

Antibiotikus anyagok hatása az *Azotobacter* nitrogénkötésében résztvevő enzimrendszerre

SZEGI JÓZSEF

MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézet, Budapest

Sok szerző megállapította, hogy bizonyos körülmények között egyes talajokban antibiotikus anyagok halmozódhatnak fel, amelyek segítségével az antibiotikumokat kiválasztó mikroorganizmusok képesek gátolni a velük konkurens mikrobafajok fejlődését. A levegő nitrogénjét megkötő *Azotobacter*-fajok majdnem minden esetben megtalálhatók az egyes talajok mikrobiopopulációjában s részt vesznek a talaj mikroorganizmusainak a létért folytatott küzdelmében. A f r i k j á n [1] és B e r s o v a [2] egyes antibiotikum-készítményeknek az *Azotobacter*-re gyakorolt hatását tanulmányozták. A szerzők megfigyelték, hogy meghatározott antibiotikum adagok csökkentik az *Azotobacter* által megkötött légköri nitrogén mennyiségét. A kísérletek adataiból azonban nem lehet arra következtetni, hogy az antibiotikumok az *Azotobacter*-sejtek szaporodását gátolják-e vagy pedig közvetlenül hatnak annak nitrogénkötő enzimrendszerére. F j o d o r o v [3] részletesen tanulmányozta a protoplazma felületileg aktív anyagainak, valamint az etiluretán nevű narkotikumnak a hatását az *Azotobacter* nitrogénkötő enzimjeire. Kísérletei eredményeképpen a szerző megállapította, hogy az *Azotobacter* nitrogénkötő enzimrendszere sokkal érzékenyebb a felületileg aktív anyagokkal és narkotikumokkal szemben, mint a légzőrendszer enzimjei.

Kísérleti rész

Munkámban azt a kérdést tanulmányoztam, hogy a sugárgomba eredetű tiszta antibiotikum készítmények és antagonista sugárgombák által termelt antibiotikus anyagok miként hatnak az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs nitrogénkötő enzimjeire. A kísérlet folyamán öt tiszta antibiotikum készítményt használtam fel: a magyar eredetű streptomycint (streptomycin sulfat), az amerikai eredetű viocint (viomycin) és oxitetraciklint (terramycin), valamint a szovjet eredetű klortetraciklint (aureomycin). Ezeken kívül a Szovjetunióban készült penicillin Ca-sójával is állítottam be kísérleteket, jóllehet közismert, hogy ezt az antibiotikumot nem a sugárgombák, hanem a *Penicillium* nemzetséghez tartozó penészgombák termelik. Felhasználtam még az *Actinomyces longisporus* Krassilnikov 1941 és *Actinomyces floridae* (*Str. griseus* W. et al. var. *purpureus* Burk. et. al.) sugárgombák kultúrfolyadékát. Az előbbi, amely az *Azotobacter*rel szemben agarblokk-teszt módszerrel vizsgálva igen erős antagonistának mutatkozott, a longisporin nevű antibiotikumot termeli, az utóbbi pedig ugyanezen módszerrel vizsgálva stimulálja az *Azotobacter*

szaporodását. Az *Actinomyces longisporus* 20-as törzset Iljina, a Szovjetunió Tudományos Akadémiája Mikrobiológiai Intézetének tudományos munkatársa bocsátotta rendelkezésemre, az *Actinomyces floridæ* törzset pedig Szabó Istvántól, a Magyar Tudományos Akadémia soproni Talajbiológiai Kutató Laboratóriumának tudományos munkatársától, az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzset Fjodorov akadémikustól, a Moszkvai Timirjazev Mezőgazdasági Akadémia Mikrobiológiai Tanszékének professzorától kaptam.

Az *Azotobacter* tenyésztésére a F j o d o r o v által módosított nitrogénmentes táptalajt használtam fel [4]. A táptalajt 150 ml-es Erlenmeyer-lombikokba öntöttem szét. Minden lombik 50 ml táptalajt tartalmazott. Egyidejűleg steril oldatokat készítettem a kísérletben felhasznált öt antibiotikum preparátumból. A poralakú antibiotikumot tartalmazó üvegfialákba steril körülmények között meghatározott mennyiségű steril desztillált-vizet pipetáztam. Az antibiotikus anyagok oldódása után azokból különböző hígításokat készítettem steril desztillált-vizet tartalmazó kémcsövekben. Utána a különböző koncentrációjú antibiotikum oldatok egy-egy ml-jét bepipettáztam a táptalajba. Az egyes lombikokba a következő antibiotikum dózisokat vittem be: 10, 100, 500, 1000, 5000 és 10 000 mikrogrammot. Mivel a lombikok 50—50 ml táptalajt tartalmaztak, azok minden ml-jében 0,2, 2,0, 10,0, 20,0, 100,0, 200,0 mikrogramm hatóanyaggal kellett számolnunk.

Ugyancsak felhasználtam steril kultúrfolyadékot is az *Actinomyces longisporus* és *Actinomyces floridæ* sugárgomba fajok folyékony álló tenyészetéből. Mivel az *Actinomyces longisporus* 20-as törzs által termelt antibiotikus anyag 100 C°-on 5 perc alatt teljesen inaktíválódik, ezért a hősterilizálás nem jöhetett számításba. A hideg sterilizálást tekintve, ugyancsak nehézségek mutatkoztak. A táptalajba kiválasztott gátló anyag antibiotikus aktivitása — Chamberlein-féle porcelánszűrőn áthaladva — igen erősen csökken. Míg szűrés előtt a kultúrfolyadéknak az *Azotobacter*rel szembeni gátló zónája lyuk-teszt módszerrel vizsgálva 9 mm volt, addig szűrés után csak 2 mm-es gátló zónát lehetett megfigyelni.

Az *Actinomyces longisporus* 20-as törzs hatásos antibiotikumot tartalmazó kultúrfolyadéka, a Butkevics által ismertetett és a víz baktériumszámának meghatározására szolgáló celluloidhártyán átszűrve aktivitásának 100%-os megtartása mellett sterilizálható. A celluloidhártya elkészítését Fjodorov magyar nyelven megjelent mikrobiológiai praktikumában részletesen ismerteti.

Az *Actinomyces longisporus* és az *Actinomyces floridæ* steril kultúrfolyadékából az egyes lombikokba 0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00, 2,50, 3,00, 3,50 ml-t vittünk be. A táptalaj minden ml-je 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07 ml filtrátumot tartalmazott. Ezután beoltottam azokat az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs egynapos tenyészetének sejtuszuspenziójával. A bevitt *Azotobacter*-sejtek számát közvetlen mikroszkópos megfigyeléssel — Thoma-kamrában — állapítottam meg.

Beoltás után a tenyészeteket 2 hétig 32 C°-os termosztátban inkubáltam. A vegyszerekben levő nitrogénzennyeződések, valamint a levegőből elnyelt nitrogén meghatározásához *Azotobacter*-rel be nem oltott steril táptalajt (kontrol II.) helyeztem a termosztátba.

Miután Fehling-oldatok segítségével megállapítottam, hogy az antibiotikumot nem tartalmazó kontrol (kontrol I.) lombikokban az *Azotobacter*

teljesen felhasználta a glukózt, a tenyésztést befejeztem. Bertrand módszerével meghatároztam az antibiotikumot tartalmazó lombikokban fel nem használt glukóz mennyiségét. Thoma-kamrában közvetlen mikroszkópos módszerrel megszámláltam az *Azotobacter*-sejtek számát az egyes kísérleti variációk esetében. Az *Azotobacter* által a különböző antibiotikum koncentrációk mellett megkötött nitrogén mennyiségét Kjeldahl módszerével határoztam meg (1. táblázat).

1. táblázat

Antibiotikumok hatása az *Azotobacter* nitrogénkötésére

(1) Antibio- tikum	(2) Azotobacter sejtek száma és megkötött N	(3) A kísér- let elején	(4) Az antibiotikumok mennyisége µg/ml								
			0	0,2	2,0	10,0	20,0	100,0	200,0		
Strepto- mycin	Sejtszám millió/1 ml	2,9	1200	960	1100	5,2	3,1	1,8	1,8		
	N mg/1 g glukóz		13,20	13,80	13,68	—	—	—	—		
Aureo- mycin	Sejtszám millió/1 ml	5,5	1520	1200	1050	4,7	4,9	3,6	2,5		
	N mg/1 g glukóz		12,93	12,75	14,11	—	—	—	—		
Terra- mycin	Sejtszám millió/1 ml	4,7	944	800	752	4,4	3,7	3,0	3,0		
	N mg/1 g glukóz		12,46	11,12	12,90	—	—	—	—		
Viomycin	Sejtszám millió/1 ml	4,7	944	700	960	4,4	4,2	2,5	3,6		
	N mg/1 g glukóz		12,46	10,96	12,00	—	—	—	—		
Penicillin	Sejtszám millió/1 ml	5,5	1320	1217	1380	956	7,2	3,5	4,0		
	N mg/1 g glukóz		12,93	12,03	12,20	13,40	—	—	—		
<i>Actino- myces longi- sporus</i>	Sejtszám millió/1 ml	3,6	(5) Sugárgombák kultúrfolyadéka ml/1 ml								
			0	0,005	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07
<i>Actino- myces floridae</i>	Sejtszám millió/1 ml	5,9	960	890	950	880	3,9	2,2	2,9	1,9	1,5
			N mg/1 g glukóz	11,92	12,85	12,44	11,41	—	—	—	—
<i>Actino- myces floridae</i>	Sejtszám millió/1 ml	5,9	875	721	738	656	897	975	757	953	785
			N mg/1 g glukóz	11,55	11,08	11,80	12,46	11,71	12,93	11,27	12,06

A táblázat adataiból látható, hogy a táptalaj 1 ml-jére számított 10 mikrogramm streptomycin, aureomycin, terramycin, viomycin és 20 mikrogramm penicillin teljesen elégséges ahhoz, hogy elnyomja az *Azotobacter chroo-*

coccum 53-as törzs fejlődését. Az *Actinomyces longisporus* 20-as törzs folyékony tenyészetének steril filtrátumából 0,03 ml —1 ml táptalajra számítva — ugyancsak megakadályozza az *Azotobacter* szaporodását. Az *Actinomyces floridae* tenyészetének filtrátuma sem gátlóan, sem pedig serkentően nem hat az *Azotobacter* által megkötött nitrogén mennyiségére.

K r a s s i l n i k o v [5] megállapításai szerint az antibiotikus anyagok egyes esetekben csak a baktérium-sejtek szaporodását gátolják. Ilyen körülmények között bakteriosztatikus hatásról beszélünk. Más esetben az antibiotikumok kiválthatják a baktérium-sejtek pusztulását. Ezt nevezzük baktericid hatásnak. Végül az antibiotikumok fel is oldhatják a baktériumok sejtjeit. Ez a bakteriolitikus hatás. Ugyancsak a fenti szerző megállapítása szerint egy és ugyanaz az antibiotikum egyaránt kifejthet mind bakteriosztatikus, mind baktericid, mind bakteriolitikus hatást attól függően, hogy milyen koncentrációban és milyen viszonyok között alkalmazzák, mennyi időn át hat a baktérium-sejtekre és milyen tesztorganizmussal állunk szemben.

Ebből kiindulva azt akartam kideríteni, hogy a kísérletben felhasznált különböző antibiotikumok hatására elpusztulnak-e az *Azotobacter* sejtjei, vagy csupán bakteriosztatikus hatást fejt ki a kérdéses hatóanyag. Az előbbi kísérletekben felhasznált lombikokból steril pipettával kivettem 1—1 ml-t, melyet nitrogén- és antibiotikum-mentes táptalajba vittem át. Az így beoltott táptalajokat termosztátba helyeztem. Néhány nap múltán sikerült megállapítani, hogy a 10 mikrogramm/ml streptomycint, aureomycint, viomycint és 20 mikrogramm/ml penicillint tartalmazó lombikokból származó sejtek az antibiotikum-mentes táptalajon még kinőnek, holott az antibiotikumot tartalmazó táptalajon már nem szaporodtak. A terramycin tartalmú táptalajról átoltott sejtek az új, antibiotikum-mentes közegen már nem nőnek ki, tehát ebben az esetben az a minimális antibiotikum koncentráció, amely gátolta az *Azotobacter* fejlődését, nem bakteriosztatikus, mint az előbbi esetekben, hanem közvetlenül baktericid hatású (2. táblázat).

Az előző kísérletekben az *Azotobacter*-t nitrogénmentes táptalajon tenyésztettem, mivel mint közismert, ez a baktérium nitrogéntáplálkozás szempontjából teljesen autotrof. F j o d o r o v [3] megállapította, hogy a táptalaj nitrogéntartalmú vegyületei részben vagy teljesen inaktíválják az *Azotobacter* nitrogénkötő enzimrendszerét. Az inaktiváció foka attól függ, hogy a vegyületben levő nitrogén milyen mértékben felvehető az *Azotobacter* számára.

Munkám második felében azt vizsgáltam, hogy az *Azotobacter* érzékenysége a nitrogénkötő enzimrendszer inaktivációja következtében változik-e meg, vagy sem az említett antibiotikus anyagokkal szemben.

A kísérlet folyamán felhasznált táptalaj összetétele megegyezett a Fjodorov által leírt nitrogénmentes tápközeggel, azzal a különbséggel, hogy nitrogénforrásként még foszforsavas ammóniát adtam hozzá. F j o d o r o v [3] kutatásai alapján ez a vegyület teljesen elnyomja az *Azotobacter* nitrogénkötő enzimrendszerét. A táptalajban a szén és a nitrogén egymáshoz viszonyított aránya 20 : 1 volt. A táptalaj fiziológiai elsavanyodása elkerülésére a kísérlet folyamán az *Azotobacter* számára az állandó neutrális kémhatást biztosítottam a táptalajba juttatott puffer-oldat segítségével. A puffer-oldatot Sørensen szerint készítettem. Koncentrációja a táptalajban 1/30 mol. volt.

A táptalajt 150 ml-es Erlenmeyer-lombikokba osztottam szét, majd autoklávban 0,5 atmoszféra nyomás mellett 35 percen át sterilizáltam.

E táptalajba az előző kísérletben is felhasznált antibiotikus anyagok steril oldatát, valamint az antagonista *Actinomyces longisporus* kultúrfolyadékának steril filtrátumát vittem be. Az egyes lombikokban az antibiotikus anyagok koncentrációja ugyanaz volt, mint az előző kísérletben. Miután a lombikok-

2 táblázat

Azotobacter chroococcum 53-as törzs sejttjeinek megmaradása különböző antibiotikum dózisok hatása alatt

(1) Antibiotikum mennyisége µg/ml	Streptomycin		Aureomycin		Terramycin		Viomycin		Penicillin		(2) Kultúr- folyadék mennyisége ml/ml táptalaj	(8) Actinomyces longisporus kultúr- folyadék	
	(3) antibiotikum tartalmú táptalajban	(4) átvive antibiotikum mentes táptalajba	(3) antibiotikum tartalmú táptalajban	(4) átvive antibiotikum mentes táptalajba	(3) antibiotikum tartalmú táptalajban	(4) átvive antibiotikum mentes táptalajba	(3) antibiotikum tartalmú táptalajban	(4) átvive antibiotikum mentes táptalajba	(3) antibiotikum tartalmú táptalajban	(4) átvive antibiotikum mentes táptalajba		(3) antibiotikum tartalmú táptalajban	(4) átvive antibiotikum mentes táptalajba
Kontrol	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	Kontrol	++	++
0,2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	0,005	++	++
2,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	0,01	++	++
10,0	—	++	—	++	—	—	—	++	++	++	0,02	++	++
20,0	—	+	—	—	—	—	—	—	—	++	0,03	—	++
100,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,04	—	++
200,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,05	—	+
											0,06	—	—
											0,07	—	—

++ normális növekedés
+ gyenge növekedés
— növekedés nincs.

ban levő táptalajt beoltottam az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs egynapos tenyészetének sejtszuszpenziójával, a lombikokat termosztátba helyeztem és 30 C°-on inkubáltam.

Kéthetes inkubáció után Bertrand módszerével megállapítottam, hogy a kontrol lombikokból az *Azotobacter* teljesen felhasználta a szénforrást. Ezután Thoma-kamrában közvetlen mikroszkóp alatt sejtszámlálással meghatároztam az egyes kísérleti edényekben levő *Azotobacter* sejtek számát (3. táblázat).

A táblázat adataiból látható, hogy nitrogén tartalmú táptalajon a kísérletbe vont antibiotikus anyagok ugyanolyan hatást váltanak ki az *Azoto-*

bacter chroococcum 53-as törzs sejteinek szaporodására, mint nitrogénmentes táptalajon. A sejtek száma a különböző antibiotikum dózisok hatására nitrogéntartalmú táptalajon is nagyjából ugyanannyi, mint a nitrogént nem tartalmazó táptalajon. Azok az antibiotikum dózisok, melyek nitrogénmentes táptalajon elnyomják az *Azotobacter* fejlődését, hasonlóképpen hatnak nitrogéntartalmú táptalajon is.

3. táblázat

Antibiotikumok hatása az *Azotobacter* szaporodására N-tartalmú táptalajon

(1) Anti- biotikum mennyisége µg/ml	(2) Azotobacter sejtek száma millió/l ml táptalaj a különböző antibiotikum hatására *					(3) Kultúr- folyadék mennyisége ml/ml	(4) <i>Actinomyces longisporus</i> kultúr-folyadék hatására az <i>Azotobacter</i> sejtek száma (millió/l ml)
	Strepto- mycin	Aureo- mycin	Terra- mycin	Viomycin	Penicillin		
Kontrol	1006,4	1006,4	1006,4	1006,4	1006,4	Kontrol	1006,4
0,2	911,0	1120,0	895,0	975,0	984,0	0,005	1100,0
2,0	989,0	878,0	935,0	917,0	904,0	0,01	975,0
10,0	7,2	7,6	4,8	6,5	888,0	0,02	1000,0
20,0	4,9	5,1	5,0	4,6	7,6	0,03	6,3
100,0	3,4	3,5	4,5	3,9	4,2	0,04	7,1
200,0	2,9	3,0	3,1	2,8	2,0	0,05	4,2
						0,06	4,0
						0,07	2,5

* A kísérlet beállításakor 5,3 millió.

Eredmények megbeszélése

Az adatokból látható, hogy a kísérlet folyamán felhasznált antibiotikus anyagok viszonylag alacsony dózisaik teljesen elnyomják az *Azotobacter* fejlődését. 1 ml táptalajra számítva streptomycintől, aureomycintől, terramycintől és viomycintől 10 mikrogramm, penicillintől 20 mikrogramm, az *Actinomyces longisporus* 20-as törzs kultúr-folyadékából pedig 0,03 ml már elégséges ahhoz, hogy az *Azotobacter chroococcum* szaporodását megakadályozza. Azt, hogy a penicillintől kétszer olyan magas dózis szükséges a szaporodás megakadályozásához, mint a többi antibiotikum esetében, megfigyeléseim szerint nem lehet azzal magyarázni, hogy az *Azotobacter* érzékenysége a penicillin irányában gyengébb, mint a felsorolt többi antibiotikummal szemben. Megfigyeltem ugyanis, hogy a kísérlet beállítása után 4—5 napon át a ml-enként 10 mikrogramm, sőt a 2 mikrogramm penicillint tartalmazó táptalajokban is az *Azotobacter* szaporodása gátlást szenvedett, lyuk-teszt módszerrel vizsgálva a kísérletbe vont *Azotobacter*-törzs a penicillinnel szemben mutatkozik legérzékenyebbné. Az a tény, hogy néhány nap elteltével a sejtek a 10 mikrogramm/ml penicillint tartalmazó lombikokban szaporodni kezdtek, minden valószínűség szerint annak a következménye, hogy ezen idő alatt a sejtek vagy adaptálódtak e dózis jelenlétéhez, vagy biotikus, esetleg egyéb inaktíváció következett be. Egy másik kísérletben azt figyeltem meg, hogy természetes talajba bevive, a fenti antibiotikumok közül a penicillin inaktíválódik leggyorsabban.

Az, hogy bizonyos antibiotikum koncentráció elnyomja az *Azotobacter* szaporodását, távolról sem jelenti azt, hogy el is pusztítja a baktérium-sejteket. A streptomycin, aureomycin, viomycin, valamint az *Actinomyces longisporus* kultúrfolyadékának az a legalacsonyabb dózisa, amelynek jelenlétében az *Azotobacter*-sejtek már nem szaporodnak, csupán bakteriosztatikus hatást fejt ki az *Azotobacter*-rel szemben, mivel utólag az antibiotikumot nem tartalmazó táptalajon a sejtek kinőnek annak ellenére, hogy azok két héten keresztül az antibiotikumot tartalmazó táptalajon növekedtek.

Azon kísérleti körülmények között, amikor a felhasznált antibiotikum dózis kisebb a bakteriosztatikus koncentrációnál, az *Azotobacter* ugyanannyi nitrogént képes megkötni a légkörből, mint a kontrol-lombikokban. Ez azt mutatja, hogy ilyen antibiotikum koncentráció nemcsak a baktérium-sejtek szaporodását nem képes elnyomni, de nem hat annak a nitrogénkötő enzimrendszerére sem.

Nitrogéntartalmú táptalajon tenyésztve, az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs ugyanolyan fokban érzékeny a kísérletben felhasznált antibiotikumokkal szemben, mint nitrogénmentes táptalajon. Ugyanaz az antibiotikum dózis, mely nitrogénmentes táptalajon elnyomja az *Azotobacter*-sejtek szaporodását, hasonlóképpen hat a nitrogéntartalmú táptalajon is. Mivel a bakteriosztatikus dózissnál alacsonyabb antibiotikum koncentrációk ugyancsak nem befolyásolják a megkötött nitrogén mennyiségét, valószínűnek látszik, hogy az *Azotobacter* nitrogénkötő enzimrendszere kevésbé érzékeny az antibiotikumokkal szemben, mint a felületileg aktív alkoholokkal és narkotikumokkal szemben.

A fenti kísérleteket a Moszkvai Timirjazev Mezőgazdasági Akadémia Mikrobiológiai Tanszékén M. V. Fjodorov professzornak, a Szovjetunió Mezőgazdasági Tudományos Akadémiája levelező tagjának irányítása mellett végeztem, akinek a sok segítségért és tanácsért ez úton is köszönetet mondok.

Összefoglalás

A tanulmányozott antibiotikumok (streptomycin, aureomycin, terramycin, viomycin, penicillin) és folyékony sugárgomba tenyészetek filtrátumának olyan koncentrációja, amely még nem nyomja el az *Azotobacter* fejlődését, nem hat annak nitrogénkötő enzimrendszerére sem. Ugyanis ezek jelenlétében a megkötött nitrogén mennyisége nem változik a kontrolhoz viszonyítva.

Egyes antibiotikumok (streptomycin, aureomycin, viomycin, penicillin) elnyomják az *Azotobacter* fejlődését, azonban nem pusztítják el a sejteket, csak meggátolják azok szaporodását, mivel utólagos továbbtenyésztésnél a sejtek megőrizték szaporodó képességüket.

Az *Azotobacter* által felvehető nitrogént tartalmazó táptalajon a kísérletbe vont antibiotikumoknak az *Azotobacter*-re gyakorolt hatása azonos a nitrogénmentes táptalajon megfigyelttel.

Érkezett: 1959. február 3.

I r o d a l o m

- [1] Afrikjan, E. K. & Arutjunjan, R. S.: O gyejsztvii antibiotikov na azotobakter. Mikrobiol. szbornyik A. N. Armjanszkoj SSR. 7. 173—189. 1953.
- [2] Bersova, O. I.: Vlijanyija nyekotoruh antibiotikov na azotobakter. Mikrobiol. Zsurnal. 11. (4) 3—42. 1949.
- [3] Fjodorov, M. V.: Biologicseszkaia fixacija azota atmosferu. Szeljhozgiz, Moszkva, 1952.
- [4] Fjodorov, M. V.: Prakticseszkie zanyjatija po mikrobiologii. Szeljhozgiz. Moszkva, 1952.
- [5] Krassilnikov, N. A.: Aktinomicetu antagonisztu i antibioticeszkie vecsesztva. Izd. A. N. SSSR. Moszkva—Leningrad, 1950.

ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА ФЕРМЕНТНУЮ СИСТЕМУ АЗОТОФИКСАЦИИ АЗОТОБАКТЕРА

Й, Сегн

Институт Почвоведения и Агрехимии А. Н. Венгрии, Будапешт

Резюме

В первой половине нашей работы было изучено влияние чистых препаратов разных антибиотиков и нативных антибиотических веществ, образованных лучистыми грибами, на ферментную систему азотфиксации азотобактера. В течение опыта были использованы пять разных видов антибиотиков: стрептомицин, ауреомицин, тетрацилин, виомицин и пенициллин. Использовалась также культуральная жидкость *Actinomyces longisporus* Krassilnikov 1941, *Actinomyces floridiae* (Strept. griseus W. et al. var. purpureus Burk.). *Actinomyces longisporus* как было установлено при помощи агарового блочка, является сильным антагонистом азотобактера, а *Actinomyces floridiae* стимулирует его развитие.

Для выращивания азотобактера мы использовали безазотную питательную среду в модификации М. В. Федорова. В питательный субстрат были добавлены следующие дозы данных антибиотиков: 0,2, 2,0, 10,0, 20,0, 100,0 и 200,0 микрограмм в одном миллилитре среды. Из культуральной жидкости актиномицетов добавлялось в среду 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06 и 0,07 мл. пересчитанных на 1 мл. субстрата.

После заражения азотобактером, колбы были поставлены в термостат при температуре 32° С. Когда при помощи метода Бертрана установили, что в контрольных вариантах опыта азотобактер полностью использовал источник углерода из среды, колбы были сняты. Определялось число клеток азотобактера в присутствии разных доз антибиотиков по методу прямого подсчета под микроскопом в камере Тома. Количество неиспользованной глюкозы в колбах, содержащих антибиотики, было установлено при помощи жидкости Фелинга. Количество фиксированного азота определялось методом Кьельдаля.

Как видно из данных опыта, 10 микрограмм стрептомицина, ауреомицина, тетрацилина, виомицина, а также 20 микрограмм пенициллина или 0,03 мл. культуральной жидкости, добавленной в один мл. питательного субстрата азотобактера, полностью подавляет его размножение. Тот факт, что пенициллин нужно в большем количестве для подавления роста клеток азотобактера, не даёт основу считать, что азотобактер менее чувствителен к этому антибиотику, чем к предыдущим, так как после постановки опыта в течение 3—4 дней клетки азотобактера не развивались даже в присутствии 2 $\mu\text{г}$. пенициллина. При помощи луночного теста также было установлено, что среди антибиотиков, использованных нами, азотобактер является наиболее чувствительным к пенициллину. Через несколько дней после постановки опыта азотобактер начинает развиваться в колбах, содержащих 10 $\mu\text{г}/\text{мл}$. антибиотика, в результате того, что в течение этого времени клетки или адаптировались к этой дозе, или антибиотик инактивировался.

Наиболее низкая бактерио-задерживающая доза стрептомицина, ауреомицина, виомицина, пенициллина и культуральной жидкости *Actinomyces longisporus* оказывает бактериостатическое действие на клетки азотобактера, так как при пересеве на свежую питательную среду, несодержащую антибиотик, клетки начинают развиваться.

Во второй части опытов мы хотели установить, как инактивация азотфиксирующих ферментов влияет на чувствительность азотобактера к вышеуказанным антибиотикам

Питательная среда для азотобактера была приготовлена в модификации М. В. Федорова, но с добавлением двухзамещенного фосфорнокислого аммония. Как установил М. В. Федоров, это соединение полностью подавляет ферменты азотобактера, участвующие в фиксации атмосферного азота.

В питательную среду были добавлены такие же дозы антибиотиков, как в предыдущем опыте. После заражения клетками азотобактера, питательная среда содержалась в термостате при температуре 32° С в течение двух недель.

После двухнедельной инкубации в колбах, содержащих разные дозы антибиотика, проводился подсчет клеток азотобактера прямо под микроскопом в камере Тома. На питательной среде, содержащей связанный азот, *Azotobacter chroococcum* оказался таким же чувствительным к данным антибиотикам как и на безазотной среде. Дозы антибиотиков на безазотной среде подавляют размножение азотобактера, таким же образом влияют и на азотосодержащем субстрате. На основе того, что антибиотики, недостигающие бактериостатической дозы, не влияют на количество фиксированного азота, можно предполагать, что ферментная система азотобактера, участвующая в азотофиксации, менее чувствительна к антибиотикам, чем к спиртам и поверхностно активным веществам.

Табл. 1. Влияние антибиотиков на азотфиксацию азотобактера. (1) Антибиотики. (2) Число клеток азотобактера в миллион на 1 мл. среды и количество фиксированного азота на 1 г. глюкозы. (3) В начале опыта. (4) Количество антибиотиков $\mu\text{г}/\text{мл}$. среды. (5) Количество культуральной жидкости актиномицетов мл/1 мл. среды.

Табл. 2. Выживаемость клеток *Azotobacter chroococcum* штамма № 53 под влиянием разных доз антибиотиков. (1) Количество. (2) Количество культуральной жидкости *Actinomyces longisporus* в мл/мл питательного субстрата. (3) В субстрате, содержащем антибиотики. (4) В пересеве на питательную среду не содержащую антибиотики ++ нормальный рост, + слабый рост, — роста нет.

Табл. 3. Влияние антибиотиков на размножение азотобактера в присутствии связанного азота. (1) Количество антибиотика $\mu\text{г}/\text{мл}$. среды. (2) Количество клеток азотобактера под влиянием разных доз антибиотиков миллион/мл. среды. (Во время постановки опытов 5,3 миллион.) (3) Количество культуральной жидкости *Actinomyces longisporus* в мл/мл среды. (4) Влияние культуральной жидкости на число клеток азотобактера миллион/1 мл. среды.

The Effects of Antibiotic Substances on the Enzyme System of *Azotobacter* Responsible for the Fixation of Atmospheric Nitrogen

J. SZEGI

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

Summary

In the first phase of the studies described in this paper the effects of various preparations of antibiotics and the effects of crude substances excreted by some strains of *Actinomyces* were studied on the fixation of atmospheric nitrogen by *Azotobacter chroococcum*. The antibiotics tested were: streptomycin, aureomycin, tetracycline, viomycin, and penicillin. Nutrients supporting the growth of *Actinomyces longisporus* and *Actinomyces floridiae* (*Strept. griseus* W. et al. var. *purpureus* Burk.) were also tested by the agar block method; in the first case a very strong antagonistic effect was revealed to *Azotobacter*, but in the second case only stimulation of *Azotobacter* was obtained.

Azotobacter has been cultured on the nitrogen-free medium described by M. V. Fedorov. Antibiotics were applied in 0,2, 2,0, 10,0, 20,0, 100,0, and 200,0 g per ml concentrations. The sterilized culture solutions of the above strains of *Actinomyces* were added in the amounts of 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, and 0,07 ml to *Azotobacter* cultures.

Azotobacter cultures were incubated for weeks at 32°C in thermostats. After ascertaining by the method of Bertrand, that the consumption of glucose has been completed in control flasks, the number of *Azotobacter* cells in cultures containing different amounts of antibiotic substances has been determined by direct microscopic counting in

the Thoma chamber. The amount of residual glucose was determined in the latter flask^s using Fehling solutions; the Kjeldahl procedure was applied to determine the amount of atmospheric nitrogen fixed by the cultures.

The results show a complete suppression of the growth of *Azotobacter chroococcum* strain-53 by 10 μg per ml of streptomycin, aureomycin, terramycin, or viomycin, or by 3 ml of a solution that has supported the growth of *Actinomyces longisporus*. The lower effectivity of penicillin in relation to the suppression of multiplication of *Azotobacter* cells cannot simply be explained by an increased resistance of *Azotobacter* to penicillin. This was shown by the inhibition of cell multiplication in the first 3 to 4 days of growths of *Azotobacter* cultures by 10 or even 2 μg per ml of penicillin. According to the results obtained by the hole-test, moreover, of all the above substances the most active antibiotic against *Azotobacter* is penicillin. The cell multiplication in cultures containing 10 μg per ml penicillin after an initial lag period of a few days clearly indicates the possibility of an adaptation of the cells to the dose of the drug, or of an inactivation of penicillin in the cultures.

The lowest effective doses of streptomycin, aureomycin, viomycin, penicillin, and of the culture solution from *Actinomyces longisporus* exert only a bacteriostatic action on *Azotobacter*, since the transfer of cells in a medium free of antibiotics results in cell multiplication.

In the second phase of our investigations the susceptibility of *Azotobacter* towards the antibiotics studied has been recorded under conditions which inactivate the enzyme system responsible for fixation of atmospheric nitrogen. The altered conditions consisted of supplementing the Fedorov nutrient with ammonium phosphate as N source. This latter compound has been shown by Fedorov to inactivate completely the enzyme system of *Azotobacter* responsible for the fixation of atmospheric nitrogen.

Doses of the antibiotics and conditions during incubation have been the same as in the foregoing experiments. The effects of antibiotics have likewise been evaluated by direct microscopic cell counts.

It has been found that susceptibility of *Azotobacter chroococcum* to the antibiotics studied is not changed by adding a nitrogen source to the nutrient. The effectivities in suppression of cell multiplication of all doses of the studied substances were the same regardless of the presence or absence of fixed nitrogen in the nutrient. Since doses of these antibiotics lower than those required for a bacteriostatic effect do not affect the nitrogen fixing activity of *Azotobacter*, it seems likely that the enzyme system of this organism, responsible for the fixation of atmospheric nitrogen, is more resistant to antibiotics, than to surface active alcohols or narcotics.

Table 1. The effect of antibiotics on the nitrogen fixing activity of *Azotobacter*. (1) Antibiotic. (2) Number of *Azotobacter* cells (million per ml) and fixed nitrogen (ml per ml glucose). (3) At the start of incubation. (4) Concentration of the antibiotic (μg per ml). (5) Culture liquid from *Actinomyces* culture (ml per ml).

Table 2. Cell multiplication of *Azotobacter chroococcum* strain-53 as affected by antibiotics. (1) Concentration of the antibiotic (μg per ml). (2) Culture filtrate from *Actinomyces longisporus* cultures (ml per ml culture medium). (3) In the antibiotic-containing medium. (4) After transfer into a second medium free of antibiotic. ++ normal growth, + slow growth, — no growth.

Table 3. The effect of antibiotics on cell multiplication of *Azotobacter* in the presence of fixed nitrogen in the nutrient. (1) Concentration of the antibiotic (μg per ml). (2) Number of *Azotobacter* cells (million per ml; at the start: 5,3). (3) Culture filtrate from *Actinomyces longisporus* cultures (ml per ml—). (4) Number of *Azotobacter* cells (million per ml).