

## A színképelemzés felhasználása mikrobiológiai vizsgálatoknál

MACHER FRIGYES és MANNINGER ERNŐ

MTA Geofizikai Értelmező Csoport, Sopron  
és MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete, Budapest

Bizonyos elemeknek, az úgynevezett *nyomelemeknek* igen fontos szerepe lehet a mikroorganizmusok anyagcsereforgalmában. A mikroszervezetek összetételének — főleg nyomelemszükségletének — ismerete alapján módunkban van bizonyos mikrobák számára a legoptimálisabb szintetikus táptalajt összeállítani.

A baktériumsejt vegyi összetétele, kémiája már régóta foglalkoztatja a kutatókat. Ma már tudjuk, hogy az összetétel nemcsak fajonként, de törzsenként is többé-kevésbé változó. Ez leginkább mégis attól a milieutól függ (elsősorban a táptalaj összetételétől, kémhatásától, a tenyésztési hőmérséklettől stb.), amelyben a baktériumok tenyésznek. Ezért is igyekeztünk kísérleteinket a lehetőséghez képest pontosan meghatározott környezetben (a táptalaj, a tenyésztés hőmérséklete és ideje) elvégezni.

A baktériumok testének összetételét megállapító vizsgálatokat mind-ezideig túlnyomórészt pathogen baktériumfajokkal végezték el. Jelen kísérleteinkkel kettős célunk volt: elsősorban azt kívántuk megállapítani, hogy a műszaki tudományokban és az iparban széleskörűen alkalmazott színképelemzés használható-e a mikrobiológiában is baktériumok szervesetlen alkotórészeinek meghatározására az eddig követett mikrokémiai vizsgálatok helyett; másodsorban két szaprofita baktériumfaj (*Sarcina citrea* és *Azotomonas insolita*) idáig közzé nem tett kémiai összetételét kívántuk meghatározni. A vizsgálatokat még a Földtan-teleptani Tanszéken és az MTA Talajbiológiai Kutató Laboratóriumában, Sopronban kezdtük.

### A felhasznált anyag és módszerek

A mikrobiológiai kutatásokban külföldön már történt kísérlet e módszer alkalmazására penészgomba konidiumok nyomelemeinek kimutatására (BAUTZ és HAGEN [2], KOCH és DEDIC [4]). Hazai viszonylatban TÖRÖK és SZAKÁCS [12] használták elsőnek a színképelemzést a mikrobiológiai gyakorlatban penicillin táptalajok réznyomainak meghatározására. Előfordult a penicillin ipari előállításakor, hogy egyszer jól tenyészett a penicillin gomba, míg más-kor egyáltalában nem nőtt. Utóbbi okát a szerzők a táptalaj rézszennyeződésében találták meg, amelynek meghatározására és ezzel a termelés megjavítására dolgozták ki eljárásukat.

Előkísérleteink során a szükséges baktériumanyagot szilárd babagar táptalajon tenyésztettük, követve CRAMER [3], NICOLLE és ALLLAIRE [10]

módszerét. A további vizsgálatokhoz azonban már nem az előbb mondott szilárd táptalajról vettük a vizsgálandó baktériumanyagot, hanem szintetikus táptalajban szaporítottuk tenyészeiteinket, hogy ezáltal kísérleteink egyértelműen bármikor megismételhetők legyenek [5]. Táptalajunk összetétele a következő volt (módosított Dox és Czapek-féle tápoldat): 30 g saccharose p. u. sc., 2 g natrium nitricum p. a., 1 g kaliumdihydrophosphoricum p. a., 0,4 g magnesium sulfuricum · 7 H<sub>2</sub>O p. a., 0,4 g kalium chloratum p. a., 0,01 g ferrum sulfuricum oxydulatum · 7 H<sub>2</sub>O p. a., 1000 ml kétszer desztillált-víz, pH = 7,2 az autóklavozás előtt. A saccharoset Seitz-szűrőn át való csírátlantás után adtuk az előzőleg sterilizált táptalajhoz.

A táptalajt is kétféle módon próbáltuk: fehérjealkotórészrel és fehérjealkotórészmentes, illetve aminosavmentes állapotban (az első esetben 3 g asparagint adtunk 1000 ml táptalajhoz). Mivel a baktériumok mind az asparagin tartalmú táptalajban, mind a szerves nitrogénforrás nélküliben csaknem egyformán jól szaporodtak, ezért asparagin nélküli táptalajt használtunk a továbbiakban.

### A kísérleti rész és az eredményekből levonható következtetések

A tenyészeteket három napra 25–30 °C hőmérsékleten, az oxigénjuttatás kellő kielégítésére vízszintes rázóra tettük. Centrifugálással nyertük a tenyészeteket a táptalajból. A sejteket háromszor mostuk kétszer desztillált vízzel, és centrifugálásuk után 110 °C-on szárítottuk (a víztartalom meghatározására). A szárazanyagot 600–700 °C-os elektromos kemencében izzítottuk és egyúttal meghatároztuk a szerves alkotórészek mennyiségét is [5]. Az elégetést azért végeztük alacsonyabb hőmérsékleten, nehogy az esetlegesen könnyebben illó alkotórészeket elveszítsük. Mikromérleggel lemértünk 30 mg-ot, majd ugyancsak 30 mg spektrálistizta szénporral elkevertük achátészésében. Az egész mennyiséget szénelektroda furatába helyeztük (1. ábra) egy egyszerű töltőberendezéssel [6]. Az elektródák alakozását elektródamaróval végeztük [7]. 220 V egyenáram és 10 A áramerősséggel gerjesztettünk 16 : 1 ívelési és hűlési viszonyú szaggatott ívvel percnként 78 megszakítással. A gerjesztőberendezés egy Török tervei szerint készült átalakított hazai gyártmányú kombinált szikra- és ívgerjesztő volt [8]. Az ívet nagyfrekvenciás impulzus gyújtja be, amely azután magától tovább ég. Középső leképzést használtunk 3,2 mm-es tárcsanyílással. Az elektróda távolság 2 mm volt, és így az izzó elektródák képe a tárcsára esett. A megvilágítás ideje 30 másodperc volt, míg az ISzP—22 kvarcspektrográf résszélessége 0,005 mm. Az elektródákat az optikai tengelybe egy szikra-állványra szerelt vetítőberendezéssel állítottuk be [9].



1. ábra  
Az elektród  
alakja

A felvételeket 9 × 24 cm-es Gevaert Scienza lemezekre készítettük, és három percig hívtuk keményen dolgozó metholhydrochinonos hívóban. A felvételeinket Zeiss SP—2 színképvetítővel értékeltük ki.

Vizsgálatainkhoz mindig pontosan ugyanazt az anyagmennyiséget mértük le, a felvételek körülményei is azonosak voltak, és így a baktériumfajok összetételének mennyiségi viszonyaira is következtethettünk. A színképek

kiértékelésénél, különösen a nyomelemek meghatározásakor, mindig az elemek legérzékenyebb (legutolsó) vonalait használtuk. Olyankor, amikor ezek az ISzP—22 kvarespektrográffal már rosszul érzékelhető területre estek, kény-

1. táblázat

**Az értékeléshez használt színeképvonalak hullámhosszúsága és az érzékenységek határai AHRENS [1] szerint**

(1) Elem	(2) A vonalak hullámhosszúsága Å-ban	(3) A kimutathatóság határa %-ban C elektródával	(1) Elem	(2) A vonalak hullámhosszúsága Å-ban	(3) A kimutathatóság határa %-ban C elektródával
Ag	3280,7	0,00005	K	4044,1	0,01—0,02*
Al	3092,7 3082,1	0,0002	Li	3232,6	0,0001
As	2349,8	0,01	Mg	2852,1 2795,5	0,0002
Au	2675,9 2427,9	0,001	Mn	2793,7 2576,1	0,001
B	2497,7 2496,8	0,001*	Na	3302,9 3302,3	0,001
Be	2348,6	0,001	Ni	3493,0 3414,8	0,0005
Bi	3067,7	0,002	Pb	2833,0	0,0005
Ca	3158,9	0,0002	Si	2881,6	0,002
Cd	2288,0	0,001	Sn	2840,0	0,001
Cu	3274,0 3247,5	0,0005	V	3185,4	0,0005
Fe	3020,6	0,0005	Zn	3345,0	0,01
Ge	3039,0 2651,1	0,0005			

\* A kimutathatóság értékei ugyan C-elektrodára vonatkoznak, de a használt Cu-elektroda sem okoz lényegesebb érzékenység változást.

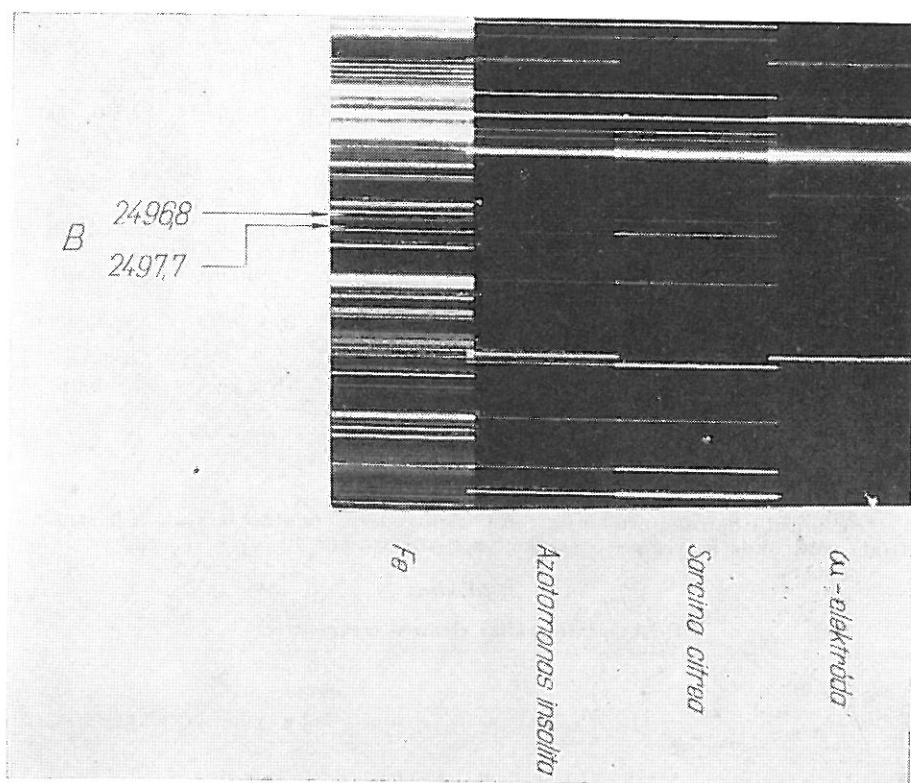
2. táblázat

**A spektrográfiai elemzés eredményei**

(1) Baktériumfaj	(2) Elem																						
	Ag	Al	As	Au	B	Be	Bi	Ca	Cd	Cu	Fe	Ge	K	Li	Mg	Mn	Na	Ni	Pb	Si	Sn	V	Zn
Azotomonas insolita	3	5	0	0	3	0	0	5	0	5	6	0	3	0	6	4	6	4	2	4	2	3	0
Sarcina citrea	3	5	0	0	3	0	0	3	0	5	4	0	4	0	6	4	6	4	1	5	3	3	0

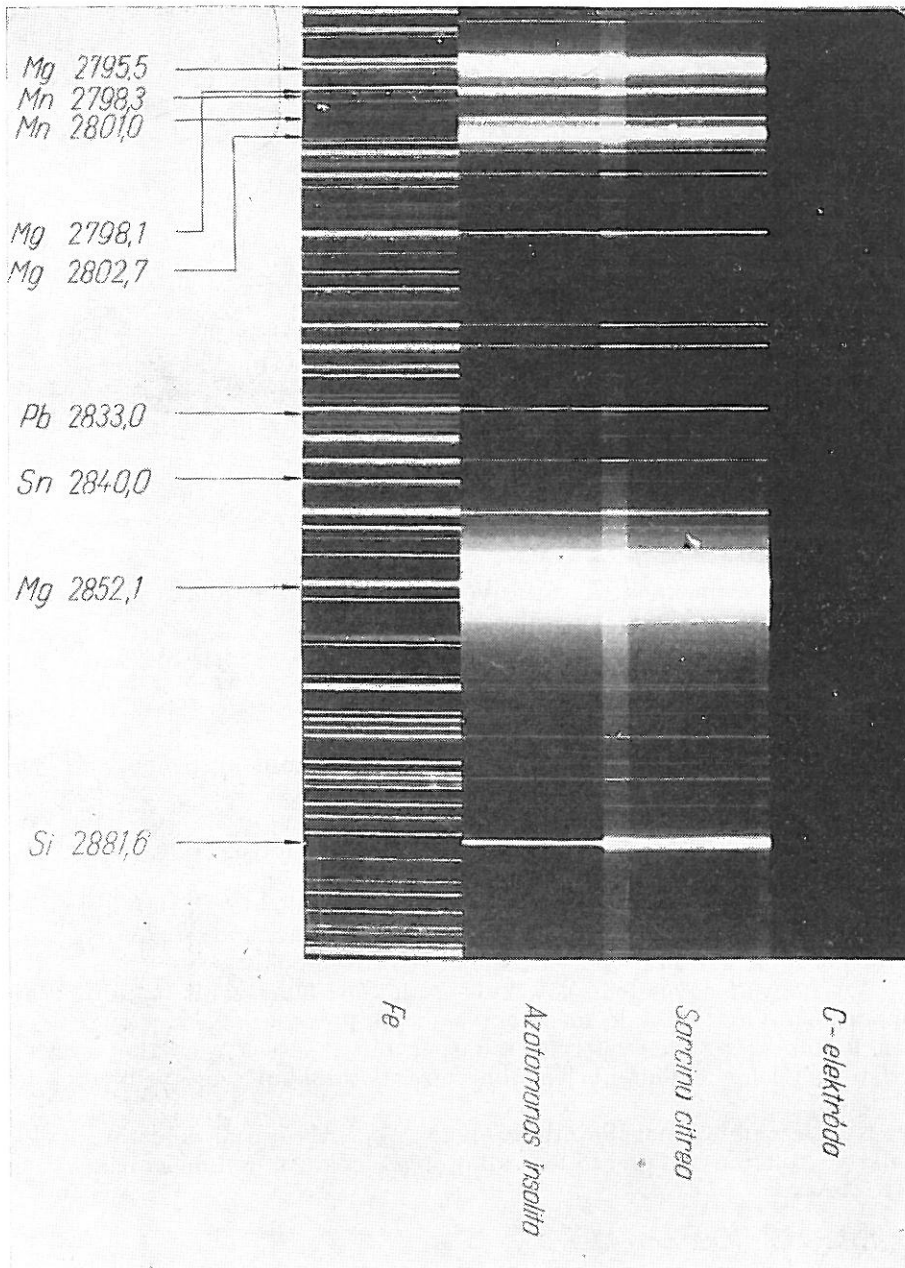
telenek voltunk kevésbé érzékeny vonalakat használni. A használt vonalak hullámhosszúságát az 1. táblázatban közöljük. Ugyanott megtaláljuk AHRENS [1] szerint a „gyenge nyom” fokozatnak megfelelő abszolút koncentráció értékeit is. Bár ezek az adatok állandó egyenáramú ívgerjesztésre vonatkoznak, mi pedig szaggatott ívvel dolgoztunk, mégis úgy gondoljuk, hogy hozzávetőleges mennyiségi becslésre nyugodtan használhatjuk ezeket az értékeket, mert szaggatott ívünk hűlési ideje olyan rövid, hogy lényeges érzékenység csökkenés nem következhetik be.

A megfigyelt színkép vonalak erősségét becsléssel különböző erősségi fokozatokkal jelöltük [11]: 0 = nincsen színkép vonal, 1 = bizonytalan színkép vonal, 2 = gyenge nyomok, 3 = nyomok, 4 = közép erős színkép vonal, 5 = igen erős színkép vonal, 6 = kivételesen erős színkép vonal. Ezek az intenzitás fokozatok magától értetődően mindig csak egy elemen belül hasonlíthatók össze és alkalmatlanok arra, hogy a különböző elemek koncentrációit hasonlítsuk össze. Természetes, hogy ugyanaz az erősségi fokozat könnyen gerjeszthető elemnél (pl. Na) sokkal kisebb abszolút értéknek felel meg, mint egy nehezen gerjeszhetőnél (pl. P).



2. ábra

Színképrészlet a B színkép vonalaival



3. ábra

Színképrészlet a Mg, Mn, Pb, Si és Sn színképvonalaival

A baktériumok izzítás után visszamaradt szervesanyagában a következő elemeket tudtuk kimutatni: **Ag, Al, B,\* Ca, Cu, Fe, K,\* Mg, Mn, Na, Ni, Si, Pb, Sn, V**, (2. táblázat).

A 2. és 3. ábrán részleteket láthatunk a felvételekből. Vastag betűvel jelöltük azokat az elemeket, amelyek táptalajunknak nem voltak alkotórészei. Ezek valószínűleg a vegyszerek nyomelem szennyezettségéből kerültek a táptalajba és onnét a baktériumokba. A rendelkezésünkre álló kalium chloratum p. a. *Merck* gyári vizsgálata szerinti szennyezői: 0,001% Pb, 0,0005% Fe, 0,001% Ba, 0,002% Ca, 0,0005% Mg, 0,02% Na.

Kísérleteinkből megállapítható, hogy a spektrográfiai módszer alkalmas mikroorganizmusok szervesanyaguk alkotórészeinek és nyomelemeinek meghatározására.

A kutatásainkhoz felhasznált baktériumfajok növekedésénél felvett egyes fémek fontossága még ismeretlen. További vizsgálatainkkal szeretnénk erre feleletet kapni. Ezeknek az elemeknek fontosságát természetesen csak spektráltiszta vegyszerekkel és ezek koncentrációinak változtatásával lehet eldönteni.

### Összefoglalás

Bizonyos elemeknek, az ún. nyomelemeknek igen fontos szerepe lehet a mikroorganizmusok anyagcsereforgalmában.

Két baktériumfaj, a *Sarcina citrea* és *Azotomonas insolita* szervesanyaguk alkotórészeit határoztuk meg színképelemző módszerrel. E vizsgálatokhoz felhasznált baktériumtömeget módosított *Dox* és *Czapek* tápoldatban való elszaporítás után centrifugálással nyertük.

A vizsgálataink során meghatároztuk a baktériumok víztartalmát, valamint a szárazanyag, szerves és szervesanyag tartalmát.

A spektrográfiai meghatározást a szervesanyag maradékkal végeztük egyenáramú ivvel ISzP—22 kvarespektrográffal. A felvételeket Zeiss SP—2 színképvetítővel értékeltük ki.

A baktériumok testében olyan elemeket sikerült kimutatnunk, amelyek nem voltak eredetileg a táptalajban. Ezek bizonyára a vegyszerek szennyezettségétől kerültek a táptalajba és onnét a baktériumokba.

Azt, hogy az egyes fémek a kutatásainkhoz felhasznált baktériumfajok számára mennyire fontosak, még nem ismerjük pontosan. Ezeknek az elemeknek a fontosságát természetesen csak spektráltiszta vegyszerekkel végzendő kísérletekkel lehet eldönteni. További vizsgálatainkkal szeretnénk erre feleletet kapni.

Kísérleteinkből megállapítható, hogy a spektrográfiai módszer alkalmas a mikroorganizmusok szervesanyaguk alkotórészeinek és nyomelemeinek meghatározására.

*Érkezett: 1960. november 25.*

(\* Mivel szénelektrodáink B-t tartalmaztak, külön felvételt készítettünk tiszta Cu segédelektrodákkal a B kimutatására. Ugyanezt a felvételt használtuk a K kimutatására is. Az elektrodák laposvégű ( $\varnothing$  6) rudak voltak. A próbát természetesen ebben az esetben nem kevertük szénporral.)

## Irodalom

- [1] AHRENS, L. H.: Spectrochemical Analysis. Addison-Wesley Publ. Cambridge. 1954.
- [2] BAUTZ, E. & HAGEN, U.: Spektroskopische Untersuchungen der Zytochrome bei Hefekulturen mit verschiedener Anzahl Nadipositiver Zellen. Naturwiss. **41**. 458. 1954.
- [3] CRAMER, M.: Arch. f. Hyg. **23**, p. 71. 1891. Cit. BAUMGÄRTEL, T.: Grundriss der theoretischen Bakteriologie. Springer. Berlin. 1924.
- [4] KOCH, O. G. & DEDIC, G. A.: Über den Spurenelementgehalt der Konidien von Schimmelpilzen. Zbl. Bakter. II. Abt. **110**. (6/10) 1957.
- [5] MACHER, F. & MANNINGER, E.: Die Verwendung der Spektrochemie zur Bestimmung der Zusammensetzung von Bakterien. Arch. Mikrobiol. **38**. 201—208. 1961.
- [6] MACHER, F.: Segédeszköz szinképelektrodák töltéséhez. Magyar Fizikai Folyóirat **5**. 449—450. 1957.
- [7] MACHER, F.: Egyszerű szénelektrodmaró szinképelemzéshez. Magyar Fizikai Folyóirat **4**. 559—562. 1956.
- [8] MACHER, F.: Hazai gyártmányú szikragerjesztő kibővítése. Mérés és Automatika **3**. 153.—155. 1955.
- [9] MACHER, F.: Elektroda-beállító segédberendezés ISzP-22 kvarcspektrográfhöz. Magyar Fizikai Folyóirat **6**. 247—250. 1958.
- [10] NICOLLE, M. & ALILAIRE, E.: Ann. Inst. Pasteur. **7**. 1909. Cit. BAUMGÄRTEL, T.: Grundriss der theoretischen Bakteriologie. Springer. Berlin. 1924.
- [11] SZÁDECZKY, E. & FÖLDVÁRINÉ, VOGEL, M.: Geokémiai vizsgálatok magyarországi kőszenek hamuin. Földt. Közlöny **85**. 7—43. 1955.
- [12] TÖRÖK, T. & SZAKÁCS, O.: Réznyomok meghatározása penicillin-táptalajokban oldatos szinképelemzéssel. Magyar Kémiai Folyóirat **59**. 203. 1953.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦВЕТОВОГО АНАЛИЗА В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Ф. Махер и Е. Маннингер

Геофизическая группа АН Венгрии г. Шопрон и Научно-исследовательский Институт Почвоведения и Агрохимии АН Венгрии, Будапешт

## Резюме

В обмене питательных веществ микроорганизмов большую роль играют микроэлементы. Зная состав микроорганизмов, имеем возможность составлять для них самый оптимальный питательный субстрат. Для определения неорганических частей вида бактерий *Sarcina citrea* и *Azotomonas insolita* использовали метод спектрографии. Бактерии, использованные в анализах, размножили на модифицированном питательном субстрате Dox и Czapek и выделили центрифугированием. После этого было проведено промывание в воде двойной дистилляции, и высушивание при 110° С. Сухое вещество прокаливало в электрических муфелях при 600—700° С для определения неорганической части. 30 мг материала смешивали с 30 мг спектрально-чистого угольного порошка и поместили в отверстие угольного электрода, затем подключили к сети в 220 вольт и 10 ампер. Расстояние между электродами 2 мм, т. е. их отражение при накаливании попадало на диск. Время освещения 30 сек. и ширина ISZP—22 кварцевой спектрографической части 0,005 мм.

Снимки сделали на пластинки Gevaert Siencia размером 9—24, затем анализировали спектрографом Zeiss Sp—2. При анализе, особенно при определении микроэлементов, всегда пользовались самыми чувствительными (самыми последними) линиями элементов. Длину волн использованных линий см. в таблице № 1.

В неорганической части бактерий обнаружили следующие элементы: **Ag, Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Si, Pb, Sn, V** (2 таблица).

На рисунках 2 и 3 показаны снимки, на них жирной буквой обозначены те элементы которые в начале не входили в состав питательного субстрата. Вероятно они попали в питательный субстрат через загрязненные реактивы. Пока еще точно не известно в какой степени некоторые минеральные соли нужны для видов бактерий, использованных в наших исследованиях. О потребности в этих элементах можно судить только после опы-

тов со спектрально-чистыми химикатами, с изменением их концентрации. На основании наших исследований можно сказать, что спектрографический метод пригоден для определения неорганической части и состава микроэлементов микроорганизмов.

Рис. 1. Форма электрода.

Рис. 2. Спектрограмма с линиями В.

Рис. 3. Спектрограмма с линиями Mg, Mn, Pb, Si, Sn.

Табл. 1. Длина волны линий спектрограммы, использованной в наших опытах. Пределы чувствительности по Ahrens [1] (1) Элемент. (2) Длина волны линий в Å. (3) Предел определения в % С-электрода.

Табл. 2. Результаты спектрографического анализа. (1) Вид бактерий. (2) Элементы.

## The Application of Spectrographic Methods in Microbiological Studies

F. MACHER and E. MANNINGER

Geophysical Working Group of the Hungarian Academy of Sciences, Sopron, and Research Institute for Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

### Summary

In a high number of cases trace elements play an important role in the metabolism of microorganisms. If the mineral composition, and especially the mineral requirements of microorganisms are known, their optimal nutrient is easy to establish. The spectrographic analysis of the mineral composition of *Sarcina citrea* and *Azotomonas insolita* was undertaken with the above intention. The bacteria applied in these studies were grown on modified *Dox* and *Czapek* solutions, respectively, and separated from the nutrient by centrifugation.

The cell residue was washed three times with re-distilled water, and dried at 110° C for the determination of its water content. The dried material was subsequently heated to 600—700° C in an electric oven, and its total mineral content was determined. 30 mg of the ash was mixed to 30 mg of spectrographic grade carbon powder, placed into the hole of the carbon electrode, and a broken electric arch (with an arch-induction to cooling ratio of 16 : 1) was induced by 20 V, 10 A direct current. The distance between the electrodes was 2 mm, and so their image fell on the plate. Duration of the illumination was 30 seconds, and the slit width of the ISZP—22 quartz spectrograph applied was 0.005 mm.

The spectrograms were obtained on 9 × 24 cm Gevaert Sciencia plates, and they were evaluated with a Zeiss Sp—2 spectroscopic projector. Especially for the determination of trace elements, their last, most sensitive lines were used. Wavelengths of the used spectral lines are found in Table 1.

The following elements were found in the ash of the bacteria studied: Ag, Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Si, Pb, Sn, and V (Table 2).

Two sections of the spectrograms obtained are shown in Figs. 2 and 3. Those of the elements found which have not been added to the nutrient are denoted in these figures by their fat-faced symbols. It is assumed that they were originally impurities of the nutrient salts used.

At present we can not give an answer to the question whether or not the trace elements taken up by these microorganisms play an important role in their metabolic processes. This question might be decided only by further cultural experiments, in which spectrographic grade salts are used, and the concentration of the trace elements in the nutrient is controlled. It is concluded that the spectrographic method is applicable to the determination of the mineral composition and trace element content of microorganisms.

Fig. 1. Shape of the electrode used

Fig. 2. Section of one of the spectrograms with the boron lines

Fig. 3. Section of a spectrogram with the lines of Mg, Mn, Pb, Si and Sn.

Table 1. Wavelengths of the spectral lines used for evaluation of the spectrograms and the lowest sensitivity limit of the indication according to Ahrens (1). (1) Element. (2) Wavelength of the most sensitive line, Å. (3) Lowest sensitivity limit with carbon electrode

Table 2. The result of the spectrographic analyses. (1) Species. (2) Mineral elements present.