

Z Katedry Mikrobiologii Rolnej Wydziału Rolniczego WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr Adam Szember

Adam SZEMBER i Andrzej WYCZÓŁKOWSKI

**Wpływ niektórych związków fosforu i węgla na wiązanie azotu
atmosferycznego przez azotobaktera**

Влияние некоторых соединений фосфора и углерода
на связывание атмосферного азота азотобактером

Influence of some Phosphorus and Carbon Compounds on Binding
of Atmospheric Nitrogen by *Azotobacter*

Jak wiadomo, azotobakter należy do tych mikroorganizmów, które mogą wykorzystywać różne związki jako źródła węgla. Może on rozwijać się na wielu cukrach prostych i złożonych, alkoholach, a nawet na związkach aromatycznych, takich jak benzoosan sodu (5, 11, 12, 26).

Zdolność do korzystania przez azotobaktera z jakiegoś źródła węglowego jest, jak się wydaje, cechą związaną nie tylko z określonym gatunkiem, ale i szczepem. Na przykład badany przez Winogradskiego jeden ze szczepów *Azotobacter agile* nie korzystał z mannitolu i kwasu benzoesowego. Inny natomiast szczep tego samego gatunku, którym zajmował się Fiodorow, całkiem dobrze wykorzystał oba wymienione źródła węgla (19). Wiadomą jest rzeczą, że jedne źródła węgla są wykorzystywane szybciej, inne wolniej przez ten sam szczep azotobaktera (19). Może być i tak, że różne źródła węgla są wykorzystywane przez azotobaktera równocześnie w jednakowym stopniu (9).

Oprócz obecności w podłożu hodowlanym odpowiednich dla azotobaktera źródeł węgla, konieczna jest także obecność i innych związków. Na przykład wydzieliny korzeniowe niektórych roślin, zawierające różne związki organiczne, mogą być w pewnych okolicznościach czynnikiem stymulującym wzrost azotobaktera (4, 8, 14, 15, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 29, 30). Doniesiono także o stymulującym wpływie substancji humusowych na wiązanie azotu atmosferycznego przez ten mikroorganizm (6).

Z doniesień niektórych autorów wynika, że dodatek do podłoża hodowlanych niektórych minerałów, jak np. montmorillonitu (17) lub żelu krzemionkowego (27), może mieć wpływ na rozwój azotobaktera. Minerale te wpływały w jakiś sposób albo na zwiększenie intensywności wiązania azotu atmosferycznego, albo przyczyniały się do lepszego wykorzystania fosforu z różnych źródeł przez azotobaktera.

Znaną jest rzeczą, że poza takimi pierwiastkami jak bor, molibden, mangan, żelazo i inne (1, 2, 5, 7, 10, 16, 19, 25), istotną rolę w rozwoju azotobaktera, a więc i w procesie wiązania wolnego azotu przez ten organizm, odgrywa fosfor. Przy braku wystarczającej ilości tego pierwiastka w podłożu, działalność azotobaktera jest upośledzona lub ulega zahamowaniu. Wprawdzie nie wydaje się, aby fosfor uczestniczył bezpośrednio w wiązaniu azotu atmosferycznego przez azotobaktera (5), należy jednak przypuszczać, że intensywność tego procesu jest ściśle związana z ilością dostępnego fosforu. Przeprowadzone w tym kierunku liczne próby sugerowałyby, że aktywność azotobaktera w wiązaniu wolnego azotu była wyższa przy zwiększonych dawkach fosforu w porównaniu z niższymi dawkami tego pierwiastka w podłożu hodowlanym (5, 11, 28).

Ziemięcka (28) badając wpływ niektórych mineralnych związków fosforu na intensywność wiązania wolnego azotu przez szczep *Azotobacter chroococcum* znalazła w tym względzie istotne różnice. Podobnie Duma-Bobryk (3), analizując wpływ niektórych źródeł fosforu w płynnej pożywce na wiązanie azotu atmosferycznego, znalazła również wyraźne różnice.

Celem niniejszej pracy było zbadanie, w jakim stopniu niektóre związki fosforu oraz węgla wpływają na intensywność wiązania azotu atmosferycznego przez szczepy 3 gatunków azotobaktera.

MATERIAŁ I METODY

W doświadczeniach użyto następujących szczepów: *Azotobacter macrocytogenes*, *Azotobacter vinelandii* i *Azotobacter chroococcum*. Szczepy te pochodziły z kolekcji laboratorium mikrobiologicznego w Delft (Holandia).

Doświadczenia przeprowadzono na pożywkach stałych, agarowych (po 20 ml na płytkach Petriego), o składzie podanym przez Jensena (12). W miarę potrzeby modyfikowano je, wprowadzając do nich różne związki fosforu lub węgla, jako jedyne źródła tych pierwiastków w pożywce. W przypadku stosowania różnych źródeł fosforu, źródłem węgla była zawsze glikoza w ilości 2%. Gdy zmieniano źródła węgla, fosfor dodawano zawsze w postaci K_2HPO_4 w ilości 0,05%.

Źródłami fosforu w pożywkach doświadczalnych były: K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , $Ca_3(PO_4)_2$, $FePO_4$, gliceryno-fosforan sodu, gliceryno-fosforan wapnia, fityna, nukleinian sodu i lecytyna. Wymienionych związków fosforowych dodawano do pożywek w przeliczeniu na 0,05% K_2HPO_4 .

Jako źródło węgla użyto w ilości 2%: glikozy, fruktozy, galaktozy, sorbozy, ramnozy, sacharozy, maltozy, laktozy, rafinozy, ksylozy, skrobi, etanolu, sprawdzając uprzednio, czy szczepy azotobaktera są zdolne do korzystania z wymienionych związków jako jedyne źródła węgla w pożywce.

Uzyskane w ten sposób pożywki, w których zmiennymi były źródła węgla i fosforu nazwano doświadczalnymi. Zarówno pożywki podstawowe, jak i doświadczalne sterylizowano w autoklawie w temp. 110°C przez 10 min.

Szczepy azotobaktera namnażano na skosach pożywki podstawowej (12). Po 5 dniach hodowli w temp. 28°C splukiwano wzrost bakterii przy pomocy 2,5 ml sterylnego płynu fizjologicznego. Przy pomocy komory Thoma obliczano liczbę komórek azotobaktera w 1 ml zawiesiny, co pozwoliło wnieść na powierzchnię pożywek doświadczalnych jednakowe inoculum bakterii. Zawiesinę azotobaktera rozprowadzano równomiernie na powierzchni pożywki przy pomocy specjalnej ba-gietki szklanej.

Hodowlę szczepów azotobaktera na pożywkach doświadczalnych prowadzono przez 10 dni w stałej temp. 28°C w 3 równoległych powtórzeniach dla każdego szczepu.

Po skończonej hodowli określano azot w całej pożywce (wraz ze wzrostem bakteryjnym) metodą Kjeldahla. Stosowano 6-krotne powtórzenie dla każdego szczepu. Stopnia wykorzystania cukru w pożywce nie oznaczano.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Wyniki prób, mających na celu wyjaśnienie wpływu niektórych mineralnych i organicznych związków fosforu w pożywce na wiązanie azotu atmosferycznego przez azotobaktera, wskazują, że przy użyciu odmiennych związków mineralnych fosforu, przebiegało ono z różną intensywnością (tab. 1). Najefektywniejszy okazał się szczep *Azotobacter chroococcum* przy obecności w pożywce fosforanu dwusodowego. Mniej azotu związał szczep *Azotobacter vinelandii* w obecności fosforanu dwupotasowego. Fosforan trójwapniowy był najmniej odpowiedni dla tych dwóch szczepów azotobaktera. Natomiast *Azotobacter macrocytogenes* w warunkach przeprowadzonych doświadczeń wiązał stosunkowo dużo wolnego azotu właśnie przy dodaniu do pożywki fosforanu trójwapniowego. Jednakże największe ilości związane azotu przez ten organizm znaleziono w pożywce z fosforanem żelaza. Wynik ten potwierdza ją wcześniejsze obserwacje niektórych autorów (3).

Z organicznych źródeł fosforu w pożywce najlepszy okazał się gliceryno-fosforan wapnia dla szczepów *Azotobacter vinelandii* i *Azotobacter chroococcum*. Fityna była natomiast nieco lepszym źródłem fosforu od gliceryno-fosforanu sodu i gliceryno-fosforanu wapnia w pożywce dla szczepu *Azotobacter macrocytogenes*. Użycie w pożywkach dla azotobaktera nukleinianu sodu lub lecytyny, z uwagi na obecność azotu w tych związkach, mija się z celem.

Uzyskane w naszych doświadczeniach wyniki sugerowałyby, że stosowany powszechnie w pożywkach dla azotobaktera fosforan dwupota-

Tab. 1. Wpływ niektórych źródeł fosforu w podłożu agarowym na wiązanie azotu atmosferycznego przez azotobaktera (związany N w mg na 1 g dodanego cukru)

Influence of some sources of phosphorus in agar medium on the binding of atmospheric nitrogen by *Azotobacter* (bound N in mg per 1 g of sugar added)

<i>Azotobacter</i>	Źródła fosforu								
	K ₂ HPO ₄	Na ₂ HPO ₄	Ca ₃ (PO ₄) ₂	FePO ₄	gliceryno- fosforan sodu	gliceryno- fosforan wapnia	fityna	nukleinian sodu	lecytyna
<i>macrocytogenes</i>	13,0	11,6	11,0	15,4	10,4	10,3	10,8	0,9	4,5
<i>vinelandii</i>	14,3	13,3	6,8	12,3	13,3	14,0	9,0	0,8	nie badano
<i>chroococcum</i>	14,8	15,6	9,1	12,8	10,8	12,9	11,2	0,6	4,5

Tab. 2. Wpływ niektórych źródeł węgla w podłożu agarowym na wiązanie azotu atmosferycznego przez azotobaktera (związany N w mg na 1 g dodanego związku energetycznego)

Influence of some sources of carbon in agar medium on the binding of atmospheric nitrogen by *Azotobacter* (bound N in mg per 1 g of energizing compound)

<i>Azotobacter</i>	Źródła węgla											
	ksyloza	glikoza	sor- boza	galak- toza	frukto- za	ram- noza	maltoza	laktoza	sacha- roza	rafinoza	skrobia	etanol
<i>macrocytogenes</i>	3,27	8,90	3,40	10,62	12,40	6,77	23,60	2,60	5,85	14,85	7,55	4,67
<i>vinelandii</i>	3,05	16,10	12,72	12,37	14,05	14,90	16,10	1,20	12,47	13,52	9,60	7,92
<i>chroococcum</i>	3,40	14,50	4,05	14,82	14,82	6,80	14,10	2,80	14,47	15,30	10,70	1,40

sowy jest gorszym źródłem fosforu dla szczepu *Azotobacter chroococcum* niż fosforan dwusodowy. Należałoby to jednak jeszcze sprawdzić na większej liczbie szczepów, aby przekonać się, czy jest to cecha gatunkowa, czy też szczepowa.

W przypadku hodowli *Azotobacter macrocytogenes*, spośród wszystkich użytych w doświadczeniach związków fosforu, najlepszy okazał się fosforan żelazowy. Wykorzystanie przez szczep *Azotobacter macrocytogenes* tego na ogół trudno dostępnego dla mikroorganizmów związku fosforu wiąże się, być może, ze zdolnością do wytwarzania kwasów organicznych przez ten drobnoustrój. W tych też warunkach może także jon żelaza jest dostępniejszy dla tego organizmu, co z pewnością nie pozostaje bez znaczenia przy wiązaniu azotu atmosferycznego. Wytwarzanie przez szczep *Azotobacter macrocytogenes* małych ilości kwasów organicznych pomaga, być może, tej bakterii również w lepszym wykorzystaniu $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ w porównaniu z dwoma pozostałymi gatunkami azotobaktera użytymi w doświadczeniach.

Wyniki prób, w których obserwowano wpływ różnych związków energetycznych w pożywce na wiązanie azotu przez badany szczep azotobaktera wskazuje, że najodpowiedniejszym źródłem energii dla szczepu *Azotobacter macrocytogenes* była maltoza (tab. 2). Jest to zgodne z wcześniejszymi spostrzeżeniami Karwackiej (13). Dla szczepu *Azotobacter vinelandii* najlepszym źródłem węgla okazała się również maltoza oraz glikoza. Natomiast *Azotobacter chroococcum* najlepszy efekt w wiązaniu wolnego azotu osiągał przy obecności w pożywce rafinozy jako jedynego źródła energii.

WNIOSKI OGÓLNE

1. Spośród użytych w doświadczeniach nieorganicznych związków fosforu fosforan żelazowy powodował najsilniejsze wiązanie azotu atmosferycznego przez *Azotobacter macrocytogenes*. Najlepszym źródłem P dla *Azotobacter vinelandii* był natomiast K_2HPO_4 , a dla *Azotobacter chroococcum* — Na_2HPO_4 . Fosforan trójwapniowy okazał się najgorszym źródłem fosforu mineralnego w pożywce dla wszystkich trzech badanych szczepów azotobaktera.

2. Z organicznych związków fosforu fityna wywoływała najsilniejsze wiązanie azotu atmosferycznego przez szczep *Azotobacter macrocytogenes*. Natomiast szczepy *Azotobacter vinelandii* i *Azotobacter chroococcum* najsilniej wiązały azot z powietrza w obecności gliceryno-fosforanu wapnia w pożywce. Nukleinian sodu lub lecytyna powodowały najniższe wiązanie wolnego azotu przez badane szczepy azotobaktera.

3. Najlepszymi źródłami węgla w pożywce była: maltoza — dla *Azotobacter macrocytogenes*, maltoza i glikoza — dla *Azotobacter vinelandii* i rafinoza dla *Azotobacter chroococcum*.

4. W warunkach przeprowadzonych doświadczeń użyte źródła węgla i fosforu różnicowały ilość związanego wolnego azotu przez badane szczepy azotobaktera.

PIŚMIENICTWO

1. Abutajew R. A.: Wlijanie niekórych mikroelementów na rozwitje azotobaktiera w siero-buroj poczwie Apszerona. Ucz. Zap. Azierb. Uniw. Sierija Biologiczeskaja, nr 1, 63, 1966.
2. Burk D., and Horner C. K.: Molybdenum and Calcium in Azotobacter Nutrition, Proc. III, Intern. Congress Microbiol., 1940.
3. Duma-Bobyk M.: Wpływ różnych nieorganicznych związków fosforu w pożywce na wiązanie azotu atmosferycznego przez azotobaktera. Praca magisterska (maszynopis), Katedra Mikrobiologii Rolnej WSR w Lublinie, 1963.
4. Fiodorow M. W.: Wlijanie korniewych wydzieleń kukuruzy na fiksacyję azota atmosfery *Azobacter chroococcum* w usłowjach monobaktierialnej kultury. Mikrobiologija, 13, 199, 1944.
5. Fiodorow M. W.: Biologiczeskaja fiksacyja azota atmosfery. Sielchozgiz, Moskwa 1952.
6. Gaur A. C., and Mathur R. S.: Stimulation Influence of Humic Substances on Nitrogen Fixation by Azotobacter. Sci. and Cult., 32, 319, 1966.
7. Gerretsen F. C.: Boron an Essential Micro-element for *Azotobacter chroococcum*. Plant and Soil, 5, 349, 1954.
8. Greaves I. E., Jones L., Anderson Alice: The Influence of Amino acid and Proteins on Nitrogen Fixation by *Azotobacter chroococcum*. Soil Sci., 1, 9, 1940.
9. Harris J. O.: A Study of Adaptation in Azotobacter. Soil Sci. Soc. Am. Proc. Division III — Soil Microbiology, 18, 154, 1954.
10. Horner C. K., Burk D., Allison F. E., and Sherman M. S.: Nitrogen Fixation by Azotobacter as Influenced by Molybdenum and Vanadium. J. Agr. Res., 65, 173, 1942.
11. Jensen H. L.: The Azotobacteriaceae. Bact. Rev., 18, 195, 1954.
12. Jensen H. L.: *Azotobacter macrocytogenes* n. sp., a Nitrogenfixing Bacterium Resistant to Acid Reaction. Acta Agricult. Scand., 5, 280, 1955.
13. Karwacka H.: Wpływ różnych źródeł węgla w pożywce na wiązanie azotu atmosferycznego przez azotobaktera. Praca magisterska (maszynopis), Katedra Mikrobiologii Rolnej WSR w Lublinie, 1964.
14. Katznelson H., Rouatt J. W., and Payne T. M. B.: Recent Studies on the Microflora of the Rhizosphere. VI Congres de la Science du Sol, Paris, III, 25, 151, 1956.
15. Katznelson H., Strzelczyk E.: Studies on the Interaction of Plants and Free-living Nitrogen-fixing Microorganisms. I. Occurrence of Azotobacter in the Rhizosphere of Crop Plants. Can. J. Microbiol., 7, 437, 1961.
16. Krzemieniewski S., und Kovats J.: Über den Einfluss von Eisen und Molybdän auf die Stickstoffbindung durch *Azotobacter chroococcum*. Bull. Acad. Pol., 1936.

17. Macura J., and Pavel L.: The Influence of Montmorillonite on Nitrogen Fixation by *Azotobacter*. *Folia Microbiol.*, 4, 83, 1959.
18. Mieszkow N. M., Chodakowa R. N.: Wlijanije korniewych wydzielienij gorocha i kukuruzy niekórych poczwiennych mikrobów w usłowijach wyraszcziwanija ich w rizośniernom rastworie rastienij. *Mikroibologija*, 23, 544, 1954.
19. Rubieńczyk L. I.: Fizjologija azotobaktiera. *Mikrobiologija*, 27, 503, 1958.
20. Sadowska R. D.: Wlijanije korniewoj sistiemy winograda na rozwitije azotobaktiera. *Mikrobiologija*, 28, 534, 1959.
21. Strzelczyk E.: Wpływ różnych roślin uprawnych na liczebność azotobaktiera i *Clostridium* w ich rizośniernie. *Acta Microbiol. Pol.*, 7, 115, 1958.
22. Strzelczyk E.: Influence of Root Extracts and Root Exudates on Respiratory Activity of *Azotobacter*. *Acta Microbiol. Pol.*, 15, 153, 1966.
23. Szełoumowa A. M., Sztucjer J. M.: Azotobaktier i korniewaja sistiema rastienij. *Sowietskaja Agronomija*, 5, 1947.
24. Vančura V., Macura J.: The Development of *Azotobacter* in the Oat Rhizosphere and Its Effect on the Yeld. *Folia Microbiol.* 4, 200, 1958.
25. Virtanen A. I.: Microbial Metabolism. Symp. VI-th Intern. Congress Microbiol., 92, 1954.
26. Zajcewa G. N., Biełozierskij A. N.: Chimija azotobaktiera. VI. Izučenie uglewodnogo sostawa *Azotobacter agile* 20-D w zawisimosti ot wozrasta kultury. *Mikrobiologija*, 28, 416, 1958.
27. Ziemięcka J.: O wpływie gelu krzemionkowego na pobieranie fosforu przez azotobaktera. *RNRiL*, 22, 1, 1929.
28. Ziemięcka J.: Znaczenie fosforu przy asymilacji wolnego azotu. *Studia nad mikrobiologią gleby. Część II. RNRiL*, 21, 231, 1929.
29. Ziemięcka J., Maliszewska W.: L'occurrence des azotobacters dans rhizosphère des différentes plantes et leurs relations mutuelles. VI Congrès Intern. de la Sci. du Sol, Paris 1959.
30. Zinowjewa Ch. G.: Wlijanije korniewych wydzielienij i korniewych wytiażek niekórych sielskochozajstwiennych rastienij na azotobaktiera. *Mikrobiologija*, 27, 75, 1958.

РЕЗЮМЕ

Целью работы было установление влияния некоторых минеральных и органических соединений фосфора и углерода на интенсивность связывания свободного азота азотобактером. Применялись штаммы: *Azotobacter macrocytogenes*, *Azotobacter vinelandii* и *Azotobacter chroococcum*.

В результате исследований установлено, что из всех примененных в эксперименте фосфорных соединений, FePO_4 сильнее всего влиял на связывание азота *Azotobacter macrocytogenes*. Из минеральных соединений фосфора для *Azotobacter vinelandii* самым лучшим оказался K_2HPO_4 , а для *Azotobacter chroococcum* — Na_2HPO_4 .

Из органических соединений фосфора фитин сильнее всего стимулирует связывание атмосферного азота *A. macrocytogenes*. Для

A. vinelandii и *A. chroococcum* самым лучшим оказался глицерофосфорнокислый кальций.

Из примененных в эксперименте источников углерода мальтоза влияла на связывание свободного азота *A. macrocytogenes* сильнее всего. Так же и для *A. vinelandii* мальтоза и глюкоза были наилучшими источниками энергии. В условиях проводимого эксперимента *A. chroococcum* связал самое большое количество свободного азота, при этом в питательной среде в качестве единственного источника энергии присутствовала рафиноза.

SUMMARY

The objective of the present work was to determine the influence exercised by some mineral and organic compounds of phosphorus and carbon on the intensity of binding free nitrogen by *Azotobacter*. The following strains were used: *Azotobacter macrocytogenes*, *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter chroococcum*.

It was found out that out of all phosphorus compounds used for the experiment, FePO_4 had the strongest action on the binding of atmospheric nitrogen by *Azotobacter macrocytogenes*. Of the mineral phosphorus compounds, K_2HPO_4 proved the best in this respect for *Azotobacter vinelandii*, and Na_2HPO_4 — for *Azotobacter chroococcum*.

Of the organic phosphorus compounds, phytin had the most stimulating influence on the binding of atmospheric nitrogen by *A. macrocytogenes*. For *A. vinelandii* and *A. chroococcum*, calcium glycerophosphate proved the best.

Of the sources of carbon used in this experiment, maltose influenced the binding of free nitrogen by *A. macrocytogenes* most strongly. Maltose, as well as glycose, were the best source of energy for *A. vinelandii*. Under the conditions of the present experiment, *A. chroococcum* bound the greatest amount of free nitrogen in the presence of raffinose as the only source of energy.