

A BALATON-MEDERISZAP BAKTÉRIUMNÉPESSÉGÉNEK SZÁMÍTÓGÉPES ANALÍZISE

I. A MICROMONOSPORA-POPULÁCIÓ

SZABÓ ZSUZSA

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék, Budapest

A Balaton bakteriológiájával foglalkozó irodalmi közléseket áttekintve megállapítható, hogy a bakterioplanktonhoz képest az üledék prokariótái viszonylag kevésbé tanulmányozottak. Mindamellett a szórványos közlések is számos fontos problémát érintenek, így a mederiszap baktériumközösségeinek aktivitásával, valamint a biomassza és a baktériumnépesség mennyiségi viszonyaival foglalkoznak. A tó trofikus állapotának folyamatos változása azonban a Balaton különböző biotópjaiban, így a szubhidrikus talajokban tevékenykedő baktériumközösségek sokoldalú átalakulását is maga után vonja. Emiatt egyrészt a korábbi mennyiségi analízisek adataira ma már bizonyosan csak kevésbé támaszkodhatunk, másrészt az eutrofizálódás folyamatában jelentős szerepet játszó és egymást váltó mikroorganizmusok mind alaposabb faji szintű megismerése is szükségessé válik.

Jóllehet a Balaton fenéküledékének kielégítően aerált legfelső horizontjára igen intenzív mikrobiológiai aktivitás a jellemző, mégis tavunk gyttja-típusú üledékében élő és ott a szervesanyag lebontásban közreműködő mikrobaközösségek összetételét maig sem ismerjük. Az alantiakban bemutatásra kerülő munkánk fő célja volt, hogy a mennyiségi csíraszámbecslésen túlmenően, az iszap felszíni rétegéből kitenyésztett baktériumtörzsek tiszta tenyészeinek vizsgálatával a gyttja-mikroflóra biokémiai kapacitását és specieszintű közösségi struktúráját is felderítsük.

Már vizsgálataink kezdetén megállapítható volt, hogy a Balaton tipikus iszap-baktériumflórájában, szemben a Zala-folyó fenéküledékének (SUMAN 1980) és torkolati iszapjának (FARKAS 1982) hatalmas sztreptomiceta frakcióval jellemezhető baktériumpopulációjában, de hasonlóan az eddig külföldön tanulmányozott tavi iszapokéhoz, a mikroaerofil aktinomiceták egy különleges csoportja, a mikromonosporák közössége is részt vesz. E genusz képviselői nehezen lebontható szerves anyagokat, így aromás vegyületeket, cellulózt, kitint stb. mineralizálnak, antibiotikumot termelnek és az elemforgalom fontos és speciális funkciót betöltő alakjai. Éppen ezért a balatoni fenéküledék eddig ismeretlen autochton mikromonospora-populációjának vizsgálatát megkülönböztetett fontosságúnak minősítettük és alant is ezekről számolunk be.

Jóllehet már a 40-es évek eleje óta ismeretes, hogy a *Micromonospora*-k

a tavi üledékek jellegzetes bennszülött baktériumcsoportját alkotják, mégis tavi populációik faji összetételéről mind a mai napig csaknem semmit sem tudunk. Sajnos korrekt taxonómiai identifikálásuk lehetőségei még napjainkban is nagyon korlátozottak. Az 1974-ben kiadott Bergey's Manualban a LUEDEMANN szerkesztette *Micromonospora* határozókulcs használhatóságát erősen korlátozza, hogy az csak kevés faj néhány autentikus törzsének hiányos adataira és korábbi elégtelen fajleírásokra támaszkodik. Azóta, bár számos új, főleg antibiotikumtermelő fajt írtak le, mégis korszerűbb rendszerezésükkel senki sem próbálkozott. JOHNSTON (1972) ökológiájukat illetően számos értékes adatot közölt, de vizsgált törzseit speciesz-szinten egyáltalán nem azonosította. Értekezésében csupán utalt arra, hogy a mikromonosporáknál a hagyományos taxonómiával szemben a numerikus rendszerezése a jövő, hangsúlyozva azt is, hogy valamiféle racionális fajfogalom kidolgozása csak természetes populációk variabilitásának vizsgálatára alapulhat. A *Micromonospora* genuszon belül azonban ilyen természetű vizsgálatokra mind ez ideig nem került sor. Így többek között meghatározatlanok maradtak az angliai tavak mikromonosporái is, melyek ökológiáját JOHNSTON és CROSS (1976a és b) ismertették, és numerikus analízist azok a szovjet szerzők sem alkalmaztak, akik a Moszkva környéki mocsaras talajok mikromonosporáit faji szinten ugyan, de csak nagyon kevés tulajdonságra alapítva kísérelték meg feldolgozni (SVESHNIKOVA és mtsai 1969 és 1970). E genuszon belül általánosan elfogadott, standard nemzetközi diagnosztikai bélyegek és eljárások máig is hiányoznak. LUEDEMANN ugyan több olyan módszert is javasolt, melyeket mi is előnnyel hasznosíthattunk, a numerikus analízishez azonban jóval több diagnosztikai tesztre van szükség. Mi a legtöbb eljárást más aktinomicetáknál felhasználtak közül vettük át és ezeket vagy változatlanul, vagy a mikromonosporákhoz adaptálva alkalmaztuk. Ezenkívül néhány új eljárást is kikísérleteztünk.

Az identifikálást különben autentikus törzsek bevonásával konvencionális úton is megpróbáltuk. Ezért a lehetőségeket e téren is értékelni tudjuk.

Isolált törzseink nagy része az eddig ismert *Micromonospora* fajokkal nem volt azonosítható. Két gyakorinak bizonyult új típusuk közül e cikkben az egyiket *M. nigra* új faj megjelöléssel ismertetjük. A még közönségesebb másikat mint *M. balatonica*-t külön tárgyaljuk (SZABÓ Zs. 1982).

Anyag és módszerek

Iszolálás: Az iszapmikroflóra kvalitatív analíziséhez a Tihanyi Biológiai Kutatóintézet előtti térségben két alkalommal, 1978 júniusában és szeptemberben összesen öt iszapmintát vettünk. A parttól 50, 100, 150 és 300 m távolságban, Ekman-féle mintavevő szerkezet segítségével, az iszap 0–15 cm-ig terjedő, legfelső rétegét hoztuk felszínre. A mintákat szuszpendálva és hígítva

lemezeltük, majd 28 °C-on 3–5 hétig inkubáltuk. Az izolálásokhoz felhasznált táptalajok: keményítő-pepton-húskivonat agar (WAKSMAN 1961), keményítő-élesztőkivonat agar (LUEDEMANN 1971a), kolloidális kitin agar (JOHNSTON és CROSS 1976a) és tiamin-Na-propionát agar (ROWBOTHAM és CROSS 1977). A kolóniákat nem szelektív alapon olyan összetételű ferde agarra izoláltuk, mint amilyeneken kifejlődtek (SZABÓ Zs. 1981).

Baktériumtörzsek: Az izolált 981 törzs mikroszkópos vizsgálata szerint a fenéküledékben a sugárgombák közönséges előfordulásúak. E szervezetek ugyanis törzseink 27%-át (269 törzs) teszik ki és közöttük is a *Micromonospora*-k dominálnak. A beható vizsgálatok céljaira szelektált 132 *Micromonospora* törzs közül 120-nak faji szintű azonosítását elismert *Micromonospora* fajok 20 autentikus törzsével szinkron kivitelezett összehasonlító laboratóriumi tesztek és numerikus analízis eredményeire támaszkodva közelítettük meg. Az autentikus törzseket (1. táblázat) az ATCC (American Type Culture Collection) és a RIA (USSR Research Institute for Antibiotics) bocsátotta rendelkezésünkre. Fenntartásuk keményítő-élesztőkivonat agaron (LUEDEMANN 1971a) havonkénti továbboltással történt.

A mikromorfológiai tulajdonságok vizsgálata: A 2. táblázatban felsorolt sajátságokat parányitenyészetekben keményítő-élesztőkivonat agaron, valamint leveskultúrákban (glükóz 1%, élesztőkivonat 1%) detektáltuk. Megfigyelések mindkét módszer esetén 72 órás inkubáció után naponta.

A kulturális-morfológiai tulajdonságok vizsgálata az alanti diagnosztikai táptalajokon: élesztőkivonat-maláta-kivonat agar (ISP Med. 2), anorganikus

1. táblázat

Az összehasonlító vizsgálatokhoz felhasznált autentikus *Micromonospora* törzsek

A törzs jelzése	Fajnév
ATCC 12452	<i>M. chalcea</i> (Neotípus)
ATCC 15835	<i>M. purpurea</i> (Típustörzs)
ATCC 15836	<i>M. echinospóra</i> ssp. <i>ferruginea</i> (Típustörzs)
ATCC 15837	<i>M. echinospóra</i> ssp. <i>echinospóra</i> (Típustörzs)
ATCC 21773	<i>M. inositolá</i>
ATCC 21819	<i>M. olivoasterospóra</i>
ATCC 21826	<i>M. sagamiensis</i>
ATCC 27007	<i>M. purpureochromogenes</i> (Típustörzs)
ATCC 27008	<i>M. ceorulea</i> (Neotípus)
ATCC 27029	<i>M. aurantiaca</i> (Típustörzs)
ATCC 27030	<i>M. lilacina</i> (Típustörzs)
ATCC 27031	<i>M. rubra</i> (Típustörzs)
ATCC 27114	<i>M. carbonacea</i> (Típustörzs)
ATCC 27331	<i>M. narashino</i> (Típustörzs)
ATCC 27334	<i>M. brunnea</i> (Típustörzs)
ATCC 27358	<i>M. parva</i> (Típustörzs)
ATCC 27596	<i>M. halophytica</i> ssp. <i>halophytica</i> (Típustörzs)
ATCC 27598	<i>M. megalomicea</i> ssp. <i>nigra</i> (Típustörzs)
ATCC 27600	<i>M. inyoensis</i>
RIA 472	<i>M. fusca</i>

2. táblázat

A Balaton-iszaphól nagy gyakorisággal izolálható *M. purpureochromogenes*. L. továbbá a *M. nigra* spec. nov. fajok tulajdonságai

Tulajdonságok		A pozitív törzsek %-os aránya az egyes fajok törzsei között	
		<i>M. purpureochromogenes</i> (10. csoport a dendrogramon)	<i>M. nigra</i> spec. nov. (11. csoport a dendrogramon)
1—2. Sporuláció típusa	{ „open web” „cluster” kevert	0 0 100	100 0 0
3. Sporofórák elágazása	{ monopodiális szimpodiális	100 0	100 0
4. Pszeudogmicélium jelenléte		0	31
5. A kolóniák	{ gyűrtek simák	100 0	100 0
6. A kolóniák	{ kemények lágyak	0 100	0 100
7. Spóraréteg jelenléte		100	100
8.	{ Narancssárga Vörös Lila Sötétbarna Halványbarna Kék Zöld	37	100
9.		0	0
10. A szubsztrát micélium		0	0
11. színe lehet		53	0
12.		11	0
13.		0	0
14.		0	0
15.	{ Narancssárga Sárga Vörös Kék Sötétbarna Halványbarna	0	0
16.		0	0
17. Az oldódó pigment színe lehet		0	0
18.		0	0
19.		53	0
20.		11	0
21. Rózsaszín oldódó pigment tirozin agaron		100	92
22. Sötétbarna oldódó pigment pepton-vas agaron		53	69
23.	{ Czapek-szach. agaron Glükóz-aszp. agaron ISP Med. 2 agaron ISP Med. 4 agaron ISP Med. 5 agaron	100	100
24.		100	100
25. Növekedés		100	100
26.		100	100
27.		100	0
28. Növ. ferde burgonya-közegen	CaCO ₃ jelenlétében	100	100
29.	nélkül	100	0

Tulajdonságok		A pozitív törzsek %-os aránya az egyes fajok törzsei között	
		<i>M. purpureochromogenes</i> (10. csoport a dendrogramon)	<i>M. nigra</i> spec. nov. (11. csoport a dendrogramon)
30.	$\left\{ \begin{array}{l} 2\% \\ 3\% \\ 4\% \\ 5\% \end{array} \right. \text{NaCl}$	37	100
31.		5	100
32. Növekedés		5	77
33.		0	15
34.	$\left\{ \begin{array}{l} 0\text{ }^{\circ}\text{C} \\ 6\text{ }^{\circ}\text{C} \\ 40\text{ }^{\circ}\text{C hőmérsékleten} \\ 45\text{ }^{\circ}\text{C} \\ 50\text{ }^{\circ}\text{C} \end{array} \right.$	0	0
35.		100	100
36. Növekedés		84	92
37.		0	62
38.		0	0
39. L-arabinóz	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Szénforrások} \\ \text{értékesítése} \end{array} \right.$	21	100
40. D-xilóz		100	100
41. L-ramnóz		0	0
42. D-fruktóz		100	100
43. D-galaktóz		100	100
44. D-glükóz		100	100
45. Mannóz		100	100
46. Szorbóz		0	0
47. Cellobióz		100	100
48. β -laktóz		100	100
49. Maltóz		100	100
50. α -melibióz		100	100
51. Szacharóz		100	100
52. Trehalóz		89	100
53. L-melicitóz		0	0
54. Raffinóz		100	23
55. Dextrin		100	100
56. Inulin		100	0
57. α -metil-D-glükozid		0	0
58. Szalicin		0	8
59. Adonit		0	0
60. Dulcit		0	0
61. Glicerin		95	0
62. D-mannit		0	0
63. D-szorbit		0	0
64. i-inozit		0	0
65. DL-alanin	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Nitrogénforrások} \\ \text{értékesítése} \end{array} \right.$	100	85
66. DL-fenilalanin		0	0
67. L-triptofán		0	0
68. L-glutaminsav		0	92
69. L-lizin		0	62
70. L-aszparagin		100	92
71. L-arginin		100	92
72. L-hisztidin		0	92
73. L-cisztin		0	0
74. NaNO_3		100	85
75. KNO_3		100	85
76. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		0	0

Tulajdonságok		A pozitív törzsek %-os aránya az egyes fajok törzsei között	
		<i>M. purpureo-chromogenes</i> (10. csoport a dendrogramon)	<i>M. nigra</i> spec. nov. (11. csoport a dendrogramon)
77. DL-alanin	Aminosavak mint egyedüli C- és N-források értékesítése	0	0
78. DL-fenilalanin		100	0
79. L-triptofán		17	0
80. L-glutaminsav		0	100
81. L-lizin		26	0
82. L-aszparagin		0	0
83. L-arginin		0	31
84. L-hisztidin		0	0
85. L-cisztin		0	0
86. Acetátértékesítés	{ jó	100	100
87.		0	0
	{ nincs	0	0
		0	0
88. Benzoátértékesítés	{ jó	0	0
		0	0
89.	{ nyomokban	0	0
		100	100
	{ nincs		
90. Citrát-értékesítés	{ jó	0	0
		100	15
91.	{ nincs	0	85
		0	0
	{ jó	0	0
		0	0
92. Oxalát-értékesítés	{ nyomokban	32	0
		68	100
93.	{ nincs	100	100
		0	0
94. Piruvát-értékesítés	{ jó	0	0
		0	0
95.	{ nyomokban	0	0
		0	0
	{ nincs		
96. Cellulóz-bontás		0	100
97. Allantoin-bontás		0	0
98. Eszkulin hidrolízis		100	100
99. Arbutin hidrolízis		0	0
100. Hippiurát hidrolízis		42	62
101. Keményítő hidrolízis		100	100
102. Tributirin hidrolízis		100	100
103. Tejemesztés 14 nap után		21	100
104. DN-áz aktivitás		53	38
105. RN-áz aktivitás		100	100
106. Ureáz aktivitás		0	0
107. Foszfataáz aktivitás		100	100
108. Arilszulfataáz aktivitás		0	0
109. Nitrát-redukció NO ₂ -té		32	100
110. Tellurit-redukció		84	62
111. Alginát bontása		0	0
112. Na-szaliciláttal szembeni érzékenység		0	0
113. Penicillinnel (3 IE) szemben	{ érzékeny	26	0
114.		74	8
		0	92
	{ mérs. érz.		
	{ rezisztens		
115. Oxacillinnel (10 µg) szemben	{ érzékeny	37	92
116.		63	0
		0	8
	{ mérs. érz.		
	{ rezisztens		

Tulajdonságok		A pozitív törzsek %-os aránya az egyes fajok törzsei között	
		<i>M. purpureo-chromogenes</i> (10. csoport a dendrogramon)	<i>M. nigra</i> spec. nov. (11. csoport a dendrogramon)
117. Meticillinnel (20 µg) szemben	érzékeny	63	69
118.	mérs. érz.	55	0
	rezisztens	5	31
119. Klóramfenikollal (30 µg)	érzékeny	74	77
120. szemben	mérs. érz.	26	8
	rezisztens	0	15
121. Oleandomicinnel (30 µg)	érzékeny	44	0
122. szemben	mérs. érz.	44	0
	rezisztens	12	100
123. Streptomicinnel (30 µg)	érzékeny	79	100
124. szemben	mérs. érz.	21	0
	rezisztens	0	0
125. Tetraciklinnel (30 µg) szemben	érzékeny	100	100
126.	mérs. érz.	0	0
	rezisztens	0	0
127. Neomicinnel (100 µg) szemben	érzékeny	89	100
128.	mérs. érz.	11	0
	rezisztens	0	0
129. Polimixin-B-vel (15 µg) szemben	érzékeny	95	62
	rezisztens	5	38
130. Eritromicinnel (10 µg)	érzékeny	74	0
131. szemben	mérs. érz.	26	0
	rezisztens	0	100
132. Szuperszeptillel (400 µg)	érzékeny	0	0
133. szemben	mérs. érz.	0	0
	rezisztens	100	100
134. Nitrofurantoinnal (300 µg)	érzékeny	11	0
135. szemben	mérs. érz.	0	0
	rezisztens	89	100
136. Klórtetraciklinnel (30 µg)	érzékeny	16	15
137. szemben	mérs. érz.	84	62
	rezisztens	0	23
138. Oxitetraciklinnel (30 µg)	érzékeny	21	31
139. szemben	mérs. érz.	79	69
	rezisztens	0	0

Tulajdonságok			A pozitív törzsek %-os aránya az egyes fajok törzsei között	
			<i>M. purpureo-chromogenes</i> (10. csoport a dendrogramon)	<i>M. nigra</i> spec. nov. (11. csoport a dendrogramon)
140. Vankomicinnel (50 µg)	}	érzékeny	16	15
141. szemben		mérs. érz.	84	85
		rezisztens	0	0
142. Kanamicinnel (30 µg)	}	érzékeny	42	75
143. szemben		mérs. érz.	58	25
		rezisztens	0	0
144. Spiramicinnel (30 µg)	}	érzékeny	0	0
145. szemben		mérs. érz.	53	8
		rezisztens	47	92
146. Ampicillinnel (20 µg)	}	érzékeny	95	62
147. szemben		mérs. érz.	5	0
		rezisztens	0	38
148. Kolisztinnel (20 µg)	}	érzékeny	87	8
szemben		rezisztens	13	92
149. Linkomicinnel (10 µg)	}	érzékeny	0	0
150. szemben		mérs. érz.	58	0
		rezisztens	42	100
151. Cefalosporinnal (10 µg)	}	érzékeny	89	62
152. szemben		mérs. érz.	11	38
		rezisztens	0	0
153. Prisztinamicinnel (10 µg)	}	érzékeny	89	0
154. szemben		mérs. érz.	11	15
		rezisztens	0	85
155. Nalidix-savval (30 µg)	}	érzékeny	0	0
156. szemben		mérs. érz.	0	0
		rezisztens	100	100
157. Paromomicinnel (50 µg)	}	érzékeny	42	23
158. szemben		mérs. érz.	58	77
		rezisztens	0	0
159. Gentamicinnel (20 µg)	}	érzékeny	100	100
szemben		rezisztens	0	0
160. Karbenicillinnel (50 µg)	}	érzékeny	83	54
161. szemben		mérs. érz.	17	15
		rezisztens	0	31

Tulajdonságok		A pozitív törzsek %-os aránya az egyes fajok törzsei között	
		<i>M. purpureo-chromogenes</i> (10. csoport a dendrogramon)	<i>M. nigra</i> spec. nov. (11. csoport a dendrogramon)
162. Nisztatinnal (100 IE)	} érzékeny mérs. érz. rezisztens	0	0
163. szemben		0	0
		100	100
164. Szumetrolimmal (25 µg)	} érzékeny mérs. érz. rezisztens	0	0
165. szemben		5	0
		95	100
166. <i>Bac. cereus</i> var. <i>mycoides</i> ATCC 9654	} Tesztorganizmusok- kal szembeni antagonizmus	0	0
167. <i>Bac. subtilis</i> ATCC 6633		0	0
168. <i>Escherichia coli</i> ATCC 9637		0	0
169. <i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341		0	0
170. <i>Staph. aureus</i> ATCC 6538		0	0
171. <i>Aspergillus niger</i> EM-0003		0	0
172. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EM-0004		0	0

só-keményítő agar (ISP Med. 4), glicerín-aszparagin agar (ISP Med. 5; Difco dehidrált készítmények alkalmazásával — SHIRLING és GOTTLIEB 1966), Czapek-szacharóz, glükóz-aszparagin és tirozin agar (WAKSMAN 1961), valamint pepton-vas agar (Difco). A törzsek numerikus analíziséhez kódolt kulturális bélyegeket a 2. táblázat tartalmazza.

A fiziológiai-biokémiai tulajdonságok vizsgálati módszerei:

Szénforrás értékesítés: A vizsgálatokat LUEDEMANN (1971a) módszere alapján végeztük el. A tesztelt szénforrásokat a 2. táblázatban ismertetjük. Inkubációs idő 2–4 hét.

Szerves savak értékesítése: A 2. táblázatban szereplő szerves savak értékesítésének vizsgálatát GORDON (1968) szerint eszközöltük. Inkubációs idő 3–4 hét.

Szerves és szervetlen nitrogénforrások értékesítése: A teszthez a következő alaptáptalajt alkalmaztuk: glükóz 1,0%; élesztőtökvonat 0,1%; CaCO₃ 0,1%; agar 1,5% (pH 7,0). Ehhez a 2. táblázatban felsorolt N-tartalmú vegyületeket 280 mg N/liter mennyiségben adtuk (SZABÓ 1974). Inkubációs idő 2–4 hét.

Aminosavaknak mint egyedüli C- és N-forrásnak az értékesítése: Alaptáptalaj: élesztőtökvonat 0,1%; CaCO₃ 0,1%; agar 1,5% (pH 7,0). Az aminosavakat (lásd 2. táblázat) 280 mg N/liter mennyiségben adagoltuk (SZABÓ 1974). Inkubáció 2–4 hétig.

pH-tolerancia: Meghatározásához CaCO_3 nélkül készült, ill. CaCO_3 -tal kiegészített ferde burgonya-közeget alkalmaztunk (LUEDEMANN 1971a). Megjegyezzük, hogy e tápközegek egyúttal kulturális tulajdonságok megfigyelésére is alkalmasak voltak.

Hőmérsékletitolerancia: A növekedés hőmérsékleti tartományának megállapításához keményítő-élesztőkivonat agaron 6, 40, 45 és 50 °C-on két hétig tenyésztettünk.

NaCl-tolerancia: Alaptáptalajként keményítő-élesztőkivonat agar (LUEDEMANN 1971a) szolgált, ehhez a NaCl-ot 2, 3, 4, 5, ill. 6%-os végkoncentrációban adagoltuk. Inkubációs idő 2 hét.

Cellulóz bontás: LUEDEMANN-féle folyékony szénforrás értékesítési alaptáptalajon szűrőpapírsíkkal. Inkubációs idő 4 hét, majd a szűrőpapírsík emésztését figyeltük meg.

Allantoin-bontás: A vizsgálatot KURUP és SCHMITT (1973) módszere alapján végeztük.

Eszkulin és arbutin hidrolízise: A COWAN és STEEL által 1965-ben javasolt leveshez 0,1%-os végkoncentrációban eszkulint, ill. arbutint adtunk. 4 hetes inkubáció után a tápleves megfeketedését (ill. az eszkulin esetén a fluoreszcencia eltűnését is) mint pozitív reakciót értékeltük.

Hippurát hidrolízis: A teszt kivitelezése GORDON és HORAN (1968) szerint.

Keményítő hidrolízis: A keményítő bontását keményítő-pepton-húskivonat agar lemezeken (SZABÓ és mtsai 1976) tanulmányoztuk. Inkubációs idő 2 hét.

Tributirin hidrolízis: Alaptáptalaj: glükóz 1,0%; élesztőkivonat 1,0%; agar 1,5%. Ehhez 1%-os végkoncentrációban glicerintributirátot adtunk, majd autoklávozás után lemezeket öntöttünk. A tesztet 3 hetes inkubáció után, a kolóniák körül kialakuló tisztulási zónák megfigyelése alapján értékeltük.

Tej emésztés: Detektálásához a LUEDEMANN (1971a) által javasolt módszert módosítottuk, úgy, hogy az alaptáptalaj és a sovány tej (Skim milk — Difco) keverési aránya nem 1:1, hanem 2:1 volt. A pontoltással inokulált agar lemezeket, melyeken kulturális sajátosságokat is megfigyelhettünk, 14–20 napig inkubáltuk, majd a kioldási zónák sugarát mértük.

Dezoxiribonukleáz és ribonukleáz aktivitás kimutatása: A vizsgálatokat JEFFRIES és mtsai (1957) alapján végeztük el. Inkubációs idő 2 hét.

Urea bontás: A tesztet a CHRISTENSEN (1946) által javasolt ferde agar táptalajt alkalmaztuk. Inkubációs idő 3 hét.

Foszfátáz kimutatása: A tesztet COWAN és STEEL (1965) alapján hajtottuk végre. Inkubációs idő 2 hét.

Arilszulfátáz aktivitás kimutatása: KURUP és SCHMITT

(1973) módszerét azzal a módosítással alkalmaztuk, hogy alaptápközegként glükóz-élesztőkivonat levest használtunk.

Nitrát-redukció: Kimutatása kétféle tápleves segítségével történt: a Difco nitrát, ill. glükóz-élesztőkivonat-nitrát (LUEDEMANN 1971a) leveseket beoltásuk után két hétig inkubáltuk.

Tellurit-redukció: A vizsgálatot KURUP és SCHMITT (1973) szerint hajtottuk végre, a glükóz-nutrient levest glükóz-élesztőkivonatlevessel helyettesítve. Inkubációs idő 10 nap.

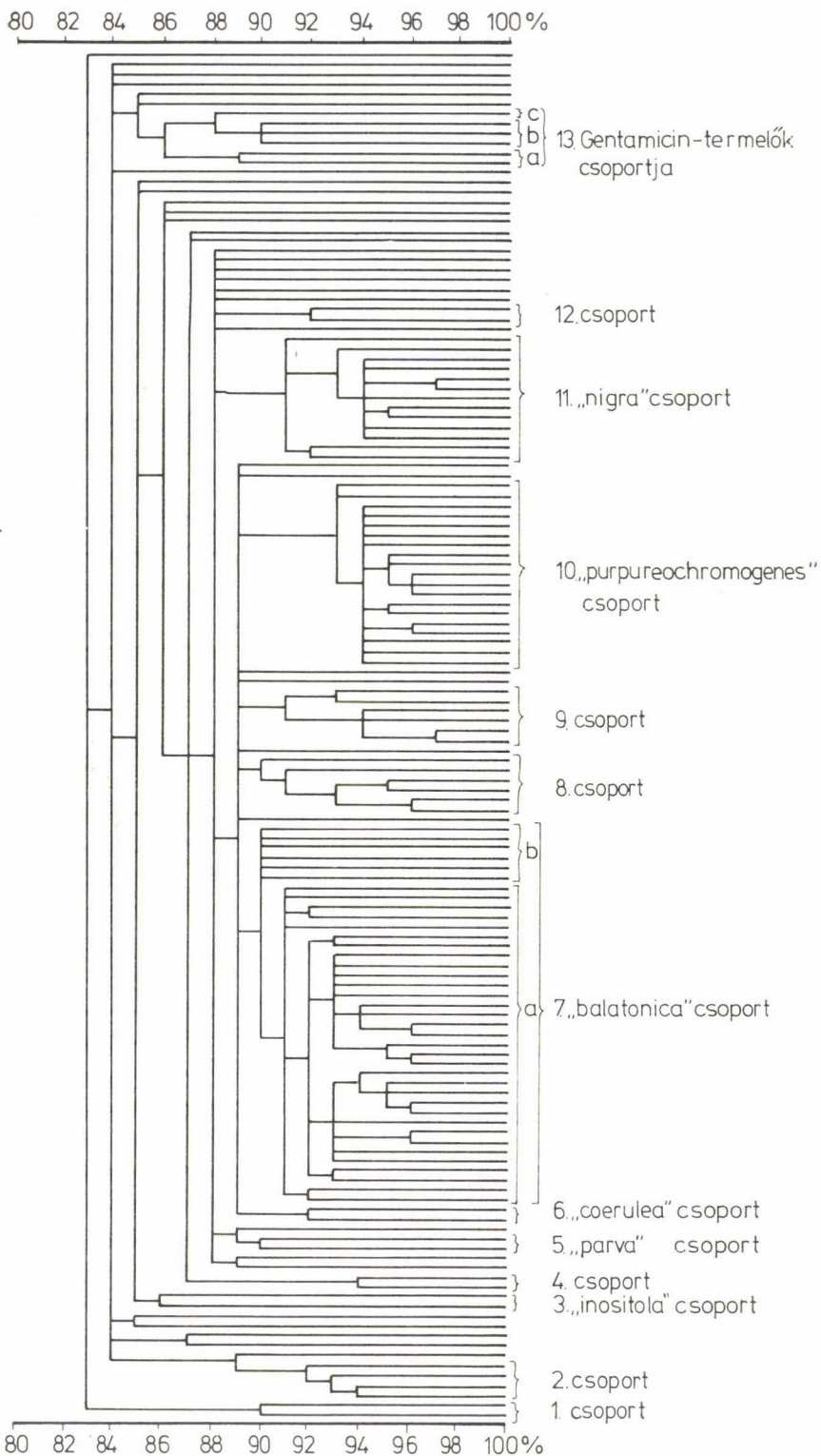
Alginát bontás: Detektálása DAVIS és EWING (1964) módszere alapján. **Érzékenység Na-szaliciláttal szemben:** A teszt leírását — TSUKAMURA alapján — GORDON és HORAN 1968-ban közzétették.

Érzékenység antibiotikumokkal és antibakteriális anyagokkal szemben: Keményítő-pepton-húskivonat agar lemezekre a törzsek megfelelő sűrűségű szuszpenzióját szélesztettük, majd a hatóanyagokat (lásd a 2. táblázatban) tartalmazó RESISTEST korongokat (Human Oltóanyagtermelő- és Kutatóintézet) az inokulált lemezekre helyeztük. Inkubációs idő 2 hét, majd a korongok körül kialakult gátlási zónák sugarát mértük. **Baktériumokkal és gombákkal szembeni antagonizmus vizsgálata:** Keményítő-élesztőkivonat agar lemezeket csíkok alakjában mikromonospórákkal oltottunk, majd 1 hétig inkubáltunk. Ezután a lemezekre a tesztbaktériumok (lásd a 2. táblázatban) 1,5% agart tartalmazó steril, felolvasztott, 50 °C-os nutrient agarban készített egyenletes szuszpenzióját öntöttük. A gombák esetén (lásd a 2. táblázatban) hasonló módon jártunk el, azonban a tesztorganizmusok szuszpenzióit 5% maláta-kivonatot és 1,5% agart tartalmazó tápközegben állítottuk elő. A lemezeket baktériumokkal 24–48, gombákkal pedig 48–72 óráig ismételtelen inkubáltuk. A kiértékelés a gátlási zónák szélessége alapján történt.

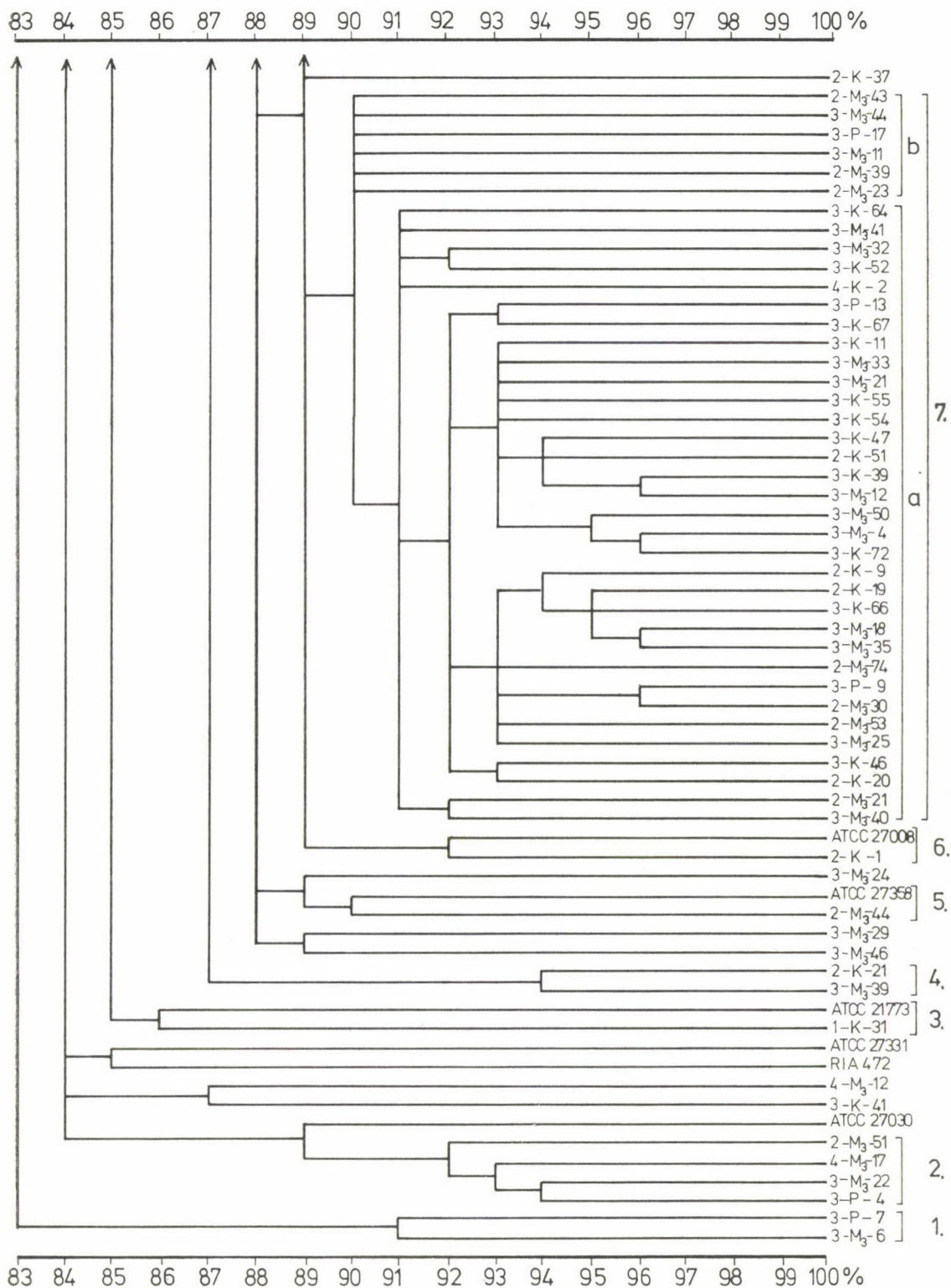
Numerikus analízis: A laboratóriumi vizsgálatok eredményeit az Adanson-elveknek megfelelően bináris rendszerben, részben mennyiségi alapon is kódoltuk. A hasonlósági indexek (SOKAL és MICHENER 1958) gépi kalkulálása 172 fiziológiai-biokémiai, kulturális-morfológiai, ill. mikromorfológiai tulajdonság (lásd a 2. táblázatban) alapján történt. A cluster-analízis algoritmus és a számítógépes COMPASS program Ferenczy Lászlótól származik (MTA Számítástechnikai és Automatizálási Kutatóintézet). A programot Control Data B-300 számítógépen futatták le. Ferenczy László készítette az alant bemutatott dendrogramot is, amiért e helyen mondok hálás köszönetet.

Eredmények

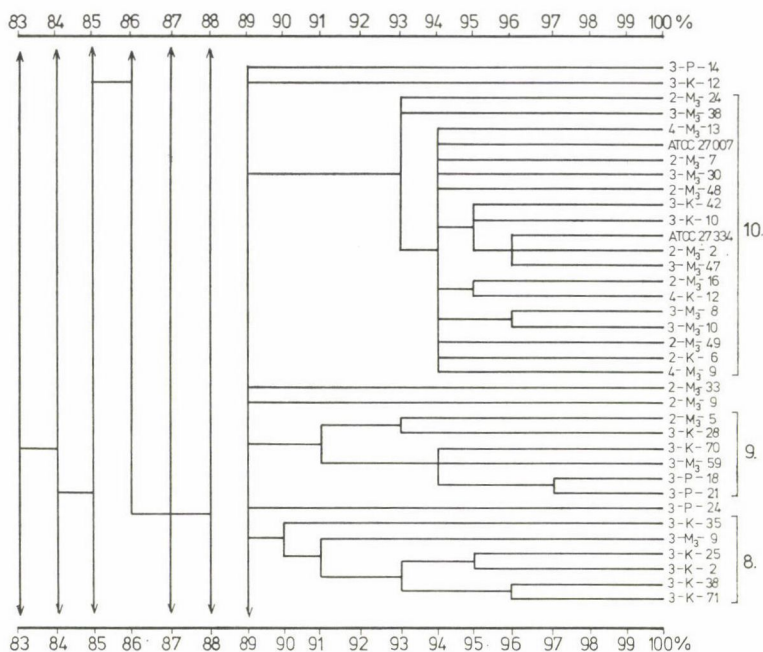
A fenékküledék legfelső, 0–15 cm vastagságú rétegében a fakultatív és obligát aerob baktériumok csíraszama 1 g nedves súlyra vonatkoztatva átlagosan százezer körüli nagyságrendűnek adódott. Az iszapmintákból nem szelek-



1. ábra. 120 balatoni és 20 autentikus *Micromonospora* törzs gépi csoportanalízisének eredményei alapján szerkesztett és a százalékos hasonlóság mértékét bemutató dendrogram



2. ábra. Részlet a dendrogramból: az 1-7. csoportok tagjainak megoszlása



3. ábra. Részlet a dendrogramból: a 8—10. csoportok tagjainak megoszlása

tív alapon, összesen 981, az aerob és fakultatív flórát reprezentáló baktérium-törzset izoláltunk. Közülük a mikroszkópos vizsgálatok szerint 269, tehát a törzskollekció 27%-a, aktinomiceta volt. Utóbbiak megoszlását a 3. táblázat mutatja be. Eszerint 50%-ukat a *Micromonospora* genuszba sorolhattuk, ugyanakkor a sztreptomiceták 19, a nocardioform szervezetek 15 és az egyéb, ritkább előfordulású genuszokba tartozó sugárgombák az aktinomiceta törzskollekció 16%-át tették ki.

a) Numerikus analízis

A Balaton-iszaphól izolált 135 *Micromonospora* törzs közül laboratóriumi körülményekhez viszonylag hosszú idő, mintegy 4—5 hónap eltelte után 132 törzs adaptált. Összehasonlító numerikus analízisbe 20 autentikus és 120 iszapmikromonospora törzset vontunk be.

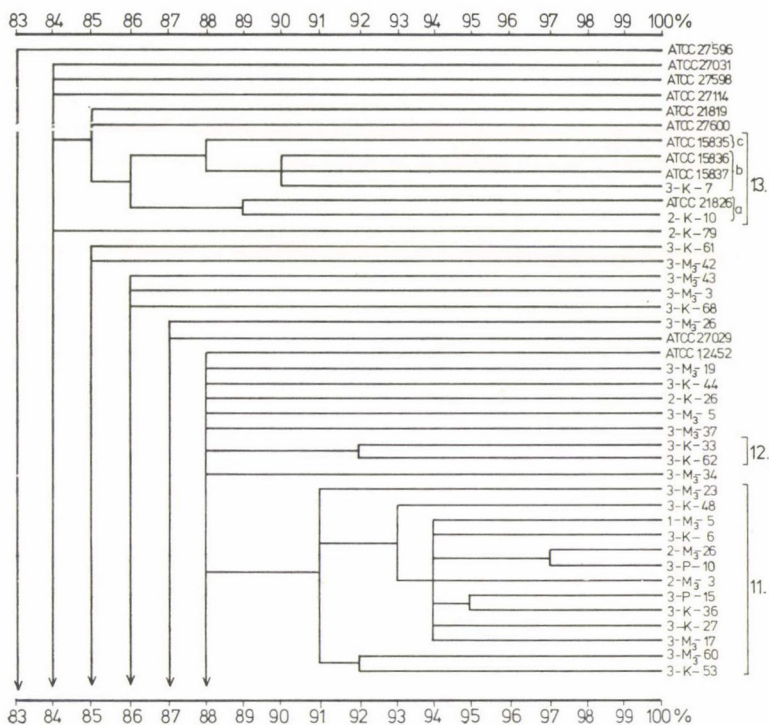
A gépi csoportanalízis eredményei alapján szerkesztett dendrogramot az 1. ábra szemlélteti. A számítógép a 140 törzset 83%-os hasonlósági szinten egyetlen nagy csoportba egyesítette. A dendrogramon 13 szűkebb törzscsoport különíthető el, ezek hasonlósági szintje 86 és 94% között váltakozik. A 13 csoportba összesen 105 törzs került, míg 35 törzset a gép csoportok közötti pozícióba helyezett. A 2., 3. és 4. ábrákon a dendrogram alapján az egyes törzscsoportokat részletezzük.

3. táblázat

A Balaton-iszaphból izolált aktinomiceta törzsek megoszlása

A minta számjelzése	Micromono- spora	%	Strepto- myces	%	Nocardio- form	%	Más aktinomiceta	%	Összesen
1	4	11	5	14	18	48	10	27	37
2	36	68	2	4	8	15	7	13	53
3	89	59	32	21	6	4	25	16	152
4	6	24	10	40	8	32	1	4	25
5	—	0	2	100	—	0	—	0	2
Összesen	135	50	51	19	40	15	43	16	269

A 2. ábrán bemutatott 3., 5. és 6. számú, két-két tagú csoportok mindegyikében 1–1 autentikus és 1–1 balatoni törzs található 86, 90, ill. 92%-os hasonlósági szinten egyesítve. A balatoni iszapmikromonosporák között tehát az *M. inositol*a, az *M. parva* és az *M. corulea* fajok jelenlétét a gépi azonosítás igazolta. Az 1. és 4. csoportokba 90 és 94%-os hasonlósági szinten 2–2, a 2. csoportba pedig 92%-os hasonlósági szinten 4 balatoni törzs került. A gép által



4. ábra. Részlet a dendrogramból: a 11–13. csoportok tagjainak megoszlása

alkotott legnagyobb, 39 törzsből álló 7. csoport képviselőit *Micromonospora balatonica* néven új fajként azonosítottuk (SZABÓ Zs. 1982).

A 3. ábrán látható, viszonylag magas, 93%-os hasonlósági szinten egyesített 10. csoport 2 autentikus (*M. purpureochromogenes* és *M. brunnea*) és 17 balatoni törzset tartalmaz. A 3. ábrán még az 8. és 9. csoport található, ezekbe a gép 90, ill. 91%-os hasonlósági szinten 6–6 balatoni törzset sorolt.

Autentikus, mégpedig gentamicin-termelő törzseket foglal magába a 4. ábrán látható, 86%-os hasonlósági szinten összefogott 13. csoport. A gép, amely egyúttal a gentamicin-termelő fajok közötti rokonsági kapcsolatokat is feltárta, 2 balatoni törzset is idesorolt. E csoport „a” alcsoportjába 89%-os hasonlósági szinten az *M. sagamiensis* ATCC 21826 jelzésű törzse és 1 balatoni törzs, míg a „b” alcsoportjába 90%-os hasonlósági szinten az *M. echinospora* két alfajának ATCC 15836 és ATCC 15837 jelzésű autentikus törzsei, továbbá 1 balatoni törzs került. A gép az „a” alcsoporttól az ugyancsak gentamicin-termelő *M. purpurea* ATCC 15835 jelzésű törzs felé 88%-os hasonlósági szintet jelzett. A 11. és 12. csoport ugyancsak a 4. ábrán szerepel. A gép a 12. csoportba 92%-os hasonlósági szinten 2, míg a 91%-os hasonlósági szinten egyesített 11. csoportba 13 balatoni törzset sorolt. A gépi analízisre támaszkodva a 11. csoportba tartozó törzseket *Micromonospora nigra* néven új fajként határoztuk meg.

A dendrogramon számos törzzsel szereplő 10. és 11. csoportok képviselőit alant részletesen is jellemezzük. Ehhez a 2. táblázatban e törzseknek a numerikus analízishez kódolt valamennyi tulajdonságát ismertetjük, mégpedig úgy, hogy az egyes tesztek relációjában pozitívnak bizonyult törzsek %-os arányát a csoportba tartozó összes törzsre vonatkoztatva adjuk meg.

b) A *Micromonospora nigra* balatoni populációja (11. csoport)

A Balaton fenéküledékéből izolált mikromonospora törzsek 10%-át az *M. nigra* spec. nov. képviselői teszik ki. E faj törzseit mikromorfológiai szempontból jellemzi, hogy magánosan képződő spóráik a hifafonalak mentén egyenletesen oszlanak el („open web” típusú sporuláció) és a sporofórák elágazása monopodiális. Kulturális-morfológiai sajátágaik: csak nyomokban nőnek glicerin-aszparagin (ISP Med. 5) agaron, viszont Czapek-szacharóz, glükóz-aszparagin, maláta kivonat-élesztő kivonat (ISP Med. 2), anorganikus só-keményítő (ISP Med. 4) agaron, valamint ferde burgonya-közegen CaCO_3 jelenlétében jó növekedést mutatnak. A szubsztrátmicélium mindig narancsszínű, de ezt a gyorsan növekedő kolóniák felszínén 5–6 nap alatt képződő fekete sporulációs réteg elfedi. Az intenzív sporuláció következtében a telepek konzisztenciája nyúlós lesz. A fent felsorolt táptalajokon oldódó pigment nem termelődik, azonban pepton-vas agaron a törzsek többségénél (92%) egy hét inkubáció után sötétbarna diffuzibilis pigment képződése figyelhető meg. Fiziológiai-

biokémiai tulajdonságaik: ferde burgonya-közegen CaCO_3 nélkül (pH 5,8—6,0) nem növekednek, 3% NaCl-ot valamennyi törzs tolerál, azonban 4%-ot már csak kb. 3/4-ed részük (ezek közül néhány viszont még 5% NaCl jelenlétében is képes növekedni). 40 °C-on majdnem minden törzs, 45 °C-on 62%-uk növekszik. Értékesítik az L-arabinózt, D-xilózt, D-fruktózt, D-galaktózt, D-glükózt, mannózt, cellobiózt, β -laktózt, maltózt, α -melibiózt, szacharózt, trehalózt, dextrint, valamint az acetát és piruvát szénforrásokat. Ezzel szemben L-ramnózt, szorbózt, L-melicitózt, inulint, α -metil-D-glükozidot, adonitot, dulcitot, glicerint, D-mannitot, D-szorbitot, i-inozitot, továbbá benzoátot és oxalátot nem hasznosítanak. A tesztelt aminosavak közül ki kell emelni az L-glutaminsavat, melyet C- és N-forrásként szinte valamennyi *M. nigra* törzs értékesít. Cellulóz-bontás, eszkulin, keményítő és tributirin hidrolízise pozitív. A tejemésztés igen intenzív. Nitrátot nitráttá redukálnak. Allantoin-bontás és arbutin hidrolízis negatív, ureáz és arilszulfatáz aktivitásuk nincs. Valamennyi törzs érzékeny streptomycin (30 μg), tetraciklin (30 μg), neomicin (100 μg), gentamicin (20 μg), oxitetraciklin (30 μg), vankomicin (50 μg), kanamicin (30 μg), cefalosporin (10 μg) és paromomicin (50 μg) antibiotikumokkal szemben, de az utóbbi öt hatóanyag esetén a törzsek egy része csak mérsékelt érzékenységet mutat. Az *M. nigra* az oleandomicin (30 μg), eritromicin (10 μg), szuperszeptil (400 μg), nitrofurantoin (300 μg), linkomicin (10 μg), nalidix-sav (30 μg), nisztatin (100 IE) és szumetrolim (25 μg) hatóanyagokkal szemben mindig rezisztens. A vizsgált 7 tesztorganizmussal szemben antagonizmus nem tapasztalható.

c) *A 10., „purpureochromogenes” csoport*

A dendrogram által alkotott második legnagyobb, 10. csoportba 2 autentikus és 17 balatoni törzs tartozik. A 19 mikromonospora törzs legfontosabb tulajdonságai a következők. Mikromorfológia: spórákat mind magánosan, mind fűrtökben megfigyelhetünk, a spóratartó hifafonalak elágazása monopodiális. Kulturális-morfológiai sajátosságok: a törzsek a 2. táblázatban felsorolt valamennyi táptalajon növekednek, a kolóniákon spóraréteg mindig képződik. Tirozin agaron minden törzs rózsaszín oldódó pigmentet termel, más táptalajokon viszont a diffuzibilis pigmentek képződése variabilis sajátyságnak tűnik. Fiziológiai-biokémiai tulajdonságok: a ferde burgonya-közeg természetes savasságát (pH 5,8—6,0) valamennyi törzs jól tolerálja, a NaCl- és hőmérsékleti tolerancia viszont a csoporton belül variabilis. Szénforrás értékesítés: D-xilózt, D-fruktózt, D-galaktózt, D-glükózt, mannózt, cellobiózt, β -laktózt, maltózt, α -melibiózt, szacharózt, raffinózt, dextrint és inulint, valamint acetátot és piruvátot jól hasznosítanak, citráton viszont csak nyomokban növekednek. L-ramnózt, szorbózt, L-melicitózt, α -metil-D-glükozidot, szalicint, adonitot, dulcitot, D-mannitot, D-szorbitot és i-inozitot, ill. benzoátot egyetlen törzs sem értékesít. A vizsgált szerves és szervetlen N-források közül DL-alanint, L-asz-

paragint, L-arginint, NaNO_3 -ot és KNO_3 -ot minden törzs hasznosít, az egyedüli C- és N-forrásként alkalmazott aminosavak közül csak a DL-fenilalanin bizonyul valamennyi számára értékesíthetőnek. Az eszkulin, keményítő és tributirin hidrolízis, illetve a ribonukleáz és foszfatáz aktivitás mindig pozitív, viszont a cellulóz- és allantoin-bontás, az arbutin hidrolízise, valamint az ureáz és arilszulfatáz aktivitás mindig negatív. A törzsek mérsékelt vagy erősebb érzékenységet mutatnak a penicillin (3 IE), oxacillin (10 μg), klóramfenikol (30 μg), streptomycin (30 μg), tetraciklin (30 μg), neomicin (100 μg), eritromicin (10 μg), klórtetraciklin (30 μg), oxitettraciklin (30 μg), vankomicin (50 μg), kanamicin (30 μg), ampicillin (20 μg), cefalosporin (10 μg), prisztinamicin (10 μg), paromomicin (50 μg), gentamicin (20 μg) és karbenicillin (50 μg) antibiotikumokkal szemben, míg a szuperszeptil (400 μg), nalidix-sav (30 μg) és niszztatin (100 IE) hatóanyagok esetén rezisztencia tapasztalható. A vizsgált tesztorganizmusokat e csoport törzsei nem gátolják.

Az eredmények megbeszélése

A Balaton fenéküledékének legfelső horizontjában az aktinomiceták tevékenysége feltehetően sokkal intenzívebb lehet, mint azt a lemezöntéses csíraszám adatok mutatják. Az ilyen eljárásnál ugyanis a lemezeken kifejlődött kolóniák mennyiségével kalkulálunk, márpedig az aktinomiceták hifafonalai a baktériumtelepekkel szemben csak nehezen dezintegrálhatóak és nagyon gyakran a sok sejtegységből felépült fonalakból csak egyetlen kolónia fejlődik. Az aktinomiceták számaránya tehát az általunk kapott 27%-nál lényegesen magasabb lehetett.

Az izzapaktinomiceta törzsek genuszok szerinti százalékos megoszlását tekintve JOHNSTON (1972) a balatoni törzsek adataihoz hasonló eredményeket közölt. Törzsei között a mikromonosporák 54, a sztreptomiceták 26 és a nocardioformok 14%-ban képviseltették magukat. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy JOHNSTON törzsei nem egy, hanem 13, különböző produktivitású tó fenéküledékéből származtak.

A balatoni törzsek numerikus analízise alapján az alanti következtetésekre juthatunk. A már elismert *Micromonospora* fajokkal az általunk izolált törzseknek mindössze 20%-a azonosítható. Ezek legnagyobb része a 10. csoportba tartozik (3. ábra), melybe a gép még két autentikus törzset is beépített. Már korábbi vizsgálataink szerint is úgy tűnt, hogy az *M. purpureochromogenes* ATCC 27007 és az *M. brunnea* ATCC 27334 azonos fajhoz tartozhatnak. (SZABÓ Zs. mtsai 1982). Feltevésünket most a gép is alátámasztotta. Az International Code of Nomenclature of Bacteria (1976) alapján a LUEDEMANN által 1971-ben új kombinációban közölt *M. purpureochromogenes* fajnevet előnyben részesítve javasoljuk, hogy az 1969-ben szovjet szerzők által új fajként leírt *M.*

brunnea neve ennek szinonimájaként szerepeljen. A 10. csoportba tartozó 17 balatoni törzs adatai alapján további érdekes taxonómiai következtetéseket tehetünk. Eszerint az *M. purpureochromogenes* eddig előkerült törzseinél észlelt és taxonómiai szempontból fontosnak tartott barna endo- és exopigmentnek a fajmeghatározásban nincsen olyan fontossága, mint azt korábban gondolták. Mind a konvencionális, mind pedig a numerikus analízis alapján ugyanis e fajhoz olyan balatoni törzsek is tartoznak, melyek ilyen pigmentet egyáltalán nem termelnek, de fiziológiai tulajdonságaikban az *M. purpureochromogenes* tipikus képviselőivel messzemenő hasonlóságot mutatnak. Bár a numerikus analízisbe csak 8 tipikusan pigmentált és 5 ilyen pigmentációt nem mutató szervezetet vontunk be, elmondhatjuk, hogy a Balaton-iszapból összesen 17 képviselőjüket izoláltuk. Ezeket különben az *M. purpureochromogenes* trehalóz-pozitív balatoni ökotípusának tekinthetjük. A 10. csoport még 4 további iszapmikromonospórát tartalmaz, ezeket hagyományos módszerekkel nem tudtuk meghatározni. E pigmentációjukat tekintve nehezen definiálható, arabinóz-pozitív törzsek gépi besorolása az *M. purpureochromogenes* variabilis tulajdonságainak számát tovább növelte (így pl. egy törzs közülük glicerint nem hasznosít és még 4% NaCl mellett is képes növekedni). E faj eddig előkerült törzseit inkább talajokból izolálták, előfordulását tavi üledékben először FERNANDEZ (1980) említi, aki tipikusan pigmentált képviselőit a Hévízi-tóból tenyésztette ki. Az *M. purpureochromogenes* a balatoni iszapmikromonospórák között nagy gyakoriságú (törzseink között 16%-ban fordul elő).

Gyakorlati szempontból igen jelentősnek minősíthetjük, hogy a Balaton iszapjából a gyógyászati szempontból rendkívül értékes gentamicint termelő törzsek, ha kis számban is, de kimutathatóak. Az *M. sagamiensis* 2-K-10 és az *M. echinospora* 3-K-7 jelzésű balatoni törzsek az iszapban is hatóanyagot termelhetnek, antibakteriális tesztekben ugyanis mind Gram-pozitív, mind pedig Gram-negatív baktériumokkal szemben hatékony antagonistának bizonyultak. Mivel a gentamicin-termelő fajok igen jól felismerhető jellemvonásokkal rendelkeznek, a fent említett két balatoni törzset konvencionális módszerekkel is hasonló eredménnyel határoztuk meg, ezenkívül *M. purpurea*-ként azonosítottunk egy 3-K-13 jelzésű mikromonospóra törzset is, amely azonban a későbbiekben kihalt, így gépi analízisére a hiányzó adatok miatt nem kerülhetett sor. A gentamicin-termelő törzsek numerikus analízise alapján elmondhatjuk, hogy bár e törzsek szoros rokonságban állnak egymással és így a 13. csoport önálló egységként kezelhető, mégis nem fogadható el SVESHNIKOVA és mtsainak (1969 és 1970) az a megállapítása, miszerint az *M. purpurea* és az *M. echinospora* egyetlen fajba sorolható. A gentamicin-termelő mikromonospórák egyébként minden bizonnyal ritka szervezetek. Újabb előfordulásukra ugyanis a LUEDEMANN és BRODSKY (1964) által Észak-Amerikában izolált *M. purpurea* ATCC 15835 és az *M. echinospora* törzsek, ill. a japán *M. sagamiensis* ATCC 21826 (NARA és mtsai 1975) után csak szabadalmakban utalnak. A

Balatonban, amely így a gentamicin-termelők első irodalomban is nyilvántartott európai lelőhelyének tekinthető, e szervezetek viszonylag nem közönségesek. Izolált törzseik együttesen az összes izolátum 2,5%-át tették ki.

A balatoni törzsek között még három további ritka előfordulású *Micromonospora* faj azonosságát mutathattuk ki. Így gyűjteményünkben az *M. inositol*a (KAWAMOTO és mtsai 1974), az *M. parva* (SVESHNIKOVA és mtsai 1969 és 1970) és az *M. coerulea* (LUEDEMANN 1971b) fajokat 1–1 törzs képviselte. Megjegyezzük, hogy ezek közül hagyományos taxonómiai módszerekkel a 2-M₃-44 jelzésű törzset, mint *M. parva*-t nem azonosíthattuk. Bár a 3., „inositol” csoport hasonlósági szintje igen alacsony (86%), azonban két tagjának faji szintű azonosítását reálisnak tartjuk, ugyanis a konvencionális módszerekkel is hasonló eredményre jutottunk. Az *M. inositol*a 1-K-31 egyébként nem volt antagonista (az *M. inositol*a ATCC 21773 antibiotikum-termelő törzs). Az *M. coerulea*-t tavi iszapokból még nem tenyésztették ki. JOHNSTON (1972) pl. iszapokból e fajra jellemző zölden pigmentált törzseket egyáltalán nem izolált.

A fentiekben ismertetett 5 csoportba, melyekbe a gép összesen 7 nemzetközileg elismert *Micromonospora* faj autentikus törzseit is besorolta, az általunk izolált balatoni törzseknek mindössze 20%-a került. A gépi analízis szerint tehát a Balaton fenékküledékében főként olyan mikromonospora típusok észlelhetők, melyek egyetlen eddig ismert fajjal sem azonosíthatóak. Ezeket képviseli az a 74 törzs, melyeket a gép egyenként magas hasonlósági szinten egyesített nyolc csoportba sorolt. Az 1., a 4. és a 12. csoport 2–2, a 2. csoport 4, a 8. és a 9. csoport pedig 6–6 balatoni törzset tartalmaz. Az izolált összes törzs között ezek csak igen alacsony, csoportonként 1,5–4,5%-ot tesznek ki. Ezzel szemben a 7. és a 11. csoportok képviselői izolátumaink 30, ill. 10%-át is elérték. Ezek nyilván a Balaton jellegzetes, mindmáig ismeretlen mikromonosporái. Mindkettőt új fajként írjuk le, mégpedig a 11. csoport tagjait mint *M. nigra*-t e helyen.

Az *M. nigra*, továbbá az *M. purpureochromogenes* képviselőinek részletes tulajdonságanalízise (2. táblázat) arra mutat, hogy a Balaton iszapjában e fajok populációi igen variabilisak. E variabilitás nemcsak a mikromorfológiai és a kulturális-morfológiai sajátságok terén tapasztalható, hanem éppen a fiziológiai-biokémiai tulajdonságok esetén a legkifejezettebbek. Bár a *Micromonospora*-k variabilitására már többen is rámutattak, így pl. LUEDEMANN (1969 és 1971c) és JOHNSTON (1972), azonban e tényt adatokkal, legalábbis nagyszámú törzs vizsgálata alapján, még eddig egyetlen szerző sem igazolta. Egyes tulajdonságok, így pl. a nitrát-redukció közzismerten variabilis, kevésbé tudtuk ezt azonban a fajmeghatározásban döntő fontosságúnak tartott szénforrás értékesítésről. Vizsgálataink szerint a gép által konstruált három legnagyobb törzscsoportban az L-arabinóz, az α -melibióz, a trehalóz, a raffinóz, az α -metil-D-glükózid, a szalicin, a glicerín és a D-mannit értékesítése variabilis lehet. Ezenkívül variabilisnek tűnik több N-forrás, ill. C- és N-forrásként hasz-

nosítható aminosav értékesítése, a hippurát hidrolízise, a DN-áz, az RN-áz, az ureáz és foszfatáz aktivitás, a tellurit-redukció, valamint a már említett NO_3 -redukció. Mindezekhez járul még az antibiotikumokkal szemben mutatott érzékenység instabilitása is. A konvencionális módszerekkel szemben a variabilitást legpregnansabban a gépi csoportanalízis mutatja ki. Mivel a Balatonból csak három faj nagyobb populációját tanulmányozhattuk, jelenleg nincs módunkban a fajok meghatározásához szüksége kritériumok általános értékelésére. A mikromonosporáknál is a fajfogalom tisztázásához még további, első sorban numerikus vizsgálatok szükségeseek.

A *Micromonospora nigra* spec. nov. leírása

Név: *Micromonospora nigra* (az erőteljes sporuláció következtében a kolóniák a legtöbb táptalajon feketék).

Lelőhely: Az *M. nigra* törzseit Tihany térségében a Balaton fenéküledékéből izoláltuk.

Holotípus törzs: 1-M₃-5 (az ATCC-ben, valamint az ELTE Mikrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményében helyeztük letétbe).

A *Micromonospora nigra* 1-M₃-5 jelzésű holotípus törzsének leírása

Mikromorfológia: A magános, gömbölyű spórák a hifafonalak mentén egyenletesen oszlanak el („open web” típusú sporuláció). Paránytenyészetben jól megfigyelhető, hogy a spórák szesszilisek, továbbá, hogy a spóratartó hifafonalak elágazása monopodiális. Levestenyészetben a sporulációt körültekintően tanulmányozni nem lehet, mivel fonalas struktúrát a látómezőben már igen rövid, 4–5 napos inkubáció után is alig találhatunk.

Kulturális-morfológiai sajátosságok: Élesztőkivonat-malátakivonat agar (ISP Med. 2): jó növekedés, gyűrt felszínű, narancsszínű, majd fekete kolóniák. Oldódó pigment nincs. Anorganikus só-keményítő agar (ISP Med. 4): jó növekedés, a kolóniák, melyek kevésbé kiemelkedőek, élénk narancsszínűek, majd feketék. Oldódó pigment nincs. Glicerinaszparagin agar (ISP Med. 5): növekedés nyomokban, kissé barnás színű kolóniák, oldódó pigment nincs. Czapek-szacharóz agar: gyér vagy közepes növekedés, élénk narancsszínű, majd barna ill. fekete kolóniák, oldódó pigment nincs. Glükóz-aszparagin agar: közepes növekedés, zöldesszürke kolóniák, oldódó pigment nincs. Tirozin agar: gyér növekedés, szürkésbarna kolóniák; gyér, rózsásbarna oldódó pigment. Pepton-vas agar: közepes növekedés, mind a kolóniák, mind pedig a 2 hét inkubáció után megfigyelhető oldódó pigment barnásfekete. Tej agar: igen jó növekedés, erősen gyűrt, élénk narancsszínű, majd barna, ill. fekete kolóniák. Ferde burgonya-közegen csak CaCO_3 jelenlétében növekedik, ekkor viszont igen jól; gyűrt felszínű kolóniái vöröses narancsszínűek, felszínükön néhol fekete spóraréteg található.

Az 1-M₃-5 jelzésű törzset, az *M. nigra* többi képviselőjéhez hasonlóan kulturális szempontból jellemzi, hogy valamennyi táptalajon a kezdetben halványabb vagy élénk narancsszínű kolóniáin fekete spóráréteg képződik. Az intenzív sporulációnak köszönhetően a telepek konzisztenciája nyúlós lesz.

Fiziológiai-biológiai tulajdonságok: Szénforrás értékesítés: L-arabinózt, D-xilózt, D-fruktózt, D-galaktózt, D-glükózt, mannózt, cellobiózt, β -laktózt, maltózt, α -melibiózt, szacharózt, trehalózt, dextrint, továbbá acetátot és piruvátot hasznosít, viszont az L-ramnózt, szorbózt, L-melicitózt, raffinózt, inulin, α -metil-D-glükózid, szalicin, adonit, dulcit, glicerint, D-mannit, D-szorbit, i-inozot, valamint a benzoát, citrát és oxalát szénforrásokat nem értékesíti. Nitrogénforrás értékesítés: DL-alanint, L-glutaminsavat, L-lizint, L-aszparagint, L-arginint, L-hisztidint, NaNO₃-ot és KNO₃-ot értékesít, L-triptofán és L-cisztin jelenlétében nyomokban növekedik, a DL-fenilalanin és (NH₄)₂SO₄ nitrogénforrásokat pedig egyáltalán nem hasznosítja. Aminosavaknak mint egyedüli C- és N-forrásnak az értékesítése: ily módon egyedül csak az L-glutaminsavat hasznosítja, a DL-alanin, DL-fenilalanin, L-triptofán, L-lizin, L-aszparagin, L-arginin, L-hisztidin és L-cisztin aminosavakat viszont egyedüli C- és N-forrásként értékesíteni nem képes. Ferde burgonya-közegen CaCO₃ hozzáadása nélkül (pH 5,8–6,0) nem növekedik. NaCl-tolerancia: 4%. 45 °C-on növekedését még észleltük, 50 °C-on viszont már nem tenyészthető. Cellulóz-bontás, hippurát, eszkulin, keményítő és tributirin hidrolízise pozitív. Tej-emésztés erősen pozitív (14 napos inkubáció után a kioldási zóna sugara 15 mm). Foszfataz aktivitása van, ureáz aktivitás csak nyomokban tapasztalható. Allantoin és alginát bontása, arbutin hidrolízise negatív, arilszulfataz és DN-áz aktivitás nincs, az RN-áz aktivitás igen gyenge. Nitrátot nitráttá redukál, a tellurit redukciója viszont csak nyomokban észlelhető. Na-szaliciláttal, továbbá oxacillin (10 μ g), meticillin (20 μ g), streptomycin (30 μ g), tetraciklin (30 μ g), neomicin (100 μ g), polimixin-B (15 μ g), oxitetraciklin (30 μ g), vankomicin (50 μ g), kanamicin (30 μ g), ampicillin (20 μ g), cefalosporin (10 μ g), gentamicin (20 μ g) és karbenicillin (50 μ g) antibiotikumokkal szemben erősen, a klóramfenikol (30 μ g), klórtetraciklin (30 μ g) és paromomicin (50 μ g) hatóanyagokkal szemben pedig mérsékelten érzékeny. A penicillinnel (3 IE), oleandomicinnel (30 μ g), eritromicinnel (10 μ g), szuperszeptillel (400 μ g), nitrofurantoinnal (300 μ g), spiramicinnel (30 μ g), kolisztinnel (20 μ g), linkomicinnel (10 μ g), prisztinamicinnel (10 μ g), nalidix-savval (30 μ g), nisztatinnal (100 IE) és szumetrolimmal (25 μ g) szemben rezisztenciát mutat. A vizsgált tesztorganizmusokat (2. táblázat) növekedésükben nem gátolja.

Variabilitás: Az új faj Balatonból kitenyésztett populációjának vizsgálata során a következő sajátosságok variabilitását észleltük: pseudodélgmicélium jelenléte a kolóniák felszínén, rózsaszín, valamint sötétbarna oldódó pigment termelése tirozin ill. pepton-vas agaron, növekedés 4 és 5% NaCl jelenlé-

tében, továbbá 40 és 45 °C hőmérsékleten, raffinóz, szalicin, továbbá citrát szénforrások, DL-alanin, L-lizin, L-aszparagin, L-arginin, L-hisztidin, NaNO_3 és KNO_3 nitrogénforrások értékesítése, L-arginin egyedüli C- és N-forrásként való hasznosítása, hippurát hidrolízise, DN-áz aktivitás, tellurit-redukció, ezenkívül a penicillin (3 IE), oxacillin (10 μg), meticillin (20 μg), klóramfenikol (30 μg), polimixin-B (15 μg), klórtetraciklin (30 μg), spiramicin (30 μg), ampicillin (20 μg), kolisztin (20 μg), prisztinamicin (10 μg) és karbenicillin (50 μg) antibiotikumokkal szembeni érzékenység.

Az új faj rendszertani helyzete: A dendrogram szerint (1. ábra) az *M. nigra* képviselői a tanulmányozott *Micromonospora* fajok autentikus törzseitől jól elkülöníthetőek. Ezen új faj törzseinek szénforrás értékesítési spektruma hasonló az *M. aurantiaca* ATCC 27029, az *M. carbonacea* ATCC 27114, az *M. chalcea* ATCC 12452, az *M. halophytica* ssp. *halophytica* ATCC 27596, az *M. narashino* ATCC 27331 és az *M. parva* ATCC 27358 autentikus törzsekéhez, egyéb sajátosságait tekintve azonban ezektől nagymértékben különböznek. Így adatainkból csak néhányat kiemelve, az *M. nigra* az *M. aurantiaca* és az *M. parva* fajoktól kulturális-morfológiai tulajdonságai terén (pl. spóraréteg képzése, egyes diagnosztikai értékű táptalajokon való növekedés mértéke), az *M. carbonacea*, az *M. chalcea* és az *M. narashino* fajoktól a pH-tolerancia és az L-glutaminsav C- és N-forrásként történő értékesítése, valamint az *M. halophytica* ssp. *halophytica*-tól kulturális-morfológiai tulajdonságai és ugyancsak az L-glutaminsav értékesítése esetén lényegesen eltér. Ezenkívül az általunk izolált új faj az *M. purpurea*, az *M. echinospora*, az *M. inositol*a, az *M. olivoasterospora*, az *M. sagamiensis*, az *M. purpureochromogenes*, az *M. coerulea*, az *M. lilacina*, az *M. rubra*, az *M. megalomicea*, az *M. inyoensis* és az *M. fusca* fajokkal sem mikromorfológiai, sem kulturális-morfológiai szempontból, sem szén- és nitrogénforrás értékesítése terén rokonságot nem mutat.

Az *M. nigra* ökológiája: Törzseit mind nyáron, mind őszi időszakban egyaránt izoláltuk. Kolóniáik a keményítő-élesztő kivonat agart kivéve, valamennyi izoláláshoz felhasznált táptalajon kifejlődtek. Az *M. nigra* a Balaton fenéküledékében, a nem szelektív alapon végzett izolálások alapján 10%-os gyakoriságú.

Összefoglalás

A Balaton gyttja-típusú fenéküledékének legfelső rétegéből — ahol becsléseink szerint a fakultatív és obligát aerobok csírászama 1 g nedves súlyra vonatkoztatva átlagosan százezer körüli — összesen 981 baktériumtörzset izoláltunk. Ezek közül 269 (27%) volt aktinomiceta és közöttük, az eddig külföldön tanulmányozott tavak iszapaktinomiceta-közösségeihez hasonlóan, a *Micromonospora* genusz tagjai domináltak. Az aktinomiceta törzskollekció 50%-át képező 135 mikromonospora törzs közül 120-at, valamint 20 autentikus

Micromonospora törzset nagyszámú élettani-biokémiai, mikromorfológiai és kulturális-morfológiai tulajdonságra alapított numerikus analízisnek vetettünk alá.

A gépi csoportanalízis eredményei alapján szerkesztett dendrogramon a 140 mikromonospora törzs 83%-os hasonlósági szinten egyetlen nagy csoportba tartozik, ezen belül pedig 86 és 94% között váltakozó hasonlósági szinten 13 szorosabb rokonságot mutató törzscsoport különíthető el.

Adataink szerint az eddig ismert *Micromonospora* fajokkal az általunk izolált törzseknek mindössze 20%-a volt azonosítható. Ezek nagy részét az *M. purpureochromogenes* fajba sorolhattuk, míg az *M. coerulea*, az *M. echinospóra*, az *M. inositol*a, az *M. parva*, az *M. purpurea* és az *M. sagamiensis* fajokat balatoni izolátumaink között csak 1–1 törzs képviselte.

A Balaton-iszap *Micromonospora*-populációját tehát főként ismeretlen fajok alkotják. Ez érthetővé válik, ha figyelembe vesszük, hogy mikromonosporákon mind ez ideig számítógépes analízist még nem végeztek, és természetes populációik faji szintű elemzésére sem került még sor. E cikkben a *Micromonospora nigra* spec. nov. leírását is megadtuk, továbbá a *Micromonospora balatonica* néven új fajként azonosított szervezet biológiájához is adatokat közlünk.

A Balaton fenéküledékében a mikromonosporák nagyfokú típusdifferenciálódását észleltük. Vizsgálataink alapján egyes kulturális-morfológiai sajátosságok, pl. az *M. purpureochromogenes* törzsei között a barna endo- és exopigment képzése, továbbá több fiziológiai-biokémiai tulajdonság, így a NaCl- és hőmérsékleti tolerancia, az L-arabinóz, trehalóz, raffinóz, szalicin, glicerin szénforrások és számos nitrogénforrás értékesítése, a hippurát hidrolízise, a DN-áz aktivitás, a nitrát- és tellurit-redukció, a legtöbb antibiotikummal szembeni érzékenység fajon belül variabilisnak mutatkozott.

A balatoni iszapmikromonosporák biokémiai teljesítőképességét legjobban a következő adatokkal jellemezhetjük: a D-xilóz, D-fruktóz, D-galaktóz, D-glükóz, mannóz, cellobióz, β -laktóz, maltóz, szacharóz, trehalóz, dextrin, valamint az acetát és piruvát szénforrásokat általában jól értékesítik, eszku-lint, keményítőt és tributirint hidrolizálnak, proteolitikusak, foszfatáz aktivitásuk van, változóan RN-áz és DN-áz aktívak, majdnem 75%-uk cellulózt bont, részben pH- és sótoleránsak, több mint 25%-uk nitrát-redukáló, szórványosan antagonisták stb.

IRODALOM

- Bergey's Manual of determinative bacteriology. (Buchanan, R. E., Gibbons, N. E. eds.) Eighth edition. The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1974).
- CHRISTENSEN, W. B.: Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. J. Bact. **52**, 461–466 (1946).
- COWAN, S. T., STEEL, K. J.: Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge, Univ. Press (1965).
- DAVIS, B. R., EWING, W. H.: Lipolytic, pectolytic and alginate activities of *Enterobacteriaceae*. J. Bact. **88**, 16–19 (1964).

- FARKAS, I.: Cellulóz bontó aktinomiceták a Keszthelyi-öbölben és a „Zala-hatás” bakteriológiai indikációjának kérdése. MTA Biol. Oszt. Közl. **25**, 191—200 (1982).
- FERNANDEZ, C.: Estudios en las comunidades de actinomicetos de diferentes ecosistemas. Kandidátusi értekezés. ELTE, TTK (1980).
- GORDON, R. E.: The taxonomy of soil bacteria. In: Gray, T. R. G., Parkinson, D. eds.: The ecology of soil bacteria. Liverpool, Univ. Press 293—321 (1968).
- GORDON, R. E., HORAN, A. C.: A piecemeal description of *Streptomyces griseus* (Kraus) Waksman and Henrici. J. Gen. Microbiol. **50**, 223—233 (1968).
- International Code of Nomenclature of Bacteria. (Lapage, S. P., Sneath, P. H. A., Lessel, E. F., Skerman, V. B. D., Seeliger, H. P. R., Clark, W. A. eds.) American Society for Microbiology, Washington (1976).
- JEFFRIES, C. D., HOLTMAN, D. F., GUSE, D. G.: Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. J. Bact. **73**, 590—591 (1957).
- JOHNSTON, D. W.: Actinomycetes in aquatic habitats. Thesis. Univ. Bradford (1972).
- JOHNSTON, D. W., CROSS, T.: The occurrence and distribution of actinomycetes in lakes of the English Lake District. Freshwat. Biol. **6**, 457—463 (1976a).
- JOHNSTON, D. W., CROSS, T.: Actinomycetes in lake muds: dormant spores or metabolically active mycelium? Freshwat. Biol. **6**, 465—470 (1976b).
- KAWAMOTO, I., OKACHI, R., KATO, H., YAMAMOTO, S., TAKAHASHI, I., TAKASAWA, S., NARA, T.: The antibiotic XK—41 complex. I. Production, isolation and characterization. J. Antib. **27**, 493—501 (1974).
- KURUP, P. V., SCHMITT, J. A.: Numerical taxonomy of *Nocardia*. Can. J. Microbiol. **19**, 1035—1048 (1973).
- LUEDEMANN, G. M.: Micromonospora taxonomy. Adv. Appl. Microbiol. **11**, 101—133 (1969).
- LUEDEMANN, G. M.: Micromonospora purpureochromogenes (Waksman and Curtis 1916) comb. nov. (Subjective synonym: Micromonospora fusca Jensen 1932). Inj. J. Syst. Bact. **21**, 240—247 (1971a).
- LUEDEMANN, G. M.: Designation of neotype strains for *Micromonospora coerulescens* Jensen 1932 and *Micromonospora chalybeata* (Foulerton 1905) Ørskov 1923. Int. J. Syst. Bact. **21**, 248—253 (1971b).
- LUEDEMANN, G. M.: Species concepts and criteria in the genus *Micromonospora*. Trans. N. Y. Acad. Sci. **33**, 207—218 (1971c).
- LUEDEMANN, G. M., BRODSKY, B. C.: Taxonomy of gentamicin-producing *Micromonospora*. Antimicrob. Ag. Chemother. — **1963**, 116—124 (1964).
- NARA, T., KAWAMOTO, I., OKACHI, R., TAKASAWA, S., YAMAMOTO, M., SATO, S., SATO, T., MORIKAWA, A.: New antibiotic XK—62—2 (sagamicin). II. Taxonomy of the producing organisms, fermentative production and characterization of sagamicin. J. Antib. **28**, 21—28 (1975).
- ROWBOTHAM, T. J., CROSS, T.: Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in the freshwater and agricultural habitats. J. Gen. Microbiol. **100**, 231—240 (1977).
- SHIRLING, E. B., GOTTLIEB, D.: Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bact. **16**, 313—340 (1966).
- SOKAL, R. R., MICHENER, C. D.: A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ. Kansas Sci. Bull. **38**, 1409—1438 (1958).
- SUMAN, Y. R.: Investigaciones bacteriológicas sobre la comunidad de actinomicetos en el lodo y agua del río Zala. Doktori értekezés. ELTE, TTK (1980).
- СВЕШНИКОВА, М. А., МАКСИМОВА, Т. С., КУДРИНА, Е. С.: Виды рода *Micromonospora* Ørskov, 1923 и их таксономия. Микробиология **38**, 883—893 (1969).
- SVESHNIKOVA, M., MAXIMOVA, T., KUDRINA, E.: Species of the genus *Micromonospora* Ørskov, 1923 and their taxonomy. In: Prauser, H. ed.: The Actinomycetales. The Jena International Symposium on Taxonomy. Gustav Fischer Verlag, Jena 187—197 (1970).
- SZABÓ, I. M.: Microbial communities in a forest-rendzina ecosystem. The pattern of microbial communities. Akadémiai Kiadó, Budapest (1974).
- SZABÓ, I. M., MARTON, M., KULCSÁR, G., BUTI, I.: The taxonomy of primicin producing actinomycetes. I. Description of the type strain of *Thermomonospora galieriensis*. Acta microbiol. Acad. Sci. Hung. **23**, 371—376 (1976).
- SZABÓ, Zs.: Adatok a Balaton fenéküledékének bakteriológiájához. Doktori értekezés. ELTE, TTK (1981).
- SZABÓ, Zs.: *Micromonospora balatonica* spec. nov. MTA Biol. Oszt. Közl. **25**, 227—235 (1982).
- SZABÓ, Zs., FERNANDEZ, C., KONDICS, L.: A comparison between *Micromonospora purpureochromogenes* ATCC 27334. Fifth Intern. Symp. on Actinomycetes Biology. Oaxtepec, Morelos, Mexico, Abstr. of Papers (1982).
- WAKSMAN, S. A.: The Actinomycetes. I—II. The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1961).