

ANTAGONISTIČKI SOJEVI STREPTOMICETA
IZ TERMALNOG MULJA TUHELJSKIH
TOPLICA U HRVATSKOM ZAGORJU

Mit deutscher Zusammenfassung

ZLATKO PAVLETIĆ i BOŽIDAR STILINOVIĆ

(Iz Instituta za botaniku Sveučilišta u Zagrebu)

Primljeno za štampu 6. II 1967.

Uvod

Jedna od najviše istraživanih skupina mikroorganizama su danas pripadnici reda Actinomycetales, naročito vrste roda *Streptomyces*, koje imaju veliki značaj zbog svoje sposobnosti da luče antibiotske supstancije. Ove mikroorganizme istražuju s raznih aspekata i nastoji se detaljno upoznati ne samo njihova fiziologija već i ekologija.

Spomenuta istraživanja streptomiceta odnose se, međutim, uglavnom na one vrste i sojeve koji žive u tlu, njihovoj najpovoljnijoj životnoj sredini, gdje se i javljaju u najvećoj množini. U ostalim sredinama koje nisu za njih toliko tipične, kao npr. zrak, voda i neki drugi supstrati, streptomiceti su manje istraživani, naročito njihov odnos prema tim životnim sredinama.

Među raznim supstratima, u kojima se mogu razvijati streptomiceti, od posebnog interesa je mulj koji se taloži u mnogim termalnim vrelima. O streptomicetima iz termalnog mulja nismo u literaturi mogli naći nikakvih podataka iako postoje podaci o njihovoj prisutnosti u mulju jezera i rijeka (Price-Jones 1900, Thaysen 1936, Putilina 1940, Egorova i Isačenko 1942—1944, Frolova 1965, i dr.), kao i mora (Zo Bell, Grant i Haas 1943, Siebert i Schwartz 1956, Piljac 1964. i dr.).

U toku naših ekoloških istraživanja streptomiceta u različitim substratima, imali smo prilike ispitivati i njihovu prisutnost u termalnom mulju nekih toplica u Hrvatskom zagorju. Posebnu smo pažnju obratili mulju iz sumpornog termalnog vreła Tuheljske toplice, gdje su preliminarna ispitivanja pokazala prisustvo većeg broja tih mikroorganizama.

Istraživanja smo vršili u proljeće 1965. god., a laboratorijska obrada sakupljenog materijala izvršena je u laboratoriju za mikrobiologiju Odjela za niže biljke Instituta za botaniku Sveučilišta u Zagrebu.

Biološke karakteristike Tuheljskih toplica

Za Tuheljske toplice je karakteristično da sadržavaju znatne količine sumporovodika, pa se stoga ubrajaju među tzv. sumporna vreła. Zbog neugodnog zadaha koji stvara sumporovodik, nazivaju ove toplice još i Smrdeće toplice.

Postoji nekoliko izvora termalne vode koja se skuplja u omanju baru, što predstavlja tip limnokrenog vreła. Gornji dio bare je ograđen, tako da tamo postoje prirodni uvjeti. Iz tog dijela voda protječe kroz sistem basena, koji služe u balneološke i rekreacione svrhe.

Temperatura vode iznosi u području izvora 32–33 °C, a najviša izmjerena temperatura iznosi 36,4 °C.

Po svom biološkom sastavu ova terma predstavlja cijanoficejski tip terme u kojoj prevladavaju modrozelenе alge. Pored nekih predstavnika sumpornih begijatoaceja, prevladavaju rodovi *Oscillatoria*, *Lyngbya* i *Spirulina*. Pored toga javljaju se i neke druge alge, a naročito predstavnici haraceja od kojih u velikim količinama dominira *Nitella*. Ustanovljeni su također i neki predstavnici konjugata, kloroficeja i rodoficeja.

Zanimljivo je da su prilikom analize mulja utvrđene uglavnom leukobakterijaceje i od ostalih bakterija neki spirili, a o prisustvu streptomiceta nema podataka (V o u k 1916). Spominje se i prisustvo prevlaka koje sačinjava željezna bakterija *Leptothrix ochracea*.

Od životinja zastupljeni su neki praživi, te virnjaci, puževi, žabe i druge neke životinje (M a t o n i č k i n 1957).

Svi navedeni organizmi zadržavaju se uglavnom na dnu ili plivaju po površini, ali planktonski organizmi u termalnim vodama ne postoje.

Bakterije kao stanovnici termalnih voda

O bakterijama kao stanovnicima terma izvršena su do danas mnogobrojna istraživanja, jer su one u termalnim vodama jedni od najkarakterističnijih organizama. Bakterije u tim biotopima mogu živjeti i pri vrlo visokim temperaturama.

Najveći broj tih istraživanja odnosi se samo na pojedine grupe bakterija, a to su uglavnom sumporne i njima srodne bakterije o kojima postoji u literaturi najviše podataka. Samo vrlo malo radova obrađuje neke druge bakterije, tako da možemo reći da su termalne vode u tom pogledu relativno slabo istražene.

Od poznatih istraživača obrađivali su sumporne bakterije Cohn (1874), Vinogradski (1887), Beijerinck (1895), Emoto (1933) i drugi.

Isto tako o istraživanjima bakterija u termalnim vodama Jugoslavije nema mnogo podataka. Prva istraživanja u tom smislu izvršili su Karlinski (1895) na Ilidži kraj Sarajeva, gdje je izolirao i opisao dvije nove termofilne bakterije, te Đorđević (1910) koji je radio u Vranjskoj banji i također izolirao nekoliko termofilnih bakterija.

Opsežnija proučavanja termalnih bakterija u našim toplicama proveo je poznati istraživač biologije termalnih voda V. Vouk sa svojim suradnicima u vremenu od 1916–1960. Tako je Klas (1936, 1938) obrađivala sumporne bakterije iz nekih sumpornih termalnih voda u našem Primorju. Devidé (1952, 1954, 1957) obrađuje sumporne bakterije iz raznih termalnih vrela u našoj zemlji, a posebnu pažnju posvećuje citološkim osobinama.

U posljednje vrijeme istraživali su termalno vrelo Ilidža u Bosni Tešić, Todorović i Ristanović (1963). Oni su istraživali u tim vodama aerobne bakterije termofilnog karaktera koje stvaraju spore.

Treba napomenuti da se u većini ljekovitih terma vrše stalna rutinska ispitivanja prisutnosti bakterija koje predstavljaju indikatore onečišćenja vode, kao što su to koliformne bakterije, a određuje se i broj svih bakterija u jedinici volumena vode.

Upotrebljeni materijal i metodika rada

Prilikom naših istraživanja uzimali smo uzorke mulja iz područja gdje se termalna voda akumulira neposredno nakon izviranja. Kao što je već naprijed rečeno, ovo područje je zaštićeno tako da na tom staništu vladaju više-manje prirodni uvjeti. Pri uzimanju uzoraka birali smo mjesta gdje je mulj bio bez vegetacije alga. Uzorke mulja sabirali smo pomoću sterilnih epruveta koje smo otčepili ispod površine vode i nakon toga ih zaronili u mulj. Osim toga grabili smo mulj pomoću lopatica i prenosili ga u sterilne bočice.

Sakupljeni uzorci ispitivani su u laboratoriju pomoću standardnih metoda za izolaciju streptomiceta. Najprije se izvršilo razrijeđivanje ispitivanog supstrata u odgovarajućim količinama fiziološke otopine, a zatim je po 1 ml suspenzije mulja zasijavan na hranjive podloge.

Kao hranjiva podloga za izolaciju i brojanje streptomiceta poslužio je modificirani Czapekov agar ovog sastava:

NaNO ₃	2,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
KCL	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
topljivi škrob	25,0 g
agar	15,0 g
dest. voda	1000 ml
pH	7,2

Da bi bila olakšana izolacija i brojanje streptomiceta, zasijavana je navedena podloga razrijeđenjem ispitivane suspenzije mulja u odnosu 1 : 10000.

Inokulirane podloge bile su inkubirane u termostatu kod temperature od 32 °C kroz 8 dana. Nakon tog vremena razvile su se kolonije streptomiceta, koje smo zatim presađivali na kosi agar radi dobivanja čistih kultura. Kao podloga za kosi agar poslužio je također opisani modificirani Czapekov agar.

Nakon razvitka čistih kultura pristupili smo ispitivanju antagonističkih svojstava pomoću metode unakrsnog pruganja (agar cross-streak method). Na taj način smo izdvojili antagonističke sojeve i istražili njihov antimikrobni spektar.

Kod ispitivanja antagonističkih svojstava izoliranih sojeva, kao testni organizmi poslužile su gram-pozitivne bakterije *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, gram-negativne bakterije *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* i *Shigella flexneri* te od gljivica *Candida albicans*.

Kao hranjiva podloga na kojoj su ispitivana antagonistička svojstva streptomiceta poslužio je glukoza-pepton agar ovog sastava:

glukoza	20,0 g
pepton	5,0 g
NaCl	5,0 g
agar	15 g
vodovodna voda	1000 ml

Testne bakterije uzgajane su prije ispitivanja na podlozi ovog sastava:

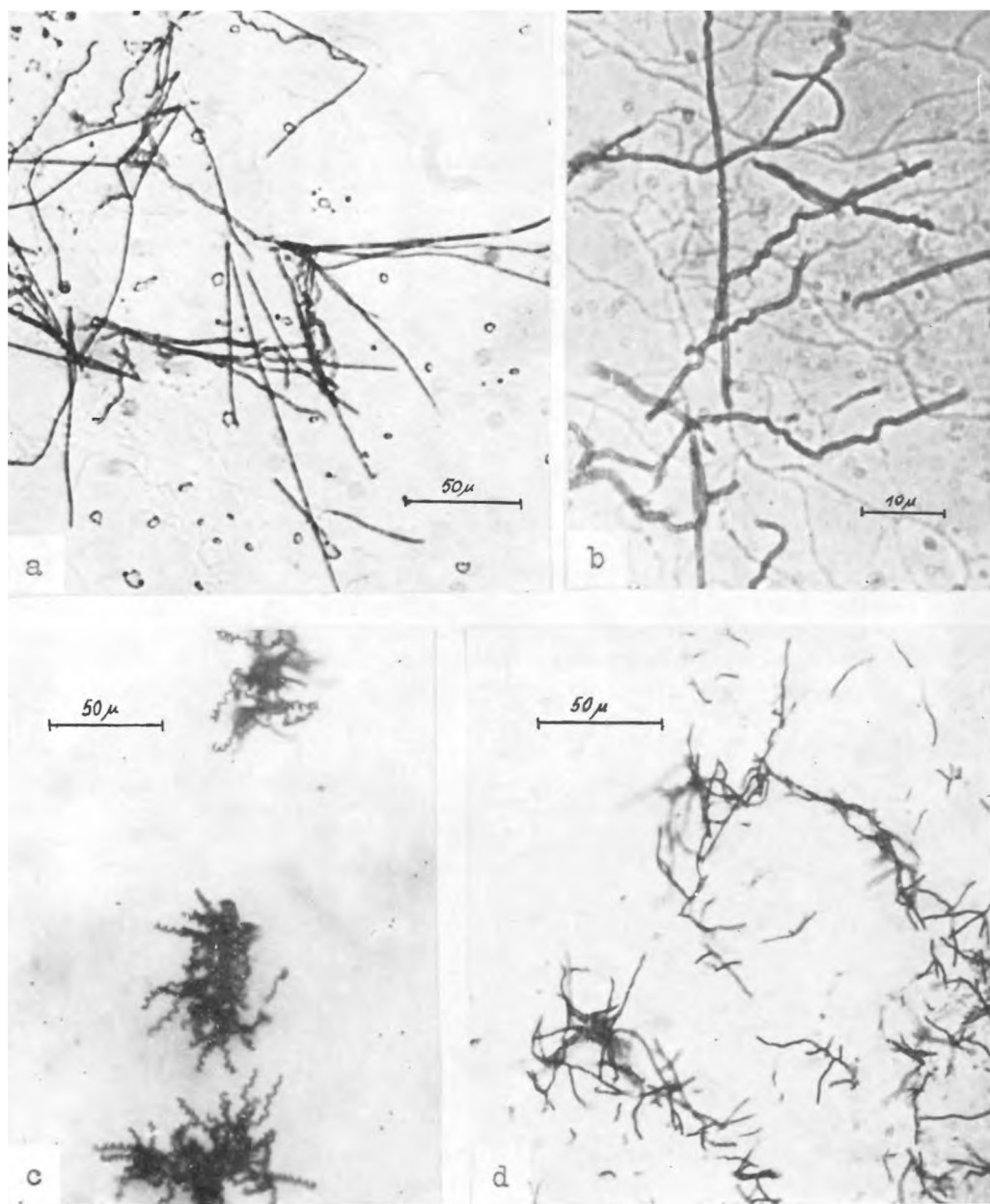
hranjivi bujon (Eskulap)	15,0 g
agar	20,0 g
dest. voda	1000 ml

Za uzgoj gljivica dodavali smo ovoj podlozi još 2% glukoze.

Morfološke karakteristike ispitivanih sojeva određivali smo metodom koju je postavio N o m i (1960). Ta se metoda sastoji u tome da se u skrtnutoj podlozi izrežu žljebovi i nakon toga se površina podloge zasije suspenzijom spora istraživanog soja streptomiceta. Nakon zasijavanja žljebovi se s jedne strane prekriju pokrovnim stakalcima koja su prethodno sterilizirana. Poslije inkubacije od oko 8 dana streptomiceti izrastu uz rub žljeba ispod samog pokrovnog stakalca, pa se na taj način može lako istražiti morfologija sporofora.

Analiza antagonističkih sojeva streptomiceta iz termalnog mulja

Na osnovu ispitivanja termalnog mulja iz Tuheljskih toplica, ustanovili smo da u 1 gramu uzorka broj svih streptomiceta iznosi 43.000–45.000. Zanimljivo je da u većini uzoraka prevladavaju sojevi sa sivom bojom zračnog micelija sekcije »Spira«, dok je vegetativni micelij žute boje. Naprijed opisanom metodom unakrsnog pruganja izolirali smo 8 sojeva koji su pokazali antagonističko djelovanje na spomenute testne organizme. Aktivne sojeve označili smo oznakama T1, T2, T3, T6, 1T5, 3T6, 1T1 i 1T2



Sl. 1. Neki oblici zračnog micelija izoliranih aktivnih sojeva streptomiceta iz termalnog mulja Tuheljskih toplica

i determinirali ih prema sistemima Gauze-a i Pridham-a. Pripadnost aktivnih sojeva serijama i sekciji prikazana je u tabeli 1.

Tabela 1

Pripadnost izoliranih antagonističkih sojeva streptomiceta serijama po Gauze-u i Pridham-u i sekcijama po Pridham-u

Oznaka soja	Serija		Seksija
	Gauze	Pridham	
T1	<i>Aureus</i>	siva	RF
T2	<i>Aureus</i>	siva	S
T3	<i>Chromogenes</i>	siva	S
T6	<i>Albus</i>	bijela	S
1T5	<i>Fradae</i>	crvena	RF
3T6	<i>Albus</i>	bijela	RF
1T1	<i>Roseoviolaceus</i>	crvena	RF
1T2	<i>Aureus</i>	siva	RF

Kao što se iz tabele vidi, prevladavaju sojevi sa sivom bojom zračnog micelija. Isto tako među antagonističkim sojevima prevladavaju sojevi s ravnim sporoformama iako većina izoliranih sojeva (zajedno s neaktivnim oblicima) pokazuje spiralno savijene sporofore. Na slici 1 (a, b, c, d) prikazani su oblici zračnog micelija izoliranih aktivnih sojeva streptomiceta iz termalnog mulja Tuheljskih toplica. Nakon determinacije antagonističkih sojeva, detaljnije smo ispitali njihov antimikrobni spektar (tabela 2).

Tabela 2

Antimikrobni spektar sojeva streptomiceta iz termalnog mulja Tuheljskih toplica (zone inhibicije u mm)

Oznaka soja	Testni organizmi						
	1	2	3	4	5	6	7
T1	14	19	15	—	—	—	—
T2	10	15	14	—	—	—	—
T3	14	14	20	—	—	—	—
T6	15	12	13	—	—	—	—
1T5	24	19	23	12	11	13	16
3T6	17	14	14	—	—	—	—
1T1	10	9	10	—	—	—	—
1T2	11	10	15	10	9	9	—

Na tabeli su testni organizmi označeni ovim brojevima: 1 — *Bacillus subtilis*, 2 — *Staphylococcus aureus*, 3 — *Sarcina lutea*, 4 — *Escherichia coli*, 5 — *Proteus mirabilis*, 6 — *Shigella flexneri*, 7 — *Candida albicans*.

Kao što se iz tabele vidi, najveći broj sojeva djeluje antagonistički na gram-pozitivne bakterije. Najširi antimikrobni spektar pokazali su sojevi 1T5 i 1T2, koji djeluju i na gram-negativne bakterije, dok soj 1T5 pokazuje i antifungalno djelovanje. Soj 1T5 pokazuje također i najšire zone inhibicije.

Kako je najjaču aktivnost pokazao soj 1T5, posebno smo ispitali njegove biokemijske i sistematske karakteristike.

Prema spomenutim karakteristikama soj 1T5 odgovarao bi prema sistemu Waksmana-a i Lechevalier-a (1953) vrsti *Streptomyces fradiae* za koju je značajan vrlo široki antimikrobni spektar.

Diskusija

Istraživanja su pokazala da u termalnom mulju Tuheljskih toplica postoji brojna populacija streptomiceta među kojima nalazimo i mnoge antagonističke sojeve. Većina aktivnih sojeva pokazuje sličnosti s antagonistima iz drugih sredina, tj. prevladavaju sojevi koji djeluju na gram-pozitivne bakterije. Ipak u znatnoj količini smo uspjeli izolirati i sojeve koji pokazuju vrlo široki antimikrobni spektar. Ovi sojevi su pokazali antagonističku djelatnost protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, ali i antifugalnu aktivnost na patogenu gljivicu *Candida albicans*.

Sve to ukazuje na veliku važnost streptomiceta u mulju raznih terma i na potrebu intenzivnijeg izučavanja njihovih ekoloških i fizioloških svojstava. To je i tim potrebnije jer naša zemlja obiluje mnogim termalnim vodama, pa takva istraživanja mogu pridonijeti daljnjem poznavanju njihovih balneobioloških svojstava.

Zaključak

U radu su obrađeni antagonistički sojevi streptomiceta iz termalnog mulja Tuheljskih toplica u Hrvatskom zagorju. Ustanovljeno je da u 1 gramu mulja ima 43.000–45.000 svih streptomiceta. Metodom unakrsnog pruganja izolirano je 8 antagonističkih sojeva koji su determinirani po sistemima Gause-a i Pridhama-a.

Prevladavali su sojevi sa sivom bojom zračnog micelija. Među antagonističkim sojevima dominiraju oblici s ravnim sporoforima. Najveći broj aktivnih sojeva djeluje antagonistički na gram-pozitivne bakterije.

Najširi antimikrobni spektar pokazuje soj koji prema sistemu Waksmana-a i Lechevalier-a pripada vrsti *Streptomyces fradiae*. Ovaj soj djeluje antagonistički na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, a osim toga pokazuje znatno antifungalno djelovanje na patogenu gljivicu *Candida albicans*.

Izolirani antagonistički sojevi pripadaju prema sistemu Gause-a u serije *Aureus* (3 soja), *Albus* (2 soja), *Chromogenes* (1 soj), *Roseoviolaceus* (1 soj) i *Fradiae* (1 soj).

Prema sistemu Pridhama-a 4 soja pripadaju sivoj seriji, i po 2 soja crvenoj i bijeloj seriji.

U diskusiji je istaknuta važnost prisustva antagonističkih streptomiceta u mulju termalnih voda, koja ukazuje na potrebu intenzivnijeg izučavanja njihovih ekoloških i fizioloških svojstava. To bi pored ostalog moglo pridonijeti i boljem poznavanju balneobioloških svojstava termalnih voda.

Literatura — Schrifttum

- Beijerinck, M. W., 1895: Über *Spirillum desulfuricans* als Ursache von Sulfat-reduktion. Centr. f. Bakt., II Abt., Bd. I. (cit. po Ellis D., 1932: Sulphur-bacteria. London).
- Cohn, F., 1874: Über den Algen in den Thermen von Johannisbad und Landeck, nebst einigen Bemerkungen über die Abhängigkeit der Flora vom Salzgehalt. Jahresber. d. Schles. Ges. f. vaterl. Kultur 52. (cit. po Vouk V., 1950: Balneobiologie der Thermen, Basel).
- Devidé Z., 1952: Zwei neue farblose Schwefelbakterien: *Thiologia ruttneri* n. gen., n. sp. und *Thiogloea ragusina* n. sp. Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie 14, 446—455.
- Devidé Z., 1954: Istraživanja o stanici bezbojnih sumpornih bakterija. Acta Pharm. Jug. 4, 147—176.
- Devidé Z., 1957: O nalazištu bezbojnih sumpornih bakterija kod Ulcinja. Acta Pharm. Jug. 7, 129—135.
- Egorova, A. A., Issatschenko, B. L., 1942—1944: The cause of earthy odor and flavor in water basins. Dokladi Acad. Nauk U.S.S.R. 36, 202—204; Microbiologia 13, 216—225.
- Emoto, Y., 1933: Über drei neue Arten der schwefeloxydierenden Bakterien. Proc. Imp. Acad. Tokyo 5. (Cit. po Vouk, V., 1950: Balneobiologie der Thermen, Basel).
- Frolova, L. F., 1965: Mikrobi — antagonisti videlenie il lečebnoj grjazi ozera Karabotan gurjevskoi oblasti. Mikrobnii atnagonizm i antibiotiki. Akad. nauk Kazahskoi SSR 8, 28—35.
- Gauze, G. F., 1957: Voprosy klassifikacii aktinomicetov antagonistov, Moskva.
- Georgevitch, P., 1910: *Bacillus thermophilus jivoini* (n. sp.) und *Bacillus thermophilus losanitschi* (n. sp.). Zbl. Bakt. 27, 150—167.
- Georgevitch, P., 1910: *Bacillus vranjensis* (n. sp.). Arch. Hyg. 72, 201.
- Karllinski, J. 1895: Zur Kenntnis der Bakterien der Thermalquellen. Hyg. Rundsch. 5, 685.
- Klas, Z., 1936: Zwei neue Schwefelbakterien *Thiothrix Voukii* und *Thiothrix longiarticulata*. Arch. Protistenk. 88, 121—126.
- Klas, Z., 1936: *Thiosiphon*, eine neue Gattung der Schwefelbakterien. Sitz. - Ber. Wiener Akad. Wiss. 145, 209—215.
- Klas, Z., 1938: Die thiothermale Vegetation im Hafen von Split. Acta Adriatica Inst. Oceanogr. 2, 2.
- Matoničkin, I., 1957: Ekološka istraživanja faune termalnih voda Hrvatskog zagorja. Jug. Akad. znan. i umjet. Rad 312, 139—206.
- Nomi, R., 1960: On the classification of *Streptomyces*. The Journal of Antibiotics. Series A. 13, 236—247.
- Piljac, G., 1964: Morfološko-fiziološke studije streptomiceta iz nekih tala kontinentalnog i primorskog dijela Jugoslavije, Zagreb (disertacija).
- Price - Jones, C., 1900: Preliminary note on cultures of streptotrichiae from various sources. Transactions of the Pathological Society of London. 51, 217—220.
- Pridham, T. G., Hesseltine, C. W., and Benedict, R. G., 1958: A Guide for the Classification of *Streptomyces* according to the Selected Groups. Applied Microbiology. Baltimore, 6, 52—79.
- Putilina, N. T., 1940: Actinomyces, mould and microbes in the water and silt deposits of the North Donetz River. Microbiol. (SSSR) 9, 702—705.
- Siebert, V. H. und Schwartz, W., 1956: Untersuchungen über das Vorkommen von Mikroorganismen in entstehenden Sedimenten. Archiv für Hydrobiologie 52, 321—366.
- Thaysen, A. C., 1936: The origin of an earthy or muddy taint in fish. I. The nature and isolation of the taint. Ann. Appl. Biol. 23, 99—104.

- Thaysen, A. C. and Pentelow, F. T. K.*, 1936: The origin of an earthy or muddy taint in fish. II. The effect on fish of the taint produced by an odoriferous species of *Actinomyces*. *Ann. Appl. Biol.* 23, 105—109.
- Tešić, Ž., Todorović, M. i Ristanović, B.*, 1963: Aerobne sporogene termofilne bakterije u toplom izvoru Ilidže. *Zemljište i biljka* 12, 325—331.
- Todorović, M. i Ristanović, B.*, 1963: Prilog poznavanju plavih algi i sumpornih bakterija u toplom izvoru Ilidže. *Zemljište i biljka* 12, 319—324.
- Vinogradski, S.*, 1887: Über Schwefelbakterien. *Bot. Zeit.*, Jahrg. 45, 31—37.
- Vouk, V.*, 1916: Biologische Untersuchungen der Thermalquellen von Zagorje in Kroatien. *Bull. Trav. Acad. Sci. Arts d. Slaves d. Sud, Cl. Sci. Math. et Nat.*, 5, 97—119.
- Vouk, V.*, 1950: *Balneobiologie der Thermen*. Basel.
- Waksman, S. A. and Lechevalier, H. A.*, 1953: Guide to the classification and identification of the actinomycetes and their antibiotics. Baltimore.
- Zo Bell, C. E., Grant, C. W. and Haas, H. F.*, 1943: Marine microorganism which oxidize petroleum hydrocarbons. *Bull. Amer. Assoc. Petrol. Geol.*, 27, 1175—1193.

ZUSAMMENFASSUNG

ANTAGONISTISCHE STREPTOMYCETEN-STÄMME AUS DEM THERMALSCHLAMM VON TUHELJSKE TOPLICE IN HRVATSKO ZAGORJE

Zlatko Pavletić und Božidar Stilinović

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Zagreb)

In dieser Arbeit wurden antagonistische Streptomyceten-Stämme aus dem Thermalschlamm von Tuheljske toplice (Hrvatsko zagorje) untersucht. Es wurde festgestellt, daß dieser Schlamm 43 000—45 000 Streptomyceten pro Gramm enthält. Mit Hilfe der »agar cross-streak method« wurden 8 antagonistische Stämme isoliert und nach Gauze- und Pridham-Systemen determiniert.

Es waren dies überwiegend Stämme mit graufarbigem Luftmyzel. Unter den antagonistischen Stämmen dominierten Formen mit geraden Sporoforen. Die meisten antagonistischen Stämme hatten eine Wirkung auf Gram-positive Bakterien.

Das breiteste antimikrobe Spektrum zeigt der Stamm *Streptomyces fradiae* (Waksman und Lechevalier 1953). Dieser Stamm wirkt antagonistisch auf Gram-positive und Gram-negative Bakterien und hat außerdem eine beträchtliche antifungale Wirkung gegen den pathogenen Pilz *Candida albicans*.

Die antagonistischen Stämme, die bei diesen Untersuchungen isoliert wurden, gehören nach Gauze zu den Serien *Aureus* (3 Stämme), *Albus* (2 Stämme), *Chromogenes* (1 Stamm), *Roseoviolaceus* (1 Stamm) und *Fradiae* (1 Stamm). Nach dem Pridham-System gehörten 4 Stämme der grauen und je 2 der roten und der weißen Serien an.

In der Diskussion wurde hervorgehoben, daß die Streptomyceten, die im Thermalschlamm leben, von großer Bedeutung sind. Weitere Forschungen auf diesem Gebiete könnten uns einen besseren Überblick über die balneobiologischen Eigenschaften der Thermalgewässer ermitteln.