

Adatok a sztreptomiceszek festékképzéséhez szintetikus táptalajon egy antibiotikus *Streptomyces* fajjal végzett kísérletek alapján

HORVÁTH JÁNOS és OROSLÁN ISTVÁN

A Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Intézete, Tihany

Bevezetés

Az antibiotikus sztreptomiceszek törzskutatásánál állandó nehézséget jelent számunkra az izolált fajok meghatározása. Egyes fajok morfológiai és fiziológiai megjelenése annyira változékonynak mutatkozik a tenyésztés folyamán, hogy az ismert határozókönyvek (1, 13) nem tudnak kielégítő módon segítségünkre lenni. Bár a legutóbbi idők leghatékonyabb antibiotikumait *Streptomyces* fajok anyagcsere-termékeiből izolálták, mégis az a helyzet, hogy éppen ezeknél a fajoknál legzavarosabbak a meghatározás alapelvei (9). Könnyen útvesztőbe kerül a kutató a határozókönyvek alapján megadott egyes jellegek feltárásánál. Nehézséget főleg az okoz, hogy az egyes fajokat — amint már említettük — nem egységes alapelvek szerint jellemzik. Ha például Bergey az egyik fajnál megállapítja a cellulóz jelenlétét, másíknál annak hiányát (1), akkor joggal elvárhatnók, hogy a többi fajnál is említést tegyen erről pozitív vagy negatív irányban. De ez nincs így. Azonban sokkal egyszerűbb hibák is fellelhetők. Kraszilnyikov ezt írja pl. az *Actinomyces erythrochromogenes*-ről: »Tenyészteti szintetikus táptalajon vörösek vagy rózsaszínűek, pigment választódik ki a sejtől és megfesti a táptalajt vörös-barna színben« (13). Az egyik alább ismertetendő *Streptomyces* fajunkal végzett egyéb irányú kísérleteink közben láthattuk azonban, hogy annak tenyészteti szintetikus táptalajokon más és más színű festékanyagokat termeltek. Keresve a változatos színek képzés okát, vizsgálatainkkal főleg azt a kérdést kívántuk eldönteni, hogy vajjon elégséges-e egyszerűen csak »szintetikus táptalaj« kifejezést használni a *Streptomyces* fajok egyik legjellegzetesebb tulajdonságának, a festékképzésnek leírásakor, avagy nincs-e szükség éppen a könnyebb és pontosabb fajmeghatározás érdekében a tenyész körülmények pontosabb megadására, így elsősorban magának a szintetikus táptalaj kémiai összetételének pontos ismeretére? Bár a kérdéses mikroszervezetek festékképzését számosan vizsgálták, de erre a fontos kérdésre nem tértek ki. A sztreptomiceszek festékképzését illetően nagyszámú megfigyelési adat gyűlt össze napjainkig. Számos kutató a legkülönbözőbb szempontból vizsgálta a kérdéses mikroszervezetek ezen tulajdonságát. Többek között elsősorban a sztreptomices festékek mibenlétét és azok antibiotikus hatása közötti összefüggéseket vizsgálták (2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 15, 18, 19, 20, 25, 27) és emellett nagy súlyt fektettek a festékképzés vizsgálatára a sztreptomiceszek rendszerezése szempontjából is. Számosan megfigyelték az egyes fajok festékképzésének nagyfokú variációját (8, 12, 14, 16, 22, 23, 24, 26, 29) és pl. Lieske (16), aki szerves anyagokban gazdag és változó táptalajokon figyelte meg a festékképzést, arra a következtetésre jutott, hogy nem is lehet az aktinomiceteket rendszerezni nagyfokú variációjuk — és nem utolsósorban éppen a festékképzés variabilis volta miatt. Később mások szintetikus táptalajon vizsgálva a festék-

képzést, azt mint határozó jelleget igen fontosnak vélték. Jensen (10) mellett főleg Waksman és munkatársai (28) mutattak erre rá, és ma már általánosan alkalmazzák. Azonban a szintetikus táptalajokon belüli festékképzés különbözőségével egy azon fajon belül — a fentebb feltett kérdésünk értelmében — foglalkozó irodalmi adatot nem találva, szükségnek tartottuk az alábbi vizsgálatokat elvégezni.

Vizsgálati anyag

A *Streptomyces* fajt, amellyel a fenti kérdés megoldására irányuló kísérleteinket végeztük, a Tihanyi félsziget nyugati fennsíkján levő tölgyerdő talajából izoláltuk. Ezen faj T₃ jelzéssel szerepel antibiotikus törzseink között. Az alábbi meghatározó bélyegek alapján megkíséreltük Bergey (1), valamint Kraszilnikov (13) határozókönyv segítségével determinálni, de csak annyit sikerült megállapítani, hogy közel áll a *Streptomyces (Actinomyces) globosus* Kraszilnikov-hoz. Leírása röviden a következő:

Vékony, elágazó hifák. Levegő micéliumok fehérek, vagy szürkék. Egyenes spórahordozók, gömbölyő spórák.

Szűrt zselatint lassan cseppfolyósítják s közben barna pigmentet képeznek.

Szintetikus agar: [K₂HPO₄ 0, 1% ; MgSO₄ 0,05% ; NaCl 0,05% ; FeSO₄ 0,001% ; CaCl₂ 0,03% ; (NH₄)₂HPO₄ 0,1% ; glukóz 0,5% ; agar-agar 2%].

pH 6 : igen minimális növekedés apró szürke telepek képében, az egyes telepek kissé kiemelkednek ráncos felülettel.

pH 6, 5 : a ferde agar felületét igen vékonyan lelik el a telepek és rövidesen szürkés-fehér spórát képeznek.

pH 7 : a kezdeti növekedés valamivel jobb, de a spórásodás itt is bekövetkezik.

pH 7,5 : a táptalajon apró, önálló telepeket képeznek, gyenge növekedés után éppen úgy spóráznak, mint az előbbi feltételek mellett.

Ammóniumfoszfát helyett ammóniumnitrátot adva, a növekedés valamivel jobb.

Keményítő-agar : (tápsók mint fent, nitrogénforrás : ammóniumnitrát) igen kis gyér telepek, az agart nem színezi, fehér levegő micéliumot képez.

Glicerín-ammóniumnitrát-agar : a ferde agar felületét vékonyan bevonja, spórát nem képez, az agart nem festi, telepe kissé ráncos, kiemelkedő felületű, színe szürke.

Burgonya blokk : a felületet sötét-barnára színezi és szürkés-fehér spórát képez, elég jól tenyészik.

Bouillon-glukóz folyékony táptalaj : igen vékony rétegben, fenéken ülepedve, lassú növekedéssel tenyészik, felületi hárttyát nem képez, a bouillon egyáltalán nem zavarosodik meg, nem színeződik.

Lakmusz-tej : a tej savanyú marad a tenyészedő végéig, megalvad, barna árnyalatú felületi telep képződik, a savós részben ibolyaszínű festékképzés.

Nitrátot erősen redukálja nitritté.

Szintetikus táptalajon a táptalaj összetételétől függően vízben jól oldódó zöld, barnás-sárga és vörös-barna színanyagokat képez folyékony kultúrában.

Aerob.

Optimális hőmérséklete 30 C°.

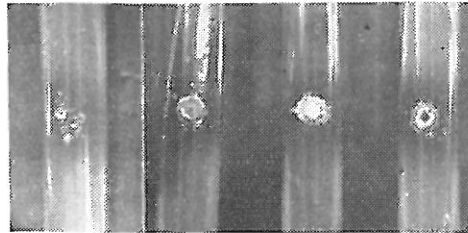
Antibiotikus tulajdonságai : Gram-pozitívra erős hatású antibiotikumot termel. (*B. subtilis*-re és *Staphylococcus aureus*-ra erős in vitro.) Képes szintetikus táptalajon egyszerű szervesetlen nitrogén-forrás és mono- vagy

diszaharid, mint szénforrás jelenlétében, illetve felhasználásával antibiotikumot szintetizálni. Legnagyobb az antibiotikum termelés süllyesztett kultúrában erős levegőztetés esetén. Felületi tenyészetben csak igen minimális mennyiségben, vagy egyáltalán nem termel antibiotikumot. Állati fehérjészarmazékok jelenlétében lényegesen nő az antibiotikum-képzés. Az aktív anyag szobahőn savanyú közegben még pH 1-nél is stabil, de pH 7 felett rohamosan bomlik. Jól oldódik vízben, több organikus oldószerben. Éterben nem oldódik.

Különös jellegzetessége a fajnak nagyfokú variabilitása. Spóráképzésüket a befogott faj egyes vonalai elveszítették, antibiotikum termelésének mennyisége szintén erősen variált, A variáció megmutatkozik morfológiai jellegekben is. A mellékelt felvétel (1. ábra) jól bizonyítja a morfológiai variációt.

Ammóniumnitrátos folyékony szintetikus táptalajon 8 napos tenyésztés után a felületen a képen látható a és b) jelzésű telepforma jött létre, melyeket egyazon tenyészlombikból izoláltunk és rávittünk húskivonat-glukóz-agarra. Az a) jelzésű variáns viszonylag kis méretű, kerek szegélyű levegő micéliumos telep, pereme fehér, egyébként lila színű. A b) jelzésű variáns telepének közepe kiemelkedő és körkörös elhatárolt a külső szegélytől, mely lapos. Színe ránézetben szürke, átnézetben lila. A fentivel egyidős, de nátriumnitrátos folyékony szintetikus táptalajon tenyésztett és ugyancsak azonos tenyészlombikból húskivonat-glukóz-agarra leoltott c) és d) jelzésű telep egymástól szintén élesen elüt. A c) jelzésű variáns telepének közepe fehér, széle barna. A d) jelzésű telep az előbbivel szemben közepén lila, a szomszédos gyűrű fehér és a széle barna. Mindegyik telepet külön-külön továbboltva, megállapítást nyert, hogy az a), c), d) jelzésű telepek ismét egyneműekké váltak, míg a b) jelzésű variáns az előbbiektől a további tenyésztés során is élesen elütött.

Lelőhely : kissé savanyú tölgyerdő-talaj.



a b c d

1. ábra

A makrotelepek morfológiai variációja

Módszertani kérdések

A festékképzést a következő szintetikus táptalajokon vizsgáltuk, felületi és rázatott kultúrákban :

1. K_2HPO_4 0,1% ; $MgSO_4$ 0,05% ; NaCl 0,05% ; $FeSO_4$ 0,001% ; $CaCl_2$ 0,03% ; $(NH_4)_2HPO_4$ 0,1% ; glukóz 0,5% (a továbbiakban a táptalaj jelzése : I.)
2. Ugyanaz, mint I., csupán a szervesetlen nitrogénforrás ammónium-foszfát helyett NH_4NO_3 0,1%-os mennyiségben. (A továbbiakban jelzése : II.)
3. Ugyanaz, mint az előző táptalajok, de a szervesetlen nitrogénforrás itt 0,1% $NaNO_3$ (Jelzése a továbbiakban : III.)

A fenti tápoldatok elkészítése és pH-jának a megfelelő értékre történő durva beállítása (universal-indikátor-papírral ellenőrizve) után 200—200 ml tápoldatot adagoltunk 1 literes, ú. n. ferde tenyészlombikokba. Ezeket 1,5 atmoszféra nyomáson 20 percig sterilizáltuk. Kihűlés után az egyes, illetve párhuzamos kísérletekre elkészített tápoldatok pH-ját pontosan mértük elektrometrikusan. A beoltásokat ferde agaron steril csapvízzel készített spóra-micélium szuszpenzió 1—1 ml-ével

végeztük. Mind a felületi, mind a rázatott kultúrákat 8 napig tenyésztettük 28—30 C°-on. A tenyészidő végén a pH-t ugyancsak elektrometrikusan mértük.

A képződött festékanyagokat papírkromatográfiás eljárással, Ruttelmelez módszerrel (21) víz-ecetsav-butanol háromkomponensű oldószerkeleggyel választottuk szét. Utóbbi vizsgálatokhoz Schleicher és Schüll-féle 589¹ sz. 11 cm átmérőjű szűrőpapírt használtunk.

Kísérletek lefolyása

Kísérleteinket a következő szakasokban végeztük:

a) Felületi tenyésztés, azonos kezdeti pH (7) érték, de a szervesetlen nitrogénforrásnak a módszertani kérdéseknél leírt módon történő változtatásával. A pH minden esetben a tenyészidő végén 6 körüli értékre csökkent. A színképződés a következő volt: I. jelzésű táptalajon barnás-sárga; II. jelzésűnél palackzöld III-nál sárgás-barna.

b) Vizsgáltuk a festékképzést a különböző nitrogénforrású táptalajokon, különböző kiindulási hidrogénion koncentráció mellett. A párhuzamos tenyészeteiket pH 6—7,5 intervallumban 0,5 érték eltolással 4 különböző (6; 6,5; 7; 7,5) kezdeti pH érték mellett indítottuk el. Több tenyészorosozatot figyeltünk meg azonos körülmények között. A felületi kultúrákban bekövetkeztett viszonyokról az 1. táblázat tájékoztat.

1. táblázat
A felületi kultúrákban bekövetkezett színváltozások

| (1) Táptalaj jele | (2) Kezdeti pH | (3) Végső pH | (4) Táptalaj színe a tenyészidő végén |
|----------------------|-------------------|-----------------|--|
| I. | A | 6 | zöldes-barna (5) |
| | B | 6 | zöldes-barna (5) |
| | C | 6,5 | sötét-barna (6) |
| | D | 6,5 | világos-barna (7) |
| | E | 7 | sötét-barna (6) |
| | F | 7 | világos-barna (7) |
| | G | 7,5 | barna (8) |
| | H | 7,5 | barna (8) |
| II. | A | 6 | élénk palack-zöld (9) |
| | B | 6 | élénk palack-zöld (9) |
| | C | 6,5 | élénk palack-zöld (9) |
| | D | 6,5 | élénk palack-zöld (9) |
| | E | 7 | világos-barna (7) |
| | F | 7 | barna (8) |
| III. | A | 6 | sárgás-zöld (10) |
| | B | 6 | sárgás-zöld (10) |
| | C | 6,5 | zöldes-barna (5) |
| | D | 6,5 | barna (8) |
| | E | 7 | barna (8) |
| | F | 7 | barna (8) |
| | G | 7,5 | barna (sötét) (11) |
| | H | 7,5 | barna (sötét) (11) |

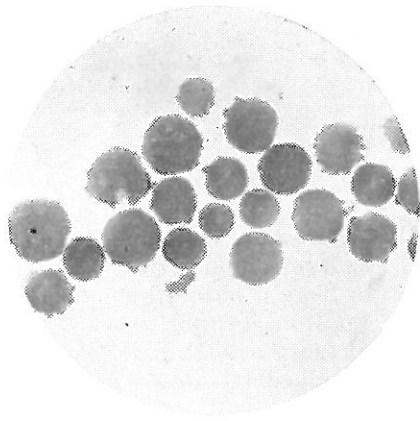
Amint említettük, a fentebb megadott kísérleti eredményeket felületi tenyészetek esetén kaptuk. Mivel azonban erősen aerob mikroorganizmekkel állunk szembe, szükségesnek véltük, hogy jobb levegőztetési tenyész körülmények között ismételjük meg kísérleteinket. Itt azonban már eltekintettünk attól, hogy aránylag kicsi (0,5) pH érték-változtatásokat eszközöljünk a tenyészet elindításakor, hanem csak az előző sorozatok szélső értékeivel (6; 7,5) indítottunk el párhuzamos tenyészeteiket. Ezen kísérletek eredményeit a 2. és 3. táblázatban mutatjuk be, melyekkel egyben a süllyesztett tenyészetekben végzett kísérleteink reprodukálhatóságát is demonstrálni kívánjuk.

A 2. ábrán látható félmikrofelvétel viszont azt mutatja be, hogy a változó szervesetlen nitrogénforrás a színképzésen kívül a telep alakját is befolyásolja. Az a) jelzésű telepek, melyek csaknem sima kiképzésűek, a 3. táblázatban II. B jelzéssel szereplő tenyészetekben, míg a b) jelzésű telepek — melyek tüskés nyúlványokat mutatnak — ugyanezen táblázatban III. C jellel jelzett tenyészetekben

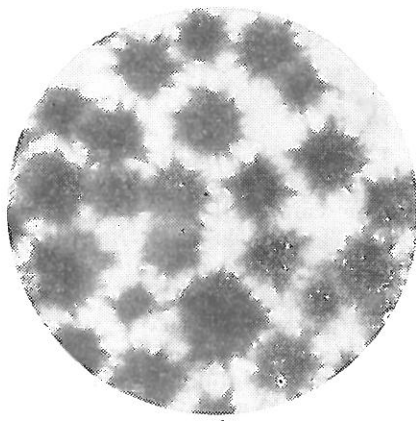
fejlődtek ki. c) A festékképzés vizsgálata pufferolt tápoldatokban. A táblázatok eredményeiből látható, hogy a táptalaj pH-ja a tenyésztés végére határozottan megváltozott. A III. jelzésű táptalajnál lúgos felé, míg a II. és I. jelzésűeknél minden

2. táblázat
Kísérleti eredmények

| (1) Táptalaj jele | (2) Kezdeti pH | (3) Végző pH | (4) Táptalaj színe 4 nap múlva | (5) Táptalaj színe 8 nap múlva | (6) Telepképződés | |
|-------------------------|----------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|---|
| I. | A | 6,27 | 3,60 | erős palack-zöld (13) | erős palack-zöld (13) | jó telepképződés, apró szürke makrotelepek |
| | B | 6,29 | 3,66 | erős palack-zöld (13) | erős palack-zöld (13) | |
| | C | 7,40 | 5,94 | sötét-barna (21) | vörös-barna (19) | igen jó telepképződés, barna makrotelepek |
| | D | 7,41 | 5,94 | sötét-barna (21) | vörös-barna (19) | |
| II. | A | 6,42 | 3,57 | ig. halvány-zöld (7) | halvány-zöld (8) | gyenge telepképz., szürkés-fehér makrotelepek |
| | B | 6,34 | 3,57 | ig. halvány-zöld (7) | halvány-zöld (8) | |
| | C | 7,50 | 3,54 | középerős zöld (10) | erős palack-zöld (13) | jó telepképz., szürkés-barna makrotelepek |
| | D | 7,50 | 3,95 | középerős zöld (10) | erős palack-zöld (13) | |
| III. | A | 6,41 | 7,59 | barnás-vörös (18) | barnás-vörös (18) | jó telepképz., sötét-barna makrotelepek szürke szegéllyel |
| | B | 6,35 | 7,60 | barnás-vörös (18) | barnás-vörös (18) | |
| | C | 7,18 | 7,40 | alig sárga (15) | vörös-barna (19) | közepes telepképz., barna makrotelepek szürke szegéllyel |
| | D | 7,23 | 7,20 | alig sárga (15) | vörös-barna (19) | |



a



b

2. ábra

Nitrogénforrás és a telepforma összefüggése: a) csaknem sima kiképzésű telepek, b) tüskés nyulványokat mutató telepek

esetben savanyú irányba tolódott el. A festékképzés alakulását a különböző táptalajokon a puffer-hatás függvényében is megvizsgáltuk. Ugyancsak párhuzamos tenyészeteket indítottunk a pH-t egyik csoportban 6,47-re, a másik csoportban 7,14-re állítva 1/15 molos foszfátpufferrel. Ezen kísérleteink eredményei lényegében megegyeztek a korábbiakkal. A pH eltolódás a tenyésztés végére hasonló volt, de a pufferelés következtében érthetően kisebb mértékű mindkét irányban. Amíg a nem pufferolt sülyesztett tenyészetekben több esetben közel 3,5-re esett a pH, addig itt a legalacsonyabb pH érték is alig 5 alatti volt. Általában ugyan-

3. táblázat
Kísérleti eredmények

| (1) Táptalaj jele | (2) Kezdeti pH | (3) Végső pH | (4) Táptalaj színe 4 nap múlva | (5) Táptalaj színe 8 nap múlva | (6) Telepképződés |
|--------------------------|----------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|
| I. A B C D | 6,19 | 3,77 | középerős zöld (10) | középerős p. zöld(11) | Önálló makrotelepek, színük piszkos-szürke, az edény oldalára rakódó körgyűrűtelep lilás-szürke, fentebb fehér |
| | 6,18 | 3,88 | középerős zöld (10) | középerős p. zöld(11) | |
| | 7,65 | 6,46 | sárga (16) | barnászöld (14) | igen jó telepképzés; önálló makrotelepek színe vörös-barna, intenzív gyűrűképződés az edény falán, színe sötét-barna |
| | 7,55 | 6,33 | sárga (16) | barnászöld (14) | |
| II. A B C D | 6,20 | 3,72 | halvány-zöld (8) | halvány p. zöld (9) | gyenge telep-képzés, önálló makrotelepek színe szürke, gyenge gyűrű az edény falán, színe szürke, később sötétedik, barnába megy. |
| | 6,01 | | halvány-zöld (8) | halvány p. zöld (9) | |
| | 7,50 | 4,05 | középerős zöld (10) | erős palack-zöld (13) | jó telepképzés, önálló makrotelepek színe szürke, erős gyűrűképzés az edény falán, színe sötét-barna |
| | 7,56 | 4,62 | sárgászöld (12) | erős palack-zöld (13) | |
| III. A B C D | 6,10 | 7,71 | közép-barna (20) | barnász-vörös (18) | igen jó telepképzés, önálló makrotelepek színe sötét-barna, erős gyűrűképzés, ennek színe: vörös-barna |
| | 6,06 | 7,87 | közép-barna (20) | sárgász-vörös (18) | |
| | 7,55 | 7,87 | sárga (16) | sárgász-vörös (17) | jó telepképzés, önálló makrotelepek színe barna, aránylag erős gyűrűképződés az edény falán, gyűrű színe: vöröses-barna |
| | 7,67 | 7,87 | sárga (16) | sárgász-vörös (17) | |

azon festékanyagok képződtek, de sem az élénk-zöld, sem az erős barnász-vörös szín nem vált uralkodóvá.

Tájékozódásképpen, hogy tiszta, vagy keverék színekkel állunk-e szemben, a különböző színű tápoldatokat a micéliumról leszűrve a módszertani kérdéseknél leírtak szerint kromatografáltuk. Megállapítottuk, hogy a három különböző színű (zöld, sárga, vörös-barna) festékanyag, mely a papíron igen jól szétvált, egymás mellett képződött. Azonban minden esetben hiányzott a zöld színű komponens azokból a tápoldatokból, melyek pH-ja 7 fölé emelkedett, illetve a barnaszínű komponens azokból, melyeknek végső pH-ja 4 alá esett.

Az eredmények megvitatása

A fentebb vázolt és táblázatokba foglalt kísérleti eredményeket egybevetve, a papírkromatográfiás vizsgálatokkal az tűnik ki, hogy általában három különböző festékanyag képződik egymás mellett. Világosan látszik, hogy az uralkodó szín nem annyira a kezdeti, mint inkább a végső pH érték függvénye. Jól mutatják ezt a 2. táblázat II. A., B., illetve C., D., valamint a 3. táblázat ugyancsak II. A., B., illetve C., D. jelzésű táptalajokon bekövetkezett kísérletek eredményei. A kiinduló pH-tól függetlenül a pH közel ugyanarra a végső értékre (és pedig erősen savanyú irányba) tolodott el, minek következtében mindegyik tenyészetben azonos szín, a savanyúban a legnagyobb mértékben képződő zöld szín vált uralkodóvá.

Ugyanilyen egyértelmű eredményhez jutunk, ha az előző két táblázat III. jelzésű táptalajokon (nitrogén-forrás nátriumnitrát) vezetett párhuzamos kísérleteit vizsgáljuk. Láthatjuk, hogy ezeknél a kezdeti pH érték a tenyésztés végére emelkedett és a pH 6-ról indított tenyészetekben is határozott lúgos közeg alakult ki. Ennek megfelelően függetlenül a kiindulási pH alacsonyabb vagy magasabb értékétől ugyancsak azonos szín, mégpedig a neutrális, illetve gyengén lúgos közegben nagyobb mértékben képződő barna, sőt vörös-barna szín lett uralkodó. Figyelmet érdemelnek az ammóniumfoszfát nitrogénforrású táptalajokon kapott kísérleti eredmények is, melyeket a 2. és 3. táblázatban I. jelzéssel tüntettünk fel. Elég egy pillantást vetnünk a táblázat adataira és láthatjuk, hogy itt nem olyan egyértelműek az eredmények, mint az előző két esetben. Itt a végső pH értékek között lényeges eltérés van, minek következtében a táptalajok színe sem egyező. Amíg az A és B párhuzamosoknál erősen eltolódott a pH a savanyúba és a zöld szín lett a domináló, addig a C és D párhuzamosoknál jóval kisebb mértékben csökkent, közel maradt a neutrális ponthoz, aminek megfelelően a barna színű festékanyag képződött nagyobb mértékben.

A fent elmondottak mind amellettszólnak, hogy valóban a végső pH érték a döntő a színek kialakulásánál, mely természetesen egyéb tenyész körülmények mellett elsősorban a szintetikus táptalaj vegyi összetevőitől is függ. Jelen esetben amikor pl. csak a szervesetlen nitrogénforrást változtattuk meg aszerint, hogy a szervesetlen nitrogén-forrás melyik részét hasznosította, vagy volt kénytelen hasznosítani a szervezet, a pH eltolódás is más és más volt. Ammóniumnitrát és ammóniumfoszfát esetében egyező irányú — de érthetőleg az utóbbi esetében annak jól érvényesülő pufferhatása következtében kisebb mértékű — a pH savanyú irányba tolódása a tenyészidő alatt. Viszont más irányba — a lúgosba — tolódik a pH nátriumnitrát nitrogénforrás esetén, amikor is a nitrát-nitrogént kénytelen hasznosítani a szervezet. Ezen megállapításoknál ki kell emelnünk azt is, hogy a vázolt eredmények jól szellőztetett tenyésztésnél következtek be; azonban nem ilyen világos a helyzet a felületi tenyészetben, amelynek adatait az 1. táblázatban láthatjuk. Itt nyilvánvalóan arról van szó, hogy a felületi kultúrák lényegesen rosszabb levegőzési viszonyai nem jól definiálható módon befolyásolták a festékképzés menetét is.

Nem érdektelen a festékképzés szempontjából a táptalaj puffereltsége sem. Itt egyfelől megállapíthatjuk, hogy általában a festékképzés kisebb mértékű volt, másfelől éppen a puffereltség folytán akadályozott pH eltolódás következtében sem a zöld, sem a vörös-barna szín nem vált uralkodóvá.

A kísérleti eredmények feltárása és értékelése után ismét fel kell vetnünk azt a gondolatot, hogy a *Streptomyces* fajok determináló bélyegeinek megadásánál felettebb szükséges a funkciók körülményeit pontosan leírni, mert az általánosítások, így a már említett »szintetikus táptalaj« megjelölés oda vezetnek, hogy nem lehet a meghatározás akkor sem pontos, ha nem erősen variálós, hanem konzervatív fajról van szó. Tudvalevő ugyanis, hogy az anyagcsere nemcsak a faj jellegzetes tulajdonságaitól, hanem a körülményektől is erősen függ. Viszont még erősen variálós fajnál is lehetnek olyan jellegek, amelyek azonos feltételek mellett azonos funkciót mutatnak, ahogyan az a kétségtelenül erősen variálós T₃ jelzésű fajunknál éppen a festékképzésben megmutatkozott. Mindenképpen helyes lenne tehát, ha a szintetikus táptalajra vonatkoztatott adatok a határozókból egyéb tenyésztési körülmények megadása mellett a vegyi összetétel és hidrogénion koncentráció pontos megjelölését is tartalmaznák. Továbbmenőleg oda kell irányulni a faj meghatározás művelete előkészítésének, hogy több biokémiai jelleget tárjon fel

az egyes szervezeteknél, de természetesen csakis úgy, hogy azt következetesen minden fajnál kidolgozzák (17). A sztrep-tomiceszeknél még követelõbben lép fel ez a szempont, mivel épp ezek termelik eddigi ismereteink szerint a leghatékonyabb antibiotikumokat, viszont a rengeteg új »provizorikus« elnevezés is igazolja, hogy a taxonomiai ismeretek többségükben nem kielégítõek.

Összefoglalás

Az antibiotikus sztreptomiceszek törzskutatásánál igen nagy nehézséget jelent a fajok meghatározása, mivel a kurrens határozó könyvek (akár Bergey, akár Kraszilnyikov által írottak) nem adnak kielégítõ és egységes szempontok szerinti determináns bélyegeket.

Vizsgáltuk egy közelebrõl meg nem határozott *Streptomyces* faj festékképzését szintetikus táptalajokon, felületi és rázott tenyészetekben. Táptalajaink egyébként azonos összetételûek voltak, csupán a szervesetlen nitrogén-forrást változtattuk háromféleképpen [NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_3\text{HPO}_4$, NaNO_3]. Egyben parallel kísérletekben vizsgáltuk a háromféle táptalaj különbözõ pH értékeinél is a festékképzést. (A vizsgált faj különben a Kraszilnyikov-féle *Actinomyces* határozó alapján közeláll a *Streptomyces* [*Actinomyces*] *globosus*-hoz.)

Megállapítottuk, hogy *Streptomyces* fajunk háromféle, kémiaiilag még nem definiált, de egymástól jól elkülöníthetõ festékanyagot termel. Papírkromatográfiával szelvtválasztva zöld, sárga és vörös-barna festéket nyertünk. A festékek változatos dominanciával egymás mellett termelõdtek és attól függõen, hogy melyik termelése volt túlsúlyban, adódtak a táptalajok színváltozatai. Megállapítottuk, hogy az egyes festékek domináns termelésének és így egyben a táptalaj szeszélyesnek látszó számos színváltozatának oka a táptalaj kiindulási, de fõleg végsõ pH-jában van, melynek kialakulását a szervesetlen nitrogén-forrás változtatásával is befolyásoltuk. Savanyúbb végsõ pH esetén a zöld, általában pH 5,6—6,5 között a sárga, míg 6,5 felett az erõsen barna, sõt vörös-barna festék volt domináns.

Kísérletünk eredményeinek általános értékeléseként az a véleményünk, hogy az egyes fajok jellegzetes tulajdonságainak megadásánál az eddigiekkel szemben sokkal pontosabban kell a tenyésztés kémiai és fizikai körülményeit közölni, annál is inkább, mivel jól tudjuk, hogy a mikroorganizmusok többsége egészen csekély környezeti hatásokra is élesen reagál. Csak így lehetséges a meghatározásokhoz szükséges élettani adatok pontos egyeztetése.

Érkezett: 1953. július 15.

Irodalom

1. Bergey, D.: Manual of Determinative Bacteriology. 5. Ed. London. 1948.
2. Brockmann, H., Bauer, K. & Borchels, I.: Chem. Ber. **84**. 700. 1951.
3. Brockmann, H., Pini, H. & Plotho O.: Chem. Ber. **83**. 161. 1950.
4. Cochrane, V. W. & Conn, J. E.: J. Bact. **54**. 213. 1947.
5. Conn, J. E.: J. Bact. **46**. 113. 1943.
6. Dietzel, E.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **284**. 262. 1949.
7. Duggar, B. M.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **51**. 177. 1948.
8. Erikson, D.: Jour. Gen. Microbiol. **2**. 252. 1948.
9. Erikson, D.: Ann. Rev. Microbiol. **3**. 24. 1949.
10. Jensen, H. L.: Soil Sci. **30**. 59. 1930.
11. Krainsky, A. V.: Centrbl. Bakter. II. **41**. 649. 1914.
12. Kraszilnyikov, N. A.: Mikrobiologija **14**. 164. 1945.
13. Kraszilnyikov, N. A.: Opredelitelj bakterij i aktinomycetov. Moszkva—Leningrad. 1949.
14. Krisz, A. E.: Az Actinomycetes variabilitása. (Orosz) Moszkva. 1936.
15. Krisz, A. E.: Mikrobiologija **5**. 607. 1936.
16. Lieske, R.: Morphologie und Biologie der Strahlenpilze. Leipzig. 1921.

17. Lindenbein, W.: Arch. Mikrobiol. **17**. 361. 1952.
18. Lindenbein, W.: Ber. Deutsch. Bot. Ges. **64**. 33. 1952.
19. Oxford, A. E.: J. Bact. **51**. 267. 1950.
20. Ploth, O.: Arch. Mikrobiol. **14**. 142. 1948.
21. Rutter, L.: Nature. **161**. 435. 1948.
22. Schaal, L. A.: Jour. Agr. Res. **69**. 168. 1943.
23. Schatz, A. & Waksman, S. A.: Proc. Nat. Acad. Sci. **31**. 129. 1945.
24. Shimako, O.: J. Antibiotics. (Japan) **4**. 1. 1951.
25. Shokman, G. & Waksman, S. A.: Antib. and Chemoter. **1**. 68. 1951.
26. Stainer, R. Y.: J. Bact. **44**. 555. 1942.
27. Waksman, S. A.: Soil Sci. **8**. 71. 1919.
28. Waksman, S. A.: The Actinomycetes. Waltham, Mass., U. S. A. 1950.
29. Waksman, S. A. & Schatz, A.: Proc. Nat. Acad. Sci. **31**. 208. 1945.

ДАННЫЕ ОБ ОБРАЗОВАНИИ КРАСОК СРЕПТОМИЦЕСАМИ НА СИНТЕТИЧЕСКОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ (НА ОСНОВЕ ОПЫТА С АНТИБИОТИЧЕСКИМ ВИДОМ STREPTOMYCES)

Я. Хорват и И. Орослан

Биологический Исследовательский Институт Академии Наук Венгрии, Тихань

В ы в о д ы

Определение видов представляет большие трудности в изучении линий антибиотических стрептомицесов, так как в применяемых определителях (как Bergey, так и Красильникова) не даны удовлетворительные детерминирующие признаки основанные на единых точках зрения.

Авторами было изучено образование красок неопределенным видом *Streptomyces* на синтетических питательных средах в поверхностных и разболтанных культурах. Впрочем, питательные среды были одинакового состава, лишь источник анорганического азота изменился $[NH_4NO_3, (NH_4)_2 HPO_4, NaNO_3]$ Одновременно в параллельных опытах было изучено образование красок в указанных 3 питательных средах также и при различной величине рН (Впрочем, по определителю видов *Actinomyces* Красильникова, изученный вид близок к *Streptomyces (Actinomyces) globosus*).

Было установлено, что изученный вид стрептомицеса образует три различных красящих веществ, химически еще не определенных, но хорошо разделяемых друг от друга. При разделении бумагохроматографией была получена зеленая, желтая и краснубурая краска. Краски образовались совместно, при изменяющейся доминанции одного из них. Окраска питательной среды была обусловлена тем, образование которого из красок преобладало. Было установлено, что доминирующее образование отдельных красок и вместе с тем многочисленные, повидимому капризные окраски питательной среды были обусловлены исходной, но главным образом конечной величиной рН почвы, на формирование которой авторы воздействовали также и изменением источника минерального азота. При более кислой конечной величине рН преобладала зеленая краска, в общем при величине рН от 5,6 до 6,5 — желтая, в при величине рН свыше 6,5 доминировала интенсивно-коричневая и даже краснубурая краска.

В результате общей оценки результатов опыта, авторы того мнения, что при описании характерных признаков отдельных видов необходимо немного более точно излагать химические и физические условия культуры, чем до сих пор — тем более, что широко известно, как сильно реагирует большинство микроорганизмов даже на минимальное воздействия окружающей среды. Только таким путем возможно точное согласование физиологических данных, необходимых для определений.

Р и с. 1.: Изменение вариацией в морфологических признаках. а: колония сравнительно малых размеров, с воздушными мицелиями с округлыми краями, на краях с белой и на остальных частях с фиолетовой окраской. б: середина колонии возвышается, кругом отграничивается от внешнего края, который является плоским, в общем виде серой и в просвете фиолетовой окраски. с: середина колонии — белая, край же — коричневый. d: середина колонии — фиолетовая, прилегающее кольцо — белое, край же — коричневый.

Р и с. 2. Связь между источником азота и образованием окраски. а: колонии с почти гладкой формой. б: колонии с шиповатыми придатками.

Т а б л. 1. Изменения окраски в поверхностных культурах. (1) Обозначение питательной среды. (2) Начальная величина рН. (3) Конечная величина рН. (4) Окраска пита-

тельной среды в конце вегетационного периода. (5) Зеленовато-бурое. (6) Темнокоричневое. (7) Светлокоричневое. (8) Коричневое. (9) Интенсивно-бутылочно-зеленое. (10) Желтовато-зеленое. (11) Темнобурое.

Табл. 2. и 3. Результаты опытов. (1) Обозначение питательной среды. (2) Начальная величина pH. (3) Конечная величина pH. (4) Окраска питательной среды через 4 дн. (5) Окраска питательной среды через 8 дней. (6) Образование колонии. (7) Очень слабозеленое. (8) Слабозеленое. (9) Слабобутылочно-зеленое. (10) Среднезеленое. (11) Среднебутылочно-зеленое. (12) Желтовато-зеленое. (13) Интенсивно-бутылочно-зеленое. (14) Буровато-зеленое. (15) Едва желтое. (16) Желтое. (17) Желтовато-красное. (18) Буровато-красное. (19) Красно-бурое. (20) Среднекоричневое. (21) Темнокоричневое.

Beiträge zur Kenntnis der Farbstoffbildung von Streptomyces-Arten, auf synthetischem Nährboden, auf Grund der Ergebnisse von Versuchen mit einer antibiotischen Streptomyces-Art

J. HORVÁTH und I. OROSZLÁN

Biologisches Forschungsinstitut der Ungarischen Akademie für Wissenschaften, Tihany

Zusammenfassung

In der Stammforschung von antibiotischen Streptomyces-Arten bietet die Bestimmung der Art grosse Schwierigkeiten, weil die üblichen Bestimmungsbücher (gleichviel ob von Bergey, oder Krassilnikov) keine ausreichenden, und nach einheitlichen Gesichtspunkten festgelegten Merkmale geben.

Es wurde die Farbstoffbildung einer nicht genau definierten Streptomyces-Art auf synthetischen Nährböden, in Oberflächen- und Schüttelkulturen geprüft. Die Nährböden waren von der gleichen Zusammensetzung, bis auf die Stickstoffquelle, welche von dreierlei Art war $[\text{NH}_4\text{NO}_3, (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4, \text{NaNO}_3]$. In Parallelversuchen wurde auch die Farbstoffbildung bei verschiedenen pH-Zahlen der drei Nährböden untersucht. Gemäss dem Actinomyces-Register nach Krassilnikov stand die verwendete Pilzart dem Streptomyces, (*Actinomyces*) *globosus* nahe.

Es konnte festgestellt werden, dass der Versuchspilz drei verschiedene, chemisch noch nicht bestimmbare, jedoch gut isolierbare Farbstoffe erzeugt. Mittels Trennung durch Papierchromatographie wurde eine grüne, eine gelbe, und eine rotbraune Substanz erhalten. Die drei Arten dominierten abwechselnd, doch wurden sie stets nebeneinander erzeugt; je nach dem Vorherrschender einen oder der anderen ergaben sich die Farbentöne der Nährböden. Es zeigte sich, dass die Frage der Dominanz und demnach auch das Schwanken der Farbentöne des Nährbodens, durch die anfängliche, hauptsächlich jedoch durch die End-pH-Zahl geregelt wurde; die pH-Zahl aber wurde durch die Natur der Stickstoffquelle auch verändert. Bei saurerer End-pH-Zahl dominierte der grüne, bei Werten von 5,6—6,5 im Allgemeinen der gelbe, oberhalb von 6,5 der tiefbraune, sogar rotbraune Farbstoff.

Aus den Versuchsergebnissen ergibt sich der allgemeine Schluss, dass es unbedingt nötig ist, bei der Kennzeichnung einzelner Arten die chemischen und physikalischen Vegetationsbedingungen viel genauer als üblich anzugeben, umso mehr, als die Mehrzahl der Mikroorganismen sehr empfindlich auf geringfügige Umwelteinflüsse reagiert. Nur auf solche Weise ist ein genauer Vergleich der zur Artbestimmung erforderlichen biologischen Merkmale möglich.

Abb. 1. Schwankungen in den morfolologischen Merkmalen, a) Verhältnismässig kleine, runde Kolonie, mit schwebenden Mycelien, Rand weiss, sonst lila gefärbt. b) Mitte der Kolonie gehoben, kreisförmig abgegrenzt gegen den flachen Rand, im auffallenden Licht grau erscheinend, bei Durchsicht lila. c) Mitte der Kolonie weiss, Rand braun, d) Mitte der Kolonie lila, dann weisser Ring, Rand braun.

Abb. 2. Beziehung des Farbbildes zur Stickstoffquelle. a) fast ebene Kolonien. b) Kolonien mit stachelartigen Fortsätzen.

Tabelle 1. Farbveränderungen in Oberflächenkulturen (1) Bezeichnung des Nährbodens. (2) Ausgangs-pH. (3) End-pH. (4) Farbe des Nährbodens am Ende der Vegetationszeit. (5) Grünlich-braun. (6) Dunkelbraun. (7) Hellbraun. (8) Braun. (9) Lebhaft flaschengrün. (10) Dunkelbraun.

Tabelle 2. und 3. Versuchsergebnisse. (1) Bezeichnung des Nährbodens. (2) Ausgangs-pH. (3) End-pH. (4) Farbe des Nährbodens nach 4 Tagen. (5) Farbe des Nährbodens nach 8 Tagen. (6) Kolonienbildung. (7) Stark blassgrün. (8) Blassgrün. (9) Blass flaschengrün. (10) Mittelstark grün. (11) Mittelstark flaschengrün. (12) Gelbgrün. (13) Stark flaschengrün. (14) Bläulichgrün. (15) Kaum gelb. (16) Gelb. (17) Gelbrot. (18) Braunrot. (19) Rotbraun. (20) Mittelbraun. (21) Dunkelbraun.