

Vizsgálatok a sugárgombák közötti specifikus gátló hatások természetére vonatkozóan

SZABÓ ISTVÁN ÉS MARTON MÁRIA

M T A Talajbiológiai Kutatólaboratórium, Sopron

Ismeretes, hogy a sugárgombák kölcsönviszonyában a gátló hatások igen elterjedtek [5, 8, 10, 15, 16, 17]. E hatások legtöbbször olyan antibiotikumok produkciójára vezethetők vissza, melyek hatóspektruma más mikroszervezetek, így baktériumok, penészek, stb. irányába is kiterjedhet. Ezek mellett mesterséges tápközegeken gyakran észlelhetők olyan gátlásjelenségek is, melyeket a lízisnek alávetett, előregedett micélium részlegekből szabaddá váló anyagok idéznek elő. Ez utóbbiak, miként maga a lízis jelensége is, továbbá az e téren valószínűleg komoly szerepet-játszó fág-hordozás lehetőségei a sugárgombák körében mindmáig csak igen kevésé tanulmányozottak.

Kiindulva, a főleg a bélbaktériumok körében ismeretessé vált és elsősorban ugyanezen mikroba csoport tagjaival szemben aktív ún. bakteriocinek, antibiotikus hatású fehérje természetű anyagok nagy általános biológiai jelentőségéből [2, 9], hasonló természetű hatóanyagok után kutattunk a sugárgombák körében. Így egy nagyobb, több mint ezer törzsrre kiterjedt vizsgálat [16] keretében sikerült elkülönítenünk egy *Streptomyces* törzset, melynek igen kifejezett, állandó, specifikus, sugárgomba-ellenes antibiotikus hatóspektrumát állapíthattuk meg. E törzsre vonatkoznak alanti vizsgálataink.

Vizsgálati anyag és módszer

Streptomyces Ca-6-törzs

Savanyú erdőtalajból (Sopron) kazein-glukóz-agaron izoláltunk néhány kolóniát, melyek kulturális és fiziológiai sajátosságok szempontjából azonosaknak bizonyultak. E kolóniák közül egyet Ca-6 jelzéssel tenyésztettünk tovább.

Kultúrmédiumok (Minden adat %-ban)

1. *Glukóz-agar* (GA): pepton 0,5; glukóz 1,0; K_2HPO_4 0,1; $MgSO_4$ 0,5; agar 1,5. — 2. *Pepton-agar* (PA): pepton 0,5; húskivonat 0,5; NaCl 0,5; agar 1,5. — 3. *Glukóz-aszparagin-agar* (GAA): glukóz 1,0; aszparagin 0,05; K_2HPO_4 0,05; agar 1,5. — 4. *Keményítő-agar* (KA): oldható keményítő 1,0; KNO_3 1,0; NaCl 0,1; K_2HPO_4 0,1; $FeSO_4$ 0,01; $MgSO_4$ 0,01; $CaCO_3$ nyomokban; agar 1,5. — 5. *Szintetikus-agar* (SA): K_2HPO_4 0,1; $MgSO_4$ 0,05; KCl 0,05; $FeSO_4$ 0,001; $NaNO_3$ 0,2; glicerin 3,0; agar 1,5. — 6. *Szintetikus folyadék-kultúra* (S—II): 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. — 7. *Sárgarépa-agar* (MA): K_2HPO_4 0,1; glukóz 0,5; pepton 0,5; agar 2,0; víz helyett sárgarépa-kivonat. A C és N-források értékesítését Pridham és Gottlieb [12] szintetikus-agar tápközegén (pH 6,8—7,0) vizsgáltuk.

A folyadékkultúrákat 250—250 ml-enként, keverőgépen, Erlenmeyerekben percenként 75 fordulatszám mellett levegőztettük 28 °C-on.

A variánsok kiválogatása

A *Streptomyces* Ca-6 törzs variánsai számarányának megállapításánál és izolálásánál a Pfenning által javasolt [11] egyspóra-kultúrák előállításának módosított eljárását alkalmaztuk.

A gátlóanyag mennyiségi meghatározása

Mivel jelen esetben a sugárgomba törzsek érzékenységi fokát a tenyésztáptalaj összetétele határozottan befolyásolta és a mennyiségi meghatározásokhoz szükséges éles gátlásjelenségek nem minden összetételű tápközegen jelentkeztek, először ezt a kérdést igyekeztünk tisztázni. Az alanti összetételű tápközeg komponenseit változtattuk mennyiségi és minőségi értelemben (adatok %-ban): glukóz 1,0; K_2HPO_4 0,2; $MgSO_4$ 0,4; NaCl 0,2; $FeSO_4$ nyomokban; $(NH_4)_2HPO_4$ 0,2; agar 1,5; pH 7,2—7,4. Összesen mintegy 45 táptalaj kombinációt vizsgáltunk meg, mikor is figyelemmel voltunk a hatóanyagból előállított preparátumok aktivitására, annak sztatikus vagy letális hatására, hígítási fokára, az előidézett gátlások erősségére, a zónahatárok élességére, a gátlás-mezők tisztaságára, az utólagos növekedés mértékére, stb. Megállapításaink szerint a C-forrásként alkalmazott glukóz mennyiségének növelése vagy csökkentése 0,5—3,5% határokon belül, avagy helyettesítése más C-forrásokkal, mint glicerin, keményítő, maltóz, mannóz, dextrin, pepton lényeges befolyást nem gyakorolt a hatóanyaggal szembeni érzékenységre. Ha a fenti tápközegből a 0,2% $(NH_4)_2HPO_4$ -ot a PO_4 gyökre ekvivalens K_2HPO_4 -el ill. nitrogén-ekvivalens peptonnal, aszparaginnal helyettesítettük, úgy az összehasonlítások szerint a hatóanyag érzékenységekben különbség nem mutatkozott. A NaCl mennyiségének változtatása 0,02—1,5% határok között vagy ennek helyettesítése KCl-el, továbbá a $MgSO_4$ különböző méretű adagolása 0,04—2,0% között önmagában ugyancsak nem idézett elő lényegbevágó különbségeket. Más volt a helyzet a PO_4 gyök esetében, melynek mennyiségi viszonyai a táptalajban a gátlás-jelenség megnyilvánulása szempontjából döntőnek bizonyultak. Így bármiféle tápforrás variációban is a maximális erősségű antibiotikus hatást, tiszta növekedésmentesen maradó, éles határú gátló zónákkal csak — a táptalaj kombinációtól függően — 0,38—0,45% PO_4 gyöknek, mint a szükséges foszforszint alsó határának jelenlétében észleltük. Amennyiben a táptalajban szereplő foszfátokban [K_2HPO_4 , $(NH_4)_2HPO_4$, stb.] a PO_4 gyök a jelzett mennyiségi értéket nem éri el, úgy a közegben növekedve a szenzibilis törzs érzékenysége csökken, a gátlózóna határok kevésbé élesek, sőt alig kifejezettek és határozatlanok lesznek, és rövid sztatikus hatás után t. k. gyors benövés észlelhető. Megállapításaink szerint a kultúrmédiumban egyedüli N-forrásként alkalmazott anorganikus nitrogénvegyületek [pl. $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl , KNO_3 , stb.] jelenlétében, a tápközeg fent megjelölt foszforszintje alatt, növekedett valamelyest az egyébként érzékeny törzsek szenzibilitása, ez azonban inkább a gátlóanyag sztatikus hatásának meghosszabbodásában nyilvánult meg, semmint a jelzett foszforszint felett észlelhető jellegzetes letalításban, mely utóbbi a vegetatív micélium fonalainak lízisében ill. a spórák csírázásának teljes kimaradásában jutott érvényre. Ha a kritikus foszforszinttel azonos, vagy ennél magasabb nivót képviselő PO_4 -el ekvivalens szerves kötésű foszfort, így nukleinsavat — mint egyedüli foszforforrást — juttattunk a tápközegbe, úgy az ebben fejlődő sugárgombáknál az érzékenység igen nagy mérvű, sőt gyakran teljes felfüggesztését értük el, amit párhuzamosan kísért a különben szenzibilis tesztorganizmusnak a gátlóanyag hatékony koncentrációja jelenlétében bekövetkező fokozott, serkentett szaporodása. Ezek után külön vizsgálat tárgyává tettük a tápközeg mindenkor pH-viszonyainak szerepét az antibiotikus titer alakulásánál ill. meghatározásánál. Fzen kísérletekkel kapcsolatban — melyek keretében a kultúrmédium pH-értékeinek és

tápforrás összetételének egyidejű variációját is elvégeztük — röviden csak arra utalunk, hogy a hatóanyag aktivitása 5,8—8,3 pH értékek között változást nem mutatott, és a mért antibiotikus titer értékeit e pH határok között, végső fokon a mindenkori foszfátszint határozta meg.

Sugárgomba ellenes titer

Mindezek figyelembe vételével a gátlóanyag mennyiségi kimutatásánál az alantiek szerint jártunk el. Az általunk már gyakran alkalmazott, standard érzékenységi, *Streptomyces* sp. M—15 sugárgomba spóraszuszpenzióját terítettük GPA-agar [összetétele: glukóz 10,0 g; K_2HPO_4 2,0 g; $MgSO_4$ 0,4 g; NaCl 0,2 g; $FeSO_4$ nyomok; $(NH_4)_2HPO_4$ 5,0 g; deszt. víz 1000 ml; pH 7,0 körül] felületén, majd a vizsgálandó kultúrfolyadékából vagy a hatóanyag-preparátumból hígítási sorozatot készítettünk és ezek 0,2 ml mennyiségeit a lyuktesztmódszerrel vizsgáltuk aktivitásra, 28 °C-on 24 órás inkubációs időt biztosítva a teszt fejlődése számára. Azt a legnagyobb hígítási fokot, mely még 2—3 mm-es zónában teljesen megakadályozta e szervezet spóráinak kicsírázását, tekintettük a sugárgombaellenes titernek.

Vizsgálati eredmények

A Streptomyces Ca-6 törzs és variánsai

Mivel e vizsgálataink alapját képező sugárgombatörzs a legújabb rendszertan munkák [6, 18] alapján sem volt fajilag meghatározható — amit még csak jobban aláhúzott a szelektált variánsoknak a törzstípustól is igen elütő volta — alant a Ca-6 törzs kulturális és morfológiai leírását adjuk a Lindenbein [7] által az aktinomiceták meghatározásához és leírásához javasolt tápközegeken.

1. GA : Levegő micélium (Lm.) sötét zöldesszürke, bársonyos. Szubsztratmicélium (Szm.) barnássárga, gyengén ráncos. Oldódó pigment (Op.) világos barnássárga. — 2. PA : Lm. nem fejlődött. Szm. világos sárga, vékony, leperszerűen kiterjedt. Op. világos sárga. — 3. Burgonya-blokk : Lm. szürkés, porszerű. Szm. világos sárga, ráncos. Op. világos barnászörös. — 4. GAA : Lm. hamuszürke, bársonyos. Szm. sötét barnászürke, kezdetben zöldes árnyalattal, gyengén ráncos. Op. világos sárgásbarna. — 5. KA : Lm. sötét vörösszürke. Szm. sötét barnászürke. Op. világos barna. — 6. SA : Lm. fehéresszürke, porszerű. Szm. színtelen. Op. hiányzik. — 7. MA : Lm. sötét zöldesszürke, bársonyos. Szm. smaragdzöld, kezdetben ponszerű majd összenő. Op. világos zöldesbarna. — 8. Glukóz-glikokoll-agar (Pridham-Gottlieb szintetikus tápközege) : Lm. sötét zöldesszürke, bársonyos. Szm. fahéjbarna, ráncos. Op. barnássárga. Bouillon-pepton-glukóz rázatott kultúrában hűsvörös színanyagot képez. Ez a pigment nem gátló hatású. Mikromorfológia : a felsorolt tápközegeken csoportosan elhelyezkedő spirális spórahordozókat figyeltünk meg 1—4 kanyarulattal. A spórák hosszúkásak, gyakran szögletesek. Méretük $0,9—1,1 \times 1,0—1,8$ u. A spórahordozók kanyarulatai általában zártak.

Az 1. táblázaton többek között a *Str.* Ca-6 törzs egy jellegzetes kultúr vonalának az α -19-nek, mint a törzs tipikus képviselőjének néhány fiziológiai tulajdonságát láthatjuk feltüntetve. Ezek kiegészítésül még a következőket jegyezzük meg. A törzstípusra jellemző a pozitív tirozináz hatás (barna színképzés tirozin tartalmú tápközegben), a gyengén pozitív hemolitikus képesség. Erős földszagot árasztanak, különösen fehérje tartalmú tápközegeken. Hőmérsékleti optimumuk 26—29 °C között van, 38 °C-on alig, 45 °C-nál már egyáltalán nem fejlődnek. 65 °C-on nedves melegben a spórák csírázóképeségük 80%-ban károsodnak. pH 5,0 alatt nem fejlődnek. 1,0% NaCl fejlődésükben stimulációt idéz elő, míg 3,0% már teljes gátlást.

A *Str.* Ca-6 törzsön belül nagyszámú variánst különítettünk el, melyek közül a következőkben csak hárommal foglalkozunk (α -12, α -41 és α -41-x jelzéssel), mivel ezek vizsgálata a termelt gátlóanyagnak az anyagcserében vitt jelentősége megértése szempontjából — mint erre később rátérünk — különösen fontosnak bizonyult. Az 1. és 2. táblázatok anyaga e variánsok fiziológiai és morfológiai-kulturális tulajdonságait szemlélteti a törzstípus bélyegeit viselő Ca-6- α -19 adataival összehasonlítva.

1. táblázat

A *Streptomyces* Ca-6-törzs és variánsainak összehasonlítása

	Ca-6- α -19	α -12	α -41	α -41-X
A hatóanyag produkció titere	400—800	200—400	0	0
A spórák hatóanyag érzékenysége	0	0	+	+
A vegetatív micélium hatóanyag érzékenysége	0	0	+	+
Patológias jelenségek	+	++	0	++
Nitrát-redukció	alig	alig	erős	erős
Zselatin-folyósítás	lassú	lassú	lassú	lassú
Tej-peptonizáció	alig	alig	alig	alig
Tej-koaguláció	gyors	gyors	gyors	gyors
Spórahordozók	spirál	spirál	spirál	spirál
Spórák mérete μ -ban	0,9—1,1× 1,0—1,8	0,8—1,1× 0,9—1,8	0,8—1,1× 0,8—1,6	0,8—1,1× 0,6—1,6
A szubsztrát micélium fonalainak vastagsága μ -ban	0,6—0,8	0,5—0,8	0,5—0,9	0,5—0,9

Az α -12 jelzésű variáns annyira hasonlít a törzstípushoz kulturális tulajdonságait tekintve, hogy a 2. táblázaton külön fel sem tüntettük, ugyanez a helyzet az α -41 és az α -41-x viszonylatában is. A C-forrás vizsgálatok szerint, melyeket itt nem részletezünk, az α -19 és az α -12 között fiziológiailag is alig van lényeges eltérés, míg az α -41-x csupán az α -41-nek egy d-szorbit értékesítő változata. Lényeges azonban a 41-jelzésű variánsok eltérése a törzstípustól. Ez élesen megnyilvánul a cellulózbontásban, d-mannit, melibióz, d-xilóz, stb. értékesítésében, a nitrát redukcióban és igen kife-

jezeten a kulturális tulajdonságokban. Ezen lényeges differenciák készítették bennünket arra, hogy felkérjük Mészáros János eget. docenst (Állatorvosi Főiskola) a Ca-6 törzstípus és a 41-jelzésű variáns szerológiai összehasonlítására. Szóbeli közlése szerint a törzstípus és a variáns szerológiailag azonosíthatóak voltak.

Patológias jelenségek

A *Str.* Ca-6 törzs valamennyi típusos kultúráján már közvetlenül az izolálás után is patológias jelenségeket figyeltünk meg. Ezek: állandóan jelentkező hajlam nemspórázó szektorok képzésére (3. ábra), melyek utólagosan vagy sterilek maradnak vagy hosszabb idő után fejlesztenek csak spórahordozókat és spórákat. Ugyancsak megfigyeltünk — különösen a tenyészetek korának előrehaladásával — lizisre visszavezethető jelenségeket, melyek a kolóniák részleges pusztulásának képét mutatták. Mindez különösen élesen nyilvánult meg az α -12 variáns esetében, melynek nemcsak általános fejlődése volt gyengébb a törzstípusnál, hanem kulturái viszonylag gyorsan üvegszerűvé váltak és tönkre mentek. Az α -41 variáns megfigyeléseink szerint mentes

2. táblázat

A *Streptomyces* Ca-6-törzs és variánsának (α -41) növekedése különböző tápközegen

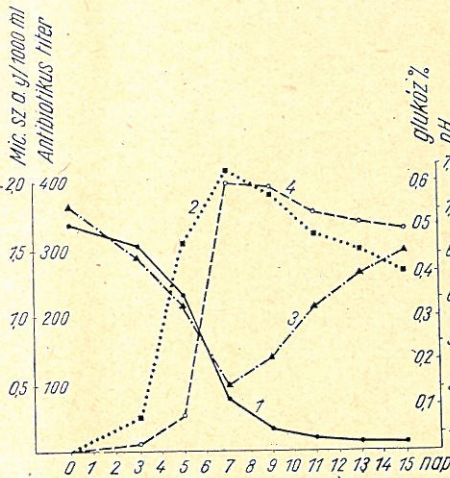
Tápközeg	Burgonya-agar		Pepton glicerin-agar		Módosított Cohn-agar		Glukoz-aszparagin-agar	
	α -10	α -41	α -10	α -41	α -10	α -41	α -10	α -41
Levegő micélium	hamuszürke, porszerű	hamuszürke, porszerű	—	hamuszürke, porszerű	—	szürkés fehér, bársonyos	hamuszürke, bársonyos	világos, közep-szürke, bársonyos
Szubsztrat micélium	vöröses barnarácós	zöldes ill. barnás-sárga, rácós	színtelen, lepel-szerű	világos sárga, rácós	színtelen, lepel-szerű	halvány-sárga, lepel-szerű	sötét barnás-szürke, gyengén rácós	sárga, gyengén rácós
Oldódó pigment	vöröses-barna	sárgás-barna	barnás-sárga	barnás-sárga	—	—	világos, sárgás-barna	—

volt a fenti kórképtől, míg az α -41-x bár asporogén szektorokat nem képzett, a részleges lizis jelenségeit ugyancsak erőteljesen tanúsította. Ezen megfigyelések készítették bennünket az esetleges fág jelenlétének kimutatására. E célból valamennyi fág gyanus variáns és törzstípust megvizsgáltuk, azonban az általunk alkalmazott biológiai módszerek segítségével szaporodásra képes fág jelenlétét kimutatni nem sikerült.

A gátlóanyag produkciója

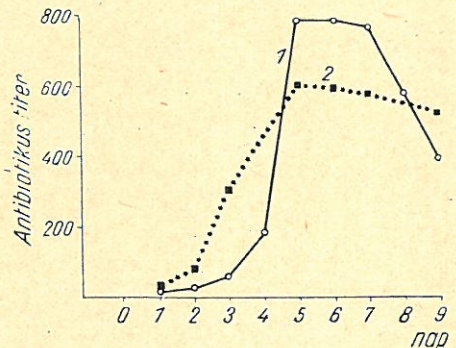
A gátlóanyag produkciójára egyaránt alkalmasnak bizonyult szintetikus és természetes összetételű tápközeg, mégpedig elsősorban folyadékkultúrák, rázatott körülmények között 28 C°-nál nem magasabb hőmérsékleten. Folyékony állókultúrákban, továbbá szilárd táptalajokon felületi növekedést biztosítva, a termelt gátlóanyag mennyisége igen alacsony szintet képviselt. Ilyen esetekben a kultúrmediumban a sugárgombaellenes titer gyakran az 50—80-at nem érte el. A fermentáció jel-

legzetes menetének lefutását egy szintetikus tápközegen az 1. ábrán mutatjuk be. E tápközeg összetétele: (%-ban) 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; pH 6,8. Látható, hogy a 7-ik napon, amikor a kultúrfolyadékban a glukóz mennyisége (Schoorl—Regenbogen módszerével meghatározva) 0,1%-os nivóra szállt alá, a micelium szárazanyagossága a maximumát érte el, teljesen párhuzamosan az antibiotikus titer alakulásával. A 7-ik nap után a szárazanyagossága csökkenése volt észlelhető, ami a már megindult autolízisre vezethető vissza, és amit a tápközeg pH értékének emelkedése is — mely a 7-ik napig pH 5,0 körüli nivóra szállt alá — ugyancsak jelez. A 7-ik nap után, vagyis ami nagyon fontos a fokozott mérvű autolízis megindulásával, a kultúrfolyadék gátlóanyag-szintjének is lassú csökkenése következett be, ami kapcsolatba hozható az anyagok gyengén savanyú, neutrális vagy gyengén lúgos közegben tanúsított kevésbé stabil mivoltával. A természetes tápforrások, különösen fehérje tartalmú tápközeg a gátlóanyag termeléséig mindig magasabb szintjét teszik lehetővé, amit az organikus és anorganikus N-forrás egyidejű alkalmazásával csak tovább fokozhatunk. A 2. ábrán bemutatjuk az α -19 jelzésű tenyészet rázatott kultúrfolyadékában az antibiotikus titer alakulását, mégpedig egy, organikus és anorganikus N-forrást egyaránt tartalmazó



1. ábra.

A glukóz (1), a micelium szárazanyagossága (2), a pH (3) és a sugárgombaellenes titer (4) változásai a *Str.* Ca-6- α -19 rázatott, szintetikus folyadék-kultúrájában.



2. ábra.

A sugárgomba ellenes titer változásai a *Strep. tomyces* Ca-6- α -19 törzs rázatott kultúrfolyadékában a tenyészidő alatt. 1. Buillon—X. 2. Waksman-tápközeg.

tápközegen (Bouillon-X), továbbá a Waksman-táptalajon (ennek összetétele: glukóz 1,0; pepton 0,5; húskivonat 0,5; $NaCl$ 0,5 [adatok %-ban]; pH 7,1). A nagyobb termelés az első táptalajon jól látható, jelen esetben az 5-ik nap körüli maximummal. Vizsgálataink szempontjából — és erre később még visszatérünk — igen fontosnak mutatkozott, az autolízis és általában a litikus jelenségek közelebbi megfigyelése a fermentáció ideje alatt. Ezért a beoltástól számítva minden 24 órában a rázatott kultúrfolyadékból steril körülmények között mintát vettünk és a fejlődő miceliumot fáziskontraszt mikroszkóp segítségével 1350 x-es nagyítással figyeltük meg. Ilyen vizsgálatot szintetikus és összetételében fehérjét tartalmazó tápközeg esetében egyaránt végeztünk. Az eredmények szerint a fermentáció első

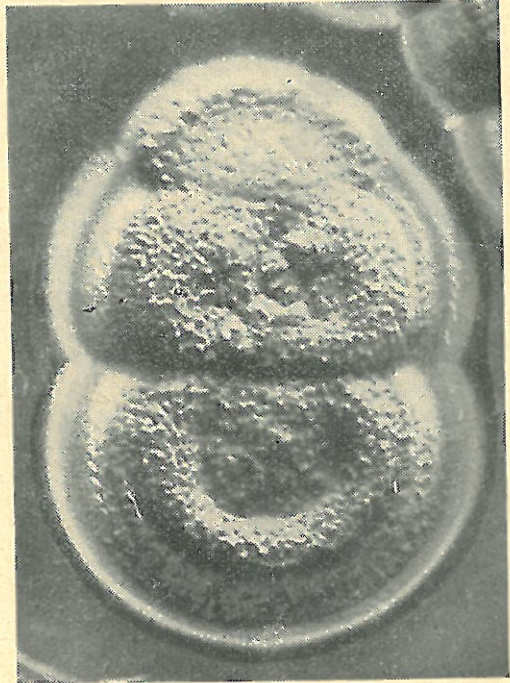
periódusában, mégpedig a gátlóanyag szint növekedésének idején litikus jelenség — lizáló micélium fonalak — a fejlődő hifatömegnek csak igen csekély, elenyésző hányadán volt megfigyelhető, bár kétségtelen mindig kimutatható volt. A feltűnő ebben az időszakban a micéliumfonalakon belül észlelhető erősen és durván szemcsés állapota a protoplazmának. Annak eldöntésére, hogy a fermentáció folyamán — a törzstípus spóraszuszpenziójával beoltott tenyészetekben — a patológiás jelenségekre hajlamos vagy kevésbé hajlamos alakok milyen mérvű fejlődésnek indulnak és arányuk hogyan viszonyul a fermentofolyadék gátlóanyag szintjéhez, ugyancsak megfigyeléseket végeztünk. Évégezt a fermentáció lefutásának különböző időpontjaiban vett mintákból nyert micélium-tömeget szétráztuk és GAA-agaron szélesztettük mégpedig oly nagy hígításokban, hogy a kifejlődő kolóniák egymástól függetlenül növekedhessenek és megfigyelhetők legyenek. Észleleteink szerint a magas antibiotikus titerű fermentofolyadékokban a patológiás jelenségekre hajlamosabb kolóniák nagyobb számáránya nem volt kimutatható.

UV-besugárzás hatása a gátlóanyag termelésre

UV-fénnyel egyre növekvő dózisokban (egészen a letalitásig) besugárzott spóratömeg ill. vegetatív micélium utólagos fermentációban nem produkált — a kontrolhoz viszonyítva — magasabb gátlóanyag szintet, és a produkció lefutásában sem észleltünk olyan értelmű eltolódást, mely a hatóanyagának az általános autolízis állapotában való keletkezésére engedne következtetni.

A gátlóanyag

Seitz—EK szűrőn aktivitásának vesztesége nélkül halad keresztül. A cellophanmembránon át nem dializál. Aktív szénezen adszorbeálódik, de eluálása problematikus. Az agarban viszonylag jól diffundál. A tripszin 36 C°-on pH 8,0-nál nem hatastalanítja. A pepszin 40 C°-on pH 2,0-nél gyorsan inaktíválja. A kultúrfolyadékból továbbá vizes oldatából ammoniumsulfáttal 70%-ra való telítés mellett kiszótható. Vizes oldatában 30 C°-on pH 2,0—9,0-ig stabil (30 percig vízfürdőn), 50 C°-on pH 6,0—10,0 között 10 perc alatt aktivitásának több mint 90%-át veszti el. Erősen savanyú körletben, így pH 5,0—2,0 között, stabil formát vesz fel. Ilyen alakban pH 2,0—9,0-ig termostabillá válik. Így pl. pH 3,0-nál vizes oldatában 98 C°-on 30 perc alatt sem veszít aktivitásából. Vízben jól oldódik, azonban vizes oldatából egy sor organikus oldószerekkel mint éterrel, benzollal, kloroformmal, stb. nem extrahálható. Mindezen tulajdonságok alapján arra következtethetünk, hogy a szóbanforgó gátlóanyag fehérjekarakterű.



3. ábra.

Asporogen szektor kiválása a *Streptomyces* Ca-6- α -19 törzs tenyészetében glukóz-asparagin agaron. (kb 20-szoros nagyítás)

A hatóspektrum

A gátlóanyag aktivitása eddigi vizsgálataink alapján kizárólag sugárgombatörzsekkel szemben nyilvánul meg. Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok, továbbá élesztők és penészgombák irányába teljesen hatástalan. Így inaktívnak bizonyult a *Staphylococcus albus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterium mucosum*, *Mycobacterium sp.*, *Saccharomyces carlsbergiensis*, *Rhodotorula rubra*, *Penicillium granulatum*, *Aspergillus flavus*, *A. foetidus*, *A. niger*, *Trichothecium roseum*, *Rhizopus nigricans*, *Botrytis cinerea*, *B. allii*, stb. fajokkal szemben, továbbá ugyancsak hatástalannak mutatkozott mintegy 100 talajlakó Gram-pozitív és Gram-negatív szaprofita baktériumtörzs irányába. Aktivitása nem terjedt ki az általunk vizsgált valamennyi *Streptomyces*-törzsrre sem. E szervezetek között a szenibilitásra megvizsgált törzsek mintegy 60—65%-a bizonyult érzékenynek. Ezek között is nagy különbségek mutatkoztak az érzékenység szempontjából. Így pl. az általunk előállított tisztított preparátumok csupán néhány százszoros hígításban hatottak a *Streptomyces rimosus*, *Str. aureofaciens* és a *Str. griseus* egyes törzseire. A *Str. floridae* (*Str. griseus* var. *purpureus*) egy törzse a kivonatok 10 000 x-es hígításával szemben is érzékenységet tanúsított. Egy sor, a színes *Streptomyces* fajokhoz tartozó, sugárgombatörzs spórája még az 50—60 000 x-esen hígított gátlóanyag jelenlétében sem csírázott ki. Az általunk értékmérésre használt *Streptomyces* sp. M—15 érzékenységi határa ugyanezen preparátumok esetében a 60 000 x-es hígítás volt. Ezeket a vizsgálatokat a gátlóanyagkészítmény Seitz—EK szűrőn át szűrt vizes oldatával, a lyukteszt módszerrel végeztük GPA-agaron. A gátlóanyag hatékony koncentrációja jelenlétében az érzékeny törzsek spóráinak csírázása elmarad, a vegetatív micélium pedig lizisen megy keresztül. A gátlóanyag antibiotikus hatását a termelő *Str. Ca-6* törzsekre még a legaktívabb preparátumok esetében sem tudtuk kimutatni. A szelekció során kitenyészített és α -41-es jelzéssel ellátott variánsok a szóbanforgó gátlóanyagot nem produkálták, ezzel szemben irányába — bár alacsony fokú (így a 60 000-es titerű preparátumok maximum 1000-es hígításával szemben) — határozott érzékenységet tanúsítottak. A törzstípushoz tartozó mindazon tenyészetek, melyeken a patológiás jelenségek — különösen az erőteljes autolízis — előtérbe nyomultak és ennek következtében gyengébb fejlődésviszonyokat is tanúsítottak, fermentációba vonva, gátlóanyagot alacsonyabb koncentrációban produkáltak. Érzékenységük azonban ezen anyaggal szemben ugyancsak nem volt kimutatható.

A vizsgálati eredmények megbeszélése

Mint látható, az általunk kitenyészített *Streptomyces* Ca-6 jelzésű törzs típusos tenyészetei, igen nagyfokú specifikusságot mutató, protein-jellegű gátlóanyagot termelnek, melynek aktivitása csupán közelrokon szervezetekre, más *Streptomyces*-fajokra ill. törzsekre terjed ki. Ez az anyag a termelő törzsrre nem fejt ki gátló hatást, nem fág-karakterű, sőt még egy esetlegesen egyidejűleg kimutatható virulens fág jelenlétét sem tudtuk megállapítani. Ilyen csupán közel rokon szervezetekre aktív, protein-jellegű, letális hatást kiváltó gátlóanyagok produkcióját a mikroszervezetek körében elsősorban a bélbaktériumok csoportjából ismerünk. Így a *Gratia* által [3] leírt kolicin, melyet egyes kolibacillus törzsek kultúrájából nyertek, elsősorban más kilitörzsekre hatékony, és legfeljebb egyes kolibacillusok speciális kolicin-változatának hatóspektruma terjed ki még az ugyancsak rokon *Shigella* és *Salmonella* törzsekre is. Ezeknek a kolicineknek a gátlóspektruma még az egyes kilitörzsek irányában is igen szelektíven nyilvánul meg, hasonlóan az általunk kimutatott gátlóanyagéhoz,

mely ugyancsak szelektíve hatott a különböző *Streptomyces* fajok és törzsek irányába. A kolicinekhez hasonló természetű anyagokat nyertek még a *Pseudomonas pyocyanea* egyik törzsének kultúrájából, melyet pyocin-nak neveztek el [4] stb. A legutóbbi évek vizsgálatai kimutatták, hogy ezeknek a specifikusan közelrokon szervezetekre ható, protein-jellegű gátlóanyagoknak a létrejötte bonyolult összefüggést mutat a fággenézis folyamatával és képződésük letális bioszintézis eredménye. Ez a folyamat (melyet Lwoff bakteriocinogenezisnek nevezett) amely a kolicinek, piocin stb. (együttesen bakteriocinek) szintéziséhez vezet, lényegében abban áll, hogy a mikroba plazmájában valamilyen ok folytán nem teljes fág szintézis megy végbe és ennek következtében csak a fág „talpi”-részét képező — a fágfertőzés fajlagosságát hordozó és a letális hatást kifejtő — protein jön létre. Ez a protein ugyanazon hatóspektrumú, mint a komplet fág és bár elpusztítja az érzékeny szervezetet, abban önmagát megsokszorozni nem képes. A bakteriocinogenezis folyamata ma még nagyon kevésbé ismert jelenség, jóllehet már mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív baktériumok körében sikerült kimutatni. Ami a sugárgombákat illeti itt a fághordozás jelensége ismert és részben tanulmányozott is [13, 14], de az aktinofág biológiája alig [1], az aktinofággenézis pedig nagyon kevésbé kutatott terület.

A *Str.* Ca-6 törzsrre ill. ennek hatóanyagára vonatkozóan tett megfigyelések, a jelen körülmények között, a bakteriocinekhez való bizonyosmértékű összehasonlíthatóságnál többre nem jogosítanak fel. Így a kísérletek arra utalnak, hogy a gátlóanyag termelése nem postletális szintézis eredménye, mivel a fermentációs görbe lefutása szerint a vegetatív micélium tömegének növekedésével párhuzamosan emelkedik a kultúrfolyadék sugárgomba ellenes títtere, és a tenyészet pusztuló stádiumában ez a titer már nem növekedett, hanem ellenkezőleg csökkent. Fennáll még annak a lehetősége, hogy a hatóanyag szintézis a növekvő stádiumban is állandóan jelentkező, és a micéliumfonalaknak csak bizonyos szakaszaira szorítkozó, litikus folyamatok keretében megy végbe. Ezeknek a lokális liziseknek másfajta — talán a látens vírus jelenlétével összefüggő — indukciójával lehetne számolni, eltérően a tenyészetek tömeges tönkremenetelekor jelentkező autolizist kiváltó okoktól, és míg az előbbi a specifikus fehérje szintéziséhez vezet, az utóbbi ilyen nem produkál. Ezt a megfontolást nem támasztják alá az UV-fénnyel végzett besugárzási kísérletek. Ismeretes ugyanis, hogy nemcsak a lizogén baktériumtenyészetekben lehet indukáló eljárásokkal — így igen hatásosan ultraibolya-besugárzással — a fertőzőképes fág fokozott képzését kiváltani, hanem hasonló eljárással a bakteriocinek növekvő mértékű szintézisét is indukálni lehet. A *Str.* Ca-6-törzs besugárzott tenyészeit — akár spóra, akár vegetatív micélium képezte a besugárzás tárgyát — az utólagos fermentációban nem hoztak létre magasabb hatóanyag szintet, mint a kontrollok. A lizátumban sem észleltük a gátlóanyag szintézisének fennforgását. Egyébként az eredmény mindig ugyanez volt, bárhogy is módosítottuk a sugárzási dózisokat.

A legproblematisabb volt számunkra a leírt patológiás jelenségek értelmezése és ezek esetleges kapcsolata a gátlóanyagképzéssel. Bizonyos körülmények között a szilárd táptalajon növekvő törzsek részleges lizise nagyon fág-tarfolatokra emlékeztetett, de fág jelenlétét mégsem tudtuk megállapítani. Úgy látszik a variánsok szelekciója e kérdésre némi fényt vet, mivel sikerült a patológiás jelenségektől mentes (α -41), de gátlóanyagot nem terhelő, sőt ez iránt érzékeny, továbbá a patológiás jelenségektől terhes, de ugyancsak nem termelő és szenzibilis (α -41-X) variánsokat egyaránt elkülöníteni.

Láthatjuk az itt előadottakból, hogy a *Str.* Ca-6 törzs tenyészeitől kimutatott gátlóanyagot, mely tulajdonságaiban sokban emlékeztet a bakteriocinokra, a sugárgombáknál esetlegesen megnyilvánuló és a bakteriocinogenezissel analóg folyamat

eredményének ma még nem tekinthetjük. Azonban tekintetbe véve a nemkomplet fágképzésre vonatkozó ma még hiányos ismereteinket, ennek lehetőségét sem zárhatjuk ki. E kérdés további vizsgálatokat igényel.

Összefoglalás

1. Az általunk izolált *Streptomyces* Ca-6 jelzésű sugárgombatorzs tenyészetéből protein-jellegű gátlóanyagot különítettünk el, melynek szelektív antibiotikus hatóspektrumát a *Streptomyces*-genus bizonyos fajai ill. törzsei irányába észleltük csupán.

2. A gátlóanyag produkciójára vonatkozó fermentációs kísérletek, a mikromorfológiai megfigyelések, az ultraibolya besugárzással megkísérelt indukció, a patológias jelenségeknek a törzstípusokon és a variánsokon végzett összehasonlító megfigyelése, stb. alapján e hatóanyag szintézise és a baktériumok körében ismeretes bakteriocinogenezis folyamata között nem lehetett határozott analógiát megállapítani.

Érkezett: 1957. október 30.

Irodalom

- [1] *Carvajal, F.*: Host-parasite relations with a polyvalent Streptomycephage from *Streptomyces griseus*. *Antibiotics & Chemother.* 5. 28. 1955.
- [2] *Fredericq, P.*: Colicines et bacteriophages. *Ann. Inst. Pasteur*, 84. 294. 1953.
- [3] *Gratia, A.*: Des relations numériques entre bactéries lysogènes et particules de bacteriophage. *Compt. rend. soc. biol.* 122. 812. 1936.
- [4] *Jacob, F.*: Les bacteries lysogènes et la notion de provirus. *Monographies de l'Institut Pasteur*. Masson et Cie Paris. 1954.
- [5] *Krassilnikoff, N. A.*: La classification des actinomycetes producteurs d'antibiotiques. *Ann. Ins. Pasteur.* 92. 597. 1957.
- [6] *Kraszilnyikov, N. A.*: Opredelatelj bakterij i Aktinomycetov. *Izd. Akad. Nauk. SSSR, Moszkva.* 1949.
- [7] *Lindenbein, W.*: Über einige chemisch interessante Actinomycetenstämme und ihre Klassifizierung. *Arch. Mikrobiol.* 17. 361. 1952.
- [8] *Lochhead, A. G. & Landerkin, G.*: Aspects of antagonisms between micro-organisms in soil. *Plant and Soil.* 1. 271. 1949.
- [9] *Lwoff, A.*: Lysogeny. *Bact. Rev.* 17. 269. 1953.
- [10] *Peterson, A. E.*: A study of cross antagonisms among some Actinomycetes active against *Streptomyces scabies* and *Helminthosporium sativum*. *Antibiotics & Chemother.* 4. 145. 1954.
- [11] *Pfennig, N.*: Untersuchungen an Actinomycin-bildenden Strahlenpilzstämmen und deren Actinomycinen. *Arch. Mikrobiol.* 18. 327. 1953.
- [12] *Pridham, T. H. & Gottlieb, D.*: The utilization of carbon compounds by some actinomycetales as an aid for species determination. *J. Bact.* 56. 107. 1948.
- [13] *Rautenstein, J. I.*: Aktincfagija. Autocreferat disszertacii. *Mcszkva* 1957.
- [14] *Reilly, H. C., Harris, D. A., & Waksman S. A.*: An actinophage for *Streptomyces griseus*. *J. Bact.* 54. 451. 1947.
- [15] *Szabó, I.*: Antibiotika erzeugende Actinomyceten in Bäden Ungarns. *Naturwiss.* 43. 330. 1956.
- [16] *Szabó, I.*: Adatok a magyarországi talajek sugárgombafőcájára antibiotikus aktivitásának ismeretéhez. *Agrokémia és Talajtan.* 5. 433. 1956.
- [17] *Szabó, I.*: O faktorah, vlijajuscih na reszprcsztrancenie aktincmicetov producirujuscih antibioticeszkie vcsesesztva. *Mikrobiologija.* 25. 442. 1956.
- [18] *Waksman, S. A. & Icalalier, H. A.*: Actinomycetes and their Antibiotics. *Williams & Wilkins Comp. Baltimore.* 1953.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ПРИРОДЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ТОРМОЗЯЩИХ ДЕЙСТВИЙ
ЛУЧИСТЫХ ГРИБОВ

И. Сабо и М. Мартон

Лаборатория почвенной биологии АН Венгрии, Шопрон

Резюме

В ходе своих работ мы изучали свойства штамма лучистого гриба, изолированного из кислой лесной почвы. Этот штамм синтезирует вещество, специфического действия, которое оказывает активное тормозящее действие только на некоторые чувствительные штаммы лучистых грибов. Действующее начало этого вещества имеет белковый характер. Исследование по продукции этого вещества показали, что оно не является результатом послесмертного биосинтеза. Согласно приведенным рисункам во время ферментации (рисунок 1) максимальная величина антибиотического титра культурной жидкости наблюдается на 6—7 день (кривая ч. 4), что соответствует максимальной продукции сухого вещества мицелия (кривая ч. 2). Нам были проведены последования по биологической природе этого тормозящего вещества. Наша работа была подробно напечатана в журнале «Микробиология» на русском языке.

Untersuchungen über die spezifischen antibiotischen Wechselwirkungen
zwischen Actinomyzeten

I. SZABÓ und M. MARTON

Bodenbiologisches Forschungslaboratorium der Ungarischen Akademie der Wissenschaften,
Sopron

Zusammenfassung

Wir haben schon früher darauf hingewiesen, dass in den antagonistischen Wechselwirkungen zwischen Strahlenpilzen auch gewisse spezifisch — also nur gegen bestimmte andere Actinomyzeten aktiv — wirkende Hemmstoffe eine Rolle spielen. Die Untersuchungen über diese Stoffe scheinen nicht nur von systematischen, sondern auch allgemein biologischen Gesichtspunkten für diese Organismen als wichtig und bedeutend.

Laut unseren Untersuchungen, produziert ein, aus sauerem Waldboden isolierter Strahlenpilzstamm (*Streptomyces* sp. Ca-6) einen streng spezifischen, und nur gegen gewisse Strahlenpilzarten bzw. Stämme aktiven proteinartigen Hemmstoff. Der *Streptomyces* Ca-6 Stamm war systematisch nicht genau bestimmbar. Dieser Stamm ist durch hellgelbes bzw. braunlichgelbes oder grünliches Substratmycel, dunkel grünlichgraues oder graues, sammetiges Luftmycel und durch ein auch auf synthetischen Nährböden erscheinendes, hellbraunlichgelbes lösliches Pigment gekennzeichnet. Dieser Stamm bildet spirale Sporophoren mit 1—4 Windungen und mit länglichen, winkelförmigen Sporen. Auf syntetischen Nährböden nach Pridham—Gottlieb wird Amylum, Dextrine, D-Maltose, D-Mannose, D-Fructose, D-Galactose, Caramid positiv verwertet, wogegen Cellulose, i-Inosit, D-Mannit, D-Sorbit, Dulcitol, D-Raffinose, Saccharose, Inulin und NaNO_3 nicht verwertet wird.

Der Hemmstoff konnte sowohl aus der syntetischen als auch der natürlichen, flüssigen, geschüttelten Kulturflüssigkeit des *Streptomyces* Ca-6 Strahlenpilzstammes nachgewiesen werden. Die maximale Produktion des Wirkstoffes wurde aber in der Bouillon-Pepton-Glucose geschüttelten Kulturflüssigkeit nach einer fünftägigen Inkubation bei 28° C beobachtet. Der Hemmstoff geht ohne Verlust seiner Aktivität durch das Seitz EK-Filter, Membrane aus Zellophan ist jedoch für ihn unpassierbar. Durch aktive Kohle wird er adsorbiert. Im Agar diffundiert er verhältnismässig gut. Das Trypsin macht bei 36° C und pH 8,0 nicht unwirksam. Das Pepsin inaktiviert aber bei 40° C und pH 2,0 sehr schnell. Aus der Kulturflüssigkeit, sowie aus dessen wässriger Lösung lässt sich der Hemmstoff bei Sättigung auf 70% mit Ammoniumsulfat aussalzen. In seiner wässrigen Lösung bei 30° C von pH 2,0 bis 9,0 ist er stabil 30 Minuten im Wasserbad. Bei 50° C während 10 Minuten von pH 6,0 bis 10,0 verliert er mehr als 90% seiner Aktivität, nimmt dagegen in stark saueren Bereich (pH 5,0—2,0) stabile Form auf. In solcher Form ist er von pH 2,0 bis 9,0 thermostabil. Bei pH 3,0 in wässriger Lösung, bei 98° C zum Beispiel verliert er auch während 30 Minuten nichts von seiner Aktivität. Der Hemmstoff löst sich im Wasser gut, lässt sich aber aus seiner wässrigen Lösung mit Äther, Benzol, Chloroform und anderen organischen Lösungsmitteln nicht extrahieren.

Aus diesen Erfahrungen ist darauf zu schliessen werden, dass der Hemmstoff einen Eiweissstoff-Charakter besitzt.

Die antibiotische Aktivität erstreckt sich — laut unseren bisherigen Untersuchungen — nur gegen die Strahlenpilzstämme. Gegen Grampositive und Gram-negative Bakterien, sowie Hefe und Schimmelpilze ist der Hemmstoff unwirksam. Er erwies sich als inaktiv gegenüber *Staphylococcus albus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterien*-Arten, *Saccharomyces carlsbergiensis*, *Rhodotorula rubra*, *Penicillium granulatum*, *Aspergillus flavus*, *A. foetidus*, *A. niger*, *Trichothecium roseum*, *Rhizopus nigricans*, *Botrytis cinerea*, *B. allii* sowie etwa 100 Gram-positive und negative bodenbewohnende Saprophyten-Bakterien.

Die Wirkung erstreckt sich nicht auf alle untersuchten Streptomyces Stämme. Die Zahl der sensiblen Streptomyces-Stämme beläuft sich auf 60—65%. Auch unter diesen wurden in der Empfindlichkeit grosse Unterschiede beobachtet. Die hergestellten Präparate haben z. B. nur in mehr hundertfacher Verdünnung auf die Stämme, *Streptomyces rimosus*, *S. aureofaciens* und *S. griseus* gewirkt. Ein Stamm des *S. floridae* (*Streptomyces griseus* var. *purpureus*) hat selbst bei 10 000-facher Verdünnung der Extrakte Empfindlichkeit gezeigt. Bei einer Reihe anderer farbigen Act.-Stämme hat unter Einwirkung der Präparate in 50—60 000-facher Verdünnung die Sporenkeimung eine Hemmung erlitten. Bei einem von uns früher isolierten Str. sp. Stamm (Kennzeichen M-15) zeigte sich die Empfindlichkeit bei 60 000-facher Verdünnung desselben Präparates.

Diese Untersuchungen wurden mit Verdünnungen der durch Seitz EK-Filter filtrierten wässrigen Lösung des Präparates, mit Hilfe der Lochtestmethode, auf GPA-Agar, gegen in Form von Sporensuspension aufgeimpfte Strahlenpilzen als Testorganismen ausgeführt. GPA-Agar: Glucose 10,0 g; K_2HPO_4 2,0 g; $MgSO_4$ 0,4 g; NaCl 0,2 g; $FeSO_4$ Spur; $(NH_4)_2 HPO_4$ 5,0 g, dest. Wass. 1000 ml; pH 7,0. Unter Einwirkung des Hemmstoffes ist die Auskeimung der Sporen der sensiblen Stämme völlig gehemmt worden, während die Hyphen des vegetativen Myceliums lysiert wurden. Ähnliche hemmende Wirkung wurde gegen den Kulturen des Stammes *Streptomyces* Ca-6, aus deren Kulturflüssigkeit der Hemmstoff nachgewiesen werden konnte, nicht beobachtet. Nach unseren Untersuchungen die Sensibilität der Strahlenpilzstämme wurde durch die Zusammensetzung der zur Testversuche verwendeten Nährböden auffallend beeinflusst. Zur Ausbildung einer maximalen antibiotischen Wirkung ist es notwendig in dem Nährboden — nach der Mengenverhältnisse übrigen Nährmedienbestandteilen — eine Niveau von PO_4 - 0,38—0,45% zu sichern. Zur Erreichen der erwähnten Phosphor-Niveau sind nur anorganische Phosphorverbindungen geeignet. Die Sensibilität der Testorganismen wurde durch die Qualität und auch durch die (zwischen gewissen Grenzen) Quantität der verschiedenen C- und N-Nährquellen und der anorganischen Salzen nur wenig beeinflusst.

Nach unseren Erfahrungen kann die Produktion des Hemmstoffes nicht als Folge einer postletalen Biosynthese betrachtet werden. Darauf weist auch der aus Abbildung No 1 ersichtliche Verlauf der Fermentation hin. In geschüttelten, synthetischen glucose- $(NH_4)_2 HPO_4$ Flüssigkeitskulturen erreicht das Mycelientrockengewicht sein Maximum am 7-ten Tage, so dann nimmt das Gewicht in Folge der Autolyse ab. Einen ähnlichen Verlauf hat auch die Kurve des antibiotischen Titters der Kulturflüssigkeit. Die stärkste Verdünnung der Kulturflüssigkeit oder der Präparate, woraus 0,2 ml mit der Lochtestmethode in einer Zone von 2—3 mm Radius noch eine volle Hemmung auf die Auskeimung der Sporen von sehr sensiblen Str. sp. M-15 auf GPA-Agar verursacht, betrachten wir als den antibiotischen (strahlenpilzfeindlichen) Titer. Die pH-Werte nehmen bis zum 7-ten Tage ab und steigen mit der beginnenden Autolyse wieder an. Mit Hilfe von UV-Bestrahlung ist es nicht gelungen, eine gesteigerte Hemmstoffbildung zu induzieren.

Im Sinne der obigen Ausführungen ist eine Analogie zwischen der Produktion unseres Hemmstoffes und dem Vorgang der sogenannten Bacteriocinogenesis nicht festzustellen. Letztere führt auch zur Bildung von proteinartigen Hemmstoffen die gegen die, mit dem produzierenden Organismus systematisch naheverwandten Mikroben spezifisch wirken. Es ist noch zu bemerken, dass mit dem wahrscheinlichen Vorkommen der erwähnten Stoffe, auch im Kreise der Strahlenpilze zu rechnen ist, weil die damit zusammenhängende Phagbildung auch zwischen der Actinomyceten sehr weit verbreitet ist.