

## A sugárgombák humusz-bontó tevékenysége

A. N. IBRAHIM és I. A. IBRAHIM

*Al-Azhar Egyetem, Mezőgazdaságtudományi Kar,  
Mezőgazdasági Növénytan Tanszék, Kairó (E. A. K.)*

A humusz-bontó mikroorganizmusokkal kapcsolatos ismereteink hiányosak és egymásnak ellentmondanak. WINOGRADSKY [16] szerint a talajokban speciális humusszal táplálkozó mikroflóra található, amelyet a szerző autochton mikroflórának nevez szemben a zimogén mikroorganizmusokkal, amelyek a friss növényi és állati eredetű szerves anyagokat építik le. TEPPER [14] több olyan mikroorganizmust tenyésztett ki a talajból, amelyeket az autochton mikroszervezetekhez sorolt. MISUSZTIN és NIKITIN [9], FJODOROV és ILJINA [2], SZMALIJ [13] valamint más szerzők viszont a szaprofita talajmikrobák szerepét emelik ki a humuszanyagok elbontásánál.

A humuszanyagok elbontásában, kémiai szerkezetüknek megfelelően, csak olyan mikroszervezetek tudnak részt venni, amelyek képesek megtámadni az aromás vegyületeket. Ilyen sajátosságokkal rendelkeznek többek között a talajban élő aktinomyceták is, amelyek, mint közismert, képesek lebontani a különböző nehezen degradálódó vegyületeket. Ez ad jelentőséget tanulmányunk célkitűzésének, nevezetesen az egyiptomi talajokból kitenyésztett sugárgombák humusz-bontó tevékenysége megismerésére irányuló munkánknak. Mint ismeretes, a humuszmolekulák felépítésében fontos szerepet játszanak a fenolok kondenzációja során létrejött kinon típusú vegyületek. Ebből kiindulva célkitűzésünket képezte részben a különböző fenol vegyületek elbontásának vizsgálata, részben pedig a talajból kémiai úton kinyert humuszkészítmény (Na-humát) biológiai degradálhatóságának megismerése.

Kísérleteinkbe három sugárgomba törzset vontunk be, amelyek az előkísérletek folyamán aktív humusz-bontóknak bizonyultak. Ezek a következők: *Streptomyces viridans* 581-es törzs, *Streptomyces viridans* 1130-as törzs és *Streptomyces violaceoruber* 1133-as törzs. Mindhárom kultúrát egyiptomi talajból izoláltuk.

Tanulmány tárgyává tettük a kísérletbe vont sugárgombák proteolitikus aktivitásának megismerését is, mivel ismeretes, hogy a humuszmolekula szerkezeti felépítésében fontos helyet foglal el a fehérjetartalmú komponens.

A kísérletek során alkalmazott humuszanyagokat két különböző talajtípusból nyertük, az irodalomból ismert lúgos kioldás segítségével. Az egyik egyiptomi agyagos vályogtalaj volt, a másik pedig Magyarországról származó barna erdőtalaj.

### Anyag és módszer

A kísérletbe vont három sugárgombát PRIDHAM és GOTTLIEB által dolgozott (SHIRLING és GOTTLIEB [10]) folyékony tápközegben tenyésztették. A kísérlet beállítása 250 ml-es Erlenmeyer lombikokban történt. A humátot gyenge lúgban vittük oldatba, s ilyen állapotban adagoltuk a tápoldathoz steril viszonyok között. A kísérlet az alábbi négy kezelésben került beállításra: 1. A tápoldat nem tartalmazott külön szén és nitrogénforrást, s így az aktinomyeták tápanyagszükségletüket csak a humátból tudták fedezni. 2. A tápoldat kiegészítő szénforrást tartalmazott, nitrogénforrást nem. Kiegészítő szénforrásként glukóz szolgált 0,2 %-os koncentrációban. 3. A táp-talaj csak kiegészítő nitrogénforrást tartalmazott (2,64 g.) ( $\text{NH}_4/2\text{SO}_4/\text{liter}$ ), szénforrást nem vittünk be. 4. Mind kiegészítő szénforrást, mind pedig nitrogénforrást adtunk a tápoldathoz.

A humuszlebontás mértékének meghatározása részben a sötét színű szubsztrátum elszíntelenedése, részben pedig a súlycsökkenés alapján történt. Az elszíntelenedés fokát az inkubáció 4-ik, 8-ik és 12-ik hetének végén határoztuk meg fotokolorimetrikus úton 465 mμ hullámhosszon, a súlycsökkenést pedig a kísérlet befejezésekor a 12-ik héten. Az inkubációt 30 °C-os termosztátban folytattuk le.

A tenyészfolyadékot és a biomasszát centrifugálással választottuk el egymástól. Az irodalomból ismeretes, hogy a tenyészfolyadékban oldatban levő humátok adszorbeálódhatnak a mikroorganizmusok sejtjeinek, különösképpen pedig a mikrogombák és aktinomyeták micéliumának felületén, s ez zavarhatja az elszíntelenedés alapján mért humuszlebontási értékek megbízhatóságát. Ennek kiküszöbölése céljából a biomasszáról pH 10-re beállított univerzális puffer segítségével mostuk le a humátot. Az így oldatba került humátot több lépcsőben végrehajtott lecsapással (savanyítás pH 2-ig, kifagyasztás, pH 8-as pufferben végzett reszuszpendálás, centrifugálás 30,000 fordulatszámú ultracentrifugával) nyertük vissza. Az így megtisztított humuszcsapadékot univerzális pufferban feloldottuk és meghatároztuk az optikai sűrűségét.

Az inkubáció befejezésekor visszamaradt humát súlyát úgy határoztuk meg, hogy a szervesen sókat dialízis útján elválasztottuk az oldattól, majd vákuumban bepárooltuk 45 °C hőmérsékleten. Az így nyert száraz maradékot, amely a humusszal volt azonos, megmértük, és a bemért humát súlyához viszonyítottuk.

Munkánk során a továbbiakban tanulmányoztuk a különböző fenoltartalmú vegyületek (fenilalinin, tirozin, galluszsav, floroglucin, vanilinsav, rezorcin, p-hidroxibenzoesav, szalicilsav) lebontását a három kísérletbe vont sugárgombatorzs által. A Pridham—Gottlieb-féle folyékony tápközegben beállított kísérlet két kezelésből tevődött össze. Az egyik variáns esetében a tápoldat nem tartalmazott kiegészítő szénforrást, így a sugárgombák energiaszükségletét a tápoldatba 5 ppm dózisban bevitt fenoltartalmú vegyületek voltak hivatva biztosítani. A másik kezelésénél a tenyészetekhez glükózt is adtunk 0,01 %-nyi mennyiségben. A tenyészeteket 30 °C-os termosztátban inkubáltuk 12 napig. Az inkubációs idő folyamán naponta kivettünk aliquot mennyiségeket a tenyészfolyadékból, centrifugálással elkülönítettük a tenyészfolyadékot a biomasszától, és a felülúszó éteres kivonatóból mutatuk ki a fenol anyagok mennyiségét kromatográfiás úton.

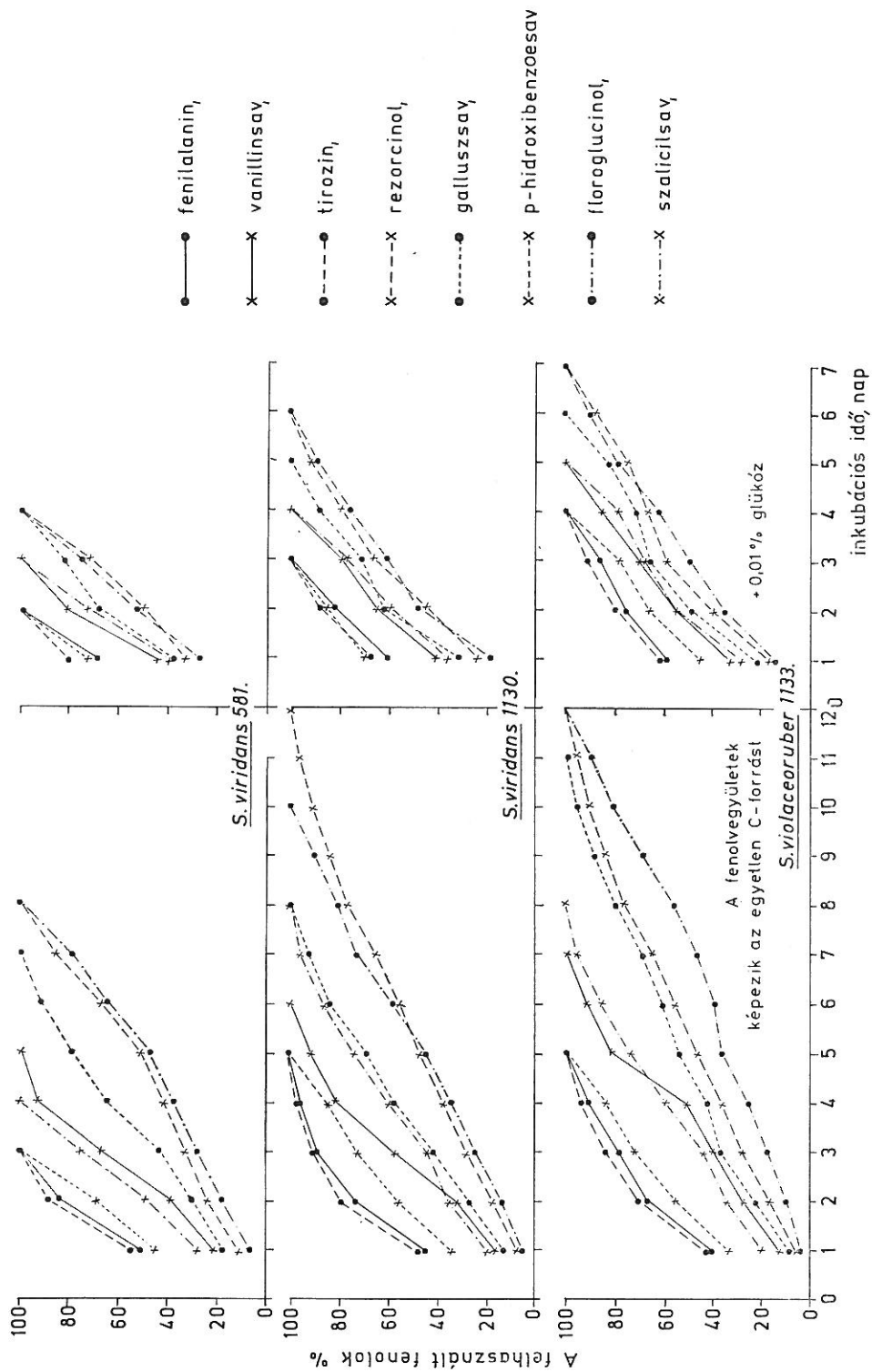
Munkánk során a tanulmányozott aktinomicetákat olyan szempontból is vizsgáltuk, hogy mennyiben képesek hidrolizálni a humuszmolekula fehérjetartalmú komponenseit. A kísérletet glicerinkazein tartalmú tápoldatban folytattuk le (KÜSTER és WILLIAMS [6]), és a proteolitikus aktivitást 1, 2, 3 hetes inkubáció után mutattuk ki. A tenyészetekből 1, 2, 3, 4 ml szubsztrátumot pipettáztunk ki steril körülmények között, és azt steril centrifuga-csővekben levő 8 ml humát oldathoz adagoltuk. A tenyészfolyadék és a nátrium humát keverékét ezt követően 5 n sósavval elsavanyítottuk a hidrolizáció meggyorsítása céljából, majd 37 °C-os termosztátba helyeztük 24 órára. Ezt követően a csöveket centrifugába tettük s centrifugálással különítettük el a folyadék és a szilárd komponenseket. Az összes aminosavtartalom elválasztása kromatográfias úton történt. Kontrollként szolgáltak szűrletet és humuszt nem tartalmazó csövek.

### Az eredmények megvitatása

Az 1. ábra adataiból kielemezhető, hogy a *Str. viridans* 581-es törzs tekinthető legintenzívebb humuszbontó mikroszervezetnek, mivel a komplett (C és N forrásokat tartalmazó) Pridham—Gottlieb-féle tápoldatban a barna erdőtalajból származó humusznak 17, 25 és 42 %-át bontotta le 4, 8 és 12 hetes inkubációs időszak folyamán. Ugyanakkor az egyiptomi agyagos vályogtalajból nyert humusznak 23, 35 és 44 %-át értékesítette. Az irodalomban több forrásmunka található, amelyeknek a szerzői (MISUSZTIN és NIKITIN [9], HURST és munkatársai [4], FJODOROV és ILJINA [2], VOLKOVA [15], SZEGI [12]) a tápoldatba vitt humusz elszíntelenedése alapján határozták meg a humuszbontó aktivitását. Közülük többen rámutattak a sugárgombák intenzív humuszbontó képességére.

Az általunk lefolytatott vizsgálatok alátámasztották a fenti szerzők azon megállapítását, hogy olyan körülmények között legintenzívebb az elszíntelenedés, amikor a tápoldat a humuszon kívül kiegészítő szén- és nitrogénforrásokat is tartalmaz. Ezt követte az a variáns, amely csak kiegészítő szénforrást tartalmazott, s így a nitrogén szükségletet a humusz hivatott fedezni. Végül leggyengébb humuszbontó tevékenységet annál a kezelésnél tapasztaltunk, amely sem kiegészítő szénforrást, sem pedig nitrogénforrást nem tartalmazott. Több szerző, így LATTER és BURGESS [8], VOLKOVA [15] FJODOROV és ILJINA [2] megállapította, hogy a humuszsavak mint nitrogénforrások jobban értékesíthetők a mikroszervezetek által szénforráskénti felhasználásukhoz viszonyítva. A kiegészítő szén- és nitrogénforrás feltételezhetően azáltal serkenti a humuszbontást, hogy jelenlétükben a mikroszervezetek nagyobb biomasszát képeznek, és így növekszik a fermentatív aktivitásuk azon variánsokhoz viszonyítva, ahol ezek a könnyen felvehető tápelemek nem állnak rendelkezésre.

A fenolok illetve kondenzációjuk útján kialakuló kinon vegyületek a humuszmolekula szerkezeti alapegységeit alkotják, ezért lebontásuk szoros összefüggésben van a humuszmolekula mikrobiális degradációjával. A 2. ábrából látható, hogy a vizsgált sugárgombák a fenol vegyületeket eltérő intenzitással képesek leépíteni. Hasonlóan előző vizsgálataink eredményéhez, legtöbb fenolt a *Str. viridans* 581-es törzs képes értékesíteni az egyes fenol-vegyületek kémiai sajátosságaitól függően az alábbi sorrendben:



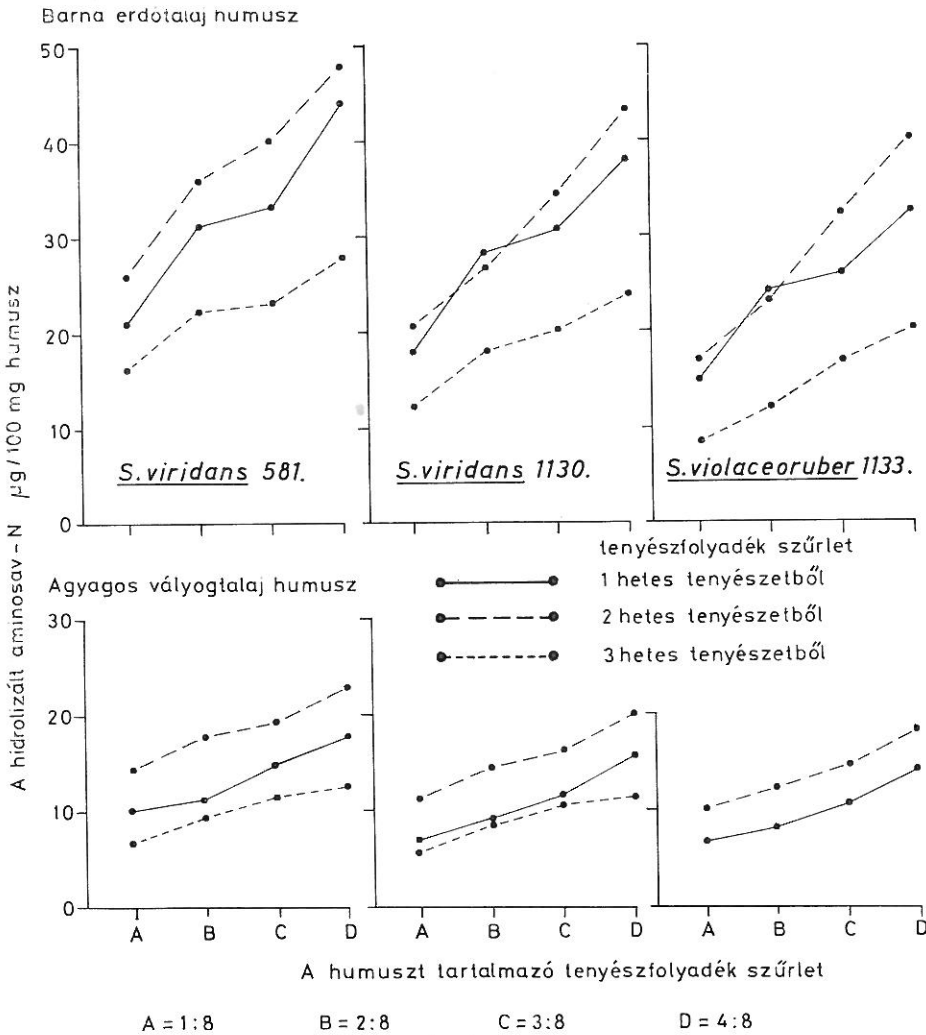
I. ábra

Egyes fenolgyűletek felhasználása sugárgombák által. %

Fenilalanin, tirozin, p-hidroxibenzoészav > szalicilsav > vanilinsav > gallusz-sav, rezorcin, floroglucin.

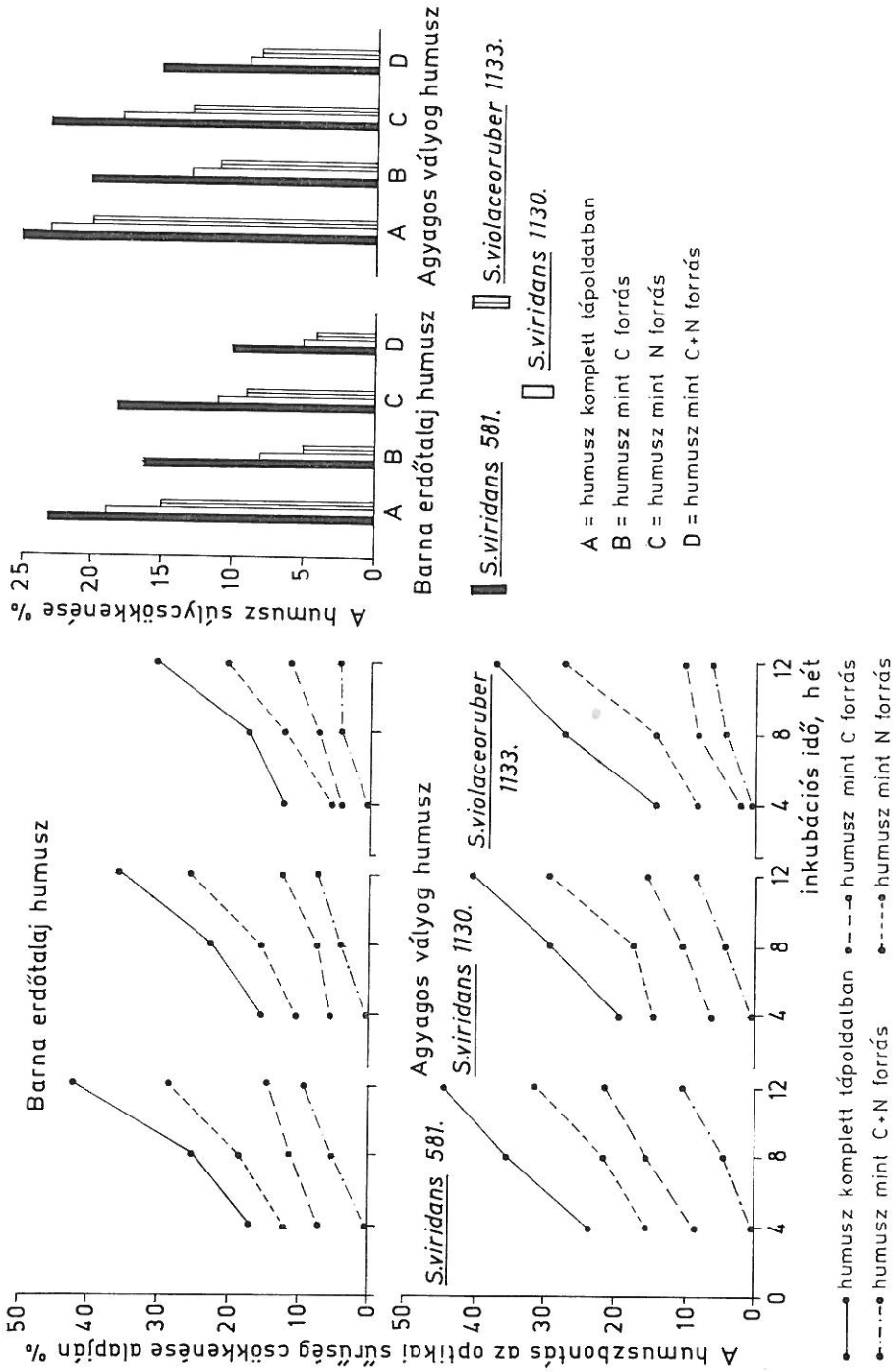
Kis mennyiségű glukóz hozzáadása a tápoldathoz meggyorsítja a fenolok lebontásának intenzitását, és csökkenti a teljes lebontás időtartalmát. A glukózt tartalmazó kezeléseknél a fenolok 4 – 7 nap alatt felhasználódtak, míg azoknál a variánsoknál, amelyekbe nem vittünk be glukózt, ez a folyamat 8 – 12 napig is elhúzódott.

Az aminosavak felszabadulása a humusból azt igazolja, hogy a kultúrfolyadék extracelluláris proteázokat tartalmaz. Ilyen következtetéshez



2. ábra

A vizsgált sugárgombák tenyészfolyadék szűrletének proteolitikus aktivitása a talajból kivont humuszanyagok hidrolízise során.



A talaj humuszanyaga sugárbombák által történő lebontásának mérése fotokolorimetrikus úton és a súlykülönbség alapján. 3. ábra

jutott SCHARPENSEEL és KRAUSSE [11], LADD és BRISBANE [7], JEGOROV és munkatársai [5], HUNTJENS [3], valamint ANDRJUK és munkatársai [1], akik proteázok jelenlétét mutatták ki egyes humusbontó mikroszervezetek kultúráiban.

A 3. ábra adatai azt mutatják, hogy a kísérletbe vont sugárgomba törzsek tenyészeiben az inkubációs periódus közepén, a második héten volt a legerősebb a proteolitikus tevékenység, míg az első és a harmadik héten lényegesen gyengébb. A barna erdőtalajból származó humusból a *Str. viridans* 581-es törzse kéthetes inkubáció alatt az össznitrogén 33,4 %-át szabadította fel, míg az agyagos vályog humuszanyagai esetében ez az érték 26,2 %-ra módosult. LADD és BRISBANE [7] ugyancsak azt találták, hogy a pronáz enzim relatív koncentrációjának növekedése fokozza a különböző humuszsavakból felszabaduló aminosav nitrogénmennyiségét.

Mindkét humuszmintából ugyanazoknak az aminosavaknak a felszabadulását észleltük. Ezek az aminosavak az alábbiak voltak: glutaminsav, glicin, leucin (izoleucin), fenilalanin, tirozin, szerin, valin, sziszten és metionin. Bázikus tulajdonságú aminosavakat nem sikerült kimutatnunk.

### Összefoglalás

A szerzők azt tanulmányozták, hogy egyiptomi talajból kitenyésztett három aktinomiceta törzs (*Str. viridans* 581-es és 1130-as törzsei, *Str. violaceoruber* 1133-as törzse) milyen intenzitással képesek lebontani a talajból kinyert humuszt valamint a különböző fenol származékokat. Tanulmányozták továbbá, hogy a humusz fehérjetartalmú komponensei milyen mértékben hidrolizálódtak a kísérletbe vont sugárgombák által kiválasztott enzimek hatására.

A sugárgomba törzsek közül a *Str. viridans* 581-es törzs bizonyult legaktívabbnak, mind a humusbontás, mind a különböző fenolszármazékok értékesítése, mind pedig a humuszprotein hidrolízise tekintetében.

A humusz lebontását nagy mértékben meggyorsítja a kiegészítő szén- és nitrogénforrás jelenléte a tápközegben. A vizsgált sugárgombák a két tápanyagforrás értékesítése során előnyben részesítik a humuszmolekula nitrogéntartalmú komponenseit a széntartalmú komponensekhez viszonyítva.

Leggyengébb humusz- és fenolbontó tevékenységet azoknál a variánsoknál figyeltük meg, amelyek nem tartalmaztak kiegészítő szén- és nitrogénforrást.

### Irodalom

- [1] ANDRJUK, K. I. et al.: Iszpolzovanie azota guminovüh kiszlot mikroorganizmami. Mikrobiologicsn. zurn. (Kiev) **35**. 139-142. 1973.
- [2] FJODOROV, M. V. & ILJINA, T. K.: Dosztupnoszt' ugleroda i azota guminovoj kiszlotü mikroorganizmami. Izv. TSzHA. **38**. 42-48. 1961.
- [3] HUNTJENS, J. L.: Amino acid composition of humus acid-like polymers produced by *Streptomyces* and of humic acid from pasture and arable land. Soil Biol. Biochem. **4**. 339-345. 1972.
- [4] HURST, H. M., BURGESS, A. & LATTER, P.: Some aspects of the biochemistry of humic acid decomposition by fungi. Phytochemistry. **1**. 227-231. 1962.
- [5] JEGOROV, N. S. et al.: Izucsenie vlijania novobiocina na uglevodnij obmen *Act. spheroides* stamm No 35 i ego neaktivnij mutant vlijanie novobiocina na szintez ketokiszlot. Antibiotiki. **12**. 110-114. 1967.

- [6] KÜSTER, E. & WILLIAMS, S. T.: Selection of media for isolation of Streptomyces. *Nature*. **202**. 928. 1964.
- [7] LADD, J. N. & BRISBANE, P. G.: Release of amino acids from soil humic acids by proteolytic enzymes. *Aust. J. Soil Res.* **5**. 161—171. 1967.
- [8] LATTER, P. & BURGESS, A.: Experimental decomposition of humic acid by fungi. *Trans. 7th Inter. Congr. Soil Sci.* **3**. 643—647. 1960.
- [9] MISUSZTIN, F. N. & NIKITIN, D. I.: Atakueoszt guminovü kizsolt pocsvénnoj mikroflorój. *Mikrobiologija*. **30**. 841—848. 1961.
- [10] SHIRLING, E. B. & GOTTLIEB, D.: Method for characterisation of Streptomyces species. *Internat. J. Syst. Bacteriol.* **16**. 313—340. 1966.
- [11] SHARPENSEEL, H. W. & KRAUSSE, R.: Aminosäureuntersuchungen an verschiedenen organischen Sedimenten besonders Grau- und Braunhuminsäurefraktionen verschiedener Bodentypen (einschliesslich <sup>14</sup>C markierter Huminsäuren). *Z. Pfl. Nähr. Bodenk.* **96**. 11. 1962.
- [12] SZEGI, J.: Additional data on humus-decomposing activity of some Actinomycetes and microscopic fungi. *Acta Agron. Hung.* **16**. 367—373. 1967.
- [13] SZMALIJ, V. T.: Role of microorganisms in transformation of humic substances of caustobiolytes. *Proc. Symp. Soil Biol.* 215—220. Budapest. Akadémiai Kiadó. Budapest. 1972.
- [14] TEPPER, E. Z.: O bakteriah avtohtonnoj mikroflorü pocsvü, razlagajuscih gumuszovü veseszstva. *Mikrobiologija*. **32**. 655—662. 1963.
- [15] VOLKOVA, L. P.: Razlozsenie gumuszovoj kizsoltü mikroorganizmami. *Izv. AN SSSR szer. biol.* (1) 101—106. 1961.
- [16] WINOGRADSKY, S.: *Microbiologie du sol*. Dunod. Paris. 1948.

Érkezett: 1976. október 29.

## Biodegradation of Soil Humus by Streptomyces

A. N. IBRAHIM and I. A. IBRAHIM

Department of Agricultural Botany, Faculty of Agriculture, Al-Azhar University, Cairo (U.A.R.)

### Summary

The biodegradation of humus (extracted from the soil) and phenol containing compounds were studied by three streptomyces strains (*S. viridans* 581 and 1130, *S. violaceoruber* 1133 strains) isolated from Egyptian soils, as well as the hydrolyzation of protein content components of humus on the effect of enzymes extracted by the streptomyces strains was also investigated.

As regards the biodegradation of humus, utilization of the different phenol containing compounds and the hydrolyzation of humus protein the *S. viridans* 581 proved to be the most active.

The presence of C- and N-sources as a supplement in the medium accelerated the biodegradation of humus to a great extent. The studied streptomyces strains preferred rather the N-content components.

The weakest humus and phenol decomposing activity was observed in the case of those variants which did not contain supplement C- and N-sources.

*Fig. 1.* Utilization of some phenol compounds by ray fungi.

*Fig. 2.* Proteolytic activity of culture filtrate of the investigated ray fungi in the course of the hydrolysis of humus materials extracted from soils.

*Fig. 3.* Measuring of the decomposition of soil humus material by actinomycetes, photocolometrically and on the basis of different weights.

## Degradación biológica del humus por los hongos de rayo

A. N. IBRAHIM y I. A. IBRAHIM

Departamento de Botánica Agrícola, Facultad de Agronomía Universidad de Al-Azhar, Cairo, Egipto

### Resumen

La intensidad de la degradación biológica del humus y de diferentes compuestos fenólicos extraídos del suelo han sido estudiado con 3 cepas de actinomicetos (*S. viridans* 581 y 1130, *S. violaceoruber* 1133) aislados de suelos egipcios. Igualmente ha sido investigado la medida de hidrólisis de los componentes proteinicos del humus por efecto de los enzimas segregados por los actinomicetos estudiados.

Con respecto a la degradación biológica del humus al igual que a la utilización de los diferentes derivados fenólicos y la hidrólisis de humusproteínas, la cepa *S. viridans* 581 se comprobó como la más activa entre las demás cepas de actinomicetos.

La presencia de la fuente suplementaria de carbon y nitrogeno acelera la degradación biológica del humus en el medio nutritivo considerablemente. Los estudiados hongos de rayo dan preferencias a los componentes nitrogenados del humus en comparacion con los componentes de carbon.

La más debil actividad en la decomposición del humus y del fenol han podido observados en las variantes sin fuente suplementaria de carbon y nitrogeno.

*Figura 1.* La utilización de algunos compuestos fenólicos por los actinomicetos.

*Figura 2.* La actividad proteolítica del filtrado de la solución nutritiva de los hongos de rayo en el curso de la hidrólisis de los componentes de humus extraídos del suelo.

*Figura 3.* La medida de la decomposición del humus por los actinomicetos con el fotocolorimetro y por la diferencia de peso.

## Разложение гумуса лучистыми грибами

A. N. ИБРАХИМ и И. А. ИБРАХИМ

Университет Ал-Азхар, Сельскохозяйственный факультет, кафедра сельскохозяйственной ботаники, Каир (А. Р. Е.)

### Резюме

Авторы изучали интенсивность разложения почвенного гумуса и различных производных фенола под влиянием трех штаммов лучистых грибов (штаммы *Str. viridans* 581 и 1130 и штамм *Str. violaceoruber* 1133) выделенных из египетских почв. Изучали также в какой степени гидролизуются белковые компоненты гумуса под влиянием энзимов, выделенных подпытанными лучистыми грибами.

Из штаммов лучистых грибов наиболее активными в отношении разложения гумуса, использования различных производных фенола и в отношении гидролиза протеина гумуса оказался штамм *Str. viridans* 581.

Разложение гумуса в значительной степени ускоряется при наличии в питательной среде дополнительных источников углерода и азота. Изученные лучистые грибы при использовании двух источников питания оказывают предпочтение азотным компонентам молекулы гумуса по сравнению с углеродными компонентами.

Самое слабое разложение гумуса и фенола наблюдали на тех вариантах, которые не содержали дополнительных источников азота и углерода.

*Рис. 1.* Использование отдельных соединений фенола лучистыми грибами.

*Рис. 2.* Протеолитическая активность фильтрата питательной жидкости изученных лучистых грибов в ходе гидролиза гумусовых веществ извлеченных из почвы.

*Рис. 3.* Измерение разложения почвенного гумуса лучистыми грибами фотоколориметрическим путем и на основании разницы в весе.