

UDC 576.852.1 : 553.7.031.5 (497.1) = 862

ISTRAŽIVANJA STREPTOMICETA U MULJU  
NEKIH SUMPORNIH HIPERTERMA  
JUGOSLAVIJE

With Summary in English

VICKO PAVIČIĆ, ZLATKO PAVLETIĆ i BOŽIDAR STILINOVIĆ

(Biološki odjel Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu)

Primljeno 23. 01. 1981.

Uvod

Streptomiceti su široko rasprostranjeni u prirodi, a u tlu, te donekle u sedimentima kopnenih voda i mora čine značajan dio mikrobnih populacija (Safferman i Moris 1962, Frolova 1965, Pavletić i Stilinović 1968, Weyland 1969, Ristanović et al. 1975).

U literaturi su vrlo oskudni podaci o rasprostranjenosti streptomiceta u mulju naših sumpornih termalnih voda. Iz dosadašnjih ispitivanja (Pavletić i Stilinović 1968, Pavičić 1976) vidljivo je da streptomiceti čine značajnu komponentu među bakterijskim populacijama u mulju tih ekosistema. Ovaj rad obuhvaća ispitivanje streptomiceta u sumpornom mulju nekih termomineralnih voda na području Jugoslavije u kojima je temperatura iznad 38° C pa spadaju u hiperterme (Novak 1968).

Zbog niza teškoća tehničke naravi nismo određivali prisutnost termofilnih sojeva streptomiceta u pojedinim hipertermama, već samo onih koji se mogu razvijati u standardnim temperaturnim uvjetima od 28° C.

Materijal i metodika rada

U tablici 1. navedene su postaje sumpornih hiperterma u Jugoslaviji u kojima su u ljetu 1977. i zimi 1978. godine uzimani uzorci mulja za izolaciju i ispitivanje streptomiceta.

Tablica 1. Postaje ispitanih sumpornih hiperterna u Jugoslaviji  
 Table 1. Stations of examined sulphuric hyperthermal springs in Yugoslavia

Redni broj Ordinal Numeral	Naziv postaje Stations	Soc. Republika Soc. Republics
1.	Ilidža (IL)	Bosna i Hercegovina Bosnia and Herzegovina
2.	Katlanovska banja (KA)	Makedonija — Macedonia
3.	Kosovratska banja (KO)	Makedonija — Macedonia
4.	Ribarska banja (RI)	Srbija — Serbia
5.	Varaždinske toplice (VA)	Hrvatska — Croatia

Fizičko-kemijske karakteristike uzoraka sumporne termalne vode ispitivale su se u skladu s jugoslavenskim standardima koji se primjenjuju od 1. VIII. 1974. Analizirani su uglavnom parametri koji se kontroliraju i u pitkim vodama kao: pH vrijednost vode i mulja određivana pH-metrom 5701 »Iskra« Kranj, biološka potreba kisika ( $BPK_5$ ) metodom svjetlih i tamnih bočica (A.P.H.A. 1965), sumporovodik titracijskim postupkom, permanganatni broj i temperatura po standardnom postupku (A.P.H.A. 1965).

Kao hranjiva podloga za određivanje broja i izolaciju streptomiceta poslužio je Czapekov modificirani agar (Pavletić i Stilinović 1968). Inkubacija je trajala 8—10 dana kod 28° C. Antagonistička svojstva izoliranih sojeva ispitivana su metodom isječaka agara na bakterijskim pločama, kulture streptomiceta uzgajane su prije testiranja na glukoza-pepton agaru (Stilinović 1971). Morfološka svojstva streptomiceta, tj. boja zračnog i vegetativnog micelija te oblik sporofora, ustanovljeni su izravno na modificiranom Czapekovu agaru s pomoću mikroskopa pri povećanju od 125 X i 450 X. Pripadnost streptomiceta morfološkim skupinama (R, F, RA i S) određena je po sistemu International Streptomyces project (ISP), dok su serije određene po boji zračnog i vegetativnog micelija po sistemu Gauzea (1957). Od biokemijskih svojstava ispitana je sposobnost produkcije melanina (Waksman 1961), hidroliza želatine, razgradnja celuloze i redukcija nitrata (Gauzea 1957). Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti izoliranih sojeva streptomiceta poslužilo je pet test-bakterija (od gram pozitivnih: *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*, a od gram negativnih: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* i *Proteus mirabilis*).

## Rezultati i diskusija

Mnogi autori se slažu da na rasprostranjenost streptomiceta u tlu utječu u prvom redu sastav supstrata, pH vrijednost, temperatura i neki drugi fizičko-kemijski faktori (Černiševa 1950, Waksman 1952, Stilinović 1971, Pavletić et al. 1975, Pavloviča 1978), pa treba očekivati da isti činioci imaju utjecaj i na rasprostranjenost i brojnost streptomiceta u mulju sumpornih termalnih voda.

Iz podataka u tablici 2. uočljive su prilično ujednačene pH vrijednosti vode i mulja u svakoj postaji. Stanovitih neujednačenosti ima samo između nekih postaja (Katlanovska banja 6,9 i 7,0 te Ribarska banja 8,9).

Tablica 2. Pregled nekih fizičko-kemijskih parametara sumpornih termalnih voda

Table 2. Survey of some physical and chemical parametres in sulphuric thermal waters

Postaja Station	pH vode pH Water	pH mulja pH Mud	BPK <sub>5</sub> mgO <sub>2</sub> /l	H <sub>2</sub> Smg/l	KMnO <sub>4</sub> mg/l	T°C
Ilidža	8,0	8,2	5,0	11,7	47,4	58 °C
Katlanovska banja	6,9	7,0	12,9	5,8	36,1	39 °C
Kosovratska banja	7,2	7,3	8,0	60,5	20,8	49 °C
Ribarska banja	8,9	8,9	6,2	2,5	22,12	39 °C
Varaždinske toplice	7,7	7,9	1,3	3,4	8,2	57,6°C

Poznato je da i u tlu streptomiceti bolje rastu u slabo alkalnoj nego u kiseloj sredini (Johnstone 1947), što je dokazano i u laboratorijskim uvjetima (Shirling i Gottlieb 1964, Stilinović 1971, Pavletić et al. 1975), pa na toj osnovi zaključujemo i za termalni sumporni mulj.

Biološka potreba kisika (BPK<sub>5</sub>) je različita. Tako prema tim vrijednostima (Sladeček 1975) Varaždinske toplice pripadaju u I. klasu, Ribarska banja i Kosovratska banja u II. do III. klasu, a Ilidža i Katlanovska banja u III. klasu boniteta.

U spomenutim vodama III. klasu boniteta možemo tumačiti prirodnim sastavom tla, te agrotehnikom i drugim utjecajem čovjeka, što potvrđuju i značajne vrijednosti permanganatnog broja, po kojem ove vode pripadaju istim klasama boniteta kao i prema BPK<sub>5</sub> (Nehrkorn 1967).

Uprkos toksičnim svojstvima sumporovodika za mnoge mikroorganizme, u uzorcima sumpornog mulja koji je u neprestanoj interakciji sa sumpornom vodom, ustanovljen je različit broj bakterija u 1 g mulja. Najveće vrijednosti sumporovodika nađene su u hipertermi Kosovratske banje i Ilidže, dok je u Ribarskoj banji, Varaždinskim toplicama i Katlanovskoj banji koncentracija sumporovodika mnogo manja.

S obzirom na temperaturu vode broj streptomicetata je u Katlanovskoj banji, a osobito u Kosovratskoj banji znatno veći. Čini se da je tome jedan od osnovnih uzroka veće organsko opterećenje vode, na što upozorava relativno visoki BPK<sub>5</sub>, karakterističan za vode III. klase.

U tablici 3. komparativno je prikazana srednja vrijednost broja streptomiceta i nekih heterotrofnih bakterija u 1 g uzorka mulja sumpornih hiperterma.

S obzirom na broj saprofita uzgojenih na MPA (= 100%), zastupljenost streptomiceta u mulju pojedinih hiperterma varira od 0,008% (Katlanovska banja) do 25,0% (Varaždinske toplice). Proteolitički sojevi saprofitskih bakterija zastupljeni su od 1,57% do 4,09%, a samo u Varaždinskim toplicama taj se postotak penje na 20%.

Pojava da broj proteolitičkih bakterija prati ponegdje i povećanje broja streptomiceta može se objasniti prisutnošću proteina u mulju (Grigorjeva 1975). U pravilu broj streptomiceta raste s povećanjem broja saprofitskih bakterija na MPA.

Tablica 3. Srednja vrijednost broja streptomiceta i nekih heterotrofnih bakterija u 1 g uzorka mulja sumpornih hipoterma.

Table 3. Mean average number of streptomycetes and some heterotrophic bacteria per 1 g of mud sample from sulphuric hyperthermal springs.

Skupina mikro- organizama	Iliđa		Katlanovska banja		Kosovratska banja		Ribarska banja		Varaždinske toplice	
	Broj Number	%	Broj Number	%	Broj Number	%	Broj Number	%	Broj Number	%
Streptomiceti Streptomycetes	3.500	0,36	19.500	0,008	42.000	0,38	3.500	0,14	5.000	25,0
Saprofitske bakterije na MPA	950.000	100	240.000.000	100	11.000.000	100	2.500.000	100	20.000	100
Saprophytic bacteria on MPA	15.000	1,57	4.500.000	1,87	450.000	4,09	40.000	1,6	4.000	20,0
Proteolitičke bakterije Proteolytic bacteria										
pH mulja mud	8,2		7,0		7,3		8,9		7,9	

Tablica 4. Pregled morfoloških skupina, serija i biokemijskih svojstava ispitanih sojeva streptomiceta iz mulja sumpornih hiperterma  
 Table 4. Survey of morphological groups, series and biochemical properties of examined streptomycetes strains from the mud of sulphuric hyperthermal springs.

Postaja i soj Stations and Strain	Morfološka skupina Morphological groups	Serija Series	Biokemijska svojstva Biochemical properties			
			Melanin Melanin	Želatina Gelatin	Celuloza Cellulose	Redukcija nitrata Reduction of Nitrates
IL/1	R	<i>Helvolus</i>	-	-	++	++
IL/2	F	<i>Albus</i>	-	+	-	+
KA/1	RA	<i>Albus</i>	-	+	++	++
KA/2	F	<i>Albus</i>	-	++	+	++
KA/3	R	<i>Griseus</i>	-	+	++	++
KO/1	F	<i>Aureus</i>	-	-	+	+++
KO/2	R	<i>Aureus</i>	-	+++	+	++
KO/3	F	<i>Albus</i>	-	-	++	++
KO/4	S	<i>Griseus</i>	-	-	++	+
KO/5	RA	<i>Albus</i>	-	-	++	++
KO/6	RA	<i>Aureus</i>	-	-	++	+
RI/1	F	<i>Aureus</i>	+	++	+	++
RI/2	R	<i>Albosporeus</i>	+	-	+	+++
RI/3	RA	<i>Aureus</i>	+	+++	++	+
RI/4	F	<i>Albus</i>	+	-	+	+++
VA/1	F	<i>Albus</i>	-	+	+++	-
VA/2	S	<i>Chromogenes</i>	-	+	+	-
VA/3	S	<i>Chrysomallus</i>	-	-	++	-
VA/4	RA	<i>Albus</i>	-	+	+	++
VA/5	S	<i>Chrysomallus</i>	-	+	++	-
VA/6	S	<i>Coerulescens</i>	-	++	++	-

Legenda: IL = Ilidža  
 KA = Katlanovska banja  
 KO = Kosovratska banja  
 RI = Ribarska banja  
 VA = Varaždinske toplice

U tablici 4. vidljivo je da je iz svih uzoraka sumpornog mulja, u 5 hipertermi, izoliran ukupno 21 soj streptomiceta. Zastupljeno je samo 8 serija od čega 8 sojeva pripada seriji *Albus* (38%), a 5 sojeva seriji *Aureus*. Zanimljivo je da se 7 serija nije uopće pojavilo. Isti je slučaj zabilježen i za streptomicete u tlima Hrvatske, gdje je također utvrđen najveći broj sojeva serija *Albus* i *Aureus* (Pavletić et al. 1975). S obzirom na morfološke skupine broj izoliranih sojeva je prilično ujednačen, iako nešto više sojeva pripada skupini *Flexibilis* (7). Izvjesna dominacija sojeva s više-manje ravnim sporoforima karakteristična je u težim uvjetima staništa (Ribalkina 1957, Milošević 1967 i Pavičić 1976).

U smislu biokemijskih svojstava, zanimljivo je da od ukupno 21 soja produkcija melanina je zabilježena samo u 4 soja iz postaje Ribarske banje. Sposobnost hidrolize želatine pokazalo je 12 sojeva, a razgradnju celuloze čak 20 sojeva (95,2%), što je konstatirano i u nekim ranijim istraživanjima (Pavičić 1976). Redukcija nitrata dokazana je u 16 sojeva.

Naročito je izražena razgradnja celuloze i redukcija nitrata, što znači da mikroflora streptomiceta u mulju tih ekosistema može imati važnu ulogu u procesima kruženja ugljika i dušika.

Iz pregleda antagonističkih svojstava izoliranih streptomiceta u tablici 5, vidljiva je vrlo velika neujednačenost u produkciji antibiotskih tvari i njihova djelovanja na određene test-organizme na upotrijebljenim podlogama. Samo 1 soj izoliran iz mulja Ribarske banje pokazao je antimikrobno djelovanje na svih 5 test-organizama, a 4 soja, od svih izoliranih, nisu djelovala antagonistički ni na jedan test-organizam, što znači da je 81% sojeva antagonistički aktivno. Najjače su izražena antagonistička svojstva u sojeva iz postaje Ribarska banja. Treba istaći da među izoliranim antagonističkim sojevima prevladavaju oni s inhibicijskim djelovanjem na gram negativne test-bakterije, što je inače prema dosadašnjim podacima, osobito za antagonističke sojeve streptomiceta u našim tlima, vrlo slabo izraženo (Stilinović 1971, Pavletić et al. 1975. i Džingov 1980).

Tablica 5. Pregled antagonističkih svojstava ispitanih sojeva streptomiceta u postajama hiperterma.

Table 5. Survey of antagonistical properties of streptomycetes strains examined in stations of hyperthermal springs.

Postaja i soj Stations and Strain	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylo- ccus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterobac- ter aerogenes</i>	Serijska Series	Morf. skupina Morph. group
IL/1	+	-	+	+++	++	<i>Helvolus</i>	R
IL/2	-	-	++	+	-	<i>Albus</i>	F
KA/1	-	-	-	+	++	<i>Albus</i>	RA
KA/2	+	-	+	-	+	<i>Albus</i>	F
KA/3	-	-	+	+	+++	<i>Griseus</i>	R
KO/1	+	-	-	-	-	<i>Aureus</i>	F
KO/2	+	+	+	-	-	<i>Aureus</i>	R
KO/3	-	-	-	-	-	<i>Albus</i>	F
KO/4	-	-	+	-	-	<i>Griseus</i>	S
KO/5	-	-	-	-	-	<i>Albus</i>	RA
KO/6	-	-	-	-	-	<i>Aureus</i>	RA
RI/1	+++	+++	++	++	+	<i>Aureus</i>	F
RI/2	+	-	+	++	-	<i>Albos- poreus</i>	R
RI/3	+	++	+	+++	-	<i>Aureus</i>	RA
RI/4	+	-	+	+++	-	<i>Albus</i>	F
VA/1	-	-	-	-	-	<i>Albus</i>	F
VA/2	-	-	-	+	-	<i>Chromo- genes</i>	S
VA/3	+	-	+	-	+	<i>Chryso- mallus</i>	S
VA/4	-	-	-	++	-	<i>Albus</i>	RA
VA/5	-	-	-	+	-	<i>Chryso- mallus</i>	S
VA/6	+	+	+	++	+	<i>Coeru- lescens</i>	S

Legenda: +++ jako djelovanje  
 ++ dobro djelovanje  
 + slabo djelovanje  
 - nema djelovanja

## Zaključak

Broj streptomiceta u uzorcima sumpornog mulja iz 5 istraženih sumpornih hiperterma Jugoslavije kreće se od 3 500 do 42 000 u 1 g mulja. S obzirom na brojnost streptomiceta mogu se razlikovati dvije skupine postaja, i to: bogatije (Kosovratska banja i Katlanovska banja), u kojima je srednja vrijednost streptomiceta 30 750 u 1 g mulja, te siromašnije (Ilidža, Ribarska banja i Varaždinske toplice) sa srednjom vrijednošću od 4 000 u 1 g mulja. Najveći broj streptomiceta u 1 g mulja nađen je u Kosovratskoj banji — hipertermi s najvišom koncentracijom sumporovodika. Ukupno je izoliran 21 soj streptomiceta. Klasificirani su u serije po sistemu Gauzea, te u morfološke skupine po ISP sistemu. Serija *Albus* ustanovljena je u svim postajama, dok ni u jednoj nisu konstatirane serije *Lavendulae-Roseus*, *Fradaiae*, *Fuscus*, *Roseo-violaceus*, *Ruber*, *Nigrescens* i *Violaceus*. Od morfoloških skupina najzastupljenija je *Flexibilis* (7), a nešto manje *Spira* i *Retinaculum-Apertum* (5) te *Rectus* (4). Melanin su reducirala samo 4 soja, s hidrolizu želatine je pokazalo 13 sojeva. Celulozu je razgrađivalo čak 20 sojeva, a redukciju nitrata su pokazali svi sojevi. Jako antagonističko djelovanje bilo je izraženo u samo 5 slučajeva, od čega se 4 odnose na sojeve iz Ribarske banje. Samo su 2 soja pokazala antimikrobno djelovanje na svih 5 test-bakterija.

Utvrđeno je da se niti jedan isti soj ne javlja u dvije ili više različitih postaja, što pokazuje da svaku od istraženih sumpornih hipertermi treba promatrati kao poseban biotop sa specifičnim ekološkim i drugim karakteristikama.

## Literatura

- A. P. H. A., 1965: Standard methods for the examination of water and wastewaters. Amer. Pub. Health Assoc., New York.
- Černiševa, O. P., 1950: Aktinomikoz kartofelja. Disertacija. Inst. mikrobiolog. Akad. nauk, SSSR, Moskva.
- Džingov, A., 1980: Rasprostranjenost aktinomiceta u tlima bukovih šuma Makedonije i njihova ekološka uvjetovanost. Disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Frolova, L. F., 1965: Mikrobi-antagonisti videlenie iz lečebnoi grjazi ozero Karabotan gurjevskoj oblasti. Mikrobnoi antagonizam i antibiotiki 8, 28—35.
- Gauze, G. F., 1957: Voprosi klasifikacii aktinomicetov antagonistov, Medgiz, Moskva.
- Grigorjeva, L. V., 1975: Sanitarnaja bakteriologija i virusologija vodoemov. Medicina, Moskva.
- Johnstone, D. B., 1947: Soil *Actinomycetes* of Bikini atoll with special references to their antagonistic properties. Soil Science 64, 435—458.
- Milošević, R., 1967: Mikroflora i njena dinamika na raznim staništima Deliblatske peščare, I. Mikrobno naselje neobrasle peščane dine. Mikrobiologija 4, 79—96.
- Nehrkorn, A., 1967: Statistische Beziehungen zwischen biologischen und chemischen Vorfluteruntersuchungen. Ges. Ing., 55—59.
- Novak, R., 1968: Osvrt na klasifikaciju termomineralnih voda. Radovi Medicinskog fakulteta u Zagrebu 1, 63—66.
- Pavičić, V., 1976: Komparativna istraživanja streptomiceta u mulju termalnih voda Hrvatskog Zagorja. Magistarski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilišta u Zagrebu.
- Pavletić, Z., B. Stilić, 1968: Antagonistički sojevi streptomiceta iz termalnog mulja Tuheljskih toplica u Hrvatskom Zagorju. Acta Bot. Croat. 26/27, 9—16.

- Pavletić, Z., B. Stilinović, D. Grbić, 1975: Novija istraživanja streptomiceta u tlima Hrvatske. Jugoslavenska akademija znanosti i umjetnosti, Razred za prirodne znanosti, Knj. 17, 31—40.
- Pavloviča, D. J., 1978: Aktinomyceti Latvii — rasprostranjenje i biologiĉeskie svoistva, Zinatne, Riga.
- Ribalkina, A. V., E. B. Kononenko, 1957: Mikroflora poĉv Evropeiskoi ĉasti SSSR. Akad. nauk SSSR. Moskva.
- Ristanović, B., B. Stilinović, D. Grbić, 1975: Distribucija aktinomyceta u juĝnom Jadranu. Mikrobiologija, 12, 59—68.
- Safferman, R. S., M. E. Moris, 1962: A method for the isolation and enumeration of Actinomycetes related to water supplies. Robert A. Taft Sanitary Engineering Center Cincinnati 26, Ohio.
- Shirling, E. B., D. Gottlieb, 1964: ISP — international cooperative project for description and deposition of type cultures of streptomycetes. Ohio Wesleyan University, Delaware, Ohio.
- Sladaĉek, V., 1973: System of Water Quality from the Biological Point of View Ergebnisse der Limnologie 7. Schweizerbart'sche Verlagbuchhandlung. Stuttgart.
- Stilinović, B., 1971: Utjecaj pedoloških i fitocenoloških faktora na rasprostranjenost streptomiceta u tlima okolice Zagreba. Disertacija. Prirodoslovno-matematiĉki fakultet Sveučiliša u Zagrebu.
- Waksman, S. A., 1961: Soil microbiology, John Wiley and Sons, INC., New York, London.
- Weyland, H., 1969: Actinomycetes in north sea and atlantic ocean sediments. Nature 223, 858.

## SUMMARY

### THE RESEARCH INTO STREPTOMYCETES IN THE MUD OF SOME SULPHURIC HYPERTHERMAL WATERS OF YUGOSLAVIA

Vicko Paviĉić, Zlatko Pavletić and Boĝidar Stilinović

(Division of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb)

This work is the result of a three-years-long research into the streptomycetes in the mud of 5 sulphuric hyperthermal waters of Yugoslavia.

The samples of mud and water were taken twice, in summer 1977 and in winter 1978.

The number of streptomycetes in the mud samples of the hyperthermal waters analysed varied from 3500 to 42000 per 1 g of mud. Considering the number of streptomycetes, two main groups of stations could be distinguished: The richer ones (Kosovratska banja and Katlanovska banja) with the mean value of streptomycetes of 30750 per 1 g of mud — and the poorer ones (Ilidĝa, Ribarska banja and Varaĝdinske toplice) with the mean value of 4000 per 1 g of mud. The greatest number of streptomycetes per 1 g of mud was found in Kosovratska banja — the hyperthermal water with the biggest concentration of sulphurated hydrogen.

Altogether 21 strains of streptomycetes were isolated. They were all classified into series according to a Gauze system and into morphological groups according to the ISP system. The Albus series was found in all sample stations, although the *Lavendulae-Roseus*, *Fradiæ*, *Fuscus*, *Roseo-violaceus*, *Ruber*, *Nigrescens* and *Violaceus* were not found in any of the hyperthermal waters mentioned. The morphological groups had the most



abundant representatives in *Flexibilis* (7), *Spira* (5), *Retinaculum-Apertum* (5), and *Rectus* (4).

Only 4 strains reduced Melanin and 13 strains showed the hydrolysis of gelatine. As many as 20 strains destroyed cellulose, while all strains showed a reduction of nitrate.

The antagonistic effect in its powerful form was expressed in only 5 cases, four of which were the strain of Ribarska banja. Only 2 strains showed the antimicrobial effect on all 5 test-bacteria.

It was ascertained that none of the strains appeared in two or more different hyperthermal waters. Consequently, this indicates that each of the sulphuric hyperthermal waters examined should be analysed and examined as a separate habitat with its specific ecological and other characteristics.

*Dr. Vicko Pavičić*  
*Prof. dr. Božidar Stilić*  
 Biološki odjel  
 Prirodoslovno-matematički fakultet  
 Rooseveltov trg 6  
 YU-41001 Zagreb, pp. 993 (Jugoslavija)