

TAKSONOMSKI ZNAČAJ BOJE ZRAČNOG  
I VEGETATIVNOG MICELIJA  
U STREPTOMICETA

*With Summary in English*

VERA JOHANIDES, ZLATA JURIC, ANTEA KORČULANIN  
G. PILJAC, Ž. ŽAGAR

(Iz Laboratorija za industrijsku mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta, Zagreb;  
Istraživačkog instituta tvornice farmaceutskih i kemijskih proizvoda »Pliva«, Zagreb;  
Zavoda za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta, Zagreb)

I z v o d

Vršena su promatranja boja zračnog i vegetativnog micelija u 11 različitih sojeva streptomiceta u tri različita laboratorija u Zagrebu. Streptomiceti su uzgajani na šest različitih podloga, a boja promatrana nakon 5, 10 i 15 dana. Slaganje boja zračnog i vegetativnog micelija ovisilo je o podlozi, soju i vremenu promatranja. Ispitivanja su pokazala da je slaganje među različitim promatračima bolje, ako se ima neka skala boja za uporedbu.

U v o d

Otkrivanje brojnih novih vrsta streptomiceta postavilo je problem pronalaženja jedinstvenog kriterija klasifikacije, osobito zato što do nedavno taj kriterij često nije bio isti u svim Laboratorijima koji su se bavili klasifikacijom streptomiceta.

U novijim klasifikacionim sistemima odlike koje se uglavnom koriste za klasifikaciju nepoznatih sojeva jest morfologija spora i sporofora, boja zračnog i vegetativnog micelija i topivog pigmenta. Tako neki sistematičari (Gauze 1957, Preobraženska 1960, Rautenstein 1960) smatraju boju zračnog micelija stabilnom i uzimaju je kao primarno dijagnostično pomagalo. Drugi pak (Pridham 1956, Ettlinger 1958, Nomi 1960) drže oblik spora i sporofora najstabilnijom oznakom. Kao rezultat tih suprotnih mišljenja, stvoreni su brojni ključevi za klasifikaciju koji se prvenstveno koriste u zemlji autora koji su ih napravili.

Da bi se dobila jedinstvena klasifikacija streptomiceta, na dva posljednja internacionalna kongresa mikrobiologa (Stockholm 1956, Montreal 1962) sistematičari su razradili upute za komparativno ispitivanje tipskih kultura streptomiceta. Prema tim uputama neki od kriterija koji će se uzeti za klasifikaciju jesu: a) morfološke karakteristike — sposobnost stvaranja zračnog micelija, stvaranje spora i sporofora, broj spora u lancu, tendencija dijeljenja micelija, stvaranje sklerocija, morfologija sporonosnih hifa, veličina, izgled i oblik spora i b) boja zrelog zračnog micelija. Serije boja uzete su prema sistemu boja koje predlažu Trensner i Backus (1963).

Baldacci (1961) predlaže da se kao glavna karakteristika za klasifikaciju roda uzme način sporulacije. Za klasifikaciju unutar samog roda i za daljnje svrstavanje u podrod, sekciju, podsekciju, seriju i podseriju smatra da je prikladna karakteristika boja zračnog i vegetativnog micelija. Ta se osobina odavno upotrebljava, a i sada se u svakoj klasifikaciji opisuje boja vegetativnog micelija za prvih sati rasta, kao i boja zračnog micelija u starijih kultura.

Neki autori usvojili su prijedlog Baldaccija i razradili svoje klasifikacione sisteme (Gauze 1957, Pridham 1958, Ettlinger 1958). Svi ti autori, kao i neki drugi, slažu se da je, pri klasifikaciji u serije, boja zračnog micelija važna oznaka. Samo neki autori koriste i boju vegetativnog micelija. Naime, boja vegetativnog micelija varira sa starošću kulture, sastavom podloge, temperaturom inkubacije i prirodom inokuluma. Na temelju svojih istraživanja Baldacci (1961) smatra da bi bilo poželjno provesti standardizaciju podloga, ali ne isključivo upotrebom sintetskih podloga. Poželjno je upotrijebiti nekoliko različitih podloga, među kojima treba da bude i »prirodnih« supstrata, čija priprema treba da je standardizirana. Supstrati koji sadrže malo organskih supstancija, nisu poželjni, jer je na njima razvoj aktinomiceta oskudan, vegetativni micelij je rijedak, a sporulacija slaba.

U našim ispitivanjima nastojali smo ustanoviti koliko je boja zračnog i vegetativnog micelija stabilna i u kojoj mjeri može poslužiti u klasifikaciji novih izolata streptomiceta. U tri laboratorija određivali smo boju zračnog i vegetativnog micelija u 11 sojeva streptomiceta, da bismo ustanovili koliko pojedini promatrači subjektivno ocjenjuju boju.

### Materijal i metodika

Uspoređivanje boje zračnog i vegetativnog micelija izvršeno je u 11 sojeva streptomiceta iz Zbirke Zavoda za mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta u Zagrebu. Osam sojeva (sa oznakom 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108) izolirano je iz vrtnje zemlje, soj 110 dobijen je kao *Streptomyces rimosus* iz ATCC-10970. Soj s oznakom 109 je *Streptomyces aureofaciens* izoliran iz zemlje, a soj 107 je *Streptomyces coelicolor* iz Istituto Superiore di Sanità, Rim.

Boja zračnog i vegetativnog micelija ispitivana je u Petrijevim zdjelicama promjera 9 cm. Prije prenošenja inokuluma na podloge za izučavanje boje, sojevi su uzgajani na kosom agaru u epruveti na podlozi priređenoj od koncentrata rajčice, zobenog brašna i agara. Nakon 14-dnevnog uzgoja na podlozi kod temperature od 28° C priređena je suspenzija spora sa 20 ml destilirane vode. Istog dana svakom laboratoriju dostavljeno je po 6 ml suspenzije spora od svakog ispitivanog mikroorganizma. Sa po 0,2 ml suspenzije spora inokulirane su Petrijeve zdjelice, koje su sadržavale 15 ml odgovarajućih čvrstih podloga. Svaki mikroorganizam inokuliran je na dvije Petrijeve zdjelice od svake pojedine podloge. Za usporedna ispitivanja korištene su ove podloge: Čapekov agar modificiran po Gottliebu (G o t t l i e b 1961), podlogu po Gauzeu za organski izvor dušika (G a u z e 1957), podlogu po Gauzeu za mineralni izvor dušika (G a u z e 1957), krumpirov agar (L o d d e r 1952), podloga koncentrat od rajčice, zobenog brašna i agara (G o t t l i e b 1961), asparagin agar (W a k s m a n 1950) bez glukoze.

Odmah nakon inokuliranja suspenzija spora razvučena je pomoću staklenog štapića po površini hranjivog agara. Nakon toga Petrijeve zdjelice stavljene su u termostat na temperaturu od 28° C.

### Rezultati i tumačenje

Na zasijanim podlogama boja je promatrana petog, desetog i petnaestog dana nakon inokulacije i uspoređivana sa bojama iz skale boja po B o n d a r c e v u (1954). Ustanovljene nijanse uspoređivale su se sa odgovarajućom bojom iz skale i unosile u tabele. Sređujući rezultate, ispitivači su se sporazumjeli koje se prelazne nijanse iz tabele Bondarceva odnose na pojedine osnovne boje, što je bilo nužno učiniti radi velikog broja različitih nijansi jedne te iste boje koje su date u skali. Tako je uzeto za zračni micelij 6 tipičnih boja koje predlaže T e š i ć (1962), a to su: bjeličasta, sivkasta, žućkasta, crvenkasta, plavičasta i zelenkasta. Kod promatranja boja vegetativnog micelija uzete su osnovne boje koje predlaže G a u z e (1957), a to su: bezbojna, siva, žuta, crvena, plava, zelena, narančasta, ljubičasta, smeđa i crna. Istovremeno se promatrala boja zračnog micelija bez skale boja od Bondarceva i svrstavala u jednu od osnovnih boja po Tešiću.

Sve tri grupe promatrača izradile su tabele prema serijama boja za svaki soj i svaku podlogu posebno. Sve tabele su uspoređene međusobno i izrađene zajedničke tabele. S obzirom na velik broj tabela, iznosimo kao primjer po dvije tabele na podlogama gdje je slaganje boja među promatračima bilo dobro i po dvije tabele gdje je slaganje najslabije. Tabela 1 i 2 odnosi se na uspoređivanje boja prema skali boja po Bondarcevu, a tabela 3 i 4 na slaganje boja zračnog micelija bez skale boja, a prema serijama boja po T e š i ć u (1962). U tabelama su boje označene brojevima, i to za boju zračnog micelija brojevima od 1—6, a za boju vegetativnog micelija brojevima od 1—10.

TABELA 1

Podloga: Organski izvor dušika (Gauze)  
 Medium: Organic nitrogen (Gauze)

Micelij mycelium	dani days	Boje po brojevima Colour numbers	Oznaka sojeva (Culture numbers)										
			100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
zračni aerial	5	Boje po brojevima Colour numbers	3 3 3	2 2 2	2 2 2	1 2 3	2 2 2	2 3 3	2 3 3	2 2 2	2 3 3	2 2 3	2 2 3
	10		3 3 3	1 2 2	1 2 2	1 3 3	2 2 2	2 3 3	3 3 3	4 4 4	3 3 3	2 2 2	2 3 4
	15		3 3 3	2 2 2	1 2 2	3 3 3	2 2 2	2 3 3	3 3 3	2 4 5	3 3 3	2 2 2	2 3 3
vegetativni vegetative	5		3 3 3	3 3 9	3 3 3	3 3 3	6 6 6	3 3 3	3 3 3	4 5 5	2 3 3	3 3 3	3 3 3
	10		3 3 6	3 9 9	3 3 3	2 3 9	2 2 6	3 3 3	3 3 3	4 5 8	3 3 3	3 4 9	3 9 9
	15		3 3 3	3 9 9	3 3 3	3 3 3	2 2 2	3 3 3	3 3 3	4 5 8	3 3 3	3 4 9	3 3 9

TABELA 2

Podloga: Čapekov ugar  
 Medium: Czapek's agar

Micelij mycelium	dani days	Boje po brojevima Colour numbers	Oznaka sojeva (Culture numbers)										
			100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
zračni aerial	5	Boje po brojevima Colour numbers	3 3 3	1 2 3	2 2 2	2 2 2	2 2 2	2 3 3	2 2 2	2 2 2	2 3 3	---	---
	10		3 3 3	1 2 2	2 2 2	2 2 3	2 2 2	2 2 3	2 2 3	2 2 2	2 2 3	---	---
	15		3 3 3	1 2 2	2 2 2	2 2 3	2 2 2	2 2 3	2 2 3	2 2 2	2 2 3	---	---
vegetativni vegetative	5		3 3 3	3 3 3	2 2 2	2 2 2	2 2 2	2 3 3	2 2 2	2 2 5	3 3 6	2 2 3	2 2 3
	10		3 3 3	3 9 9	2 2 2	2 2 3	6 6 6	2 3 3	2 2 3	5 5 5	2 3 3	2 3 3	2 3 3
	15		3 3 3	3 3 9	2 2 2	3 3 3	2 2 6	3 3 3	2 3 3	5 5 5	3 3 3	2 2 3	2 3 3

TABELA 3

Podloga: Organski izvor dušika (Gauze)  
 Medium: Organic nitrogen (Gauze)

Dani days	Boje po brojevima Colour numbers	Oznaka sojeva (Culture numbers)										
		100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
5		2 3 3	2 2 2	1 1 2	1 3 3	2 2 2	1 3 3	1 3 3	1 2 4	3 3 3	2 2 3	3 3 3
10		2 3 3	1 2 2	1 2 2	3 3 3	2 2 2	3 3 3	2 3 3	2 4 4	2 3 4	2 3 3	3 3 3
15		2 3 3	1 2 2	1 2 3	3 3 3	2 2 2	3 3 3	3 3 3	2 4 5	3 3 3	2 3 3	3 3 3

TABELA 4

Podloga: Čapekov agar  
 Medium: Czapek's agar

Dani days	Boje po brojevima Colour numbers	Oznaka sojeva (Culture numbers)										
		100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
5		2 3 3	1 1 1	1 1 2	1 2 3	2 2 2	2 3 3	1 2 3	2 2 2	1 3 3	---	---
10		2 3 3	1 1 2	1 2 2	1 1 3	2 2 2	3 3 3	1 2 3	2 2 2	2 2 3	---	---
15		2 3 3	1 1 2	1 2 3	2 3 3	2 2 2	3 3 3	3 3 3	2 2 2	2 3 3	---	---

Oznake: a) za boje zračnog micelija (po Tešiću):  
 colour designation for aerial mycelium  
 (Tešić):

bjeličasta (whitish)	1
sivkasta (grayish)	2
žućkasta (yellowish)	3
crvenkasta (reddish)	4
plavičasta (bluish)	5
zelenkasta (greenish)	6

b) za boje vegetativnog micelija (po Gauzeu):  
 colour designation for vegetative mycelium (Gauze):

bezbojna (colourless)	1	zelenka (green)	6
siva (gray)	2	narančasta (orange)	7
žuta (yellow)	3	ljubičasta (violet)	8
crvena (red)	4	smeđa (brown)	9
plava (blue)	5	crna (black)	10

Prilikom uspoređivanja rezultata ustanovili smo da je slaganje relativno slabo na svim upotrijebljenim hranjivim podlogama. Od tri uzeta vremenska perioda najbolje slaganje postignuto je petnaesti dan. Uzrok je u tome, što većina streptomiceta tek tada postigne svoj potpuni razvoj.

Od svih upotrijebljenih podloga najslabije slaganje dobiveno je na podlozi iz koncentrata rajčice i zobenog brašna, a najbolje na podlogama s asparaginom i organskim izvorom dušika. Podloga na bazi rajčice ima još jednu negativnu stranu, a to je njezina žutocrvena boja koja smeta pri određivanju boje vegetativnog micelija. Asparagin agar, međutim, nije pogodna podloga za određivanje boja, jer je na njemu rast streptomiceta veoma oskudan, a neki streptomiceti na toj podlozi uopće ne razvijaju zračni micelij.

Slaganje je nešto bolje pri promatranju zračnog nego pri promatranju vegetativnog micelija. Vrlo dobro je slaganje boja zračnog micelija u soja s oznakom 104. Zračni micelij toga soja tamnosive je boje, što sprečava razmimoilaženja pri određivanju. Ipak, pri promatranju boje vegetativnog micelija ovog soja, došlo je do nekih neslaganja, jer su jedni ispitivači očitali boju kao tamnosivu, a drugi kao sivosmeđu i svrstali je u smeđu seriju.

Kod nekih sojeva slaganje je veoma slabo (109 i 110), i to vjerojatno zato što je micelij sivožut, pa su neki ispitivači dali prednost žutoj, a drugi sivoj boji.

Nešto drukčiji rezultati dobiveni su bez upotrebe skale boja po Bondarcevu. U tom slučaju postignuto je slabije slaganje, jer su ispitivači pri očitavanju boje zračnog micelija bez pomoćne skale lakše griješili, pa su sivkasti micelij neki čitali kao sivi, dok su ga drugi svrstavali u bijelu seriju. Također su nastala neslaganja i kod žučkastosivih tonova.

## ZAKLJUČAK

Iz ovog usporednog rada vidi se da je teško postići dobro slaganje između više promatrača, jer subjektivni momenti jako utječu na odluku, pa je neophodno imati jednu skalu s osnovnim bojama i mogućim nijansama za svaku pojedinu boju. Skala boja po Bondarcevu, iako bogata raznim nijansama (sadrži 105 boja), ne može se s uspjehom upotrijebiti, jer nijanse pojedinih boja nisu poredane jedne uz druge. Naše je mišljenje da bi različite nijanse jedne te iste osnovne boje trebale biti grupirane i svrstane u red ili krug kao što predlažu Tresner i Backus. Tako bi se izbjeglo da gotovo iste boje nose različite oznake i kompliciraju očitavanje.

## L I T E R A T U R A

- Baldacci, E.*, 1961: The classification of Actinomycetes in relation to their antibiotic activity. *Adv. in Appl. Micr.*, New York, Academic Press, 3, 257—278.
- Bondarcev, A. S.*, 1954: *Skala cvetov*. Moskva. Izdateljstvo Akademii nauk SSSR.
- Ettlinger, L.*, et al. 1958: Zur Systematik der Actinomyceten: 4 Eine Arteinteilung der Gattung *Streptomyces*. *Arch. f. Mikrobiol.* (Berlin), 31, 326—358.
- Gauze, F. G.*, 1957: *Voprosi klasifikacii aktinomicetov-antagonistov*. Moskva, Medgiz.
- Gottlieb, D.* 1961: An evolution of criteria and procedures used in the description and characterization of the Streptomyces. *Appl. Micr.* (Baltimore), 9, 55—65.
- Lodder, J.* and *Kreger-Van Rij N. J. W.*, 1952: *The Yeasts*. Amsterdam, North-Holland Publishing Company.
- Nomi, R.*, 1960: On the classification of Streptomyces. *Journ. of Antibiotics* (Japan), 13, 236—247.
- Preobrazenskaja, T. P.* et al. 1960: O diagnostičeskom značenii različnih priznakov dlja klasifikacii predstavitelj roda *Actinomyces*. *Mikrobiologija* (Moskva), 29, 455—462.
- Pridham, T. G.* et al., 1958: A guide for the classification of Streptomyces according to selected groups: placement of strains in morphological sections. *Appl. Micr.* (Baltimore), 6, 52—71.
- Rautenštein, I.*, 1960: O sistematike aktinomicetov k itogam sovješčenija po probleme klasifikacii aktinomicetov. *Mikrobiologija* (Moskva), 29, 926—935.
- Tresner, H. D.* and *Backus E. J.*, 1963: System of color wheels for Streptomyces Taxonomy. *Appl. Microb.* (Baltimore), 11, 335—338.
- Tešić, Ž.*, 1962; Problem sekcija i serija kod aktinomiceta. (Manuscript).
- Waksman, S. A.* and *Lechevalier, H.*, 1953: *Guide to the classification and identification of the actinomycetes and their antibiotics*. Baltimore, Williams & Wilkins Co.

## SUMMARY

### ON THE TAXONOMICAL SIGNIFICANCE OF THE COLOUR OF AERIAL AND VEGETATIVE MYCELIUM IN STREPTOMYCES

V. Johanides, Z. Juric, A. Korčulanin, G. Piljac, Z. Žagar

(From the Laboratory of Industrial Microbiology, Faculty of Technology, Zagreb; Research Institute, »Pliva« Pharmaceutical and Chemical Works,, Zagreb; Institute of Microbiology, Faculty of Medicine, Zagreb)

The colour of the sporulating and sometimes of the vegetative mycelium of the streptomycetes is a feature extensively used for taxonomical purposes. The description of colour is a very subjective process. In this work the agreement between individual investigators in three different laboratories was compared. All groups of investigators received the prepared spore suspension of 11 different streptomycetes strains from one investigator. The spore suspensions were streaked on plates with six different media and the colours were observed after 5, 10 and 10 days of incubation at 28 C. The colours were compared with the colour table of Bondarcev or recorded by a number for every colour series (1—6 for aerial mycelium and 1—10 for vegetative mycelium). The agreement was poor to good depending on the culture strain, the medium and the age of the culture. Better agreement was achieved in colour description of aerial mycelium than of vegetative mycelium. The best agreement was achieved after 15 days and the best medium was Gauze's organic nitrogen substrate. The agreement was better when the colours were compared with the colour table. The results for two media are set out in tables. The introduction of a uniform descriptive colour terminology and the use of appropriate colour wheels, as proposed by Tresner and Backus, would be useful in categorizing streptomycetes in different colour series.