

Inszezticidok hatása az *Azotobacter* fiziológiai sajátosságaira

S. H. SALEM és GULYÁS FERENC

*Ain Shams Egyetem Mezőgazdasági Karának Bakteriológiai
Tanszéke, Kairo, EAK és MTA Talajtani és Agrokémiai
Kutató Intézet, Budapest*

Napjainkban széles körben alkalmaznak peszticid anyagokat a talajban élő kártevők elleni küzdelemben. Viszonylag kevés információ áll rendelkezésre ezeknek az anyagoknak a talajmikroorganizmusokra gyakorolt hatását illetően.

A peszticidok befolyásolhatják a mikroszervezetek alapvető élettevékenységét és e hatásuk megnyilvánul abban, hogy gátolják, vagy serkentik a mikroszervezetek szaporodását. Az azotobactereknek, mint nitrogénkötő szervezeteknek jelentős szerepük van a talajtermékenység fenntartásában, ezért igen fontos annak a tisztázása, hogy különböző peszticid anyagok miként befolyásolják az említett mikroszervezetek nitrogénfixáló tevékenységét. A szakirodalomban — elsősorban — a különböző herbicidek azotobacterekre gyakorolt hatására vonatkozóan találhatók közlemények. Így MICKOVSKI [11], BABAK [2], TOLUBAEV és TAMIKAEV [15], SCHREVEN és munkatársai [14] szerint az azotobacter nagyon érzékeny a különböző herbicidekkel szemben. A fentiekkel ellentétes eredményeket közölt GOGUADZE [6]. Vizsgálatai szerint a Simazin, Manuron és Diuron aluviális talajokon nem befolyásolták hátrányosan az azotobacter szaporodását. A fenti herbicidek a szerző szerint nem gátolták a nitrogénkötő folyamatokat sem, sőt a Simazin hatására fokozódott az azotobacterek nitrogénkötő képessége. A peszticidoknak az élettani folyamatokra gyakorolt hatásukat illetően többnyire magasabbrendű növényekkel kapcsolatban találhatunk közleményeket. HUMPHREYS és DUGGER [7,8] megállapítása szerint a kukorica gyökereinek glükóz disszimilációja fokozódott a 2,4-D inszezticidokkal történő kezelés hatására. BROUK és munkatársai [3] arról közöltek adatokat, hogy az amitrol és hidrazid herbicidek gátolják a glükóz disszimilációt, de nincsenek hatással a specifikus ciklusra.

Anyag és módszer

Célul tűztük ki annak tanulmányozását, hogy a különböző inszezticidok milyen mértékben befolyásolják az azotobacter glükóz anyagcserejét és nitrogénkötését.

Vizsgálatainkat laboratóriumi körülmények között folytattuk le. A kísérletbevonott mikroszervezetek: *Azotobacter agile* és az *Azotobacter chroocum* 53-as törzs voltak. Mindkét azotobacterfaj magyarországi talajokon gyakran előfordul és talajbiológiai szempontból jelentős.

A kísérlet céljára folyékony kultúrközeget készítettünk (ALLEN [1]). Az alaptápközeget dupla koncentrációban készítettük el, amelyből a glükóz

hiányzott. Az ásványi sókat tartalmazó dupla koncentrációjú közeget 250 ml-es Erlenmeyerekbe adagoltuk 50 ml-es mennyiségben, majd 1 1/2 atmoszféra nyomáson 15 percen át autoklávban sterilizáltuk. A szénforrásként alkalmazott glukózt az alaptápközegtől elkülönítve sterilizáltuk, három egymást követő napon áramló gőzben. A glukóz oldatot steril körülmények között adagoltuk az ásványi tápközeghez olyan mennyiségben, hogy a végső térfogatra számítva (100 ml/ edény) koncentrációja 1,5% legyen.

Az *azotobacter*ek elszaporítását folyékony ALLEN-féle közeget végeztük. 10 napig tartó inkubáció után az *azotobacter* sejteket steril körülmények között centrifugálás útján elkülönítettük a tápoldattól és steril fiziológiás sóoldatban többször átmostuk. A mosott sejtömegeből fiziológiás sóoldattal szuszpenziót készítettünk. A szuszpenziót homogenizáltuk és azonos mennyiséget vittünk be a 250 ml-es tenyészlombikokba.

1. táblázat

**Inszekticidok hatása az *Azotobacter chroococcum* glukózfelvételére.
A visszamaradt glukóz mennyisége mg/100 ml kultúrközeg**

(1) Kezelések	(2) Inkubációs idő napokban					
	0	3	6	9	15	21
Kontroll	1500	1220	1130	1080	1030	1000
Lindan	1500	1370	1300	1210	1050	1020
Dyfonat	1500	1350	1220	1160	1100	820
Basudin	1500	1430	1280	1260	1190	880

A kísérletekben három inszekticid került alkalmazásra, ezek a lindan, Dyfonat és a Basudin, amelyeket a mezőgazdaságban széles körben alkalmaznak. A kísérletbevont inszekticidok kémiai definícióját az alábbiakban ismertetjük: Lindan = γ -hexachlorociklohexan, Dyfonat = O-ethyl-S-fenilethilfoszfonothiolothionat, Basudin = 0,0-diethyl-0-/2-izopropil-6-metil-4-pirimidinil/pi foszforothioat.

Az inszekticidokból 1% Tween-80 hozzáadásával vizes emulzió oldatokat készítettünk s ezekből olyan mennyiségeket vittünk be a tenyészlombikokba, hogy a koncentrációjuk a lindan esetében 10 μ g/ml, míg a Dyfonatot, illetve Basudint tartalmazó kezeléseknél 50 μ g/ml legyen. Az ismétlések száma négy volt. Az inkubáció 28 °C-os termosztátban történt. Elemzések céljára az inkubáció 3, 6, 9, 15, 21 napján vettünk mintákat.

Minden lombikból 16–16 ml tápközegot vettünk ki megfelelő homogenizálás után. Ezeket a mintákat kezelésként egyesítettük, majd két részre különítettük. Az első mintarészből nitrogén meghatározást végeztünk, míg a második mintarészlet a glukóz és a szerves savak meghatározására szolgált. A nitrogén meghatározás céljára a homogenizált sejtsuszpenzióból két-két ml mennyiséget adagoltunk Kjeldahl lombikokba. A nitrogén tartalom meghatározását mikro-Kjeldahl módszerrel végeztük.

A második mintarészből az *azotobacter* sejteket centrifugálással elkülönítettük (3000 fordulat/perc). A folyadékfázis a glukóz meghatározás céljára szolgált, a sejtekből pedig a KREBS – SZENT-GYÖRGYI ciklushoz tartozó szerves savakat határoztuk meg. A glukóz meghatározását KOEHLER [10] által ismertetett módszerrel végeztük, antron reagenssel.

Az azotobacter sejtekből a szerves savak felszabadítását, illetve azok kimutatását az alábbi módszer szerint végeztük. A kultúrközegből elkülönített sejteket hideg, 0,2%-os KCl oldattal centrifugán mostuk. A mosott sejtekhez vele megegyező térfogatú finoman porított alumíniumoxidot adtunk és 12 per-
cig mozsárban őröltük. Az ily módon nyert masszához 4 ml hideg KCl oldatot adagoltunk és nagy fordulatszámmal centrifugáltuk, az alumíniumoxid és a sejt törmelék eltávolítása céljából. Az így nyert folyadékot infralámpa alatt bekoncentráltuk és a papírkromatográfiás vizsgálat céljára használtuk fel. E munka során PARTIDGE [13] által ismertetet módszert követtük. A szerves-savak elkülönítését n-butanol, ecetsav, víz (5 : 1 : 4) oldószer rendszerben végez-
tük.

A foltok előhívására bromkrezolzöld 0,05%-os, alkoholos oldatát használtuk. (DENISON és PHARES [4]).

A tanulmányozott inszekticidek jelentős mértékben befolyásolták az azotobacterek glukóz felvételét. Az 1. táblázatban az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs, a 4. táblázatban pedig az *Azotobacter agile* glukóz felhasználási értékeit ismertetjük. A kontroll mintákban az inkubáció első három napjában volt a legintenzívebb a glukóz felvétel, ezt követő mintavételi időszakokban a glukóz felhasználás fokozatosan csökkent. Az inszekticidekkel kezelt mintákban – az inkubáció első felében – kevesebb glukóz bomlott el, mint a kontroll kezelésben. Az *Azotobacter chroococcum* és az *Azotobacter agile* eltérő módon reagáltak az inszekticidekre. Az *A. chroococcum* glukóz felvétele inszekticidek jelenlétében az inkubáció 15. napjáig elmaradt a kontrollban mért glukóz felhasználási értékektől. Az inkubáció 15. napja után a glukóz felvétel fokozó-

2. táblázat

Inszekticidek hatása az *Azotobacter chroococcum* nitrogénkötésére. Nitrogéntartalom (mg) 100 ml kultúrközegben

(1) Kezelések	(2) Inkubációs idő napokban					
	0	3	6	9	15	21
Kontroll	1,40	5,53	6,26	6,90	7,26	7,72
Lindan	1,40	3,67	3,97	4,90	6,54	7,35
Dyfonat	1,50	4,49	4,67	5,67	7,35	8,98
Basudin	1,60	2,85	4,08	4,49	6,94	7,35

dott és 21 napig tartó inkubáció után a tápoldatban visszamaradt glukóz mennyisége a Lindannál 10,2 mg/ml, a Dyfonatnál 8,2 mg/ml, a Basudinnál pedig 8,8 mg/ml a kontrollban mért 10 mg/ml glukózzal szemben. Az *Azotobacter agile* glukóz felvételét az inkubációs időszak 9. napjáig az inszekticidek gátolták, ezt követően a glukóz felvétel fokozódott. Az inkubáció végén a kultúrközegben visszamaradt glukóz mennyisége: 9,3–4,6–1,8–3,8 mg/ml volt a kontroll, a Lindan, a Dyfonat és a Basudin kezelés sorrendjében. Mindezek arra mutatnak, hogy az alkalmazott inszekticidek serkentően hatottak az *Azotobacter agile* glukóz felvételére és légzésére.

Az inszekticidek nitrogénkötésre gyakorolt hatását a 2. és 4. táblázatban mutatjuk be. Az adatokból kitűnik, hogy az alkalmazott peszticidek az inkubáció első 9 napjában erősen gátolták az *Azotobacter chroococcum* nitrogénköté-

sét (2. táblázat). Az inkubáció 9. napja után az inszekticidokkal kezelt mintákban a nitrogénkötés fokozódott és csaknem elérte, illetve meg is haladta a kontroll kezelésben levő nitrogén mennyiségét. Az *Azotobacter agile* nitrogénkötését az inkubáció első három napjában az inszekticidok nem gátolták. A harmadik és kilencedik nap között azonban visszaesett a nitrogénkötés mértéke a kontrollhoz viszonyítva. Az inkubáció 15. napjától az inszekticidokkal kezelt mintákban jelentősen fokozódott a nitrogénkötés, a gátlóhatás után serkentés mutatkozott. Ebben az időszakban tapasztalt magas nitrogénkötő aktivitás minden bizonnyal kapcsolatban van az *Azotobacter agile* glukóz felvételének nagymértékű növekedésével, amely ugyanezen időszakban lépett fel.

3. táblázat

Krebs—Szent-Györgyi ciklushoz tartozó szerves savak előfordulása az inszekticidokkal kezelt *Azotobacter chroococcum* sejt kivonatában

(1) Kezelések	(2) Az inkubációs idő napokban	(3) Citromsav	(4) Izocitromsav	(5) α -ketoglutarát	(6) Borostyánkősav	(7) Fumársav	(8) Oxyborostyánkősav	(9) Piroszólósav
Kontroll	3	++	—	++++	+	+	+	++
	6	+	+	++++	+	++	+	++
	9	+	+	++++	+	+++	+	+++
	15	—	+	++++	++	++	+	+++
	21	+	+	++++	+	++	++	+++
Lindan	3	+++	+++	+	+	—	+++	+
	6	+++	+++	+	—	+	+	+
	9	++	++	++	++	+	+	++
	15	+	—	+++	++	+	++	++
	21	+	+	+++	++	++	++	+++
Dyfonat	3	++	—	++	++	+	+	++
	6	+	+++	++	—	+	+	++
	9	+++	—	+	++	+	+	++
	15	++	+	+++	++	++	+	+++
	21	+	—	+++	++	+	++	+++
Basudin	3	+++	+++	—	+	+	++	++
	6	+++	+	++	+	—	+	++
	9	++	+++	++	+	+	+	+
	15	+	+	++	++	+	+	+++
	21	+	—	+++	++	++	+	+++

Jelmagyarázat: — = nem kimutatható
 + = alacsony koncentrációban
 ++ = közepes „
 +++ = magas „

A 3. és 6. táblázatban az *azotobacter* sejtekből elkülönített KREBS—SZENT-GYÖRGYI ciklushoz tartozó szerves savak előfordulását és mennyiségi viszonyait ismertetjük.

Az *Azotobacter chroococcum* (3. ábra) inszekticidokkal nem kezelt mintáiból piroszólósav, α -ketoglutarát és fumársav volt legnagyobb mennyiségben elkülöníthető. KOBAYASCHI és munkatársai [9] szerint a piroszólósav és α -ketoglutarát közreműködik a nitrogénkötési folyamatokban, ezekhez kapcsol-

lódhat a légkörből felvett nitrogén, amelynek eredményeképpen a megfelelő aminosavak képződnek. Az inszekticidekkel kezelt mintákból az első 3 mintavétel folyamán piroszőlősav és α -ketoglutársav csak kis mennyiségben volt kimutatható. Viszonylag sok citromsavat és izocitromsavat tartalmazott ez időszakban a sejtextraktum, amelyeknek azonban nincs szerepe a nitrogénkötési folyamatokban. Az inkubáció 15. napja után vett mintákban a piroszőlősav és α -ketoglutársav mennyisége jelentősen megnövekedett. Az *Azotobacter agile* (6. táblázat) sejtextraktum esetében nem volt nagy különbség a szervesavak előfordulása tekintetében a kontroll és az inszekticid kezeléseik között.

4. táblázat

**Inszekticidok hatása az *Azotobacter agile* glukózfelvételére.
A visszamaradt glukóz mennyisége mg/100 ml kultúrközeg**

(1) Kezelések	(2) Inkubációs idő napokban					
	0	3	6	9	15	21
Kontroll	1500	1300	1100	1030	970	930
Lindan	1500	1320	1230	1180	970	460
Difonat	1500	1310	1300	1220	420	180
Basudin	1500	1220	1200	1180	830	380

Piroszőlősav és α -ketoglutársav nagy mennyiségben volt kimutatható minden egyes mintából. Mindezek arra mutatnak, hogy a nitrogénkötés szempontjából fontos szerves savak: piroszőlősav és α -ketoglutársav képződését az alkalmazott inszekticidok nem gátolták. A 7. táblázatban az *Azotobacter chroococcum* és az *Azotobacter agile* glukóz felhasználásának és nitrogénkötésének összevont értékeit ismertetjük. (21 napos inkubáció adatai alapján). Az alapadatokból számítás útján meghatároztuk az 1 g glukóz felhasználásával megkötött nitrogén mennyiségét, majd ez utóbbi értékeket a kontroll százalékában kifejezzük.

5. táblázat

**Inszekticidok hatása az *Azotobacter agile* nitrogénkötésére.
Nitrogéntartalom mg/100 ml kultúrközeg**

(1) Kezelések	(2) Inkubációs idő napokban					
	0	3	6	9	15	21
Kontroll	1,0	3,26	4,08	5,26	6,63	7,76
Lindan	1,1	4,49	4,85	5,08	6,08	8,17
Dyfonat	1,3	3,67	4,49	4,90	6,26	11,03
Basudin	1,3	4,90	4,90	5,31	8,11	8,98

FJODOROV [5] adatai szerint az *Azotobacter chroococcum* 1 g felhasznált szénforrásra 12 – 18 mg nitrogént köt meg. E viszonyszám függ a szénforrás minőségétől, az azotobacter aktivitásától és a környezeti viszonyoktól. A mi kísérleteinkben tanulmányozott *A. chroococcum* és *A. agile* kontroll mintáiban ez a számérték 12,64 illetve 11,86 mg. Inszekticidok alkalmazása esetén ez a viszonyszám változott. Amennyiben a kontrollra számított értékeket 100%-

6. táblázat

Krebs – Szent-Györgyi ciklushoz tartozó szerves savak előfordulása az inszekticidokkal *Azotobacter agile* sejtkivonatában

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
Kezelések	Az inkubációs idő napokban	Citromsav	Izocitromsav	α -ketoglutarát	Borostyánkősav	Fumarsav	Oxyborostyánkősav	Piroszölősav
Kontroll	3	—	—	++	—	—	+	++++
	6	+	—	++++	+	+	+	++++
	9	+	+	++++	+	++	+	++++
	15	—	—	++++	++	++	+	++
	21	—	+	++++	++	++	++	++++
Lindan	3	—	—	++++	+	++	+	++++
	6	—	+	++++	+	++	+	++++
	9	+	—	++++	++	+	—	++++
	15	+	+	++	++	++	—	++++
	21	+	+	++++	—	+	—	++++
Dyfonat	3	+	—	++++	—	++	++	++++
	6	+	—	++++	++	++	+	++++
	9	—	—	++	+	+	+	++++
	15	—	—	++++	+	+	+	++
	21	—	—	++++	++	+	+	++++
Basudin	3	—	—	—	—	+	++	++++
	6	—	+	++	—	++	+	++++
	9	—	—	++	+	++	+	++++
	15	—	—	++++	+	+	—	++++
	21	—	+	++++	++	++	—	++++

Jelmagyarázat: — = nem kimutatható
 + = alacsony koncentrációban
 ++ = közepes
 +++ = magas

nek tekintjük, az *A. chroococcum*-nál a Lindan, Dyfonat és Basudin sorrendjében 98,1 – 87,0 – 73,3 % számsorral jellemezhetjük. Az *A. agile* esetében a viszonyszámok változása a fenti sorrendben: 57,3 – 62,1 – 57,8. Minthogy a környezeti viszonyok azonosak voltak és eltérést csupán alkalmazott inszekticidok jelentették, nyilvánvalónak tűnik az a következtetés, hogy az egységnyi szénforrás felhasználásával megkötött nitrogén mennyiség az inszekticidok hatására csökkent.

Eredmények megvitatása

A folyékony kultúrközegben tenyésztett *A. chroococcum* glukóz felvételét az inkubáció első kilenc napjában alkalmazott herbicidek gátolták. Hasonlóan alakult a légkörből megkötött nitrogén mennyisége is. Az inszekticidokat tartalmazó közegben az első kilenc nap alatt lényegesen kisebb volt a megkötött nitrogén mennyisége, mint a kontroll kezelésben. Lényegében ezekkel hasonló következtetésre jutottak MICKOVSKI [11], BABAK [2], valamint SCHREVEN és munkatársai [14], amikor vizsgálataik alapján rámutattak arra, hogy az *azotobacter* mindig érzékeny volt a különböző herbicidekkel szemben. A kísérleti eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy az inszekticidokkal kezelt *A.*

chroococcum nitrogénkötő aktivitása az inkubáció második szakaszában emelkedett és a 4., 5. mintavétel időpontjában elérte, illetve meghaladta a kontroll minta nitrogénkötő aktivitását.

Az inkubáció utolsó időszakában tapasztalt magas nitrogénkötő aktivitás valószínűleg kapcsolatban van azzal, hogy bizonyos idő után a mikroszerveze-

7. táblázat

Egységnyi glukóz szénforrásra jutó légköri nitrogénkötés változása az inszekticidek hatására

(1) Azotobacter fajok	(2) Kezelések	(3)	(4)	(5)	
		Az elbontott glukóz mennyisége	A légkörből meg- kötött nitrogén mennyisége	Nitrogénkötés a felhasznált glukóz 1 g-jára	
		g/100 ml közeg		mg	kontroll = 100%
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Kontroll	0,50	6,32	12,64	100,0
	Lindan	0,48	5,95	12,40	98,1
	Dyfonat	0,68	7,48	11,00	87,0
	Basudin	0,62	5,75	9,27	73,3
<i>Azotobacter agile</i>	Kontroll	0,57	6,76	11,86	100,0
	Lindan	1,04	7,07	6,80	57,3
	Dyfonat	1,32	9,73	7,37	62,1
	Basudin	1,12	7,68	6,86	57,8

tek alkalmazkodtak az inszekticideket tartalmazó közegekhez és ellenállókká váltak ezekkel szemben. Lehetséges, hogy bizonyos adaptív enzimek segítségével az azotobacterek fokozatosan lebontották az alkalmazott vegyületeket.

A glukóz lebontása során képződő KREBS-SZENT-GYÖRGYI ciklushoz tartozó szerves savak közül az inszekticideket tartalmazó kezelésekben az inkubáció első kilenc napján, piroszőlősav és α -ketoglutársav viszonylag kis mennyiségben volt kimutatható, míg a citromsav, izo-citromsav és almasav koncentrációja magas volt. Közismert és elfogadott megállapítás az, hogy a piroszőlősav és az α -ketoglutársav közreműködnek a légköri nitrogén biológiai megkötésében azon szerepüknel fogva, hogy alkalmasak a légkörből felvett nitrogénnel való kapcsolatra. Az így képződő aminosavakba épül be a megkötött nitrogén. Mindezekből az is következik, hogy amennyiben a nitrogénkötés szempontjából alapvetően fontos szerves savak képződését az alkalmazott inszekticidek akadályozzák, akkor egyben a nitrogénkötés folyamatát is gátolhatják. Amennyiben elegendő mértékben képződött piroszőlősav és α -ketoglutársav, mint pl. az inszekticidekkel kezelt mintákban az inkubáció 9. napjától, úgy ez megmutatkozott a nitrogénkötés fokozódásában.

Az *A. agile* bizonyos mértékig eltérő módon reagált az inszekticidekre. A glukóz felhasználás az inkubáció első három napjában a kontroll mintákban mért értékkel megegyező volt. Ugyanebben az időszakban az inszekticidekkel kezelt minták nitrogénkötése elérte, vagy meghaladta a kontroll mintákban mért nitrogén mennyiségét. Ezt követő időszakban (3-9 nap között) csökkent a glukóz felhasználás és nitrogénkötés a kontroll mintákhoz viszonyítva. Az inkubáció 9. napjától az inszekticideket tartalmazó kezelésekben nagymértékben fokozódott a glukóz felvétel és ezzel megegyezően a nitrogénkötés is emelkedett. Tehát az inkubáció 2. felében az inszekticidek serkentően hatottak

az *A. agile* glukóz felvételére és nitrogénkötésére. Ezek az eredmények egybeesnek GOGUADZE [6] megállapításával, aki úgy találta, hogy a Simazin nevű herbicid hatására többszöröse nővekedhet az azotobacterek nitrogénkötő kapacitása. Hasonló eredményeket közölt MIHAJLOVA [12] is a herbicidek és azotobacterek kölcsönhatását illetően. A 6. táblázat adataiból látható, hogy a nitrogénkötés szempontjából jelentős organikus savak piroszólósav és α -ketoglutársav elegendő mennyiségben képződött az *A. agile* kontroll és inszekticiddel kezelt mintáiban egyaránt. Az inkubáció 3–9 napja között a nitrogénkötés mégis jelentős mértékben visszaesett a kezelések hatására. Annak ellenére, hogy az inkubációs időszak végére az inszekticidekkel kezelt minták nitrogéntartalma tetemesen felülmúlta a kontroll mintákban levő nitrogén mennyiségét, a 7. táblázat adataiból az tűnik ki, hogy a glukóz felhasználással nem növekedett arányosan a légkörből felvett nitrogén mennyisége. Amíg a kontroll mintákban az *A. agile* a felhasznált glukóz 1 g-jára 11,86 mg nitrogént kötött meg, addig az a viszonyszám az inszekticidekkel kezelt mintákban csaknem felére, kétharmadára csökkent. Mindez arra mutat, hogy az inszekticidek hatására az *A. agile* légzési intenzitása fokozódik, az intermedier anyagcsere rovasára. Bár a kromatográfiás vizsgálat a nitrogénkötéshez elegendő mennyiségű piroszólósavat és α -ketoglutársavat mutatott ki az inkubáció minden időszakában, felmerül annak a lehetősége, hogy ezek jelentős része a többi szerves savval együtt az inszekticidek által kiváltott fokozott légzési tevékenység során elhasználódott és a nitrogénkötési folyamatokhoz — végül is — nem állt elegendő mennyiségben rendelkezésre.

Az *A. chroococcum*-nál a glukóz–nitrogén viszonyszám ilyen élesen nem változott az inszekticidek hatására. Kézenfekvő tehát az a megállapítás, hogy az anyagcsere egyensúly kevésbé bomlik fel az *A. chroococcum* esetében, ami azt is jelenti, hogy kevésbé érzékeny az inszekticidekre, mint az *A. agile*.

Összefoglalás

A szerzők tanulmányozták a Lindan, a Dyfonat és a Basudin nevű inszekticidek hatását két azotobacter faj glukóz felvételre, nitrogénkötésére és ezekkel összefüggésben az intermedier anyagcserejére.

Az *Azotobacter chroococcum* glukóz felhasználását és nitrogénkötését a tápoldatba bevitt inszekticidek az inkubáció első kilenc napjában gátolták. Az inkubáció második felében az inszekticiddel kezelt *Azotobacter chroococcum* glukóz felhasználása és nitrogénkötése fokozódott.

A piroszólósav és α -ketoglutársav mennyiségi változása (a sejttextraktumban) megegyezett a nitrogénkötő aktivitás és a glukóz felvétel változásával.

Az *Azotobacter agile* nitrogénkötését és glukóz felhasználását az első három nap alatt az inszekticidek gátolták. Ezt követő időszakban csökkent a folyamatok intenzitása, majd az inkubáció 9. napjától nagymértékű serkentés volt megfigyelhető.

A nitrogénkötés szempontjából fontos szerves savak: α -ketoglutársav, piroszólósav elegendő mennyiségben képződtek az *Azotobacter agile* kontroll és inszekticideket tartalmazó mintáiban egyaránt.

Az *Azotobacter agile* inszekticidekkel kezelt mintáiban a felhasznált glukóz 1 g-jára jutó nitrogénkötés csaknem felére csökkent a kontrollra számított értékre viszonyítva. Mindez arra mutat, hogy az intermedier anyagcsere rová-

sára fokozódott a légzés intenzitása. Az *Azotobacter chroococcum*-nál a glukóz-nitrogén viszonyszám ilyen élesen nem változott, az anyagcsere egyensúly itt kevésbé borult fel. Mindezekből az is következik, hogy az *Azotobacter chroococcum* az inszekticidekre kevésbé volt érzékeny, mint az *Azotobacter agilis*.

Irodalom

- [1] ALLEN, O. N.: Experiments in soil bacteriology. Burgess Publ. Minnesota. 1961.
- [2] BABAK, N. M.: O esuvsztvitel'noszti azotobaktera k nekotörim antibiotikam i gerbicidam. Mikrobiologija, **37**. 338–344. 1968.
- [3] BROUKE, J. B., BUTTS, J. S. & FANG, S. C.: Effect of various herbicides on glucose metabolism in root tissue of garden peas, *Pisum sativum*. I. 2,4-Dichlorophenoxy-acetic acid and its analogs. Plant Physiol. **37**. 233–237. 1962
- [4] DENISON, JR F. V. & PHARES, E. F.: Rapid method for paper chromatography of organic acids. Anal. Chem., **24**. 1628–1629. 1952.
- [5] FJODOROV, M. V.: Vlijanie ot'del'nüh pitatel'nüh elementov na fikszaciju azota atmosferü azotobakterom. Dokl. AN. SSSR. **72**. 157. 1950.
- [6] GOGUADZE, V. D.: Vlijanie gerbicidov na razvitie azotobaktera v nekotörih pocsvah zapadnoj gruzii. Agrohimiija. [3] 99–103. 1968.
- [7] HUMPHREYS, T. E. & DUGGER, JR, W. M.: The effect of 2,4-D on the pathways of glucose catabolism in higher plants. Plant Physiol. **32**. 136–140. 1957.
- [8] HUMPHREYS, T. E. & DUGGER JR, W. M.: Use of specifically labelled glucose and gluconate in the evolution of catabolic pathways for glucose in corn roots. Plant Physiol. **34**. 580–582. 1959.
- [9] KOBAYASHI, M., KATAYAMA, T. & OKUDA, A.: Nitrogen-fixing microorganisms in paddy soils. XV. Nitrogen fixation in a mixed culture of photosynthetic bacteria (5). Association with *Azotobacter agilis*. Soil Sci. Plant Nutr. **11**. 99–103. 1965.
- [10] KOEHLER, L. H.: Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate and colour intensity. Anal. Chem. **24**. 1576–1579. 1952.
- [11] MICKOVSKI, M.: Effects of herbicides Gesaron 2079, Lumeton 2412 and Igran 1866 on the microflora of soil. Ann. Fac. Agric. Univ. Skopje. **20**. 43–54. Yugoslavia 1967.
- [12] MIHAJLOVA, M. F.: Piscsevoj rezsim i mikrobiologiceszskaja aktivnoszt' pocsvü v poszevah groha, obrabotannüh gerbicidami. Himija v sz/h. **6**. 204–206. 1968.
- [13] PARTIDGE, S. M.: Filter paper partition chromatography of sugars. I. General description and application of the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and fotal blood of sheep. Biochem. J., **42**. 238. 1948.
- [14] SCHREVEN, D. A. VAN, LINDENBERGH, O. J. & KORIDON, A.: Effect of several herbicides on bacterial populations and activity and the persistence of the herbicides in soil. Plant and Soil **33**. 513–532. 1970.
- [15] TULABAEV, B. & TAMIKAEV, S.: Effect of herbicides on meadow soil microflora. Uzbek. biol. Zh. (2) 14–17. 1968.

Érkezett: 1971. május 5.

Effect of Insecticides on the Physiological Behaviour of the *Azotobacter* Species

S. H. SALEM and F. GULYÁS

Ain Shams University, Bacteriological Department, Faculty of Agriculture, Cairo (UAR) and Research Institute of Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

Summary

The effect of some insecticides as Lindane, Dyfonate and Basudine on the physiological behaviour of two *Azotobacter* species was studied in liquid culture media. The glucose consumption and N-fixation of *Azotobacter* were determined as well as the presence of organic acids of Krebs–Szent-Györgyi cycle was analysed in the cell free extract.

The effect of the insecticides studied was reflected by changes in the glucose consumption, N-fixation as well as the presence and content of organic acids of the Krebs—Szent-Györgyi cycle in the cell free extract of the *Azotobacter chroococcum*.

It is supposed that the insecticides studied were gradually decomposed by special adaptive enzymes induced by the organism only in the presence of these chemicals. Consequently the activity of the organism became similar to the control by the end of the experiment.

Pyruvic and α -keto-glutaric acids were found in relatively high concentrations when high N-fixation had taken place. The acids were always affected by the insecticides.

The activity of *Azotobacter agilis* was enhanced by the addition of the mentioned insecticides. It indicates that the two species of *Azotobacter* behaved differently in their responses to the action of insecticides.

The investigated insecticides can be applied in the mentioned concentrations in the agricultural practice without any deterring effect on the activity of the non-symbiotic N-fixer *Azotobacter*.

Table 1. Effect of insecticides on the glucose consumption of *Azotobacter chroococcum*. Remaining glucose amount mg/100 ml culture medium. (1) Treatments. (2) Incubation time in days.

Table 2. Effect of insecticides on the N fixation of *Azotobacter chroococcum*. N content mg/100 ml culture medium (1) and (2) see in Table 1.

Table 3. Organic acids of Krebs Szent-Györgyi-cycle in the cell extract of *Azotobacter chroococcum* treated with insecticides. (1) Treatments. (2) Incubation time in days. (3) Citric acid. (4) Isocitric acid. (5) δ -keto-glutaric acid. (6) Succinic acid. (7) Fumaric acid. (8) Malic acid. (9) Pyruvic acid. Signs used: — = Not detectable. + = low concentration. ++ = medium concentration. +++ = high concentration.

Table 4. Effect of insecticides on the glucose consumption of *Azotobacter agilis*. Remaining glucose amount mg/100 ml culture medium. (1) Treatments. (2) Incubation time in days.

Table 5. Effect of insecticides on the N fixation of *Azotobacter agilis*. (1) Treatments. (2) Incubation time in days.

Table 6. Organic acids of Krebs-Szent-Györgyi cycle in the cell extract of *Azotobacter agilis* treated with insecticides. Legends see in Table 3.

Table 7. Variation of N fixation/1 mg glucose carbon source, under the influence of insecticides. (1) *Azotobacter* strains. (2) Treatments. (3) Amount of decomposed glucose g/100 ml culture medium. (4) N fixed from the atmosphere g/100 ml culture medium. (5) Fixed N mg/1g glucose used.

Effet des insecticides sur les propriétés physiologiques de l'*Azotobacter*

S. M. SALEM et F. GULYÁS

Chaire de Bactériologie de la Faculté d'Agronomie, Université Ain Shams, Le Caire, RAU, et Institut de Recherches de Pédologie et de Chimie Agricole de l'Académie des Sciences de Hongrie, Budapest

Résumé

Nous avons examiné l'effet des insecticides Lindane, Dyfonate et Basudine sur l'assimilation de glucose, l'activité fixatrice d'azote et le métabolisme intermédiaire de deux espèces d'*Azotobacter* (*Azotobacter chroococcum*, souche No. 53 et *Azotobacter agilis*).

Les expériences modèles ont été conduites au laboratoire. Au cours des périodes successives pendant l'incubation, on a étudié l'assimilation de glucose et la fixation de l'azote par les *Azotobacters* ainsi que les rapports quantitatifs et qualitatifs des acides organiques appartenant au cycle KREBS—SZENT-GYÖRGYI, devenant libres des cellules d'*Azotobacter*.

Dans la première moitié de l'incubation, les insecticides employés ont inhibé l'assimilation de glucose et la fixation de l'azote par *Azotobacter chroococcum*. Cependant, au cours de la seconde mi-temps et l'assimilation de glucose et la fixation de l'azote par *Azotobacter chroococcum* se sont intensifiées et leurs valeurs ont approché celles mesurées avec les bactéries de contrôle.

Des acides organiques présentes dans les extraits cellulaires, l'acide pyruvique et l'acide α -cétoglutarique n'étaient détectables qu'en petites quantités dans les bactéries

traitées avec les insecticides. Pendant la seconde mi-temps de l'incubation, leur quantité a atteint le haut niveau des organismes de contrôle.

Les changements quantitatifs des acides pyruvique et α -cétoglutarique s'accroissent avec l'augmentation de l'activité fixatrice d'azote.

Pendant les trois premiers jours, les insecticides n'ont pas inhibé la fixation de l'azote et l'assimilation de glucose par l'*Azotobacter agile*. Au cours de la période suivante, et l'assimilation de glucose et la fixation de l'azote ont diminué, enfin, dès le 9^e jour de l'incubation, une stimulation considérable devenait observable.

L'acide α -cétoglutarique et pyruvique qui sont des acides organiques importantes du point de vue de la fixation d'azote, se sont formées en quantités suffisantes et dans les échantillons contrôle de l'*Azotobacter agile* et dans ceux traités avec des insecticides.

A l'effet des insecticides, la mesure de la fixation d'azote afférente à 1 g de glucose assimilée par l'*Azotobacter agile* est diminuée presque de moitié par rapport aux valeurs mesurées avec le contrôle. De là vient que l'intensité de respiration s'est accrue aux dépens du métabolisme intermédiaire.

Avec l'*Azotobacter chroococcum*, ce rapport entre la glucose et l'azote n'a pas changé si nettement, là, l'équilibre du métabolisme était moins rompue. Conséquemment, l'*Azotobacter agile* était plus sensible aux insecticides que l'*Azotobacter chroococcum*.

Tableau 1. Effet des insecticides sur l'assimilation de glucose par *Azotobacter chroococcum*. La quantité résiduelle de glucose, mg/100 ml du milieu nutritif. (1) Traitements. (2) Période d'incubation, jours.

Tableau 2. Effet des insecticides sur la fixation d'azote par *Azotobacter chroococcum*. Teneur en N, mg/100 ml du milieu nutritif. Légendes voir Tabl. 1.

Tableau 3. Présence des acides organiques appartenant au cycle Krebs—Szent-Györgyi dans les extraits cellulaires de l'*Azotobacter chroococcum* traités avec des insecticides. (1) Traitements. (2) Période d'incubation, jours. (3) Acide citrique. (4) Acide isocitrique. (5) Acide α -cétoglutarique. (6) Acide succinique. (7) Acide fumarique. (8) Acide malique. (9) Acide pyruvique. Légendes: — = pas démontrable. + = concentrations faibles. ++ = concentrations moyennes. +++ = concentrations fortes.

Tableau 4. Effet des insecticides sur l'assimilation de glucose par *Azotobacter agile*. La quantité résiduelle de glucose, mg/100 ml du milieu nutritif. (1) Traitements. (2) Période d'incubation, jours.

Tableau 5. Effet des insecticides sur la fixation d'azote par *Azotobacter chroococcum*. (1) Traitements. (2) Période d'incubation, jours.

Tableau 6. Présence des acides organiques appartenant au cycle Krebs—Szent-Györgyi dans les extraits cellulaires de l'*Azotobacter agile* traités avec des insecticides. Légendes voir Tabl. 3.

Tableau 7. Effet des insecticides sur la mesure de la fixation d'azote afférente à 1 g de glucose comme source de charbon. (1) Espèces d'*Azotobacter*. (2) Traitements. (3) Quantité de la glucose décomposée, g/100 ml de milieu nutritif. (4) Quantité de l'azote fixé de l'atmosphère, g/100 ml de milieu nutritif. (5) Quantité de N fixé par 1 g de glucose assimilée.

Влияние инсектицидов на физиологические особенности азотобактера

САЛЕМ С. Х. и Ф. ГУЯШ

Кафедра Микробиологии Сельскохозяйственного Факультета Университета Аин Шамс, Каир, О.А.Р. и Научно-исследовательский институт почвоведения и агрохимии А. Н. Венгрии, Будапешт

Резюме

Авторы изучали влияние инсектицидов Lindan, Dufonat, Vasudin на усвоение глюкозы, фиксирование азота и интермедиаальный обмен веществ двух видов азотобактера

В опыте были использованы 53-й штамм *Azotobacter chroococcum* и *Azotobacter agile*.

Исследования проводились в лабораторных условиях в модельных опытах. В различные периоды инкубации изучали использование глюкозы и величину фиксирования азота клубеньковыми бактериями, а также количественное и качественное соотношение органических кислот, относящихся к циклу Сент-Дьёрди—Кrebs, выделенных из клеток клубеньковых бактерий.

Исследуемые инсектициды в первый период инкубации тормозили усвоение глюкозы и фиксирование азота *Azotobacter chroococcum*. Во второй период инкубации увеличился размер усвоения глюкозы и связывания азота, обе эти величины приближались к контрольной.

Среди органических кислот, находящихся в клеточном экстракте, пировиноградная кислота и α -кетоглutarовая кислота — в образцах обработанных инсектицидами — в первом периоде инкубации обнаруживались в очень незначительных количествах, во второй половине инкубационного периода количество их возрастало и достигло высокого уровня, наблюдаемого у контрольных образцов.

Изменение количества пировиноградной и α -кетоглutarовой кислот совпадает с увеличением активности фиксирования азота.

Инсектициды в первые три дня не тормозят фиксирование азота и усвоение глюкозы *Azotobacter agile* в последующий период усвоение глюкозы и связывание азота снижаются, затем на 9 день инкубации наблюдается значительная стимуляция. В контрольных и обработанных инсектицидами образцах клубеньковых бактерий *Azotobacter agile* образовалось достаточное количество органических кислот — пировиноградной и α -кетоглutarовой — имеющих большое значение с точки зрения фиксации азота.

Количество связанного азота, приходящееся на 1 грамм глюкозы, используемой *Azotobacter agile* под влиянием инсектицидов уменьшается почти на половину по сравнению с контролем. Это все указывает на то, что за счет интермедиального обмена веществ увеличилась интенсивность дыхания.

Относительная величина глюкозы-азота у *Azotobacter chroococcum* в такой значительной степени не изменялась, в этом случае менее нарушалось равновесие в обмене веществ. Из всего вышесказанного можно сделать заключение, что *Azotobacter chroococcum* был менее чувствительными к инсектицидам, чем *Azotobacter agile*.

Табл. 1. Усвоение глюкозы *Azotobacter chroococcum*. Оставшееся количество глюкозы в мг/100 мл питательной среды (1) Варианты. (2) Время инкубации в днях.

Табл. 2. Влияние инсектицидов на фиксирование азота *Azotobacter chroococcum*. Содержание азота в мг/100 мл питательной среды. Обозначение смотри в таблице 1.

Табл. 3. Наличие органических кислот относящихся к циклу Сент-Дьёрди—Кребс в вытяжках из клеток *Azotobacter chroococcum* обработанного инсектицидами. (1) Варианты. (2) Время инкубации в днях. (3) Лимонная кислота. (4) Изолимонная кислота. (5) α -кетоглutarовая кислота. (6) Янтарная кислота. (7) Фумаровая кислота. (8) Оксиянтарная кислота. (9) Пировиноградная кислота. Условные обозначения: — = не проявляется. + = в низких концентрациях. ++ = в средних концентрациях. +++ = в высоких концентрациях.

Табл. 4. Влияние инсектицидов на усвоение глюкозы *Azotobacter agile*. Оставшееся количество глюкозы в мг/100 мл питательной среды. (1) Варианты. (2) Время инкубации в днях.

Табл. 5. Влияние инсектицидов на фиксирование азота *Azotobacter agile*. (1) Варианты. (2) Время инкубации в днях.

Табл. 6. Наличие органических кислот, относящихся к циклу Сент-Дьёрди—Кребс в вытяжках из клеток *Azotobacter agile* обработанного инсектицидами. Обозначения смотри в таблице 3.

Табл. 7. Изменение фиксирования азота, приходящееся на единицу источника глюкозы, под влиянием обработки инсектицидами. (1) Виды азотобактера (2) Варианты, (3) Количество разложенной глюкозы в г/100 мл питательной среды. (4) Количество азота связанного из воздуха, г/100 мл питательной среды. (5) Фиксирование азота на один грамм использованной глюкозы.