

Magyarországi talajgombák fungisztatikus hatásának vizsgálata

NESPIAK ANDRZEJ és VÖRÖS JÓZSEF

Wyższa Szkoła Rolnicza Zakład Fitopatologii, Wrocław és
Növényvédelmi Kutató Intézet, Budapest

Az új antibiotikumokat termelő szervezetek izolálására a talaj az egyik leggyakoribb forrás. Az elmúlt évek folyamán a közlemények egész sora foglalkozott talajból kitenyésztett mikroorganizmusok antagonista hatásának vizsgálatával [3, 4]. Az ilyen irányú munkák tekintélyes része csak sugárgombákkal foglalkozik [5]. A talajból izolált hatásos gombagátló mikroorganizmusok nagy része, mintegy 80 %-a sugárgomba és csak a fennmaradó 20% gomba és baktérium [9]. Ami az utóbbi két mikroorganizmus csoportot illeti, THORNTON és MEIKLEJOHN megállapították, hogy a gombák általában hatásosabbak, mint a talajbaktériumok [11]. LUKE és CORNELL a talajból izolált gombák 16 %-a esetében észleltek antagonista hatást, míg a kitenyésztett baktériumoknak csak 3,6 %-a volt hatásos [4].

Munkánk a Növényvédelmi Kutató Intézet tenyészkertjéből, melegágyi- és agyag-talajból izolált gombák fungisztatikus hatásának vizsgálatára terjedt ki, sugárgombákkal és baktériumokkal nem foglalkoztunk.

Kitenyésztés módszere

Mintavétel céljából steril kanállal a talaj felületi rétegét eltávolítottuk és a kitenyésztéshez steril késcsővel, cca. 3—4 cm mélységből vettünk talajmintákat (cca. 1—1,5 cm³ talajt). A talajmintákat 100 ml steril csapvizben szuszpendáltuk, majd 20×-osra hígítottuk. A szuszpenziókat 1—1 ml-jével, 9 cm átmérőjű Petri-csészékben, 3,5 pH-ra beállított burgonya-dextróz agar lemezöntéssel történt a gombák kitenyésztése. A lemezekben kifejlődött izolált gomba telepeket burgonya-dextróz, illetve maláta agar ferde késcsőkre vittük át.

A *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* és *Cephalosporium* fajok esetében monospor kultúrákat készítettünk, a fajok meghatározása, valamint az antagonista hatás vizsgálata ezekkel történt. A *Fusarium* fajok meghatározása burgonya és rizs táptalajon, RAILLO [6] módszere szerint, az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok identifikálása THOM és RAPER [7, 10], a *Mucor* félék azonosítása pedig ZYCHA [12] alapján történt, Czapek, illetve maláta agaron.

Munkánk során 28 fajt képviselő 38 izolátumot határoztunk meg. 12 fajt agyag talajból, 16 fajt pedig melegágyi talajból tenyésztettünk ki (1. táblázat).

1. táblázat
Kitenyésztett fajok

Sor- szám	(1) Fajnév	(2) Forrás	(3) Tenyészet száma	(4) Ábra száma
1	<i>Circinella mucoroides</i> Saito	h † a	11—12	—
2	<i>Cunninghamella echinulata</i> Thaxter	a	13	—
3	<i>Mucor adventitius</i> Oudem.	a	14—39	—
4	<i>Pythium</i> sp.	a	6	—
5	<i>Acrocyllindrium granulosum</i> Bonorden	h	43	—
6	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius	a	9	—
7	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	a	37	—
8	<i>Aspergillus sclerotiorum</i> Huber	h	24	—
9	<i>Cephalosporium roseum</i> Oudem.	h	8a—35—36	—
10	<i>Cephalosporium curtipes</i> Sacc.	h	8	—
11	<i>Fusarium conglutinans</i> Wr.	h † a	27—42	—
12	<i>Fusarium equiseti</i> (Cda.) Sacc. forma 1 Raillo	h	3—5	—
13	<i>Fusarium oxysporum</i> Schl.	h	4—16	—
14	<i>Fusarium redolens</i> Wr. forma 1 Raillo	h	20	1
15	<i>Mycotorula</i> sp.	h	25	—
16	<i>Myrothecium roridum</i> Tode	a	23	6
17	<i>Oospora sulphurea</i> Preuss.	h	34	—
18	<i>Penicillium frequentans</i> Westling	a	22	2
19	<i>Penicillium notatum</i> Westling	a	41	3
20	<i>Penicillium pallidum</i> Smith (sensu lato)	h	33	4
21	<i>Penicillium soppi</i> Zaleski	a	40	5
22	<i>Penicillium</i> sp. (Carpenteles ser.)	h	44	—
23	<i>Rhodotorula</i> sp.	h	15	—
24	<i>Stemphylium verruculosum</i> Zimm.	a	31	—
25	<i>Phoma hibernica</i> Grimes	h	10	—
26	<i>Phoma</i> sp.	h	18—18a	—
27	<i>Trichoderma koningi</i> Oudem.	a	26	—
28	<i>Mycelia sterilia</i> indet.	h † a	7—21—29	—

h = melegágyi talaj

a = mezőgazdasági művelés alatt álló, erősen kötött, agyagos barna erdőtalaj

Gombagátló hatás vizsgálata. Az izolátumok antagonistá hatását 8 teszt-organizmussal szemben vizsgáljuk meg, melyből 5 növénykórokozó volt:

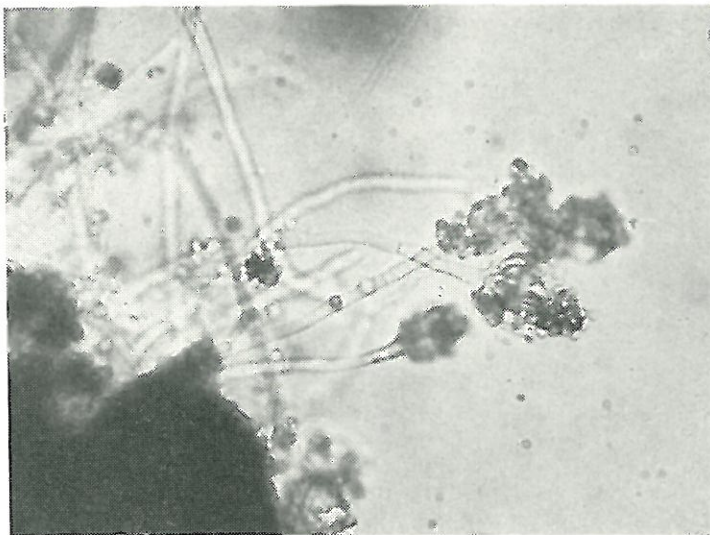
Rhizopus nigricans
Sordaria fimicola
Sclerotinia sclerotiorum
Colletotrichum atramentarium
Botrytis cinerea
Aspergillus niger
Helminthosporium sativum
Fusarium moniliforme

Az igen gyors növekedésű *Fusarium*, *Trichoderma* és *Mucor* fajoktól eltekintve a vizsgálatot a következő módszer szerint hajtottuk végre: az izolátumokat növekedési gyorsaságuk alapján négyes csoportokra osztottuk. 4—4 gombát oltottunk 1—1 Petri-csészébe, a középponttól egyenlő távolságra. A Petri-csészé középpontjába, a növekedési gyorsaságnak megfelelő időpont-

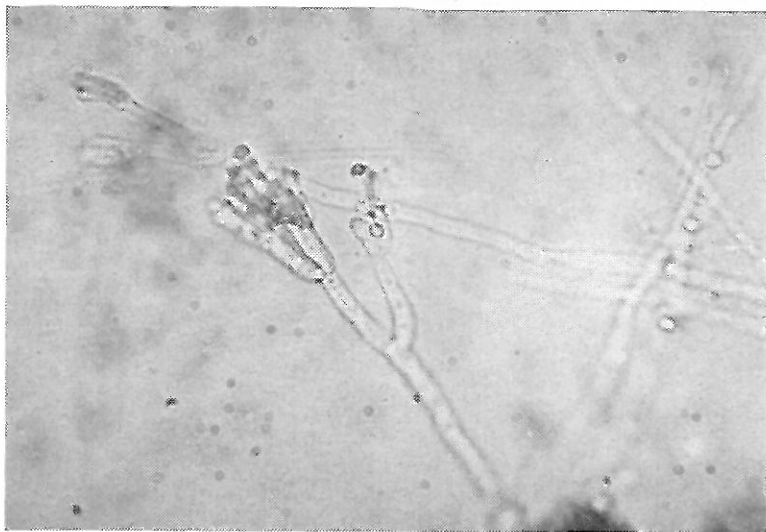


1. ábra
Fusarium redolens makrokonidiumai

ban oltottuk be a teszt-organizmusok valamelyikét. Néhány napos inkubálás után a hatásos izolátumok telepe körül a teszt-organizmus gátolt zónája volt megfigyelhető. A vizsgálat eredményeit az 2. táblázatban foglaltuk össze. A gombagátló hatás hiányát 0, az alig észlelhető gátlást +, a közepes erősségű hatást ++, míg a kapott maximális gombagátló hatást +++ jelzi.



2. ábra
Penicillium frequentans konidiumtartói

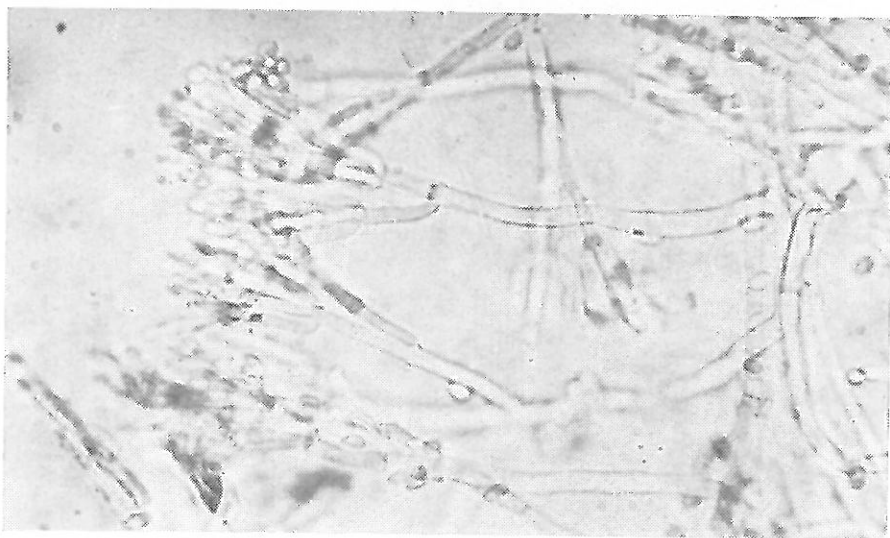


3. ábra

Penicillium notatum konidiumtartó

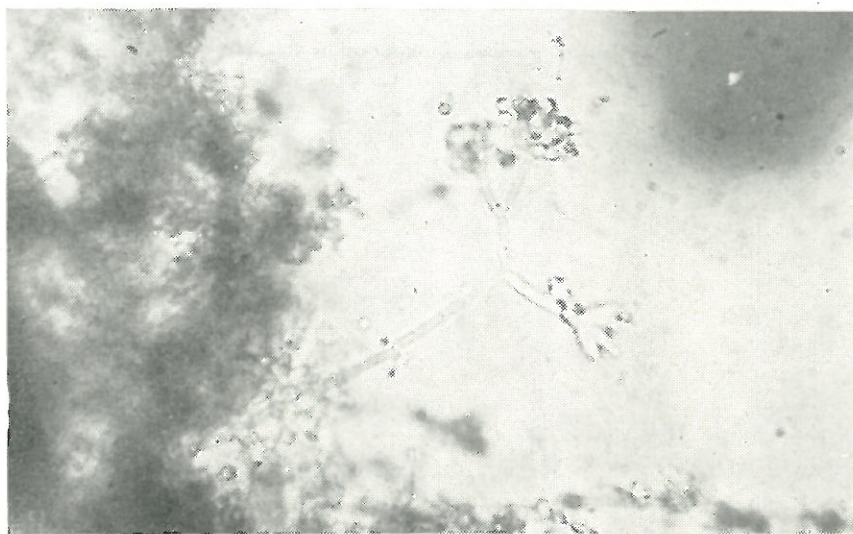
Mint látható, a leghatásosabbak a 9, 23 és 40 számú törzsek voltak.

A kitenyésztett *Fusarium*, *Trichoderma* és *Mucor* fajok gombagátló hatását — gyors növekedésük miatt — tápoldaton beállított felületi tenyészetükből vett minták alapján vizsgáltuk. Három különböző összetételű, szintetikus tápoldaton tenyésztettünk az izolátumokat. A tenyészetekből cca.



4. ábra

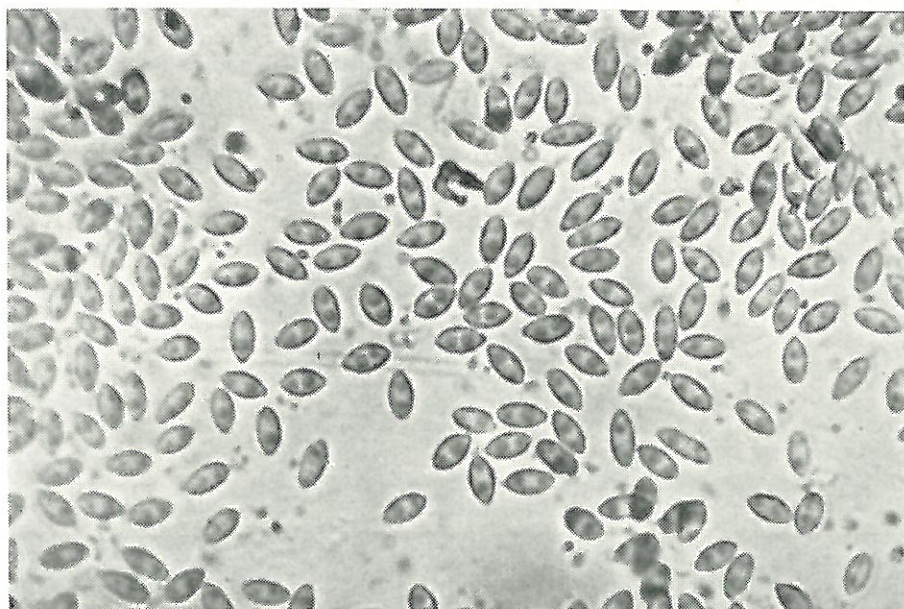
Penicillium pallidum konidiumtartói



5. ábra

Penicillium soppi konidiumtartó

7 napos időközökben, 26 napig vettünk mintákat. A gombagátló hatást párhuzamosan *Saccharomyces carlsbergensis*-el rétegezett élesztőkivonat-glükóz és *Aspergillus niger*-rel rétegezett Czapek lyukasztott agar lemezekben értékeltük.



6. ábra

Myrothecium roridum konidiumai

2. táblázat

Az izolált gombák fungisztikus hatása

(1) Tenyészet szám	<i>Colletotrichum atramentarium</i>	<i>Rhizopus nigricans</i>	<i>Sclerotinia sclerotior.</i>	<i>Sordaria fimicola</i>	<i>Helmintho- sporium sativum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
6	0	0	+	0	0	0	0	0
7	0	0	+	0	0	0	+	0
8	0	0	+	0	0	0	+	0
8a	0	0	+	0	0	++	+	0
9	0	0	++	++	0	0	0	0
10	0	0	+	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	+	+	0	0	0	0	0
18a	0	+	0	0	0	0	+	0
21	++	0	0	+	0	0	0	0
23	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0
24	+	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	+	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	+	0	0	0	+	0
36	+	0	+	0	0	0	+	0
37	0	+	0	0	0	0	0	0
40	++	0	++	0	+	0	0	0
41	+	0	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	+	0	0	0	0

A beoltott réteg mindkét teszt-organizmus esetében $6-8 \times 10^6$ sejtet, illetve sporát tartalmazott ml-ként. A kapott maximális gátló hatásokat a 3. táblázat tünteti fel. Az értékek a gátló zónák átmérőjét jelentik mm-ben.

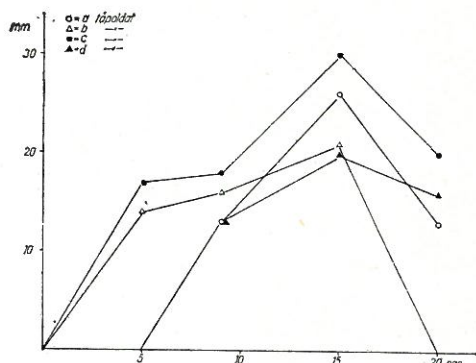
3. táblázat

Az izolált gombák fungisztikus hatása

(1) Tenyészet szám	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
3	0	13
4	0	16-20
13	0	0
16	0	15
20	11	17-21
26	0	0
27	14	20
42	11-12	12

Az első vizsgálat sorozatban leghatásosabbnak talált 9, 23 és 40 számú izolátumok hatóanyagtermelő képességét 4 különböző összetételű tápoldaton, felületi tenyészetben vizsgáltuk meg. A tenyészetekből 20 napig, 5 napos időközökben vettünk mintákat. A gombagátló hatást párhuzamosan *Saccharomyces carlsbergensis* és *Aspergillus niger* teszt-organizmusokkal rétegezett,

lyukasztott agar lemezeken értékeltük. A 9 és 40 törzsek mintái a tenyésztési idő alatt nem mutattak gombagátló hatást. A 23 számú *Myrothecium* törzs mind a 4 tápoldaton beállított tenyészetének szürlete azonban erősen gombagátlónak bizonyult. Az *Aspergillus niger* teszt-organizmussal rétegezett lyukasztott Czapek agar lemezeken kapott eredményeket az 7. ábra szemlélteti. Az abszcisszán a napok száma, az ordinátán pedig a gátolt zónák átmérője van feltüntetve, mm-ben. A használt tápoldatok összetétele a következő volt:



7. ábra

Myrothecium kultúraszürletek gombagátló hatása, *Aspergillus niger* teszt - organizmussal rétegzett, lyukasztott agar lemezeken. Vízszintes tengely a napok száma, függőleges tengely a gátolt zónák átmérője mm-ben

a) Czapek tápoldat.

b) g/1-glükóz 40, ammoniumtartarát 9,5, KH_2PO_4 2, K_2SO_4 0,6, MgSO_4 0,2, nyomelemoldat 1 ml. pH: 5,0

c) g/1-glükóz 25, ammoniumtartarát 2, KH_2PO_4 2, MgSO_4 1, FeSO_4 0,01. pH: 5,0

d) g/1-glükóz 75, NH_4NO_3 2,5, KH_2PO_4 1, MgSO_4 0,5, KCl 0,01, nyomelemoldat 1 ml. pH: 5,0.

Folyamatban levő vizsgálataink azt mutatják, hogy a gombák ellen leghatásosabbnak bizonyult 23 számú *Myrothecium* törzsünk a glutinosin néven közölt antibiotikumot termeli [1, 2, 8].

Ö s s z e f o g l a l á s

Magyarországi talajmintákból 28 fajt képviselő 39 gomba törzset tenyésztettünk ki és határoztunk meg.

Az izolátumok gombagátló hatását in vitro 2 módszer szerint vizsgáltuk meg.

Számottevő fungisztatikus hatást észleltünk a következő törzsek esetében: *Aspergillus fumigatus* (9), *Penicillium soppi* (40), *Fusarium oxysporum* (4), *Fusarium redolens forma 1* (20), *Fusarium redolens* (27 és 42), *Myrothecium roridum* (23). A többi izolátum vagy hatástalan volt, vagy csak nyomokban volt gombagátló.

A leghatásosabb *Myrothecium roridum* (23) minden valószínűség szerint glutinosin antibiotikumot termel.

Érkezett: 1960. szeptember 16.

I r o d a l o m

- [1] BRIAN, P. W., HEMMING, H. G. & JEFFERS, E. G.: Production of antibiotics by species of *Myrothecium*. *Mycologia*, **40**. 363—368. 1948.
- [2] BRIAN, P. W. & MCGOWAN, J. C.: Biologically active metabolic products of the mould *Metarrhizium glutinosum* S. Popc. *Nature*, **157**. 334. 1946.
- [3] KATZ, M.: Isolation of soil organisms antagonistic to some phytopathogenic fungi. *Palest. J. Bot. J. Ser.*, **6**. 67—70b. 1953.
- [4] LUKE, H. H. & CORNELL, T. D.: Studies on antibiotic soil organism. II. Bacteria and fungi antagonistic to *Pythium arrhenomanes* in sugarcane soils of Louisiana. *Phytopathology*, **44**. 377—379. 1954.
- [5] NISSEN, T. V.: Soil actinomycetes antagonistic to *Polyporus annosus* Fr. *Friesia*, **5**. 332—339. 1956.
- [6] RAILLO, A. I.: Gribi roda *Fusarium*. Szelyhozigiz. Moszkva 1950.
- [7] RAPER, K. B. & THOM, C.: A manual of the *Penicillia*. Williams & Wilkins., Baltimore, 1949.
- [8] RIBALDI, M.: Osservazioni preliminari sui caratteri morfologici e sulle proprietà antibiotiche di *Myrothecium verrucaria* (Alb. et Schw.) Ditmar., *Ann. Fa. Agr. Perugia*, **7**. 10. 1951.
- [9] STRESSEL, G. J., LEBEN, C. & KEITZ.: Screening test designed to discover antibiotics suitable for plant disease control. *Mycologia*, **45**. 325. 1953.
- [10] THOM, C. & RAPER, K. B.: A manual of the *Aspergilli*. Williams & Wilkins., Baltimore, 1945.
- [11] THORNTON, H. G. & MEIKLEJOHN, J.: Soil microbiology. *Ann. Rev. Microbiology*, **11**. 123—148. 1957.
- [12] ЗУСНА, Н.: Pilze II. Mucorineae. (Kryptogamenflora der Mark Brandenburg.) Verl. Gebrüder Borntraeger, Leipzig, 1935.

ИЗУЧЕНИЕ ФУНГИСТАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЧВЕННЫХ ГРИБОВ, В ВЕНГРИИ

А. Неспиак и И. Вёрёш

Высшая сельскохозяйственная школа, кафедра фитопатологии, Вроцлав (Польша) и Научно-исследовательский Институт защиты растений, Будапешт (Венгрия)

Р е з ю м е

Из двух различных почвенных типов с использованием питательной смеси кислого картофельного декстроза при помощи агаровой пластинки, были размножены и исследованы 38 штаммов 28-ми видов грибов. Название выделенных видов и среда размножения приведены в таблице № 1.

Было исследовано фунгистатическое действие большинства выделенных грибов против 8-ми тест-организмов (*Rhizopus nigricans*, *Sordaria fimicola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum atramentarium*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Helminthosporium sativum*, *Fusarium moniliforme*) (находящихся в чашках Петри рядом друг с другом. Результаты исследований приведены в таблице 2). 0 = без влияния, + слабое, ++ среднее, +++ сильное тормозящее действие.

Было исследовано фунгистатическое действие фильтрата поверхностной культивации быстрорастущих видов *Fusarium*, *Trichoderma* и *Mucor* против тест-организмов *Saccharomycetes carlsbergensis* и *Aspergillus niger*, находящихся на слоистых луночных агаровых пластинках. Размеры полученных максимальных зон торможены, показаны в табл. № 3.

Значительное фунгистатическое действие было обнаружено также у штаммов: *Aspergillus fumigatus* (9), *Penicillium sopri* (40), *Fusarium redolens* (27 и 42) *Myrothecium roridum* (23).

Остальные штаммы оказывали очень небольшое фунгистатическое влияние или совсем не оказывали его.

Способность образования антибиотиков у самого активного штамма *Myrothecium* была исследована при поверхностной культивации его, на следующих питательных средах:

- а) Питательный раствор Czapek.
 в) 40 гр/литр глюкозы, 9,5 тартарата аммония, 2 гр/литр — K_2HPO_4 , 0,6 гр/литр — K_2SO_4 , 0,2 гр/литр — MgSO_4 и 1 мл раствора микроэлементов. pH раствора — 5.
 с) Глюкозы 25 гр/литр тартарат аммония, — 2 гр/литр K_2HPO_4 — 2 гр/литр, MgSO_4 — 1 гр/литр, FeSO_4 — 0,01 гр/литр, pH — 5,0.
 д) Глюкозы 75 гр/литр, NH_4NO_2 2,5 гр/литр, K_2HPO_4 1 гр/литр, MgSO_4 0,5 гр/литр, KCl — 0,01 гр/литр, 1 мл раствора микроэлементов pH = 5,0.

Фунгистатическое действие фильтрата культуральной жидкости на тест-организмы *Saccharomyces carlsbergensis* и *Aspergillus niger* исследовали на слоистых луночных агаровых пластинках. Результаты показаны на рисунке 7. Максимальное содержание действующего вещества было обнаружено на питательном растворе С через 15 дней. Опыты показывают, что штамм *Myrothecium* вырабатывает антибиотик глютинозин.

Рис. 1. Макроконидии *Fusarium redolens*.

Рис. 2. Конидионосцы *Penicillium frequentans*.

Рис. 3. Конидионосец *Penicillium notatum*.

Рис. 4. Конидионосцы *Penicillium pallidum*.

Рис. 5. Конидионосец *Penicillium soppi*.

Рис. 6. Конидии *Myrothecium roridum*.

Рис. 7. Фунгистатическое действие фильтрата культуральной жидкости *Myrothecium* на тест-организмы *Aspergillus niger* на луночных агаровых пластинках. (Ордината — число дней, абсцисса — диаметр в мм зоны торможения.)

Табл. 1. Виды выделенных грибов. (1) Название; (2) Место обитания; (3) Номер культуры; (4) Номер рисунка. h = почва из теплицы. а = глинистая почва.

Табл. 2. Фунгистатическое действие выделенных грибов. (1) Номер культуры

Табл. 3. Фунгистатическое действие выделенных грибов. (1) Номер культуры

Study on the Fungistatic Effect of Hungarian Soil Inhabiting Fungi

A. NESPIAK and J. VÖRÖS

Department of Phytopathology, College of Agriculture, Wrocław (Poland) and Research Institute for Plant Protection, Budapest (Hungary)

Summary

38 fungus strains belonging, as it was determined, to 28 different species, were isolated from two different soil types on acidified potato-dextrose plates. Source of the isolates and the list of the species concerned are summarized in Table 1.

Fungistatic activity of most isolates was studied against eight test organisms (*Rhizopus nigricans*, *Sordaria fimicola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum atramentarium*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Helminthosporium sativum* and *Fusarium moniliforme*). The Petri dishes were simultaneously inoculated with both test organisms and experimental strains. Results are summarized in Table 2. (+ = slight activity, ++ = medium activity, +++ = high activity). Activity of strains belonging to the genera *Fusarium*, *Trichoderma* and *Mucor*, whose vegetative growth is very intensive, was studied by applying filtrate of their surface cultures to *Saccharomyces carlsbergensis* and *Aspergillus niger* as test organisms. The latter were spread on agar plates and the filtrate was applied by the agar cup plate procedure. Diameters of the observed maximal inhibitory zones are shown in Table 3.

Remarkable fungistatic activity was observed with the following isolates: *Aspergillus fumigatus* (9), *Penicillium soppi* (40), *Fusarium oxysporum* (4), *Fusarium redolens* f. 1. (20), *Fusarium redolens* (27 and 42), and *Myrothecium roridum* (23). Fungistatic activity of the other isolates was slight or nil.

Fungistatic activity of the filtrate of the most active *Myrothecium* strain was studied more closely in surface cultures on different nutrients:

a) on Czapek solution:

b) on (gm per l): glucose (40), ammonium tartarate (9,5); K_2HPO_4 (2), K_2SO_4 (0,6) and MgSO_4 (0,2), with the addition of 1 ml of a solution of trace elements and with an initial pH: 5,0;

c) on (gm per l) : glucose (25), ammonium tartarate (2), KH_2PO_4 (2), MgSO_4 (1) and FeSO_4 (0,01), initial pH : 5,0; and

d) on (gm per l) : glucose (75), NH_4NO_3 (2,5), KH_2PO_4 (1), MgSO_4 (0,5), and KCl (0,01), supplemented with 1 ml of the trace element solution, and with an initial pH of 5,0.

Activity of the filtrates was assessed with *Saccharomyces carlsbergensis* and *Aspergillus niger* as test organisms in the agar cup plate test referred to above. Results are presented in Fig. 7. Highest productivity was found with solution *c*), on the 15th day of the cultures.

Further studies are under way and these indicate that the antibiotic produced by the *Myrothecium* strain is identical with glutinosin.

Fig. 1. Macroconidia of *Fusarium redolens*.

Fig. 2. Conidiophores of *Penicillium frequentans*.

Fig. 2. Conidiophores of *Penicillium notatum*.

Fig. 4. Conidiophores of *Penicillium pallidum*.

Fig. 5. Conidiophore of *Penicillium soppi*.

Fig. 6. Conidia of *Myrothecium roridum*.

Fig. 7. Fungistatic activity of culture filtrates of *Myrothecium* against *Aspergillus niger*, as shown by the agar cup plate method (abscisse: culture, in days, ordinate: diameter of the inhibition zone, mm).

Table 1. The fungus strains isolated. (1) Species. (2) Source of the isolate. (3) Strain number. (4) Reference Figure. (h = hotbed soil, a = clay soil.)

Tables 2, and 3. Fungistatic activity of the isolates. (1) Strain number.