

## Mikrobiális közösségek denitrifikáló tagjainak vizsgálata

TIMÁR M. ÉVA, BARANYI KATALIN és PÁTKAI TAMÁS

*MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete, Budapest*

A nagyadagú nitrogén-műtrágyázás, valamint a szerves hulladékok koncentrált keletkezése módosítja azokat az önregulációs folyamatokat, melyek egy ökoszisztémán belül a mikrobiális társulások denitrifikációra képes tagjainak tevékenységét irányítják.

Kedvező esetben a denitrifikációt végrehajtó baktériumok a növényi táplálkozás igényeit meghaladó nitrátkészleteket visszajuttatják a légkörbe, ahonnan azt a  $N_2$  fixálásra képes mikroszervezetek a talaj nitrogén mennyiségének csökkenésekor megkötik és így a körforgalom folyamatosságát fenntartják.

A szervesetlen nitrogénvegyületek felhalmozódása és kimosódása a talajból a vizek emberi hasznosíthatóságát rontja.

A mikrobák denitrifikációs anyagcsere-tevékenységét a szennyvíztisztítás során hasznosítják, amikor is mesterségesen irányított környezeti körülmények hatására biológiai úton távolítják el a nitrogént a szennyvizekből.

A denitrifikációt végrehajtó organizmusok élettani, biokémiai és taxonómiai megismerése azonban nemcsak a szennyvíztisztítás technológiájának fejlesztése érdekében szükséges, hanem talajbeli tevékenységük is indokolttá teszi vizsgálatukat.

A különböző rendszertani egységekbe sorolható baktériumfajok jelentős hányada képes  $O_2$  hiányában nitrátokat hasznosítani disszimilatív anyagcseréje során, de örökletes tulajdonságok és a környezeti feltételek változottsága a folyamat érvényesülését, sebességét, köztes termékeit nagymértékben befolyásolják.

Vizsgálataink különböző ökológiai feltételek között tevékenykedő mikrobiális életközösségek denitrifikációra képes tagjainak megismerését célozzák. Célszerűnek látszott viszonylag stabil környezeti paraméterekkel rendelkező helyről az izolálási munkát megkezdeni. Ezért munkánk során a délpesti szennyvíztisztító-telep utóülepítő medencéjének iszapos vízmintájából izolálható, disszimilatív nitrátredukációs képességgel rendelkező baktériumokat vizsgáltuk.

### Anyagok és módszerek

Az iszapos mintát 0,5 g/l  $KNO_3$ -mal dúsítottuk és  $28^\circ C$ -on tartottuk 24 órán keresztül. Az inkubációs idő alatt  $N_2$  átáramoltatásával  $O_2$ -mentes körülmények kialakulását biztosítottuk. Az így előkészített minta alikvotjai-

## 1. táblázat

Az izolált törzsek és *Arthrobacterek* morfológiai és élettani tulajdonságai

(1) Törzs jele	(2) Sejtmorfológia				(8) Gram- festés	(9) Mozgás	(10) Növe- kedés 40 °C-on
	(5) Sejtméret $\mu$	(6) Elrendeződés	(7) A sejtek formájának változása 72 <sup>h</sup> tenyészet				
			Coccoid	Ciszták			
D 16	0,7–0,9 × 1,3–1,4	m	+	–	–	+	+
D 51	0,9–1,3 × 1,1–1,6	rl	+	–	–	+	+
D 124	1,1 × 1,3–4,2	m p	+	–	–		+
E 28	1,0–1,3 × 5,0–5,2	rl	–	+	–	+	–
E 211	0,7–1,1 × 1,3–5,6	m p	–	+	–	–	+
E 18	0,9–1,1 × 1,6–7,8	es rf	–	–	–		–
E 26	1,3 × 4,0–9,0	m p	–	+	V	+	–
E 91	1,1–1,3 × 1,3–11,0	es hl	+	+	–	+	+
E 172	1,1–1,3 × 1,3–4,0	m p	+	–	–		–
E 4	1,0–1,1 × 2,0–2,6	es rf	+	+	–		+
E 16	1,3 × 2,6–5,2	rl	+	+	V		+
D 511	1,1 × 2,6–10,3	hf	+	+	–	+	+
E 920	1,1–1,3 × 1,6–9	m p	+	+	–	–	+
D 71	1,1–1,3 × 1,4–5,2	rl hf	+	+	V	+	+
E 49	1,4–1,6 × 1,3–5,2	m p	+	+	–	–	+
E 43	1,1–1,3 × 1,1–3,3–3,4	m p	+	+		+	+
		rl hf					
A. tumescens	1,1–1,3 × 2,7–7–33	m p	+	+	+	–	
		hf					
A. variabilis	1,3 × 3,9–5	m p	+	–	V	–	
		rf					

Rövidítések: m = magános; p = páros; rl = rövid lánc; es = csoportok; hf = hosszú fonal;

ból lemezöntéseket készítettünk. Táptalaj: pepton 3 g; húskivonat 2,5 g; élesztőkivonat 2,5 g; DL-almasav 2 g; KNO<sub>3</sub> 0,5 g; Hoagland nyomelem oldat 1 ml; agar 20 g; deszt. víz 1000 ml.

A kialakult kolóniákat izoláltuk és további vizsgálatokra csak azokat tartottuk meg, melyek denitrifikációs képességekkel rendelkeztek. Ezeket a

Morfológiai jellemzők és lakmusztejen történő tenyésztés eredményei

(3) Kulturális tulajdonságok							(4) Lakmusztej táptalaj			
(11) Kataláz	(12) Ureáz	(13) Metilvörös elszíntele- nítés	(14) Acetoin képzés	(15) Indol- képzés	(16) Zselatin folyósítás	(17) Kemé- nyítő bontás	(18) pH változások		(19) Redukció	(20) Koagu- láció
aktivitás							savas	lúgos		
+	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
+	-	-	-	-	-	-	0	0	0	+
+	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
+	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
+	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
+	+	-	-	-	-	-	0	0	0	+
-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
-	+	-	-	-	-	-	0	0	0	+
+	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
+	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
-	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0
+	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0
+	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
+	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
+	-	-	-	-	-	-	0	0	0	+
+	-	-	-	-	+	-	+	0	0	0
+	-	-	-	-	+	-	0	0	0	0

rf = rövid fonal; hl = hosszú lánc; V = változó.

tenyészeteket többszöri széthúzással és szélesztéssel tisztítottuk. A homogén nek bizonyuló tenyészetekkel az alábbi vizsgálatokat hajtottuk végre:

1. Sejtmorfológia: szilárd táptalajon tenyésztett törzsek 24 és 72 órás tenyészeiteneik hővel fixált és Ziehl—Nielsen szerint karbol-fuchsinnal, vala- mint Gram szerint festett keneteiből. Táptalaj: 125 g hámozott és felaprított

2. táblázat

C-forrás értékesítés

Növekedés (A) és savképzés (B) különböző C-forrásokat

(1) Törzs jele	(2) Glükóz						(3) Szacharóz				(4) Laktóz			
	Anaerob II		I		II		I		II		I		II	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
D 16	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
D 51	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
D 124	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 28	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
E 211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E 26	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E 91	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E 172	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E 4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E 16	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
D 511	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E 920	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D 71	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
E 49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 43	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A. tumesc.	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
A. variab.	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+

burgonya, valamint 1 liter víz főzetének szüredékében NaCl 5,5 g; pepton 10 g; továbbá glicerin 10 ml adagjai feloldva és a folyadék 1000 ml-re feltöltve. pH 7,0. Szükséges esetben a táptalaj 1,5 g agart tartalmazott és a táptalaj továbbiakban BG jelöléssel szerepel.

2. Gram-festés Hucker-féle változata szerint (GURR [4]).

3. Mozgás. Folyékony nutrient táptalajon nőtt tenyészet függőcseppben.

4. Növekedés 40 C fokon. BG szilárd táptalajra oltott törzsek jelzett hőfokon történő inkubációja.

5. Katalázaktivitás. BG ferde táptalajon fejlődött 48 órás tenyészeteket 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel öntöttünk le. Gázképzés hiányát oltatlan táptalajon is ellenőriztük.

6. Ureázaktivitás meghatározása Christensen módszere szerint. Táptalaj: pepton 1 g; NaCl 5 g; KH-PO<sub>4</sub> 2 g; glükóz 1 g; 0,4% fenolvörös 3 ml; agar 20 g. pH 7.

7. Proteolitikus aktivitás. Zselatint tartalmazó nutrient táptalajba szűrt tenyészetek zselatin folyósítását figyeltük.

8. Indol képzés. Húskivonaton tenyésztett organismusok 24, ill. 48 órás tenyészeit Kovács-reagenssel kémelettük.

9. Metilvörös és Voges—Proskauer teszt. Glükózfoszfátot és proteoz-peptont tartalmazó folyékony táptalajba oltott 24, illetve 72 órás tenyészetek pH változása, valamint acetoin képzése.

és savképzés

tartalmazó szintetikus I és komplex II táptalajokon

(5) Keményítő				(6) Glicerin				(7) Metanol				(8) Kontroll			
I		II		I		II		I		II		I		II	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-

10. Szénforrás hasznosítás és savképzés. Keverék indikátort tartalmazó félkemény TSUKAMURA [9] táptalaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2,64 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g; d.víz 1000 ml., valamint HUGH és LEIFSON [6]-féle komplex táptalaj: pepton 2 g; NaCl 5 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,3 g; 115 C°-on autoklávban sterilizálva 20 percig. Glükóz, szacharóz, laktóz, keményítő, glicerin, metanol, szűrővel csíráltatva, 0,5% végkoncentrációban maradt a táptalajokban. A tenyészeteket a csőben levő táptalajoszlop közepére szűrtük be a kémcső aljáig. Az inkubációs idő alatt figyeltük a tenyészetek növekedési erélyét, az indikátor színváltozását és az esetleges gázképzést. Glükóz jelenlétében Hugh – Leifson táptalajon, gumidugóval lezárt csövekben is megfigyeltük a törzsek viselkedését. Szénforrást, ill. a Hugh – Leifson táptalajban a vizsgált cukrokat és alkoholokat nem tartalmazó kontroll csövekben is ellenőriztük a törzsek fejlődését.

11. Keményítő hidrolízis. 0,5% oldható keményítőt tartalmazó Hugh, Leifson és Tsukamura táptalajban Petri-csészében kihúzott tenyészeteket 6 nap után Lugol oldattal öntöttük le.

12. Lakmusztej táptalajon történő tenyésztéskor figyeltük a táptalaj pH változását, a lakmusz elszíntelenedését és a táptalaj feltisztulását.

13. Antibiotikumok és antibakteriális szerekkel szembeni érzékenység. 24–48 órás tenyészetekkel, BG táptalajokból készült lemezekben szélesztettük a törzseket és ezekre helyeztük a Humán Oltóanyagtermelő és Kutató Intézet

## 3. táblázat

## Antibiotikumokkal

Törzs jele	Penicillin 3 NE	Oxacillin 10 µg	Methicillin 20 µg	Chlor- amphenicol 30 µg	Oleandro- mycin 30 µg	Strepto- mycin 30 µg	Tetracyclin 30 µg	Neomycin 100 µg
	gátló zóna							
D 16	—	—	—	15	11	—	12	8
D 51	—	—	—	5	10	—	15	2
D 124	—	—	—	4	—	—	5	5
E 28	—	—	—	5	—	—	15	5
E 211	—	—	—	7	8	—	17	5
E 18	—	—	—	—	—	2	3	5
E 26	—	—	—	—	—	—	10	5
E 91	—	—	—	18	—	5	20	5
E 172	—	—	—	2	—	3	20	10
E 4	—	—	—	—	—	8	3	8
D 511	—	—	—	3	—	5	3	8
E 16	5	—	10	12	12	5	12	5
E 920	—	—	—	5	—	6	6	5
D 71	—	—	10	10	5	8	—	3
E 49	—	—	—	—	—	6	3	7
E 43	9	—	5	15	7	5	11	3
A. tumesc.	5	—	—	15	12	9	10	7
A. variab.	—	5	—	5	8	5	10	5

által készített hatóanyagot tartalmazó korongokat: penicillin 3 NE; oxacillin 10 µg; methicillin 20 µg; chloramphenicol 30 µg; streptomycin 30 µg; oleandomycin 30 µg; tetracyclin 30 µg; neomycin 100 µg; polymixin-B 15 µg; erythromycin 10 µg; superseptyl 400 µg; nitrofurantoin 300 µg; chlortetracyclin 30 µg; oxytetracyclin 50 µg; kanamycin 30 µg; spiramycin 30 µg; novobiocin 30 µg. 36 óra után mértük a gátlási zóna átmérőjét.

Az izolált törzsek taxonomiai helyzetének megállapítása érdekében a törzs-gyűjteményből származó autentikus *Arthrobacter* fajokat is vizsgálatba vontuk:

<i>A. tumescens</i>	CCM 2386
<i>A. variabilis</i>	CCM 1565

## Nitrátredukció vizsgálata

A törzseket nitrát-, illetve nitrittartalmú, félkemény, pufferolt szintetikus, szintetikus és élesztőkivonatokat tartalmazó, valamint komplex táptalajokba oltottuk. A tenyészetek O<sub>2</sub> mentesítése érdekében lúgos pirogallolt tartalmazó vattadugóval és gumidugóval zártuk le. Táptalajok: szintetikus táptalaj (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,6 g; MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,5 g; glükóz 3 g; glicerin 2 g. Az élesztőkivonatot tartalmazó szintetikus táptalaj megegyezik az előzőekben leírtakkal, élesztőkivonat tartalma 1 g/liter.

szembeni érzékenység

Poly- myxin 15 µg	Erythro- mycin 10 µg	Superseptyl 400 µg	Nitro- furantoin 300 µg	Chlortetra- cyclin 30 µg	Oxytetra- cyclin 30 µg	Venomycin 50 µg	Kanamycin 30 µg	Spiramycin 30 µg	Novobiocin 30 µg
átmérője mm-ben									
—	18	—	—	9	13	7	—	—	5
—	—	—	—	12	10	3	—	—	2
—	10	—	—	12	10	5	3	—	9
—	—	—	—	15	15	—	10	—	10
—	13	—	10	12	11	—	7	—	10
3	—	—	1	10	18	—	—	—	5
5	5	—	—	10	10	—	—	—	—
3	2	—	7	15	15	5	7	—	10
5	5	—	2	12	9	—	2	—	2
2	—	—	—	—	5	—	5	—	—
2	—	—	—	1	3	—	3	—	—
3	13	—	11	13	12	—	10	10	5
3	2	—	—	10	10	2	2	—	—
—	—	—	9	10	8	—	5	—	2
3	—	—	—	1	—	—	7	—	—
—	5	—	13	12	15	—	—	7	5
1	15	—	3	12	10	10	5	9	10
2	5	—	—	9	10	9	—	12	19

Komplex táptalaj: húskivonat 3 g; élesztőkivonat 1 g; pepton 3 g. Mindhárom táptalaj esetében 1000 ml, pH 7, foszfát pufferben oldottuk fel a komponenseket és Hoagland nyomelem oldatot 0,1% koncentrációban tartalmaztak a táptalajok. A törzsek denitrifikációs tulajdonságait KNO<sub>3</sub> 0,5 g/l és NaNO<sub>2</sub> 0,5 g/l jelenlétében vizsgáltuk. Kontrollként a nitrátot, ill. nitritet nem tartalmazó táptalajra oltott és anaerob körülmények közt tartott tenyészetek szolgáltak. Az inkubációs idő alatt a növekedés erélyét és a gázképzést figyeltük és 10 nap után Gries – Ilosvay reagenssel a nitrát és nitrit jelenlétére kémleltük a tenyészeteket. Nitrit jelenlétében nitrátra nem kémleltünk. Az eredményeket a 4. táblázat ismerteti.

**Az eredmények ismertetése**

A sejtek szabálytalan formája, az egymással V és L alakot képező pálcák, ciszták (a normál sejteknél 2–10-szer nagyobb szabályos vagy szabálytalan formák), az idősebb korban kokkusokra való szétesési hajlam együttesen vagy részlegesen valamennyi törzs mikromorfológiai képére jellemző.

Gram szerint negatívan festődnek, ill. az E26, E16 és D71 törzsek Gramvariabilisek. A D511 és E920-as törzsek kivételével keményítőt nem bontanak. Proteolitikus aktivitásuk egyöntetűen negatív.

Oxidatív anyagcseréjük — az E18-as törzs kivételével — szintén általános jellemvonás, mert anaerob körülmények között glükóz jelenlétében

nem, vagy gyengén fejlődnek, és savat nem képeznek. Aerob körülmények között az E18, E26, E172, E91 és E4-es törzsek glükózból, szacharózból és laktózból kevés savat képeznek. Szintetikus táptalajon, aerob körülmények között valamilyen definiált szénforrás jelenlétében — a D16-os törzs kivételével — mindegyik törzs szaporodik.

Disszimilatív nitrátredukció szempontjából a törzsek két nagy csoportra oszthatók. Egyrészt a nitrátokat gáznemű végtermékké alakítja, másrésztüknek nincs, vagy nem működik a nitritreduktáza és így ez a végtermék felhalmozódik a környezetükben (D16 D51 D511 D124 E4). Az izolátumok további csoportokra oszthatók aszerint, hogy a komplex vagy szintetikus táplálkozási körülmények hogyan hatnak az anaerob disszimilatív folyamatokra:

1. Az E172-es és E16-os törzsek mindhárom táptalajon jól nőnek és a nitrátokat gáznemű végtermékké alakítják át.

2. Az E920, E26, E18 és E211 törzsek komplex táptalajon és szerves C-forrásokot tartalmazó szintetikus táptalajon — de csak élesztőkivonat jelenlétében — képesek a folyamat végrehajtására.

3. Az E43, D71, E49, E91 és E28 izolátumok csak a húskivonatból, vagy peptonból származó valamelyik vegyület jelenlétében valósítják meg a nitrát teljes redukeióját.

Bizonyos szerves nitrogénvegyületek hiányában az E920-as törzs szintetikus táptalajon, az E43, D71, E49 és E91 törzsek szintetikus élesztőkivonatot tartalmazó táptalajon gyenge növekedést mutatnak, a nitrátok redukeiója ezeken csak részleges és a nitrit a környezetben felhalmozódik.

Nitritnek, mint egyedüli elektronakceptornak jelenlétében a törzsek viselkedése eltérő. Komplex táptalajon egyedül a D71-es törzs nem fejlődött nitriten, ugyanakkor nitrát jelenlétében a nitritreduktázok működése egyértelműen megállapítható volt.

Élesztőkivonat tartalmú szintetikus táptalajon az E172, E16, E920, E26, E18, E211 törzsek számára a nitrit nem helyettesíti a nitrátot, viszont komplex táptalajon ugyanezek a törzsek nitrit jelenlétében is kitűnően növekednek. A vizsgálatba vont és ezek közül disszimilatív nitrátredukcióra képes *Arthrobacter variabilis* és *A. tumescens*, csak nitritig redukálják a nitrátot és élesztőkivonat nélküli szintetikus táptalajon nem fejlődnek.

### Az eredmények értékelése

Az organizmusok izolálása érdekében végzett előkezelések a nitrátredukciós képességgel rendelkező fajok elszaporítását célozták. Az izolált organizmusok azonban nemcsak nitrátredukciós sajátágaikban hasonlítottak egymáshoz, hanem sejtmorfológiai és élettani tulajdonságaikban is.

A tenyésztési körülményektől és a sejtek korától függően megjelenő coccoid, rövidfonál, L V alakú formák, valamint az óriás sejtek előfordulásának gyakorisága, a Gram-negatív, ill. Gram-variabilis festődés és a szaprofita karakter a törzsek *Arthrobacter* genuszba történő sorolását tenné lehetővé. Ugyanakkor a keményítóbontás és proteolitikus aktivitás tekintetében tapasztalt negatív tulajdonságok általában nem jellemzők a genusz tagjaira.

JENSEN [7], CUMMINS [1], HARRINGTON [5], GOODFELLOW [3], DAVIS [2], a Bergey's Manual utolsó kiadása után megjelent munkái egyértelműen





rámutattak arra, hogy azok a határvonalak, melyek a *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium* és *Mycobacterium* genuszokhoz tartozó fajokat egymástól elválasztják, nem eléggé világosak. Ezért arra kell szorítkoznunk, hogy az izolált törzseket a szaprofita *Corynebacteriumok* csoportjához tartozóként jelöljük meg. A baktériumok ezen csoportjának morfológiai, ökológiai, táplálkozási és anyagcsere sajátosságait VELDKAMP [10] foglalta össze 1970-ben.

Annak ellenére, hogy a disszimilatív nitrátredukációs képesség ökológiai, élettani, biokémiai és esetenként taxonomiai szempontból is jelentőséggel bír, a szaprofita coryneform baktériumokkal kapcsolatosan kevés irodalmi adat lelhető fel. A nehézségeket mindenekelőtt az okozza, hogy a taxonomiai leírások nem tesznek különbséget disszimilatív és asszimilatív nitrátredukció között, hanem csak azt jelzik, hogy a nitrátot hasznosítja-e az organizmus az anyagcsere folyamán és hogy nitrit képződik-e. Az általunk vizsgálatba vont autentikus *Arthrobacter* törzsek közül csak az *A. tumescens* és az *A. variabilis* redukálta a nitrátot disszimilatív anyagcserével kapcsolatosan, a többiek — bár az irodalmi adatoknak megfelelően, rendelkeztek nitrátreduktázzal — ezt csak asszimilatív folyamatok során hasznosították.

A vizsgált törzsek egy részénél a nitritreduktázok működése nem mutatható ki, a sejtek energianyerő műveleteit a nitrát nitritig történő átalakulása biztosítja és a vizsgálat körülményeiből az is megállapítható, hogy a szabaddá váló nitrit jelentősebben nem gátolja a sejtek szaporodását (D51, D16, D511, D124, E4).

A kísérletek adatai alapján egyértelműen bizonyítható, hogy megfelelő táplálkozási körülmények között a D71 törzs kivételével, a sejtek — nitrát hiányában — a nitritet önmagában is jól hasznosítják elektronakceptorként. A nitritreduktázok működését azonban nemcsak a húskivonatból, peptonból vagy élesztőkivonatból származó anyagok jelenléte határozza meg, hanem a törzsek viselkedése a tekintetben is eltérő, hogy a nitrátból a sejten belül keletkező nitrit felhasználásáról, vagy a nitritnek — mint egyedüli elektronakceptornak — hasznosításáról van-e szó. Míg nitráttartalmú szintetikus táptalajon az E172 és E16 törzsek jól nőnek, addig nitrit jelenlétében a növekedés gyenge, vagy nem tapasztalható. Ugyanez az E920, E26, E18 és E211 törzsek esetében is leírható, ezek szintetikus, de élesztőkivonatot tartalmazó táptalajon — nitrát esetében — jól nőnek, de nitrit jelenlétében — ugyanezen a táptalajon — nem szaporodnak.

Az E43, E49 és E91 törzsek, számukra kedvezőtlen táplálkozási körülmények között is képesek maradnak részleges anyagcsere tevékenység kifejtésére. Kielégítő szaporodásuk csak a komplex táptalajon figyelhető meg. A szintetikus táptalajokon kismértékű fejlődésük és a nitrátredukációjuk megtörténik, a nitrit azonban felhalmozódik a sejtek környezetében. ПЧИНОТЫ [8] *Aerobacter aerogenessal* végrehajtott kísérletei során hasonló jelenséget ír le és feltehető, hogy a szóbanforgó izolátumaink esetében is az energianyerő és sejt szintetikus folyamatok szétkapcsolódnak, vagyis a disszimilatív folyamatok során keletkező energia nem hasznosul a sejtépítő műveletekben, így a tenyészet gyarapodása megszűnik, de az energianyerő műveletek végtermékei felhalmozódnak a sejt környezetében.

Köszönetünket fejezzük ki prof. M. KOCUR-nak, aki a Brnoi Nemzetközi Törzsgyűjteményből rendelkezésünkre bocsájtotta az *Arthrobacter* fajokat.

### Összefoglalás

Szennyvíztisztító telep utóülepítő medencéjéből izolált és disszimilatív nitrátredukcóra képes baktériumai, néhány fontos élettani és morfológiai tulajdonságaikban hasonlítanak egymáshoz. Taxonomiai szempontból a szaprofita coryneform baktériumok csoportjába sorolhatók, de nem azonosíthatók az *Arthrobacter* genusz tagjaival.

A vizsgált organizmusok nitrát- és nitritredukcóját befolyásoló tényezők a törzstől függően eltérőek, egy részüknél a nitrátredukciónak a folyamat végterméke nitrit, amely felhalmozódik a sejtek környezetében.

A nitrátredukciónak a gáznemű végtermékig végrehajtó törzsek nitritreduktázának működését a táplálék szerves kötésű nitrogénvegyületeinek és magának az elektronakceptornak minősége együttesen szabja meg. Nitrát jelenlétében szerves nitrogénvegyület hiányában is jól növényöző törzsek a sejten belül keletkező nitritet gáznemű végtermékig alakítják át. Ugyanezek a törzsek a nitritnek, mint a sejten kívüli egyedüli elektronakceptornak hasznosításához már igénylik a húskivonatból, peptonból, élesztőkivonatból származó vegyületeket fejlődésükhöz.

Izolált törzseink egy részénél kedvezőtlen táplálkozási körülmények között az energianyerő és a sejt szintetikus folyamatok szétkapcsolódása figyelhető meg, vagyis a disszimilatív folyamatok során keletkező energia nem hasznosul a sejtépítő folyamatokban és a nitrátból keletkező nitrit felhalmozódik a sejt környezetében.

### Irodalom

- [1] CUMMINS, C. S. & HARRIS, H.: The chemical composition of the cell wall in some Gram-positive bacteria and its possible value as taxonomic character. *J. gen. Microbiol.* **14.** 583—600. 1956.
- [2] DAVIS, G. H. G. & NEWTON, K. G.: Numerical taxonomy of some named coryneform bacteria. *J. gen. Microbiol.* **56.** 195.—214. 1969.
- [3] GOODFELLOW, M.: Numerical taxonomy of some named bacterial cultures. *Can. J. Microbiol.* **13.** 1365—1374. 1967.
- [4] GURR, E.: *The Rational Use of Dyes in Biology.* Leonard Hill. London. 1965.
- [5] HARRINGTON, B. J.: A numerical taxonomical study of some corynebacteria and related organisms. *J. gen. Microbiol.* **45.** 31—40. 1966.
- [6] HUGH, R. & LEIFSON, E.: The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *J. Bact.* **66.** 24—26. 1953.
- [7] JENSEN, H. L.: Some introductory remarks on the coryneform bacteria. *J. appl. Bact.* **29.** 13—16. 1966.
- [8] PICHINOTY, F.: Réduction assimilative du nitrate par les cultures aérobies d'*Aerobacter aerogenes*. Influence de la nutrition azotée sur la croissance. *Folia Microbiol.* **5.** 165—170. 1960.
- [9] TSUKAMURA, M.: Adansonian classification of Mycobacteria. *J. gen. Microbiol.* **45.** 253—273. 1966.
- [10] VELDKAMP, H.: Saprophytic coryneforma bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **24.** 299—240. 1970.

Érkezett: 1974. október 28.

## Investigations of Denitrifying Bacteria of a Microbial Community

E. TIMÁR, K. BARANYI and T. PÁTKAI

Research Institute for Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

### Summary

The authors studied the denitrifying bacteria of a gravity-type secondary clarifier. The isolates were similar in several fundamental morphological and physiological characteristics, showing affinities to the saprophytic coryneform bacteria, but — in spite of striking morphological similarities — they were different from twelve named cultures of *Arthrobacter* species.

Factor influencing the reduction of nitrate and nitrite were determined by environmental conditions and by strain differences. Some of the strains accumulated nitrite in the medium while others reduced nitrate completely to gaseous products. In the latter group, when nitrite was added as sole electron-acceptor, its reduction depended on the presence of nitrogenous organic compounds in the medium; these compounds are not necessary for the reduction of nitrate. In synthetic medium, some strains showed phenomena attributable to energy-uncoupling, resulting in accumulation of nitrite and decreased growth.

*Table 1.* Physiological and morphological features of the isolates and named cultures of two *Arthrobacter* species. (1) Code number. (2) Morphological characteristics. (3) Cultural characteristics. (4) Behaviour in litmus milk. (5) Size of cells in  $\mu$  (6) Arrangement of cells. (7) Cocci and cysts after 72 hours. (8) Gram's staining. (9) Motility. (10) Growth at 40 °C. (11) Catalase. (12) Urease. (13) Methyl red. (14) Acetoin. (15) Indole. (16) Liquefaction of gelatin. (17) Hydrolysis of starch. (18) pH change. (19) Reduction. (20) Coagulation. m = single cells; p = pairs; rl = short chains; cs = groups; hf = long filaments; hl = long chains; V = variable.

*Table 2.* Utilization of carbon-sources. (A) Growth. (B) Acid-formation: I. Complex medium; II. Synthetic medium. (1) Code number. (2) Glucose. (3) Saccharose. (4) Lactose. (5) Starch. (6) Glycerol. (7) Methanol. (8) Control.

*Table 3.* Sensitivity to antibiotics. (Diam. of inhibitory zone in mm)

*Table 4.* Characteristics of nitrate-reduction. (1) Code number. (2) Complex medium. (3) Synthetic medium plus yeast extract. (4) Synthetic medium. (5) Anaerobic growth without  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$ . A) Growth: jó = good; köz. = medium; gy = weak; ny = trace; B) Nitrite formed, after 14 days; C) Nitrate after 14 days; D) Nitrite after 14 days;

## Untersuchung denitrifizierender Glieder mikrobieller Gemeinschaften

É. TIMÁR, K. BARANYI und T. PÁTKAI

Forschungsinstitut für Bodenkunde und Agrikulturchemie der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest

### Zusammenfassung

Die aus dem Nachsetzbecken einer Abwasserkläranlage isolierten und zur dissimilativen Nitratreduktion fähigen Bakterien sind in einigen wichtigen physiologischen und morphologischen Eigenschaften einander ähnlich. Sie gehören, aus taxonomischem Standpunkt aus gesehen, der Gruppe der coryneformen Saprophyten an, können aber nicht mit den Bakterien der *Arthrobacter*-Genus gleichgesetzt werden.

Diejenigen Faktoren, die die Nitrat- und Nitritreduktion der untersuchten Organismen beeinflussen, hängen von dem Bakterienstamm ab. Das Endprodukt der Nitratreduktion ist in einigen Fällen Nitrit, das sich in der Umgebung der Zellen anhäuft.

Die Wirksamkeit der Nitritreduktase der die Nitratreduktion bis zu einem gasförmigen Endprodukt durchführenden Stämme hängt gleichermaßen von den organischen N-Verbindungen des Nährstoffes und der Qualität der Elektronenakzeptoren ab. Diejeni-

gen Stämme, die in Abwesenheit von organischen N-Verbindungen, aber in Anwesenheit von Nitrat gut gedeihen, bauen das sich in der Zelle bildende Nitrit bis zu einem gasförmigen Endprodukt ab. Dieselben Stämme benötigen aber, wenn sie das Nitrit, als einzigen extracellulären Elektronenakzeptor verwenden sollen, aus Fleischextrakt, Pepton oder Hefeextrakt stammende Verbindungen zu ihrer Entwicklung.

Bei einem Teil der isolierten Stämme trennen sich unter ungünstigen Nährstoffverhältnissen die energieproduzierenden und die zellenaufbauenden Vorgänge voneinander, d.h. die sich im Laufe der Dissimilation bildende Energie wird im Aufbau der Zellen nicht verwertet und so häuft sich das aus Nitrat stammende Nitrit in der Umgebung der Zellen an.

*Tab. 1.* Morphologische und physiologische Eigenschaften der isolierten Stämme und der *Arthrobacter*. A) Morphologische Kennwerte und Ergebnisse der auf Lakmus Milch erfolgten Inkubation. (1) Bezeichnung des Stammes. (2) Zellenmorphologie. (3) Eigenschaften der Kulturen. (4) Auf Lakmus-Milch-Nährboden. (5) Zellengröße,  $\mu$ . (6) Konfiguration. (7) Änderung in der Zellenform nach einer 72stündigen Inkubation: coccoid und Zysten. (8) Anfärbung nach Gram. (9) Bewegung. (10) Wachstum bei 40 °C. (11) Katalase-Aktivität. (12) Urease-Aktivität. (13) Entfärbung mit Methylrot. (14) Bildung von Acetoin. (15) Indolbildung. (16) Verflüssigung von Gelatine. (17) Abbau von Stärke. (18) Änderung im pH-Wert: sauer und alkalisch. (19) Reduktion. (20) Koagulation. m = Einzelzelle; p = Zellenpaar; rl = kurze Ketten; cs = Gruppen; hf = lange Fäden; hl = lange Ketten; V = unterschiedlich.

*Tab. 2.* Verwertung der C-Quelle und Säurebildung. Wachstum (A) und Säurebildung (B) auf verschiedene C-Quellen enthaltenden synthetischen (I) und komplexen (II) Nährböden. (1) Bezeichnung des Stammes. (2) Glykose. (3) Saccharose. (4) Laktose. (5) Stärke. (6) Glycerin. (7) Methanol. (8) Kontrolle.

*Tab. 3.* Empfindlichkeit den Antibiotika gegenüber (Durchmesser der Hemmungszone in mm.).

*Tab. 4.* Nitratreduktionsfähigkeiten der isolierten Stämme. (1) Bezeichnung des Stammes. (2) Komplexer Nährboden. (3) Synthetischer Nährboden + Hefeextrakt. (4) Synthetischer Nährboden. (5) Anaerobe Entwicklung ohne  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{NO}_2^-$ . A) Entwicklung: j = gut; köz = mittelmässig; gy = schwach; ny = in Spuren. B) Nitritbildung nach 14 Tagen. C) Zurückgebliebenes Nitrat nach 14 Tagen. D) Zurückgebliebenes Nitrit nach 14 Tagen.

## Изучение денитрифицирующих бактерий

Е. ТИМАР, К. БАРАНИ и Т. ПАТКАЙ

Научно-исследовательский институт почвоведения и агрохимии В. А. Н., Будапешт

### Резюме

Бактерии способные диссимилятивно редуцировать нитраты выделили из отстойника по очистке сточных вод и определили их важнейшие физиологические и морфологические свойства. Таксономически их можно отнести к группе сапрофитных бактерий, подобных корине-бактериям, но нельзя отождествить их с членами гена *Arthrobacter*.

Факторы, оказывающие влияние на редукцию нитратов и нитритов, зависят от штаммов изученных микроорганизмов, у одной их части конечным продуктом процесса редукции являются нитриты, накапливающиеся в области клеток.

Действие нитрит редуктазы штаммов, редуцирующих нитраты до газообразных конечных продуктов, совместно определяют органические соединения азота, как источники питания и качество электронакцепторов. В присутствии нитратов, штаммы, хорошо развивающиеся и в отсутствии органических азотных соединений, нитриты образующиеся в клетках преобразовывают до газообразных продуктов. Те же штаммы для своего развития и усвоения нитритов, как единственных внеклеточных электронакцепторов, требуют соединений из мясных, пептонных и дрожжевых вытяжек.

В неблагоприятных условиях питания у одной части изолированных штаммов отмечали обрыв энергетических реакций и генезиса клеток, т. е. энергия, выделившаяся в результате процессов диссимиляции, не используется в построении клеток и нитриты, образовавшиеся из нитратов, накапливаются в области клетки.

*Табл. 1.* Физиологические и морфологические свойства изолированных штаммов и *Arthrobacter species A* Морфологические особенности и результаты выращивания на лакмусовой молочной среде. (1) Обозначение штамма. (2) Морфология клетки. (3) Культуральные свойства. (4) На лакмусовой молочной питательной среде. (5) Размер клеток,  $\mu$ . (6) Распределение. (7) Изменение форм клеток после 72-х часового выращивания и цисты. (8) Грам окраска. (9) Подвижность. (10) Рост при 40°C. (11) Каталазная активность. (12) Активность уреазы. (13) Обесцвечивание метила красного. (14) Образование ацетона. (15) Образование индола. (16) Разжижение желатины. (17) Разрушение крахмала. (18) Изменение pH: кислое и щелочное. (19) Редукция. (20) Коагуляция. *m* = единичные; *p* = парные; *r1* = короткая цепь; *cs* = группы; *hf* = длинные нити; *lf* = длинная цепь; *V* = переменные.

*Табл. 2.* Реализация источников углерода и образование кислоты. Рост (А) и образование кислоты (В) на синтетической I. и комплексной II. питательных средах с различными источниками углерода. (1) Обозначение штамма. (2) Глюкоза. (3) Сахароза. (4) Лактоза. (5) Крахмал. (6) Глицерин. (7) Метанол. (8) Контроль.

*Табл. 3.* Чувствительность к антибиотикам (диаметр зоны торможения в мм).

*Табл. 4.* Особенности редукции нитратов изолированными штаммами. (1) Обозначение штамма. (2) Комплексная питательная среда. (3) Синтетическая питательная среда + дрожжевая вытяжка. (4) Синтетическая питательная среда. (5) Анаэробное развитие без  $\text{NO}_3^-$  и  $\text{NO}_2^-$  А) Развитие: *jó* = хорошее, *köz* = среднее, *gy* = слабое; *ny* = в следах. В) Нитриты образовавшиеся спустя 14 дней. С) Нитраты оставшиеся через 14 дней. D) Нитриты оставшиеся через 14 дней.