viszonyítva. Ennek oka véleményem szerint elsősorban abban keresendő, hogy a kísérletbe vont sugárgombák enzimrendszerük segítségével lizálják az *Azotobacter*-sejteket. A kísérlet beállítása után az *Azotobacter* vastag sejthártyát képezett a táptalaj felszínén. Miután másodízben vittem glukózt a táptalajba, az *Azotobacter* sejthártyáján megjelentek a sugárgombák telepei. Először csak különálló, apró, pontszerű, felületi telepeket képeztek, majd néhány nap múlva összefüggő micéliumhártyával borították be a táptalaj felszínét, lizálva a korábban ott lévő *Azotobacter* sejthártyát.



Kitűnik továbbá a kísérlet adataiból, hogy az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs sugárgomba törzsekkel közös tenyészetben az esetek többségében kevesebb nitrogént köt meg a levegőből, mint tiszta kultúrában. Míg a kontrollnál a megkötött nitrogén mennyisége 13,42 mg volt 1 g glukózra átszámítva, addig sugárgombákkal közös tenyészetben majdnem minden esetben csak 8—10 mg nitrogén megkötését lehetett megállapítani. Véleményem szerint a nitrogénkötés csökkenése elsősorban nem abban keresendő, hogy a sugárgombák által képzett anyagcseretermékek és antibiotikus anyagok elnyomják az *Azotobacter* fejlődését. Ennek ellentmondanak az agar-blokk-teszt módszerrel végzett vizsgálatok eredményei is. Ezzel a módszerrel vizsgálva csak két sugárgomba-törzs mutatkozott antagonistának az *Azotobacter*-rel szemben. A többi 63 közömbös volt, sőt egy törzs serkentette az *Azotobacter* elszaporodását. Ebben az esetben elsősorban a táplálékért folyó versengés eredményezte a egyes kultúrákban észlelhető nitrogénkötés aktivitásának csökkenését. A glukózt ugyanis nemcsak az *Azotobacter* használta fel, hanem a sugárgombák is, melyek nem képesek nitrogént megkötni az atmoszférából. Ennek eredményeképpen a táptalajból felhasznált 1 g glukózra kevesebb megkötött nitrogén esik.

A kísérletbe vont *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs által megkötött nitrogénnek csak mintegy 14%-a választódik ki a táptalajba az élő sejtekből. A sugárgombák a táptalajba kiválasztott nitrogénnek 30—40%-át képesek felvenni. A többi nitrogén az egyhónapos inkubáció ellenére sem használódott fel, jóllehet közismert, hogy a sugárgombák a legellenállóbb szerves vegyületeket is képesek lebontani. A két mikroba-csoport közös tenyészeténél a táptalaj felszínén keletkező sugárgomba-micélium hártya elsősorban szintén nem az *Azotobacter* által a táptalajba kiválasztott nitrogéntartalmú vegyületek értékesítésének révén képződött, hanem az *Azotobacter* sejtek lizálása folyamán szabaddá vált nitrogén-tartalmú vegyületeket vették fel. Ennek alapján fel lehet tételezni, hogy a magasabbrendű növények táplálkozásakor nem az élő sejtek által a talajban kiválasztott nitrogén-vegyületeknek van elsőrendű szerepük, hanem a sejtek elbomlásának eredményeképpen felszabaduló nitrogén vegyületeknek.

Végezetül hálámat fejezem ki M. V. Fjodorov professzornak, a Szovjetunió Mezőgazdasági Tudományos Akadémiája levelező tagjának, akinek irányítása mellett a Moszkvai Timirjavez Mezőgazdasági Akadémia Mikrobiológiai Tanszékén a fenti kísérleteket végeztem.

### Összefoglalás

65 különböző sugárgomba-törzs és *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs együttes tenyészeténél az *Azotobacter* sejtheinek száma és az atmoszférából megkötött nitrogén mennyisége 1 g glukózra átszámítva számottevően csökken a kontrollhoz viszonyítva.

Az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs az általa megkötött nitrogénnek mintegy 14 %-át választja ki a táptalajba. A kísérletbe vont sugárgombák a táptalajba kiválasztott nitrogénnek csak 30—40%-át képesek felvenni.

Érkezett: 1959. január 20.

### Irodalom

- [1] Akshaibar (Lal), & Achari, T. K. T.: Microbiological studies VII. Studies on *Azotobacter* and *Actinomyces* in relation to nitrogen fixation and cellulose utilisation. Proc. Natl. Acad. Sci. India. 23. 137—149. 1952.
- [2] Babak, H. M.: Csúsztvityelnoszty azotobaktera k antagoniszticeszkomu gyejszviyu aktinomictov k nyekotorum antibiotikám. Mikrobiologija. 27. 436—440. 1958.



- [3] *Bacsinszkaja, A. A. & Petroszjan, A. P.*: O vzaimootnosenyii mezsdu *Azotobacter chroocoeum* i aktinomictami. Mikrobiologija. 6. 868—875. 1937.
- [4] *Blinkov, G. N.*: O vügyelenyii ammiaka azotobakterom. Mikrobiologija. 16. 113. 1947.
- [5] *Fjodorov, M. V.*: Rukovodstvo k prakticeszkim zanjatijam po mikrobiologij. Szeljhozgiz. Moskva. 1951.
- [6] *Fjodorov, M. V.*: Cszaszticsnoe ovtlecsenyije produktov fixacii azota iz kletok azotobaktera v pitatyelnuju szredu. Mikrobiologija. 21. 395—402. 1952.
- [7] *Horner, G. & Kenneth Dæen Burk*: The natural amount of extra cellular nitrogen in *Azotobacter* cultures. Trans. Third. Comm. Internat. Soc. Soil Sci. A. 168, 1939.
- [8] *Ivuskin, I. F.*: Vzaimodija mizs aktinomictami ta azotobakterom vügyeljennümi z rizosferü ljuocernü. Mikrobiologicsnütj zsurnal. 18. 14—18. 1956.
- [9] *Krassilnikov, N. A. & Korenjako, A. I.*: Baktericidnoe vcsesesztvo aktinomictov. Mikrobiologija. 8. 673—683. 1939.
- [10] *Krassilnikov, N. A.*: Vnutri i mzsduvidovüje vzaimootnosenyija u mikroorganizmov. Uszpehi szovremennoj biologii. 31. 346. 1951.
- [11] *Nickel, L. & Burkholder, P.*: Inhibition of *Azotobacter* by soils Actinomyces. J. Amer. Soc. Agron. 39. 771—779. 1947.
- [12] *Novogrudszkij, D. M.*: Ob azotnüh produktah v kul turah azotobaktera i ego vzaimootnosenyijah sz drugimi mikrobami. Mikrobiologija. 2. 237. 1933.
- [13] *Rabotnova, I. L. & Radionova, G. Sz.*: Obogacsenyije szubsztrata azotisztümi vcsesesztvami pri razvityii *Azotobacter chroocoeum*. Mikrobiologija. 22. 415—422. 1953.
- [14] *Ruschmann G.*: Über Antibiosen und Symbiosen von Bodenorganismen ihre Bedeutung für die Bodenfruchtbarkeit. II. *Azotobacter* Symbiosen und Antibiosen. Pfl. Ernähr. Düng. 58. 163—175. 1952.
- [15] *Szegi J.*: Vzaimootnosenyija mezsdu *Azotobacter chroocoeum* i pocsvennümi aktinomictami. Dokladü T. Sz. H. A. 34. 120—125. 1958.
- [16] *Szegi J.*: Vzaimootnosenyija mezsdu azotobakterom i pocsvennümi aktinomictami. Disszertacija na szoizskányie ucsonoj sztyepenyi kandidata biologicseszkih nauk. Moskva. T. Sz. H. A. 1958.

## ВЗАИМОТНОШЕНИЯ МЕЖДУ АЗОТОБАКТЕРОМ И ПОЧВЕННЫМИ АКТИНОМИЦЕТАМИ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

И. Сегй

Научно Исследовательский Институт Почвоведения и Агрохимии АН Венгрии, Будапешт

### Резюме

В первой половине нашей работы было изучено, как влияет на фиксацию молекулярного азота азотобактером, совместное выращивание *Azotobacter chroocoeum* штамма 53 с лучистыми грибами.

Азотобактер и 65 штаммов лучистых грибов культивировались на безазотной среде по модификации М. В. Федорова. Когда глюкоза была использована из субстрата, при помощи стерильных пипеток она снова добавлялась в среду в форме стерильного раствора. Содержание глюкозы в питательном субстрате составляло 2%. Это делалось потому, что лучистые грибки на питательной среде, не содержащей связанного азота, не могут развиваться. Хотя в дальнейшем азотобактер, развивающийся очень быстро, фиксировал значительное количество азота, но в то же время использовал глюкозу из среды, поэтому было необходимо добавить в питательный субстрат дополнительное количество глюкозы.

Под влиянием глюкозы лучистые грибки быстро начали развиваться и образовали толстую пленку мицелия на поверхности питательной среды. Когда глюкоза использовалась второй раз в среде определили число клеток азотобактера, по методу прямого подсчета под микроскопом в камере Тома. Количество связанного азота из атмосферы было определено по методу Кьельдаля.



Было установлено, что при совместной культивации азотобактера с почвенными актиномицетами количество клеток азотобактера в 5—6 раз меньше чем в колбах, содержащих только один азотобактер. Это объясняется тем, что лучистые грибки лизируют клетки азотобактера. На пленке клеток азотобактера, располагающейся на поверхности питательного субстрата, появляются колонии лучистых грибов и они в течение короткого времени образуют толстую пленку на месте азотобактера.

Количество фиксированного азота в колбах, содержащих оба микроорганизма, было значительно меньше чем в контроле. В другом опыте было установлено, что среди 65 штаммов лучистых грибов 63 штамма не являются антагонистами азотобактера, даже один вид по методу агарового блочка стимулирует его развитие. Это наблюдение исключает возможность того, что снижение количества фиксированного азота азотобактером происходит в результате бактерицидного действия выделенных антибиотических веществ лучистыми грибами. Мы считаем, что снижение количества фиксированного азота в первую очередь можно объяснить тем, что из питательного субстрата не только азотобактер использует глюкозу но также и актиномицеты. Среди этих микроорганизмов фиксировать атмосферный азот в значительных количествах может только азотобактер и поэтому снижается фиксированный азот на долю 1 г. глюкозы.

Во второй половине нашей работы был изучен эффект использования азота, выделенного азотобактером в питательную среду, некоторыми лучистыми грибами.

В 10-дневной культуре азотобактера при помощи центрифугирования клетки были отделены от питательного субстрата. В культуральную жидкость снова была добавлена глюкоза и мел, и после этого, жидкость стерилизовалась в автоклаве, при 0,5 атмосферы, в течение 35 минут. После стерилизации колбы были заржены суспензией недельного возраста пяти разных штаммов актиномицетов, потом колбы были поставлены в термостат на месяц. По истечении срока определялось количество глюкозы неиспользованной из субстрата, а также содержание азота в жидкости и мицелии лучистых грибов. Определение глюкозы проводилось по методу Бертрана, а определение азота по микрометоду Кельдаля.

Было установлено, что *Azotobacter chroococcum* штамм № 53 выделяет в среду около 14% фиксированного азота на 1 г потребленной глюкозы. Несмотря на продолжительную инкубацию, изучаемые лучистые грибки могут усваивать только 30—40% азота выделенного азотобактером в субстрат, хотя известно, что они имеют очень высокую ферментативную активность и могут разлагать наиболее стойкие органические вещества. Повидимому, толстая пленка мицелия лучистых грибов в предыдущем опыте образовалась за счет усвоения азота, освобожденного в результате разложения белковых веществ клеток азотобактера.

На основании этого наблюдения мы считаем, что при азотистом питании высших растений в первую очередь имеет значение использование азота отмерших клеток азотобактера. Использование выделенного азота в питательный субстрат живыми клетками, повидимому, играет только второстепенную роль.

*Таблица 1:* Совместное выращивание *Azotobacter chroococcum* с некоторыми штаммами почвенных актиномицетов. (1) Номер культур. (2) Название актиномицетов, культивировавших при совместной культуре с азотобактером. (3) Количество фиксированного азота в мг. 30 мл питательного субстрата, среднее количество пересчитано на 1 г использованной глюкозы. (4) Количество клеток в 1 мл питательного субстрата в начале и в конце опыта.

*Таблица 2:* Влияние азота, выделенного азотобактером в питательный субстрат, на развитие некоторых почвенных актиномицетов. (1) Название штаммов. (2) Количество глюкозы в г. в питательной среде и использованное актиномицетами. (3) Количество азота в мг в культуральной жидкости, в мицеллии, вообще, перечислено на 1 г использованной глюкозы. (4) Количество использованного азота лучистыми грибами.



## Interactions between *Azotobacter Chroococcum* Strain 53 and Soil-Inhabiting *Actinomyces* in Mixed Cultures

J. SZEGI

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

### Summary

In the first phase of our studies the influence of *Actinomyces* in mixed cultures on the amount of atmospheric nitrogen fixed by *Azotobacter chroococcum* strain 53, was determined.

The mixed cultures of *Azotobacter* and 65 employed strains of *Actinomyces* were grown on the nitrogen deficient solution of Fedorov. Glucose content of the nutrient has been occasionally readjusted to the 2 per cent level by adding concentrated sterile glucose solutions to the culture vessels. At the beginning of cultivation the *Actinomyces* did not grow at all because of the lack of fixed nitrogen in the nutrient. Although the rapidly proliferating *Azotobacter* strain gave rise to an increasing N-concentration in the nutrient, the original amount of glucose was exhausted before the nitrogen as energy source reached a sufficient level. That is why the addition of glucose to such cultures resulted in the rapid development of *Actinomyces* leading to pellicle formation on the surface of the solution. After the second dose of glucose has also been consumed, cell numbers of *Azotobacter* were counted in Thoma-chamber under the microscope and N-content of the nutrients were determined by the Kjeldahl procedure.

Cell number of *Azotobacter* has been found to be five to six times lower than that in the control vessels. This has been explained by the lysis of *Azotobacter* cells in the mixed cultures by *Actinomyces*. It has been observed, namely, that the surface membrane of *Azotobacter* cells was rapidly overgrown by the mycelium of *Actinomyces* after the supplementation of the nutrient with glucose.

The fixed N content of the vessels containing the mixed cultures was found to be substantially lower than that of the pure cultures of *Azotobacter*. It has been shown in a former publication, that 63 of the 65 strains of *Actinomyces* employed in these studies are by no means antagonists of *Azotobacter* and one of them even stimulates the proliferation of the latter as demonstrated by the agar-block method. This finding excludes the possibility of the production of bactericidal substances by *Actinomyces* resulting in a reduced N-fixation by *Azotobacter*. It is suggested, that the reduced N-fixation of mixed cultures might be explained by the competitive glucose-consumption by *Actinomyces*. Since only *Azotobacter* is able to fix atmospheric nitrogen, at least to a considerable degree, the amount of fixed N per g of glucose consumed is reduced in mixed cultures.

In the second phase of the investigations the utilization by individual strains of *Actinomyces* of the nitrogen fixed by *Azotobacter* has been studied.

*Azotobacter* cells were separated by centrifugation at 3000 rpm from the solution in which they were cultured for 10 days. Glucose and calcium were added to the supernatant and sterilized in autoclave at 0,5 atm. for 35 minutes. The sterilized solutions were inoculated with spore suspensions from one week old cultures of five different strains of *Actinomyces*, and incubated in thermostats at 30° C for a month. By the end of the incubation period the residual glucose and nitrogen content of the media and the amount of N in the mycelia have been determined. Glucose was determined by the method of Bertrand, nitrogen has been estimated by the micro-Kjeldahl procedure.

Only 14 per cent of the nitrogen fixed by *Azotobacter chroococcum* strain 53 has been found in the culture media. The *Actinomyces* employed in these studies were able to utilize only 30—40 per cent of this nitrogen during the month of their culture, in spite of their wellknown high enzymic activity and ability to degrade even the most stable organic substances. It is possible, that the thick mycelium-pellets of *Actinomyces* observed in the mixed cultures are due to the utilization of nitrogen liberated from lysed *Azotobacter* cells. It is suggested, therefore, that similarly, in the nutrition of higher plants, the released N-content of the perished *Azotobacter* cells plays a greater role, than the fixed-N excreted by living cells.

### Captions

Table 1. Mixed cultivation of *Azotobacter chroococcum* strain 53 and some strains of soil-inhabiting *Actinomyces*. (1) Serial number of the cultures. (2) The strain of *Actinomyces* employed. (3) The amount of fixed nitrogen per 30 ml of the nutrient, and per 1 g of glucose utilized (mg). (4) Percentage amount of nitrogen utilized by *Actinomyces*.

Table 2. The effect of the nitrogen excreted by *Azotobacter* into the culture medium on the growth of some soil-inhabiting *Actinomyces*. (1) The strain of *Actinomyces*. (2) Amount of glucose in the medium, and the amount utilized by the *Actinomyces* (g). (3) Amount of nitrogen (mg) in the culture medium, in the mycelia, and the total amount of N per 1 g of glucose utilized (mg) (4) Percentage amount of nitrogen utilized by *Actinomyces*.