

MICROMONOSPORA BALATONICA SPEC. NOV.

SZABÓ ZSUZSA

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék, Budapest

A Balaton-iszaphól izolált mikromonospora törzseknek mind hagyományos (SZABÓ Zs. 1981), mind numerikus taxonómiai analízise (SZABÓ Zs. 1982) alapján megállapítható volt, hogy e szervezetek tavi populációjának domináns frakcióját egy jellegzetesen új *Micromonospora* faj képviselői alkotják. A lelőhelye után *M. balatonica*-nak nevezett új faj ismertetése kapcsán mindenekelőtt néhány taxonómiai-ökológiai problémával kell foglalkoznunk.

A korábban — módszertani okokra visszavezethetően — csak szórványos előfordulásúnak tartott mikromonosporákról ma már tudjuk, hogy a természetben széles körben elterjedtek. E szervezetek a balatoni mederiszaphól nemcsak a tihanyi partok térségében, hanem a Keszthelyi-öböl területén is kimutathatóak (FARKAS 1982). A Hévízi-tó gyógyiszapjából izolált mikromonospora törzsek számaránya ugyan kisebb volt, mint a sztreptomicetáké (FERNANDEZ 1982), azonban közöttük egy új *Micromonospora* faj képviselőit azonosíthattuk (FERNANDEZ és SZABÓ Zs. 1982). A mikromonosporák egyébként nemcsak tavi üledékekben gyakoriak, hanem számos szerző (ISHIZAWA és ARARAGI 1970a, b, WATSON és WILLIAMS 1974, TICHELAR és VRUGGINK 1975, SZINGAL és mtsai 1978) szerint a nagyobb nedvességtartalmú talajokban a baktériumflóra aktinomiceta frakciójának 50—60%-át is elérhetik. Jelenleg e genusz fajgazdagsága ugyan még nem tűnik számottevőnek, de gyakorlati jelentősége — egyes fajok gyógyszeripari hasznosíthatósága következtében — egyre növekszik és ezzel párhuzamosan az irodalomban leírt új fajok száma is fokozatosan nő. A különböző cikkekben és szabadalmakban közzétett nagy ipari értéket képviselő új fajok tényleges taxonómiai helyzetét igen nehéz ellenőrizni (SZABÓ Zs. 1978—1979). Egyrészt ugyanis a szerzők leírásaikat nem standard módszerekre alapítják és a fiziológiai tesztek kivitelezésénél sem mindig azonos módszereket követnek. Másrészt a szabadalmi mikrobiológiában, valamiféle egységes fajfogalom általánosan elfogadott definíciójának hiányában, az új fajok leírásának tendenciája érvényesül és sok esetben a szabadalmak szerzői ismert fajok természetes vagy indukált mutációval létrehozott változatait is új fajként írják le (KURYŁOWICZ 1976). Következésképpen mind az ipari fontosságú, mind pedig az ökológiai szempontból jelentős *Micromonospora* fajok egymás közötti biztos elkülönítése egyaránt nagy nehézségekbe ütközik, amit még

csak növel a rutinvizsgálatokra alapuló határozási rendszerek elégtelensége. A fajleírások között nehéz eligazodni, mert a mikromonosporák jellemzéséhez csak kevés diagnosztikai értékű fiziológiai tulajdonságot használnak, ugyanakkor a kulturális-morfológiai bélyegeknél általában túlzott jelentőséget tulajdonítanak. Mindez világossá teszi, hogy a fajfogalom kérdése a régi úton haladva aligha lesz eredménnyel megközelíthető. Ezzel szemben a természetes populációkat alkotó, eltérő *Micromonospora* típusok közötti, főként fiziológiai-biokémiai sajátságokra alapított differenciálás e szervezetek megismerésének realisabb távlatait nyithatja meg.

Vizsgálataink során a fajszintű azonosítás problémáját nem irodalmi leírások, hanem elismert fajok autentikus törzseivel szinkron kivitelezett összehasonlító laboratóriumi tesztek, továbbá numerikus analízisek eredményeire támaszkodva közelítettük meg. Adataink szerint a balatoni mikromonosporák nagymértékben variabilisak. Feltehetően minden más élőhely mikromonospora közösségét is ez jellemzi, azonban a korábbi fajleírások során a szerzők ezt kevésbé vették figyelembe és az új fajoknak mindössze egy vagy néhány törzsét tanulmányozták és deponáltatták. Az egyes fajok variabilitásába így egyáltalán nincs vagy csak igen csekély mértékben van bepillantásunk, jóllehet e genuszon belül is a fajfogalom korrekt megfogalmazásához ez elegendhetetlenül szükséges lenne. Az alantiakban az általunk izolált új faj leírását variabilitásának bemutatásával kötjük össze.

Anyag és módszerek

A balatoni mikromonospora törzsek izolálását, mikro- és makromorfológiai, kulturális, valamint fiziológiai-biokémiai tulajdonságaik tesztelését, az alkalmazott numerikus analízis elveit, továbbá az összehasonlító vizsgálatokhoz felhasznált autentikus *Micromonospora* törzsek listáját korábban már ismertettük (SZABÓ Zs. 1982).

Eredmények

A balatoni iszapmikromonosporáknak már a konvencionális módszerekkel kivitelezett taxonómiai vizsgálata is arra mutatott, hogy közöttük egy eddig ismeretlen faj képviselőit találtuk meg. A numerikus analízis során ezek valamennyien, több más, összesen 17, a hagyományos taxonómiával egyáltalán nem azonosítható törzsszel együtt, a gép által alkotott legnagyobb, 7. csoportba kerültek (SZABÓ Zs. 1982 — 1. és 2. ábra). A dendrogramot bemutató ábrákon látható, hogy a 39 törzsből álló és 90%-os hasonlósági szinten egyesített csoport nem egységes. Az új fajnak 33 tipikus képviselője az „a” alcsoportba tartozik, míg a „b” alcsoport 6 atipikus alakját tartalmazza.

A „balatonica” csoportba tartozó törzsek adatait áttekintve megállapítható, hogy az új faj tulajdonságai nagymértékben variabilisak. Az alantikban a *M. balatonica* spec. nov. leírását az irodalomban szokásos módon, vagyis holotípus törzsének tulajdonságaira támaszkodva adjuk meg, de az új faj számos képviselőjének tulajdonságanalízise lehetővé teszi, hogy variabilitásáról, valamint ökológiájáról is beszámoljunk.

A Micromonospora balatonica spec. nov. holotípus törzsének leírása

Név: *Micromonospora balatonica* (a név arra utal, hogy e faj képviselőit a Balaton fenékküledékéből vett mintákból izoláltuk).

Holotípus törzs: 3-K-39 (az ATCC-ben és az ELTE Mikrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményében helyeztük letétbe).

Mikromorfológiai tulajdonságok: Jól fejlett, elágazó fonalakból álló szubsztrátmicélium, a hifafonalak inkább hajlott, mintsem egyenes lefutásúak. Levestenyészetben megfigyelhető, hogy a gömbölyű spórák gyakran fűrtökben helyezkednek el, bár magános spórákat is észlelhetünk („kevert” típusú sporuláció). A spóratartó hifafonalak elágazása monopodiális. Paránytenyészetekben spórák alkotta fűrtök nem találhatók, viszont itt az ún. pszeudolégmicélium, amely más *Micromonospora* fajoknál általában igen ritkán képződik, jól tanulmányozható. A mindig steril léghifák a szubsztrátmicéliumból erednek és végük olykor bunkószerűen megvastagodik. Hosszabb inkubáció után ezek a képletek az egész kolónia felszínét behálózzák és ennek köszönhetően a pszeudolégmicélium, mint fehér vagy kissé rózsaszínes árnyalatú finom bevonat, olykor szabad szemmel is észlelhető.

Kulturális-morfológiai sajátosságok: Élesztőkivonat-malátakivonat agar (ISP Med. 2): közepes növekedés, a kiemelkedő és gyűrt kolóniák vörös színűek; e pigment a táptalajt is elszínezi. Anorganikus só-keményítő agar (ISP Med. 4): közepes növekedés, a kolóniák narancssárga színűek. Oldódó pigment nincs. Glicerín-aszparagin agar (ISP Med. 5): növekedés nyomokban, a kolóniák halvány narancssárga árnyalatúak. Oldódó pigment nincs. Czapek-szacharóz agar: közepes növekedés, narancsbarna, majd sötétbarna kolóniák. Oldódó pigment nincs. Glükóz-aszparagin agar: közepes növekedés, narancsvörös kolóniák. Oldódó pigment nincs. Tirozin agar: növekedés nyomokban, lilásrózsaszínű kolóniák, rózsásbarna oldódó pigment. Pepton-vas agar: gyér vagy közepes növekedés, alig kiemelkedő, narancssárga kolóniák. Oldódó pigment nincs. Tej agar: jó növekedés, erősen gyűrt felszínű, narancsvörös, majd barna ill. fekete kolóniák, a felszínükön kb. 2 hét inkubáció után pszeudolégmicéliumot figyelhettünk meg. Oldódó pigment nincs. Ferde burgonya-közegen mind CaCO_3 nélkül, mind pedig CaCO_3 jelenlétében közepes növekedés, a kiemelkedő és gyűrt kolóniák élénk narancssárga színűek.

Megjegyezzük, hogy az egyes táptalajokon észlelhető vörös vagy lilás-vörös endo- és exopigment indikátorkarakterű; 0,1 N NaOH hatására sötét vöröses vagy lilásszürke lesz, 0,1 N HCl hatására alig változik (kissé világosabb árnyalata tapasztalható).

Fiziológiai-biokémiai tulajdonságok: Szénforrás értékesítés: az L-arabinóz, D-xilóz, D-fruktóz, D-galaktóz, D-glükóz, mannóz, cellobióz, β -laktóz, maltóz, α -melibióz, szacharóz, trehalóz, raffinóz, dextrin, D-mannit, valamint az acetát és piruvát szénforrásokat hasznosítja, viszont L-ramnózt, szorbózt, L-melicitózt, inulint, α -metil-D-glükozidot, szalicint, adonitot, dulcitol, glicerint, D-szorbitot, i-inozitot, ill. benzoátot nem értékesít. Citráton és oxaláton növekedés csak nyomokban tapasztalható. A legtöbb jól értékesített szénforrás (pl. D-galaktóz) jelenlétében vörös vagy vöröseslila endo- és exopigment képződik. Nitrogénforrás értékesítés: DL-alanint, L-aszparagint, L-arginint, NaNO_3 -ot és KNO_3 -ot hasznosít, L-lizin és $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jelenlétében csak nagyon gyengén növekedik, a DL-fenilalanin, L-triptofán és L-cisztin N-forrásokat egyáltalán nem értékesíti, az L-glutaminsav és az L-hisztidin pedig gátolja a növekedését. Aminosavaknak mint egyedüli C- és N-forrásnak az értékesítése: a DL-fenilalanint és az L-triptofánt nagyon gyengén hasznosítja, a DL-alanint, L-glutaminsavat, L-lizint, L-aszparagint, L-arginint és L-hisztidint egyáltalán nem értékesíti, míg az L-cisztin a 3-K-39 törzsre kifejezetten gátló hatásának bizonyult. Ferde burgonya-közegegen CaCO_3 hozzáadása nélkül (pH 5,8–6,0) növekedik. NaCl-tolerancia felső határa 3%. 6 °C-on növekedik, 40 °C-on növekedését már nem tapasztaltuk. Cellulózt bont, eszculint, keményítőt és tributirint hidrolizál, a tejet megmészti. RN-áz és foszfatáz aktivitása van, ureáz aktivitást és a tellurit redukcióját csak nyomokban észleltük. Allantoint és alginátot nem bont, arbutint és hippurátot nem hidrolizál. DN-áz és arilszulfatáz aktivitása nincs, nitrátot nem redukál. Na-szaliciláttal, továbbá klóramfenikol (30 μg), streptomycin (30 μg), tetraciklin (30 μg), neomicin (100 μg), polimixin-B (15 μg), kanamicin (30 μ), kolisztin (20 μg) és gentamicin (20 μ) hatóanyagokkal szemben erősen, klórtetraciklin (30 μg), oxitetraciklin (30 μg), vankomicin (50 μg), cefalosporin (10 μg) és paromomicin (50 μg) antibiotikumokkal szemben mérsékelten érzékeny. Rezisztenciát a penicillin (3 IE), oxacillin (10 μg), meticillin (20 μg), oleandomicin (30 μg), eritromicin (10 μg), szuperszeptil (400 μg), nitrofurantoin (300 μg), spiramicin (30 μg), ampicillin (20 μg), linkomicin (10 μg), prisztinamicin (10 μg), nalidix-sav (30 μg), karbenicillin (50 μg), nisztatin (100 IE) és szumetrolim (25 μg) hatóanyagokkal szemben mutatott. A vizsgált tesztorganizmusokat nem antagonizálta.

Az új faj variabilis tulajdonságai

Az *M. balatonica* 33 tipikus képviselője az alant felsorolt mikromorfológiai, kulturális-morfológiai, ill. fiziológiai-biokémiai tulajdonságok tekintetében variabilitást mutatott (zárójelben a pozitív törzsek %-os aránya): sporuláció-típusa („open web” típusú — 28%, „cluster” típusú — 12%, kevert — 60%), pszeudolégmicélium (73%) és spóraréteg (55%) jelenléte, a szubsztrátmicélium endopigmentjének színe (vörös — 64%, halványbarna — 15%, kék — 3%, csak narancssárga — 18%; megjegyezzük, hogy az utóbbiak kivételével az endopigment a kolóniák körüli táptalajt is elszínezi), növekedés glükóz-aszparagin agaron (73%) és anorganikus só-keményítő (ISP Med. 4) agaron (82%), NaCl-tolerancia felső határa (3% NaCl — 73%, 4% NaCl — 6%), α -melibióz (94%), raffinóz (52%), α -metil-D-glükózid (45%), szalicin (94%) és D-mannit (52%) szénforrások, DL-alanin (73%), DL-fenilalanin (6%), L-lizin (6%), L-arginin (94%), L-hisztidin (18%), L-cisztin (3%), NaNO_3 (52%) és KNO_3 (42%) nitrogénforrások értékesítése, L-triptofán (6%) C- és N-forráskénti értékesítése, allantoin-bontás (3%), arbutin hidrolízis (3%), hippurát hidrolízis (30%), DN-áz (6%), RN-áz (76%), ureáz (21%) és foszfatáz (81%) aktivitás, tellurit-redukció (73%), valamint a legtöbb antibiotikummal szembeni érzékenység.

Fentiekén kívül az *M. balatonica* atipikus képviselői még a következő sajátságok tekintetében is variabilitást mutatnak: növekedés glicerín-aszparagin (ISP Med. 5) agaron és ferde burgonya-közegen CaCO_3 nélkül (pH 5,8—6,0), glicerín és L-aszparagin értékesítése, valamint gram-pozitív baktériumokkal szemben tapasztalható gyenge antagonizmus.

A Micromonospora balatonica spec. nov. rendszertani helyzete a genuszon belül

Az általunk izolált új faj pontos taxonómiai pozíciójának megállapítása érdekében az 1. táblázatban az *M. balatonica* tipikus alakjainak stabil tulajdonságait az egyidejűleg vizsgált autentikus *Micromonospora* törzsek megfelelő adataival vetettük egybe. A táblázatban azok a tulajdonságok nem szerepelnek, melyek minden vizsgált mikromonosporára törzsnél megegyeznek és feltehetően a mikromonosporák generikus sajátságai közé tartoznak. Anélkül, hogy itt a táblázat adatait részleteznénk, megállapítható, hogy a felsorolt és a rendszerezésnél a nemzetközi gyakorlatban differenciáló értékűnek minősített tulajdonságok tekintetében az eddig ismert *Micromonospora* fajok autentikus törzseinek túlnyomó többsége az új faj tipikus képviselőitől több lényeges vonásban is különbözik. Bár ezen az alapon egyes autentikus törzsek (pl. *M. fusca* RIA 472) viszonylatában az eltérés kevésbé számottevőnek látszik, mégis a nagyszámú tulajdonság teljes numerikus analízisére alapított dendrogram

I. táblázat

A *Micromonospora balatonica* spec. nov. tipikus képviselőinek stabil tulajdonságai
(N = nincs adat; s = szórványos növekedés)

		Micromono- spora balatonica	M. aurantiaca ATCC 27029	M. carbonacea ATCC 27114	M. chalybea ATCC 12452	M. coerulea ATCC 27008	M. echinospora ssp. echino- spora ATCC 15837	M. echinospora ssp. ferruginea ATCC 15836
Szénforrások	L-arabinóz	+	+	+	+	—	+	+
	D-fruktóz	+	+	+	+	+	—	—
	D-galaktóz	+	+	+	+	+	—	—
	Mannóz	+	+	+	+	+	+	+
	Cellobióz	+	+	+	+	+	+	+
	β -laktóz	+	+	+	+	+	—	—
	Szacharóz	+	+	+	+	+	+	+
	Trehalóz	+	—	+	+	+	+	+
	Inulin	—	—	—	—	+	—	—
	Adonit	—	—	—	—	—	—	—
	Glicerín	—	—	—	—	—	—	—
	i-inozit	—	—	—	—	—	—	—
Nitrogén- források	L-triptofán	—	—	+	—	—	—	—
	L-glutaminsav	—	—	+	—	—	—	—
	L-aszparagin	—	+	+	+	+	+	+
	(NH ₄) ₂ SO ₄	—	—	+	—	—	—	—
Egyedüli C- és N- források	L-glutaminsav	—	—	—	—	—	—	—
	L-lizin	—	N	—	—	+	—	—
	L-arginin	—	—	—	—	—	—	—
Szerves savak	Oxalát	—	—	—	—	—	—	—
	Piruvát	+	+	+	+	+	+	+
Cellulóz-bontás		+	—	+	+	—	+	+
NO ₃ -redukció NO ₂ -té		—	+	—	—	—	—	—
Növekedés	2% NaCl	+	+	+	+	—	+	+
	5% NaCl	—	—	—	+	—	—	—
Növ. ferde burgonyán (pH 5,8—6,0)		+	+	+	+	+	—	—
Növekedés	40 °C-on	—	+	+	+	—	+	+
	45 °C-on	—	—	—	+	—	+	+
Növ. Czapek-szacharóz agaron		+	s	+	+	+	+	+

(lásd SZABÓ Zs. 1982) szerint rokonságot az *M. balatonica*-val ezek sem mutatnak. A numerikus csoportanalízis a leghatározottabban igazolja az *M. balatonica* éles különállását és izoláltságát minden más ismert *Micromonospora* fajtól. Szép példája ez annak, hogy a fajok elkülönítését nem egyes vagy kevés bélyegre kell alapoznunk.

Az új faj ökológiája

Az *M. balatonica* a Balaton fenéküledéke baktériumnépességének közönséges és nagyon jellemző alakja. Törzseinek ökofiziológiai potenciálját a viszonylag széles körű szénvegyület hasznosítási spektrum és a relatíve ugyan-csak tág amplitúdójú N-forrás értékesítés képessége jellemzi. Keményítőt, cellulózt, glükózidákat, fehérjéket, zsírnemű anyagokat és nukleinsavakat bontanak. A kissé savas pH-t jól tolerálják, hőmérsékleti toleranciájuk viszont eléggé szűk. E faj képviselői közül 11-et a nyári, míg 28-at az őszi mintavételek során izoláltunk. Törzseit a tihanyi partoktól különböző távolságokban vett valamennyi mintából és az élesztőkivonat-keményítő agar kivételével minden alkalmazott izoláló táptalajon ki tudtuk tenyészteni. E faj gyakoriságát a balatoni fenéküledék baktériumflórájának *Micromonospora*-frakciójában a nem szelektív alapon végzett izolálások eredményeiből visszakövetkeztetve mintegy 30%-osra becsüljük!

Összefoglalás

A Balaton fenéküledékéből izolált *Micromonospora*-törzskollekció numerikus analízise alapján megállapítható volt, hogy ennek 30%-át egy új faj, a *Micromonospora balatonica* törzsei képviselik. A balatoni baktériumközösség e jellemző új fajának leírását kijelölt holotípus törzsének (3-K-39) diagnosztikai jellemzésével adtuk meg. Minthogy e fajnak összesen 39 törzsét tanulmányozhattuk, populációanalízist hajthattunk végre, ami tetemes mérvű variabilitására is fényt derített. Sajnos az irodalomban más *Micromonospora* fajoknak természetes körülmények között kibontakozó változékonyságáról alig közöltek adatokat.

A Balaton teljes *Micromonospora*-népességét és a ma ismert valamennyi *Micromonospora* faj autentikus törzseit képviselő törzsgyűjteményünk numerikus cluster-analízise alapján szerkesztett dendrogram határozottan igazolja, hogy az *M. balatonica*, variabilitása ellenére is, élesen elkülönül mind a nemzetközileg nyilvántartott, mind pedig a Balaton valamennyi más mikromonospora típusától. Az *M. balatonica* számos fiziológiai jellemvonásban megnyilvánuló variabilitása valójában e faj nagyfokú alkalmazkodóképességéről tanúskodik és arról, hogy esetében egy nagymértékben differenciálódó és a lokális viszonyokhoz sokoldalúan alkalmazkodó populációval állunk szemben.

IRODALOM

- 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.: A hévízi gyógyító bakteriológiai sajátosságai. MTA Biol. Oszt. Közl. **25**, 339—351 (1982).
- FERNANDEZ, C., SZABÓ, Zs.: Isolation and characterization of *Micromonospora heviensis* sp. nov. Acta microbiol. Acad. Sci. Hung. **29**, 115—122 (1982).
- ISHIZAWA, S., ARARAGI, M.: Actinomycete flora of Japanese soils. III. Actinomycete flora of paddy soils. c) On the antibiotic production among species or species groups of actinomycetes. Soil Sci. Plant Nutr. **16**, 102—109 (1970a).
- ISHIZAWA, S., ARARAGI, M.: Actinomycete flora of Japanese soils. IV. Actinomycete flora of peat soils. Soil Sci. Plant Nutr. **16**, 110—120 (1970b).
- KURYLOWICZ, W.: (ed.) Antibiotics. A critical review. Polish Medical Publishers, Warsaw (1976).
- SZABÓ, Zs.: Possibilities of taxonomic differentiation between *Micromonospora chalybeata* and gentamycin-producing *Micromonospora* species. Annal. Univ. Sci. Budapest de R. Eötvös Sect. Biol. **20—21**, 163—169 (1978—1979).
- SZABÓ, Zs.: Adatok a Balaton fenékküledékének bakteriológiájához. Doktori értekezés. ELTE, TTK (1981).
- SZABÓ, Zs.: A Balaton-mederiszap baktériumnépességének számítógépes analízise. I. A *Micromonospora*-populáció. MTA Biol. Oszt. Közl. **25**, 201—225 (1982).
- СИНГАЛ, Э. М., ИВАНИЦКАЯ, Л. П., СМЕРНОВА, М. П., НАВАШИН, С. М.: Направленное выделение культур рода *Micromonospora* из увлажненных почв и илов. Антибиотики **23**, 693—696 (1978).
- TICHELAR, G. M., VRUGGINK, H.: A survey of fungi and actinomycetes colonizing the newly reclaimed soil of the polder Zuidelijk Flevoland. Plant and Soil **42**, 241—253 (1975).
- WATSON, E. T., WILLIAMS, S. T.: Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VII. Actinomycetes in a coastal sand belt. Soil Biol. Biochem. **6**, 43—52 (1974).