

Nemzetközi együttműködés a sugárgombák rendszertani kérdéseinek tanulmányozására

1958 augusztusában Stockholmban, a VII. Mikrobiológiai Kongresszus alkalmával megtartott „Round Table Conference on Streptomyces” résztvevői egy nemzetközi közös kísérlet megvalósítását határozták el, mely hivatva lenne a *Streptomyces*-fajok rendszertani jellemzésére használt legfontosabb bélyegek reprodukálhatóságát felülvizsgálni. A közös kísérletek megszervezését Küster E. dublini professzor, az időközben megalakult „International Committee on Bacteriological Nomenclature Subcommittee on Streptomyces” titkára vállalta magára.

E nemzetközi kutató-munkaközösség megalakítását és egyáltalán a sugárgombákra vonatkozó rendszertani munka internacionális sikon történő összehangolását az a határozott és a gyakorlati életből fakadó követelmény tette szükségessé, hogy mind a gyógyszeripari célokat szolgáló antibiotikum kutatás, mind a mezőgazdasági mikrobiológia jelentős terhektől mentesülne, ha olyan relatíve stabil bélyegekkel dolgozó „meghatározó kulcs” birtokába jutna, melynek segítségével aránylag gyorsan és megbízhatóan fájekozódni lehetne egy ismeretlen, pl. frissen izolált *Streptomyces*-törzs szisztematikai helyzetére (és ezzel párhuzamosan rokonságának biokémiai teljesítőképességére) vonatkozóan.

Krassilnikov szerint — aki az említett „kerekasztal konferencián” és a közös kísérletekben Gauzeval együtt a Szovjetuniót képviselte — a korábbi módszerek elégtelenségének tudható be, hogy az antibiotikumot termelő mikroszervezetek identifikálásánál éppen olyan nagy hibákat követtek el, mint azt maguknak az antibiotikumoknak a felosztásánál, ill. rendszerezésénél is tapasztalni lehetett. Az actinomiceták szisztematikájában ezen tévedések további forrása abban keresendő, hogy a különböző kutatók még ugyanazon bélyegek meghatározásánál is más-más módszereket alkalmaznak. Ezenkívül az egyes szerzők a fajok, változatok eltérő természetű és jellegű leírását közlik, úgyhogy sok esetben az összehasonlítás kellő alap hiányában teljesen lehetetlennek bizonyul. E leírásoknál pedig — mint azt Ettlínger

(Zürich) hangsúlyozta — sokszor olyan bélyegeket használnak, melyek tetemes variabilitásuknál fogva a fajdifferenciálásra nem alkalmasak, és ezekre alapítva később könnyen téves diagnózishoz juthatunk. Küster statisztikai adatokkal igazolta, hogy a *Streptomyces*-ek legáltalánosabban használt diagnosztikai bélyegei fontosság szempontjából az a témakörben dolgozó szerzőknél nagyon eltérő értékelésben részesülnek. Így egyesek, bizonyos esetekben, elsőrendű jelentőséget ökológiai adatoknak (előfordulás stb.) tulajdonítanak, míg egyéb jellemvonások ezek mögött a háttérbe szorulnak (pl. Waksman és Lechevalier 1953-ban megjelent tanulmányában). Mások a határozó kulcsok összeállításánál első helyen a légmicélium (Kutzner, Miesiek stb.), ill. a szubsztrátmicélium (Baldacci és munkatársai) színét, avagy a spórák elektronmikroszkópos felületi morfológiai típusát (Ettlínger és munkatársai) jelölték meg, stb. Az egyes diagnosztikai bélyegek értékelését illetően a nézeteltérések a „kerekasztal konferencián” is megnyilvánultak. Így pl. Krassilnikov nagy fontosságot tulajdonít a fajok elkülönítésénél az antibiotikus tulajdonságoknak, mivel szerinte az egyes fajok rájuk jellemző antibiotikus anyagokat termelnek, melyek ugyanazon faj más törzseit nem nyomják el növekedésükben. Antibiozis tehát csak különböző fajok között léphetne fel. Ezzel szemben Ettlínger, továbbá Hütter és mások az antibiotikus hatóspektrumot a fajdifferenciálásra alkalmatlan bélyegnek minősítik. Baldacci, több konferencia-résztvevő nézeteivel ellentétben, a szubsztrátmicélium színét a szekciókra és szériákra történő fajcsoportosításnál a határozókulcs első helyén tartja alkalmazhatónak, míg Ettlínger csupán a légmicélium színében és morfológiájában lát használható stabil bélyegeket. Gordon (New Brunswick) viszont a konferencia témapontjaira tett megjegyzéseiben annak a hitének adott kifejezést, hogy a *Streptomyces*-nem fajainak stabilabb és megbízhatóbb bélyegekkel is rendelkeznie kell, mint a micélium színe, az oldódó pigment-produkció vagy a spóráképzés stb.

Ilyen előzmények ténylegesen érdeklődést keltettek egy közös kísérlet végrehajtása iránt, melynek keretében fény derülhetne a különböző és csaknem fél évszázada használt legfontosabb faji bélyegek reprodukálhatóságára, továbbá az ellentétes véleményekkel kapcsolatban az igazságra vonatkozóan.

Egy ilyen nemzetközi kísérlet végrehajtásának azonban bizonyos előfeltételei vannak. Először is úgy kellett megválasztani és előírni a kísérleti módszereket, továbbá összeállítani a vizsgálandó törzsananyagot, hogy segítségükkel a vitás kérdésekre a legrövidebb úton és a legnagyobb biztonsággal kaphassunk feleletet. Másodszor olyan nemzetközi munkaközösséget kellett szervezni, melynek tagjai a Föld legkülönbözőbb pontjain és a földrajzi helyzet tekintetében a legeltérőbb viszonyok között végezhetnék az adatgyűjtést. Harmadszor — és ez a legfontosabb — a kísérletek lefutását a legapróbb részletekig pontosan elő kellett írni, hogy ezáltal az egyes kutatók adatainak összehasonlítását reális alapokra fektethessék.

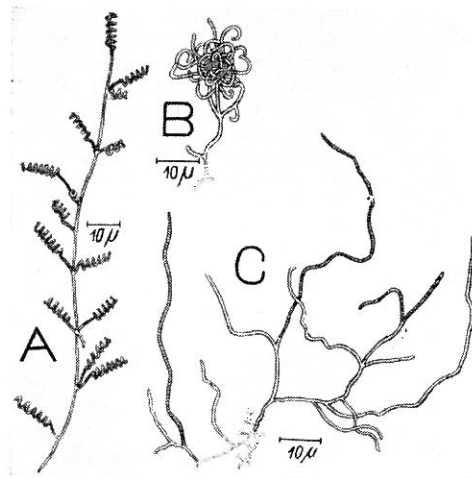
Az első nyers formában elkészített kísérlet-tervezetet Küster 1958 októberében juttatta el megvitatás és javaslattevés céljából a résztvevőkhöz. A beérkezett módosító indítványok figyelembevételével kibocsátották a végleges és átdolgozott kísérleti tervezetet, melynek alapján 1959 január 1-én megkezdődött a munka.

Az együttműködés keretében összesen 32 kutató, ill. intézmény vett részt: 1. Arishima (Japán), 2. Baldacci E. (Olaszország), 3. Frommer, W. (Németország), 4. Gause, G. F. (Szovjetunió), 5. Harada (Japán), 6. Hata (Japán), 7. Hütter, R. (Svájc), 8. Joly, S. (Brazília), 9. Knöll, H. (Németország), 10. Komatu (Japán), 11. Krassilnikov N. A. (Szovjetunió), 12. Kurylovitz, W. (Lengyelország), 13. Mach, F. (Németország), 14. Nakazawa (Japán), 15. Nishimura (Japán), 16. Nomi (Japán), 17. Ohara (Japán), 18. Okami (Japán), 19. Otuki (Japán), 20. Pfennig, N. (Németország), 21. Pinert, S. (Franciaország), 22. Pridham, T. G. (USA), 23. Sakai (Japán), 24. Sanchez-Marroquin, A. (Mexico), 25. Shinobu (Japán), 26. Szabó, I. (Magyarország), 27. Tesic, Z. (Jugoszlávia), 28. Tomosugi (Japán), 29. Umezawa (Japán), 30. De Vries, G. A. (Hollandia), 31. Waksman, S. A. (USA), 32. Wallhäusser, K. H. (Németország). Mint látható, különösen nagy a száma a japán résztvevőknek, ami párhuzamos az antibiotikum-kutatás magas színvonalával ebben az országban.

A kísérletek minden egyes résztvevője ugyanazokat a *Streptomyces* törzseket ta-

nulmányozta. Ezeket Baldacci professzor expedálta, mégpedig olyan szempontok szerint összeválogatva, hogy a 21 szériából álló rendszerének minden szériáját egy-egy (esetleg két-két) törzs képviselje. E törzsek részben determinált autentikus szervezetek voltak, azonban abból a nagyon helyes elvből kiindulva, hogy az ezekre vonatkozó irodalmi adatok egyes résztvevőket önálló véleményük megalkotásában befolyásolnának, a törzseket 1—25-ig csupán arab számokkal jelölték, és eredetükre, kiltétükre vonatkozóan semmiféle felvilágosítást nem adtak meg.

A tulajdonképpeni vizsgálatok két hónapot, majd további kétszeres ismétléssel újabb négy, összesen hat hónapot vettek igénybe. A kísérletek számára a törzsek folyamatos és sötétben történő továbbtenyésztésével kellett az életképes és meghatározott korú inokulumot biztosítani. A folyamatos tenyésztések számára javasolt zabpehely-agaron a kultúrákat először 28 C°-on 12 napig inkubáltuk, majd 8 napig szobahőmérsékleten tároltuk. Ezután újra



1. ábra

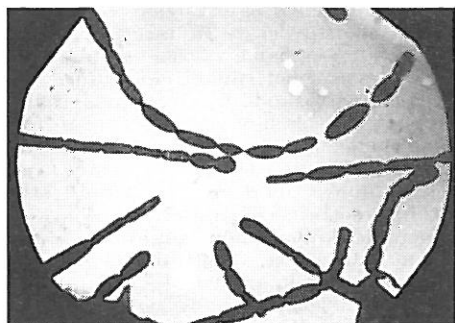
Példák a legfontosabb spóratartó típusokra. A) Spira, a 21-es számú törzs tenyészetéből. B) Retinaculum apertum, a 10-es számú törzs tenyészetéből. C) Rectus flexibilis, a 15-ös számú törzs tenyészetéből

leoltás, inkubálás, tárolás stb. következett. A tulajdonképpeni megfigyelések céljait szolgáló tápközegekre a leoltást mindig a 3., 6. és 9. passage-ból kellett eszközölni. Azokra az esetekre, amikor a légmicélium fejlődése zabpehely agaron nagyon gyenge

volt, vagy a sporuláció teljesen elmaradt, a törzsek fenntartására glicerin-glycin-agart ajánlottak. Ezenkívül előírták a táptalajok készítési módját, az agarlemezekhez és ferde táptalajokhoz a tápközeg mennyiségét, a petricsészék méretét, a beoltások módját, a tápközegek pontos összetételét, a vegyszerek minőségét és gyártmányát stb.

A megfigyelések tárgyát az alanti tulajdonságok képezték:

I. A légmicélium, továbbá a spórák fény- és elektronmikroszkópos morfológiá-



2. ábra

„Sima” spóratípus. Elektronmikroszkópos felvétel (7200× nagyítás). A 23-as jelzésű törzs tenyészetéből

ja. A légmicélium és a spóráképzés megfigyeléséhez, az előírások szerint, 5-5-petricsészében keményítő- $(NH_4)_2SO_4$ -agaron szélesztettük a törzseket, majd a növekedés 10, 15. és 20. napján direkt fénymikroszkópos megfigyelés révén határoztuk meg a spóratartó típusát. A típus megjelölése a Baldacci által módosított Pridham-féle beosztásban történt, éspedig: 1. Rectus (egyenes), 2. Rectus flexibilis (egyenes és hullámos, lásd 1. ábra c), 3. Retinaculum apertum (horog és kacs-szerű spóratartók, lásd 1. ábra b), 4. Spira (spirális alakok, lásd 1. ábra a), 5. Monoverticillus (egyszeresen örvös egyenes), 6. Monoverticillus spira (egyszeresen örvös spirál), 7. Biverticillus (kétszeresen örvös egyenes), 8. Biverticillus spira (kétszeresen örvös spirál). A spórák felületi morfológiai típusát elektronmikroszkóppal történt megfigyelések alapján az alanti három kategória valamelyikébe kellett besorolni: 1. sima, 2. tüskés, 3. hajas.

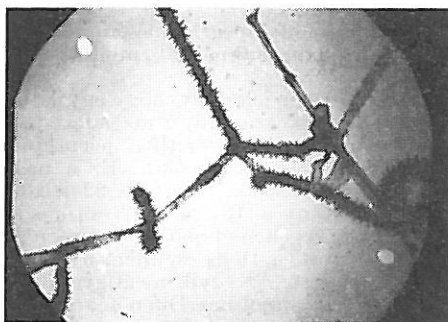
II. A légmicélium és szubsztrátmicélium színének megfigyelése. Ebből a célból a törzseket, minden kísérletsorozatban glicerin-aszparagin-agaron 3-3 petricsészében tenyésztettük. Megfigyelések az inkubáció

kezdetétől számított 10, 15. és 20. napon. Azokban az esetekben, amikor légmicélium nem fejlődött, a szubsztrátmicélium színét közvetlenül felülnézetben kellett meghatározni, különben a telepek fonákán. A színek megjelöléséhez esupán a következő alapszínek, ill. tónusok használatát javasolták: fehér, sárga, narancs, vörös, kék, zöld, szürke, barna, fekete és színtelen.

III. Melanoid-pigment képzés. Az előírást követve, az egyes vizsgálatok alkalmával a törzseket meghatározott módon 3-3 kémeső pepton-agarra oltottuk. Megfigyelések a beoltást követő 2. és 4. napon. Értékelés: pozitív ill. negatív.

A megfigyelések eredményeit a Wallhäusser által tervezett, nyomtatásban sokszorosított és minden egyes törzsre nézve külön vezetett „lyukkártyákon” tüntettük fel. Ezek a lyukkártyák praktikus összeállításban, egyrészt a vizsgált törzs nagyszámú tulajdonságának könnyen áttekinthető formában történő jelölésmódját biztosítják, másrészt sok törzs adatait tartalmazó kártyagyűjteményben a hasonló tulajdonságú szervezetek gyors megtalálását és az adatok összehasonlítását teszik lehetővé.

A kísérleti eredmények első, a múlt évből származó, körlevél formájában megküldött összesítése inkább csak a számszerű adatokra vonatkozik, míg a véleménykülönbségek okait kevéssé érinti. Mielőtt ezeket az összeített adatokat szemügyre vennénk, talán ki kellene térni néhány olyan momentumra

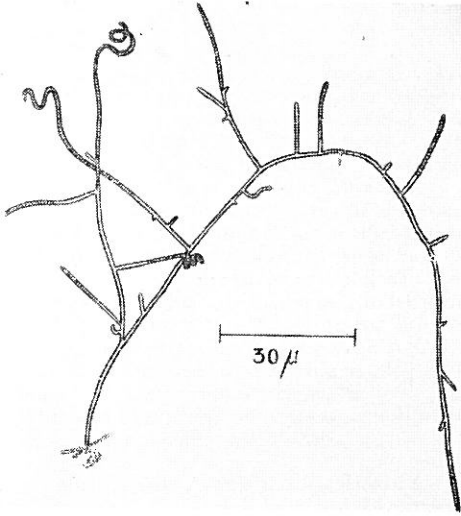


3. ábra

„Tüskés” spóratípus. Elektronmikroszkópos felvétel (7200× nagyítás). A 19-es jelzésű törzs tenyészetéből

melyek ha nem is lehettek okai az észlelteknél jelentkező különbségeknek, de mindenesetre zavart okozhattak. Így több résztvevő is szótvetette, hogy pl. ugyanakkor, amikor az alkalmazott vegyszerek

p. a. minőségét, Merek gyártmányát is előírták, vezetéki víz használatát engedték meg (sőt javasolták). Megosztott a résztvevők véleménye a keményítő agar, ill. a glicerín-aszparagin-agar használata tekintetében is, mivel sokan tapasztalták, hogy a



4. ábra

Egyenes és spirális spóratartók a 23-as jelzésű törzs légmicéliumának azonos hifa-fonalán

morfológiai típus megfigyelésére glicerín-aszparagin agar alkalmasabb, mint az előírt keményítő agar.

Nehézségeket jelentett, hogy egyes törzsek növekedése számára a megadott tápközegek nem minden esetben jelentettek optimális tenyészviszonyokat. Ez a megállapítás különösen a 10, 16 és 22 jelzésű törzsekre érvényes. Így pl. a 22-es törzs az előírt tápközegeken fejlődést egyáltalán nem tanúsított, a 16-os csaknem nyomokban növekedett. Az egyik megfigyelő szerint, ha a táptalajokhoz Difco-agart használt, úgy spirálisatna formákat, koreai-agaron viszont szabályos spirálokat kapott, stb.

A legnagyobb egyöntetűség — az összesítő eredmények tanúsága szerint — a melanoid pigment-produkció megítélésénél jelentkezett. Csaknem minden résztvevő nyolc pozitív törzset talált. Aránylag egységesek voltak a spórák morfológiájára vonatkozóan beküldött adatok is. Összesen négy törzs esetében észleltek tüskeszerű felületi képleteket, különben valamennyi

sima spórájú volt. Azonban már itt tapasztalni lehetett véleménykülönbségeket. Így a 13, 19 és 21-es törzsek spóráit három megfigyelő — a többivel szemben — nem tüskésnek, hanem simának minősítette, viszont a jellegzetesen sima spórájúak közül néhányan többet tüskésnek jeleztek. Akadt megfigyelő, aki a tüskés, sőt sima spórafelületű törzset hajásnak jelezte.

A spóratartók tipizálásánál jelentkező eltérő véleményekről az 1. táblázat számol be. A táblázaton a törzsek jelzését 1—25-ig, továbbá a különböző spóratartó-típusokra eső észleletek számát olvashatjuk. Az egy törzsre eső adatok száma elvileg 96 (a 32 megfigyelő 3—3 észlelete). Azonban a valóságban több vagy kevesebb is lehet, mivel előfordult, hogy egyesek tartózkodtak a véleménynyilvánítástól, mások ugyanarra a törzsre több típusmegjelölést is alkalmazhatónak tartottak (pl. *rectus flexibilis* + *spira* avagy *retinaculum apertum* + *spira* stb.). Utóbbi esetben az összetett típusok komponenseit külön-külön adatként jelölték be a táblázatba. Hogy ilyen összetett típusok léteznek, azt igazolja a 4. ábra is, melyen jól látható, hogy ugyanazon légmicélium fonalon egyenes és spirális spóratartók egyaránt elhelyezkednek. Az 5. ábra pedig arra vonatkozóan szolgáltat adatokat, hogy örvös elágazást nem képező törzsek tenyészeteiben valódi örvöket is megfigyelhetünk. Ugy látszik, hogy az egyenes (*rectus*) és a hullámos (*rectus flexibilis*) típusok között nagyon nehéz különbséget tenni (Így pl. a 6-os törzsnél az elsőre 42, a másodikra 38 „szavazat” esett). Ugyancsak problematikus a *retinaculum apertum* és a *spira* elkülönítése, mint erre a táblázaton számos példát láthatunk (11, 23. stb. törzsek), de a 10-es törzs esetében a *rectus flexibilis* és a *retinaculum apertum* határai is elmosódnak. Még bonyolultabb a helyzet a 7-es és a 9-es törzseknél, ahol nagyszámú típusmegjelölést találunk mindhárom említett spóratartó alakzatra. Az elágazás tekintetében is mutatkoztak nézeteltérések, így pl. szórványosan csaknem minden *verticillium*-típusra történt meghatározás.

Hasonló nehézségek jelentkeztek a légmicélium színére vonatkozó adatok összeállításakor. E tulajdonság megfigyelésénél igen nagy körültekintéssel kell eljárni, mivel minden esetben különbséget kell tenni a szubsztrát-, a légmicélium és az oldódó pigment saját színei között, melyek egyidejűleg más-más alapszint képviselhetnek. Ezek a színek kölcsönösen „fedhetik” egymást (pl. ha a légmicélium gyéren felett, úgy a szubsztrátmicélium színe

1. táblázat

25 Streptomyces-törzs spóratartójának morfológiai típusa 32 megfigyelt észleletei alapján

Törzs No	Rectus	Rectus flexibilis	Helicium apertum	Spira	Monoverticillus	Monoverticillus Spira	Biverticillus	Biverticillus Spira
1		16	12	50		8	1	
2	2	73	6	5	2			
3	5	69	1	6	2			
4		9	18	71				
5		6	3	79				2
6	42	38	6	6	1			
7	2	20	47	42	3			
8	8	14	10	58				2
9	8	20	50	54		7		
10	1	32	37	19	3			
11		18	25	54				
12	3	14	14	63				
13		7	10	62				
14	48	33	1					
15	17	42		2				
16	8	17	28	12				
17	25	54						
18	48	39	1					
19	1	13	16	59		1		
20		7	4	60		14	3	
21	3	3		59		10		4
22	7	20						
23		15	42	28				
24	32	29		1				
25	1	10	11	65				

2. táblázat

25 Streptomyces-törzs szubsztrátmicéliumának színe 32 megfigyelt észleletei alapján

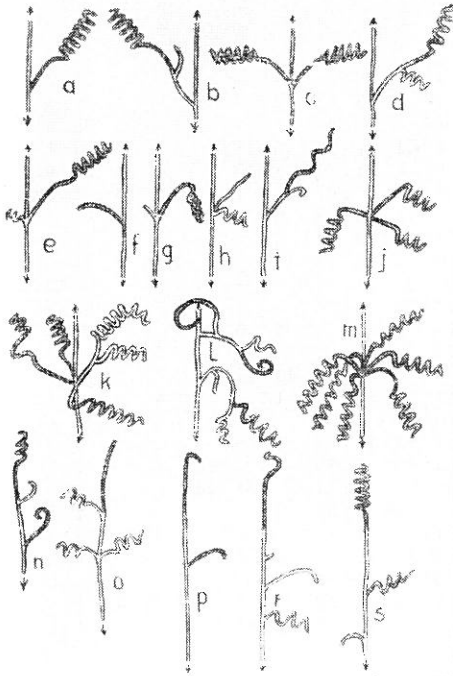
Törzs No	Szartelen	Fehér	Sárga	Narancs	Vörös	Bolyva	Kék	Zöld	Szürke	Barna	Fehete
1	18	30	33	4					7	29	
2	3	3	43	2				1	47		4
3		7	44		1			31	28	21	21
4	21	32	10	6	19				25	19	
6		1	24	8	10			6	12	69	
6			67	8	1			3	2	12	
7	14	20	38	6	3			2	16	13	
8	20	34	42	2					19	6	
9	11	25	52	14					3	27	
10	28	21	14	9	8	1			8	28	
11	23	18	24	5	1	4		1	17	34	1
12	8	15	8	4	5	4		1	19	55	
13							3	43	32	31	45
14		2	42	49	27	3					
15	29	10	3	1			3	2	28	11	5
16	34	5	26					6	10	14	16
17	13	12	57	1				2	3	21	
18	19	6	10		3	23	4		21	30	
19		2	1		51	44			3		
20	6	7	56	9	1			2	4	27	
21	3	1				2	3	27	29	39	23
22	36	12	8	9	1				1	1	
23		1	24	2						60	4
24	2		55	26	6	2		4	1		
25	3	14	3	24	41				4	14	

„átüt”, és téves diagnózist okozhat), úgy-hogy még az alapszínnek felismerésének is sokszor alig áthidalható akadályai vannak. Általánosságban a legtöbb meghatározás a fehér színre esett. Azonban a fehér lég-micélium éretlen állapotot jelölhet, és általában a jellegtelen, nem spórázó légmicélium alapszíne. A fajok nagy részénél az érési stádiumban a légmicélium szürkére, kékre, zöldre stb. változik. Az alantiekben néhány példán bemutatjuk a színmeghatározás nehézségeit: Az 1-es jelzésű törzs (Str. albus) légmicéliuma hófehér még érett állapotban is, a szubsztrátmicélium színe nem zavaró; az adatok megoszlása: fehér 78, sárga 4, piros 3, barna 3. Ez volt különben a leg-egységesebben jellemzett törzs. A 25-ös törzs légmicéliuma teljesen érett állapotban hamuszürke. Szubsztrátmicéliuma zavaró vörös színű. Az adatok megoszlása: fehér 40, sárga 1, narancs 2, vörös 24, piros 4, szürke 32, barna 8. A 20-as jelzésű törzs

Str. viridochromogenes fajjal azonosítható. E faj törzseit Ettlinger és munkatársa mint árnyalatmentes, tiszta azúrkék lég-micéliumot fejlesztő alakokat írják le. Az adatok megoszlása: fehér 15, sárga 2, kék 35, zöld 37, szürke 42. Az ugyancsak a Str. viridochromogenes rokonsági körbe tartozó 13-as törzs adatai: fehér 10, kék 27, zöld 37, szürke 51, barna 2. (Az összesen 96-nál nagyobb számú adat annak tudható be, hogy az egyes megfigyelők egyidejűleg több színárnyalatot is megadtak, és az összesítésnél a komponensek mindegyikét külön adatként kezelték). Itt meg kell jegyezni, hogy az a korábban már felmerült gyanú, miszerint a kék és a zöld színekre vonatkozó irodalmi adatokat feltétlenül felül kell vizsgálni, a közös kísérletek során beigazolódt.

Egy pillantás a 2. táblázatra azonnal meggyőz arról, hogy az egyes törzsek szubsztrátmicéliumának színét, a közös kísérle-

tek résztvevőinek adatai alapján, a megadott alapszínnek csupán egyikével vagy másikával jellemezni igen nehéz feladat lenne. Általánosságban véve a barna és a sárga szín dominál, és csak néhány törzs (3, 13, 21 zöld; 14, 24 narancssárga; 18, 19 és 25 vörös, ill. vörös-ibolya) tanúsított



5. ábra

Elágazás típusok a 21-es jelzésű törzs lég-micéliumában (m, j és k örvös formák)

olyan jellegzetes elszíneződést, mely a szervezetek szisztematikájában különös jelentőségű lehet. Vagyis a közös kísérletek adatai szerint határozottan állítható, hogy a szubsztrátmicélium esetében a nagyszámú színárnyalattal dolgozó és csupán egyetlen árnyalatot megjelölő határozó kulcsok, bármennyire is propagálják azt egycsek, kevésbé használhatóak.

Mint a fentiekben láhattuk, a nemzetközi munkaközösség első kísérletei egyrészt igen egyöntetű, másrészt igen heterogén eredményekhez vezettek. A kapott adatok nagyon sok tanulságot rejtenek magukban. Először is nyilvánvalóvá vált, hogy a szisztematikai bélyegek között valóban nagy értékülbségek vannak, és hogy a jövő rendszerezésénél az alkalmasabbakra kell alapítani. Másodsor egy jól megszervezett munkaközösség sokkal biztonságosabban tud disztingválni az alkalmas bélyegek megválasztása tekintetében, mint az egyes megfigyelő, még akkor is, ha az utóbbi esetben nagy szaktekintélyről van szó. Harmadszor, amennyiben a fajhatározásnál olyan karakterisztikákra alapítunk, melyek felismerését számos mellékkörülmény nehezíti meg, vagy erősen variábilisak, úgy a szisztematikai munkát a kaosz útjára terelhetjük.

Ez a nemzetközi együttműködés megvetette az alapjait annak a nagyobb és szorosabb kontaktust kívánó tudományos koordinációnak, melynek keretében a közeljövőben sor kerül majd az ipari és mezőgazdasági jelentőségű sugárgombafajok rendszertanának átdolgozására. A különböző országok kutatóinak ilyen együttműködése hathatósan elősegíti a népek közötti baráti viszony elmélyülését is.

SZABÓ ISTVÁN és LOVAS BÉLA

Érkezett: 1961. március 15.