

TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
I. <u>BEVEZETÉS</u>	1.
II. <u>IRODALMI ÁTTEKINTÉS</u>	7.
III. <u>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</u>	24.
1. Törzsek	24.
2. Tenyésztési eljárások és törzsfenntartás	25.
Mutánsok konzerválása	26.
Táptalajok	27.
Tenyésztés	28.
A minták kémiai összetételének meghatározása	30.
Enzimaktivitások mérése	31.
A fonalak citomorfológiai tanulmányozása	32.
Életciklus vizsgálata	36.
Enzimindukció tanulmányozása	37.
Az enzimindukció mértékének számítása és a tanulmányozásával nyert adatok értelmezése	39.
IV. <u>EREDMÉNYEK</u>	
IV.1. <u>STREPTOMYCES GRISEUS TÖRZSEK ÉLET- CIKLUSA FOLYÉKONY TÁPTALAJBAN</u>	41.
1. Növekedési görbék és a legfontosabb makromolekulák mennyiségének változásai	41.
A S. gr. 45H törzs növekedése	43.
A S. gr. 52-1 törzs növekedése	46.
2. Az életciklus során kimutatható enzimszintváltozások	48.
3. Az életciklus jellegzetes citológiai változásai	53.

IV.1.4. MEGBESZÉLÉS:I. AZ ÉLETCIKLUS ESEMÉNYEINEK MEGITÉLÉSE,AZ ÉLETCIKLUS SZAKASZAI

	58.
Vegetatív fázis	65.
Reproduktív fázis	72.
A Streptomycesek életciklusa és differenciálódásuk genetikai programja	76.
Az életciklus összefoglalása	81.

IV.2.1. AZ ENZIMINDUKCIÓ TANULMÁNYOZÁSA

1. A β -galaktozidáz indukciójának tanulmányozására alkalmas mutáns	84.
A táptalaj összetételének hatása az enzimszintre	85.
Indukálhatóság előtenyésztett mycéliumban	87.
Különböző laktóz koncentrációk hatása	89.
A tenyészet kora és indukálhatósága	90.
Különböző tápanyagok hatása	91.
2. A β -galaktozidáz indukált felszaporodásának érzékenysége a transzkripció és transláció gátlására	94.
3. Az indukció időbeli lefolyása és a mycélium növekedése	97.
4. A β -glükózidáz mennyiségének változása	99.

IV.2.2. MEGBESZÉLÉS:II. AZ ENZIMINDUKCIÓ TANULMÁNYOZÁSÁVALKAPOTT ADATOK ÉRTÉKELÉSE

V. <u>IRODALOMJEGYZÉK</u>	101.
	118.
<u>CIRILLBETÜS IRODALMI HIVATKOZÁSOK</u>	140.
VI. <u>TÉZISEK</u>	143.

I. BEVEZETÉS

A streptomycések felépítésüket és életciklusukat tekintve sajátos baktériumok. A kutatók érdeklődését leginkább azzal érdemelték ki, hogy életműködéseik közben igen változatos kémiai felépítésű és igen sokféle hatásmóddal jellemezhető antibiotikumot termelnek. A DOTE Gyógyszertani Intézetében Vályi-Nagy Tibor professzor vezetésével intenzív antibiotikum kutatás folyt. Ennek során világosan megmutatkozott, hogy az eredményes kutatáshoz és a megbízhatóbb antibiotikum termeléshez elengedhetetlen az elméleti megalapozás, néhány alapvető általános biológiai és a streptomycések biológiájával összefüggő elméleti kérdés tanulmányozása. Ebbe a munkába kapcsolódtam be a Szabó Gábor által szervezett biológiai munkacsoport, a későbbi Biológiai Intézet keretében. Egyik és legelső alapkérdésünk az volt, hogy mi a streptomycin szerepe a termelő törzs életében. A kérdés megközelítését egy streptomycint termelő *S. griseus* törzs és ennek streptomycint egyáltalán nem termelő mutánsa összehasonlításával kezdtük. A legfontosabb és legkonzekvensebb eltéréseket mélyfermentációs viszonyok között az életciklus alakulásában találtuk. Adataink a streptomycintermelés és a differenciálódás összefüggését mutatták. A két mutáns életciklusának alakulása egyben alkalmas modellnek mutatkozott néhány a

differentiálódással kapcsolatos általános biológiai probléma tanulmányozására is.

Az antibiotikumok iránti érdeklődés következtében, különösen az ötvenes és hatvanas években igen sok közlemény számolt be streptomycesek tanulmányozásáról. Erre az időre esik prokaryotákra jellemző ultrastrukturájuk felismerése, fejlődésük fénymikroszkópos eseményeinek leírása és genomjuk prokaryotákra jellemző alapvető sajátosságainak kimutatása, a részletesebb genetikai analízisük kezdete. Számos, fiziológiai és biokémiai sajátosságaikkal foglalkozó közlemény is megjelent. Ezek áttekintésének, általánosításának és rendszerbe foglalásának nehézségei is egyre inkább kiütköztek. A különböző laboratóriumokban más-más törzsekkel eltérő viszonyok között kapott eredmények összeépítése egyetlen vázlatba szinte lehetetlen. De egyetlen laboratóriumban ugyanazon kutató kezében is egy-egy kísérleti eredmény reprodukálhatósága is véletlen tényezőktől függően változó volt: egy-egy kísérleti szériában konzekvensen ismétlődött, más sorozatokban nem lehetett megismételni. Sok, streptomycesekkel foglalkozó kutató emiatt a streptomyceseket "genetikailag instabil" élőlényeknek kezdte tekinteni, melyekkel nem lehet reprodukálható kísérleteket végezni. Intézetünkben a változó viselkedést /az esetleges lizogénia és transzfekciók lehetőségét leszámítva/ a gén-expressziók regulációjának összetettebb voltával, ill.

több faktor iránti érzékenységgel próbáltuk magyarázni.

A génexpressziók szabályozásának két, egymással feltehetően többszörösen összefüggő szintjét kellett számításba vennünk: 1./ a differenciálódás keretében megvalósuló szabályozások, melyek az életciklus szakaszaitól függő változásokat eredményeznek és 2./ a más baktériumokban ismert és streptomycesekben is kimutatott enzimindukciókért, ill. repressziókért felelős szabályozási folyamatok.

A differenciálódás keretébe tartozó génexpresszióváltozások az életciklus egy-egy szakaszához rendelhetők. Az életciklus szakaszokra osztásának viszont nem alakult ki általánosan elfogadott módszere és elve. Vagy csak a citológiai változások vagy csak a szárazanyag, ill. fehérjék mennyiségének mérésére szűkített növekedési görbék alapján osztották szakaszokra a streptomycesek életciklusát is. Gyakran az egyszerűbb baktériumok növekedési ciklusának szakaszbeosztását az azonosság bizonyítása nélkül használták a streptomycesek életciklusának leírására. Ez félreértésekre adhat okot és zavart okoz a folyamatok megértésében.

A differenciálódás tanulmányozásában az jelentette a legfontosabb feladatokat, hogy az életciklus egyes szakaszait a tipikus citológiai és biokémiai jegyek egybevetésével jellemezzem és kidolgozzam az egyes fejlődési szakaszok felismerésére alkalmas kritériumokat.

Az irodalomban leginkább a citológiai változásokról találtam rendszerezett /vagy rendszerezhető/ leírásokat és adatokat. Ezek egybevetése a saját - részben más módszerekkel nyert, részben más szempontok szerint értékelt - eredményeimmal, viszonylag egyszerűbb feladatot jelentett. Nagymérékben megkönnyítette számomra az eredmények értelmezését az a tény, hogy egyik vizsgált törzsünk, a S. gr. 45H életciklusa teljesnek és zavartalan lefolyásúnak bizonyult, ezért a folyamat egésze áttekinthetővé vált.

A fejlődés biokémiai markereiről kevés adat található az irodalomban. Az erre vonatkozó közlemények legtöbbször is csak egy vagy néhány marker időbeli változásáról számol be és nem teszi lehetővé az egyes markerek és fejlődési szakaszok közötti viszony tisztázását. Ebben a vonatkozásban az alapvető összefüggések tisztázása során csak saját kísérleti eredményeimre támaszkodhattam.

A differenciálódás szabályozásának tanulmányozása során gyakran vetődtek fel olyan kérdések, melyek vizsgálata sajátos új módszerek alkalmazását követelte meg. A kapott adatok rendezése és értelmezése során is többször ütköztünk a kialakult vonatkoztatási rendszerek és megközelítési módok korlátaiba. Ilyenkor az összefüggések, számítási módok következetes végig-gondolására és újraértelmezésére volt szükség ahhoz, hogy megfelelő

változtatásokkal kísérleti eredményeink értelmezésére alkalmassá tegyük a kérdéses eljárást /pl. nehezen értelmezhető a szokásos módon a specifikus enzimaktivitás átmeneti visszaesése növekvő streptomyces tenyészetek indukciója közben/.

Az e munkában tárgyalt eredmények a saját erőfeszítések mellett a DOTE Biológiai Intézet kutatóinak kollektív teljesítményét is jelentik: más munkatársak rokon témában elért eredményeinek, problémáinak ismerete a kísérletek tervezésében, az alkotó szellemi légkör, a segítőkész kritika, szakmai viták, az eredmények egybevetése és közös gondolkodás az eredmények értékelésében jelentett nélkülözhetetlen segítséget. Mindenekelőtt köszönetemet fejezem ki dr. Szabó Gábor professzornak, aki tudományos munkám kezdetén tanítómesterem volt és később is tanácsaival, észrevételeivel, kritikájával, a kérdések megvitatásával munkámhoz a legtöbb segítséget adta. Köszönetemet fejezem ki dr. Valu Gabriellának, dr. Barabás Györgynek, dr. Szeszák Ferencnek, akikkel az elért eredményeket és a jelentkező problémákat megbeszélve együtt haladtunk előre. Dr. Szeszák Ferenccel a *S. griseus* 52-1 fonalainak heterogenitását közösen végzett kísérletekben kezdtük tanulmányozni. Dr. Erdei János *S. gr.* 45H-G20 mutánsok kapott eredményei az életciklusra vonatkozó kísérletek megtervezésében jelentettek segítséget. Dr. Schlamadinger József az *E. coli*

lac-operon indukciójának vizsgálata során szerzett tapasztalataival megkönnyítette az eredmények értékelését, a különböző rendszerek összehasonlítását. A S. gr. 52-L-301 mutánsban a β -galaktozidáz indukálhatóságát Kiss Antal egykori tudományos diákkörös munkatársammal végzett kísérleteinkben mutattuk ki. Az indukció jellemzésére Dr. Dán Anikó végezte el az első kísérleteket.

A differenciálódásra ható C-faktossal végzett kísérleteket dr. Békési István és Biró Sándor kollégáim közreműködésével, Csuha Katalin technikai segítségével végeztem. Az életciklus vizsgálatába dr. Vargha György fiatal munkatársam kapcsolódott be.

Egy-egy részprobléma megoldásában, bizonyos tájékozódó kísérletek elvégzésében nagy segítséget nyújtottak a mellettem dolgozó tudományos diákkörösök /akik közül a már említett Kiss Antal és Vargha György mellett Vekerdy Zsuzsa, Fekete István és Borhy Márta volt kiemelkedő/.

A kísérletek technikai kivitelezésében Kiss Ákosné nyújtott igen értékes segítséget. Az ábrákat Szekeres Árpád készítette. A színes fényképek kidolgozását Tóth Sándor és munkatársai készítették a DOTE Központi Foto Laboratóriumában.

Valamennyi felsorolt és fel nem sorolt munkatársam segítségét ezuton is köszönöm.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A Streptomycesek baktériumok, az Actinomycetes osztály Actinomycetales rendjének egyik legjelentősebb genusát alkotják. Sejtfelépítésüket, ultrastrukturájukat tekintve tipusos prokaryotáknak bizonyultak az elektronmikroszkópos vizsgálatokban /Stuart, 1959; Hagedorn, 1959; Glauert, Hopwood, 1959, 1960, 1961; Hopwood, Glauert, 1960; Bradley, Ritzi, 1968; Wildermuth, 1970, 1971; Williams et al., 1973, stb./. Sejtfaluk kémiai összetételét /Avery, Blank, 1954; Romano, Sohler, 1956; Romano, Nickerson, 1956; Sohler, Romano, Nickerson, 1958; Cummins, Harris, 1958/, rokonnak találták a Gram-positív baktériumokéval. A peptidoglycan-váz jelenlétére a lizozim iránti érzékenységük is utal /Sohler, Romano, Nickerson, 1958; Barabás, Szabó, 1964; Szeszák et al., 1967/. A sejtfal peptidoglycan-vázának bioszintézise is lényegében egyezik más baktériumokéval /Ghuysen, Shockman, 1973; Marquet et al., 1974/.

A streptomycesek genetikai sajátosságaikban is nagyon hasonlítanak más baktériumokhoz /Alikhanian et al., 1960; Sermonti et al., 1966; Hopwood, 1969; 1973; Alačević, 1976; Matselyukh, 1976; Coats, 1976/: kromoszómájuk a gén térképezések tanúsága szerint egyetlen gyűrűvé zárt DNS molekula. Más baktériumhoz hasonlóan, Streptomycesekben is található plasmidok /Hopwood, Wright, 1976; Sermonti, Puglia, 1976/, és a streptomyceseknek szin-

tén ismertek virulens és lizogén fágjaik /Welsh, 1956, 1959, 1969; Rautenstein, 1970; Lomovskaya et al. 1971/.

Összehasonlítva más baktériumokkal, feltűnik a Streptomycesek fonalas növekedése és a fonalak sajátos differenciálódása az életciklus során. Ugyancsak jellemző sajátossága a Streptomyceseknek a más baktériumoknál megszokott mértéket jóval meghaladó, igen széles határok között mozgó változékonyságuk. Waksman /1919/ már első munkáiban leírja az eltérő tenyésztési körülmények következtében fellépő variabilitást, mely egyetlen tenyészetből kiindulva is viszonylag rövid idő alatt olyan nagy különbségeket eredményezhet a morfológiai képen, élettani viselkedésben, hogy "gyakorlatlan megfigyelő hajlamos lenne külön rendszertani egységbe sorolni" az eltérő körülmények között nőtt testvér tenyészeteket. Az eltérő tenyésztési körülmények által kiváltott morfológiai, élettani és az antibiotikum termelésben megmutatózó változások egész sorát irták le azóta /pl. Kriss, 1937; Krassilnikov, 1950/. Különösen jelentősek az eltérő O_2 -ellátásból, ill. redox-viszonyokból adódó variációk /Volk, 1939; Kramli et al., 1954; Sukharevich et al. 1972; Hošťalek, Vaněk, 1973; Bormann, Christner, 1976/. A használt táptalajok és tenyésztési körülmények eltéréséből adódó különbségek mellett, ugyanazon tenyészetben is igen szembetűnő változások mennek végbe mind citológiai, mind biokémiai és élettani vonatkozásban /Dulaney, Perlman, 1947; Penau et al. 1954; Prokofyeva-

Belgovskaya, 1963; Langheinrich, Ring, 1976/. Ezek az időben egymás után fellépő változások a tenyészet fejlődésével, differenciálódásával kapcsolatosak.

Az eltérő tenyésztési feltételek között megfigyelhető és az élelciklus különböző szakaszaiban megjelenő különbségek mellett eltérések mutatkoznak egyetlen tenyészetben egy adott időpontban jelenlévő fonalak között is. Ezek a különbségek az élelciklus kezdeti szakaszaiban jelentéktelenek, a későbbi szakaszokban fokozódnak és jelentőssé válnak /Krassilnikov, 1970; Kalakoutskaa, Sokolov, 1961; Kalakoutskaa et al. 1970; Szeszák, Szabó, 1967/.

Az élelciklus során megjelenő, differenciálódással összefüggő változások a regulációs rendszerek működésének szembetűnő megnyilvánulását jelentik. Ezekről a jelenségek leírása szintjén viszonylag sok irodalmi adat található. A szabályozás génszinten működő alapmechanizmusáról, egy-egy enzim, ill. enzimsor indukciójáról vagy repressziójáról a jelenségek leírásának szintjén is kevés adatot közöltek még. A szabályozásuk molekuláris mechanizmusa még nem ismert.

Az enzimek indukálhatósága és a differenciálódás szabályozása közötti kölcsönös függésre mutatnak egyes, a *Bacillus* sporulációjára vonatkozó irodalmi adatok. Pl. *Bacillus megaterium*ban a β -galaktozidáz jellegzetes vegetatív enzim, melynek szintézise vegetatív sej-

tekben és a sporangiumokban galaktózzal indukálható, de nem indukálható a praespora genomban /Aubert, Millet, 1963/. Bacillus subtilisben a proteázok és az alkalikus foszfatáz jellegzetes sporulációs enzimek, a sporuláció megindulásával ismeretlen módon indukálódnak /Mandelstam, 1969; Balassa, 1971; Balassa et al. 1974; Coote, 1974; Schaeffer, 1969/. A sporuláció folyamata a bacillusokban egyes enzimek szintézisével párhuzamba állítható módon represszálható /Elmerich, Aubert, 1975/. A sporuláció egyes szakaszaiban jellegzetes változásokat sikerült kimutatni a sejtfehérjékben: miközben a vegetatív szakra jellemző fehérjék nagyrésze a sporuláció közben is változatlan intenzitással szintetizálódik, néhány fehérje szintézise a sporuláció egy meghatározott szakaszában félbeszakad és néhány új fehérje szintézise megindul /Linn, Losick, 1976/. Azaz a represszió és derepresszió néhány kulcs-fehérje esetében kimutathatóan részét képezi a differenciálódásnak. A kétféle szabályozás között az összefüggés részletei, mechanizmusa a bacillusok sporulációjában sem tisztázottak még.

Streptomycesekben több enzimről kimutatták, hogy a tenyészet fejlődésének egy-egy meghatározott szakaszában mennyiségük /specifikus aktivitásuk/ maximumot ér el, mely a más szakaszokban mért értékeket többszörösen meghaladja /Kollár, 1958; Bezborodov, 1967; Běhal et al. 1969; Běhal, Vaněk, 1970; Horváth, 1971; Erdei et al.

1972; Lowe, Westlake, 1972; Hošťalek, Vaněk, 1973; Hošťalek et al. 1974; Tzyperovich et al. 1975; Langheinrich, Ring, 1976; Kulayev et al. 1976; összefoglalásukat l. IV.1.5. táblázatban/. A tenyésztés során rendszeresen, ill. többször mért enzimek nagyobb része az életciklus szakaszaitól függő aktivitásváltozásokat mutatott. Az irodalomban nem találtunk arra adatot, hogy a differenciálódás folyamata és a megfigyelt aktivitásváltozások között milyen jellegű és mennyire szoros a kapcsolat. A változásokban közreműködő indukciós és repressziós mechanizmusok természetét sem tisztázták még az eddigi kutatások.

A rendelkezésünkre álló irodalmi adatok alapján munkahipotézisként feltételezhető, hogy az életciklus során jellegzetes, jól reprodukálható változásokat mutató enzimeknek legalább egy része eltérő mértékben indukálható vagy represszálható a különböző fejlődési szakaszokban, és a minimumoknak, ill. maximumoknak legalább egyrésze igen szorosan kapcsolódik ahhoz a differenciálódási szakhoz, amelyben megjelenik./Az esetek egyrésze feltehetően véletlen egybeesés, ill. más okokra vezethető vissza./ A fentiekből következik, hogy *Streptomyces* enzimek indukciójának, ill. repressziójának egyértelmű jellemzése megköveteli a vizsgálatokhoz használt tenyészetek differenciálódási állapotának /fejlődési szakaszának/ megbízható ismeretét. Másrészt a jelenlévő enzimek

mennyisége és ezek arányai is felhasználhatók az életciklus szakaszainak jellemzésére.

A Streptomycesek életciklusának szakaszokra osztása - különösen folyékony táptalajon növesztett tenyészetek vonatkozásában - csak részben megoldott feladat. Hiányznak az egymás után következő szakaszok lényegére és legjellemzőbb folyamataira vonatkozó kísérleti adatok, és általánosan elfogadott hipotézisek is.

Az asparogén mutánsoktól eltekintve a Streptomycesek életciklusa a spórák csirázásával kezdődik, több szakaszon át tartó növekedéssel folytatódik és újabb spóranevezék képződésével zárul. Az életciklussal foglalkozó kutatások közül igen sok az életciklus kezdetét jelentő csirázás megismerésére irányult /Prokofyeva-Belgovskaja, 1963; Kalakoutskii, Kirillova, 1965; Kalakoutskii et al. 1966, 1970; Kalakoutski, Pozharitskaja 1968, 1973; Dorokhova et al. 1969; Atwell, Cross, 1973; Nagatsu, Matsuyama, 1970; Hirsch, Ensigne, 1975, 1976 a, b, Cross Atwell, 1975; Kalakoutskii, Agre, 1976/. A "nyugvó" Streptomyces spórák szerkezetét, kémiai összetételét és biokémiai aktivitását is sokoldalúan jellemezték /az előzőkben felsoroltak mellett Erikson, 1947; Kalakoutskii, Sokolov, 1961; Kalakoutskii et al. 1969; Aslanian et al. 1971; Kalakoutskii, Duzha, 1967/.

A csirázáshoz más feltételek szükségesek, mint vegetatív növekedéshez /Kalakoutskii, Bobkova, 1966; Hirsch,

Ensign, 1976 a, b/. Szűkebb értelemben a csirázás a csira kibujását közvetlenül megelőző szakasz. Tágabb értelemben a csirázás az érett spórából a vegetatív fonal kialakulását jelenti.

A csirázást követő fejlődésről is meglehetősen sok és sokféle irodalmi adatot találunk. Az egyes szerzők eltérő körülmények között a fejlődés más-más vonatkozását vizsgálták. A közölt eredményeket azért is nehéz egységes képbe foglalni, mert gyakran nem dönthető el, hogy a különböző szerzők által kapott adatok ugyanazon folyamat, ill. fejlődési szakasz különböző aspektusát jelentik-e vagy maga a fejlődés is más eltérő körülmények között.

A csira kinövését követő első 18 órában /amíg technikailag lehetséges volt/ a fonalak növekedésének jellegzetességeit mikroszkópi felvételek alapján analizálták Schumann és Bergter /1976/. Azt találták, hogy a fonalak növekedése a fonalcsucs és a legközelebbi elágazás közötti szakaszra korlátozódik és közel egyenletes. A mycelium egészének növekedése új ágak megjelenése következtében közeledik az exponenciális jelleghez. Az új ágak képződésének valószínűségét arányosnak találták az ágnélküli fonalszakasz hosszával /az arányossági tényező táptalajtól függően változó/. A mért adatokból számított specifikus növekedési és elágazási rátákat az idő függvényében ábrázolva szabálytalan lefutású periódusos ingadozást mutat-

tak ki.

Az életciklus tanulmányozása során viszonylag korán feltűnt a kutatóknak, hogy a mycélium növekedése és fejlődése két fő fázisra osztható: egyik fázisra a viszonylag gyors növekedés, a másikra lassult növekedés vagy stagnálás mellett antibiotikumok termelése /és gyakran spóráképzés/ a jellemző /Carvajal, 1946, 1947; Erikson, 1947; Dulanay, Perlman, 1947; Prokofyeva-Belgovskaya, Orlova, 1955; Doskocil et al. 1958; Zajtseva, Orlova, 1959/. Mélyfermentációs tenyészetekben az első fejlődési fázist gyakran "trofofázisnak", a másodikat "idiofázisnak" vagy "produktív fázisnak" nevezik, az antibiotikumok termelésével foglalkozó kutatók. Mivel az első fázisban a növekedéshez szükséges új makromolekulák szintézise, a második fázisban az energiatermelés és bizonyos kismolekulák átépítése a legszembetűnőbb biokémiai tevékenység, szokás az első "anabolikus", a másodikat "katabolikus" fázisnak is nevezni /Hošťalek, Vaněk, 1973/.

Folyékony táptalajban nőtt tenyészetek fejlődését különböző szempontokból jellemezték:

Penau és mtsai /1954/ a mélyfermentációban kialakult fonal-, ill. ágtypusok, képződő spórák gondos megfigyelése, citológiai jellemzése alapján kísérelték meg az egymást követő fázisok leírását. Az átalakulások általuk vázolt sorozatai - ellentétben modelljükkel - a genetikailag

homogén törzsek tenyészetében nem szoktak egymással párhuzamosan megjelenni. Az általuk kidolgozott vázlat a gyakran egymást kizáró lehetséges fejlődési utak összefoglalásának tekinthető. A biokémiai történéseket, a növekedés dinamikáját nem vizsgálták.

Langheinrich és Ring /1976/ csak a növekedési görbe alapján próbálták szakaszokra osztani az életciklust: I. = "szokásos/?/lag", II. = "maximális ütemű növekedés" - ez sem írható le exponenciális egyenlettel - III. = "csökkenő sebességű növekedés" és IV. = "stacioner fázis". Nem vizsgálták, hogy a fiziológiai állapot, biokémiai aktivitások, stb. jellemezhető-e egyértelműen csak a növekedés sebessége alapján.

Hockenhuil /1960/ a streptomycin termelést vizsgálva az életciklust három szakaszra osztotta: 1. "növekedés": a fonalak növekedése intenzív, a tenyészet O_2 -igénye nagy, nincs, ill. jelentéktelen a streptomycin termelése; 2. "érés": a növekedés lelassult, ill. megállt, az O_2 -fogyasztás változatlanul nagy, az antibiotikum termelése intenzív; 3. "öregedés": a fonalak öregednek és autolizálnak, megszűnik az antibiotikum termelése, miközben az O_2 -fogyasztás csökken és egyre jelentéktelenebbé válik. - A fejlődési folyamatnak ez a szakaszokra osztása az eddig felsoroltaknál pontosabb és komplexebb: több jellemző empirikus adat egybevetésére támaszkodik. A leírás citológiai vonatkozásai elnagyoltak, ill. nagyon hézago-

sak és hiányzik - a közlés időpontja alapján érthetően - a jelenségek közötti ok-okozati összefüggések, szabályozó hatások magyarázatára vonatkozó hipotézis.

A Streptomycesek mélyfermentációs viszonyok között zajló életciklusáról - saját kutatásai és a helytálló korábbi irodalmi adatok alapján - Prokofyeva-Belgovskaya /1963/ adta a legsokoldalubb és legmegalapozottabb leírást. A fejlődési folyamatot a biokémiai és citológiai változások és a növekedés dinamikájának egybevetésével jellemezte és osztotta szakaszokra. Az életciklus két fő szakaszát mint "vegetatív" és "reproduktív" fázist írta le. A vegetatív fázisban "csirázási" és "intenzív növekedési" szakaszt, a reproduktív fázisban: "lassabb növekedési" és "sporulációs" /ill. "öregedési"/ szakaszt különböztetett meg. A vegetatív fázis jellegzetességei közül kiemelte - más szerzőkkel /Doskočil et al. 1958; Jeney, Szabó, 1963; Valu, Szabó, 1969/ összhangban - a mycélium nagy RNS-tartalmát, ami a fonalak citoplazmájának bazofil festődésében is tükröződik. A sok RNS jelenléte miatt metilzöld-pironin festéssel pirosra festődő fonalakban nem tűnik fel a hossz tengelyük mentén elnyúló, laza szerkezetű magállomány. Ez a fázis - a csirázási szakaszt leszámítva - fedi a Hockenhuill által "növekedés"-ként leírt életszakaszt.

A reproduktív fázisra Prokofyeva-Belgovskaya szerint az jellemző, hogy a lassult növekedésnek megfele-

lően lényegesen kevesebb a fonalak RNS-tartalma. A bazofilia, ill. a pironinnal való festhetőség különálló egymástól távolódó citoplazma-szakaszokra korlátozódik. A magok jól elkülönülnek a citoplazmától és mind metilzöld-pironin festéssel, mind Feulgen-reakcióval jól feltüntethetők. Megjelennek a spórákat képző reproduktív ágak. A mycélium növekedése egyre inkább lassul, majd megáll. A reproduktív ágakból kialakulnak a spórák, a többi fonal előregedve autolizál. Ez a fejlődési fázis foglalja magában a Hockenhull által "érés"-nek és "öregedés"-nek nevezett szakaszokat.

Prokofyeva-Belgovskaya feltételezése szerint az életciklus során megfigyelhető növekedésbeli, kémiai és citológiai változások a tápanyag-felhasználás és metabolitok kiválasztása következtében változó körülményekhez való alkalmazkodásként foghatók fel /Az adaptáció mechanizmusára nem közölt hipotézist/. Doskočil és mtsai /1958/ közlésével egyezően a szerves foszfátok elhasználásának jelentőségét emeli ki.

A sporuláció lefolyására vonatkozó vizsgálatokat felszini gombákkal végezték. Elsősorban a légmycélium fonalainak elektronmikroszkópos szerkezetét és a spórák elkülönülésének szerkezeti kérdéseit és a spóráképzés genetikáját tanulmányozták. Leírták a Streptomycesekre jellemző un. "exospóra"-képzést, mely alapvetően különbözik a Bacillusok un. "endospóra"-

képzésétől, inkább a gombák konidiumainak képzésére emlékeztet /Glauert, Hopwood, 1960, 1961; Rancourt, Lechevalier, 1964; Bradley, Ritzi, 1968; Wildermuth, Hopwood, 1970; Williams, Sharples, 1970; Kalakoutskii, Pozharisskaja, 1973; Hardisson, Manzanal, 1976; Kalakoutskii, Agre, 1976/.

Endospórák esetében a sporangium citoplazmájával körülvett praespórák védőburkainak kialakításában alapvető szerepet játszanak a sporangium enzimeit /Tipper, Linnet, 1976/. Ezzel ellentétben a streptomycesek exospórái a membránokkal, harántfalakkal szakaszokra oszló spóráképző fonalakból /felszíni tenyészetekben légmycéliumból/ úgy alakulnak ki, hogy nem érintkeznek más sejtek citoplazmájával. Következésképpen az exospórák saját genomjuk expressziója révén, saját citoplazmájuk biokémiai aktivitásával mintegy belülről épülnek át: alakítják ki viszonylagos védelmet nyújtó vastagabb falukat és jellemző belső szerkezetüket.

A Streptomycesek spórától spóráig tartó fejlődésével kapcsolatban sok a megválaszolatlan kérdés. Ezek közül egyik legfontosabb: van-e, ill. milyen fokú egyezés van a Streptomycesek életciklusának és az egyszerűbb baktériumok, bacillusok populációs ciklusának egyes szakaszai között? Milyen mélyrehatóak az egyes szakaszok közötti különbségek a sejtszerkezet, a biokémiai aktivitás, és a fiziológiai jellemzők vonatkozásá-

ban? A különbségek tartósak-e vagy a regulációs mechanizmusok viszonylag könnyen átállíthatók-e? Mennyire megalapozott az életciklus szakaszokra osztása és mi az egyes szakaszok valóban megkülönböztethető legjellemzőbb folyamat, ill. sajátossága. Játshatnak-e szerepet a fejlődésben az E. coliban megismert lac-operonhoz hasonló működésű szabályozások?

A Streptomycesek enzimeinek indukciójáról kevés irodalmi adatot találunk. Különösen kevés az olyan közlemények száma, amelyek az indukció feltételeivel, időbeli lefolyásával, kinetikájával foglalkoznak vagy az indukció lehetséges mechanizmusának kutatásáról számolnak be.

A legkorábban megismert indukálható Streptomyces enzim az α -mannozidáz, mely az igen kis biológiai aktivitású "streptomycin B"-t /azaz mannozido-streptomycint/ mannóz lehasításával sokkal hatásosabb "streptomycin A"-vá /szabad streptomycin/ alakítja át /Perlman, Longlykke, 1948; Hockenhuil et al. 1954/. Kollár /1958 a, b/ mutatta ki, hogy az enzim mennyisége megfelelő körülmények között fenil- α -mannozid, vagy metil- α -mannozid adagolását követően de novo fehérjeszintézisen keresztül növekszik, azaz indukálható a szintézise. Demain és mtsai tanulmányozták részletesebben az α -mannozidáz szintézisének induktorait és az indukció feltételeit /Inamine, Lago, Demain,

1969; Demain, Inamine, 1970/. 17^h-ás, mosott mycéliumot indukálva úgy találták, hogy az induktor adagolása után 6 órával indul meg az enzimszintézis és 18-20 óra után éri el mennyisége a maximumot, majd fokozatosan csökken. Nemcsak az induktor indítja meg az α -mannozidáz szintézisét : 0,1 % NH_4Cl + 0,15 % glükózzal pl. a mannánnal indukált szintnek közel egynegyedét elérő maximumot sikerült kapniuk. Az indukált minta enzimszintje csak mintegy négyszeresen múlja felül a kontrollt. Az indukciós-repressziós viszonyok mélyebb összefüggéseiről nem jelent meg további közlemény.

A valin és izoleucin bioszintézisét, ill. metabolizmusát *Streptomyces rimosus*-ban tanulmányozva Horváth és mtsai az aceto-hidroxisav szintetáz enzim szintézisében az enzim indukcióval rokon, közelebbről meg nem határozott mechanizmusu "fenotipusos derepressziót" figyeltek meg /Horváth, Gadó, Szentirmai, 1959, 1961, 1962; Szentirmai, Horváth, 1969; Horváth, 1971/. Folyékony, szintetikus friss táptalajba átoltott vegetatív fonalak növekedése során kb. 24 órával az átoltás után az enzim fehérjére számított/specifikus/aktivitása maximumot ért el. Fokozott enzimszint-emelkedést tudtak kiváltani α -ketovajsavval vagy treoninnal / α -ketovajsavvá alakul/. Az enzim szintézise 4 órával a treonin hozzáadása után kezdődött és chloramphenicolal kivédhetőnek bizonyult. Figyelemre méltó, hogy az indukáló kül-

sőleg adagolt anyagok hatása arra a szakaszra korlátozódik, amikor a leirt szabályozási események spontán is lejátszódnak.

Van Thoai és mtsai /1966/ *S. griseus*-ban az arginin lebontásának sajátos enzimsorát mutatták ki. Ugy találták, hogy a lebontásban közreműködő enzimek /arginin-dekarboxiláló-oxigenáz, γ -guanidino-butiramid-amido-hidroláz és γ -guanidino-vaajsav-ureohidroláz/ 48-72 órás, - a szerzők szerint "exponenciális" - tenyészetből nyert mosott mycéliumban indukálhatók 20 mM argininit tartalmazó táptalajban reszuszpendálva. Sem az indukált enzimszintézis kinetikájára, sem az indukció lehetséges magyarázatára vonatkozó adatokat nem közöltek.

Az actinomycinek bioszintézisét tanulmányozva *S. antibioticus*-ban a kromofor szintézisében közreműködő fenoxazinon szintetáz enzimről Jones és Weissbach /1970/ kimutatták, hogy szintézise 5-fluorouracil [= 5-FU] adagolásával fokozható. Az emelkedés chloramphenicollal kivédhetőnek bizonyult.

Tzyperovich és mtsai /1975/ a *S. griseus* proteázairól mutatták ki, hogy fehérjében gazdagabb táptalajon a tenyésztés 100-160. órája között nagyobb mennyiségben található.

Satoh és mtsai /1975/ a kanamycin acetiltranszferáizról közölték, hogy szintézise 4-O- /6-aminogliko-

zil/-2-desoxi-streptominnal indukálható és 6-O-/amino-glikozil/-2-dezoxistreptominnal, valamint kanamycinnel represszálható, Streptomyces kanamyceticus fonalakban.

Träger munkacsoportja S. hydrogenansban két steroiddehidrogenáz: a $17,20\beta$, 21 -trihidroxisteroid:NAD⁺ oxidoreduktáz /E.C. 1.1.1.53, = "20 β -hidroxisteroid dehidrogenáz"/ és a 17β -hidroxisteroid: NAD⁺ oxidoreduktáz EC. 1.1.1.63., = "tesztoszteron 17β -dehidrogenáz"/ indukcióját tanulmányozza. "Kvázi-exponenciális" tenyészeteket vizsgálnak. Jó induktornak találták a progesteront, a cortisolt és az 5α -dihidroxitesztoszteront. A tesztoszteron és az 5β -dihidrotesztoszteron gyenge induktornak bizonyultak /Wacker, Bauer, Träger, 1970/. Az S. hydrogenans citoplasmájában különböző, fehérjetermészetű steroidreceptorokat mutattak ki, melyek más-más steroidot kötnek specifikusan /Träger, 1973; Kurth, Träger, 1975/. Betz, Träger /1975 a, b/ rifamycin SV-vel gátolva az RNS szintézist 30 °C-on a kontrollban 3 percnek, az indukált tenyészetben 4 percnek találták a mRNS-nek átlagos féléletidejét. Tesztoszteronnal indukálva 20β -hidroxisteroid dehidrogenáz szintje 2-4 óra múlva kezd emelkedni, 11β , 21 -dihidroxi-pregnan-dionnal indukálva az enzimszintézis késedelem nélkül és nagy sebességgel megindult /Betz, Träger, 1975 a/. A tesztoszteron- 17β -dehidrogenáz indukcióját hasonló-nak találták a 20β -hidroxisteroid dehidrogenázéhoz /Markert, Träger, 1975/. Az indukció lefolyására vonat-

kozó megfigyeléseket immunológiai módszerekkel is megerősítették /Betz, Lotz, Träger, 1976/. Az átlagos m-RNS-féléletidő 65,7 sec-nak, indukált tenyészetben 84,6 sec-nak adódott /Betz, Schneider, Träger, 1977/.

A S. coelicolor hisztidin bioszintézisben közreműködő enzimeiről Sermonti és munkacsoportja olyan genetikai és biokémiai adatokat gyűjtöttek össze, melyek alapján feltételezhető, hogy termelésük szabályozása az operonelv szerint történik /Carere et al. 1973; Russi et al. 1973/.

Nincs, vagy alig található arra vonatkozó irodalmi adat, hogy van-e, s ha van, milyen az összefüggés a streptomycesekben az életciklus egyes szakaszai és az enzimindukciók, ill. a sejtciklus és az enzimindukciók között. Kevés az adat a streptomycesek enzimindukciójának mennyiségi vonatkozásairól és kinetikájáról is. Ezek alapján nem dönthető el, hogy az E. coli-típusu egyszerűbb baktériumoknál megismert génszintű szabályozási modell milyen megszorításokkal alkalmazható Streptomycesekre. /Az alkalmazhatóságot a genetikai hasonlóság alapján feltételezhetjük/. A jelen munka egyik célja volt ezen kérdések megválaszolásához is adatokat gyűjteni.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Törzsek

Kísérleteinkben a *Streptomyces griseus* két típusát alkalmaztuk /Szabó, Barabás, Vályi-Nagy, 1961; Vitális, Szabó, Vályi-Nagy, 1963/:

a/ S. griseus N^o52-1 - hasonlóan más, az iparban széleskörben felhasznált streptomycint termelő törzsekhez a Waksman munkacsoportja által izolált alapváltozat leszármazottja. Folyékony táptalajban sporulációja elakad, komplett szilárd táptalaj felszínén légmycélium és spóráképzése zavartalan /bár kevesebb spóra termelődik és nehezebben választhatók el egymástól és a felszíntől, mint a 45H törzs esetében/.

A genetikai heterogenitásból eredő zavar elkerülése céljából a törzs chlorpromazinos /50 µg:ml/ és ethidiumbromidos /5 µg:ml/szójas agar-táptalajon passzált és a később leírt módon tisztított, genetikailag stabil és homogénnek tekinthető 52-1/CP-60c jelű változatát használtuk, mely minden fontos jellegzetességében megfelel a kiindulási törzs korábban leírt sajátosságainak.

b/ S. griseus N^o45H

Az előző törzsből mustárnitrogén-kezeléssel nyert mutáns. Nem termel streptomycint, sporulációja folyékony táptalajban is bőséges és zavartalan.

c/ Laktózon jól növő mutánsok

A *S. griseus* No 52-1 szülő törzs szénforrásként csak laktózt tartalmazó szilárd táptalajon igen rövid ideig nagyon gyengén nő, majd 4-6 nap után elpusztul. A törzsből laktózon jól növő spontán mutánsokat csiráztatott, centrifugált, mosott spórák szuszpen-

ziójának egyedüli szénforrásként laktózt tartalmazó táptalajra szélesztésével szelektáltuk. 10 nap növekedés után izoláltuk a jól növő telepeket, majd háromszor egymásután 1 spórából növesztve telepeket szétválasztottuk a különböző mutánsokat, ill. tovább tisztítottuk azokat.

Indukálható β -galaktozidáz-szintézisű mutánsok

A laktázon jól növő, tisztított mutánsok közül válogattuk ki azokat a mutánsokat, melyek laktózt tartalmazó táptalajban több β -galaktozidázt termeltek, mint laktózmentes táptalajokban. Első közelítésként felszíni telepekben a Rutenburg és mtsai /1958/ által kidolgozott hisztokémiai eljárással hasonlítottuk össze az enzimaktivitást. Amennyiben különbséget láttunk, folyékony tenyészetben mértük a különbségeket. Előbb laktózos és laktózmentes táptalajon 24 óra tenyésztés után, végül előtenyésztett mycéliumot 4-6 óráig laktózzal indukálva. A kiválasztott indukálható mutánsok közül az 52-1 típusnak megfelelő növekedést és fejlődést mutatott a *S. griseus* 52-L-301a és 52-L-301.02 jelű mutáns.

2. Tenyésztési eljárások és törzsfenntartás

Spórák termelése: Szójás agar-táptalaj felszínén történő tenyésztéssel nyertünk spórákat kémcsövekben és 300 ml-es térfogatú Roux-palackokban, 27 °C-on. A spórák tömeges kialakulása és érése után /6-10 nap/ a papírvatta dugók szellőzését - olvasztott paraffinnal átítatva - megszüntettük /ezzel elejét vettük a további kiszáradásnak is/. A paraffinnal lezárt tenyészeteket 0-4 °C-on 6-10 hónapig tároltuk.

A mutánsok "konzerválása"

Egymást követő átoltások sorozatával nem sikerült mutánsainkat változatlan genotípussal fenntartanunk. Néhány átoltás után rendszerint észrevehetően változtak a figyelemmel kísért pontosabban jellemzett markertulajdonságok. Átoltás nélkül a paraffinnal lezárt felszíni tenyészetek hidegen való eltarthatósága korlátozott /6-10 hónap/.

"Agyag-konzerv" /= "homok-konzerv"/ készítése: A törzsek, mutánsok talajkivonattal elkevert mosott agyagporon való rövid növesztése utáni szárítását és szárazon, átoltás nélküli tárolását jelenti. A konzervált mutáns visszanyerésekor a konzervből közvetlenül kinőtt tenyészetet /"0. nemzedék"/ csak egyszer oltjuk át és kísérleteinkben az ebből származó 1. nemzedéket használjuk.

Spóra szuszpenzió készítése

Szójás agar-táptalaj felszínéről üveggyönggyel ráztuk le a spórákat, majd 0,1 % Tween-80-at tartalmazó fiziológiás NaCl oldatban szuszpendáltuk. Centrifugálás /1800 g, 15 perc/ után az üledéket reszuszpendáltuk 500 µg/ml lyozymot tartalmazó M/15, pH 7-es foszfát-pufferben. A reszuszpendálás után azonnal ultrahangoztuk a spóraszuszpenziót. Az ultrahang kezelést MSE, Ultrasonic Power Unit M60 készülékkel végeztük 1,5 A áramfelvétel mellett 3 x 20 másodpercig, 20-20 másodperc szünet közeiktatásával. Közben a szuszpenziót jégfürdőben hűtve védtük a túlzott felmelegedéstől. Az ultrahang kezelés után 30 percig 27 °C-on inkubálva emésztettük a lyozym-ra érzékeny képződményeket, fonalakat.

Az életciklus vizsgálatához az ultrahanggal végzett roncsolás és lyozymos emésztés után az ép, életképes spórákat ficoll /10 %/ + szacharóz /20 %/ rétegen átcentri-

fugálva /1800 g, 15 min/ választottuk el a törmeléktől. A felüluszók elöntése után a spórákat a Kalakoutszkii és mtsai /Kalakoutszkii, Bobkova, Krassilnikov, 1966; Kalakoutszkii, Pozharitskaja, 1968/ által a csirázás gátlása és az életképesség megőrzése szempontjából jónak talált foszfátot és glükózt tartalmazó 20 %-os NaCl oldatban szuszpendáltuk. A spóraszuszpenzió kinövését a tenyészetek növekedési dinamikáját, érzékenységét 6-8 hétig is változatlanoknak találtuk, ha a szuszpenziót 0-4 °C-on tároltuk.

Ha a spóraszuszpenziót mutánsok tisztítása céljából széleszteni kívántuk, steril körülmények között átszűrtük kolloidummal /0,4 %/ impregnált Schleichert-Schüll N^o 2040b jelű szűrőpapíron. Mikroszkóppal ellenőriztük, hogy a spóráknak legalább 97-99 %-a egyesével található-e. Amennyiben több, összetapadt spórát láttunk a szuszpenziót higitottuk és a szűrést megismételtük.

Táptalajok

Szójás táptalaj /Szabó, Barabás, Vályi-Nagy, 1961/: 20 g szójaliszt, 6 g "corn-steep", 3 g NaCl, 2 g CaCO₃, 20 g glükóz 1 liter csapvizben pH 7,4.

Szójás agar-táptalaj a felsorolt komponenseken túl még 20 g agar-agart is tartalmaz. Az összetevők oldása, ill. felszuszpendálása után pH-ja beállítva 7,8-8,0 közé 1 óra főzés Koch-fazékban. Sterilizés autoklávban 1,8 at, 30'.

Szűrt szójás táptalaj: a glükóz kivételével az anyagok 900 ml csapvizben felvéve pH 7,8-8,0 közé állítva 60 perc főzés Koch-fazékban. Az oldhatatlan maradékot kiszűrtük. Sterilizés autoklávban 1,8 at nyomáson 30'. Felhasználás előtt 9 rész táptalajhoz 1 rész steril 20 %-os glükózoldatot adunk.

Pufferezett szűrt szójas táptalaj: mint az előző, de a főzés után készített szűrlet felhígítva azonos térfogatu pH 7,4 M/15 foszfátpufferrel.

F-szintetikus táptalaj /Vitális, Szabó, Vályi-Nagy, 1963/ desztillált vízben oldva, ill. bemérve: 20,0 g C-forrás, 5,0 g szerves N-forrás; 2,0 g $\text{NH}_4 \text{NO}_3$; 1,2 g KH_2PO_4 ; 2,9 g K_2HPO_4 ; 4,0 g CaCO_3 ; 1,0 g NaCl ; 1,0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; $6,4 \cdot 10^{-3}$ g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; $1,1 \cdot 10^{-3}$ g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; $1,5 \cdot 10^{-3}$ g Mn Cl_2 literenként. A C- és szerves N-forrás kivételével a többi komponenst a végső térfogat 80 %-ba mértük be - az igen kis mennyiségeket törzsoldat formájában - majd 30' főzés után pH 7,4-re állítottuk és papíron kiszűrtük az oldhatatlan maradékot. Autoklávban sterilizáltuk. A C- és a szerves N-forrásként használt anyagokat a végtérfogat 10-10 %-ában külön-külön oldottuk és sterilizáltuk. Használat előtt 8 térfogatrész alapoldathoz 1 rész C-forrás oldatot és 1 rész N-forrás oldatot adtunk.

Ezen táptalaj szilárd változatába literenként 20 g agar-agart tettünk.

C-forrásként glicerint, keményítőt vagy más szénhidrátot: mono-, ill. diszacharidot /esetenként komplexebb összetételű tápanyagot/ tettünk. Tenyésztéskor 2 % mennyiséget, indukciós kísérletekben 10^{-5} M- 10^{-2} M közötti mennyiséget alkalmaztunk. A szerves N-forrásként 0,5 % töménységben használt anyagokat a kísérletek ismertetésekor írjuk le.

Tenyésztés

Folyékony táptalajban történő tenyésztés során ml-ként $1,5 \cdot 10^6$ spórával végeztük a leoltást. 1975-től kezdődően standardizált spóraszuszpenziót használtunk /ez előtt az időpont előtt csak részben tisztított spórákat

tuadtunk előállítani, és a számlált spórák nem mindenike volt élő/.

A tenyésztést 27°C -on végeztük 5 cm-es kitérésű, 250 ford/perc frekvenciájú körkörös sikrázógépen.

500 ml-es Erlenmeyer-lombikokban, 100 ml, 15 ml-es fiolákban 3 ml térfogatot rázattunk. A fiolákat azonos méretű /1 cm átm./ lyukkal ellátott műanyag kupak felhasználásával szűrőpapir koronggal zártuk le, ezzel biztosítottuk a teljesen azonos mértékű levegőzésüket /gázsterilizátorban, etilénoxiddal sterilizáltuk az így lezárt fiolákat/.

3. A tenyészetek feldolgozása

Biokémiai vizsgálatok céljára a mycéliumot 16-20 órás kor előttt centrifugálással, 16-20 órás kortól kezdve szüréssel különítettük el a tápfolyadéktól /Egyes táptalajokban, ha a csirázás nagyon elhuzódott ez a határ értelemszerűen későbbi időpontra tolódott át/.

A szürést teflonos kollodiummal /etilacetátban 0,4 % kollodium oldva, ebben ultrahanggal 0,15 % teflon-pasza szuszpendálva/ átitatott Macherey-Nagel "MN1674" jelű szűrőpapiron végeztük. Bizonyítottuk, hogy a szürés során a mycelium /fonáltömeg/ kvantitatively visszamarad ezen, és a simafelszínről maradéktalanul visszanyerhető. A szürés ezen módja rendkívül gyors /400-500 Hgmm nyomáskülönbség esetén 1 cm^2 -en 1 perc alatt 5-10 ml normál tenyészet szűrhető át/. A szürést szobahőn vákuummal végeztük.

A fiolákban rázatott 3 ml-es térfogatu tenyészetet egészében tekintettük mintának és azonos térfogatu mosófolyadékkal utánamosva kvantitatively egybegyűjtöttük a tenyészetet /a szürt mintákat 25 mm átmérőjű korongon/. A szűrőpapiron, ill. centrifugacsőben összegyűjtött mosott sejteket és a különválasztott tenyészlet -20°C -on tároltuk a biokémiai feldolgozásig. A tárolás során a mért mennyiségekben nem tapasztaltunk változást.

Feldolgozáskor a papirkorongokra /jégfürdőn/ 4 ml lehűtött "szuszpendáló puffert" mértünk és néhány erőteljes mozdulattal megrázva a hártyaszerűen egybeálló myceliumréteget leosztattuk a papírról. Szuszpendálás után 3x20 másodpercig - hűtés mellett - ultrahanggal roncsoltuk és homogenizáltuk. Az ultrahanggal szemben rezisztens fonalakat 1800 g-vel 15'-ig centrifugálva különítettük el az érzékeny fonalak nem ülepedő roncsolatától.

A minták kémiai összetételének meghatározása

Fehérjék mennyiségének mérése: a minták fehérjetartalmát azonos térfogatu /0,5 ml minta + 0,5 ml TCA/ 10 %-os triklórecetsav [= TCA/ hozzáadásával csptuk ki. Egy óra állás után centrifugáltuk, felülusztót elöntöttük, az üledéket 1 ml metanollal mostuk, majd újabb centrifugálás után 0,2 ml 1n NaOH-ot mértünk rá. 20-24 órán át 27 °C-on hagytuk oldódni, majd 1,8 ml deszt. H₂O-t hozzámértünk, centrifugáltuk és a felülusztó fehérje tartalmát Lowry et al./1951/ szerint határoztuk meg.

Nukleinsavak mennyiségének mérése:

A minták nukleinsavainak kivonását Valu és Szabó /1965/ vizsgálataiban szerzett tapasztalatok alapján végeztük, olyan kisebb módosításokat alkalmazva, melyek nagyszámu párhuzamos egyidejű feldolgozását és az eredmények összehasonlítását lehetővé tették: 0,5 ml minta fehérjéit és a nukleinsavait 0,5 ml 10 %-os perklórsav [= PCA/ hozzáadásával kicsaptuk. Ezt követően 60'-re jégfürdőbe állítva hagytuk kioldódni a kismolekulasulyu zavaró komponenseket. Centrifugálás után az üledéket 1 ml 1:1 arányu alkohol-éter keverékkel mostuk. Újabb centrifugálás után az üledékre 1,5 ml 1,5 n PCA-t mértünk, majd 70 °C-on 50 percen át extraháltuk azzal.

Centrifugálás után a felülusztó DNS-tartalmát a dezoxi-

ribóz mennyisége alapján a Richards /1974/ által kidolgozott érzékenyített difenilamin-reakció segítségével mértük. A felüluszóban lévő RNS mennyiségét pedig az aldopentóz-tartalom alapján Dische szerint floroglucin-reakcióval /Ashwell, 1966/ határoztuk meg. Hitelesítésre a DNS méréshez Reanal gyártmányu csirkevér DNS-t használtunk /az oldat tényleges DNS tartalmát Votavova et al. 1970 szerint a 260 nm-en mért extinkcióval számítottuk/. Az RNS méréshez Sigma gyártmányu "Ribonucleic Acid from Torula yeast, Type II."-t használtunk standardként. Az oldatok tényleges RNS-tartalmát a 260 nm-en mért extinkcióból számítottuk.

Enzimaktivitások mérése

β -galaktozidáz: Lederberg /1950/ módszerének módosított változatát alkalmaztuk. pH 6,5-ön és 27 °C-on - a streptomyces-enzim számára optimális viszonyok - inkubáltunk 0,5 ml mintát + 0,5 ml 1 mg/ml-es ONPG [= orto-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside]/ oldatot. 0,5-2,0 óra inkubálás után 0,5 ml 1M-os Na_2CO_3 -oldat hozzáadásával állítottuk le a bontást. 420 nm-en fotometráltuk a felszabdult o-nitrofenolt, és a mért extinkciókat 1 ml minta által bontott μmol ONPG-re számoltuk át. Az enzimaktivitás egységéül 1 óra alatt 1 μmol ONPG lebontását vettük.

β -glükozidáz: az előzőhöz hasonlóan mértük azzal az eltéréssel, hogy szubsztrátként PNPG [para-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside]-t használtunk és az inkubálást pH 7,2-ön végeztük.

Alkalikus foszfatáz: Garen és Levinthal /1960/ módszerének kisebb módosításával: 0,1 ml minta + 0,4 ml veronal-acetát pufferben oldott PNPP [p-Nitrophenylphosphate]/ oldat /összeöntés után pH = 8,0/ inkubálva 27 °C-on. A reakciót 0,1 ml tömény formalin hozzáadásával állítottuk le, majd 0,5 ml 1M Na_2CO_3 hozzáadásával lugosítottuk. 420

mm-en fotometrálunk, és a leolvasott értékeket μmol bontott szubsztrátra számítottuk át.

Proteázok: szubsztrátként házilag előállított "casein-Red"-et használtunk. Ezt kazeinből állítottuk elő, az NH_2 -csoportokhoz kovalensen Remazol Red B /Hoechst A.G., Frankfurt/ festéket kapcsoltunk Rinderknecht és mtsai /1967, 1968/ módszerének kisebb módosításával. A bontást pH 7,5-ön mértük, a kazeinből lehasított és ezáltal szulfoszalicilsavban oldhatóvá vált szines fragmentumok fotometriás meghatározása alapján /Békési, Biró, Vitális, 1977/. pH 7,5, M/15 foszfátpufferben 2 % "casein-red" szubsztrátot és a baktériumok elszaporodásából adódó álpozitív eredmények kivédésére 50 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol-t oldottunk. 0,1 ml proteázra vizsgálandó mintához 0,4 ml szubsztrát oldatot adtunk, majd 27 °C-on a várt aktivitástól függően 3-48^h-ig inkubáltuk. 0,5 ml 20 %-os szulfoszalicilsav hozzáadásával csaptuk ki a nem emésztett szubsztrátot. Centrifugálás után a felüluszó festéktartalmát 515 nm-en fotometriásan mértük enzimmentes vakkkal szemben.

A fonalak citomorfológiai tanulmányozása

Tájékozódás a legszembevetőbb citológiai sajátosságokról: nativ szuszpenzió fáziskontraszt, ill. anoptral-kontraszt mikroszkóppal /Reichert "Zetopán"/ történő vizsgálatával, olajimmerziós nagyításban.

Fixálás: glutaraldehyddel végeztük, figyelembe véve a Holt és Hiks /1961/, Sabatini és mtsai /1962/, Ryter és Kellenberger /1958/, valamint Fahmi és Drochmans /1965/ által közöltek. A kereskedelemben kapható 25 %-os glutardialdehyd oldatot /Merck, "für Elektronenmikroskopie" minőség/ aktiv szénnel /többször ismételt kezeléssel/ addig tisztítottuk, míg a kezdeti 3-4 körüli purifikációs index 0,2-0,1 értékre nem csökkent. A tisztított oldat koncentrációját a 280 nm-en mért extinkcióból számítottuk.

A fixáló összetétele: 6 % glutaraldehyd, 7,5 % szacharóz, 10^{-2} M CaCl_2 0,1 M-os pH 7,2 veronalacetát pufferben oldva.

1 ml hideg /0-4 °C/ fixálóhoz 0,5 ml tenyészetet mértünk és hidegen fixáltuk egy éjszakán át. A fixálás után a mintákat centrifugáltuk és 3x mostuk deszt. vizzel 30-30'-ig equilibrálva felszuszpendálás után. A kötött glurardialdehyd el nem reagált aldehid csoportjait nátriumborohidriddel redukálva /pH 7,5-ön 1s óra 0,5 %-os NaBH_4 / előztük meg az álpozitív mütermékek képződését Feulgen, ill. PAS-reakcióban.

Kenetek készítése: a mosott fixált mintákat kevés vízben szuszpendálva számozott tiszta tárgylemezre kentük vékony rétegben és levegőn hagytuk megszáradni.

Citológiai festések és citokémiai reakciók

Sejtfal- és citoplasma festés /általános tájékozá-
dás céljából/

Az irodalomban ajánlott eljárások közül Guttstein /1924/ tanninos és Hale /Bisset, Hale, 1953/ foszformolibdén-savas pácolásos eljárását találtuk alkalmazhatónak Streptomyces griseusra. Tapasztalataink /Vitális, Szabó, Vályi-Nagy, 1963/ alapján ezeket kombináltuk egymással és a sejtfalban lévő bivalens kationok /Szeszák és mtsai, 1967/ EDTA segítségével történő kioldásával. Egyetlen bázikus festék helyett különböző bázikus festékek keverékének igen hig oldatát alkalmaztuk, abból a tapasztalatból kiindulva, hogy a különböző basofil szerkezetekhez más-más komponens kötődik így. A festékkeverék összetételét többszöri módosítással /Vitális, Szabó, Vályi-Nagy, 1963: Szeszák et al. 1967; Vitális, Szabó, 1968/ javítottuk fokozva a fal és a citoplazma, ill. az eltérő típusu fonalak festődése közötti különbözőséget.

A festés kivitele: 30 perc 0,5 %-os, pH 7-es EDTA-oldatban 3 x 5 perc mosás deszt. vízben; 10 perc pácolás

20 % tannin + 4 % fenol oldatában; 4 x 5 perc alapos mosás deszt. vízben; 10 perc pácolás 5 %-os foszformolib-dénsav /narancssárga színű/ oldatában; 3 x 5 perc mosás deszt. vízben; 10 perc festés I. sz. festékoldatban /= 500 ml pH 3,5, 0,1M acetátpufferben oldva 100 mg alciánzöld + 10 mg Bismarck-barna/ 3 x 5 perc mosás; 10 perc festés II. sz. festékoldatban /= 100 ml metanol + 400 ml pH 5-ös, 0,1M citrát-foszfát pufferben oldva 25-25 mg toluidinkék, pironin, Janus-zöld és pararozanilin/; mosás szűrt csapvízzel, amíg a mosólé szintelen nem lesz. Öblítés deszt. vízzel, szárítás.

Mikroszkópos vizsgálat: olajimmerziós felülvilágító objektívvel és berendezéssel a keneten felülről áthaladó fény egy részét "Polyphos"-kondenzoron /Reichert, "Zetopan"/ visszatükröztetve. A sejtfal sötét-lila, sötétkék, a fiatal fonalak vöröses citoplazmájában erősen reflektáló szemcsék, pálcikák láthatók. Az idősebb fonalak citoplazmája okker színű, halvány. A reproduktív fonalak citoplazmája mély-vörös, faluk feltűnően jól kirajzolódik. A lizáló, ill. már kioldott plazmájú fonalak szétterülnek és halványan világítanak. A mikroszkópi képben a fonalak lokális kémiai és fizikai sajátosságai együttesen tükröződnek, szétválásztásuk a kép analízisében rendkívül nehéz feladatot jelentene. Ugyanakkor ez a vizsgálati mód lehetővé teszi az egyes fonaltípusok gyors és egyértelmű felismerését, megkülönböztetését.

Feulgen-reakció kivitelezése előtt a fixálóból visszamaradt vagy más eredetű, nem DNS reakciójából származó aldehid-csoportokat borohidrides redukcióval kiküszöböltük. A hidrolízist a klasszikus módszertől /Feulgen, Rosenbeck, 1924/ eltérően nem 60 °C-on 1 n HCl-val, hanem Hashim /1953/ szerint 42,5 %-os fosz-

forsavval szobahőn 50 percig végeztük /1 rész 85 %-os foszforsavhoz 1 rész deszt. vízben oldott 0,5 %-os natriumdodecilszulfátot adtunk/. Schiff-reagenssel 0-4 °C-on egy éjszakán át festettük. A reakció eredményét olajimmerziós nagyításban anoptralkontraszt berendezés segítségével 578 nm hullámhosszuságu fényrel megvilágítva vizsgáltuk /Reichert "Zetopan", pH 100/1,25 N^o6 objektív, Balzers B-40 típusu 578 nm áteresztési maximumu interferencia-szűrő/. Korábban bizonyítottuk, hogy halványan festett preparátumok kontrasztja - az anomális diszperziót kihasználva fáziskontraszt vagy interferenciakontraszt eljárással - a festésre specifikusan fokozható /Vitális, Hellio, 1969/. A színeződést adó elnyelési maximum közelében ui. a törésmutató hullámhossztól függő változása rendelkezés: a nagyobb hullámhosszak területén a törésmutatónak maximuma, a kisebbek területén minimuma van. A törésmutató maximuma és minimuma az extinkció maximumának fele értékét mutató hullámhosszakon mutatkozik /1. Bruhat, Kastler 1959. tankönyvét/. Feulgen és PAS reakció esetében a kontraszt fokozására 580 nm körüli hullámhosszuságu fény alkalmazása optimális.

Perjódsav-Schiff-reakció /= PAS/ perjódsavval reagáló poliszacharidok és glikoproteidek kimutatására Hotchkiss /1948/ eljárásának Barka /1959/ által módosított változatát használtuk. Az oxidáció előtt az előzetesen jelenlévő aldehid csoportokat borohidriddel redukáltuk. 0,8 %-os perjódsav-oldattal oxidáltunk. Alapos mosás után szobahőn 1 órán át festettünk Schiff-reagenssel. A mikroszkópi képet a Feulgen-reakcióval azonos módon anoptralkontraszt berendezéssel 578 nm hullámhosszuságu fényben vizsgáltuk.

Metilzöld-pironin festés: Kurnick /1950, 1955/ szerint tisztított metilzölddel és pironinnal végeztük. pH 4,4, 0,06M veronalacetát pufferben 0,3 % metilzöld

+ 0,5 % pironin oldatával 15' festés után 3 x 5 perc 3:1 arányu n-butanol: tercier-butanol elegyében differenciáltunk. A pironinnal festett RNS-tartalmu területeket 545 nm, a metilzölddel festődő magvakat 640 nm hullámhosszuságu közel monokromatikus fénnel megvilágítva azonosítottuk a mikroszkópi képen.

A β -galaktozidáz sejten belüli lokalizációját Rutenburg és mtsai /1958/ módszerével 6-brom-2-naftilgalaktozid szubsztráttal és utólagos azokapcsolással mutattuk ki. A kontrasztot ez esetben is anopralkontraszt eljárással fokoztuk.

Az életciklus vizsgálata

Pufferezett, szürt szójas táptalajban tenyésztettük a vizsgált törzseket. /összehasonlítás céljából szintetikus táptalajban is tenyésztettünk, de csak néhány időpontot vizsgáltunk így/. 4^h és 20^h közötti időpontokban végzett vizsgálatokhoz 500ml-es Erlenmeyerlombikban 100 ml táptalajban tenyésztettünk. 12^h-20^h-ás koru tenyészeteket 3 ml térfogatban fiolában is előállítottunk /az átfedés a kétféle tenyésztési mód hatásának összehasonlítását szolgálta/, későbbi életkorokban csak fiolában előállított tenyészeteket vizsgáltunk. 0^h-ás mintaként a spóraszuszpenziót, ill. a tenyésztéshez használt táptalajt vizsgáltuk, átszámítva a kapott értékeket a leoltáskor bemért mennyiségekre. A csirázás eseményeinek analizálását azzal tettük pontosabbá, hogy a 4^h és 8^h-ás korban vizsgált tenyészetek esetében 100 ml táptalajba kb. $3 \cdot 10^9$, 12^h-ás vizsgálatához kb. $2 \cdot 10^9$ spórát mértünk be, míg a későbbi időpontokban vizsgált tenyészeteket standard mennyiséggel: 1,5-1,8 millió spóra/ml táptalaj oltottuk le.

Kísérletsorozatonként az Erlenmeyer-lombikban rázatott tenyészetekből 3-3, a későbbi időpontokban vizs-

gált fiolában előállított tenyészetekből 4-4 párhuzamos indítottunk. A jelzett időpontokban az Erlenmeyer-lombikok tartalmából 2-2 ml-t kivettünk és fixáltuk mikroszkópos vizsgálatok céljából. A tenyészetek megmaradt hányadát /98-98 ml/ centrifugálással /Janetzki K 23 , 4000 g, 15 perc/ ülepitettük. Az üledéket 4 ml térfogatban szuszpendáltuk és a már leirt módon végeztük el a kémiai meghatározásokat és enzimméréseket.

A fiolákban előállított 4-4 párhuzamos tenyészetből egyet-egyet morfológiai vizsgálatok céljára használtunk. A megmaradó 3-3 párhuzamos tenyészet mycéliumát szűrővel különítettük el a tenyésztő folyadéktól. A feldolgozást a már leirt módon végeztük, a myceliumot 4 ml térfogatban szuszpendálva.

A kémiai meghatározások és enzimmérések eredményét 1 ml tenyészetre számítottuk át. - A párhuzamosak adatait átlagoltuk és kiszámítottuk a szórás értékét.

A főbb makromolekuláris komponensek, endocelluláris és exocelluláris enzimek relatív mennyiségét a szokástól eltérően nem szárazanyagra vagy fehérjére vonatkoztatva, hanem a sejtszámmal arányos DNS mennyiségre számítva fejeztük ki. Ezáltal a sejtek változásait hibebe tükröző, az egy genomhoz tartozó komponensek mennyiségével arányos értékeket nyertünk.

Az enzimindukció tanulmányozása

Az előtenyésztést F-szintetikus táptalajban végeztük 500 ml-es Erlenmeyer-lombikban, 100 ml táptalajban, 27 °C-on, 260 ford/perc frekvenciájú, 5 cm végkitérésű körkörös sikrázógépben. Az F-szintetikus alapoldathoz adott C- és szerves N-forrásokat, ill. azok mennyiségét a kísérletek leírásánál ismertetjük. 16-72 óra előtenyésztés után a myceliumot szűrővel nyertük ki, majd gyorsan ujrászuszpendáltuk az indukciós kísérletben

használt friss szintetikus táptalajban. Az egyben elkészített szuszpenziót a vizsgálandó sorozatoknak megfelelően szétosztottuk és egy-egy részhez még a további szétmérés előtt hozzáadtuk azt az anyagot, melynek hatását vizsgálni kívántuk. A vizsgált szénhidrátok Reanal gyártmányu a. lt. / = p.a. / minőségűek voltak, kivéve a melibiózt, amely Merck, für biochem. minőségű volt. Az izopropil- β -D-tiogalaktopiranosid / = IPTG / és metil- β -D-tiogalaktopiranozid / TMG / pedig Sigma gyártmányu volt.

A szuszpenziók sűrűségét több változat kipróbálása után az indukció kinetikájának analizisére szolgáló kísérletekben úgy standardizáltuk, hogy 10x-es higitás 500 nm hullámhosszon 0,100 extinkciót adjon.

A szuszpenziókat 3 ml-ként szétmértük fiolákba, melyeket standard módon, azonos levegőzést biztosító, szűrőpapirbetétes kupakkal fedtünk be. A mintavétel időpontjáig 27 °C-on 310 ford/perc frekvenciával, 25,4 mm végkiteréssel rázattuk a fiolákat körkörös sikrázógépen / New Brunswick, Incubator Shaker M25 típus /. Az előte nyészet szűrésének kezdetétől az újra szuszpendálás megtörténtéig legfeljebb 10 perc, az ujjabb rázatás megindításáig maximum 30 perc telt el.

A mintákban folyó fehérjeszintézist a mintavétel pillanatában bemért 50 μ l mennyiségű 5 mg/ml töménységű chloramphenicol-oldat hozzáadásával állítottuk le, majd a mintákat jégfürdőben lehűtöttük és szűréssel nyertük ki a minták mycéliumát. A mycélium feldolgozása a már korábban leirt módon történt. Mértük a β -galaktozidáz és a proteintartalom változását minden esetben, és a DNS mennyiségét, valamint a β -glükozidáz aktivitását is a kísérletek egy részében.

Az enzimindukció mértékének számítása és az
indukció vizsgálata során nyert adatok értelmezése

A baktériumok génszintű szabályozásának legrész-
letesebben megismert példáját az *E. coli* lac-operont
/Jacob, Monod, 1961; Monod, Jacob, 1961; Gilbert,
Müller-Hill, 1966, 1967, 1970; Riggs et al. 1970. a,b.
Bourgeois et al. 1970; Bourgeois, 1971; Jobe et al.
1972 a, 1972 b., Zubay, Chambers, 1969; Zubay et al.
1970; De Crombrughe et al. 1971. a, 1971. b/ tekintet-
tem viszonyítási alapnak.

Az *E. coli* lac-operon indukciójának mennyiségi
jellemzésére kidolgozott számítások /Pardee, Prestidge,
1961; Boezi, Cowie, 1961; Clark, Marr, 1964; Sadler,
Novick, 1965/ alkalmazása a *Streptomyces griseus* β -ga-
laktozidás indukciójára ellentmondásokhoz vezetett. Az
indukció mértékét streptomycesekben - különösen a vege-
tativ növekedési szakasz után - más fehérjék szintézisé-
től elkülönítve kell vizsgálnunk, hogy az ellentmondáso-
kat elkerüljük. Ezért a rendelkezésre álló irodalmi ada-
tok alapján /a felsoroltakon túl Oshima et al. 1974;
Parks et al. 1971; Nakanishi et al. 1973; Hua, Markovitz,
1974; Monod, Wyman, Changeux, 1965/ újra végig gondoltam
a represszor-operátor, ill. a represszor-induktor kapcso-
lódás kinetikáját, következményeit, az indukció molekulá-
ris mechanizmusát. Elemeztem a transzkripció során képző-
dő labilis messenger-RNS szintézisének, bomlásának sebes-

sége és az enzimszint változása közötti összefüggéseket az irodalmi adatok alapján /Herzenberg, 1959; Kepes, 1963, 1969; Kaempfer, Magasanik, 1967; Kennel, Bicknell, 1973/.

Az indukció mértékét annak valószínűségével definiáltam, hogy a vizsgált operon operátor szakaszán a transzkripciónak nincs operátorra-specifikus akadály, azaz nem kötődik hozzá represszor. Ez esetben a m-RNS szintézisének sebessége

$$\frac{dm_e}{dt} = i \cdot a \cdot D - \mu m_e \quad /1./$$

/ m_e = az indukált enzim messenger-RNSe; i = indukció, a = a transzkripció sebességét befolyásoló nem specifikus hatásokból adódó tényező; D = a DNS mennyisége, arányos a genomok számával; μ = a mRNS bomlási állandója/. Az enzimszint változásának sebessége:

$$\frac{dE}{dt} = \mathcal{K}_1 m_e - \mathcal{K}_2 E \quad /2./$$

/ E = az enzim mennyisége; \mathcal{K}_1 = a transzláció sebességével arányos állandó; \mathcal{K}_2 = a kész enzim bontásának, ill. inaktiválásának állandója/.

Az 1. és 2. egyenletekből kifejeztem az indukció mértékét

$$\mathcal{K}_1 a \cdot i = \frac{1}{D} \left[\frac{d^2 E}{dt^2} + (\mathcal{K}_2 + \mu) \frac{dE}{dt} + \mathcal{K}_2 \mu E \right] \quad /3./$$

Ez a kifejezés módot nyújt az indukció mértékének számítására, ill. összehasonlítására akkor is, ha a tenyészet nem exponenciálisan növekszik, ill. más fehérjék szintézise nagymértékben változik és nem jelentalkalmas viszonyítási alapot.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. STREPTOMYCES GRISEUS TÖRZSEK ÉLET- CIKLUSA FOLYÉKONY TÁPTALAJBAN

IV.1.1. Növekedési görbék és a legfontosabb makromolekulák mennyiségének válto- zásai a tenyésztés során

Az egyszerűbb baktériumok viselkedése a tenyésztés során a növekedési görbével egyértelműen jellemezhető és az életciklus szakaszokra osztható.

Amennyiben a baktériumok megoszlása a szuszpenzióban homogén, a baktériumok alakja, nagysága és bennük a szárazanyagok koncentrációja nem változik a tenyészet szárazanyagtartalma egyértelműen meghatározható a fényszórás, ill. az ebből adódó optikai denzitás méréséből. Rendszerint 400-700 nm között választott hullámhosszon mért optikai denzitással egyenesen arányosnak tekintik a szárazanyag mennyiségét /pl. Goodwin, 1969; Spudich, Kornberg, 1968 és sokan mások/. Néha Streptomycesek növekedésének jellemzésére is használják ezt az egyszerű eljárást /pl. Langheinrich, Ring, 1976/ anélkül, hogy az arányosság fennállását minden időpontra bizonyítanák.

Streptomyces griseus törzseinek növekedésének jellemzésére nem találtuk alkalmasnak az optikai denzitás

mérését. A S. gr. N^o 45H törzsünk mycéliuma pl. nagyon inhomogén módon, "göbök" formájában növekszik és igen gyorsan ülepszik le. A S. gr. N^o 52-1 törzs és a belőle izolált mutánsok növekedése elég homogén, de csak igen szűk határok között találtuk arányosnak az optikai denzitást és a sejttömeget akkor is, ha azonos koru mycéliumok szuszpenzióját vizsgáltuk. A szárazanyag direkt mérése is meglehetősen pontatlan /az anyag többé-kevésbé nedvszívó tulajdonsága miatt/ és nagyszámu mintában pontos mérések végzésére nem eléggé gyors és megbízható.

A sejtek citoplazma-tömegének változását egyértelműen, egyszerűen és megbízhatóan jellemezni tudtuk nagy mintaszám esetén is a fehérjetartalom mérésével. A fehérjék mennyisége sokkal inkább a működésre képes citoplazma-tömegeggyel arányos, mint pl. a szárazanyag, mely az inaktív polimereket /pl. sejtfal poliszacharidok/ is tartalmazza.

A fonalas növekedés miatt szélesztéssel meghatározhatatlan sejtszám helyett a genomok számával arányos DNS-mennyiséget mértük.

A növekedés kémiai változásokkal történő leírása mellett vizsgáltuk a tenyésztés során fellépő citológiai változásokat is. Az életciklus szakaszokra osztását és az egyes szakaszok jellemzését a kétféle módszertani megközelítéssel kapott eredmények egybevetésével végeztük.

A növekedési görbék lefutása, a tenyészetek biokémiai változásai a tenyésztés során függenek a törzstől, táptalaj összetételétől, tenyésztési körülményektől /különösen a hőmérséklettől és az O_2 -ellátás egyenletességétől, mértékétől/, a leoltásnál alkalmazott spórasűrűségtől és a leoltott spórák fiziológiai állapotától.

A *S. griseus* N^o 45 H törzs növekedése

Egy spóra $1,3 \cdot 10^{-14}$ g DNS-t, $2,6 \cdot 10^{-14}$ g RNS-t és kb. $8,3 \cdot 10^{-14}$ g fehérjét tartalmaz /a spórák nagysága nem teljesen egyforma/. A csirázás a leoltást követően 8-10 óra múlva indul meg. 12-24 óras kor között a tenyészet fehérje és RNS tartalma igen intenzíven emelkedik /a fehérje mennyisége 60-80 percenként duplájára nő/. A DNS mennyiségének növekedése elmarad az RNS és fehérje mögött, bár szintén jelentős /kb. 100 percenként duplázódik/. A fő makromolekuláris komponensek eltérő ütemű szintézise azt eredményezi, hogy a spórára jellemző 2:1 RNS:DNS-arány a 24 órás vegetatív myceliumban kb. 16:1 arányig növekszik. A fehérje : DNS arány ugyanezen idő alatt 7,5:1 értékről 35:1 értékre emelkedik. Az RNS:DNS arány csúcserkéke korábbi időpontban van, mint a fehérje:DNS-arányé. 24- és 48-órás kor között a fehérjetartalom nem csupán stagnál, hanem vissza is esik, minimumot megy át. A minimumot újabb, az első növekedési periódusnál sokkal kisebb sebességgel újabb emelkedés követi. Az RNS tartalom is csúcserkéken túlhaladva fokozatosan

csökken. A csökkenés 48-72 órás kor között lassabb, 72-96 órás kor között meggyorsul.

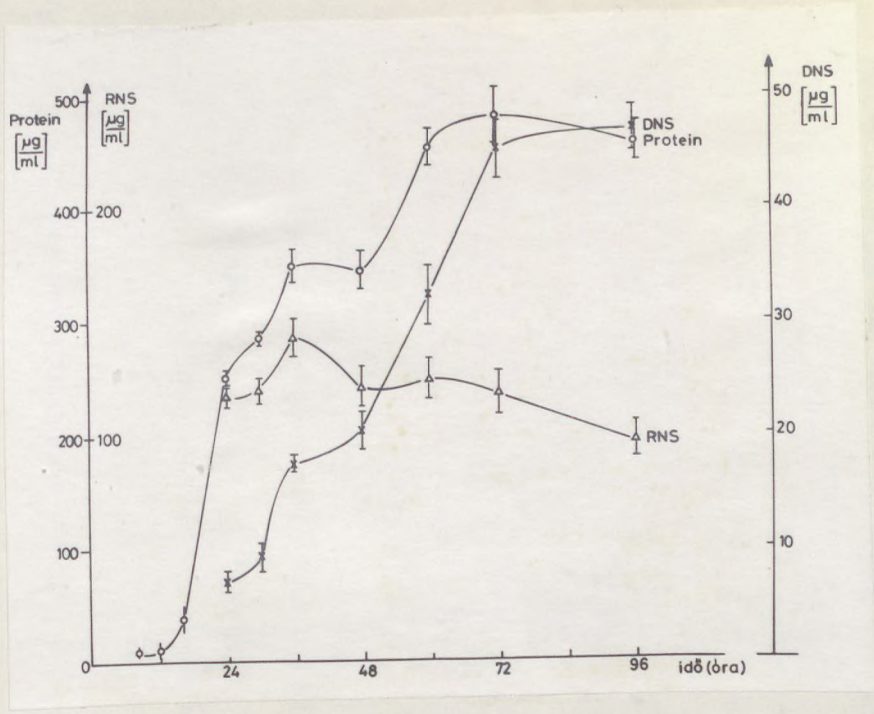
A DNS mennyisége 24- és 30-órás kor között stagnál vagy igen lassan emelkedik. 30-36 órás kor között ismét emelkedni kezd és emelkedése 72 óráskorig folytatódik. Ez alatt az idő alatt a DNS mennyisége lényegesen nagyobb, a fehérjék mennyisége kisebb mértékben nő, miközben az RNS mennyisége kissé csökken / IV.1.1. ábra /.

Előzetes kísérleteinkben kimutattuk, hogy a spórák és a spóráképződő reproduktív ágak /ha fejlődésük megfelelően előrehaladt már/ nem roncsolódnak a vegetatív sejteket feltáró 1 perces ultrahang kezelés hatására /akár 30 perces kezelést is károsodás nélkül elviselnek/. A *S. griseus* N^o 45H tenyészetében az ultrahang-rezisztens alakok mennyisége 36-48 órás kor előtt igen alacsony, 48 órás kortól kezd emelkedni és 72 óráskorban éri el mennyiségük a legmagasabb értéket / IV.1.2. ábra és IV.1.1.-IV.1.4. táblázat /. Viszonyaink között 72 óráskorban a DNS-nek több mint 26, a fehérjének 13-14 és a DNS-nek kb. 28 %-a található az ultrahanggal szemben ellenálló, reproduktív alakokban. Az UH-rezisztens ágakban a fehérje:DNS arány alacsonyabb az UH-szenzitív frakcióban és a nem frakcionáltan vizsgált myceliumban talált értéknél, 72 óráskorban az UH-rezisztens fonalakban a spó-

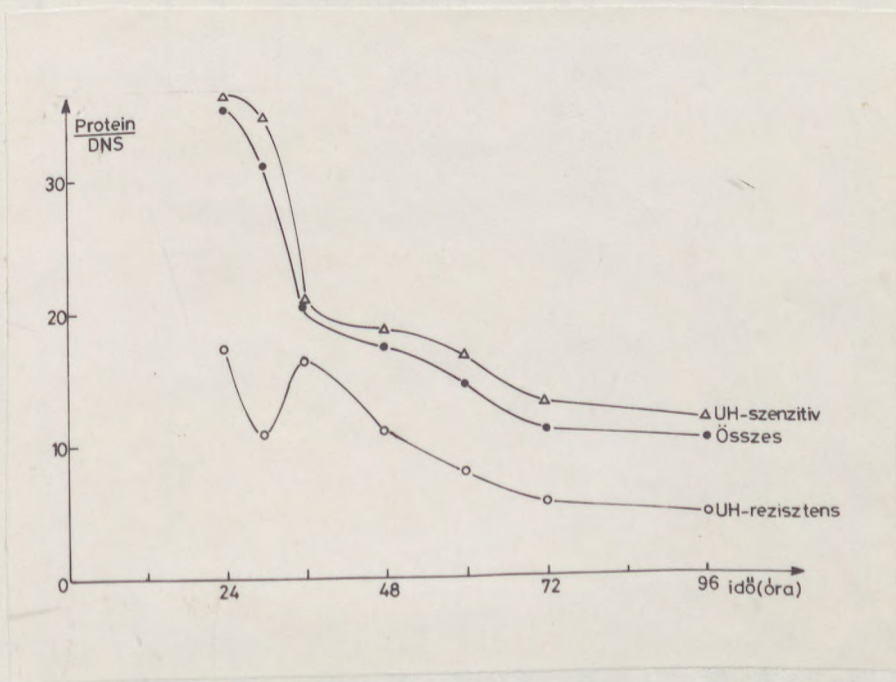
rákra jellemzőhöz igen hasonló protein:DNS arány alakul ki. Ezzel párhuzamosan a protein:DNS arány az UH-érzékeny fonalakban is jelentősen csökken. Az RNS:DNS arány az ultrahang-érzékeny és rezisztens fonalakban közel azonosan alakul. A mycélium kinyerésére alkalmazott szűrés során a tenyésztés 60. órájától kezdődően szűrődik át kevés, centrifugálással kinyerhető szabad spóra és törmelék. DNS-re számítva ennek mennyisége 60- és 72^h-ás korban kb. 1 %, 96 órás korban kb. 2 %. 60 és 72 órás korban benne a fehérje:DNS aránya a spórára jellemző, 96 órás korban annak fele.

Az egyes csucok magasságában és kialakulásának időpontjában mutatkozó ingadozásoktól eltekintve /melyek a már felsorolt tényezőkből adódnak/ ez a növekedési görbe a spóraképzéssel záruló, "teljes életciklusu" streptomyces törzsekre jellemző.

Az O₂-ellátás javítása esetén /pl. a 15 ml-es fio-
la helyett 500 ml-es Erlenmeyer-lombikban tenyésztve
100 ml táptalajban, azonos rázással/ a vegetatív növe-
kedési szak és a differenciálódással kapcsolatos má-
sodnövekedés közötti fehérjecsökkenés még kifejezettebb
/ IV.1.8. ábra /.



IV.1.1. ábra: *S. griseus* N^o 45H törzs szűrt szójas táptalajon nőtt tenyészetében a protein, DNS és RNS számított mennyisége µg/ml-ben a tenyésztési idő függvényében



IV.1.2.a. ábra: A protein: DNS arány változása *S. gr* 45H tenyészetében, az összmycéliumban és külön-külön annak UH-érzékeny, ill. UH rezisztens frakciójában

IV.1.1. I. táblázat

Streptomyces griseus No. 45H tenyészetek DNS-tartalma és annak megoszlása a különböző típusu fonalakban a tenyésztési idő függvényében

Tenyészet kora /óra/	DNS $\mu\text{g/ml}$							
	Össz.	%	UH szenz.	%	UH rez.	%	Spóra	%
24	7,14	100	6,77	94,8	0,37	5,2	0	-
30	9,28	100	7,85	84,6	1,43	15,4	0	-
36	17,41	100	16,69	95,8	0,72	4,2	0	-
48	20,21	100	17,08	84,5	3,13	15,5	0	-
60	32,21	100	23,90	74,2	7,87	24,4	0,44	1,4
72	45,21	100	32,60	72,1	12,11	26,8	0,50	1,1
96	46,46	100	35,80	77,1	9,73	20,9	0,93	2,0

"Spóra" = zömmel magányos spórákat tartalmazó mycelium-frakció, mely az MN1640 jelű, kolloidumozott szűrőpapíron átszűrődik

IV.1.2. táblázat

Streptomyces griseus No. 45H tenyészetek RNS-tartalma és annak megoszlása a különböző típusú fonalakban a tenyésztési idő függvényében

Tenyészet kora /óra/	RNS $\mu\text{g/ml}$						Spóra %
	Össz.	%	UH szenz.	%	UH rez.	%	
24	116,2	100	111,2	95,7	5,0	4,3	0
30	119,4	100	110,5	92,5	8,9	7,5	0
36	143,2	100	136,4	95,3	6,8	4,7	0
48	120,1	100	100,7	83,8	19,4	16,2	0
60	124,4	100	94,5	75,9	29,9	24,1	?
72	118,0	100	84,6	71,7	33,4	28,3	?
96	96,7	100	59,3	61,3	37,4	38,7	?

"Spóra" = zömmel magányos spórákat tartalmazó mycelium-frakció, mely az MN1640 jelű kolloidumozott szűrőpapíron átszűrődik

. = kisebb mennyiség, mint az alkalmazott módszerrel mérhető

IV.1.3. táblázat

Streptomyces griseus No. 45H tenyészetek protein-tartalma és annak megoszlása a különböző típusu fonalakban a tenyésztési idő függvényében

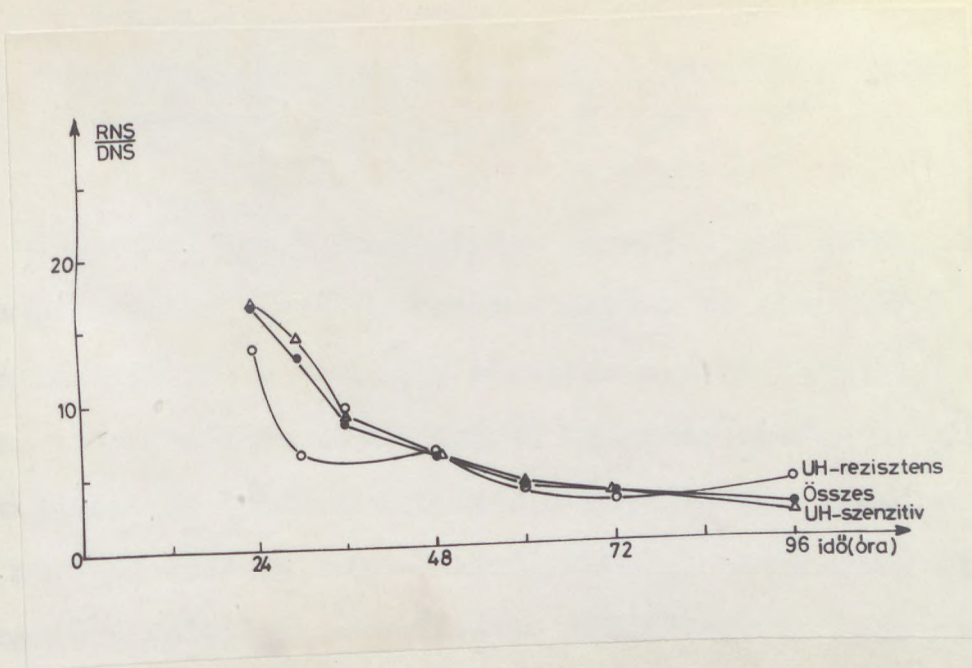
Tenyészet kora /óra/	Protein µg/ml						
	Össz.	%	UH szenz.	%	UH rez.	%	Spóra
24	250,3	100	244,0	97,5	6,3	2,5	0
30	285,1	100	270,0	94,7	15,1	5,3	0
36	349,0	100	337,5	96,7	11,5	3,3	0
48	344,0	100	310,1	90,1	33,9	9,9	0
60	454,5	100	390,5	85,9	61,4	13,5	2,6
72	482,9	100	414,6	85,9	65,2	13,5	3,1
96	458,5	100	412,2	89,9	43,0	9,4	3,2

"Spóra" = zömmel magányos spórákat tartalmazó mycelium-frakció, mely az MN1640 jelű, kolloidiumozott szűrőpapíron átszűrődik

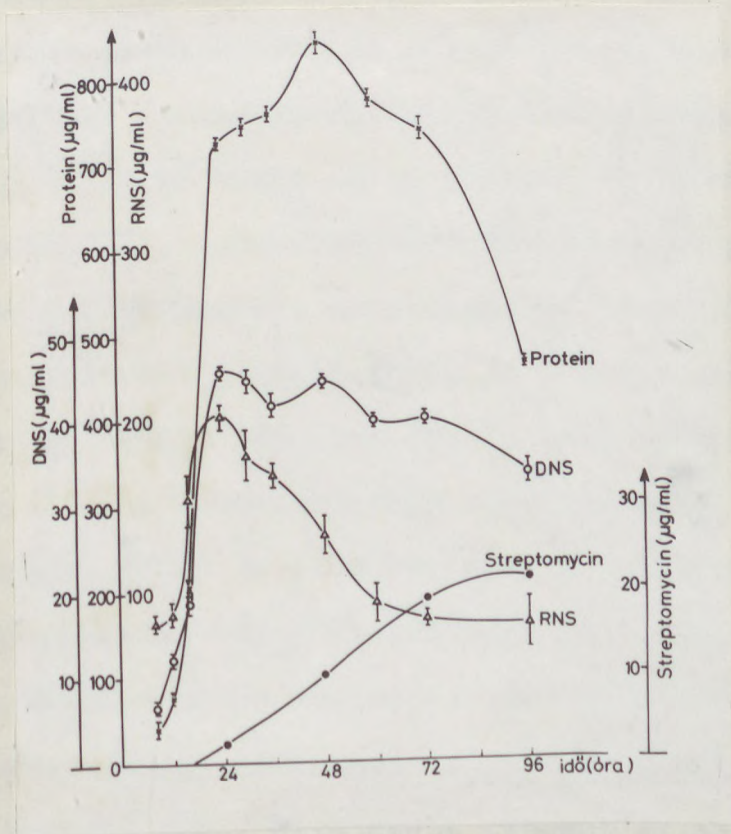
IV.1.4. táblázat

Streptomyces griseus N^o 45H fonalakban a cytoplasma relatív RNS-tartalmának és a bazofiliának változása, az életrciklus függvényében /folyékony tenyészet szűrt szójás táptalajban/

Tenyészet kora /óra/	RNS		DNS + RNS		UH rez.	UH rez.
	$\frac{\text{RNS}}{\text{Protein}}$	= a cytoplasma relatív RNS tartalma	$\frac{\text{DNS + RNS}}{\text{Protein}}$	= "Bazofilia"		
	Össz.	UH szenz.	Össz.	UH szenz.	UH rez.	UH rez.
24	0,47	0,46	0,49	0,48	0,85	
30	0,42	0,41	0,45	0,44	0,68	
36	0,41	0,40	0,46	0,45	0,66	
48	0,35	0,32	0,41	0,38	0,66	
60	0,27	0,24	0,34	0,30	0,62	
72	0,24	0,20	0,34	0,28	0,70	
96	0,21	0,14	0,31	0,23	1,10	



IV.1.2.b. ábra: S. gr. 45H tenyésztetben az RNS:DNS arány változásai az öszmycéliumban és annak UH-érzékeny és rezisztens frakcióiban



IV.1.3. ábra: S. gr. 52-1 szórt szójás táptalajban tenyésztve. A protein, DNS, RNS és streptomycin mennyiségének alakulása a tenyésztés során

A streptomyces griseus N^o 52-1 törzs növekedési
görbéje

A törzs spórái a leoltást követő 4 óra elteltével kezdenek csirázni, 6 órás korra a spórák 80 %-án már növekvő csira látható, 8 óra után a csirázás meghaladja a 90 %-ot, a csirázására képes spórák már feltehetően mind kicsiráztak /a további csirázás megfigyelését akadályozza a növekvő fonalak hálózata/. A fonalak növekedése exponenciálisan felgyorsul. A fehérje mennyisége 24 órás korra a 12 órás értéknek kb. 10-szerese /a spórával bevittnek több mint 2700-szorosa/. A leoltáskor bevitt mennyiséget a leoltott spórák számából és egy átlagos spórára jellemző mennyiségből számítottuk. Az RNS mennyisége 16 és 24 órás kor között éri el maximumát, utána fokozatosan kb. felére csökken 60-72 órás korra. A csucsérték kb. 2700-2800-szorosa a leoltáskor spórákban lévő RNS mennyiségnek. A DNS mennyiségnek növekedésének jellege exponenciális a csirázás idejétől kb. 24 órás korig /500 ml-es lombikban ez a szakasz már 16-20 órás kor között befejeződik/. Ez alatt az idő alatt kb. 1700-szorosára nő a spórákkal bevitt mennyiségnek. 24 és 36 órás kor között a DNS mennyiség növekedése megáll, kissé /legfeljebb 8-10 %-kal/ csökken, majd kis mértékű újabb emelkedés után kisebb ingadozásokkal mérsékelt süllyedést mutat / IV.1.3. ábra /.

Az RNS:DNS arány kifejezett csucsot ér el a fonalak legintenzívebb növekedésének időpontjában kb. 16 órás tenyészetben. 24 órás korban az arány már jelen-

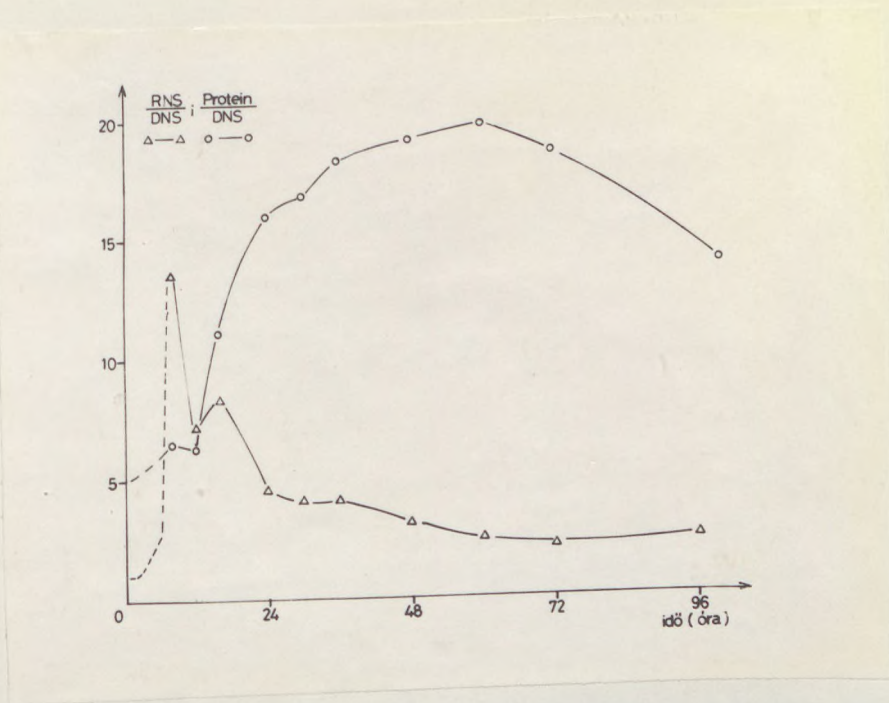
tősen alacsonyabb, kb. 36 órás korig stagnál, majd tovább csökken / IV.1.4. ábra /.

A fehérje:DNS arány 24 órás korig emelkedik és utána sem esik vissza, 60-72 órás korig magas marad, utána csökken, de a spórákra és a 45H törzs UH-rezisztens frakciójára jellemző értéknél lényegesen magasabb marad. A fehérje tartalomnak 96 órás korban mintegy 7-10 %-a az ultrahang-rezisztens frakcióban található. /Ezekben a fonalakban nem mutatható ki a spóráképzésre jellemző hársántfalak, l. IV.1.5. ábra /.

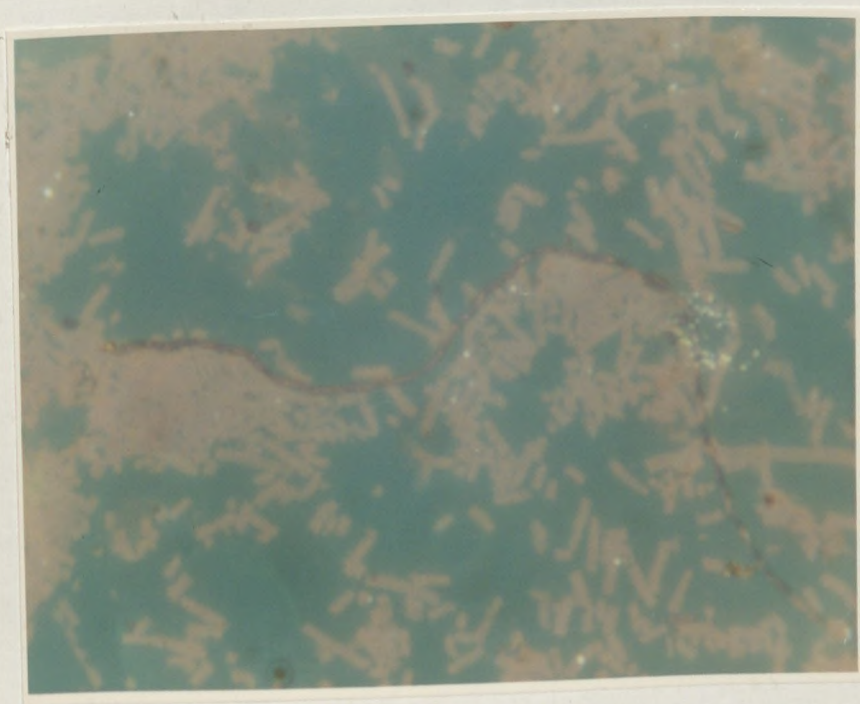
A *Streptomyces griseus* N^o 52-1 törzs folyékony táptalajban növesztett tenyészetében párhuzam van a fonalak differenciálódásának elakadása, a növekedési görbe egyfázisos lefutása és a hosszú időn át változatlanul nagy protein:DNS-arány /azaz kicsiny mag:plazma hányados/ között. Mivel a reproduktív ágakban mind biokémiai, mind citológiai módszerekkel a mag:plazma-hányados növekedését tudtuk kimutatni, a nem csökkenő protein:DNS arányt a spóráképzés korai elakadására jellemzőnek tartjuk.

Az 52-1 típusu mutánsok növekedési görbáját és az életsiklus során mutatott protein:DNS és RNS:DNS arányának alakulását nem sikerült az O₂-ellátás fokozásával a 45 H-típusához hasonlóvá tenni /legalábbis technikai lehetőségeink határain belül nem/.

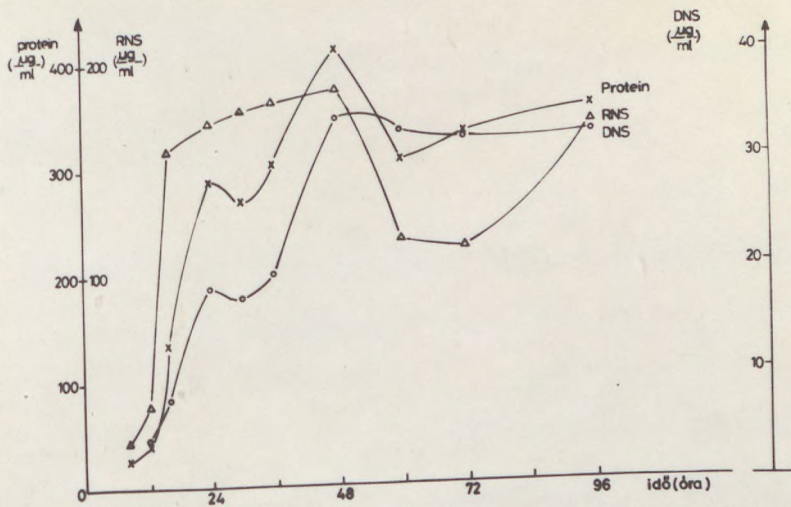
A 45H törzs fermentlevéből izolált, kb. 20 000 dalton molekulasúlyu, fehérjetermészetű szabályozó anyag, a



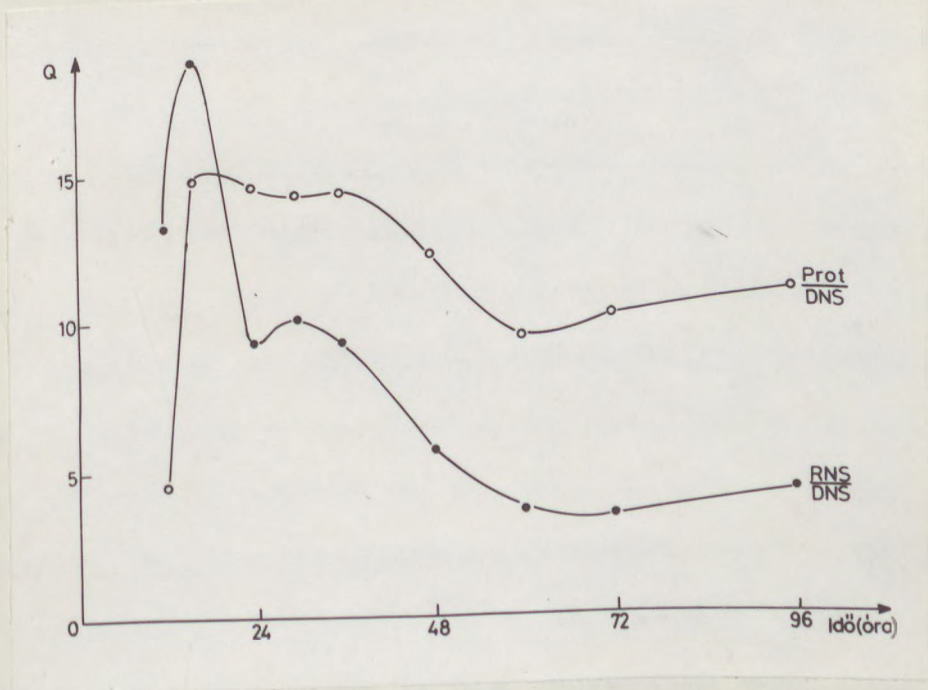
IV.1.4. ábra: S. gr. 52-1 tenyésztésében a protein:DNS és RNS:DNS arányok alakulása a tenyésztési idő függvényében



IV.1.5. ábra: 72 órás S. gr. 52-1 fonalak 120 secundum ultrahang-kezelés után



IV.1.6.a. ábra: S. gr. 52-1 C-faktorial kezelten tenyészetenben a protein, DNS és RNS mennyisége $\mu\text{g/ml}$ -ben a tenyésztési idő függvényében
 / x—x = protein; Δ — Δ = RNS; o—o = DNS /



IV.1.6.b. ábra: A protein:DNS és az RNS:DNS arányok alakulása S. gr. 52-1 C-faktorial kezelten tenyészetenben

a C-faktor hatására a növekedési görbe és a makromolekulák tenyésztési idő függvényében mutatott arányai inkább a 45H törzsnél leirtakhoz hasonló lefutást mutattak / IV.1. 6. ábra /.

IV.1.2. Az életciklus során kimutatható enzimszint változások

A változások jellemzésére mértük a tenyészetek β -galaktozidáz, β -glükózidáz, alkalikus foszfátáz és proteáz aktivitásának endocelluláris és exocelluláris értékeit.

Kísérleteinkben a β -galaktozidáz és β -glükózidáz aktivitások maximumai /akár térfogatra, proteinre, vagy akár DNS-re számítva az értékeket/ a vegetatív fázis végére estek. A kétféle glikozidáz aktivitásának maximuma, ill. ezek egymáshoz való nagyságbeli és időbeli viszonya mutánsról mutánsra kisebb-nagyobb eltéréseket mutatott és a tenyésztési körülményektől függő ingadozások is jelentkeztek. Csak endocelluláris aktivitást találtunk.

A *Streptomyces griseus* N^o 45H mutánsban 15 ml-es fiolában tenyésztve/ mindkét aktivitás 24-30 óras kor között igen éles csucst ér el, majd meredeken zuhan és a csucs 1/4 - 1/5-ének megfelelő értéket elérve, 40-60 óras kor között alig változik. Utána mindkét aktivitás lassan csökken tovább és 72 óra tenyésztés után igen alacsony minimumon stabilizálódik / IV.1. 7. ábra /.

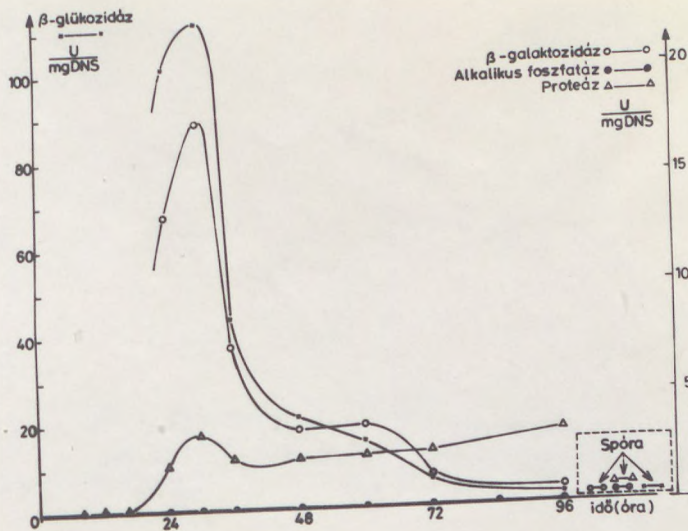
A β -glikozidáz aktivitások leirt változásai nagymértékben hasonlóak az Erdei és mtsai /1972/ által a *Streptomyces griseus* N^o 45H/G-20 jelű mutánsban megfigyelt változásokhoz / IV.1. 8. ábra /. A különbség az, hogy az általuk százszoros spórasűrűséggel végzett leoltást követően /500 ml-es Erlenmeyer-lombikban/ tenyésztett mutáns életsiklusában a jellemző szakaszváltások korábban következnek be, és a β -galaktozidáz-csucs kialakulása megelőzi a β -glükozidáz-csucsot.

A *Streptomyces griseus* N^o 52-1 törzsben a vegetatív növekedés szakaszában mind a β -galaktozidáz, mind a β -glükozidáz egy sejtre számított maximális aktivitása messze elmarad a 45H törzsben kialakuló csucsoktól /a β -galaktozidáz kb. egyhetede, a β -glükozidáz nem éri el egytizedét sem annak/.

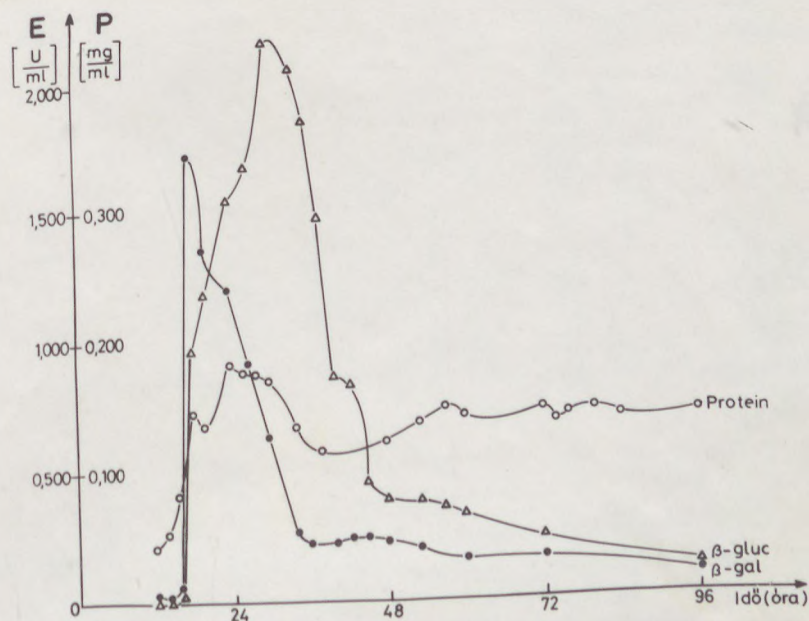
A késve kialakuló és alacsonyabb maximumot adó β -galaktozidáz-szint 24- és 48 órás kor között változatlan marad, 48- és 60 órás kor között is csak kismértékű /kb. 40 %/ csökkenést mutat, majd állandóvá válik. A β -glükozidáz-csucs élesebben jelenik meg 16- és 24 órás kor között, de csökkenése 24 órás kor után sokkal lassabb és kisebb foku, mint azt a *Streptomyces griseus* N^o 45H törzs esetében jellemzőnek találtuk.

A bacillusok sporulációjának jellegzetes enzimje, az alkalikus foszfatáz /Coots, 1974; Warren, 1968; Kay, Warren, 1968/ mindkét *Streptomyces* törzsünk életsiklusa során megjelenik mind intracellulárisan, mind

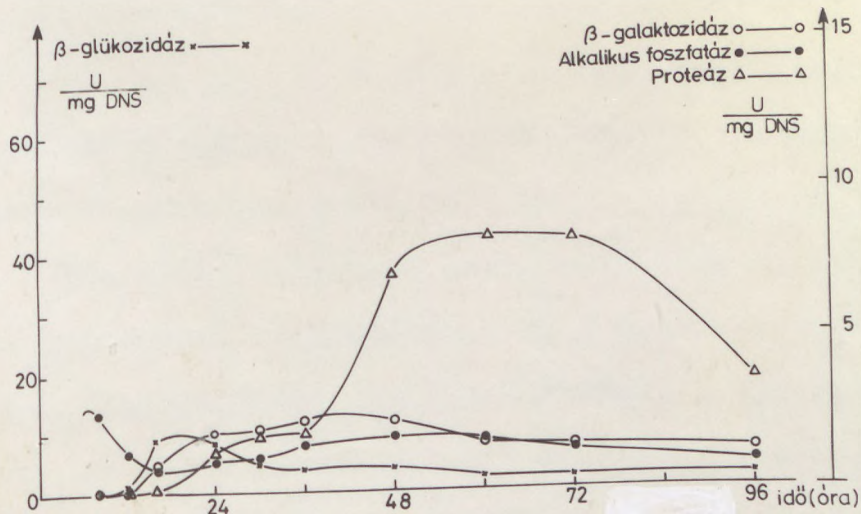
extracellulárisan. A 45H törzs mycéliumában a sejtenbeli enzimszint alakulása igen érzékeny az oxigén-ellátásra: standard körülmények között, fiolában rázatva az ultrahanggal feltárható fonalakban nem sikerült jelenlétét kimutatnunk / IV.1. 7. ábra /, míg ugyanazon törzset fermentorban tenyésztve jelentős intracelluláris aktivitást találtunk /72 óras korban 8,83 U 1 mg DNS-re számítva/. Az 52-1 jelű törzsből minimumot találtunk a legintenzívebb vegetatív növekedés szakaszában és hosszan elnyúló lapos platót 36-72 óras kor között / IV.1. 9. és IV.1. 10. ábra /. Az exocelluláris alkalikus foszfatáz mindkét törzsből jól mérhető változásokat mutatott. A N^o 45H törzs esetében két csúcst találtunk az első és második növekedési szaknak megfelelően /A csúcsok jól felismerhetőek, ha az enzim mennyiségét DNS-re vonatkoztatjuk, de egybemosódnak, ha a tenyészet fehérje tartalmára számítjuk/. 60 óras kortól kezdve az enzimszint a csúcsok magasságának kevesebb mint 10 %-át jelentő minimális szintre áll be / IV.1. 11. ábra /. Az 52-1 törzsből az exocelluláris alkalikus foszfatáz mennyiségének változása az életciklus során alapvetően különbözik a 45H törzsnél leirtaktól: az emelkedés a legintenzívebb vegetatív növekedés szakában nem mutatható ki, csak 24 óras kor után igen lassan indul meg és 48 óras korig nem számottevő. 48- és 60 óras kor között - amikor a 45H törzsből gyors csökkenés van -



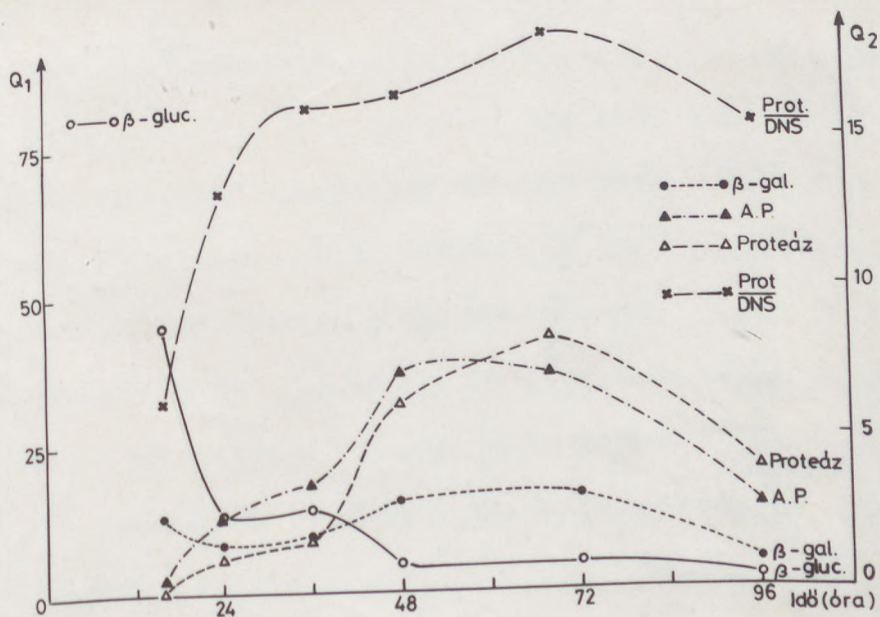
IV.1.7. ábra: *S. griseus* 45H tenyésztésében endocelluláris enzimek 1 mg DNS-re számított mennyisége a tenyésztési idő függvényében /Baloldali függőleges tengelyen a β -glükózidáz, jobboldalon a másik három enzim mennyisége felvéve/. Szaggatott vonallal bekezeztelve: a spórákban mért aktivitások



IV.1.8. ábra: *S. griseus* 45-H-G20 törzs fonalaiban a fehérjék, β -galaktozidáz és β -glükózidáz mennyiségének alakulása a tenyésztési idő függvényében. Szűrt szójas táptalaj 200 millió spóra/ml táptalaj /Erdei et al. 1972/



IV.1.9. ábra: S. gr. 52-1 tenyészetében endocelluláris enzimek 1 mg DNS-re számított mennyiségének alakulása a tenyésztési idő függvényében



IV.1.10. ábra: S. gr. 52-1 tenyészetben a protein:DNS arány és az endocelluláris enzimek 1 mg DNS-re számított mennyiségének változása a tenyésztési idő függvényében. $Q_1 = \beta$ -glükózidáz

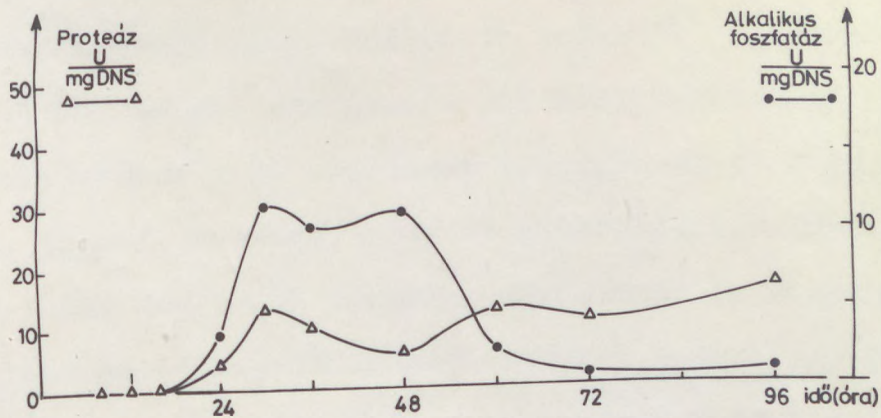
/U pro mg DNS/, $Q_2 = \text{protein:DNS /mg per mg/}$,
 β -galaktózidáz, alkalikus foszfatáz /A.P./
és proteáz /U per mg DNS/

az 52-1 törzs fermentlevében meredek emelkedés tapasztalható, ami egy lassabb emelkedésbe vagy stagnálásba megy át. A jól differenciálódó törzsre jellemző csökkenés 96 órás korig nem mutatkozik / IV.1. 12. ábra /.

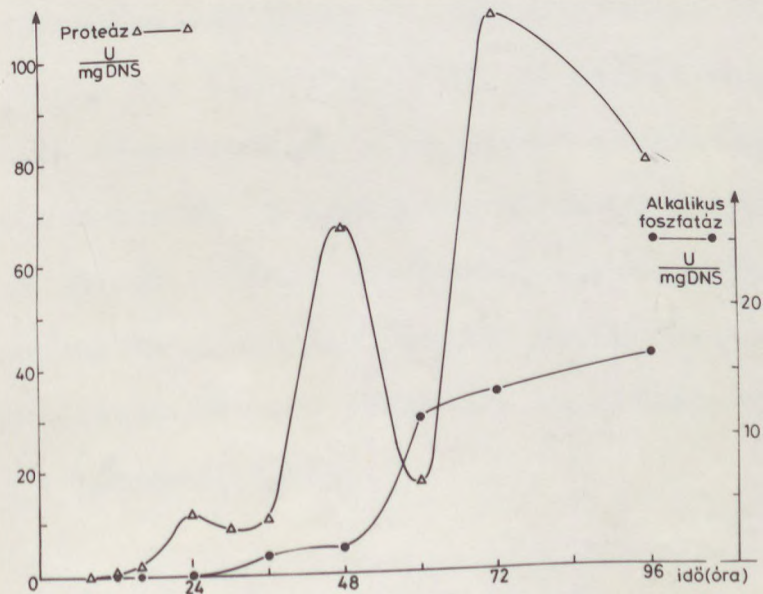
Még kifejezettebb eltérés mutatható ki a két törzs fermentlevében lévő **exocelluláris** proteázok mennyiségének életciklustól függő szintjében: a 45H törzs esetében az egy sejtre számított mennyiségük két alacsony csúcst ér el, egyiket 30 órás kor körül az első növekedési szak végén, a másikat 60 órás kor körül, a második növekedési /differenciálódási/ szak végén. Utána minimumon áthaladva szintjük alig kimutatható mértékben igen lassan emelkedik. Az 52-1 jelű törzs fermentlevében az első maximum szintén /kissé korábban bekövetkező/ az első növekedési szak végén 24 órás kor körül alakul ki. Ez még kissé alacsonyabb is, mint a 45H fermentlevében megjelenő szint. Később, a 45H-től eltérően egyre nagyobb maximumok jelennek meg 48-, majd 72 órás kor körül. Ezek magassága az első maximumét és a 45H törzs csúcértékét 5-9-szeresen meghaladja.

A sejtekben lévő proteázok mennyiségében kisebb ingadozással hasonló tendenciák figyelhetők meg/IV.1. 7. és IV.1. 9. ábra/. Az 52-1 törzs tenyészetében az életciklus későbbi szakában ismét elmarad a proteázok mennyiségének a 45H törzs esetében megfigyelt csökkenése.

A differenciálódást kiváltó C-faktor hatására nem-

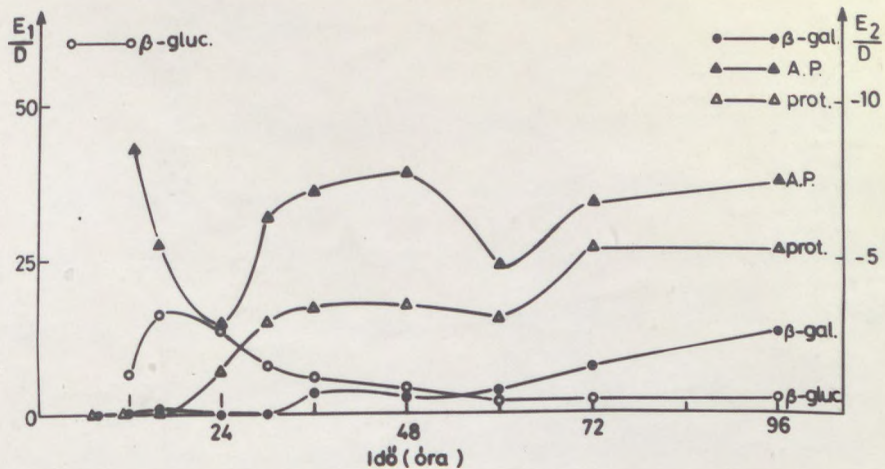


IV.1.11. ábra: S. gr. 45H szürlésében az exocelluláris proteázok és alkalikus foszfatáz a mycélium 1 mg DNS-ére számított mennyiségei a tenyésztési idő függvényében

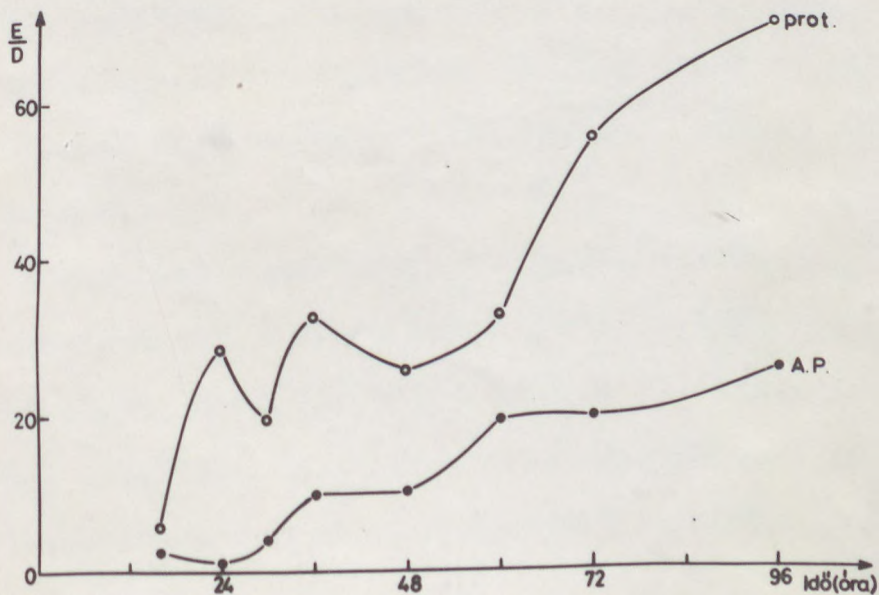


IV.1.12. ábra: S. gr. 52-1 szürlésében az exocelluláris proteázok és alkalikus foszfatáz 1 mg mycélium-DNS-re számított mennyiségei a tenyésztési idő függvényében

csak a növekedési görbe és a protein:DNS arány alakulása válik hasonlóvá a 45H törzsrre jellemzőhöz, hanem az enzimszintek alakulásában is jelentős változások jönnek létre, melyek egyrésze a jól differenciálódó törzs életciklusához való közeledés irányába mutat / IV.1. 13.a. és b. ábra /. Feltűnő, hogy az endocelluláris proteázok mennyisége még a 45H törzsbén mérhetőnél is alacsonyabb szinten, azzal nagyjából párhuzamosan alakul. Az exocelluláris enzimek viselkedés viszont csak a 48 órás kort megelőző életszakaszokban mutat szembetűnő változásokat: a vegetatív növekedési szakasz végén a proteáz csucs mérsékelten emelkedik, 48-60 órás korban még lényegesen alacsonyabb, mint a kontroll tenyészetben, de termelődése 60 órás kortól fokozódik és a 96 órás tenyészet proteáz szintje majdnem eléri a kontroll értékét. Az exocelluláris alkalikus foszfatáz mennyiségének jól mérhető emelkedése - a kontrollnál kb. 24 órával korábban - már 24 órás tenyészetben, a vegetatív növekedési szakasz végén megindul. A kialakult magasabb szinthez adódik hozzá 48- és 60 órás kor között a kontrollal azonos időben bekövetkező hasonló mértékű újabb emelkedés. Így a 96 órás korban mérhető aktivitás kb. kétszeresen felülmúlja a kontroll értékét.



IV.1.13.a. ábra: Az endocelluláris enzimek mg DNS-re számított mennyiségének alakulása / U:mg / S. gr. 52-1 törzs C-faktorialal kezelt tenyészetében. \circ — \circ β -gluc = β -glükózidáz / $E_1 : D$ / \bullet — \bullet β -gal = β -galaktóidáz, \blacktriangle — \blacktriangle A.P. = alkalikus foszfatáz, \triangle — \triangle prot = proteáz / $E_2 : D$ /



IV.1.13.b. ábra: Az exocelluláris proteáz / \circ — \circ prot / és alkalikus foszfatáz / \bullet — \bullet A.P. / 1 mg DNS-re számított mennyiségének változása a S. gr. 52-1 törzs C-faktorialal kezelt tenyészetében / U:mg /

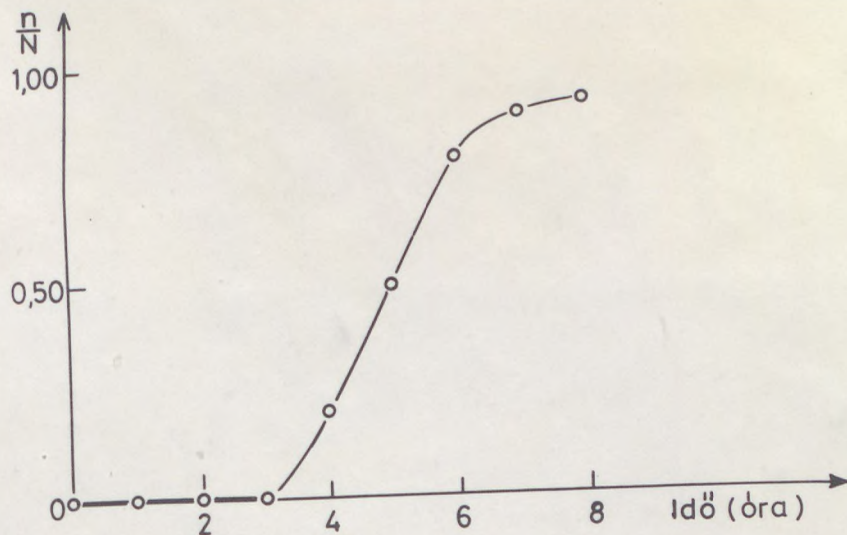
IV.1.3. Az életciklus jellegzetes citológiai változásai

A vastagfalú, viszonylag kisebb víztartalmu és kissé hidrofob felszínű spórák nedvesedés után, ha a szükséges tápanyagok és a kielégítő O_2 -ellátás biztosítottak, csirázni kezdenek. A csirázás során a biokémiai aktivitás fokozódását követően az első látható jelként megjelennek a spórák felszínén előbb kis kidudorodások, melyek egyre hosszabb csirákká / "germ tube" / azaz fonalkezdeményekké növekednek. A csira és fonal között nincs elvi különbség, köztük éles határt vonni nem lehet.

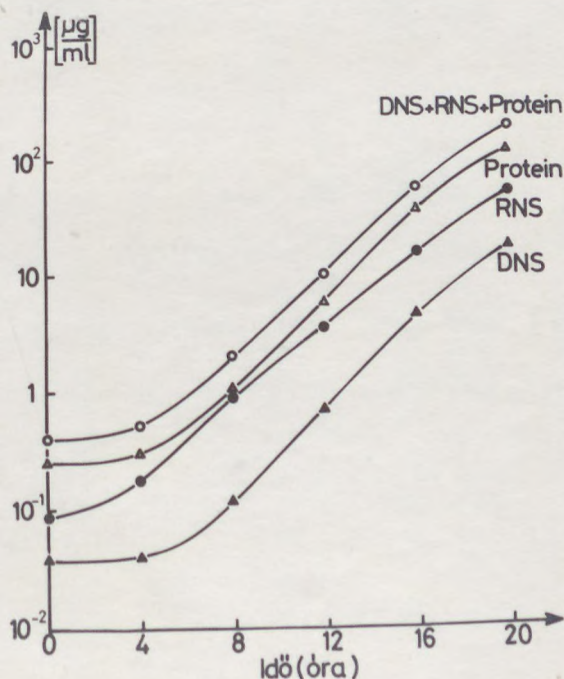
A gyorsabban nedvesedő 52-1 spórákon a csiracsövek 4-8 óra inkubáció után láthatók / IV.1. 14. ábra /. A 45H törzs spórái esetében még 10 óra inkubáció után is a spóráknak csak mintegy felén látható csirázás / IV.1. 15. ábra /.

A csirázás utáni gyors növekedés időszakában kb. 20-24 óráig a mycéliumot alkotó fonalak mind összetételüket, mind sejtfelépítésüket tekintve igen hasonlóak egymáshoz és a két eltérő fejlődési típust képviselő törzs sem mutat szembetűnő eltérést /Vitális, Szabó, 1963/.

A fiatal fonalak erősen bazofil festődésűek. Igen feltűnő metilzöld-pironin festéssel a fonalak intenzív, csaknem homogen pironin-felvétele. A magok mind metil-



IV.1.14.a. ábra: S. gr. 52-1 spóráinak csirázása szűrt szójas táptalajban 500 ml-es lombikban rázatva
 /n = mikroszkóposan csirázott spórák száma,
 N = összes vizsgált spórák száma/



IV.1.14.b. ábra: S. griseus 52-1 tenyészetében a csirázás és a kvázi-exponenciális növekedés /500 ml-es Erlenmeyer-lombikban, 5-40 x nagyobb spóraszámmal leoltva/ során a főbb makromolekuláris komponensek mennyiségének növekedése



IV.1.15. ábra: *S. griseus* 45H törzs spóráinak csirázása szűrt szójas táptalajban 10 órával a leoltás után. A csirák hosszúsága igen különböző, a spóráknak több mint fele nem csirázott még

zölddel, mind Feulgen-reakcióval igen halványan festődnek, kiterjedésük viszonylag nagy, elhatárolódásuk nem éles / IV.1. 16. és IV.1. 17. ábra /. Ebben a szakaszban a kombinált fal-citoplazma festési és vizsgáló eljárásunkkal az élesen kirajzolódó fal mellett a citoplazma bazofil, benne a növekedés előre haladtával egyre nagyobb számban jelennek meg a fényt csillogóan visszavetítő ún. "reflektáló szemcsék". Legsűrűbben a növekedési szakasz végén és rövid idővel utána találhatók / IV.1. 18. és IV.1. 21. ábra /. A poliszaccharidok mennyisége kevés és eloszlásuk meglehetősen egyenletes a PAS-reakció tanúsága szerint / IV.1. 19. és IV.1. 21. ábra /.

24-30 órás korra a "fiatal vegetatív" fonalak "átmeneti vegetatív" típusúvá alakulnak, majd ezek is más típusu fonalakká fejlődnek. Ebben a szakaszban egyre nagyobb lesz a különbség mind az egyes tenyészetekben található fonalféleségek között, mind az eltérő eredménnyel differenciálódó törzsek fonalai között. A reproduktív ágak kivételével a fonalak bazofiliája csökken. A pironinnal való festődés is szakaszokra tagolódik, intenzitása csökken. Az 52-1 tenyészetek fonalai kezdetben telve vannak "reflektáló szemcsékkel", ezek gyakorisága lassan csökken. A nukleoidokban a DNS állomány jobban előtűnik mind Feulgen reakcióval, mind metilzöld festés alapján. A magállomány relativ mennyisége, alakja, elhelyezkedése alapján is igen nagy különbségek alakulnak ki a fonalak között. A

folyékony tenyészetben spórát nem képező 52-1 törzs fonalaiban a citológiai jegyek kombinációját tekintve igen sok egymástól eltérő fonaltípus alakul ki. Különösen megnő az eltérő variációk száma kiegyensúlyozatlan körülmények között /1. Szeszák, Szabó, Vitális, 1967/. Az 52-1 fonalai között kialakuló típusok közül néhány nem található meg a jól differenciálódó /bőven spórázó/ 45H törzs tenyészetében /IV.1. 16. - IV.1. 22. ábra /.

A fonalak csökkenő RNS-tartalmának megfelelően csökkenő bazofilia mellett az öregedő vegetatív fonalak nagyobb részében - különösen a vastagabb, oldalágakat is hordozó fonalakban - nagy mennyiségű PAS-pozitív anyag felhalmozódása figyelhető meg. A PAS-pozitív poliszacharidok ezekben a fonalakban a citoplazmának sejtmagot nem tartalmazó szakaszaiban igen nagy koncentrációban halmozódnak fel. A mikroszkópi képen hosszabb-rövidebb intenzíven festődő pálcák formájában láthatók / IV.1. 19. ábra /. Kialakulásuk 36 órás kor körül a második növekedés megindulásakor kezdődik. 48 órás korban kisebb mennyiségben halványabb pálcák-szemcsék láthatók, maximális mennyiségüket 66-72 órás korra érik el, később halványulnak és megritkulnak. Ezzel párhuzamosan kb. 60 órás korig a reflektáló szemcsék gyakorlatilag eltűnnek a fonalaktól.

A 45H törzsben a PAS-pozitív poliszacharidok mennyisége, általában kevesebb és eloszlásuk is más, mint az 52-1 jelű törzsben: inkább kisebb szemcsék formájában

és a sejtfalat követve jelennek meg. A spóraképzésben jellemző megjelenésük: a későbbi spórákat elválasztó harántfalakban "zárójel-szerű képletek" formájában / IV.1. 22. ábra /, később a spórafalban mutatható ki PAS-pozitivitás. A spóraképzés előrehaladtával 48-60 órás kortól a spórát nem képező vegetatív fonalak poliszacharid tartalma általában alacsony és nem jellemző.

A 45H törzs tenyészetében 30-36 órás kortól kezdődően az életciklus második növekedési periódusában megjelennek a spóraképzés irányába fejlődő reproduktív ágak. Ezek fejlődésüknek viszonylag korai szakaszától ultrahanggal szemben ellenállóak. Általában vastagabbak annál a fonalnál, amelyikből erednek. Gyakran buncőszerűen kiszélesednek és elágaznak. Faluk intenzíven festődik és jól elkülöníthető mikroszkópos vizsgálat során a szintén kifejezetten bazofil festődésű citoplazmájuktól /A fal alciánzöldet, Janus-zöldet és toluidinkéket köt nagyobb mennyiségben, a sejt plazmája pedig pironint és para-rozanilint/. Több pironint kötnek meg mint a fiatal vegetatív fonalak, magjuk metilzöld festődése láthatóan kisebb területre korlátozódik a pironin-festődésnél. Feulgen-reakcióval felismerhetően elkülönülő, de nem határozott konturu magvak láthatók a már elkülönülő praespórákban, ill. spórákban. A reproduktív ágak fejlődésének korábbi szakában, amikor még a DNS-szintézis folyik a magállomány nem sza-

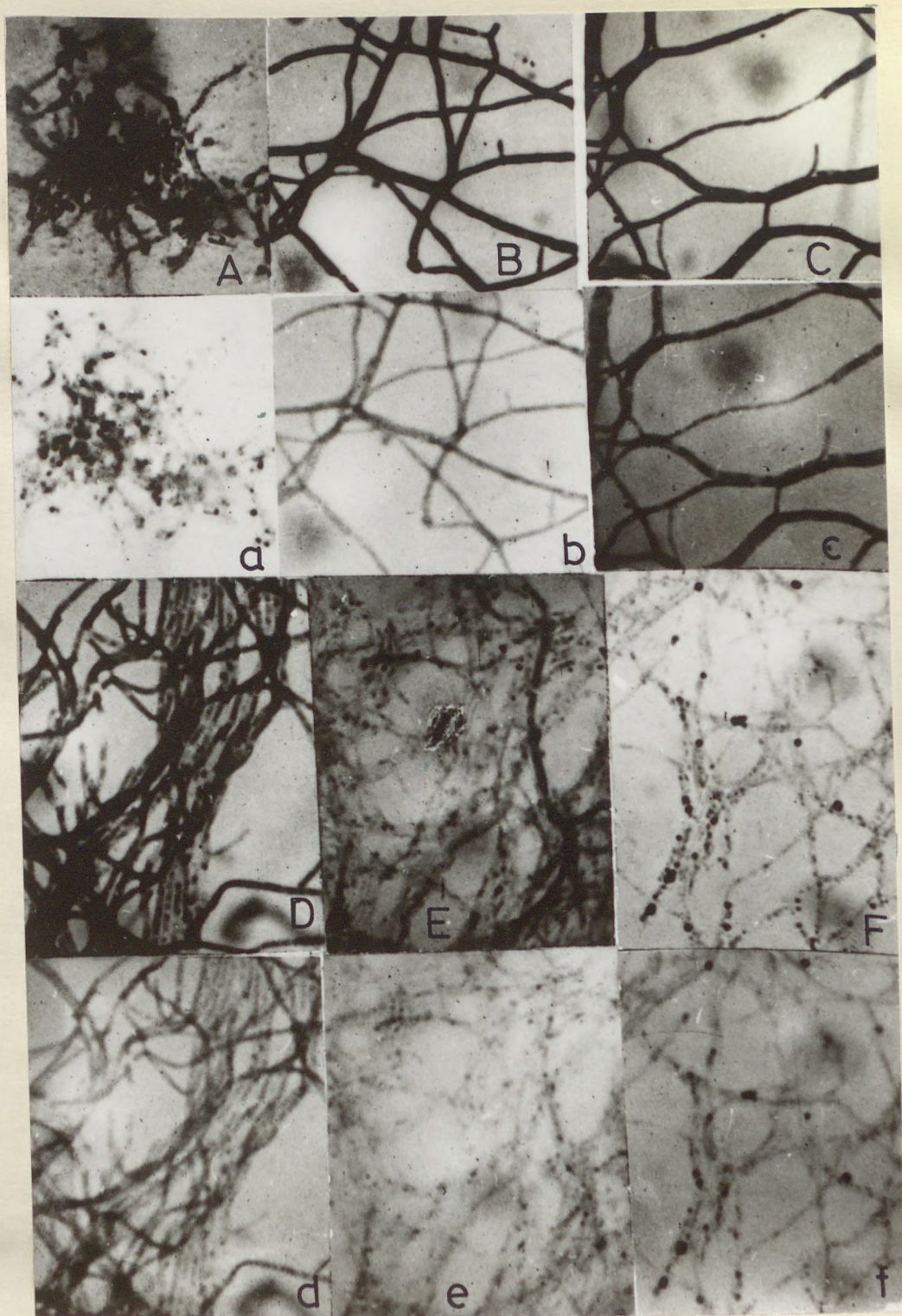
kad meg a leendő spórák határán, hanem egybefüggő tagolatlan képletet alkot / IV.1. 17. ábra /. A bazofil citoplazma a reproduktív ágakban sohasem tartalmaz olyan jellegű tömörüléseket, mint a fiatal vegetatív fonalak reflektáló szemcséi. A bazofília mértékének változását a 45H törzs tenyésztése során a különböző fonalfrakciókban kémiaiilag is jellemeztük és a morfológiai képpel jól összeegyeztethető adatokat nyertünk. Jellemzésül kiszámítottuk az RNS fehérje; valamint az össz-nukleinsav, fehérje arányokat / IV.1. 4. táblázat /. Látható, hogy az ultrahang-rezisztens reproduktív fonalakban a bazofília mértéke 1,5-4-szer nagyobb mint az ultrahanggal feltárható azonos koru vegetatív fonalakban.

A C-faktorral kezelt 52-1 tenyészetekben, a kezletlen kontrollal ellentétben 60-72 órás korra megjelennek a citológiájukat tekintve jellegzetes reproduktív ágak /részletesebben l. Vitális, Szabó, 1968/. Ezeknek az ágaknak többsége mutatja a már ismerttetett, reproduktív ágakra jellemző főbb citológiai jegyeket /PAS-pozitivitás eloszlása, magvak jellege, mag: citoplazma aránya, bazofília, a sejtfal és citoplazma festődése, stb. / IV.1. 23. ábra /, de nem jutnak el az ultrahang-rezisztencia kialakulásáig az általunk alkalmazott feltételek között.

IV.1. 16. ábra. A metilzöld-pironin festés képének változásai a *Streptomyces griseus* 52-1 törzs életciklusában. 1800-szoros nagyítás.

A nagybetűvel jelölt kép a pironinnal festett, a kisbetűvel jelzett ugyanazon fonalakban a metilzölddel festett részleteket mutatja /az előbbi 545 nm, az utóbbi 644 nm hullámhosszúságu fényvel fényképezve/.

A, a: 8 órás tenyészet /csirázás/, B, b: 16 órás
C, c: 24 órás, D, d: 48 órás, E, e: 60 órás,
F, f: 96 órás tenyészetek



16. ábra

IV.1. 17. ábra: A Feulgen-reakció képének alakulása a Streptomyces griseus törzsek élelciklusa során. 1800-szoros nagyítás. Anoptrálkontraszt eljárás, 578 nm hullámhosszúságú fényvel fényképezve.

A - D : S. griseus 45H

A: 24 órás - elmosódott halvány magfestés,

B: 36 órás, C: 60 órás, D: 72 órás tenyészetek.

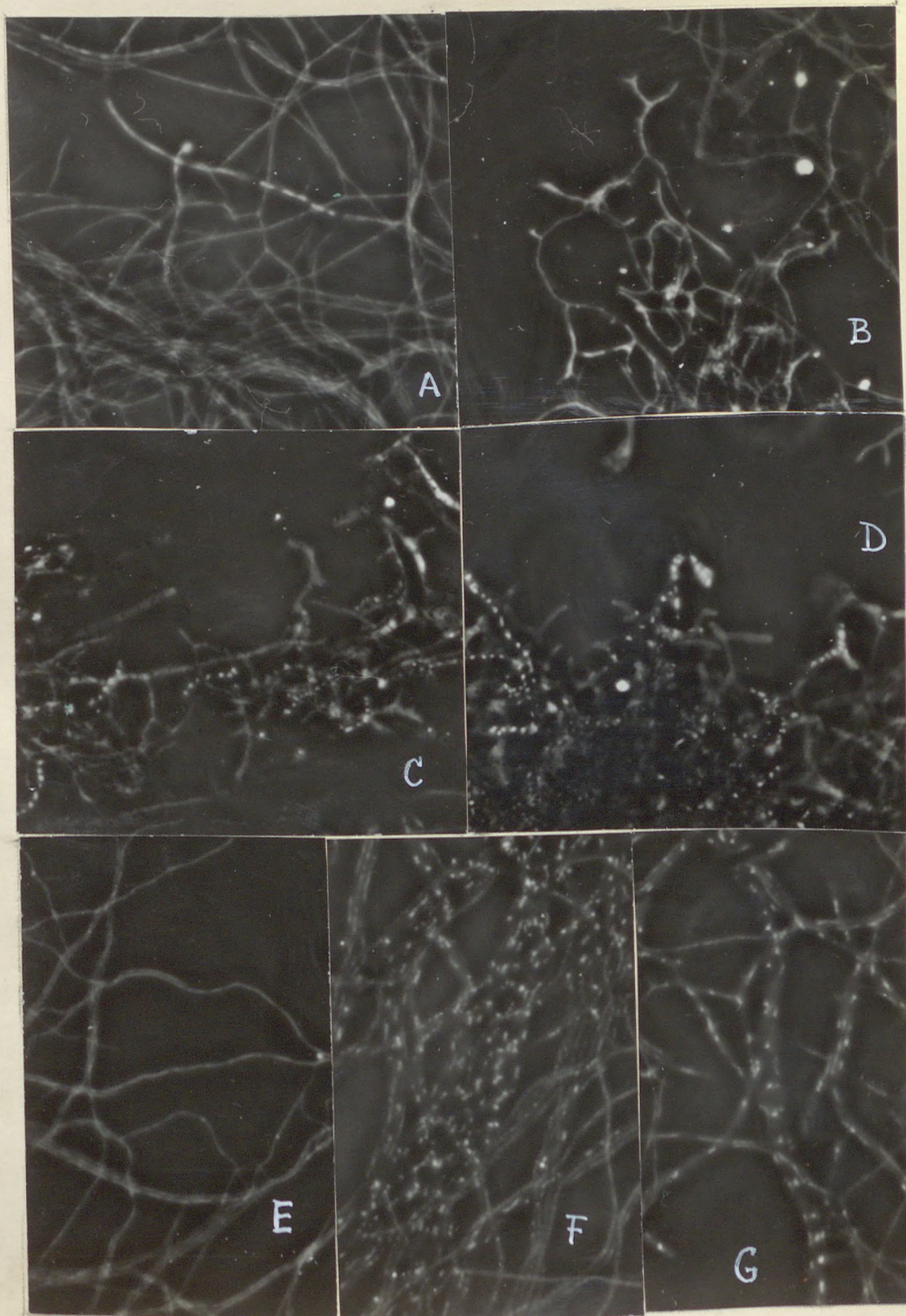
A képződő reproduktív ágakban a magállomány spóráknak megfelelő elkülönülése látható.

E - G : S. griseus 52-1

E: 24 órás, F: 48 órás, G: 96 órás tenyészet.

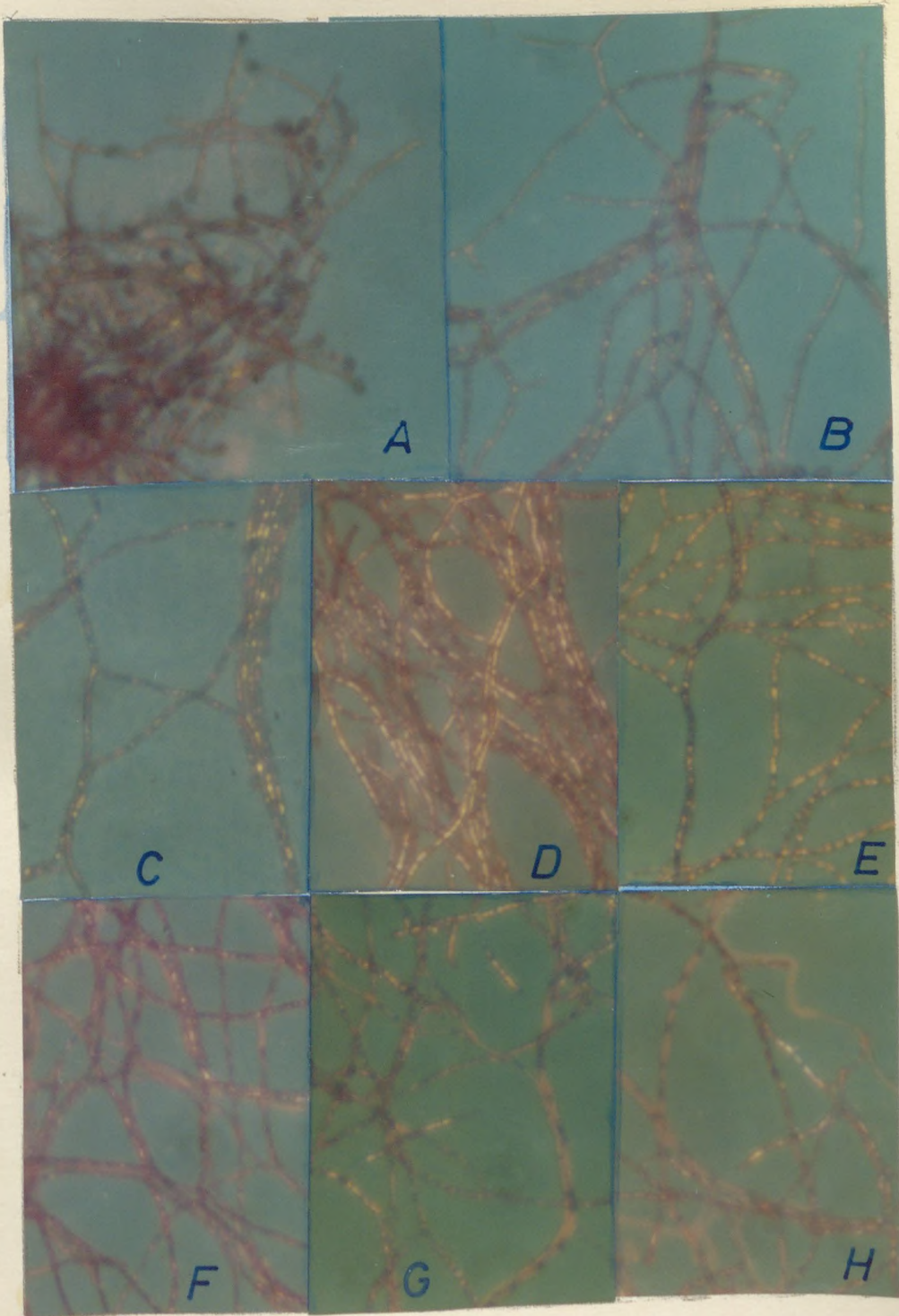
Reproduktív ágak nincsenek, az öreg vegetatív fonalak magállománya egyre tömörebbé válik.

/A negatív kontraszt következtében a jobban festődött részletek világosabbak a képeken/



IV.1.17. ábra

IV.1. 18. ábra: *Streptomyces griseus* N^o 52-1 törzs fonalainak változása az életciklus során. Sejtfal- és általános citoplazma-festés, kombinált ráeső-áteső megvilágítással vizsgálva mikroszkópban. 1600-szoros nagyítás. A: 8 órás tenyészet, csirázott spórák; B: 12 órás tenyészet, fiatal vegetatív fonalak; C: 16 órás tenyészet a fonalakban kezdenek felhalmozódni a reflektáló szemcsék; D: 20 órás tenyészet, átmeneti vegetatív fonalak; E: 36 órás tenyészet; F: 48 órás tenyészet, öregedő vegetatív fonalak, G: 72 órás tenyészet, lizáló, átmeneti és öreg vegetatív fonalak egymás mellett; H: 96 órás tenyészet, fokozódó lizis

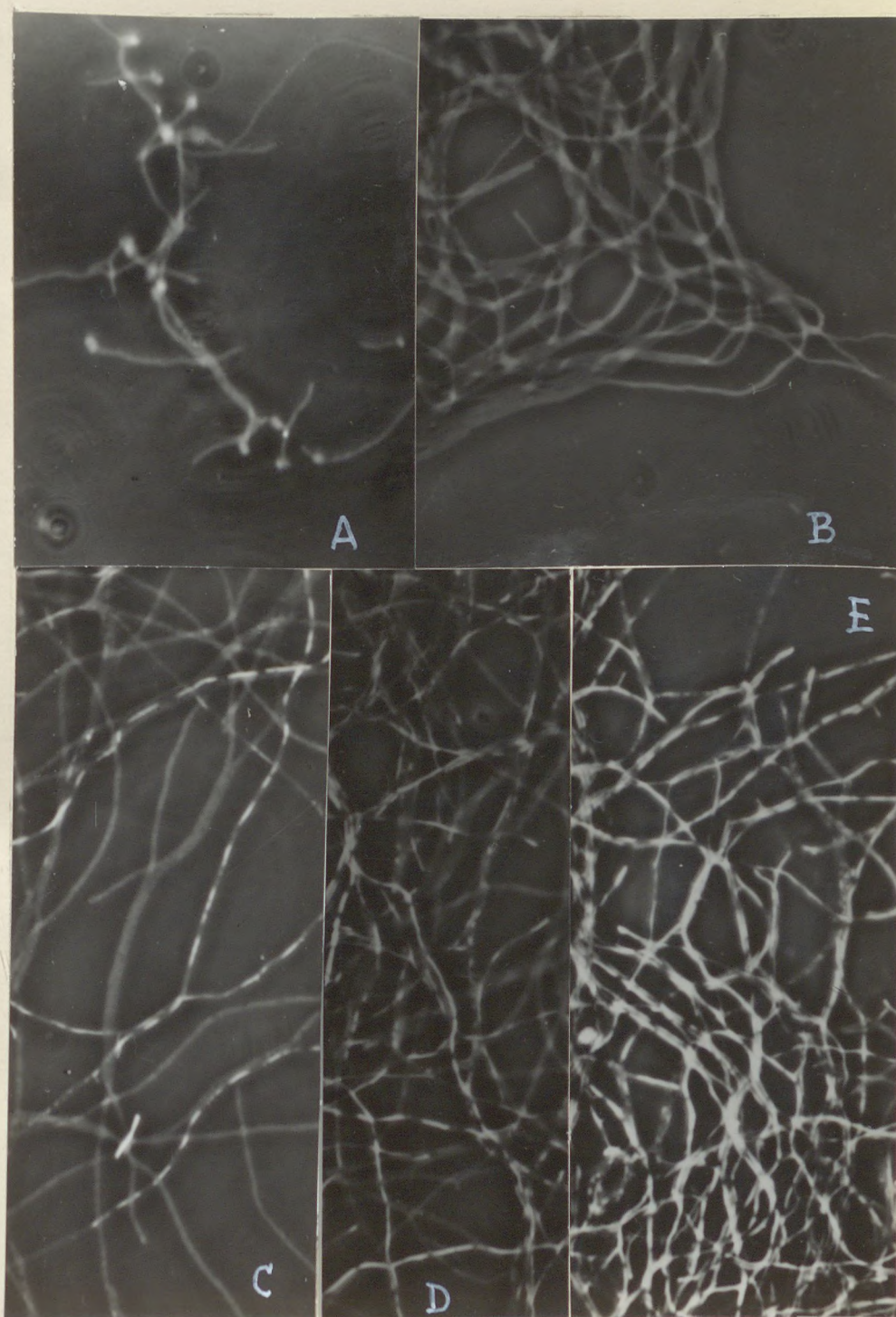


IV. 1.18. ábra

IV.1. 19. ábra: A PAS-pozitív poliszacharidok mennyiségének és megoszlásának életkortól függő változásai a Streptomyces griseus 52-1 törzs fonalaiban. 1800-szoros nagyítás. Anoptrálkontraszt eljárás, 578 nm hullámhosszúságú fénnel fényképezve.

A: 8 órás tenyészet, csirázó spórák. B: 24 órás tenyészet - kevés, egyenletesen elosztott poliszacharidot tartalmazó fonalak. C: 48 órás tenyészet - egyes fonalakban mérsékelt felhalmozódás. D: 60 órás, E: 72 órás tenyészet - a fonalak többségét csaknem teljesen kitölti szemcsék, pálcák formájában az intenzív reakciót adó poliszacharid.

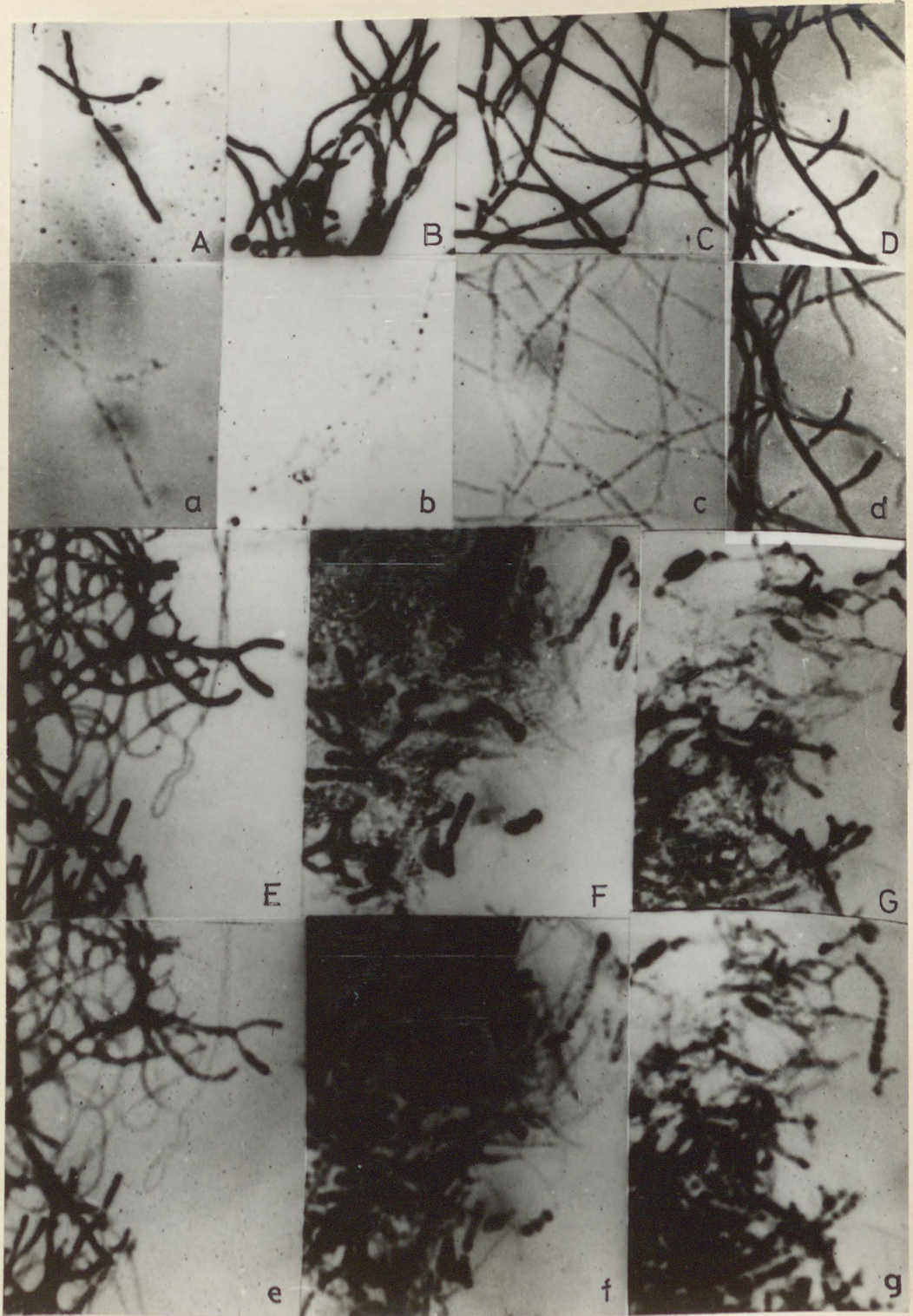
/A negatív kontraszt következtében jobban festődött részletek világosabbak a képen/



19. ábra

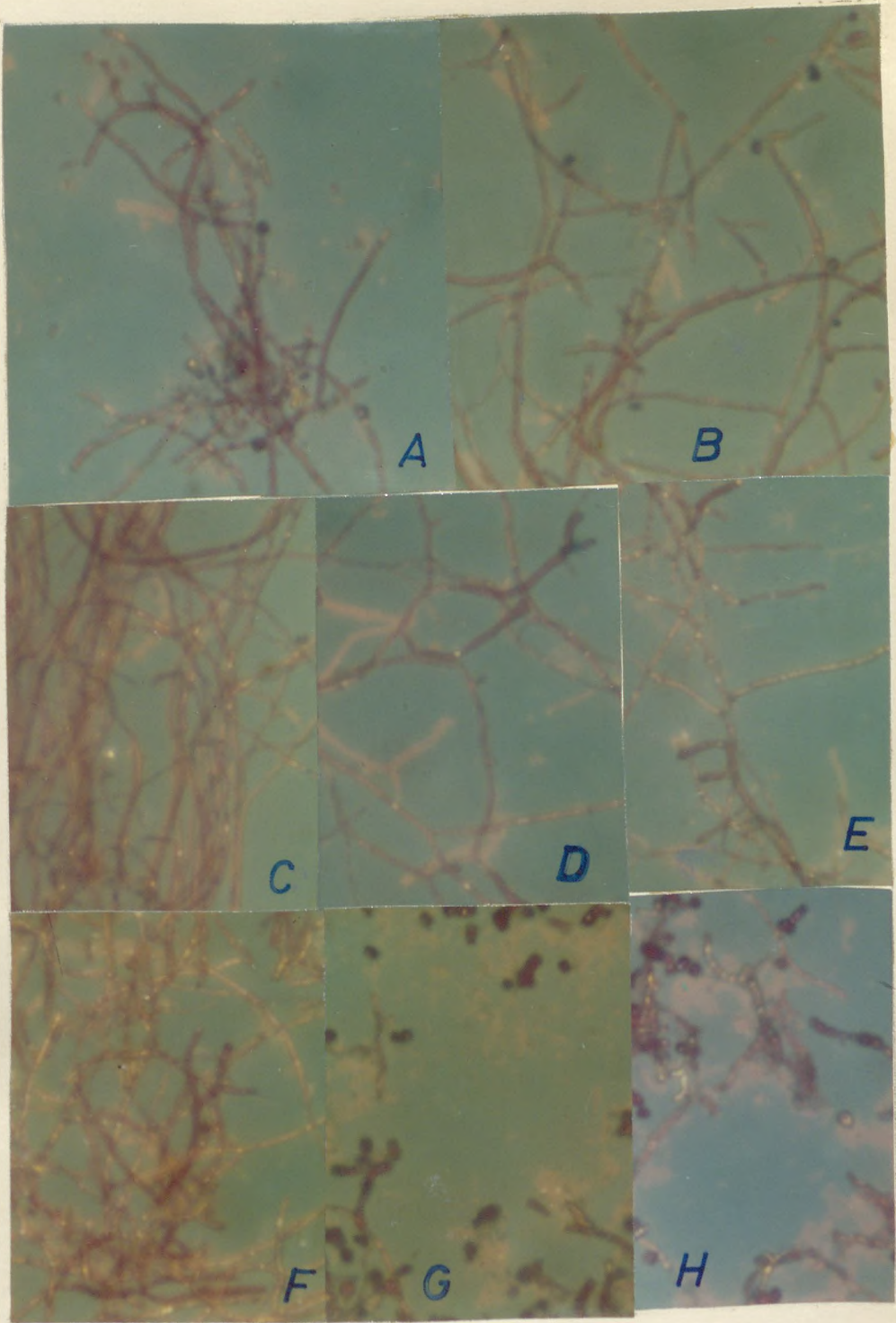
IV.1. 20. ábra: A *Streptomyces griseus* 45H törzs differenciálódása /szürt szójas táptalajban/: a metilzöld-pironin festéssel kapott kép változásai az életciklus során. 1800-szoros nagyítás. A nagybetűvel jelölt kép a pironinnal festődött, a kisbetűvel jelzett ugyanazon fonalakban a metilzölddel festődött részleteket mutatja /az előbbi 545 nm, az utóbbi 644 nm hullámhosszon fényképezve/.

A, a: 8 órás tenyészet, csirázás; B, b: 12 órás tenyészet; C, c: 16 órás, D, d: 24 órás tenyészet, a nyíl a növekedés legkezdetén lévő reproduktív ágra mutat; E, e: 36 órás; F, f: 60 órás; G, g: 72 órás tenyészetek képe. Feltűnő a reproduktív ágak igen intenzív fejlődése pironinnal.



20. ábra

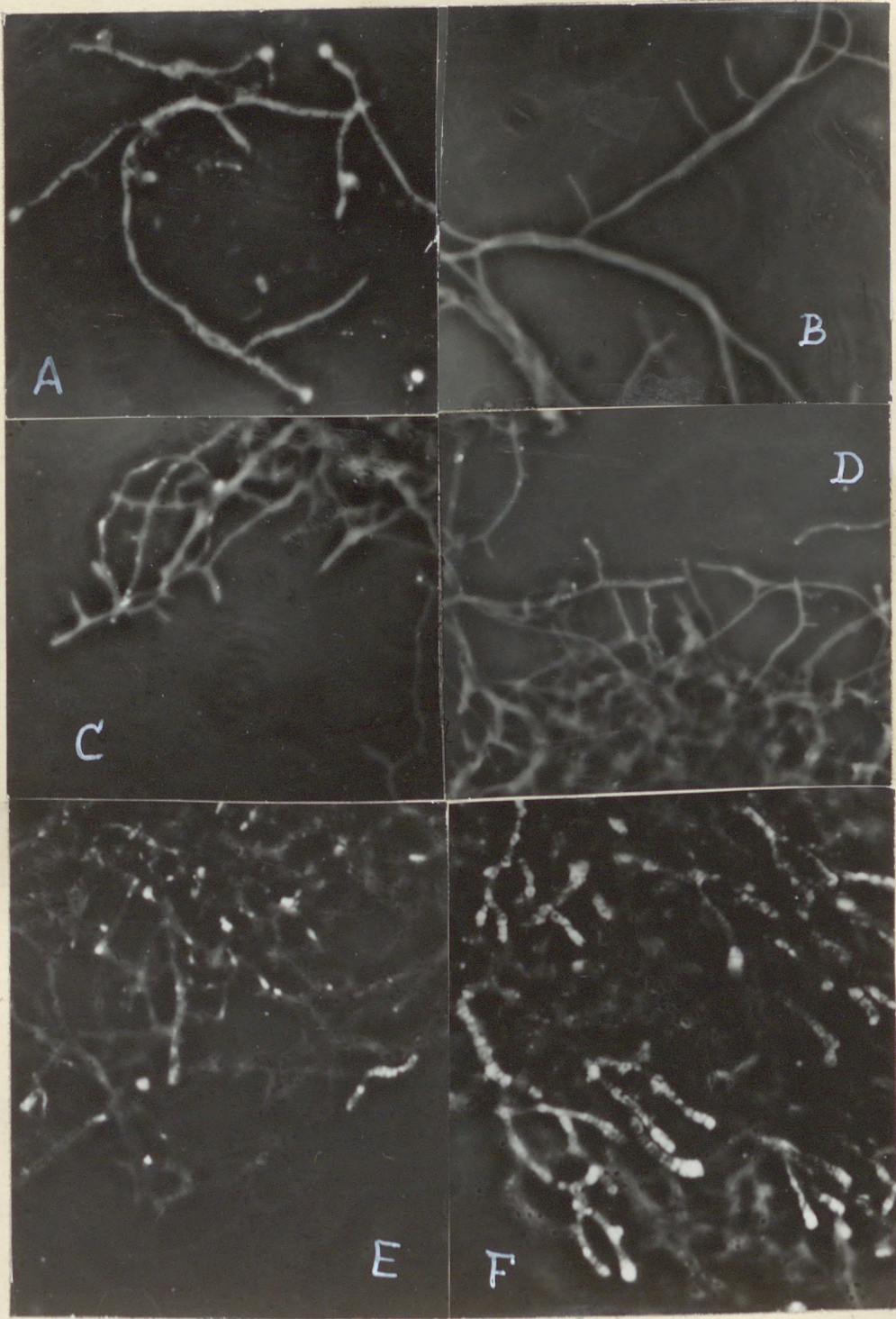
IV.1. 21. ábra: A *Streptomyces griseus* N^o 45H törzs fonalainak változása az életciklus során. Sejt-fal- és általános citoplazma-festés, kombinált ráeső-áteső fényel végzett mikroszkópi vizsgálat. 1600-szoros nagyítás. A: 12 órás tenyészet, csirázó spórák; B: 16 órás tenyészet fiatal vegetatív fonalak, kevés nem csirázott spóra; C: 24 órás tenyészet; D: 30 órás tenyészet, a nyíl a reproduktív ágakra mutat; E: 48 órás tenyészet; F: 60 órás tenyészet; G, H: 72 órás tenyészetek, jól látható a spórák és a reproduktív ágak festődése és optikai viselkedése közötti hasonlóság



IV.1. 21. ábra

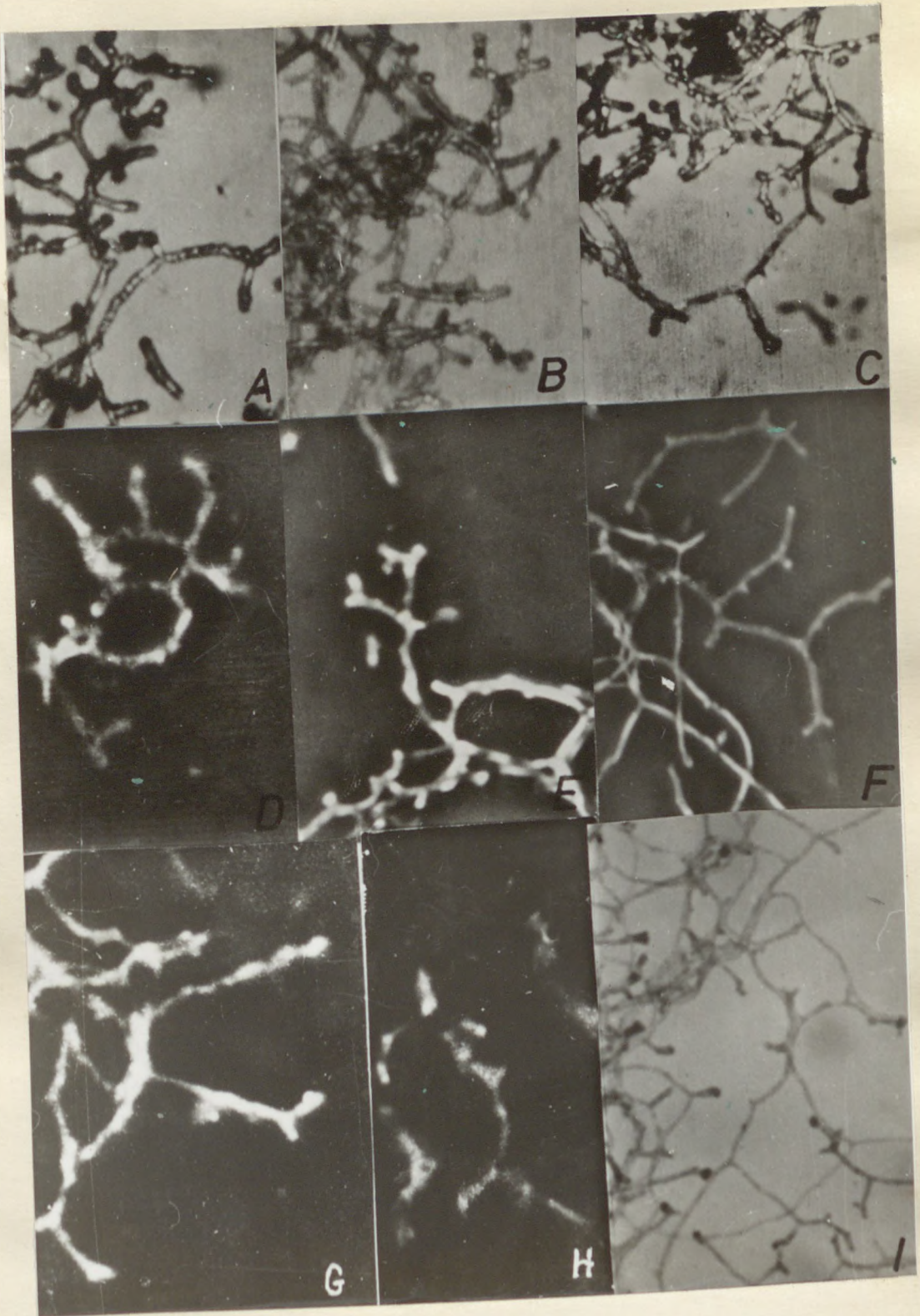
IV.1. 22. ábra: A PAS-pozitív poliszacharidok mennyiségének és megoszlásának változásai a Streptomyces griseus 45H törzs differenciálódása során. 1800-szoros nagyítás. Anoptralkontraszt eljárás, 578 nm hullámhosszuságu fényel fényképezve. A: 12 órás tenyészet, csirázó spórák; B: 24 órás; C: 36 órás - egyes fonalakban kezdenek megjelenni pozitív szemcsék. D: 48 órás; E: 60 órás; F: 72 órás tenyészet. A reproduktív ágak reakciója intenzívebb a differenciálódás előrehaladásával a pozitív reakció egyre inkább a spórák falába lokalizálódik.

/A negatív kontraszt következtében a jobban festődött részletek világosabbak a képen/



IV. 1. 22. ábra

IV.1.23. ábra: *Streptomyces griseus* 52-1 törzs C-faktórral kezelt 72 órás tenyészetének citológiai jellegzetességei. A-C: fal- és citoplazmafestés kombinált ráeső-, áteső fényel megvilágítva. A reproduktív ágak megjelenése különböző mennyiségű C-faktor hatására. Nagyítás: 1800-szoros. D-F: PAS-reakció, anoptrálkontraszt eljárás, 578nm hullámhosszúságú fényel megvilágítva. D és E = 2200-szoros, F = 1800-szoros nagyítás. G-H: Feulgen-reakció, anoptrálkontraszt eljárás, 578nm hullámhosszúságú fényel megvilágítva. 2500-szoros nagyítás. I: Metilzöld-pironin festés 545nm hullámhosszúságú fényel megvilágítva, csak a pironinnal festett részletek feltüntetve. 1800-szoros nagyítás.



23. ábra

IV.1.4. MEBESZÉLÉS

I. AZ ÉLETCIKLUS ESEMÉNYEINEK MEGITÉLÉSE

AZ ÉLETCIKLUS SZAKASZAI

Az általunk vizsgált *Streptomyces griseus* törzsek életciklusa a növekedési görbék lefutását tekintve az egyszerűbb, nem fonalas növekedésű baktériumok populációs ciklusára emlékeztet. A több oldalú, alaposabb vizsgálatok során azonban kiderül, hogy a hasonlóság csak felszínes és alapvető eltéréseket rejt magában. A *Streptomyces* életciklusának szakaszai nem jellemezhetőek egyértelműen egyetlen paraméter segítségével /Az egyszerűbb populációs ciklusok - mint pl. az *E. coli* növekedési szakaszai - egyértelműen jellemezhetőek a "növekedési ráta konstans", számértékével és változásával - Koch, 1971; Singh, 1976/. A streptomycesek életciklusa csak a citológiai, kémiai összetételre, biokémiai aktivitásra, a sejtek számának és tömegének változására vonatkozó adatok egybevetésével írható le a folyamatok lényegét tükröző módon és osztható fel szakaszokra. Ez egyben a streptomycesekkel végzett kísérletek helyes értékelésének és szabályozási rendszerük tanulmányozásának is előfeltétele.

Az életciklus tanulmányozása során követtük a fonalak morfológiájának és citológiai-citokémiai sajátosságainak a tenyészet korától függő változásait: tájékozódunk a sejtfalak, harántfalak mennyiségéről és festődéséről, a citoplazma bazofiliájáról és különböző bá-

zikus festékek iránti affinitásáról, a DNS és RNS tartalomról és annak megoszlásáról/metilzöld-pironin festéssel és Feulgen-reakcióval/a PAS-pozitív poliszacharidok mennyiségéről és megoszlásáról /Esetenként más citológiai vizsgálatokat, ill. enzimek lokalizálására alkalmas reakciókat is felhasználtunk egy-egy kérdés tisztázására./ . Minden citológiai vizsgáló eljárással az egyes fonalak képében /ill. különböző eljárásokkal, egymásután alkalmazva azokat ugyanazon fonalszakaszon a nyert képek kombinációjában/ a fonal típusára jellemző, lényeges jegyek mellett igen sok egyedi és esetleges vonást találtunk /Szeszák, Szabó, Vitális, 1967/. Ennek tudatában citológia vizsgálataink során a fonalak fejlődésének irányára és előrehaladottságára jellemző, tipusos jegyeket kerestük. Adatokat gyűjtöttünk a nem spórázó és a jól spórázó törzsek fonalainak a tenyészetek korától függő változásairól és jellegzetességeiről, a különböző koru tenyészetekben megtalálható fonaltípusokról. Felhasználtuk azt a megfigyelésünket, hogy a spórák és spóráképző fonalak rezisztensek az ultrahanggal szemben. Ezáltal mód nyílt a reproduktív fonalak elkülönítésére és vizsgálatára. A megfigyelt citológiai jellegzetességeket összehasonlítottuk az irodalomból ismert citológiai adatokkal /l. az irodalmi összefoglalásban, ill. a részletes kifejtésben/. Négy fonaltípust különböztettünk meg: "fiatal

vegetativ", "átmeneti vegetativ", "öreg vegetativ" és "reproduktív".

"Fiatal vegetativ" fonalaknak azokat tekintjük, melyeknek citoplazmájában - egyezően Prokofyeva-Belgovskaya /1963/ megfigyeléseivel - sok az RNS és ezért bazofilek. Sejtmagjuk laza szerkezetű, kiterül a fonal tengelyében és halványan festődik, elmosódott határu. Metilzöld-pironin festéssel a nagy mennyiségű RNS festődése elfedi a magot. PAS-reakcióval kevés és homogén elosztású PAS-pozitív poliszacharidot látunk ezekben a fonalakban. Az un. reflektáló szemcsék kezdetben hiányzanak, később megjelenik egy-egy, számuk, sűrűségük lassan nő.

"Átmeneti vegetativ" fonalak: a fiatal vegetativ fonalaktól alakulnak ki. A módszerekben leírt citoplazma-fal-festési eljárással festve, olajimmenziós felülvilágító objektívvel /kombinált tükrözött-áteső fényben/ vizsgálva igen sok csillogó reflektáló szemcse és szakasz látható bazofil citoplazmájukban. Ezek csaknem teljesen kitöltik a citoplazmát. Más citológiai sajátosságaikban kezdetben megegyeznek a fiatal vegetativ fonalakkal, később az öreg vegetativ alakokhoz közelítenek.

"Öreg vegetativ" fonalak: citoplazmájukból eltűntek a reflektáló szakaszok, szemcsék. Egyezően Prokofyeva-Belgovskaya leírásával citoplazmájuk bazofiliája a csökkenő RNS-tartalomnak megfelelően egyre csökken, magjuk festhetősége javul. Saját megfigyeléseink szerint a ma-

gok jobb festődése nem csupán a plazma csökkent basofiliájából adódik. A magvak szerkezete a Feulgen reakcióból ítélve is tömörebb, intenzívebben festődik, környezetétől élesebben elhatárolódik. Egyes magvak szerkezete extrém mértékben tömör, "heterokromatikus"-nak nevezhető. Egy-egy maghoz nagyméretű citoplazma tartozik /Szeszák et al. 1973/. A fonalakban különféle anyagok halmozódhatnak fel. Jellegzetesek a poliszacharid felhalmozódásból adódó PAS-pozitív "pálcák", azaz citoplazma-szakaszok. A degenerálódás során a fonal vakuolizálódik, anyagai fokozatosan lebomlanak, végül autolízis következik. A lizált fonalak maradványai könnyen felismerhetőek. Ebben a fonaltípusban igen változatos alakokat tudtunk kimutatni /Szeszák, Szabó, Vitális, 1967/.

"Reproduktív" ágak: a vegetatív fonalakból nőnek ki és szerepük mély fermentációban, a felszíni telepek légmycéliumának szerepével egyezik. Szerkezetük is a legfontosabb jegyekben egyező. Bennük a magvak - egyezően Hopwood és Glauert /1960/, Prokofyeva-Belgovszkaya /1963/ és Shamina /1964/ adataival - sűrűbben található, mint a vegetatív fonalakban. Saját megfigyeléseink szerint a reproduktív ágak magjai tömörebbek a fiatal vegetatív fonalakénál, de nem annyira kondenzáltak, mint az öregedő fonalakban. Feulgen-reakcióval is, metilzöld-pironin festéssel is jól előtűnnek, határuk azonban kis-

sé elmosott. A reproduktív ágakban különösen - képződésük kezdeti szakában - gyakoriak az "oszló" magvak, melyek az ág kiindulásánál, ágközépen, ágvégen kb. azonos gyakorisággal találhatók. A reproduktív ágakban az egy magra eső citoplazma térfogata lényegesen kisebb, mint vegetatív fonalakban és a fiatal fonalakhoz hasonlóan nagy bennük az RNS koncentrációja, azaz kifejezetten bazofilak. Az ágak fala vastag és kifejezetten festődik. PAS-pozitív poliszacharidok csak a sejtfal közelében találhatók, nem töltnek ki citoplazma-szakaszokat. Jellemző a harántfalak képződése és a spóráképzés előrehaladtával sűrűbb elhelyezkedése. A reproduktív ágakban nem találunk "reflektáló" szemcséket.

A citológiai jellemzést kémiai és biokémiai mérések eredményeivel vetettük egybe. A DNS mennyisége arányos a genomok, tehát a genetikai szempontból sejttel egyenértékű egységek számával. A sejtszám mérésére a fonalas növekedés miatt streptomyceseknél nincs is más lehetőség, ui. a "telepképző egységek" száma ugyanazon tenyészet esetében is változó /tördeléssel pl. jelentősen fokozható/. A telepképző egység mennyiségileg nem vagy alig definiálható fogalom, nem alkalmas vonatkoztatási alap. A fehérjék mennyisége közelítően a potenciálisan aktív, élő citoplazma tömeggel tekinthető arányosnak. Az RNS-tartalom a fehérjeszintetizáló kapaci-

tásról ad felvilágosítást. Ezeknek a komponenseknek a méréséből, arányainak kiszámításából információt nyerünk a sejtszámról, az egy sejtmaghoz tartozó citoplazma átlagos nagyságáról, az egy sejtmagra, ill. az "egységnyi" citoplazma tömegre eső RNS /zömmel riboszómális és transzfer-RNS/ relativ mennyiségéről /Az arányokból egyszerű szorzással megkaphatók az abszolút mennyiségek is/. A S. gr. 45H törzs esetében módunk volt ezek változását a reproduktív ágakban, ill. vegetatív fonalakban külön-külön is vizsgálni.

Az életciklus egyes szakaszainak jellemzésére felhasználható adatok harmadik csoportját a markerként választott enzimek aktivitásának mérésére szolgáltatta. Ezek kiválasztásában az vezetett, hogy ezek az életciklus egyes szakaszaiban feltűnően és jellegzetesen változnak. Ezeknek az enzimeknek a szerepe az életciklus fejlődési folyamataiban ismeretlen. Az is lehetséges, hogy változásaik csak másodlagos kísérői, következményei a szakaszváltásoknak. A különböző proteázokról és az alkalikus foszfatázról bacillusokban kimutatták, hogy termelődésük szorosan kapcsolódik a sporulációs program megindulásához, ill. előrehaladásához /Schaeffer, 1969; Mandelstam, 1969; Balassa, 1971; Slapikoff et al. 1971; Coote, 1974; Balassa et al. 1975; Szulmajster, Keryer, 1975; Bott, 1976/. Szerepük mégis tisztázatlan a bacillusok sporulációjában is, annak ellenére, hogy a

kérdést hosszú idő óta sokan, sokoldalúan és intenzíven tanulmányozzák. A streptomycesek életciklusának spóra-képző szakaszában is a proteázok termelődésének megindulását és az alkalikus foszfatáz termelődésének jelentős fokozódását észleltük. Streptomycesek esetében is fennáll és bizonyításra szorul annak lehetősége, hogy ezek az enzimek a sporulációs program keretében termelődnek. A β -glükózidázról és β -galaktozidázról egyik *S. griseus* N^o 45H-ből előállított mutánsban. Erdei és mtsai /1972/ mutatták ki, hogy a vegetatív életszakaszban éri el maximumát. Ezeknek az enzimeknek még kevésbé ismert a feladata, mint a proteázoknak és alkalikus foszfatáznak.

Az irodalomban sok olyan adatot találtunk, melyek különböző *Streptomyces* fajokban, különböző enzimek mennyiségének az életciklus során megfigyelhető többé-kevésbé jelentős változásairól számolnak be. Ezeket a IV.1. 5. táblázatban foglaltuk össze /"++" jelzéssel a maximumot, "+" jelzéssel az alapszint és maximum közötti értékeket jelölve. Az életciklus egyes szakaszainak az időbeli határait a közölt növekedési görbékből következtettünk/.

A felsorolt enzimek, ill. biokémiai-kémiai jellemzők között sok olyan van, mely nem hiányozhat egyetlen élő sejtből sem. Ezek - annak ellenére, hogy relatív mennyiségük változik - nem sorolhatók sem a vegetatív,

IV.1.5. táblázat. Különböző enzimek és biokémiai jellemzők változása
Streptomycesekben az életciklus során

Enzim, ill. biokémiai aktivitás	Csirázás	Vegetatív fázis		Reproduktív fázis		Irodalmi forrás
		kvázi exponen- ciális növekedés	átmeneti szakasz	reproduktív növekedés	spóráképzés, ill. öregedés és lizis	
I. Aminósavak szintézise és transzportja						
Acetohidroxisav szintetáz	.	++	+	.	.	6.
Dezoxi-D-arabino-heptulonsav-7 foszfát szintetáz	+	++	+	.	.	12.
Prefénsav dehidrogenáz	.	++	++	.	.	12.
Korizminsav diszmutáz	.	++	++	.	.	12
Aminósavakat transzportáló enzimek /sejtmembránban/	.	++	.	?	?	11.
II. Fehérjék szintézise:						
¹⁴ C-leucin beépülése	+	++	+	.	.	8.
III. Zsirsavak szintézise						
.	.	++	.	.	.	2.
IV. Citrátkör és kapcsolódó biokémiai aktivitások:						
Citrát szintetáz	.	.	.	++	+	8
Izocitrát-dehidrogenáz	.	++	+	.	.	8
Akonitinsav-hidratáz	.	++	+	.	.	8
Fumársav hidratáz	++	8
Malát-dehidrogenáz /E.C. 1.1.1.37./	.	.	.	++	++	8
Malát-dehidrogenáz dekarboxiláló /E.C. 1.1.1.40./	.	++	+	.	.	8
Acetil-CoA-karboxiláz	.	++	.	++	.	3
V. Energia-átalakítás és polifoszfátok anyagcseréje:						
Citoplazmában ATP koncentrációja	.	++	.	++	.	7
Membránhoz kötött ATP-áz aktivitás	.	.	++	.	.	7
Citoplazma oldható ATP-áz aktivitása	.	.	.	++	.	7
ATP-polifoszfát foszfo-transzferáz	++	++	+	.	.	7
Polifoszfát-glükóz foszfo-transzferáz	.	.	.	++	++	7
Pirofoszfát-foszfo-transzferáz	.	.	.	++	.	10
VI. Hidrolázok:						
Exocelluláris proteázok:						
eszteráz típusúak	∅	∅	+	++	++	13
kazein-bontással mérve	∅	∅	.	+	++	13

Anson szerint, hemoglobin szusztrát- tal	∅	∅	++	+	++	5
amidáz típusuak	∅	∅	.	+	++	13
Exocelluláris peptidázok	∅	∅	∅	+	++	13
Exocelluláris RN-áz	.	.	.	+	++	4
Exocelluláris alkalikus foszfatáz	.	.	++	+	++	5
Exocelluláris DN-áz	.	.	+	++	+	1
Intracelluláris α-mannozidáz	.	.	+	++	.	9
Intracelluláris β-galaktozidáz	.	+	++	.	.	5
Intracelluláris β-glükozidáz	.	+	++	.	.	5

Az egyes életkoroknak megfelelő fejlődési szakaszra az irodalmi forrásban közölt növekedési görbék alapján következtettünk

- Irodalmi források:
1. Baskova et al., 1967. -
 2. Behal, Cudlin, Vanek, 1969. -
 3. Behal, Vanek, 1970. -
 4. Bezborodov et al., 1967. -
 5. Erdei et al., 1972. -
 6. Horváth, 1971. -
 7. Hošťalek et al., 1974. -
 8. Hostalek, Vanek, 1973. -
 9. Kollár, 1958. -
 10. Kulayev et al., 1976. -
 11. Langheinrich, Ring, 1976. -
 12. Lowe, Westlake, 1972. -
 13. Tzyperovich et al., 1975. -

Jelölések: ∅ = nincs, . = alapszintnek megfelelő, + = kissé fokozott
++ = maximális aktivitás, ill. mennyiség, ? = nincs adat

sem a "reproduktív" programhoz /Ez összevethető azzal a Linn és Losick - 1976 - által *Bacillus subtilis*ben kimutatott ténnyel, hogy a vegetatív szak fehérjéi közül csak néhánynak a termelése szűnik meg és kevés új fehérje szintézise indul a sporuláció során./.

Folyékony táptalajban tenyésztett streptomycesek életciklusának leírásában használható keretként kissé módosítva megőrizzük a Prokofyeva-Belgovskaya által bevezetett szakaszokra osztást.

Az életciklus vegetatív és reproduktív fázisokra osztását minden kísérleti adattal összhangban lévőnek találtuk és megtartottuk. A vegetatív fázison belül a csirázás és növekedés mellett szükségesnek tartjuk az első litikus vagy átmeneti szakasz megkülönböztetését. Az "intenzív növekedési szakasz" helyett szerencsésebbnek tartjuk a "vegetatív/vagy kvázi exponenciális/növekedési szakasz" elnevezés használatát. A reproduktív fázison belül a "reproduktív növekedés" és a "spóráképzés és lizis" szakaszának megkülönböztetése indokolt.

Az életciklus egymást követő szakaszai
mélyfermentációban

I. Vegetatív fázis

1. Csirázás: Attwell és Cross /1973/ és Kalakoutskii /1976/ felfogásával egyetértve az érett spórákból a ve-

getativ fonalak kinövésének teljes folyamatát értjük csirázáson, melynek három alszakaszát /nedvesedés, duzzadás, csira kibujása/ lehet megkülönböztetni.

Az 52-1 törzs spórái viszonylag szinkron csiráznak: a leoltás után 4 órával láthatók az első kibujt csirák, 6 órás korra a spórák 80, 8^h órás korra 90 %-a már kicsirázott. A spóraszuszpenzió RNS tartalmának növekedése kémiai módszerekkel kimutathatóan már a nedvesedés után még leoltás előtt megkezdődik /Száras spórák RNS:DNS aránya 0,6-1:1 - Kalakoutschii et al. 1970; Valu és Szabó, 1970; - ez a nedvesedés után még leoltás előtt 2:1 körüli értékig nőhet/. Leoltás után az RNS szintézise a csirák kibujásáig kissé lassabban, majd gyorsulva folytatódik. A fehérjék mennyisége a csirák kibujása előtt igen lassan nő, a csirák kibujásával egyidejűleg gyorsul a növekedése. A DNS mennyisége az első csirák megjelenéséig változatlan, 4 órával leoltás után kezd emelkedni. Összehasonlítva Nagatsu és Matsuyama /1970/ adataival a szintézisek kezdetében és sebességében mutatkozó eltérések magyarázhatók az eltérő módszerekkel, eltérő érzékenységgel, esetleg a különböző törzsek eltérő viselkedésével /pl. a detektálható H³ timidin-beépülés nem feltétlenül jelenti kémiailag kimutatható mennyiségű DNS szintézisét/.

A 45H törzs spórái nehezebben nedvesedtek, nem csiráztak szinkron /Csirázásuk 5 - 12 órás kor között el-

huzódva zajlott, a vele kapcsolatos kémiai és biokémiai változások keveredtek a következő szakasz eseményeivel/.

A csirázás citológiaiailag is, biokémiaiailag is átmenet a spórák és a vegetatív fonalak között. Kb. egy DNS-replikáció zajlik ebben a szakaszban. Jelentősen növekszik az RNS:DNS arány /kb. 7:1 értékig/, nő a fehérje:DNS arány is /kb. 6:1-ről 9-10:1-re, ha Lowry szerint mérjük/. Azaz a csirázás végére létrejönnek a tipikus vegetatív sejtek a rájuk jellemző igen bazofil citoplazmával, melyből több jut egy magra, mint a minimumot képviselő spórákban. A kinőtt csirák viszonylag vastagfalú, nagyobb átmérőjű bazofil fonalak, emlékeztetnek a reproduktív alakokra /A tipsusos festődésű, vékonyabb vegetatív fonalak a következő fejlődési szakasz végén a növekedés és az ágaképzés során jelennek meg./.

Kalakoutskii és mtsai /1970/ csirázás közben az 1 mg szárazanyagra eső DNS mennyiségének csökkenését tapasztalták. Eredményük az általunk alkalmazott megközelítési mód alapján jól értelmezhető: nő az egy magra jutó citoplazma tömege, azaz a szárazanyag mennyisége is.

2. Vegetatív növekedési szak: Prokofyeva-Belgovskaya felosztásában az ún. "intenzív növekedés" szakaszának felel meg. Gyakran nevezik "exponenciális", ill. "logaritmus" vagy "kvázi-exponenciális" növekedési szakasznak is. A növekedési görbe ebben a szakaszban emlékeztet az

egyszerűbb baktériumok populációs ciklusának exponenciális szakaszára, de attól több fontos jellemzőjében lényegesen különbözik.

Az 52-1 tenyészetekben a csirázást olyan életszakasz követi, melyben a DNS mennyiségének növekedése igen jól illeszkedő exponenciális egyenlettel írható le. Ennek a szakasznak a kezdete és vége a használt táptalajtól, a leoltott spóraszámától, tenyésztési körülményektől, elsősorban az oxigénellátástól függ. Azonos spórasűrűséggel leoltva ugyanazon pufferezett szójas táptalajra a levegővel intenzívebben keveredő 500 ml-es lombikban nőtt tenyészetben 7 és 16 óras kor között, fiolában 12 és 20-24 óras kor között van "kvázi-exponenciális" növekedés. Ebben a szakaszban kb. ötször duplázódik meg a DNS mennyisége /átlagoltan számítva/. Ez a megfigyelés egyezik a Bormann és Christner /1976/ által leírtakkal. Az egyszerűbb baktériumok valódi exponenciális növekedési szakában a sejt különböző komponenseinek aránya végig változatlan, a növekedés "kiegyensúlyozott". A szárazanyag, RNS, DNS, fehérjék, stb. mennyiségének kiindulási értékre vonatkoztatott relatív növekedését ugyanaz az exponenciális egyenlet írja le /Koch, 1971; Singh, 1976/. Ezzel ellentétben a streptomycesek vegetatív növekedési szakában az RNS és fehérjék mennyiségének változása nem írható le ugyanazon exponenciális egyenlettel. A fehérje:DNS és RNS:DNS arány a vegetatív növekedési szakban igen nagymértékben változik, maxi-

mumon halad át.

A fehérjék és nukleinsavak összegzett mennyiségének növekedése nem írható le exponenciális egyenlettel. Ez a megfigyelésünk egyezik Langheinrich és Ring /1976/ szárazanyag növekedésre vonatkozó megállapításával /Olyan irodalmi adatot nem találtunk, mely a vegetatív növekedés feltételezett exponenciális jellegét kellő sűrűséggel vett minták mérésével támasztotta volna alá./.

Schumann és Bergter /1976/ kiválasztott spórákból kinövő fonalak szilárd felszínen /mikroszkóp alatti/ növekedésének kinetikáját sűrű időközönként készített fényképfelvételeken analizálták. Azt találták, hogy a mycélium egészének növekedése az ágaképzések révén válik közel exponenciálissá. Saját eredményeinkre vonatkoztatva ez azt jelenti, hogy a DNS-növekedésének exponenciális időszakára eső átlag kb. 5 duplázódás egyenlőtlenül oszlik meg a populációban: a csucsi magvak ennél lényegesen többször, más magvak lényegesen kevesebbszer oszlanak. Azaz a sejtek nagyságában és makromolekuláris arányaiban kimutatott szakadatlan időbeli változáshoz egy adott időpontban is a különböző sejtek, pontosabban különböző helyzetű fonalszakaszok közötti különbségek társulnak /legegyszerűbb változatban: növekvők és nem növekvők/.

A felsorolt eltérések a baktériumok növekedésének valódi exponenciális szakaszától annyira nagyok és alapvetőek, hogy azonos elnevezés használata félrevezető len-

ne / esetleg megalapozatlan következtetésekre vezetne/.

A vegetatív növekedési szakaszban a "fiatal vegetatív" fonaltípus egymástól kisfokban különböző változatai találhatóak meg a mikroszkópi képen.

A kémiai összetételben az igen magas /a 10:1 értéket is meghaladó/ RNS:DNS arány jellemző erre az életszakaszra. Magas a protein:DNS arány is /15-20:1 körüli érték jellemző/. Igen gyors az RNS- és fehérjeszintézis. A magas RNS:DNS és fehérje:DNS arány általában megfelel a gyorsan növekvő fonalak nagy biokémiai aktivitásának. Ebben az életszakaszban a gyors fehérjeszintézis nemcsak a fehérjetartalom gyors növekedésében mutatkozik. Valu /személyes közlés/ egységnyi RNS-re számított in vitro poli-U irányított fenilalanint beépítő kapacitás kiugró maximumát a vegetatív növekedési szakasz harmadik harmadából származó sejtek extraktumában mérte /S. griseus 52-1/. Hošťálek és Vaněk /1973/ C^{14} -leucin in vivo beépülésében, Běhal és Jilek /1969/ az in vivo zsírsavszintézisben mértek igen éles csúcst a S. aureofaciens életsiklusának vegetatív növekedési szakában.

A marker enzimek közül a β -glükózidáz és a β -galaktozidáz egységnyi DNS-re számított aktivitása a vegetatív növekedési szakaszban gyorsabban nő, mint egyéb fehérjék mennyisége. Csúcserőértéküket a vegetatív növekedési szakasz végén, az átmeneti szakasz elején érik el. Maximumuk a jól differenciálódó törzs tenyészetében igen

kifejezett, a következő fejlődési szakaszban rendkívül gyors ütemben csökken mennyiségük. Egyébként a 45H törzstenyészetében az elhuzódó csirázás miatt a fiolákban a vegetatív növekedés elhuzódóbb, később ér véget. Lefolyását a leoltáskor használt spórasűrűség is befolyásolja /pl. Erdei és mtsai - 1972 - kísérletében a szokásosnál százszor nagyobb spórasűrűséggel végzett leoltás 500 ml-es lombikban igen élesen elkülönülő és gyorsan lezajló vegetatív növekedési szakaszt eredményezett/. A tenyészet sűrűségének hatása a fejlődési folyamatok sebességére a sejtek kölcsönhatásával magyarázható /1. Szabó, Vályi-Nagy, 1957; Vályi-Nagy, Szabó, 1957/.

3. Átmeneti vagy első litikus szakasz: Prokofyeva-Belgovskaya felosztásában nem szerepel. Külön szakaszként való tárgyalását az indokolja, hogy átmenetet képez a vegetatív növekedés és a reproduktív szakasz között, de mindkettőtől lényegesen különbözik a fonalak felépítését és aktivitását tekintve.

A vegetatív növekedési szak végén lassuló sebességgel növekvő DNS felhalmozódása leáll, gyakran a meglévő DNS mennyisége néhány százalékkal csökken is. Az RNS mennyisége kifejezetten csökken és csökken a fehérjék mennyisége is. A citológiai képben a fonalak bazofiliájának kisfokú csökkenése mutatkozik, a fonalak többsége "reflektáló szemcsékkel" telt. Fonalak oldódására utaló jel kevés van vagy hiányzik.

A vegetatív növekedésre jellemző marker-enzimek mennyisége gyorsan csökken a fejlődés előrehaladtával.

A szakasz kezdetén kisebb csucst érnek el az intracelluláris és extracelluláris proteázok. Hatásukra bizonyos citoplazmatikus fehérjék /köztük a vizsgált markerenzimek is/ degradálódnak. Ezzel lezárul az életciklus vegetatív fázisa, melyet az antibiotikum termelés szakemberei "trofofázis"-nak is neveznek.

II. Reproduktív fázis

1. Reproduktív növekedési szakasz: Prokofyeva-Belgovskaya "lassult növekedési" szakasznak nevezte.
Az átmeneti első litikus szak után 30-36 óras kör körül újabb növekedés indul meg, mely a vegetatív növekedéstől nemcsak sebességében, hanem típusában is különbözik. Ennek jellegzetességei - mivel az 52-1 törzs differenciálódása folyékony közegben zavart és nagymértékben gátolt - elsősorban a 45H tenyészetekben mutatkoznak meg határozottan.

Ebben a szakaszban a fehérjék és az RNS mennyiségének növekedése elmarad a DNS mennyiségének növekedése mögött, ennek következtében jelentősen csökken mind az RNS:DNS, mind a fehérje:DNS arány.

A fonalak két irányban differenciálódnak: öregező vegetatív fonalak és reproduktív ágak különböztet-

hetők meg. A fehérjék és a DNS növekedésének több mint 30 %-a a reproduktív ágakra esik, melyek 36 és 72 órás kor között növekednek. Míg a vegetatív fonalak RNS tartalma ebben a szakaszban jelentősen csökken, a reproduktív ágakban lévő RNS mennyisége az ágakkal együtt növekszik.

Mind a citológiai, mind a kémiai vizsgálatok azt mutatják, hogy a reproduktív alakok nem az öreg vegetatív fonalak átalakulásával jönnek létre. A képződő reproduktív ágak kezdettől külön citológiai típusként tűnnek fel. Az ultrahang-érzékeny, ill. reziztens fonalak kémiai különbségei sem csökkennek, inkább fokozódnak az idősebb tenyészetekben.

Feltűnően jó egyezés van a reproduktív ágak citológiai módszerekkel megfigyelt és kémiai mérésekkel nyert jellemzői között: egységnyi DNS-hez lényegesen kevesebb citoplazma tartozik - a fehérje:DNS arány az UH-reziztens frakcióban minden életkorban sokkal alacsonyabb, mint a szenzitív frakcióban. A fehérje:DNS arány az UH-érzékeny frakcióban is csökken a tenyészet korával. A reproduktív ágakban "oszló" magvakat látunk.

Prokofyeva-Belgovskaya et al. /1958/, Shamina /1964/, Hopwood és Glauert /1960/ szerint is a légmycélium és spóráképzés elengedhetetlen feltétele az intenzív DNS-szintézis.

A reproduktív ágak - mivel bennük egy maghoz sokkal

kevesebb citoplazma tartozik, - annak ellenére, hogy RNS:DNS arányuk azonos, sokkal bazofilebbek a vegetatív fonalaknál. A DNS nemcsak a reproduktív ágakban replikálódik. A reproduktív növekedés szakában az idős vegetatív fonalak magjai is duplázódnak egyszer, miközben a citoplazma fehérjéinek mennyisége kb. 20 %-kal megnövekszik. Ezekben a reproduktív ágakkal együtt fejlődő öreg vegetatív fonalakban nem halmozódnak fel extrém mértékben raktározott anyagok /pl. PAS-pozitív pálcák/.

A reproduktív növekedés szakaszára mérsékelten emelkedett intracelluláris és extracelluláris proteázaktivitás jellemző /A különböző proteáz féleségek arányának és mennyiségének differenciálódással kapcsolatos változásai még feltérképezésre várnak és további adatgyűjtést igényelnek./ . Az alkalikus foszfatáz mennyisége /legalábbis extracellulárisan/ szintén mérsékelt emelkedést mutat ebben a szakaszban.

Az 52-1 törzs zavart sporulációja abban is tükröződik, hogy nem alakul ki a reproduktív növekedési szakaszra jellemző alacsony fehérje:DNS arány. Az RNS:DNS arány a 45H tenyészetekhez hasonló mértékben csökken. Az intracelluláris és extracelluláris proteázok relatív mennyisége lényegesen meghaladja a jól differenciálódó törzsét. Az alkalikus foszfatáz mennyisége is inkább magasabb. A citológiai vizsgálatok igen változatos megjelenésű, a 45H tenyészetekben elő sem forduló, "öreg ve-

getativ" fonalak megjelenését mutatják. Igen jellegzetes a nagymennyiségű raktározott poliszacharid /bizonyos körülmények között polifoszfát/ a fonalak nagyrésztében. A heterogenitás fizikai módszerekkel is kimutatható /pl. enyhe darabolás után a fonalak sűrűségi gradiens centrifugálással történő frakcionálása - Szeszák, Szabó, Vitális, 1967; Szabó, Szeszák, Vitális, 1968/. A citológiai eredmények analízise arra mutat, hogy a reproduktív ágak fejlődése abban a törzsben is megindul az első litikus szakasz után, de korán elakad. A magvak elhelyezkedésének sűrűsége alapján pl. két fonaltípust lehetett megkülönböztetni: egyikben a mag:citoplazma arány 0,129, a másikban 0,296 volt /Szeszák et al. 1973/. Ez a két típus egybevethető a vegetatív, ill. reproduktív irányban fejlődésnek indult típusokkal. A streptomycin termelése erre az életszakaszra esik. Más antibiotikumokat termelő törzsekben is ebben a szakaszban zajlik az ún. "szekunder metabolizmus".

2. Spóráképzés és autolízis szakasza /morfogenetikus szakasz/: Prokofyeva-Belgovskaya is ugyanezen a néven említi. Lényege a növekedés befejeződése után a reproduktív ágakból a spórák kialakulása.

A reproduktív ágakból harántfalak képződésével különülnek el egymástól a spórák. Ezt a jellegzetes spórafal és spóraszerkezet kiépülése, a spórák lekerekedése követi. /Wildermuth, Hopwood, 1970; Chater, Hopwood, 1973; Hardison, Manzanal, 1976/. Fénymikroszkóppal mind a harántfalak

megjelenése, mind spórák lekerekedése jól megfigyelhető. PAS-reakcióval a 45H törzs reproduktív ágaiban a PAS-pozitív anyagok spórafalba való átépülését figyeltük meg.

Kémiai, biokémiai szempontból jellemző: Az UH-reziz-tens frakcióban kialakulnak a spórákra jellemző arányok. A fejlődés előrehaladtával az alkalikus foszfatáz és a proteázok mennyisége jelentősen csökken. Az előregedett vegetatív fonalak elpusztulnak, autolizálnak e szakasz végén.

Az 52-1 törzs folyékony tenyészetében a spóráképzés nem mutatható ki, csak az öreg fonalak autolizise látható. Ez a makromolekuláris sejtkomponensek mennyiségének fokozatos csökkenésében is tükröződik.

Ebben az életszakaszban már nincs DNS- és fehérjeszintézis, vagyis a növekedés megszűnt. Ez nemcsak a spórák képző 45H törzsrre, hanem a sporulációjában gátolt 52-1 törzsrre is érvényes. Az enzimindukció tanulmányozása során azt tapasztaltuk, hogy az öreg tenyészetek növekedési képessége akkor sem tér vissza öt órán belül, ha friss táptalajban szuszpendáljuk a fonalakat.

A streptomycesek életciklusa és differenciálódásuk genetikai programja

Monod és Jabob /1961/ feltételezése szerint a differenciálódási folyamatok olyan meghatározott indukciók sorozatával magyarázhatók, melyek megvalósulása gátolja

az előzőleg működő operont és kiváltja a soronkövetkező indukcióját. A differenciálódásra vonatkozó feltételezésüket sem egyértelműen cáfolni, sem bizonyítani nem sikerült eddig.

Bacillusokban kétségtelenül sok olyan gén található, melyek a vegetatív szakban nem működnek vagy nem fontosak, viszont a sporulációban nélkülözhetetlenek. Ezek meghatározott sorrendben lépnek működésbe és a sorrendben előbb következő gén működésének elmaradása akadályozza a később következők aktiválódását /Balassa, 1971/. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy /ha bonyolultabb formában is, mint azt az eredeti hipotézis feltételezi/ a szekvenciális indukció a bacillusok spóraképzésében alapvető szerepet játszik.

Streptomyces coelicolorban két olyan géncsoportot irtak le, melyek működésére a légmycélium-, ill. a spóraképzés folyamatában van szükség /Chater, 1972; Chater, Hopwood, 1973; McVittie, 1974; Chater, Merrick, 1976; Merrick, 1976/. A bld gének mutációja megakadályozza a légmycéliumképzést. Egyik típus, az ún. "soft bld" mutánsok bontó enzimek termelésében derepresszálnak látszanak. A fehér színű telepeket képző whi mutánsok a légmycéliumok spórákká alakulásában defektesek. Ezek a géncsoportok is a fejlődés meghatározott szakaszában lépnek egymásután működésbe: a dupla mutánsok ui. a korábban funkcionáló génnek megfelelő blokkot mutatják

csak.

Streptomyces griseus törzseinkben szekvenciális aktiválás-inaktiválás tételvezethető fel az életciklus egyes szakaszaira jellemző marker-enzimek aktivitásának változásában is. Az általunk vizsgált proteázaktivitás és alkalikus foszfatáz a nem spórázó törzs tenyészetében is megjelenik. Nem ezek hiánya okozza az elakadást, azt későbbi stádiumban kell feltételeznünk. A reproduktív növekedésre jellemző enzimeknek a 45H törzs morfogenezisével párhuzamosan kimutatható csökkenése, termelésének repressziója elmarad /Az 52-1 törzs felszíni tenyészetben spórát képez, sporulációja csak folyékony tenyészetben akad el/.

A megfigyelt citológiai képek és biokémiai aktivitások alapján a streptomycesekben három genetikai program feltételezése látszik indokoltnak: 1. vegetatív növekedést, 2. reproduktív ágak fejlődését, azaz a spóráképzést, 3. a reproduktív szak öreg vegetatív formáinak változásait vezérlő programok /A 3. program feltételezését az öreg vegetatív alakok és reproduktív ágak eltérő biokémiai aktivitása és fejlődése indokolja/. A marker enzimek egy része ezeknek a programoknak a be- és kikapcsolását, ill. előrehaladását jelezheti.

További vizsgálatokat kíván annak eldöntése, hogy egyes marker-enzimek megjelenése mennyire a program által endogén módon vezérelt vagy megjelenésükhöz mi-

lyen mértékben szükségesek indukáló hatások. Tisztázatlan a táptalajösszetétel által kiváltott módosulások visszahatása a tenyészet fejlődésére /Prokofyeva-Belgovskaya 1963-ban még teljes egészében ezzel magyarázta a változásokat/. Érdekes ebben a vonatkozásban az a megfigyelésünk /1. következő fejezet/, miszerint vannak táptalajok, melyekben a fejlődés elakad, a vegetatív fázis végére jutott fonalak autolizálnak és új fiatal vegetatív fonalak nőnek helyettük.

Vizsgálataink eredményei lehetővé teszik az egyes életszakaszok felismerését és ezzel használhatóbb keretet adnak a tenyésztési kísérletek értékeléséhez és lehetőséget teremtenek az egyes szakaszok szabályozásának részletesebb vizsgálatára.

A differenciálódásukban gátolt Streptomyces griseus törzsek, ill. mutánsok fejlődésének a blokkon való áthaladását eddig két endogén termelődésű anyaggal sikerült kiváltani:

Az egyik, a Khokhlov munkacsoportja által felfedezett és tisztított A-faktor, kismolekulájú, lipofil természetű, két oxocsoportot és két oldalláncot hordozó γ -lakton /Khokhlov, Tovarova, 1972; Kleiner et al. 1976/. Az A-faktor termelésére képtelen törzsek nem termelnek streptomycint és nem képeznek spórát. Az A-faktor ezekben a törzsekben pleiotrop hatást fejt ki: közvetve, egy inhibitor termelődésén keresztül gátolja

a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitását és helyreállítja mind a streptomycin termelésére, mind a spóráképzésre való képességet /Khokhlov et al. 1973; Voronina et al. 1975/.

A Streptomyces griseus differenciálódására ható másik endogén anyag az általunk kimutatott C-faktor. Kb. 20 000 dalton a molekulasúlya és proteázokkal hatás-talanítható. A streptomycint termelő és folyékony táptalajban elakadó differenciálódású 52-1 törzsből a jellegzetes reproduktív ágak tömeges kialakulását váltja ki /Szabó et al. 1966, 1967 a., b., Vitális, Szabó, 1969/. Mivel az 52-1 törzs termel streptomycint, differenciálódásának elakadását nem az A-faktor hiánya okozza a blokk későbbi lépésekben van. A C-faktor a blokkot oldja és a reproduktív ágak kialakulása nemcsak morfológiai módszerekkel mutatható ki, megjelennek annak biokémiai markerei is.

E két reguláló faktorról szerzett ismeretek valószínűsítik a szekvenciális indukciók szerepét a Streptomycesek differenciálódásában. Feltehető, hogy a szekvenciális indukciók sorozata nemcsak lineárisan egymást követő lépésekből áll, hanem csomópontjai is vannak, melyek több egymással párhuzamos eseménysort kapcsolnak. Ennek a rendszernek a tanulmányozása a jövő feladatai közé tartozik.

Összefoglalva az életciklusról mondottakat:

1. A Streptomycesek életciklusának szakaszai mind citológiai, mind biokémiai vizsgálatokkal megkülönböztethetők egymástól. Az egyes szakaszok lényege, legfontosabb folyamatai csak a különböző módszerekkel nyert eredmények egybevetésével értelmezhetőek.
2. A Streptomyces tenyészetek korát egyértelműen jellemezni lehet azzal a fejlődési szakasszal, amelybe életciklusuk eljutott. A leoltástól eltelt idő ugyanakkor nem jellemzi egyértelműen a tenyészetet.
3. A vegetatív fázisban a biomassza felhalmozása, a reproduktív fázisban a reproduktív ágak megjelenése, növekedése és spórává fejlődése a legfontosabb biológiai folyamat. A növekedési szakasz és a reproduktív fázis kezdete közé egy, átépülésekkel és részleges lizissel jellemezhető átmeneti szakasz iktatódik.
4. Az egyes szakaszokat kémiai-biokémiai vonatkozásban nem a mérhető paraméterek abszolút nagysága, inkább azok relatív értéke és változásának iránya jellemzi.
5. Az egyes szakaszokon belül is állandóan változik a fonalak összetétele és mikroszkópi képe. Az állandó lassu változás a kvázi-exponenciális növekedés közben is kimutatható /ellentétben más baktériumok valóban exponenciális szaporodási szakaszával/.

6. A kvázi-exponenciális növekedésre a bazofil, közel homogen festődésű citoplazma, az RNS:DNS aránynak a szakasz második felére eső magas csucsértéke és a növekvő fehérje:DNS arány jellemző.
7. Az átmeneti szakasz kezdetére a β -galaktozidáz és β -glükózidáz eléri egyetlen, az alkalikus foszfatáz és a proteolitikus aktivitás pedig első csucsértéküket. Mikroszkópi vizsgálattal a reflektáló szemcsékkel telt fonalak tömeges megjelenése jellemző
8. A reproduktív fázist a reproduktív ágak megjelenése és kémiaiailag is mérhető növekedése vezeti be. A fonalak fejlődése két igen különböző úton halad a spóráképzés /reproduktív fonalak/, ill. az autolízis /öreg vegetatív fonalak/ felé.
9. A spórák képződésével párhuzamosan egy második csucs alakul ki az alkalikus foszfatáz mennyiségében és a proteolitikus aktivitásban. Később ezeknek az enzimeknek csökken a mennyisége. Ebben a fejlődési szakaszban az endocelluláris proteázok tulnyomó hányada az öreg vegetatív fonalakban található.
10. Folyékony táptalajban a *S. griseus* 52-1 törzs vegetatív növekedése zavartalan, de reproduktív fejlődése igen korai stádiumban elakad. Mikroszkópos vizsgálatokkal nem láthatók tipikus reproduktív ágak, a makro-

molekuláris komponensek aránya sem utal jelenlétükre. A reproduktív alakok normális továbbfejlődésének gátlottsága egyes enzimek, ill. produktumaik nagymérvű felhalmozódásához vezet az igen heterogén fonalpopulációban /pl. poliszacharidok a citoplazmában/ vagy a közegben.

Ismertek más reprodukcióban blokkolt mutánsok is. A blokk az esetek egy részében specifikus faktorokkal oldható.

11. A fejlődési szakaszok két szinten értelmezhetőek:

1. Az individuális fonalak helyesebben egymással teljesen szinkron fejlődő fonal-szubpopulációk szintjén és
2. A mycélium egészének szintjén, mely az előző szint folyamatainak szuperpozíciójaként fogató fel. A kémiai-biokémiai módszerek számára csak az utóbbi hozzáférhető. A mycélium egészében a fonalak kölcsönhatása többé-kevésbé szinkronizált, de ennek hatásossága változó, mechanizmusai csaknem ismeretlenek.

IV.2. AZ ENZIMINDUKCIÓ TANULMÁNYOZÁSA

IV.2.1.1. A β -galaktozidáz indukciójának tanulmányozására alkalmas mutáns kiválasztása és a kedvező feltételek megkeresése

Mutánsok szelektálása és első tájékozódás enzimszintjük befolyásolhatóságáról

A *S. griseus* törzseink életciklusának tanulmányozása során kimutattuk, hogy mind az 52-1, mind a 45H törzs tenyésztése során a β -galaktozidáz és β -glükózidáz aktivitása /ill. mennyisége/ jellegzetes, életkortól függő változásokat mutat.

Sem az 52-1 jelű szülő törzsben, sem a 45H jelű mutánsban nem sikerült a β -galaktozidáz mennyiségét a fellelhető induktorral analóg vegyületek /laktóz, ill. az *E. coliban* hatásos szintetikus galaktozidok/ adagolásával növelni. Ez indokolta, hogy a β -galaktozidáz indukciójának tanulmányozására alkalmasabb mutánst keressünk.

Az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírt módon a laktózon való jó növekedési képesség alapján szelektáltunk a *S. griseus* 52-1 törzs csiráztatott spóráiból a szülő törzsnél több β -galaktozidázt termelő spontán mutánsokat. 1,13. 10^{-4} mutáns/spóra gyakorisággal találtunk ilyeneket. További tisztítás előtt laktózt tartalmazó és laktózmentes szilárd táptalajokon nőtt telepek β -galak-

tozidáz aktivitását hisztokémiai eljárással mutattuk ki és válogattunk további vizsgálatra érdemes, indukálható mutánsokat. A kiválasztott mutánsokban a β -galaktozidáz indukálhatóságáról különböző C-forrásokkal /glicerinnel, glükózzal, ill. laktózzal/ kiegészített F-szintetikus tápfolyadékokban tenyésztve nyertünk további adatokat. A IV.2.1. táblázat négy, az első szűrés során indukálhatónak ítélt mutáns vizsgálatának eredményét tartalmazza. A β -galaktozidáz fehérjére számított specifikus aktivitása a táptalajhoz adott C-forrástól függ: legalacsonyabb glicerinen nőtt tenyészetekben, glükózon nöttekben ennél 2-7-szeresen nagyobb, míg laktózon nőtt tenyészetekben három mutáns esetében a glükózzal nyert értékeket is kb. kétszeresen meghaladja /egy mutáns spórái nem csiráztak, ha laktóz volt az egyedüli C-forrás/. Három mutánsban /N^o 52-L-20, -30, -50/ a táptalajba laktózt adva a β -galaktozidáz mennyiségének növekedése indukálható.

Tájékoztató a β -galaktozidáz szintjének alakulásáról különböző összetételű táptalajokban

A második szűrés során is indukálhatónak talált mutánsokat az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírt módon háromszor újra szélesztve és egy spórából nőtt telep visszaizolálva tovább tisztítottuk. A táptalaj összetételének hatását a β -galaktozidáz szintjének alakulására az 52-L-30 jelű mutánsból tisztított S. gri-

IV.2.1. táblázat

Streptomyces griseus N° 52-1 törzsből izolált mutánsok növekedése és β -galaktozidáz aktivitása 48 órák korban különböző C-forrással kiegészített F-szintetikus tápfolyadékban tenyésztve

C - forrás :	glicerín			glükóz			laktóz		
	Protein *	β -gal **	Spec. akt. ***	Protein *	β -gal **	Spec. akt. ***	Protein *	β -gal **	Spec. akt. ***
Vizsgált mutáns									
S. griseus 52-L-10	0,209	0,029	0,138	0,260	0,183	0,704	-	-/?/	-/?/
"- " 52-L-20	0,213	0,032	0,151	0,263	0,102	0,386	***	0,043	0,503
"- " 52-L-30	0,170	0,046	0,270	0,219	0,143	0,653	0,300	0,371	1,238
"- " 52-L-50	0,133	0,010	0,075	0,178	0,096	0,540	0,286	0,290	1,012

* mg/ml tenyészet

** bontott μ mol ONPG/ml tenyészet/h

*** bontott μ mol ONPG/mg protein/h

**** nem volt növekedés

seus 52-L-301 jelű genetikailag egységesnek tekinthető mutánsban vizsgáltuk. Kerestük azt a táptalajt, amelyikben viszonylag jó növekedés mellett legalacsonyabb a β -galaktozidáz szintje. Tájékozódunk a különböző C- és szerves N-források indukciót serkentő, ill. gátló hatásáról. Az első kísérletsorozat adatait a IV.2.2. táblázat tartalmazza. Jó növekedés mellett igen alacsony az enzimaktivitás keményítőt + peptont tartalmazó F-szintetikus tápoldatban.

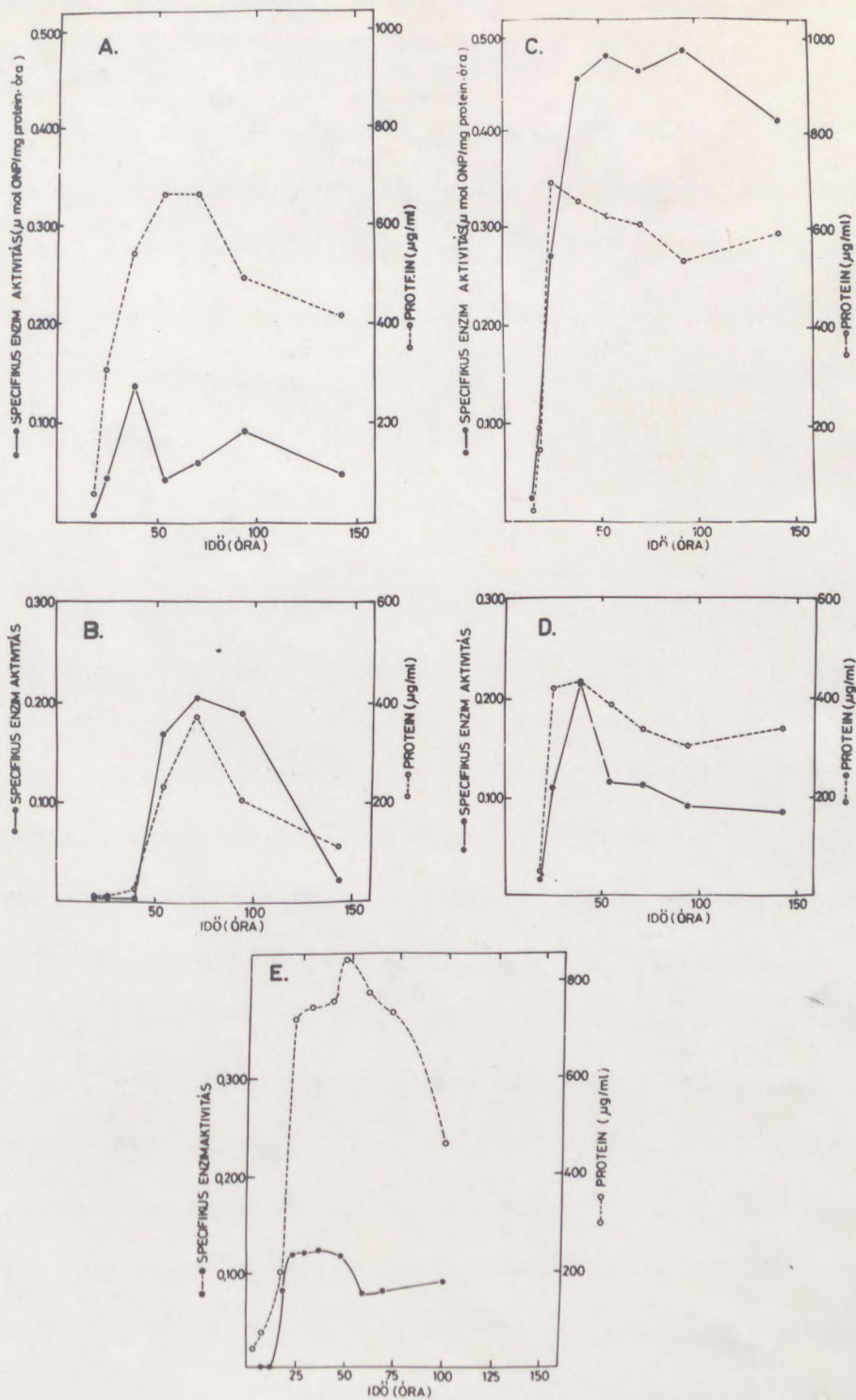
Négy, eltérő összetételű táptalajban /szürt szójas táptalaj, F-szintetikus alapoldat szójapepton + glükózzal, tripton + laktózzal, ill. csak laktózzal kiegészítve/ vizsgáltuk részletesebben a citoplazma-tömeg és az enzimaktivitás életkortól függő változásait. A mért fehérje mennyiségeket és a mérésekből számított specifikus aktivitásokat a IV.2.1. ábrán tüntettük fel /összehasonlításként bemutatjuk ugyanezen értékek változását az 52-1 szülő törzs szürt szójas táptalajban történő tenyésztése során/. A táptalaj összetétele nemcsak a csucs magasságát, hanem a görbe alakját és jellegét is befolyásolja. A növekedés és a β -galaktozidáz specifikus aktivitás életkortól függő változása szürt szójas táptalajban tenyésztve mind a csucs magasságát, mind a görbe alakját tekintve a kiválasztott mutánsban és a szülő törzsben lényegében azonos /Feltehető, hogy az életciklustól függő enzimszintváltozások szabályozása is azonos

IV.2.2. táblázat

Streptomyces griseus 52-L-30la mutáns növekedése és β -galaktozidáz szintjének alakulása különböző táptalajokban tenyésztve

Sor- szám	A tenyészet kora :	48 órás			90 órás			135 órás		
		Fehérje mg/ml	β -gal $\mu\text{mol}/$ ml.h	Spec.akt. *	Fehérje mg/ml	β -gal $\mu\text{mol}/$ ml.h	Spec.akt. *	Fehérje mg/ml	β -gal $\mu\text{mol}/$ ml.h	Spec. akt. *
1.	2 % Keményítő + 0,5 % pep- ton	0,810	\emptyset	\emptyset	0,455	\emptyset	\emptyset	0,425	\emptyset	\emptyset
2.	2 % Laktóz ———	0,410	0,135	0,135	0,160	0,062	0,385	0,150	0,019	0,123
3.	2 % Laktóz + 0,5% pepton	0,945	0,123	0,131	0,390	0,040	0,100	0,520	0,005	0,010
4.	2 % Laktóz + 0,5% szójapep- ton	1,015	0,169	0,166	0,525	\emptyset	\emptyset	0,515	\emptyset	\emptyset
5.	2 % Glükóz + 0,5% tripton	1,180	0,170	0,145	0,500	0,113	0,226	0,535	0,231	0,433
6.	2 % Glükóz + 0,5% pepton	1,025	0,038	0,037	0,515	0,022	0,045	0,455	0,021	0,045
7.	2% Galaktóz + 0,5% pepton	0,990	0,018	0,018	0,495	0,011	0,022	0,405	0,010	0,025
8.	2% Maláta extraktum + + 0,5% pepton	1,190	0,049	0,041	0,385	0,046	0,121	0,345	0,032	0,092

* $\mu\text{mol ONP}/\text{mg protein}/\text{h}$



IV.2.1. ábra: *S. griseus* 52-1-30la törzs protein tartalmának és specifikus β -galaktozidáz aktivitásának /U pro mg protein/ alakulása. A: szójapep-tont + glükózt, B: laktózt, C: triptont + laktózt tartalmazó F-szintetikus, D-szűrt szójás táptalajon. E: ugyanezen adatok szűrt szójás táptalajban az 52-1 szülő törzsben

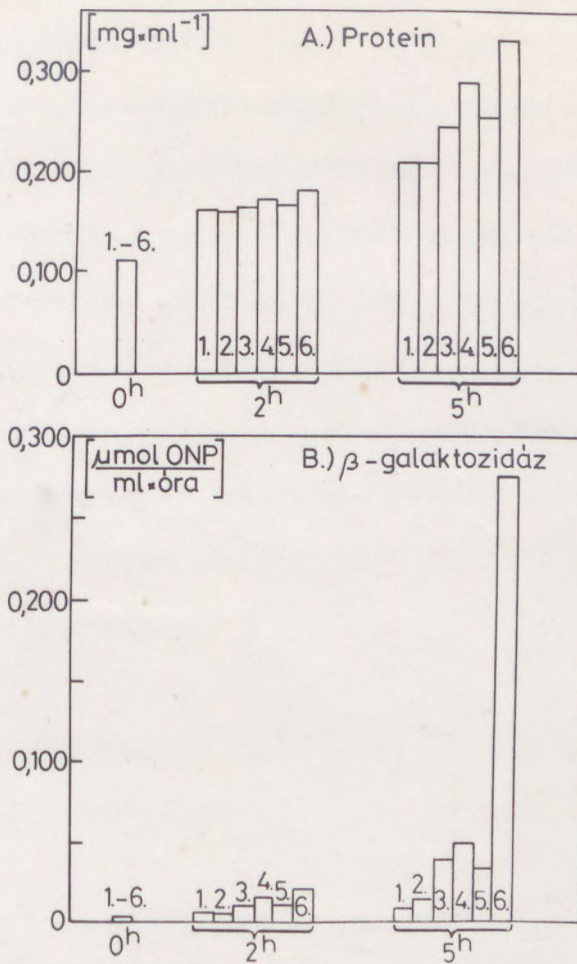
maradt./ . Szójapeptont + glükózt tartalmazó szintetikus táptalajban is hasonló jellegű görbék írják le a változásokat. Csak laktózt tartalmazó szintetikus táptalajban a csirázás igen lassu. Triptonnal és laktózzal kiegészített F-szintetikus táptalajban az igen hosszú időn át magas β -galaktozidáz szintet az életciklus lefolyásának rendellenessége magyarázza: mikroszkópban az idősebb fonalak lizisére és új fonalak folyamatos utánövésére utaló jeleket láttunk.

A β -galaktozidáz szintézisének indukálhatósága előtenyésztett és mosott mycéliumban

Az indukció kiválthatóságát és a kimutatható enzimszint emelkedéshez szükséges időtartamot viszonylag fiatal és kevés β -galaktozidázt tartalmazó mycéliumon kezdtük tanulmányozni. A mycéliumot 20-24 órás korig peptont + keményítőt, ill. peptont + glicerint tartalmazó F-szintetikus táptalajban növesztettük, majd az "Anyagok és módszerek" fejezetben leirt gyors szűrési eljárással nyertük ki és mostuk szobahőn. Friss táptalajban /aminósavakkal kiegészített F-szintetikus/ ujjaszuszpendáltuk a mosott mycéliumot, fiolákba szétmértük és az induktor-hatásra vizsgálandó anyagok hozzáadása után standard körülmények között 5 - 7 órán át tovább rázattuk. A különböző időpontokban vett minták fehérjetartalmát és β -galaktozidáz aktivitását mértük.

Vizsgáltuk laktóz, glükóz, galaktóz, glicerin, izopropil-tio- β -D-galaktopiranozid (= IPTG) és metil-tio- β -D-galaktopiranozid (= TMG) hatását az enzimszint alakulására, összehasonlítva a csak aminosavakat tartalmazó kontrollal. A kapott eredményeket a IV.2.2. ábrán mutatjuk be. Az enzimaktivitás a szénhidráttal ki nem egészített kontrollban alig növekedett a kísérlet során, 10^{-2} M laktóz hozzáadása a kísérlet végére jelentős emelkedést eredményezett. 2×10^{-2} M glükóz jelentéktelen, ugyanennyi galaktóz már értékelhető növekedést váltott ki. 10^{-2} M glükóz + 10^{-2} M galaktóz hatása kisebb volt a 2×10^{-2} M galaktóznál és minden kipróbált induktor, helyesebben preinduktor hatása messze elmaradt a laktóz mögött. Az E. coli lac-operon indukciójában igen hatásos IPTG és TMG 10^{-3} M koncentrációban nem váltott ki a kontrolltól megkülönböztethető enzimszint növekedést, valamennyi vizsgált C-forrásnál kevésbé hatásosnak bizonyultak /Sikertelenek maradtak későbbi próbálkozásaink is, hogy a TMG, ill. IPTG bejutását a koncentráció emelésével és detergenssel fokozva váltsunk ki indukciót./. A leghatásosabb laktóz is csak hozzáadása után 1-3 órával kezdett hatni az enzim mennyiségének növekedésére.

Minden indukáló hatásra megvizsgált C-forrás az enzimszintre kifejtett hatása mellett kisebb-nagyobb mértékben a fehérjetartalom növekedését is fokozta a



IV.2.2. ábra: *S. gr. 52-L-301* törzs 24 órás mycéliumában a β-galaktoszidáz indukciója.

0^h = reszuszpendálás időpontja friss kazein-hidrolizátumos táptalajban.

A: a proteintartalom, B: a β-galaktoszidáz aktivitás a reszuszpendálás időpontjában és 2, ill. 5 órával később.

1. = szénhidrát nélkül; 2. = $2 \cdot 10^{-2}$ M glükóz;

3. = $2 \cdot 10^{-2}$ M galaktóz; 4. = 10^{-2} M glükóz + 10^{-2} M galaktóz; 5. = 10^{-2} M glicerin;

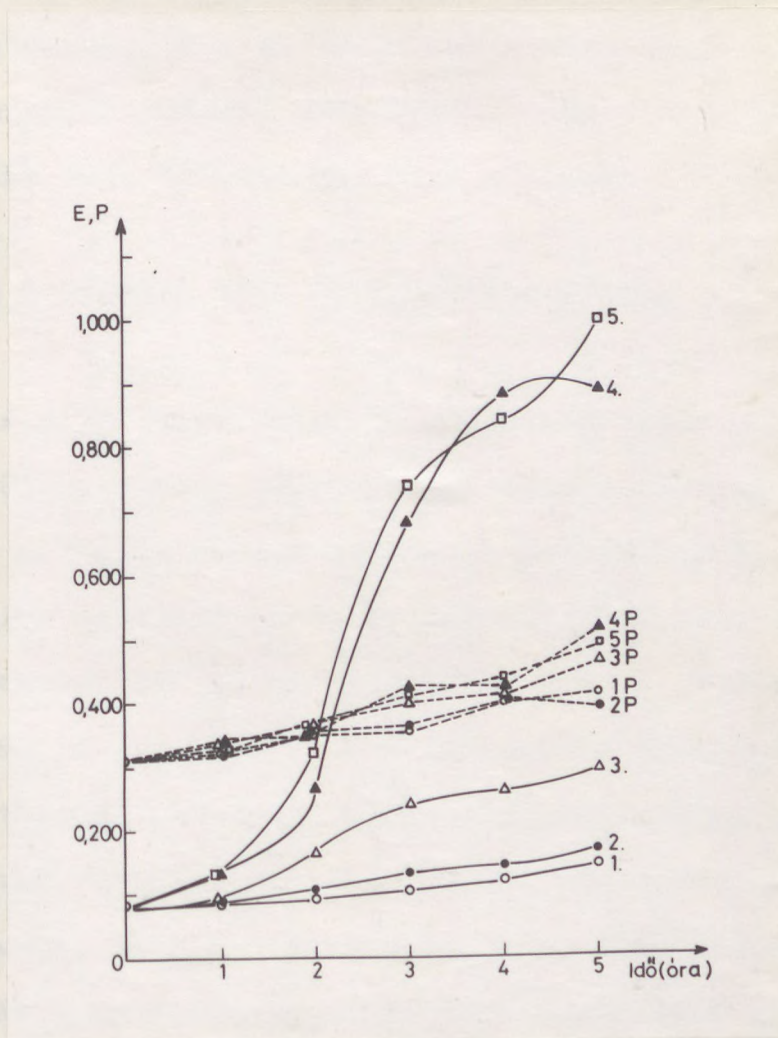
6. = 10^{-2} M laktóz / 10^{-3} M IPTG vagy ugyanennyi

TMG hozzáadása után minden időpontban a szénhidrátmentes kontrollal azonos értékeket kaptunk/.

csak kazeinhidrolizátumot tartalmazó kontrollhoz képest. A növekedés serkentésében is a laktóz volt leginkább hatásos, de a növekedést lényegesen kisebb mértékben fokozta, mint a β -galaktozidáz aktivitásának emelkedését. 5-6 órával a laktóz hozzáadása után az indukált tenyészet fehérjére számított specifikus β -galaktozidáz aktivitása 4-15-szörösen meghaladja a kontrollban, ill. a más szénhidrátokkal táplált mintákban mért értékeket. A nem metabolizálható IPTG és TMG nemcsak az indukció kiváltásában voltak hatástalanok, a növekedést nem befolyásolták.

Tájékoztató az indukció kiváltásához szükséges laktóz koncentrációról

24 órás korig peptont + glicerint tartalmazó F-szintetikus táptalajban előtenyésztett és mosott mycéliummal a már leírt módon végeztük az indukció vizsgálatát. Induktorként 10^{-5} - 10^{-2} M között koncentrációban laktózt adtunk a mintákhoz /Az indukció kiváltásához ez esetben is kazeinhidrolizátumos F-szintetikus folyadékban szuszpendáltuk a mycéliumot/. A IV.2. 3. ábrán egy tipikus kísérlet eredményét mutatjuk be. 10^{-5} M laktóz alig indukált /bár az enzim mennyisége a kontrollnál minden időpontban nagyobbak adódott, a különbség nem több a mérési hibánál/. 10^{-4} M és 10^{-3} M laktóz koncentrációk alkalmazásakor a nagyobb dózishoz nagyobb



IV.2.3. ábra: 24^h-ás *S. griseus* 52-1-301 mycélium indukciója különböző koncentrációban adott laktózzal. Folytanas vonal a β -galaktozidáz, szaggatott vonal és P jelzés a fehérjék mennyiségét jelzi. 1.=kontroll; 2.= 10^{-5} M; 3.= 10^{-4} M; 4.= 10^{-3} és 5.= 10^{-2} M laktózzal indukált minták

hatás tartozik. 10^{-2} M laktóz nem vált ki nagyobb emelkedést sem az enzim mennyiségében, sem a specifikus aktivitásban, mint 10^{-3} M. A két koncentráció hatásában csak annyi különbség mutatkozik, hogy a nagyobb dózis hosszabb időn át hatásos, mint a kisebb.

A tenyészet kora és indukálhatósága

16 órás tenyészetben a β -galaktozidáz aktivitása /az előtenyésztést pepton + glicerines táptalajban végezve/ mérhetetlenül alacsony. A mosott mycélium az indukciós kísérlet során jelentősen növekszik /a fehérje mennyisége induláskor $42 \mu\text{g pro ml}$, 5 óra után $160, 190 \mu\text{g pro ml}$ /. A β -galaktozidáz mennyisége alig kimutathatóan növekszik mind a kontroll, mind a 10^{-3} M laktózzal indukált mintában / $0,001$ -ről $0,006$, ill. $0,015 \mu\text{mol. ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ értékre/. 20-26 órás előtenyésztés után a mycélium β -galaktozidáz termelése laktózzal jól indukálható. A 48 órás tenyészetek között a vizsgálatoknak mintegy felében találtunk a 24 óráshoz hasonlóan indukálhatókat. Az ezekből nyert mycélium a reszuszpéndálást követően a IV.2.3. ábrán bemutatott 24 óráshoz hasonlóan növekedett és termelt enzimet. Nem változott a 10^{-3} M laktózzal kiváltható indukciós válasz, a 10^{-4} M koncentrációval kiváltható enzim felszaporodás nem jelentősen alacsonyabb, mint a 24 órás

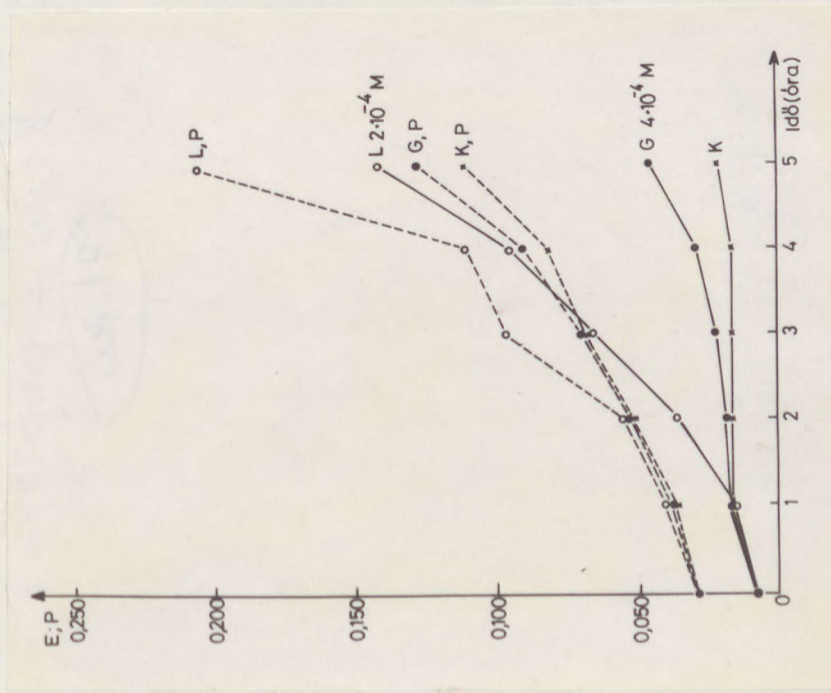
mycéliumban. A 48 órás mycélium a vizsgálatok másik felében a 72 óráshoz hasonlóan viselkedett: a mycélium fehérje tartalma nem nőtt, a β -galaktozidáz szintézise nem volt indukálható.

72 órás mycéliumban nem tudtuk a β -galaktozidáz szintézisét indukálni és a reszuszpendálás utáni 5 órában a fehérjék mennyisége sem növekedett. A reszuszpendálást követően a β -galaktozidáz mennyisége 5 óra alatt a laktózmentes és a 10^{-5} - 10^{-2} M laktózt tartalmazó mintákban azonosan nőtt: a kiindulási értéknek kb. kétszeresére / $400 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ proteintartalom mellett $0,150$ -ról $0,350 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ -ra/. Az enzim szintézise ebben a korban nem befolyásolható laktózzal. Ugyanez a mutáns ugyanabban a táptalajban 72 óras korig tenyésztve jól indukálható volt hisztidáz szintézisére /Schablik, Vitális nem közölt adatok/.

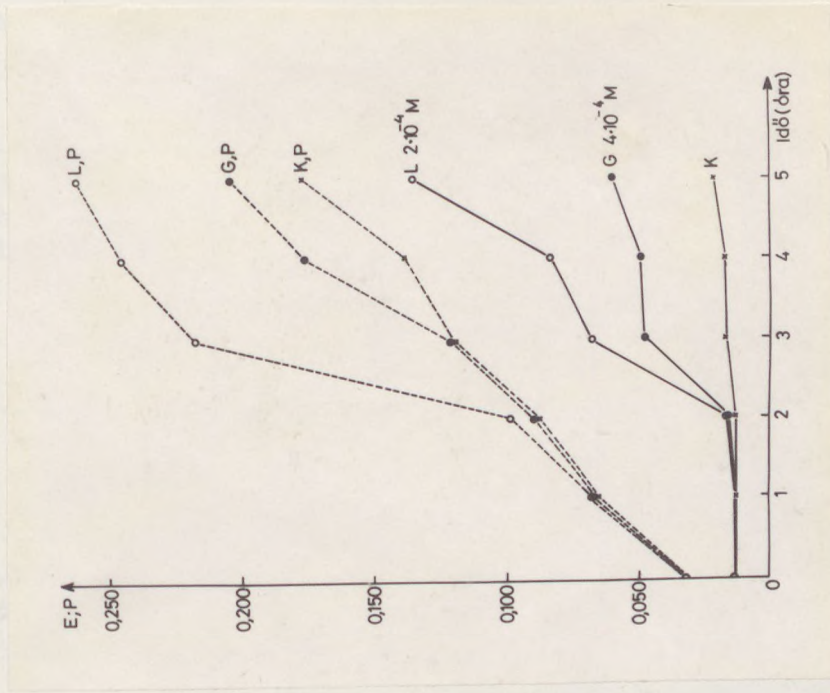
Különböző C-források és szerves N-források hatása az indukálhatóságra

Az előtenyésztéshez szerves N-forrásként a pepton találtuk legmegfelelőbbnek. C-forrásként glükózt vagy galaktózt adva hozzá, túl magas β -galaktozidáz szintet kaptunk. Keményítő + pepton kombináció a növekedés mennyiségét és az alacsony enzimszintet tekintve jó eredményt adott, de kényelmetlenné

a. /



b. /



IV.2.4. ábra: Az előtenyésztésben használt táptalaj hatása S. gr. 24 órás mycéliumának indukálhatóságára K = kontroll, G = $4 \cdot 10^{-4}$ M galaktóz, L = $2 \cdot 10^{-4}$ M laktóz hatása. Folytonos vonal a β -galaktozidáz, szaggatott vonal a fehérjék mennyisége. Előtenyésztés a: keményítőt + peptont, b: glicerint + peptont tartalmazó F szintetikus táptalajban

IV.2.3.a. táblázat

Különböző tápanyagok hatása a S. gr. 52-L-301 mutáns 24 órás mycéliumának növekedésére és a β -galaktozidáz szintézisének indukciójára

0^h = a friss tápfolyadékban történő szuszpendálás időpontja

	Az alapoldathoz adott tápanyagok	Induktor	β -galaktozidáz U.ml ⁻¹		Fehérje mgml ⁻¹		Specifikus aktivitás U mg ⁻¹	
			0 ^h	5 ^h	0 ^h	5 ^h	0 ^h	5 ^h
I.	∅	∅	0,006	0,024	0,048	0,059	0,125	0,407
		Gal	0,006	0,087	0,048	0,064	0,125	0,422
		Lakt	0,006	0,088	0,048	0,113	0,125	0,779
	0,5 % Kazein- hidrolizátum	∅	0,011	0,032	0,057	0,135	0,193	0,237
		Gal	0,011	0,054	0,057	0,153	0,193	0,353
		Lakt	0,011	0,110	0,057	0,182	0,193	0,604
	0,5 % Trypton	∅	0,006	0,067	0,050	0,287	0,120	0,233
		Gal	0,006	0,177	0,050	0,457	0,120	0,388
		Lakt	0,006	0,406	0,050	0,471	0,120	0,862
	2 % glicerin + 0,5 % aszparagin	∅	0,006	0,063	0,051	0,204	0,118	0,315
		Gal	0,006	0,042	0,051	0,246	0,118	0,171
		Lakt	0,006	0,330	0,051	0,270	0,118	1,219
	0,5 % Huskivonat	∅	0,018	0,053	0,064	0,163	0,281	0,325
		Gal	0,018	0,071	0,064	0,181	0,281	0,392
		Lakt.	0,018	0,399	0,064	0,209	0,281	1,909
II.	∅	∅	0,007	0,024	0,218	0,326	0,032	0,074
		+ Lakt	0,007	0,139	0,218	0,320	0,032	0,434
	10 ⁻³ M glükóz	∅	0,007	0,031	0,218	0,343	0,032	0,090
		+Lakt	0,007	0,116	0,218	0,409	0,032	0,284

"Gal" = 4.10⁻⁴ M galaktóz; "Lakt" = 2.10⁻⁴ M laktóz; "+Lakt" = 10⁻³ M laktóz

IV.2.3.b. táblázat

A IV.2.3.a. táblázatban szereplő mennyiségek / β -galaktozidáz, fehérje és specifikus aktivitás/ 5 óra alatti növekedése a kiinduláshoz, ill. a kontrollhoz viszonyítva

	Az alapoldathoz adott tápanyagok	Induktor	β -galaktozidáz		Fehérje		Specifikus aktivitás	
			*	**	*	**	*	**
I.	\emptyset	\emptyset	4,0	1,0	1,2	1,0	3,3	1,0
		Gal	4,5	1,0	1,3	1,0	3,4	1,0
		Lakt	14,5	1,0	2,4	1,0	6,2	1,0
	0,5 % Kazein hdiro- lizátum	\emptyset	3,0	0,8	2,4	1,9	1,2	0,4
		Gal	5,2	1,1	2,7	2,0	1,8	0,5
		Lakt	10,0	0,7	3,2	1,3	3,1	0,5
	0,5 % Trypton	\emptyset	11,2	2,8	5,7	4,8	1,9	0,6
		Gal	29,5	6,6	9,1	7,0	3,2	0,9
		Lakt	67,7	4,7	9,4	3,9	7,2	1,2
	2 % Glicerín + 0,5 % asz- paragin	\emptyset	10,5	2,6	4,0	3,3	2,7	0,8
		Gal	7,0	1,6	4,8	3,6	1,5	0,4
		Lakt	55,0	3,8	5,3	2,3	10,3	1,7
	0,5 % Huskivonat	\emptyset	2,9	0,7	2,6	2,1	1,2	0,4
		Gal	3,9	0,9	2,8	2,1	1,4	0,4
		Lakt	22,2	1,5	3,3	1,4	6,8	1,1
II.	\emptyset	\emptyset	3,4	1,0	1,5	1,0	2,3	1,0
		+Lakt	19,9	1,0	1,5	1,0	13,6	1,0
	10 ⁻³ M glükóz	\emptyset	4,4	1,3	1,6	1,1	2,8	1,2
		+Lakt	16,6	0,8	1,9	1,3	8,9	0,7

* Az 5 órás tovább növeksztés után mért értékek a kiinduláskor mért értékhez, mint egységhez viszonyítva

** Az előző érték az azonos induktrot tartalmazó, de tápanyaggal ki nem egészített alapoldatban mért növekedéshez viszonyítva

"Gal" = 4.10⁻⁴M galaktóz, "Lakt" = 2.10⁻⁴M laktóz "+Lakt" = 10³M laktóz

tette a tenyészetből a mycélium kinyerését és mosását. Peptont + glicerint tartalmazó táptalajban a növekedés mértéke és a β -galaktozidáz mennyisége 24 órás tenyészetben azonos volt a pepton-keményítő táptalajon nőtt tenyészetekkel. A mycéliumok indukálhatósága, $2 \cdot 10^{-4} M$ laktóz iránti érzékenysége is lényegében egyezett. Mint az a IV.2.4. ábrán látható a kétféle táptalajban nőtt mycéliumok viselkedése között csak az a különbség, hogy a glicerinen nőttben a reszuszpendálás után nagyobb sebességgel indul a fehérjeszintézis és a galaktóz hatásosabban indukál, mint a keményítőn nőtt mycéliumban. Az indukált enzimszintézis viszont az utóbbiban hamarabb indul és egyenletesebb a sebessége.

Az indukció idején jelenlévő C- és szerves N-források hatását az indukált β -galaktozidáz szintézisre peptont + glicerint tartalmazó táptalajon nőtt 24 órás mycéliumon különböző tápanyagokkal kiegészített, ill. adalék nélküli F-szintetikus alapoldatban vizsgáltuk. A fehérjetartalom és az enzimaktivitás 5 órás növekedését mértük induktorként $2 \cdot 10^{-4} M$ laktózt, ill. $4 \cdot 10^{-4} M$ galaktózt tartalmazó és induktor nélküli mintákban. A növekedéseket a kiindulási értékeket egységül választva számítottuk. A különböző adalékkal kiegészített táptalajokban talált növekedéseket az azonos módon indukált ill. nem indukált alapoldatban kapott értékekkel összehasonlítva értékeltük a vizsgált táptalajkomponensek ha-

tását. Egy vizsgálatsorozat eredményét a IV.2.3. táblázatban foglaltuk össze. A reszuszpendálás után minden esetben növekedett a β -galaktozidáz mennyisége. 5 óra alatt a kontrollokban a kiindulási érték 3-11-szeresére, a laktózzal indukált mintákban 14-70-szeresére nőtt az enzim mennyisége. Ugyanezen minták fehérjetartalma a tápanyagok jelenlététől függően 1,2-8-szorosra, ill. 2,4-10-szeresre nőtt. A nem indukált minták specifikus aktivitásának növekedését a megvizsgált anyagok kismértékben csökkentették. A $2 \cdot 10^{-4}$ M laktózzal indukált mintákban a specifikus aktivitás növekedését kazeinhidrolizátum kissé gátolta, tripton és huskivonat nem befolyásolta vagy alig észrevehetően fokozta, glicerin + aszparagin jelenléte észrevehetően fokozta. A $4 \cdot 10^{-4}$ M galaktóz hatására bekövetkező specifikus aktivitás növekedés tripton hatására nem változott /esetleg kissé emelkedett/, egyéb tápanyagok jelenlétében csökkent a tápanyagot nem tartalmazó kontrollhoz képest. 10^{-3} M glükóz egymagában kissé fokozta az enzimszint növekedését. 10^{-3} M laktózzal együtt adva kissé csökkentette a β -galaktozidáz és kissé serkentette más fehérjék felhalmozódását, ami a specifikus aktivitásban kimutatható csökkenést /kb. 25 %/ okozott. Az 5 órás kísérletekben azonos körülmények között az enzim és fehérjék mennyiségének relatív növekedése sorozatonként ingadozott /pl. voltak kísérletsorozatok, melyekben

az enzimszint a kísérlet kezdetén mérhetetlenül alacsony volt/, de az ismertetett tendencia nem változott, a hatásosság szerinti sorrend változatlan maradt. Miután exponenciálisan csökkent az enzim mennyisége, a szintézisének relatív növekedése mind az indukált, mind a kontroll mintákban.

IV.2.1.2. A β -galaktozidáz indukált felszaporodásának érzékenysége transzlációt és transzkripciót gátló anyagok iránt

Chloramphenicol 15 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban a hozzáadás után 1 percen belül leállítja mind a β -galaktozidáz, mind más sejtfehérjék mennyiségének további növekedését. Az esetek nagyobb részében akkor sem mutatkozik az enzimaktivitásban és a fehérjék mennyiségében csökkenés a gátlást követő órákban, ha a citoplazmában már kimutatható mennyiségű proteáz van jelen. A degradáció csak öregebb mycélium, vagy peptidekben gazdag táptalajon nőtt tenyészetek transzlációjának gátlása után észrevehető.

A transzkripciót gátló /ill. a transzkripciót is gátló/ anyagok közül a rifampicin, actinomycin D és ethidium bromid hatását vizsgáltuk.

Az actinomycin D 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció alatt hatástalan, 1-3 $\mu\text{g/ml}$ részleges, 10 $\mu\text{g/ml}$ vagy nagyobb koncentráció teljes gátlást okoz a β -galaktozidáz és

az összes egyéb sejtfehérjék mennyiségének növekedésében. A teljes gátlást okozó koncentrációkban való alkalmazás után exponenciálisan csökken az enzim és az összfehérje szintézisének sebessége és 10-40 perc után mennyiségük növekedése leáll. A szintézis megállását a már meglévő enzimaktivitás és fehérjemennyiség jelentős csökkenése követi / IV.2.5., IV.2.6. és IV.2.7. ábrák /. A gátláshoz csatlakozó lizis 15 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol egyidejű alkalmazásával kivédhető / IV.2.5. ábra /. A lizis jelentkezése miatt nem sikerült actinomycin D-vel a mRNS féléletidejét megbízhatóan meghatározni.

5-10 $\mu\text{g/ml}$ etidiumbromid szintén teljes gátlást okoz az indukált β -galaktozidáz és más fehérjék szintézisében. A gátláshoz itt is, az actinomycin által előidézetthez hasonló, de kisebb foku, chloramphenicollal kivédhető degradáció társul.

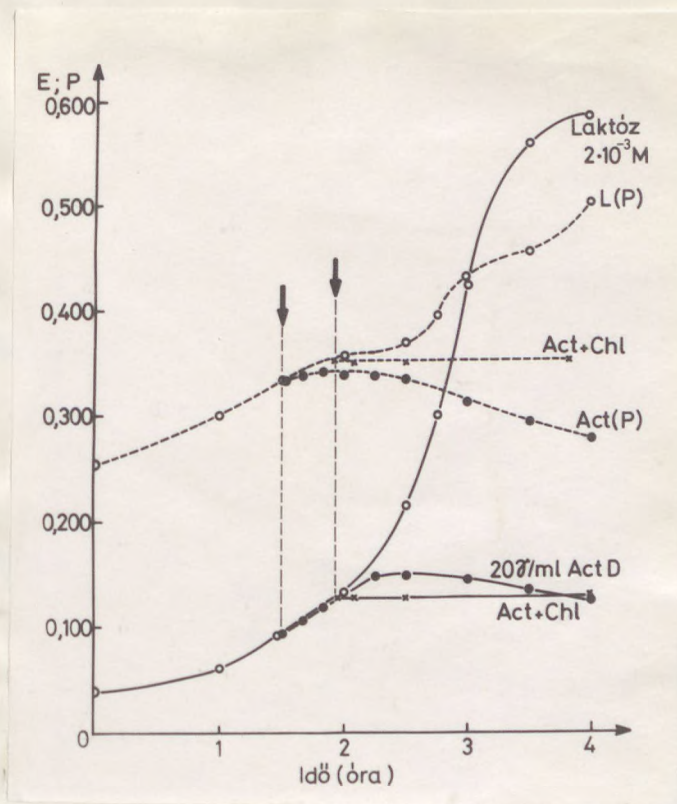
Sejtroncsolatban sem az etidiumbromid, sem az actinomycin D nem hat a meglévő enzim aktivitására és nem aktiválja a sejtfehérjéket bontó enzimeket.

Rifampicin 10 $\mu\text{g/ml}$ vagy nagyobb koncentrációban szintén meggátolja az indukált enzim szintézisét és 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban sem provokál lizist, ill. degradációt / IV.2.6., IV.2.7. és IV.2.9. ábra /. A rifampicin adása után 1-2 perc elteltével /kísérleti körülményeink között pontosabban nem mérhető/ kezd csökkenni a β -galaktozidáz és egyéb fehérjék mennyi-

ségének növekedése. A β -galaktozidáz szintézisének lassulása jól leírható, negatív kitevőjű exponenciális egyenlettel. A szintézis sebessége 15,2 percenként felelére csökken. Ha a hozzáadás pillanatában a szintézis sebessége kicsiny, gyorsan kimutathatatlaná válik a további szintézis, egyébként hosszabb időn át mérhető. A Lowry szerint mért összes fehérje szintézisének sebessége gyorsabban csökken, mint a β -galaktozidázé. A sebesség kb. 10 percenként feleződik.

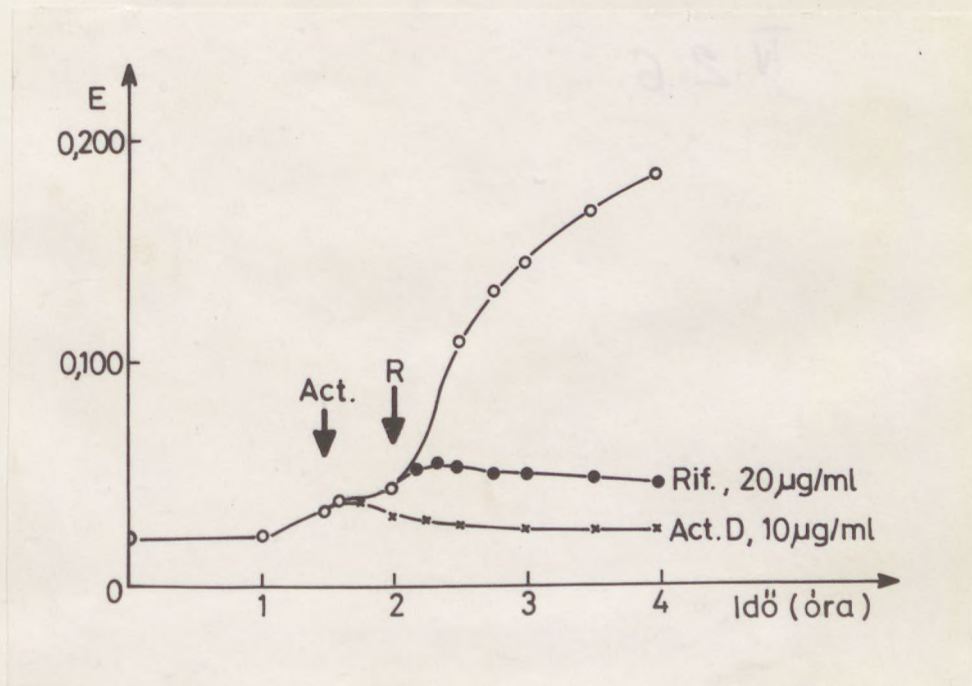
Vannak olyan időszakok, amikor az enzim vagy az össz-fehérje mennyisége nem, vagy exponenciálisan lassulva növekszik. Ilyenkor a hozzáadott actinomycin D, vagy rifampicin hatására mindaddig nem csökken, a szintézis sebessége a nem gátolt kontrollé alá, amíg az utóbbiban a szintézis gyorsulni nem kezd. A szintézis transzkripció gátlásra érzéketlen szakaszai β -galaktozidáz és az összfehérjetartalom vonatkozásában más-más időszakra esnek.

A korábban transzkripció gátlónak /ill. DNS-szinten hatónak/gondolt primycint 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban adva az indukált tenyészethez az enzim és más fehérjék szintézise 5-10 perc alatt megáll, majd mindkettő mennyisége az actinomycin D hatására létrejövő lizisnél sokkal gyorsabban, zuhanásszerűen csökkenni kezd. Ez a csökkenés nem védhető ki az egyidejűleg adott chloramphenicolal / IV.2.8. ábra /. Sejtroncsolatban a primycin sem gátolja vagy inaktíválja a β -galaktozidázt és β -glükozidázt.



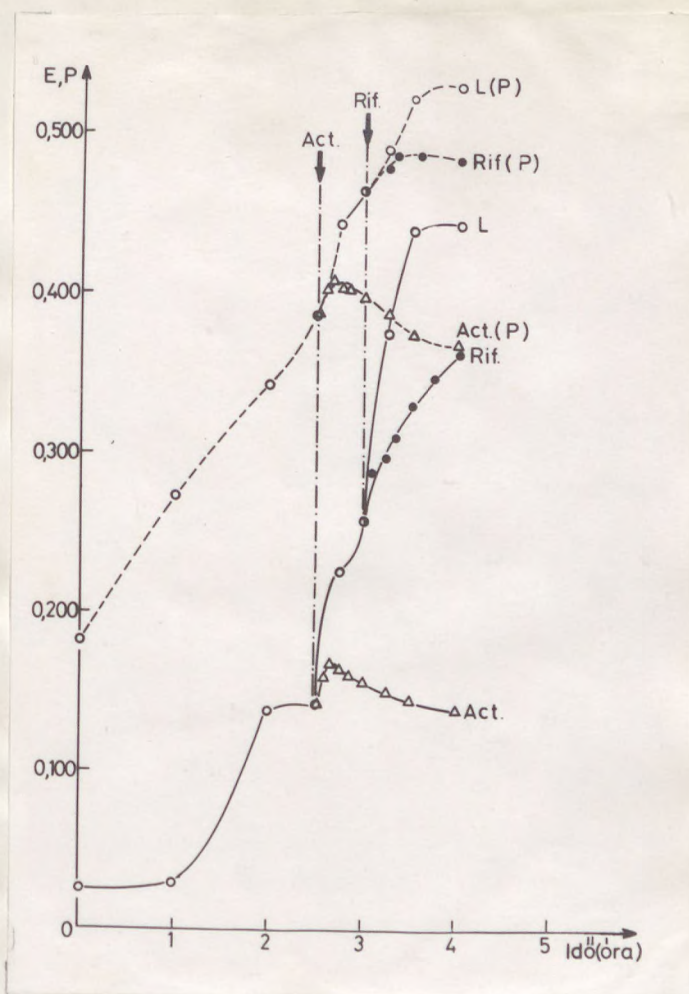
IV.2.5. ábra: 20 $\mu\text{g/ml}$ actinomycin D hatása /magában és chloramphenicolal együtt adva/ laktózzal indukált S. gr. 52-L-301 tenyészet enzim- és fehérje tartalmára.

Első nyíl: csak actinomycin D, második nyíl: actinomycin D + 80 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol. Folytonos vonal: β -galaktozidáz = U/ml, szaggatott vonal fehérje mg/ml.

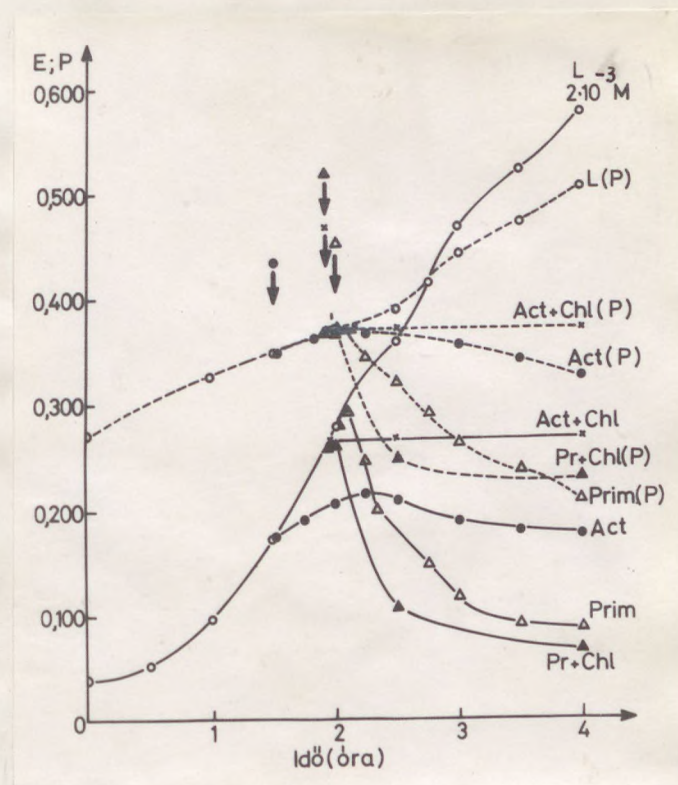


IV.2.6. ábra: Actinomycin D és rifampicin hatása indukált *S. gr. 52-1-301* tenyészet β -galaktozidáz szintézisére.

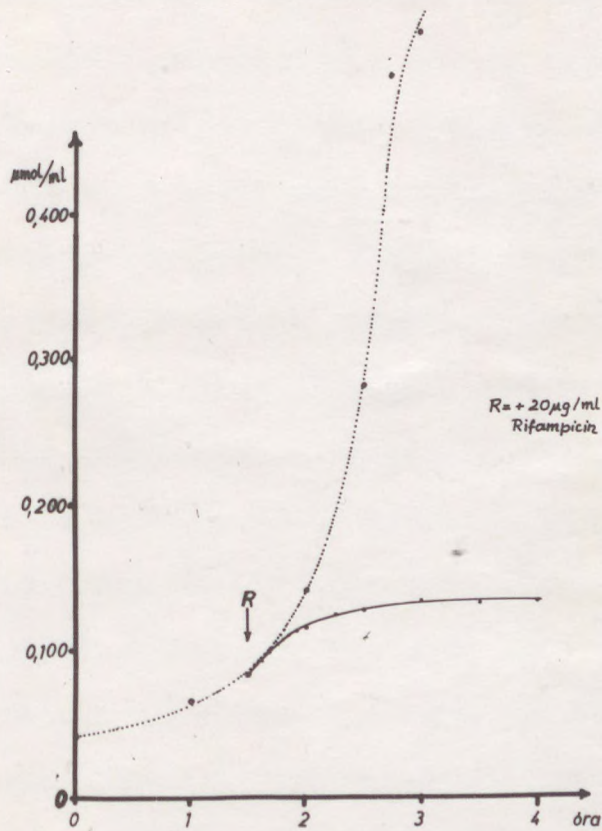
A nyilak a gátlószer hozzáadásának időpontját jelzik.



IV.2.7. ábra: 20 $\mu\text{g/ml}$ actinomycin D / Δ / és 20 $\mu\text{g/ml}$ rifampicin / \bullet / hatása a S. gr. 52-L-301 mutáns indukált β -galaktozidáz -/folytonos vonal/ és fehérjeszintézisére /szaggatott vonal/. Kontroll: $\circ\text{---}\circ$ és $\circ\text{---}\circ$. A nyíl Act. jelzéssel az actinomycin D, Rif. jelzéssel a rifampicin hozzáadását jelzi



IV.2.8. ábra: 20 $\mu\text{g/ml}$ actinomycin D és 10 $\mu\text{g/ml}$ primycin hatása a S. gr. 52-1-301 indukált β -galaktozidáza /folytonos vonal/ és fehérjéi /szaggatott vonal/ mennyiségének alakulására és kiváltott lizis felfüggeszthetősége chloramphenicollal. Actinomycin D magában: ●—●, ●---●; Act. D + chloramphenicol: x—x, x---x; Primycin magában: Δ — Δ , Δ --- Δ , és chloramphenicollal: \blacktriangle — \blacktriangle , \blacktriangle --- \blacktriangle . A nyilak a hozzáadás időpontját mutatják



IV.2.9. ábra: 20 $\mu\text{g/ml}$ rifampicin hatása az indukált β -galaktozidáz mennyiségének növekedésére

IV.2.1.3. Az indukció időbeli lefolyása és a mycélium növekedése az indukció során

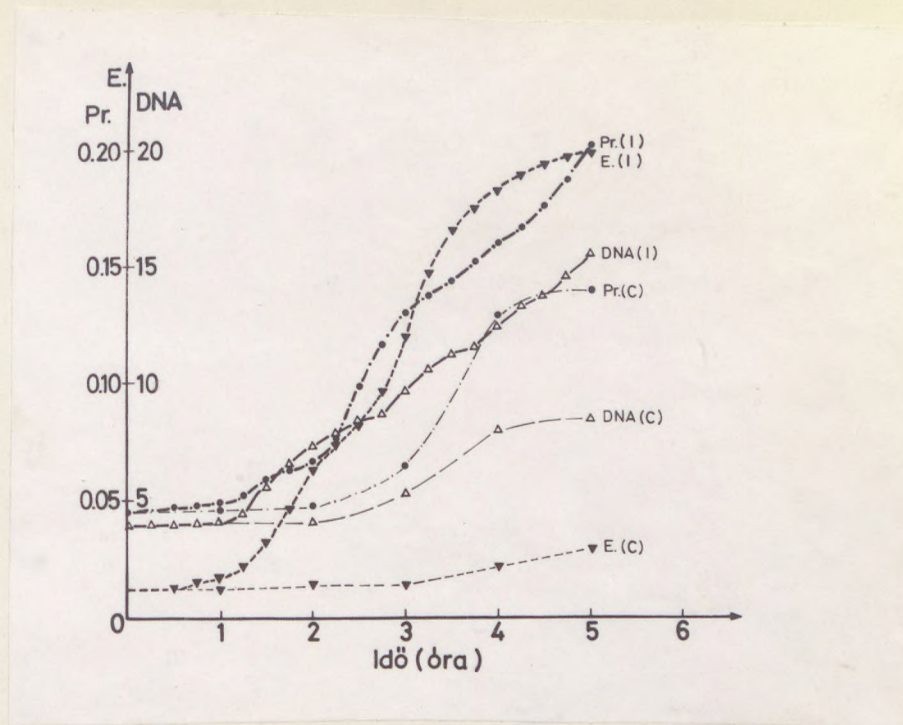
Az előtenyésztéshez és a reszuszpendálás-hoz használt táptalaj összetételétől függően az indukált β -galaktozidáz mennyisége a laktóz hozzáadása után 1-2 órával /egyres kísérletekben még később/ kezdi mérhetően meghaladni a laktózmentes kontrollban mért értéket. A fehérjék mennyisége korábban kezd növekedni, ez rendszerint már 30 perces mintákban is jól mérhető /1. IV.2.3., IV.2.4. és IV.2.10. ábrákat /. A sejtszám szaporodását jelző DNS mennyisége 0,5-1 órával a reszuszpendálás után kezd növekedni. A IV.2.3. ábráról leolvasható, hogy az indukált β -galaktozidáz fokozott felszaporodásának kezdete nem vagy alig függ az alkalmazott laktóz koncentrációtól, míg az indukált szintézis sebessége bizonyos határok között függ a koncentrációtól.

A reszuszpendálás után különböző időpontokban adva a laktózt / IV.2.11. ábra / nem találtunk az indukció kezdetében konzekvens változást. A reszuszpendálás után 0 - 2 órával adva a laktózt / $2 \cdot 10^{-3}$ M/ az enzim mennyisége és a fehérjére számított specifikus aktivitás a hozzáadás után 1 órával még változatlan, 2 órával később a kontrollnál jól mérhetően magasabb. A reszuszpendálás után 3 órával adott laktóz 2 óra alatt

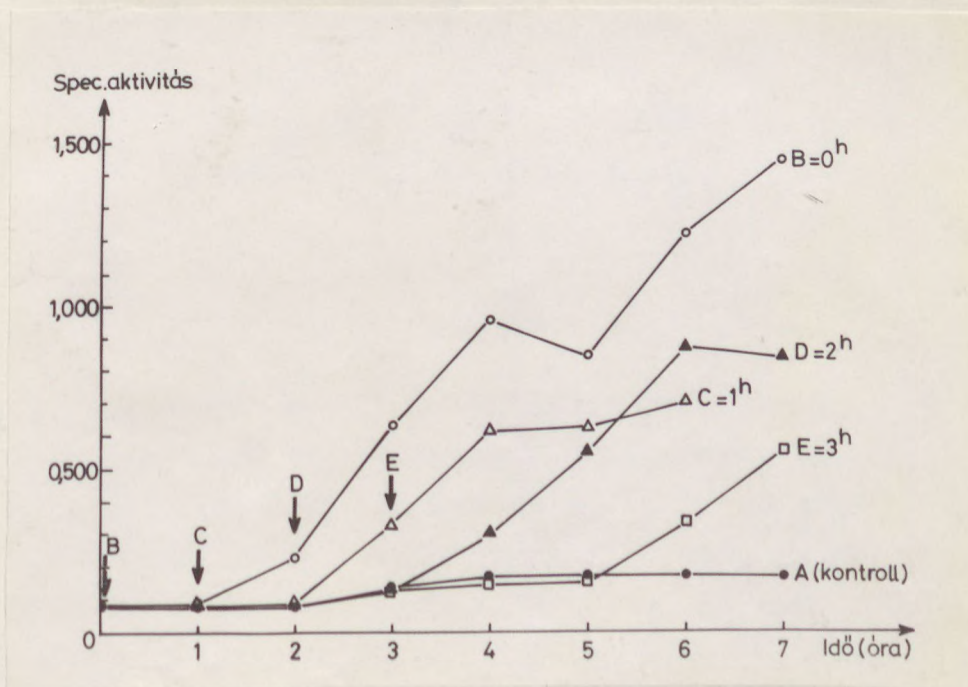
nem növeli az enzimszintet a kontroll szintje fölé, az emelkedés csak a hozzáadás után 3 órával jelentkezik/4-5 órás kor között, amikor a 3 órás korban adott laktóznak hatnia kellene a 0-órás korban indukált mintákban csökken, az 1-órás korban indukáltakban stagnál a specifikus aktivitás/.

Ha az indukciós kísérletben a laktózos táptalajt különböző időpontokban gyors szűréssel és reszuszpendálással friss, azonos koncentrációban laktózt tartalmazó táptalajra cseréljük ki, a β -galaktozidáz szintézisének legintenzívebb szakasza kb. 1 órával későbbre tolódik. A csere időpontja 0 és 2 óra között alig befolyásolja a késés mértékét / IV.2.12. ábra /. Ha nem indukált tenyészetek táptalaját cseréljük a reszuszpendálás után ugyanannyi ideig laktózzal indukált tenyészet szűrletére 3,5 órás korban végezve a cserét az intenzív β -galaktozidáz szintézis kb. félórán belül megindul.

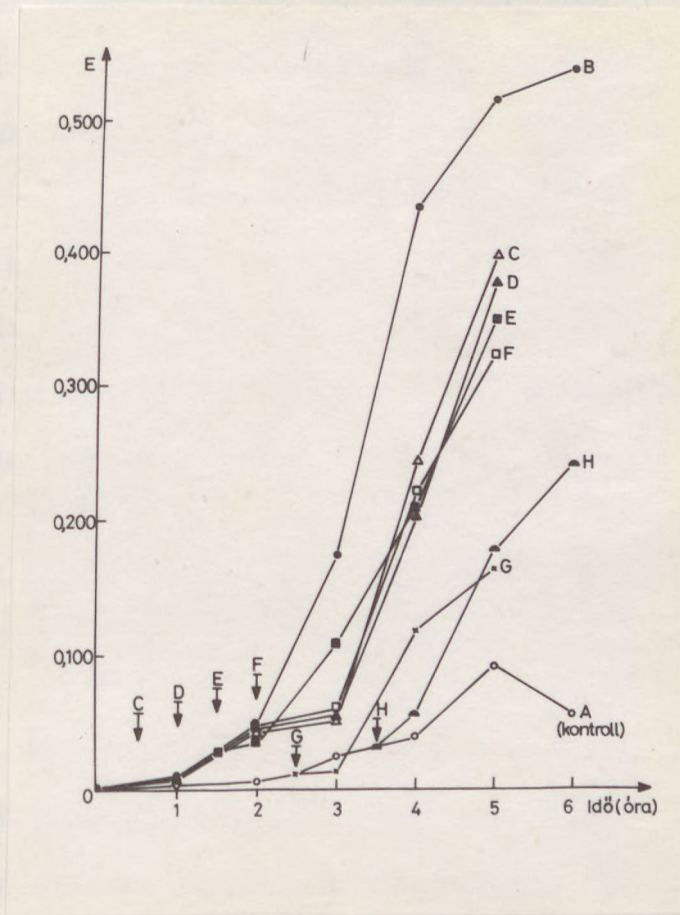
15 percenkénti mintavétellel finomabb időosztással vizsgálva a β -galaktozidáz, a fehérjék és a DNS mennyiségének növekedését, feltűnik az emelkedésük lépcsős jellege / IV.3.10. ábra /. A görbék lépcsős jellege nem tűnik el kétszer ismételt hármaskör mozgó átlagolással /1. Yule és Kendall, 1964/ simitva a véletlen okozta töréseket. A sürebb mintavétellel nyert adatokból számított specifikus aktivitások sem mutatnak monoton növekedést az időben: a nagyobb emelkedéseket időnként kisebb csökkenések követik.



IV.2.10. ábra: *S. griseus* 52-1-301 törzs indukciója közben a galaktozidáz, a fehérjék és DNS mennyiségének növekedése. C = kontroll, I = $2 \cdot 10^{-3} M$ laktózzal indukált. Pr = protein mg/ml ●---●
E = β -galaktozidáz U/ml ▼---▼; DNA = DNS μ g/ml Δ — Δ



IV.2.11. ábra: Indukció a reszuszpendálás utáni különböző időpontokban adott $2 \cdot 10^{-3} M$ laktózzal: a fehérjére számított specifikus β -galaktozidáz aktivitások /U pro mg fehérje/ alakulása az idő függvényében. A = kontroll, B = a reszuszpendálással egy időben, C = 1 óra, D = 2 óra, E = 3 óra múlva a laktózt



IV.2.12. ábra: 24^h-ás S. gr. 52-L-301 mycélium indukciója $2 \cdot 10^{-3}$ M laktózzal A = laktózmentes kontroll, B-F: 0^h-kor indukált, B: nincs táptalajcsere. Az indukáló táptalaj azonos összetételűre cserélve: C: 0,5, D: 1, E: 1,5, F: 2 órával az indukció kezdete után. G, H: nem indukált minták táptalaja azonos idejű indukált minták szűrletére cserélve - G: 2,5, H: 3,5 órával reszuszpendálás után

A görbe maximumon és minimumon áthaladva emelkedik / IV.2.13. ábra /.

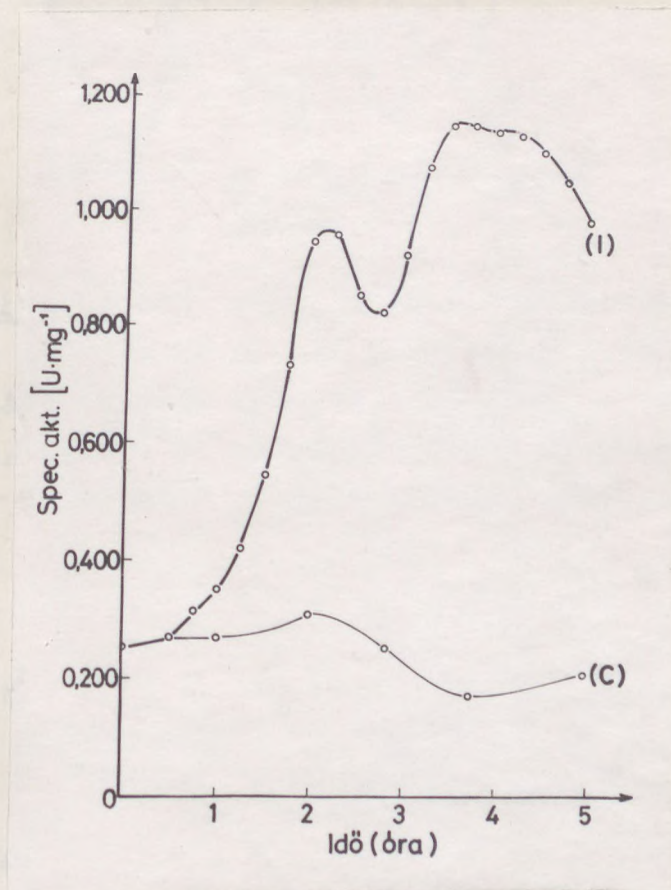
Ha a β -galaktozidáz, a fehérjék és a DNS különböző időpontokban mért mennyisége helyett azok szintézisének sebességét ábrázoljuk az idő függvényében, a kapott görbéken jól felismerhető minimumok és maximumok váltakozását látjuk / IV.2.14. ábra /. A három görbe maximumai és minimumai nem azonos időben jelentkeznek, a görbék lefutása nem párhuzamos. Különösen szembetűnő, hogy a β -galaktozidáz zömmel nem akkor szintetizálódik, amikor az egyéb sejtfehérjék fő tömege, a két sebesség aszinkron vagy inkább ellentétesen változik.

IV.2.1.4. A β -glükózidáz mennyiségének változása a β -galaktozidáz indukciója során

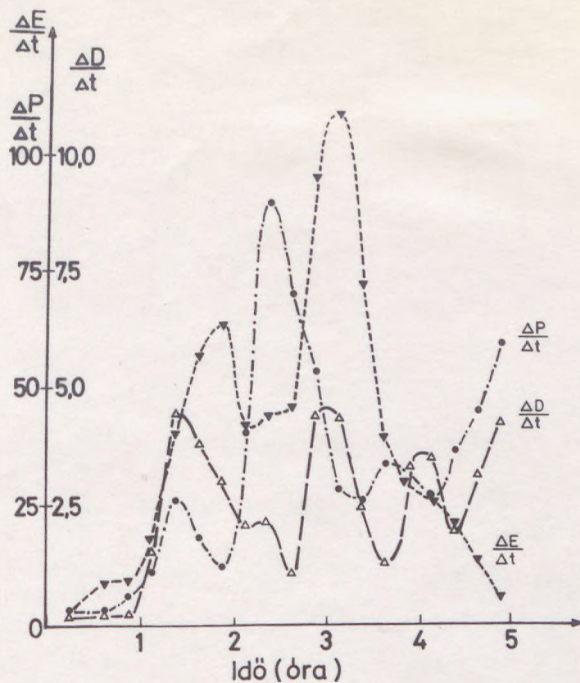
Az indukálható mutánsban a 24 órás előtenyésztés után a β -glükózidáz aktivitása az optimális pH 7,2-ön bontott p-nitrofenilglükózid mennyiségét tekintve 2-5-ször felülmulja a β -galaktozidáz saját pH-optimumán mért aktivitását. Ujraszuspendálás után a kontrollban a két enzim aránya kis ingadozást mutat és lényegesen nem változik. Az indukált tenyészetben nemcsak a β -galaktozidáz, hanem a β -glükózidáz mennyisége is meredeken növekszik. A két enzim mennyiségének növekedése azonban óránkénti mintavétellel vizsgálva sem halad minden időszakban párhuzamosan. Arányuk az 5

órás vizsgálat során nagyobb mértékben változik, 1,6 és 2,8 között ingadozik / IV.2.15. ábra /. A β -glükózidáz és β -galaktozidáz indukált szintézise más-más időszakban éri el legnagyobb intenzitását /A IV.2.16. ábra /.

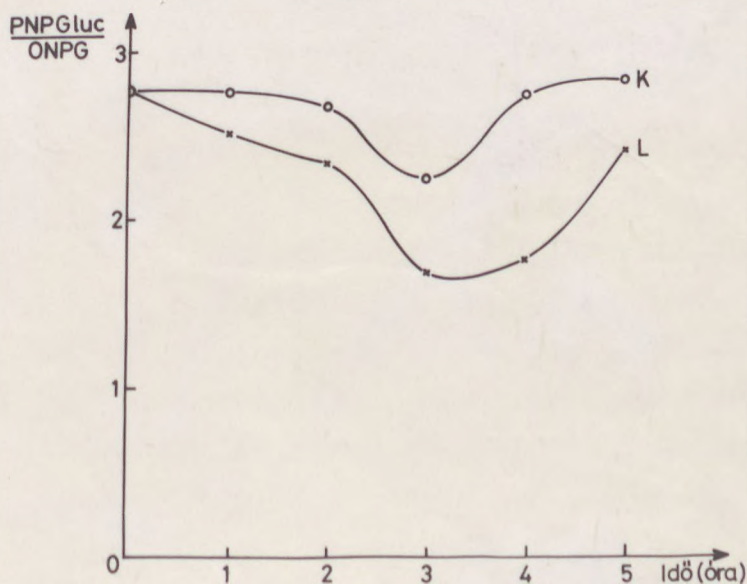
Az eredeti 52-1 jelű szülő törzsben az életciklus során a β -glükózidáz és β -galaktozidáz mennyiségének aránya a körülményektől is függően 1:1 és 10:1 között változik. Peptont és glicerint tartalmazó F-szintetikus táptalajban tenyésztve 24 óras korban a szülő törzsben is igen kevés β -glükózidáz és β -galaktozidáz mérhető. A mycélium mosása és reszuszpendálása után 2 % laktózzal vagy 2 % glükózzal a β -glükózidáz mennyisége - mind abszolút értékben, mind fehérjére vonatkoztatva - jelentősen növelhető: a növekedés 4- és 5-szörös, ill. 3,5 és 4-szeres 5 óra alatt / IV.2. 17. ábra /. Az indukció 5 órája során 2 % laktóz nem befolyásolja a fehérjeszintézis sebességét a szénhidrátmentes kontrollhoz viszonyítva. 2 % glükóz jelenlétében a kísérlet végén a sejtfehérjék mennyisége közel másfélszer annyi, mint a kontrollban. Ellentétben az indukálható mutánszal a szülő törzsben a β -galaktozidáz fehérjére számított mennyiségét sem a laktóz, sem a galaktóz vagy glükóz nem emeli a kontroll fölé, melyben a specifikus aktivitás szintén növekszik a kísérlet során.



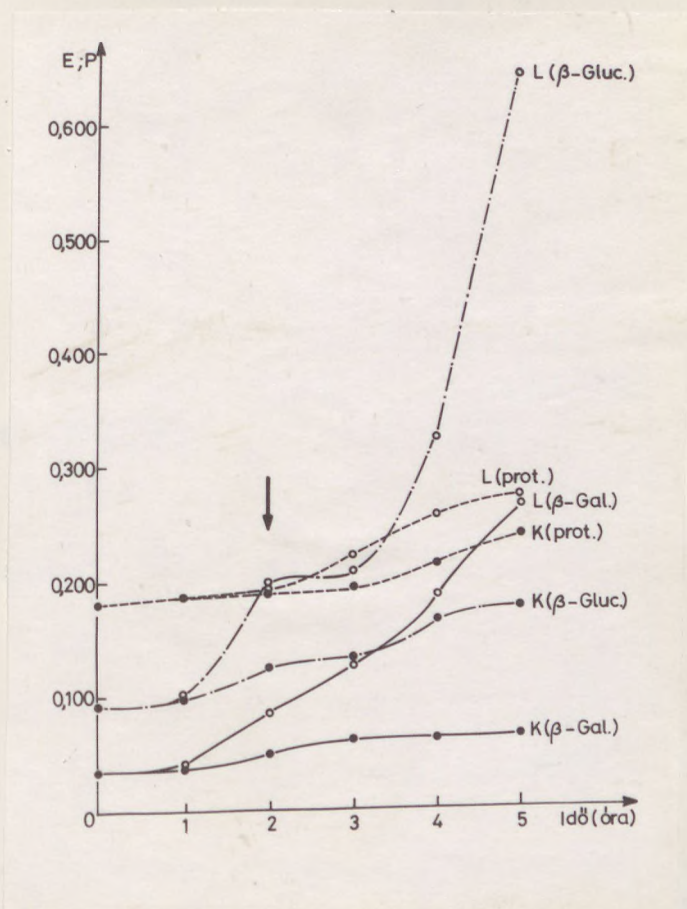
IV.2.13. ábra: S. gr. 52-L-301 törzs indukciója során a β -galaktozidáz specifikus aktivitásának alakulása /U pro mg fehérje/,
 $I = 2 \cdot 10^{-3} M$ laktózzal indukált C = kontroll



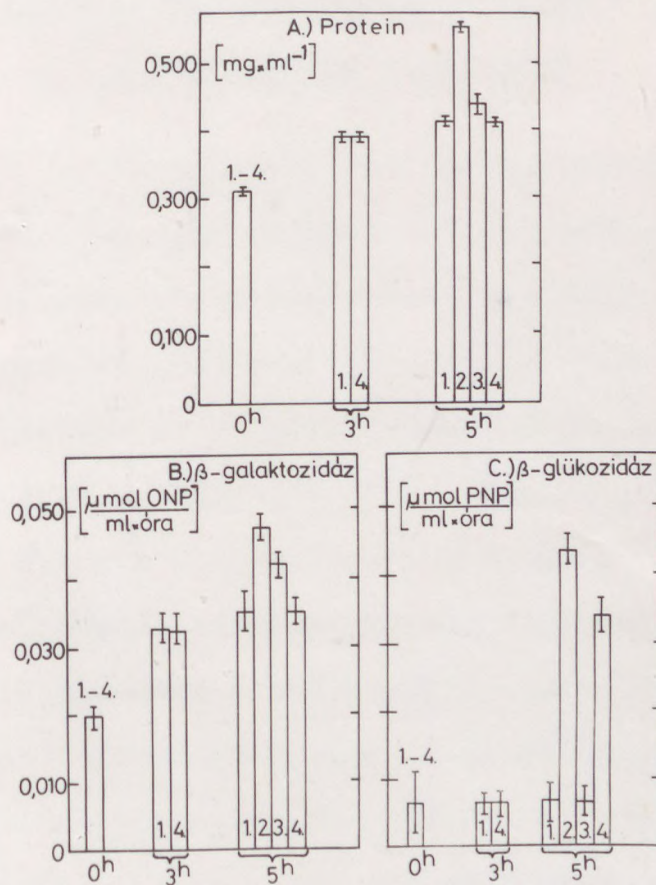
IV.2.14. ábra: A DNS, fehérje és β -galaktozidáz mennyiségek 1 órára számított növekedése $2 \cdot 10^{-3} M$ laktózzal indukált tenyészetben / $\bullet \text{---} \bullet$ $\Delta P/\Delta t$ = fehérje növekedés, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; $\Delta \text{---} \Delta$, $\Delta D/\Delta t$ = DNS növekedés $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; $\blacktriangledown \text{---} \blacktriangledown$, $\Delta E/\Delta t$ = β -galaktozidáz növekedés $\text{mU} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$



IV.2.15. ábra: A β -glükozidáz: β -galaktozidáz arány alakulása S. gr. 52-L-301 indukciója során



IV.2.16. ábra: A fehérjetartalom, a β -glükozidáz és β -galaktozidáz mennyiségének alakulása $2 \cdot 10^{-3}$ M laktózzal indukált és kontroll S.gr. 52-L-301 tenyészetben - K = kontroll /●/, L = indukált /○/, prot = protein mg/ml ○-----○, E = β -glükozidáz ○--○, és β -galaktozidáz ○—○, U/ml



IV.2.17. ábra: A β -galaktoszidáz és β -glükoszidáz indukálhatósága *Streptomyces griseus* 52-1 szülő törzs 24^h-ás mycéliumában. Előtenyésztés: glicerinnel + peptont tartalmazó, indukciós kísérlet: kazeinhidrolizátumos F-szint. táptalajban.

1. = szénhidrátmentes kontroll; 2. = 2 % glükóz; 3. = 2 % galaktóz; 4. = 2 % laktóz hozzáadásával.

A = protein, B = β -galaktoszidáz, C = β -glükoszidáz mennyisége a kísérlet kezdetén és 3, ill. 5 órával a reszuszpendálás után

IV.2.2. MEGBESZÉLÉS:

II. AZ ENZIMINDUKCIÓ TANULMÁNYOZÁSA SORÁN
KAPOTT ADATOK ÉRTÉKELESE

Az általunk részletesen tanulmányozott β -galaktozidáz /pontosabban ONPG-t bontó enzim/ mennyisége *S. griseus* törzseinkben jellegzetes, életciklustól függő változásokat mutat: a β -glükózidázzal és az első proteáz és alkalikus foszfatáz maximumokkal közel egyidőben a vegetatív fázis végén, a növekedési és átmeneti szakasz határán csúcst ér el.

Az egymással rendszerint párhuzamosan változó négy enzim szintézisének szabályozása azonban nem látszik közvetlenül összekapcsoltnak. A β -galaktozidáz és β -glükózidáz *Streptomyces fradiae*-ban is a *S. griseus*-ban leirtakhoz hasonló változásokat mutat /Vargha, Vitális, Szabó, 1978/. A különböző *S. griseus* mutánsokban és a *S. fradiae*-ban megfigyelt hasonlóság arra enged következtetni, hogy a felsorolt enzimek mennyiségének életciklustól függő szabályozása a streptomycesekre általában, vagy legalábbis egy több fajt magában foglaló csoportjukra jellemző közös mechanizmussal történik.

S. griseus 52-L-301 mutáns 20-24 órás mycéliumában,

ha megfelelő táptalajon történt az előtenyésztés laktózzal a β -galaktozidáz mennyiségének jelentős növekedése indukálható. 10^{-5} - 10^{-3} M laktóz alkalmazásakor a koncentráció növelésével az enzim felhalmozódásának sebessége is nő. Tovább növelve a laktóz koncentrációját változatlan sebességgel hosszabb időn át folytatódik az enzimszintézis. A laktóz hozzáadása után 1,5-2 óráig nincs mérhető különbség a kontroll és az indukált minták enzimszintjében. Utána kezd az indukáltakban az enzim mennyisége gyorsabban növekedni. A lappangási idő lényegében nem függ a laktóz koncentrációjától. Kézenfekvő lenne feltételezni, hogy a reszuszpendálás után adaptációra van szükség és az adaptációs periódusban gátolt az indukció /A kontroll kisebb enzimszint emelkedése is ugyanakkor indul, amikor az indukált/.

A tulajdonképpeni induktor feltehetően a streptomycetekben sem maga a laktóz. Erre közvetetten utal a táptalajcserés kísérletek eredménye: az indukált minták táptalaját azonos összetételű frissre cserélve az indukált enzimszintézisben 0,5-1 óra késés következik be.

A táptalajcsere hatására bekövetkező késés egyaránt magyarázható a táptalajcsere utáni újabb adaptációs periódus szükségességével /pl. a táptalajban esetleg felhalmozódó nélkülözhetetlen anyagok pótlásához szükséges idő/ vagy azzal, hogy az induktorszintézis köztitermékeinek /esetleg magának az induktornak/ egy része elvész a

lecserélt táptalajjal. Az utóbbi esetben a hosszú lappangási idő az induktor hatásos koncentrációjának lassu kialakulásával magyarázható. Az ellentétes értelmű táptalajcserével végzett kísérletekben, amikor az indukálatlan és reszuszenzió után 3,5 órán át tovább rázatott minták táptalaját cseréltük ugyanennyi ideig indukált minták szüretére, az indukált β -galaktozidáz szintjének gyors emelkedése a csere után kb. 30 perc múlva megindult. A lappangásnak ez a rövidülése mind az induktor, ill. intermediereinek felhalmozódásával, mind az "adaptációs szakasz" szükségességével egyaránt magyarázható lenne. Mivel a laktóz későbbi, a feltételezett adaptáció utáni adagolása nem rövidítette a lappangási időt /sőt 3 órás korban még hosszabb is a lappangási idő!/, az induktor lassu képződését tekintjük a hosszú lappangási szak egyik okának.

Azok a kísérleti adatok, miszerint más cukrok, elsősorban galaktóz hasznosítása során is növekszik a β -galaktozidáz mennyisége a kontrollhoz képest / IV.2.1. ábra és IV.2.3. táblázat / arra engednek következtetni, hogy az enzim szintézisének induktora más szénhidrátok feldolgozása során is létrejön kisebb mennyiségben.

A transzkripció és transzláció gátlásával kapott eredmények egyértelműen arra mutatnak, hogy a β -galaktozidáz mennyisége az indukció során fokozott sebességgel ujonnan szintetizálódó labilis mRNS-templáton zaj-

ló de novo fehérjeszintézis következtében növekszik. A mRNS szintézise és transzlációja között nem sikerült a gátlási kísérletekben késést, ill. olyan időszakasz közbeiktatódását kimutatni, melyben a megtermelt mRNS transzláció nélkül várakozna /Ilyen várakozási időket magasabbrendűeknél találtak, pl nyálkagombák fejlődésében Sussmann munkacsoportja - Roth et al. 1967/. Ebben a vonatkozásban a *S. griseus* β -galaktozidázának indukciója egyezik a tipusos bakteriális enzimindukciókkal: az enzimszint szabályozása döntően a transzkripció szabályozásával történik.

Az enzim mRNS-ének féléletidejét csak rifampicin alkalmazásával tudtuk mérni /az actinomycin D és más rokon hatásmódu vizsgált gátlók nem tisztázott okból nehezen korrekcióba vehető lizist, ill. degradációt okoztak/. A mért féléletidő az enzim-mRNS esetében 15,4 percnak adódott /27 °C-on/, egyéb fehérjékre, összességükben nézve a növekedés sebessége a gátlás után 10 - 12 percnként feleződött /Intézetünkben korábbi kísérletek során C^{14} -uracil 3-5'-es beépítését követően, más körülmények között, actinomycin D-vel gátolva a *S. gr. 52-1* mycéliumban egymás mellett mutattunk ki 2 perces - 6 perces feleződésű RNS-frakciókat - Valu, G., Vitális, S., nem közölt adatok/. A mRNS féléletideje és az életciklus közötti összefüggések tisztázásához

további adatgyűjtés szükséges.

A kész enzim bomlását, ill. inaktiválódását a transzláció chloramphenicolal történő gátlása után csak élelciklusukban előbbrehaladt, vagy peptidekben gazdag /triptonos/ táptalajban nőtt tenyészetekben tudtuk kimutatni. Szokásos kísérleti viszonyaink között az enzim akkor sem bomlott, ha a sejtextraktumban mérhető proteolitikus aktivitás volt jelen. Triptonos táptalajban indukált mintákban az észlelt fehérjebontást és ezen belül a β -galaktozidáz degradációját nem lehetett még igen nagy laktózkoncentrációkkal sem csökkenteni /l. Dán, Szabó, 1973/. Kísérleteinkben az enzimszint növekedését nem a szubsztrát, ill. az induktor bontás ellen védő hatása hozza létre /ill. nem sikerült olyan kísérleti adatot nyernünk, amelyik ilyen stabilizáló mechanizmus közreműködésére utalna/.

A *S. griseus* β -galaktozidázának indukciójában a más bakteriális rendszerekkel való alapvető egyezés mellett több olyan sajátosság is fellelhető, melyekben lényegesen különbözőknek látszik a tipikus bakteriális operonok - pl. *E. coli* lac-operon - indukciójától.

A streptomycészekben nincs állandó magasságu - ideális esetben közel nullának tekinthető - bazális β -galaktozidáz szint. Az enzimszint a kvázi-exponenciális növekedési szakasz második felétől még az enzim felhalmozódása szempontjából legkedvezőtlenebb glicerin-pepton

ill. glicerín-aszparagin táptalajban is egyre emelkedik. Az emelkedés reszuszpéndálás után nemcsak az induktormentes, hanem a C-forrást egyáltalán nem tartalmazó F-szintetikus alapoldatban reszuszpéndálva is folytatódik. A kontrollban is növekvő enzimszint miatt az indukált mintákban a kontrollhoz viszonyított β -galaktozidáz szint csak 5-10-szeresre nő. A kontrollban is változó "bazális szint" /?/ miatt az indukció mértékének, hatásosságának megítélése a szokásos módon nehéz.

Ellentétben az *E. coli* lac-operonnal szokatlanul hosszú, 1,5-2 óra lappangás van a preinduktor hozzáadása és hatásának megjelenése között. Más indukálható streptomyces enzimekre is gyakran hasonló hosszúságu, vagy még hosszabb lappangási idő jellemző /Inamine et al. 1969; Van Thoai et al. 1966; Horváth, Gadó, Szentirmai, 1959, 1961, 1962/. Träger és munkacsoportja a testostéron-17- β -dehidrogenázt indukálva azt találták, hogy egyik induktoral azonnal kiváltható, egy másikkal csak 3-4 óra lappangással indul az induktív szintézis /Markert, Träger, 1975/. Esetükben feltételezhető, hogy az egyik anyag maga az induktor /a feltevést erősíti, hogy specifikusan kötő receptor fehérje van a sejtben - Träger, 1973; Kurth, Träger, 1975/ a másikkal pedig lassan képződik kellő mennyiségben hatásos induktor. Következésképpen az induktor, ill. preinduktor hozzáadása és a fokozott enzimszintézis megindulása közötti

lappangási idő hiánya vagy eltérő hosszúsága önmagában nem jelent elvi különbségeket a szabályozás mechanizmusában. Egyetlen szabályozási egység is különböző preinduktorokra, különböző hosszúságu lag periódus után válaszolhat.

Az általunk tanulmányozott β -galaktozidáz és szintézisének szabályozása nem tekinthető sem eredetét, sem feladatát tekintve rokonnak az E. coli β -galaktozidázal, ill. lac-operonnal. A működésre képes enzim molekulásulya gélfiltrációval kb. 30 000 daltonnak adódott, szemben az E.coli β -galaktozidáz 500 000 dalton fölötti molekulásulyával. A streptomyces enzim K_M -je ONPG-re $3,3 \cdot 10^{-3} M$ - kb. 30-szor nagyobb az E. coli enziménél -, laktózra 0,12 M, több mint 20-szor nagyobb /az E. coli β -galaktozidáz molekulásulya és kinetikai paraméterei - Wellenfels, Weil, 1972. - a streptomyces enzimre vonatkozó adatok - Vitális, Kiss, Fodor, közlés előkészületben/. Feltűnő, hogy a streptomyces β -galaktozidáz alig mutat a laktóz iránt affinitást. Bár a laktózt jól hasznosító törzsekben nagyobb mennyiségben mutatható ki, kétséges, hogy a laktózbontás lenne a fő feladata. Az a megfigyelés hogy az életciklus egy meghatározott szakaszában akkor is képződik, ha nincs jelen külső preinduktor, és rövid kísérletben felhalmozódásra akkor is megindul, ha egyáltalán nincs jelen C-forrás, arra mutat, hogy a szintéziséért felelős faktorok endogén anyagokból is kép-

ződnek. Ez arra utal, hogy az E. coli enzimmel ellentétben nem a táptalajban megjelenő szubsztrátok lebontása jelenti a legfontosabb vagy egyetlen feladatát. Feltételezhető, hogy az enzim az életciklus szakaszváltásával kapcsolatos építő vagy bontó folyamatokban játszik szerepet és induktorát is ezen folyamatok metabolitjai között kell keresni. Ez az induktor nem azonos az E. coli lac-operon induktorával, vagy represszorhoz kötődése sokkal specifikusabb. Legalábbis erre utal az a tény, hogy az E. coliban igen hatásos induktor-analógok, az IPTG és TMG streptomycesben semmilyen körülmények között nem indukálnak. Laktóz hozzáadása csak növeli az indukálható törzs fonalaiban a laktóz hiányában is képződő induktor mennyiségét. Ebben a felfogásban a kontroll emelkedett enzimszintje nem "bazális szint" abban az értelemben, mint az indukálatlan E. coli β -galaktozidáza esetében. Ez az enzimszint endogén induktor /vagy indukáló hatás/ által emelt szintet jelent. Alapszintnek a fejlődés korábbi szakaszára jellemző sokkal kisebb enzimmennyiség tekinthető.

A rendelkezésünkre álló adatokból annyi állapítható meg, hogy a leirt módon tenyésztve a S. gr. 52-L-301 mutánst, a kvázi-exponenciális szak első felében - kétharmadában nem vagy alig indukálható a β -galaktozidáz szintézise. A vegetatív növekedési szakasz végén az átmeneti szakasz kezdetén maximális az indukálható-

ság. /A gátolt reprodukciós fejlődés miatt ez a szakasz 48 órás korrig is huzódhat./ A megöregedett 72 órás mycéliumban a szintézis nem indukálható, bár endogén okokból kevés enzim képződik.

A β -galaktozidáz szintézisének indukálhatósága azokra az életkorokra korlátozódik, melyekben a reszuszpendálást követően a laktóztól függetlenül is nő az enzimszint és nő a sejtfehérjék mennyisége is /azaz a fehérjék szintézise meghaladja a bontásukat/. Más szavakkal: a β -galaktozidáz szintézise csak növekedésre képes, de a kvázi-exponenciális szakaszon tuljutott mycéliumban indukálható.

Annak magyarázatára, hogy az indukálhatóság az életciklus egy szakaszára korlátozódik, több hipotézis is készíthető. Egyik a permeabilitás megváltozása lehet. A permeabilitás, ill. a sejthatár életkortól függő változásaira actinomycetalesekben, ill. Streptomycesekben több példa is ismert /Brown, Reda, 1967; Langheinrich, Ring, 1976; Alim, Ring, 1976; Hotta, Okami, 1976; Okanishi, Okami, 1966/. A permeabilitás változásának döntő szerepe ellen szól, hogy az enzimszint életciklustól függő változásai a konstitutív, táptalaj összetételre enzimszint változással nem reagáló mutánsokban is kimutathatók. Azt a feltételezést, hogy enzimünk szintézise, hasonlóan az E. coli gal-operonjához /Hua, Markovitz, 1974, 1975/ vagy deo- és cyt-operonjaihoz /Hammer-

Jespersen, Munch-Petersen, 1975 / kettős kontroll alatt áll /azaz életciklus-függő és induktor-függő/ adataink alapján sem kizárni, sem bizonyítani nem tudjuk.

Az indukálható mutáns mosott vegetatív mycéliumát friss táptalajban szuszpendálva és a leirt módon tovább rázatva, ha a mintavétel elég sűrű időközökben történt mind a β -galaktozidáz, mind a fehérjék, mind a DNS mennyiségének növekedése lépcsősnek bizonyult. A felhalmozódásuk szakaszos jellege még szembetűbb, ha az időegységre számított differenciákat, vagyis a növekedések sebességét ábrázoljuk az idő függvényében / IV.2.10. ábra és IV.2.14. ábra /. A sebességek szakaszos ingadozásában a mintavételi és mérési hibák és más véletlen tényezők szerepét a Yule és Kendall /1964/ által az idősorok elemzésére ajánlott statisztikai eljárásokkal vizsgáltuk. A számítások alapján a β -galaktozidáz és más fehérjék szintézisében az egyenletes sebességet feltételező nullhipotézis valószínűsége kisebb mint 0,001, ezért el kell vetnünk. A DNS replikáció sebességének ingadozásaiban a nullhipotézis valószínűségét 0,05 és 0,01 között találtuk.

A statisztikai elemzések alapján valószínű, hogy ebben az életszakaszban, az indukció vizsgálatára alkalmazott körülmények között a DNS replikációja szakaszosan és részben szinkronizáltan történik. A β -galaktozidáz és az egyéb fehérjék szintézisének sebességében

a megfigyelt ingadozások kétségtelenül léteznek. A transzkripció-gátlókkal végzett kísérletek arra utalnak, hogy ezek a transzlációk sebességében tapasztalt egymást váltó gyorsulások és lassulások a transzkripciók sebességének változásait követik: olyan időpontokban adva a gátlószert, amikor az enzim, ill. más fehérjék mennyiségének növekedése jelentősen lassul, vagy a növekedés nem mérhető, a gátolt és nem gátolt mintákban mért adatok között mindaddig nincs lényeges különbség, amíg a nem gátolt mintákban a növekedés ismét gyorsulni nem kezd. Ha az enzim, ill. más fehérjék szintézise gyorsul vagy jelentős sebességgel folyik, a gátolt minták elmaradása gyorsan szembetűnővé válik / 1. IV.2.5. - IV.2.9. ábrák /. Az ingadozások természetének, okának, más eseményekhez való viszonyának tisztázásához nem áll elegendő adat rendelkezésünkre, ill. módszerünk felbontóképessége még további finomításokra szorul. Az egyes fonalakban, fonalpopulációkban a DNS-replikáció, ill. sejtoszlási ciklusok sajátosságainak, egymáshoz való viszonyának a felderítése is további adatgyűjtést igényelne. Egyes enzimek és biokémiai aktivitások periódusos ingadozásának /"hullámzásának"/ mind szinkronizált, mind szinkronizálatlan baktériumtenyészetekben viszonylag sok példája ismert /Goodwin, 1969. a., b., Knorre, 1968; Sikyta et al., 1970/. Az esetek nagyobb részében nehéz a jelenséget a molekuláris mechanizmusok szintjén kielégítő

tően magyarázni. Más esetekben egyértelmű összefüggés mutatkozott a sejtoszlási ciklusok és a megfigyelt ingadozások között /Nishi, Kogoma, 1965; Kogoma, Nishi, 1965; Nishi, Hirose, 1966; Donachie, Masters, 1969; Halvorson et al. 1971; Hakenbeck, Messer, 1977/. Csirázó B. cereus spórákban Steinberg és Halvorson /1968/ kimutatták, hogy egyes enzimeknek nemcsak a szintézise szakaszos, hanem indukálhatóságuk is meghatározott sorrendben jelenik, majd szűnik meg és tér vissza később. Nem lehetetlen hasonló szakaszosság a Streptomyces β -galaktozidáz indukálhatóságában sem, de annak bizonyítására vagy kizárására, hogy az indukálhatóság valóban szakaszos ebben a rendszerben további vizsgálatok szükségesek. Fokozza érdeklődésünket a probléma iránt, hogy egyes modern elméletek az oszcilláló biokémiai-biológiai aktivitásoknak és ezek kölcsönhatásainak a differenciálódás térbeli és időbeli szervezésében is jelentőséget tulajdonítanak /Othmer, Scriven, 1971; Wolpert, 1969; Goodwin, Cohen, 1969; Hejnowicz, 1975; Schaffer, 1975; Wurster, 1976/.

Az indukció vizsgálata során a β -galaktozidáz és egyéb fehérjék szintézisében tapasztalt ingadozások a molekuláris mechanizmusokra és esetleges jelentőségükre vonatkozó /a rendelkezésre álló adatok alapján egyelőre megválaszolhatatlan/ elméleti kérdések mellett egy olyan kérdést is felvetnek, mely a kísérletek során nyert

adatok értelmezésére vonatkozik: *Streptomyces* tenyészetekben, melyek viselkedése a kísérlet során ilyen nagy mértékben különbözik az *E. coli lac*-operon vizsgálatánál támasztott követelményektől, milyen paraméterek alkalmasak az indukció mennyiségi jellemzésére és kinetikájának leírására? /Azaz, milyen következtetések vonhatók le a β -galaktozidáz indukciójának tanulmányozása során nyert adatainkból?/

Az enzimszintézis sebessége önmagában /az indukció jellemzésére való használatát l. Pardee, Prestidge, 1961; Kepes, 1963; Clark, Marr, 1964/ a kísérlet során bekövetkező jelentős /és a különböző körülmények között eltérő mértékű/ növekedés miatt nem alkalmas az indukció mennyiségi jellemzésére. A fehérjetartalomra vagy a fehérjeszintézis sebességére vonatkoztatott értékek - pl. a differenciális szintézis ráta /Clark, Marr, 1964; Sadler, Novick, 1965; Epstein et al. 1966; Magasanik, 1970/ vagy a specifikus aktivitás változása /Bates et al. 1967/ - alkalmazhatóságát a fehérjeszintézis szokatlan ingadozása teszi kétségesé.

Az "Anyagok és módszerek" c. fejezetben leírt 3. egyenlet bal oldalán szereplő α_1 szorzat más gének expressziójától független és az indukcióval arányos mennyiséget jelent — feltéve, hogy az indukált enzim felhalmozásának szabályozása a transzkripció szabályozásával történik. Maga a szorzat az indukált enzimet

kódoló mRNS szintézisének egységnyi DNS-templátra számított sebességét jelenti. Az egyenlet mindazokban az esetekben alkalmazható, melyekben az indukált enzim felhalmozódásának szabályozása a transzkripció szabályozásán keresztül valósul meg, feltéve, hogy nem iktatódik szabálytalan hosszúságu várakozási idő a transzkripció és transláció közé. Az egyenlet határesetként magában foglalja az indukció mennyiségi jellemzésére korábban alkalmazott összefüggéseket is. Azok a feltételek, melyek teljesülésekor a

$$\chi_1 a. i = \frac{1}{D} \left[\frac{d^2 E}{dt^2} + (\mu + \chi_2) \frac{dE}{dt} + \mu \chi_2 E \right]$$

egyenlet egy-egy korábban is alkalmazott összefüggésre egyszerűsödik egyben az adott összefüggés alkalmazhatóságának feltételeit is jelentik. Az ilyen irányú vizsgálatok szerint az enzimszintézis sebessége akkor ad torzítatlan becslést az indukcióról, ha a növekedés a kísérlet során elhanyagolhatóan kicsiny és az összehasonlított mintákban a sejtszám azonos. A differenciális szintézis-ráta akkor alkalmazható, ha a kísérlet során más fehérjék szintézisének sebessége állandó és az összehasonlított mintákban DNS-re számítva azonos. A specifikus aktivitás növekedése sem abszolút, sem relativ egységekben számolva nem egyenesen arányos az indukció mértékével — eltekintve néhány kivételes esettől. . Az összefüggések emelzése megerősítette azt a feltevésünket, hogy Streptomycesekben a

felsorolt összefüggések nem használhatók az indukció mennyiségi jellemzésére. Ahhoz, hogy az egyenletünk segítségével az indukciót torzítás nélkül jellemző \mathcal{H}_i sorozatot kellő megbízhatósággal kiszámíthassuk a mintavételek további sűrítése, a technika finomítása szükséges. Az egyenletből ugyanakkor kiolvasható, hogy a gén-expressziót jellemző mérési adatokat a tenyészetben található genomok számára, vagy ami ezzel arányos, a DNS mennyiségére kell vonatkoztatni. Kielégítő becslést kaphatunk az indukcióról az enzimszintézis DNS-tartalomra vonatkoztatott sebessége alapján, tudva azt, hogy a mRNS hosszú félélet-ideje miatt a transzláció nagyobb késéssel és tehetetlenséggel követi a transzkripció sebességének változásait.

A leirtak fényében értelmét veszti rokonvonások keresése a streptomycesek és magasabbrendűek enzimindukciója között, abból a megfigyelésből kiindulva, hogy mindkettő esetében az indukált minták specifikus aktivitása legfeljebb tíz-húszszorosan múlja felül a nem indukáltakét. Ha van a két rendszer között hasonlóság, az csak annyi, hogy mindkét esetben a külső induktor alkalmazásától függetlenül jelentős "alapaktivitás" alakul ki a "nem indukált" mintákban is. Az okok minden konkrét esetben rendkívül különbözők lehetnek.

Streptomyces griseusban a β -galaktozidáz indukciójának tanulmányozásával eddig nyert adataink több ismert

bakteriális génszintű szabályozási típus feltételezésével is összeegyeztethetők /represszor-induktor kapcsolódással derepresszálható, mint a lac-operon, apo-represszor-korepresszor kapcsolódással represszálható, mint pl. a triptofán-operon - Rose, Yanofsky, 1974; többszörös szabályozás, mint a gal-operon vagy deo-operon - Hua, Markovitz, ^{1975;} Hammer-Jaspersen, Munch-Petersen, 1975; "autoregulációs" - Savagean, 1975; Calhoun, Hatfield, 1975; aktivátorral működő pozitív csatolásu, mint az ara-operon - Cleary, Englesberg, 1974; - vagy mint a cAMP-CAP rendszer a katabolit represszióra érzékeny operonokban, - Zubay et al. 1970 - ill. ezek valamilyen kombinációja/. Azok a gének, melyeknek terméke egy-egy meghatározott életszakaszban jelenik meg /mint a vizsgált β -galaktozidáz is/ feltehetően többszörös szabályozásuak, azaz több feltétel egyidejű teljesülése szükséges expressziójukhoz.

Streptomycesekben az eddig tanulmányozott enzim-indukciók lefolyásukat tekintve két típusba sorolhatók: Egyik típust a S. hydrogenans 20β -hidroxisteroiddehidrogenázának indukciója képviseli. Az enzim szintézise a kvázi-exponenciális növekedési szakasz kezdetén indukálható és több vonatkozásban is egyezik a klasszikus bakteriális operonok indukciójával. A szintézis percekben belül megindul, a mRNS bomlása gyors. A másik típus legismertebb és legrészletesebben tanulmányozott példája az

α -mannozidáz indukciója Streptomyces griseusban
/Inamine et al. 1969/. Az enzim a vegetatív fázis leg-
végén indukálható. Az induktor adagolása után több óra
lappangási idő elteltével kezd fokozódni az enzim-
szintézis. Az indukció lefolyását finomabb időszerinti
bontásban nem vizsgálták. Az általunk vizsgált β -ga-
laktozidáz indukciója is ebbe a típusba tartozik és eb-
ben a 20β -hidroxisteroid-dehidrogenáz kivételével min-
den más eddig tanulmányozott indukálható streptomyces
enzim szabályozásával rokon. A két szabályozási típus
abban is különbözőnek látszik, hogy azok az enzimek,
amelyek szabályozásukat tekintve az α -mannozidázhoz
ill. β -galaktozidázhoz hasonlóak, az életciklus so-
rán külső induktortól függetlenül is jellegzetes szint-
változásokat mutatnak. Ezek termelése valamilyen módon
összefügg egy-egy differenciálódási lépéssel. Szabályozá-
suk molekuláris mechanizmusának megfejtése valószínűleg
közelebb fog vinni a streptomycesek differenciálódásá-
nak megértéséhez, s ezzel hozzájárul ahhoz, hogy a dif-
ferenciálódásról általában is többet tudjunk.

8. Avery, R.J., Blank, F. /1954/: On the chemical
composition of the cell walls of the Actino-
mycetales and its relation to their systematic
position
Canad. J. Microbiol. 1. 140-143.

9. Balassa, G. /1971/: The genetic control of spore
formation in Bacilli
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 56. 99-193.

IRODALOM

10. Balassa, G., Dod, B., Milhaud, P., Barro, A., Silva, M.T., Sousa, I. /1971/: Genetic control of late sporulation events in mutants of *Bacillus subtilis*. Preliminary results pp. 73-86 in "Spore Research 1970" ed. Barker, G. W. Holt and Press London.
1. Alaçević, M. /1976/: Recent advances in *Streptomyces rimosus* genetics pp. 513-519 in "Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms" ed. K.D. Macdonald, publ. Soc. Chem. Ind., Acad. Press, London - New York - San Francisco
11. Balassa, G. /1976/: Genetic control of late sporulation events in mutants of *Bacillus subtilis*. Preliminary results pp. 73-86 in "Spore Research 1970" ed. Barker, G. W. Holt and Press London.
2. Alikhanian, S.I., Ilyina, T.S., Lomovskaya, N.D. /1960/: Transduction in Actinomycetes Nature /London/ 188. 245-246.
12. Barab, J. /1960/: Transduction in Actinomycetes Nature /London/ 188. 245-246.
13. Barka, E. /1976/: Regulation of amino acid transport in growing cells of *Streptomyces hydrogenans* 2. Correlation between transport capacity and growth rate in chemostate cultures Arch. Microbiol. 109. 105-110.
14. Baskakova, G. /1966/: New colorimetric methods in sugar analysis pp. 85-95. in "Methods in Enzymology" Vol. VIII., ed. E.F. Neufeld and V. Ginsburg, Acad. Press. New York, London
4. Ashwell, G. /1966/: New colorimetric methods in sugar analysis pp. 85-95. in "Methods in Enzymology" Vol. VIII., ed. E.F. Neufeld and V. Ginsburg, Acad. Press. New York, London
5. Aslanian et al., 1971. 1. cirill betük
16. Behal, V., Cross, T. /1973/: Germination of actinomycete spores pp. 197-207. in "Actinomycetales. Characteristics and practical importance" ed. by G. Sykes and F.A. Skinner, Acad Press London, New York
6. Attwell, R.W., Cross, T. /1973/: Germination of actinomycete spores pp. 197-207. in "Actinomycetales. Characteristics and practical importance" ed. by G. Sykes and F.A. Skinner, Acad Press London, New York
17. Behal, V., Millet, J. /1965/: Regulation of biosynthesis of β -galactosidase in *Bacillus megaterium* in cours de la sporulation pp. 545-551. in "Mecanismes de regulation des activités cellulaires chez les microorganismes" 124. Colloques Internat. CRNS, ed. CRNS, Paris
7. Aubert, J.P., Millet, J. /1965/: Induction de la β -galactosidase chez *Bacillus megaterium* au cours de la sporulation pp. 545-551. in "Mecanismes de regulation des activités cellulaires chez les microorganismes" 124. Colloques Internat. CRNS, ed. CRNS, Paris
18. Behal, V., Blank, F. /1954/: On the chemical composition of the cell walls of the Actinomycetales and its relation to their systematic position Canad. J. Microbiol. 1. 140-143.
8. Avery, R.J., Blank, F. /1954/: On the chemical composition of the cell walls of the Actinomycetales and its relation to their systematic position Canad. J. Microbiol. 1. 140-143.
19. Bezborodov, I. /1971/: The genetic control of spore formation in Bacilli Curr. Top. Microbiol. Immunol. 56. 99-192.
20. Benigni, F., Barro, A. /1975/: The genetic control of spore formation in Bacilli Curr. Top. Microbiol. Immunol. 56. 99-192.
9. Balassa, G. /1971/: The genetic control of spore formation in Bacilli Curr. Top. Microbiol. Immunol. 56. 99-192.

10. Balassa, G., Dod, B., Milhaud, P., Serre, A., Silva, M.T., Sousa, I. /1974/: The genetic control of late sporulation events in mutants of Bacillus subtilis: Preliminary results pp. 73-86 in "Spore Research 1973" ed. Barker, Gould, Wolf, Acad Press London, Ne York
11. Balassa, G., Dod, B., Zucca, J. /1975/: Overproduction of sporulation associated protease in Bacillus subtilis mutants pp. 279-281. in "Spores VI." ed. P. Gerhardt, R. Costilow and H.L. Sadoff Am. Soc. Microbiol. Washington D.C.
12. Barabás, G., Szabó, G. /1964/: Comparison of cell wall composition of Streptomyces griseus strains Arch. Mikrobiol. 50. 156-163.
13. Barka, T. /1959/: Hisztokémia. 231-235. old. Kovács A.: A kísérleti orvostudomány vizsgáló módszerei, V. kötet. Budapest, Akadémiai Kiadó
14. Baskakova et al. /1967/: 1. cirill betűk
15. Bates, W.K., Hedman, S.C., Woodnard, D.O. /1967/: Comparative inductive responses of two β -galactosidases of Neurospora J. Bact. 93. 1631-1637.
16. Běhal, V., Cudlin, J., Vaněk, Z. /1969/: Regulation of biosynthesis of secondary metabolites III. Incorporation of C^{14} -acetic acid into fatty acids and chlortetracycline in Streptomyces aureofaciens Folia Microbiol. 14. 117-120.
17. Běhal, V., Jilek, M. /1969/: Regulation of biosynthesis of secondary metabolites VIII. Dynamics of fatty acid content during fermentation concentration in Streptomyces aureofaciens Folia Microbiol. 14, 211-214.
18. Běhal, V., Vaněk, Z. /1970/: Regulation of biosynthesis of secondary metabolites XII. Acetyl CoA carboxylase in Streptomyces aureofaciens Folia Microbiol. 15, 354-357.
19. Bezborodov et al /1967/: 1. cirill betűk
20. Benigni, R., Petrov, P.A., Carere, A. /1975/: Estimate of the genome size by renaturation studies in Streptomyces Appl. Microbiol. 30. 324-326.

21. Betz, J., Lotz, B., Träger, L. /1976/: Enzyme induction in *Streptomyces hydrogenans* VI. Studies on the induction of 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase, using immunological methods
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 777-782.
22. Betz, J., Träger, L. /1975. a/: Enzyminduktion bei *Streptomyces hydrogenans* IV. Qualitative und quantitative Änderungen des RNA-Gehaltes und RNA Synthese während der Induktion
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356. 357-366.
23. Betz, J.W., Träger, L. /1975. b./: RNA metabolism in *Streptomyces hydrogenans*. Effect of 20 β -hydroxysteroid-dehydrogenase inducing dienediol on RNA-content and RNA-profile
Acta microbiol. Acad. Sci Hung. 22, 509-520.
24. Betz, J.W., Schneider, B.H., Träger, L. /1977/: Enzyme induction in *Streptomyces hydrogenans* VII. Short-term accumulation of guanosine phosphates
25. Békési, I., Biró S., Vitális S. /1977/: Proteolitikus enzimaktivitás meghatározása komplex biológiai rendszerekben
Kisérlet. Orvostud. 29. 16-20.
26. Bisset, K.A., Hale, C.M.F. /1953/: Complex Structure in Bacteria
Expl. Cell. Res. 5. 449-454.
27. Boezi, J.A., Cowie, D.B. /1961/: Kinetic studies of β -galactosidase induction
Biophys. J. 1. 639-647.
28. Bormann, E., Christner, A.: Dependence of rate of microbiol product formation from length of biosynthetic pathway and oxygen limitation
Internat. Symp. on Nocardia and Streptomyces, Warszawa 1976. - Előadás -
29. Bott, K.F. /1976/: Regulation of bacterial sporulation pp. 419-436. in "Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganism" ed. K.D. MacDonald Ac. Press London, New York, San Francisco
30. Bourgeois, S. /1971/: The lac repressor pp. 39-75. in "Curr. Top. in Cellular Regulation" Vol. 4. ed. B.L. Horecker and E.R. Staaman A.P. New York

31. Bourgeois, S., Riggs, A.D. /1970/: The lac repressor-operator interaction IV. Assay and purification of operator DNA
Biochem. Biophys. Res. Comm. 38. 347-354.
32. Bradly, S.G., Ritzl, D. /1968/: Composition and ultrastructure of Streptomyces venezuelae
J. Bacteriol. 95. 2358-2364.
33. Brown, O.R., Reda, S. /1967/: Enzyme and permeability changes during morphogenesis of Nocardia corallina
J. Gen. Microbiol. 47. 199-205.
34. Bruhat, G., Kastler, A. /1959/: Cours de physique général: Optique 5^{ème} ed. Masson and C^{ie}, Paris /Dispersion anormal et absorption - p. 381./
35. Calhoun, D.H., Hatfield, G.W. /1975/: Autoregulation of gene expression.
Ann. Rev. Microbiol. 29. 275-299.
36. Carere, A., Russi, S., Bignami, M., Sermoniti, G. /1973/: An operon for histidin biosynthesis in Streptomyces coelicolor I. Genetic evidence.
Molec. gen. Genet. 123. 219-224.
37. Carvajal, F. /1947/: The production of spores in submerged cultures by some Streptomyces
Mycologia, 39. 425-440.
38. Chater, K.F. /1972/: A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of Streptomyces coelicolor
J. Gen. Microbiol. 72. 9-28.
39. Chater, K.F. /1973/: Sporulation in Streptomyces coelicolor
pp. 245. in "Spore Research, 1973" ed. A.N. Barker, G.W. Gould, J. Wolf
Acad. Press, London - New York
40. Chater, K.F., Hopwood, D.A. /1973/: Differentiation in Actinomycetes
pp. 143-160 in "Microbiol Differentiation, Symp. 23. Soc. Gen. Microbiol" ed. J.M., Ashworth, J.E. Smith, University Press, Cambridge
41. Clark, D.J., Marr, A.G. /1964/: Studies on the repression of β -galactosidase in Escherichia coli
Biochim. Biophys. Acta 92. 85-98.
42. Cleary, P.P., Englesberg, E. /1974/: Transcriptional control in the L-arabinose operon of Escherichia coli B/r
J. Bacteriol. 118. 121-128.

43. Coote, J.G. /1974/: Comparative studies on induction of sporulation and synthesis of inducible enzymes in Bacillus subtilis
J. Bacteriol. 120. 110-2-1108.
44. Cummins, C.S., Harris, H. /1958/: Studies on the cell-wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related groups
J. Gen. Microbiol. 18. 173-189.
45. Dán, A., Szabó, G. /1973/: Induced production of β -galactosidase in Streptomyces griseus
Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 1-10.
46. De Crombrughe, B., Chen, B., Anderson, W., Nissley, P., Gottesman, M., Perlman, R., Pastan, I. /1971. a/:
Lac DNA, RNA polymerase and cyclic AMP-receptor protein, cyclic AMP, lac repressor and inducer are the essential elements for controlled lac transcription
Nature, New Biol. 231. 139-142.
47. De Crombrughe, B., Chen, B., Gottesman, M., Pastan, I., Varmus, H.E., Emmer, M., Perlman, R.L. /1971. b/:
Regulation of lac mRNA synthesis in a soluble cell-free system
Nature, New Biol. 230. 37-40.
48. Demain, A.L., Inamine, E. /1970/: Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosidostreptomycinase / α -D-mannosidase/ formation
Bacteriol. Rev. 34. 1-19.
49. Donachie, W.D., Masters, M. /1969/: Temporal control of gene expression in bacteria
pp. 37-76. in "The Cell Cycle - Gene-Enzyme Interaction" ed. G.M. Padilla, G.L. Whitson, I.L. Cameron, Acad. Press New York, London.
50. Dorokhova, L.A., Agre, N.S., Kalakoutskii, L.V., Krassilnikov, N.A. /1969/ Fine structure of sporulating hyphae and spores in a thermophilic actinomycete, Micropolyspora rectivirgula
J. Microsc. /Oxford/ 8. 845-854.
51. Doskočil, J., Hošťalek, Z., Kasparová, J. Zajiček, J., Herold, M. /1959/: Development of Streptomyces aureofaciens in submerged culture
J. Biochem. Microbiol. Techn. Eng. 1. 261-271.
52. Dulaney, E.L. Parlman, D. /1947/: Observation on Streptomyces griseus I. Chemical changes occurring during submerged streptomycin fermentation
Bull. Torrey Botan. Club 74. 504-511.

53. Ebner, J.B. Frea, J.I. /1970/: Heat resistance during the life cycle of Streptomyces fradiae
Microbios. 5. 43-48
54. Elmerich, C., Aubert, J.P. /1975/: Involvement of glutamine synthetase and the purine nucleotide pathway in repression of bacterial sporulation pp. 385-390. in "Spores VI." ed. P. Gerhardt, R. Costilow and H.L., Sadoff
Am. Soc. Microbiol. Washington D.C.
55. Epstein, W., Naono, S., Gros, F. /1966/: Synthesis of enzymes of the lactose operon during diauxic growth of Escherichia coli
Biochem. Biophys. Res. Comm. 24. 588-592.
56. Erdei, J., Ujj Gy., Magyar I., Szabó G. /1972/:
Streptomyces griseus 45H/G-20 életciklus függő enzimtermelése.
Magyar Kémikusok Egyesülete XIII. Biokémiai Vándorgyűlés /Szombathely 1972/ Előadásai I. 25.
előadás /Budapest, MTESZ sokszorosításában/
57. Erikson, D. /1947/: Differentiation of the vegetative and sporogenous phases of the actinomycetes
1. The lipid nature of the outer wall of the aerial mycelium
J. Gen. Microbiol. 1. 39-44.
58. Fahimi, H.D., Drochmans, P. /1965/: Essais de standardisation de la fixation au glutaraldéhyde I.
J. Microscopie 4. 725-736.
59. Feulgen, R., Rosenbeck, H. /1924/: Mikroskopisch chemischer Nachweis einer Nucleinsäure von Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten
Hoppe Seyler's Z. Phys. Chem. 135. 203-248.
60. Garen, A., Levinthal, C. /1960/: A fine-structure genetic and chemical study of enzyme alkaline phosphatase of E. coli I. Purification and characterization of alkaline phosphatase
Biochim. Biophys. Acta 38. 470-475.
61. Ghuyssen, J.M., Shockman, G.D. /1973/: Biosynthesis of peptidoglycan.
pp. 37-130. in "Bacterial Membranes and Walls"
Vol. 1. ed. Loretta Leive, Marcel Dacker Inc.
New York
62. Gilbert, W., Müller-Hill, B. /1966/: Isolation of the lac repressor.
Proc. Nat. Acad. Sci USA, 56, 1891-1898.

63. Gilbert, W., Müller-Hill, B. /1967/: The lac operator is DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci USA, 58. 2415-2421.
64. Gilbert, W., Müller-Hill, B. /1970/: The lactose repressor.
pp. 93-109. in "The Lactose Operon" ed. J.R. Beckwith and D. Zipser, Cold Spr. Harbor Lab.
65. Glauert, A.M., Hopwood, D.A. /1959/: A membranous component of the cytoplasm in Streptomyces coelicolor
J. Biophys. Biochem. Cytol. 6. 515-516.
66. Glauert, A.M., Hopwood, D.A. /1960/: The fine structure of Streptomyces coelicolor
I. The cytoplasmic membrane system
J. Biophys. Biochem. Cytol. 7. 479-488.
67. Glauert, A.M., Hopwood, D.A. /1961/: The fine structure of Streptomyces violaceoruber /s. coelicolor/
III. The walls of the mycelium and spores
J. Biophys. Biochem. Cytol. 10. 505-516
68. Goodwin, B.C., Cohen, M.H. /1969/: A phase-shift model for the spatial and temporal organization of developing systems.
J. theoret. Biol. 25. 49-107.
69. Goodwin, B.C. /1969. a/: Synchronization of Escherichia coli in a chemostat by periodic phosphate feeding
Europ. J. Biochem. 10. 511-514.
70. Goodwin, B.C. /1969. b/: Control dynamic of β -galactosidase in relation to the bacterial cell cycle
Europ. J. Biochem. 10. 515-522.
71. Guttstein, M. /1924/: Das Ektoplasma der Bakterien
Zbl. Bakteriologie. Parasit. Infektionskrankh. Hyg. Abt. I. 93. 393-402.
72. Hagedorn, H. /1959/: Cytologische Untersuchungen an Streptomyces griseus /Krainsky/ -
Naturwissenschaften 46, 582-583.
73. Hakenbeck, R., Messer, W. /1977/: Oscillations in the synthesis of cell wall components in synchronized cultures of Escherichia coli
J. Bacteriol. 129. 1234-1238.
74. Halvorson, H.O., Carter, B.L.A., Tauro, P. /1971/:
Synthesis of enzymes during the cell cycle
pp. 47-106. in "Advances in Microbial Physiology"
Vol. 6. ed A.H. Rose and J.F. Wilkinson, A.P.
London-New York

75. Hammer-Jespersen, K., Munch-Petersen, A. /1975/:
Multiple regulation of nucleoside catabolizing
enzymes: regulation of the deo operon by the
cyt R and deo R gene products
Molec. gen. Genet. 137. 327-335.
76. Hardisson, C., Manzanal, M.B. /1976/: Ultrastructural
studies of sporulation in Streptomyces
J. Bacteriol. 127. 1443-1454.
77. Hashim, S.A. /1953/: Feulgen hydrolysis with
phosphoric acid
Stain Technol. 28. 27-31.
78. Hejnowicz, Z. /1975/: A model for morphogenetic
map and clock
J. theoret. Biol. 54. 345-362.
79. Herzenberg, L.A. /1959/: Studies on the induction of
 β -galactosidase in a cryptic strain of
Escherichia coli
Biochim. Biophys. Acta 31. 525-538.
80. Hirsch, C.F., Ensign, J.C. /1975/: Germination of
spores of Streptomyces viridochromogenes
pp. 28-35. in "Spores VI." ed. P. Gerhardt,
R.N. Costilow and H.L. Sadoff
Am. Soc. Microbiol. Washington D.C.
81. Hirsch, C.F., Ensign, J.C. /1976. a/: Nutritionally
defined condition for germination of
Streptomyces viridochromogenes spores
J. Bacteriol. 126. 13-23.
82. Hirsch, C.F., Ensign, J.C. /1976. b/: Heat activation
of Streptomyces viridochromogenes spores
J. Bacteriol. 126. 24-30.
83. Hockenull, J.D. /1960/: The biochemistry of
streptomycin production
Progr. Industr. Microbiol. /London/ 2. p. 133.
84. Holt, S.J., Hicks, R.M. /1961/: Studies on formalin
fixation for electron microscopy and cytochemical
staining purposes
J. Biophys. Biochem. Cytol. 11. 31-45.
85. Hopwood, D.A. /1973/: Genetics of the Actinomycetales
pp. 131-153. in "Actinomycetales: Characteristics
and Practical Importance" ed. G. Sykes and F.A.
Skinner A.P. London, New York

86. Hopwood, D.A., Chater, K.F., Dowding, J.E. Vivian, A. /1973/: Advances in Streptomyces coelicolor genetics Bacteriol. Rev. 37. 371-505.
87. Hopwood, D.A., Glauert, A.M. /1960. a/: Observations on the chromatinic bodies of Streptomyces coelicolor J. Biophys. Biochem. Cytol. 8, 257-265.
88. Hopwood, D., Galuert, A.M. /1960. b/: The fine structure of Streptomyces coelicolor II. The nuclear material J. Biophys. Biochem. Cytol. 8. 267-278.
89. Hopwood, D.A., Wildermuth, H., Palmer, H.M. /1970/: Mutants of Streptomyces coelicolor defective in sporulation J. Gen. Microbiol. 61. 397-408.
90. Hopwood, D.A., Wright /1976/: Interactions of the plasmid SCP1 with the chromosome of Streptomyces coelicolor A3 /2/ pp. 607-619. in "Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganismus" ed. K.D. Macdonald, publ. Society Chem. Ind. Acad. Press, London - New York - San Francisco
91. Horváth, I. /1971/: A valin és izoleucin bioszintézis szabályozása mikroorganizmusokban
Doktori értekezés
92. Horváth, I., Gadó, I., Szentirmai, A. /1959/: Formation of isoleucine in culture media containing threonin J. Bacteriol. 78. 293.
93. Horváth, I., Gadó, I., Szentirmai, A. /1961/: Possible causes for production of isoleucine by Streptomyces rimosus Nature, 192. 641-642.
94. Horváth, I., Gadó, I., Szentirmai, A. /1962/: Valine and isoleucine metabolism of Streptomyces rimosus Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 9. 11-12.
95. Hošťalek, Z., Tobek, I., Bobyk, M.A., Kulayev, I.S. /1976/: Role of ATP-glucokinase in Streptomyces aureofaciens Folia Microbiol., 21. 131-138.
96. Hošťalek, Z., Vaněk, Z. /1973/: Molecular basis of polygenic inheritance in the biosynthesis of chlortetracyclin pp. 353-371 in "Genetics of Industrial Microorganismus. Vol. II. Actinomycetes and Fungi" ed. Z. Vaněk, Z. Hošťalek, J. Cudlinc Academia, Prague

97. Hotchkiss, R.D. /1948/: A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations
Arch. Biochem. 16. 131-138.
98. Hotta, K., Okami, Y. /1976/: Effect of Mg^{++} on binding of aminoglycoside antibiotics to their producers
J. Ferment. Technol. 54. 563-571.
99. Hua, S.S., Markovitz, A. /1974/: Multiple regulation of the galactose operon. Genetic evidence for a distinct site in the galactose operon which responds to Cap R gene regulation in E. coli K-12.
Proc. Nat. Acad. Sci USA 71. 507-511.
100. Inamine, E., Lago, B.D., Demain, A.L. /1969/: Regulation of mannosidase an enzyme of streptomycin biosynthesis
pp. 199-221. in "Fermentation Advances"
Acad. Press, New York
101. Jacob, F., Monod, J. /1961/: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins
J. Mol. Biol. 3. 318-.
102. Jacob, F., Monod, J. /1961/: On the regulation of gene activity
Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 26. 139-209.
103. Jeney, A., Szabó G. /1963/: Studies on the nucleic acid content of Streptomyces strains
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 10. 271-275.
104. Jobe, A., Bourgeois, S. /1972. b/: The lac repressor-operator interaction VI. Natural inducer of the lac operon
J. Mol. Biol. 69. 397-408.
105. Jobe, A., Riggs, A.D., Bourgeois, S. /1972. a/: The lac repressor-operator interaction. V. Characterisation of super- and pseudo-wild-type repressors
J. Mol. Biol. 64. 181-199.
106. Jones, G.H., Weissbach, H. /1970/: RNA metabolism in Streptomyces antibioticus; Effect of 5-Fluoro-uracil on the appearance of phenoxazinone synthetase
Arch. Biochem. Biophys. 137. 558-573.
107. Kaempfer, R.D.R., Magasanik, B. /1967/: Mechanism of β -galactosidase induction in Escherichia coli
J. Mol. Biol. 27. 475-494.

108. Kalakoutskii et al. /1966/: 1. cirill betük
109. Kalakoutskii et al./1970/: 1. cirill betük
110. Kalakoutskii, L.V., Agre, N.S. /1976/: Comparative aspects of development and differentiation in Actinomycetes
Bact. Rev. 40. 469-524.
111. Kalakoutskii, Bobkova, /1966/: 1. cirill betük.
112. Kalakoutskii, Duzha /1967/: 1. cirill betük
113. Kalakoutskii, Kirillova /1965/: 1. cirill betük
114. Kalakoutskii, L.V., Pozharitskaya, L.M. /1968/: Calorimetric studies on germinating and quiescent conidia of Actinomyces streptomycini
J. Gen. Appl. Microbiol. 14. 209-212.
115. Kalakoutskii, L.V., Pozharitskaya, L.M. /1973/: The Streptomyces spore: its distinct feature and germinal behaviour
pp. 155.-178. in "Actinomycetales: characteristics and practical importance" ed. G. Sykes and F.A. Skinner
Acad. Press Inc. London
116. Kalakoutskii, Sokolov /1961/: 1. cirill betük
117. Kay, D., Warren, S.C. /1968/: Sporulation in Bacillus subtilis. Morphological changes
Biochem. J. 109. 819-824.
118. Kellenberger, E., Ryter, A. /1958/: A study of hybrids between two strains of E. coli
J. Biophys. Biochem. Cytol. 4. 323.
119. Kennell, D., Bicknell, I. /1973/: Decay of messenger ribonucleic acid from lactose operon of Escherichia coli as function of growth temperature
J. Mol. Biol. 74. 21-31.
120. Kepes, A. /1963/: Kinetics of induced enzyme synthesis determination of the mean life of galactosidase specific messenger RNA
Biochim. Biophys. Acta 76. 293.- 309.
121. Kepes, A. /1969/: Transcription and translation in the lactose operon of Escherichia coli studied by in vivo kinetics
pp. 201-236. in "Progress in Biophys and Molecular Biology" Vol. 19. part. 1. ed. J.V.A. Butler and D. Noble, Pergamon P. Oxford-London

122. Khokhlov, A.S., Anisova, L.N., Tovarova, I.I., Kleiner, E.M., Kovalenko, I.V., Krasilnikova, O.I., Kornitskaja, E.Ya., Pliner, S.A. /1973/: Effect of A-factor on the growth of asporogenous mutants of Streptomyces griseus, not producing this factor Z. Allg. Mikrobiol. 13. 647-655.
123. Khokhlov, A.S., Tovarova, I.I. /1972/: Studies on the streptomycin biosynthesis Post. Hyg. i. Med. Dos'w. 26. 469-491.
124. Kleiner et al. /1976/: 1. cirill betük
125. Knorre, W.A. /1968/: Oscillations of the rate of synthesis of β -galactosidase in Escherichia coli ML30 and ML 308 Biochem. Biophys. Res. Comm. 31. 812-817.
126. Koch, A.L. /1971/: The adaptive responses of Escherichia coli to a fast and famine existence pp. 147-217. in "Advances in Microbial Physiology" Vol. 6. ed. A.H. Rose and J.F. Wilkinson A.P. London - New York
127. Kogoma, T., Nishi, A. /1965/: Rhythmic variations in proteolytic activities during the cell cycle of Escherichia coli J. Gen. Appl. Microbiol. 11. 321-329.
128. Krassilnikov /1950/: 1. cirill betük
Krassilnikov /1970/: 1. cirill betük
129. Krámli, A., Kovács, A., Matkovics, B., Natonek, M., Pulay, G., Turay, P. /1954/: Herstellung von Streptomycin in Tellerkolonnen Acta biol. Acad. Sci. Hung. 5. 79-86.
130. Kriss /1937/: 1. cirill betük
131. Kulayev et al. /1976/: 1. cirill betük
132. Kurnick, N.B. /1950/: Methyl-green-pyronin I. Basis of selective staining of nucleic acids J. gen. Physiol. 33. 243-249.
133. Kurnick, N.B. /1955/ Pyronin Y in the methyl-green-pyronin histological stain Stain Technol. 30. 213-220.
134. Kurth, J., Träger, L. /1975/: Receptor for 5- -di-hydroxy testosterone from Streptomyces hydrogenans Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A. 233. 376-379.

135. Langheinrich, W., Ring, K. /1976/: Regulation of amino acid transport in growing cells of Streptomyces hydrogenans
Arch. Microbiol. 109. 227-235.
136. Lederberg, J. /1950/: The β -galactosidase of Escherichia coli, strain K 12
J. Bacteriol. 60. 381-392.
137. Linn, T., Losick, R. /1976/: The program of protein synthesis during sporulation in Bacillus subtilis Cell 8. 103-114.
138. Lomovskaya, N.D., Emeljanova, L.K., Alikhanian, S.I. /1971/: The genetic location of prophage on the chromosome of Streptomyces coelicolor
Genetics 68. 341-347.
139. Lowe, D.A., Westlake, D.W.S. /1972/: Regulation of chloramphenicol synthesis in Streptomyces sp. 3022 a. Branch-point enzymes of the shikimic acid pathway
Canad. J. Biochem. 50. 1064-1073.
140. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. /1951/: Protein measurement with the Folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193. 265-275.
141. Magasanik, B. /1970/: Glucose effects: inducer exclusion and repression
pp. 189-219. in "The lactose Operon" ed J.R. Beckwith and D. Zipser, Cold Spring Harb. Lab.
142. Mandelstam, J. /1969/: Regulation of bacterial spore formation
XIX. Symposium of the society for General Microbiology pp. 377-401
143. Marquet, A., Dusart, J., Ghuysen, J.M., Perkins, H.R. /1974/: Membrane-bound transpeptidase and penicillin binding sites in Streptomyces strain R61
Eur. J. Biochem. 46. 515-523.
144. Markert, C., Träger, L. /1975/: Enzyminduktion bei Streptomyces hydrogenans V. Charakterisierung der Testosteron-17- β -Dehydrogenase und ihre Induktion durch Steroide
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356. 1843-1852.

145. McManus, J.F.A. /1948/: Histological and histochemical uses of periodic acid
Stain Technol. 23. 99-110.
146. McVittie, A. /1974/: Ultrastructural studies on sporulation in wild-type and white colony mutants of Streptomyces coelicolor
J. Gen. Microbiol. 81. 291-302.
147. Merrick, M.J. /1976/: A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of Streptomyces coelicolor
J. Gen. Microbiol. 96. 299-315.
148. Mikulik, K., Karnetová, J. Quyen, N., Blumauerova, M., Komersova, I., Vaněk, Z. /1971/: Interaction of tetracycline with protein synthesising system of Streptomyces aureofaciens
J. Antibiot. 24. 801-809.
149. Monod, J., Jacob, F. /1961/: Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth and differentiation
Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 26. 389-401.
150. Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P. /1965/: On the nature of allosteric transitions: a plausible model
J. Mol. Biol. 12. 88-118.
151. Nagatsu, Ch., Matsuyama, A. /1970/: Changes in radiosensitivity of Streptomyces cacaoi spores during germination
Agr. Biol. Chem. /Japan/ 34. 860-869.
152. Neesemann, G., Hübner, H.J., Junk, R., Schmidt-Thome, J. /1960/: 20- β Hydroxysteroid-dehydrogenase
1. Züchtung von Streptomyces hydrogenans und Induktion des Enzyms
Biochem. Z. 333. 88-94.
153. Nishi, A., Hirose, S. /1966/: Further observations on the rhythmic variation in peptidase activity during the cell cycle of various strains of Escherichia coli
J. Gen. Appl. Microbiol. 12. 293-297.
154. Nishi, A., Kogoma, T. /1965/: Protein turnover in the cell cycle of Escherichia coli
J. Bacteriol. 90. 884-890.
155. Ohshima, Y., Mizokoshi, T., Hosiuchi, T. /1974/: Binding of an inducer to the lac repressor
J. Mol. Biol. 89. 127.-136.

156. Oishi, K., Aida, K. /1975/: Sugar specificity in the induction and on the activity of Streptomyces α -D-galactosidases
Agr. Biol. Chem. 39. 2129-2135.
157. Okanishi, M., Okami, Y. /1966/: Isolation and characteristic of an actinophage active on Streptomyces kanamyceticus
J. Gen. Appl. Microbiol. 12. 207-217.
158. Okanishi, M., Ohta, T., Umezawa, H. /1970/: Possible control of formation of aerial mycelium and antibiotic production in Streptomyces by episomic factors
J. Antibiot. 23. 45-47.
159. Othmer, H.G., Scriven, L.E. /1971/: Instability and dynamic pattern in cellular networks
J. theoret. Biol. 32. 507-537.
160. Pardee, A.B., Prestidge, L.S. /1961/: The initial kinetics of enzyme induction
Biochim. Biophys. Acta 49. 77-88.
161. Parker, R.D., Lincoln, T.L. /1966/: Parameters deducible from the kinetics of enzyme induction and repression.
J. Theoret. Biol. 15. 218-224.
162. Perlman, D., Langlykke, A.F. /1948/: The occurrence of mannosido streptomycinase
J. Amer. Chem. Soc. 70. 3968.
163. Péneau, H., Hagemann, G., Velu, H., Peyré, M. /1954/: Modalités du cycle évolutif de Streptomyces griseus en culture profonde
Rev. Immunol. 18. 265-281.
164. Prokofyeva-Belgovskaya /1963/: l. cirill betük
165. Prokofyeva-Belgovskaya, Orlova /1956/: l. cirill betük
166. Rancourt, M.W., Lechevalier, H.A. /1964/: Electron microscopic study of the formation of spring conidia in species of Streptomyces
Canad. J. Microbiol. 10. 311-316.
167. Rautenstein, Ya, I. /1970/: Lysogeny in actinomycetes and its biological significance
pp. 337-344. in "The Actinomycetales" /Symp./
Ed. H. Prauser, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

168. Richards, G.M. /1974/: Modification of the diphenyl amine reaction giving increased sensitivity and simplicity in the estimation of DNA
Anal. Biochem. 57. 369-376.
169. Riggs, A.D., Bourgeois, S., Cohn, M. /1970/: The lac repressor-operator interaction III. Kinetic studies
J. Mol. Biol. 53. 401-417.
170. Riggs, A.D., Newby, R.F., Bourgeois, S. /1970/: The lac repressor-operator interaction. II. Effect of galactosids and other ligands
J. Mol. Biol. 51. 303-314.
171. Riggs, A.D., Suzuki, H., Bourgeois, S. /1970/: The lac repressor-operator interaction I. Equilibrium studies
J. Mol. Biol. 48. 67-83.
172. Rinderknecht, H., Geokas, M.C., Silverman, P., Haverback, B.J. /1968/: A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity
Clin. Chem. Acta. 21. 197-203.
173. Rinderknecht, H., Wilding, P., Haverback, B.J. /1967/: A new method for determination of α -amylase
Experientia 23. 805.-
174. Romano, A.H., Nickerson, W.J. /1956/: The biochemistry in the Actinomycetales, Studies on the cell wall of *Streptomyces fradiae*
J. Bacteriol. 72. 478-482.
175. Romano, A.H., Sohler, A. /1956/: Biochemistry of the Actinomycetales II. A comparison of the cell wall composition of species of the genera *Streptomyces* and *Nocardia*
J. Bacteriol. 72. 865-868.
176. Rose, J.K., Yanovsky, C. /1974/: Interaction of the operator of the tryptophan operon with repressor
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71. 3134-3138.
177. Roth, R. Ashworth, J.M., Sussman, M. /1968/: Periods of genetic transcription required for the synthesis of three enzymes during cellular slime mold development
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 59, 1235-1242.
178. Russ, S., Carere, A., Siracusano, A., Ballio, A. /1973/: An operon for histidin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*
Molec. gen. Genet. 123. 225-232.

179. Ryter, A., Kellenberger, E. /1958/: Étude au microscope électronique de plasmas contenant de l'acide desoxyribonucleique
Z. Naturforsch. 13 b. 597-605.
180. Sabatini, D.D., Bensch, K.G., Barnett, R.J. /1962/: Preservation of ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation
J. Histochem. Cytochem. 10. 652-653.
181. Sadler, J.R., Novick, A. /1965/: The properties of repressor and kinetics of its action
J. Mol. Biol. 12. 305-327.
182. Satoh, A., Ogawa, H., Satomura, Y. /1975/: Role and regulation mechanism of kanamycin acetyltransferase in kanamycin biosynthesis
Agr. Biol. Chem. 39. 2331-2336.
183. Savageau, M.A. /1975/: Significance of autogenously regulated and constitutive synthesis of regulatory proteins in repressible biosynthetic systems
Nature, 258, 214-218.
184. Schaeffer, P. /1969/: Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes and exotoxins
Bacteriol. Rev. 33. 48-71.
185. Schumann, E., Bergter, E. /1976/: Mikroskopische Untersuchungen zur Wachstumkinetik von Streptomyces hygrosopicus
Z. Allg. Mikrobiol. 16. 201-215.
186. Sermonti, G., Bandiera, M., Spada-Sermonti, I. /1966/: New approach to the genetics of Streptomyces coelicolor
J. Bacteriol. 91. 384-392.
187. Sermonti, G., Puglia, A.M. /1976/: Progressive fertilization in Streptomyces coelicolor
pp. 565-572. in "Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms"
ed. K.D. MacDonald, publ. Soc. Chem. Ind., Acad. Press, London-New York - San Francisco
188. Shamina /1964/: 1. cirill betük
189. Sikyta, B., Vojtisek, V., Slezák, J. /1970/: Periodic changes of β -galactosidase in Escherichia coli B. in chemostat
Folia Microbiol. 14. 59-61.
190. Singh, V.N. /1976/: Adaptation in microorganisms: variation in macromolecular composition with growth rate
J. theoret. Biol. 59. 107-125.

191. Slapikoff, S., Spitzer, J.L., Vaccaro, D. /1971/: Sporulation in Bacillus brevis: Studies on protease and protein turnover
J. Bacteriol. 106. 739-744.
192. Sohler, A., Romano, A.H., Nickerson, W.J. /1958/: Biochemistry of the Actinomycetales III. Cell wall composition and the action of lysozyme upon cells and cell walls of the Actinomycetales
J. Bacteriol. 75. 283-290.
193. Spudich, J.A., Kornberg, A. /1968/: Biochemical studies of bacterial sporulation and germination VI.
J. Biol. Chem. 243. 4588-4599.
194. Steinberg, W., Halvorson, H.O. /1968/: Timing of enzyme synthesis during outgrowth of spores of Bacillus cereus I. Ordered enzyme synthesis
J. Bacteriol. 95. 469-478.
195. Stuart, D. /1969/: Fine structure of the nucleoid and internal membrane systems of Streptomyces
J. Bacteriol. 78. 272-281.
196. Sukharevich et al. /1972/: 1. cirill betük
197. Szabó, G., Békési, I., Vitális, S. /1967/: Mode of action of factor C, a substance of regulatory function in cyto-differentiation.
Biochim. Biophys. Acta 145. 159-165.
198. Szabó, G., Szeszák, F., Vitális, S. /1969/: Heterogeneity of Streptomyces mycelium and streptomycin production
pp. 130-136. in "Genetics and Breeding of Streptomyces"; Internat. Symp. Dubrovnik, ed. by G. Sermonti and M. Alacevic
Yugosi. Acad. Sci. Zagreb.
199. Szabó, G., Vályi-Nagy, T. /1956/: Studies on the resistance of streptomycin of Streptomyces griseus. I. Frequency of resistant variants. Patterns of resistance
Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 7. 25-42.
200. Szabó, G., Vályi-Nagy, T. /1957/: Studies on the resistance to streptomycin of Streptomyces griseus II. Interaction among spores
Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 8, 49-60.
201. Szabó, G., Vályi-Nagy, T., Vitális, S. /1967/: An endogenous factor regulating the life cycle of Streptomyces griseus
Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 18. 237-243.

202. Szabó, G., Vályi-Nagy, T., Vitális, S. /1963/: A new factor regulating the life cycle of Streptomyces griseus pp. 282-292. in V.D. Timakov /ed/. Genetica of microorganisms. Medicina, Moszkva /oroszul/
203. Szabó, G., Vitális, S., Békési, I. /1966/: An endogenous factor regulating the differentiation of Streptomyces griseus pp. 11. in IX. Internat. Congress for Microbiology, Moscow /Abstract/
204. Szabó, G., Vitális, S., Békési, I. /1967/: A differenciálódás tanulmányozása mikroorganizmusokon MTA Biol. Oszt. Közl. 10. 53-60.
205. Szeszák, F., Skripeczky, K., Princzinger, A., Szabó, G. /1973/: Functional units of Streptomyces hyphae equivalent with prokaryotic cells Zbl. Bakt. Abt. II. 128. 243-251.
206. Szeszák, F., Szabó, G., Vitális, S. /1967/: Isolation of different mycelial fractions from submerged culture of Streptomyces griseus strain by density gradient centrifugation Zbl. Bakteriolog. Parasit. Infect. Hyg. II. Abt. 121. 18-40.
207. Szeszák, F., Szabó, G. /1967/: Antibiotic production of hyphal fractions of Streptomyces griseus II. Streptomycin production of different fractions obtained by density gradient centrifugation Appl. Microbiol. 15. 1010-1013.
208. Szeszák, F., Szabó, G., Erdei, J., Müller, F. /1968/: Change of resistance to lysozyme and ultrasonic disintegration of the mycelium of Streptomyces griseus under the influence of chelating agents and polyvalent cations Canad. J. Microbiol. 14. 769-773.
209. Szulmajster, J., Keryer, E. /1975/: Isolation and properties of thermosensitive sporulation mutants of Bacillus subtilis, deficient in intracellular protease activity pp. 271-278. in "Spores VI." ed. P. Gerhardt, R. Costilow and H.L. Sadoff Am. Soc. Microbiol. Washington D.C.
210. Tipper, D.J., Linnett, P.E. /1976/: Distribution of peptidoglycan synthetase activities between sporangia and forespores in sporulating cells of Bacillus sphaericus J. Bacteriol. 126. 213-221.

211. Träger, L. /1973/: Enzyminduktion bei Streptomyces hydrogenans III. Aufnahme und Bindung von Steroiden
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354. 1077-1090.
212. Träger, L., Wacker, A. /1970/: Enzyminduktion bei Streptomyces hydrogenans, II. Hemstoffe der Enzyminduktion
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351. 329-334.
213. Tzyperovich et al. /1975/: 1. cirill betük
214. Valu, G., Szabó, G. /1966/: A comparison of the methods of quantitative determination of nucleic acids in Streptomyces griseus
Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 17. 167-173.
215. Valu, G., Szabó, G. /1970/: Changes of nucleic acid content of Streptomyces griseus strains in submerged culture
Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 21. 99-104.
216. Vaněk, Z., Hošťálek, Z. /1972/: Some aspects of the biosynthesis of chlortetracycline
Post. Hig. I. Med. Dosw. 26. 445-467.
217. Vargha, Gy., Vitális, S., Szabó, G. /1978/: Defective life cycle and low antibiotic production in submerged cultures of Streptomyces fradiae I.
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. in press
218. Vályi-Nagy, T., Szabó, G. /1957/: Group-wise growth of Streptomyces in a medium containing streptomycin
Arch. Mikrobiol. 27. 281-287.
219. Vitális, S., Hellio, R. /1969/: Principe de la mesure des colorations cytochimiques a l'aide du microscope à contraste de phase
Annal. Ins. Pasteur. 117. 213-242.
220. Vitális, S., Szabó, G. /1969/: Cytomorphological effect of factor C in submerged cultures on the hyphase of Streptomyces griseus strain NO 52-1
Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 20. 85-92.
221. Vitális, S., Szabó, G. /1978/: Enzyme induction in Streptomyces griseus
pp. 327-334. In "Nocardia and Streptomyces"
Proc. Internat. Symp. Warszawa 1976. ed. M. Mordarsky, W. Kurilowicz, J. Jeljaszewicz, Gustav Fischer Verl. Stuttgart - New York
222. Vitális, S., Szabó, G., Vályi-Nagy, T. /1963/: Comparison of the morphology of streptomycin-producing and non-producing strains of Streptomyces griseus
Acta. Biol. Acad. Sci. Hung. 14. 1-15.

223. Vivian, A. /1971/: Genetic control of fertility in Streptomyces coelicolor A3/2/: plasmid involvement in the interconversion of UF and IF strains
J. Gen. Microbiol. 69. 353. -
224. Volk, N.J. /1939/: /cit. Sukharevich et al., 1972/
J. Amer. Soc. Agron. 31. 577.-
225. Voronina et al. /1975/: l. cirill betük
226. Votavová, H., Sponar, J., Sormonová, Z. /1970/: Isolation and properties of rapidly renaturing fractions of DNA from calf tissues
Eur. J. Biochem. 12. 208-216.
227. Wachter, A., Bauer, B., Träger, L. /1970/: Enzyminduktion bei Streptomyces hydrogenans, I. Merkmale der Enzyminduktion
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351. 320-328.
228. Waksman, S.A. /1919/: Cultural studies of species of Actinomyces
Soil. Science 8. 71-215.
229. Waksman, S.A., Schatz, A., Reilly, H.C. /1946/: Metabolism and chemical nature of Streptomyces griseus
J. Bacteriol. 51. 753-759.
230. Wallenfels, K., Weil, R. /1972/: β -Galactosidase pp. 617-663. in "The Enzymes" Vol. VII. 3. ed. edited by P.D. Boyer, Acad. Press. New York, London
231. Warren, S.C. /1968/: Sporulation in Bacillus subtilis. Biochemical changes
Biochem. J. 109. 811-818.
232. Welsch, M. /1956/: Evidence for the occurrence of true lysogeny among actinomycetes
Virology 2. 703-704.
233. Welsch, M. /1959/: Lysogenicity in Streptomycetes
Ann. N.Y. Acad. Sci. 81. 974-993.
234. Welsch, M. /1969/: Biology of Actinophages pp. 43-62. in "Symposium on Genetics and Breeding of Streptomyces, Dubrovnik" ed. M. Alačević, Yugoslav Acad. Sci. Zagreb
235. Wildermuth, H. /1970/: Development and organization of the aerial mycelium in Streptomyces coelicolor
J. Gen. Microbiol. 60. 43-50.

236. Wildermuth, H., Hopwood, D.A. /1970/: Septation during sporulation in Streptomyces coelicolor
J. Gen. Microbiol. 60. 51-59.
237. Wildermuth, H., Wehrli, E., Horne, R.W. /1971/:
The surface structure of spores and aerial
mycelium in Streptomyces coelicolor
J. Ultrastruct. Res. 35. 168-180.
238. Williams, S.T., Sharples, G.P. /1970/: A comparative
study of spore formation in two Streptomyces
species
Microbios. 5. 17-26.
239. Williams, S.T., Sharples, G.P., Bradshaw, R.M. /1973/:
Fine structure of the Actinomycetales
pp. 113-127 in "Actinomycetales: characteristics
and practical importance" ed. G. Sykes and
F. Skinner, Acad. Press. Inc., London
240. Wolpert, L. /1969/: Positional information and the
spacial pattern of cellular differentiation
J. theoret. Biol. 25. 1-47.
241. Yanagisawa, K., Loomis, W.F., Jr. Sussman, M. /1967/:
Developmental regulation of the enzyme UDP-
galactose polysaccharide transferase
Exp. Cell. Res. 46. 328-334.
242. Yule, G.V., Kendall, M.G. /1964/: Bevezetés a statisztika elméletébe
Budapest, Közgazd. és Jogi Kiadó
243. Zaytseva, Orlova /1959/: 1. cirill betűk
244. Zubay, G., Chambers, D.A. /1969/: A DNA-directed
cell-free system for β -galactosidase synthesis:
characterisation of de novo synthesized enzyme
and some aspects of the regulation of synthesis
Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 34. 753.
245. Zubay, G., Schwartz, D., Beckwith, J. /1970/:
Mechanism of activation of catabolite-sensitive
genes: a positiv control system
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 66. 104-107.

- Асланян, Р.Р., Агре, Н.С., Калакуцкий, Л.В., Кириллова, И.П.
/1971./: Термоустойчивость спор актиномицетов в воде,
воздухе и углеводородах
Микробиология, 40. 293-296.
- Баскакова, А.А., Балдина, А.В., Безбородов, А.М. /1967./:
Изучение и характеристика основных свойств внеклеточной
дезоксирибонуклеазы актиномицетов
Микробиология, 36. 19-23.
- Безбородов, А.М., Иванова, Г.С., Юрьева, Л.И. /1967./: Био-
синтез рибонуклеазы культурой, Act. levoris 2789.
Прикладная Биохим. Микробиол. 3. 30-36.
- Воронина, О.И., Товарова, И.И., Хохлов, А.С. /1975./: Актив-
ность глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы различных штаммов,
Actinomyces streptomycini
Биорг. Химия, 1. 985-999.
- Зайцева, З.М., Орлова, Н.В. /1959./: Изучение условий образо-
вания окситетрациклина /террамицина/ культурой
Actinomyces rimosus ЛС-Т-118
Микробиология, 28. 216-223.
- Калакуцкий, Л.В., Агре, Н.С., Дорохова, Л.А. /1970./:
Биология развития актиномицетов
Инст. Научн. Информ. Публ. 40. 2981-71.
- Калакуцкий, Л.В., Бобкова, Е.А. /1966./: -Валин и прораста-
ние конидий Actinomyces streptomycini Б-6
Докл. Ак. Наук СССР 170. 1192-1194.
- Калакуцкий, Л.В., Бобкова, Е.А., Красильников, Н.А. /1966./:
Включение Р³² в непрорастающие конидии актиномицета
Actinomyces streptomycini Krass.
Докл. Ак. Наук СССР, 170. 705-707.
- Калакуцкий, Л.В., Дужа, М.И. /1967./: Ферментативная актив-
ность интактных конидий актиномицетов
Микробиология, 36. 279-283.
- Калакуцкий, Л.В., Кириллова, Н.Ф. /1965./: Прорастание спор
актиномицетов на "использованных" средах
Микробиология, 34. 163-170.

- Калакуцкий, Л.В., Соколов, А.А. /1961./: Гетерогенность оболочки воздушного мицелия Actinomyces violaceus
Микробиология, 30. 67-71.
- Клейнер, Е.М., Плинер, С.А., Соффер, В.С., Оноприенко, В.В., Балашова, Т.А., Розынов, Б.В., Хохлов, А.С. /1976./:
Строение А-фактора - биорегулятора из Streptomyces griseus
Биорг. Химия, 2. 1142-1147.
- Кулаев, И.С., Бобык, А.М., Тобек, И., Гомтялек, З. /1976./:
О возможной роли высокомолекулярных полифосфатов в биосинтезе хлортетрациклина у Streptomyces aureofaciens
Биохимия, 41. 343-348.
- Крассильников, Н.А. /1950./: Актиномицеты-антагонисты и антибиотические вещества
Изд.-во АН СССР, Л.
- Крассильников, Н.А. /1970./: Лучистые грибки
Издательство "Наука", Москва
- Крисс, А.Е. /1937./: Изменчивость актиномицетов
Издательство АН СССР, Москва
- Прокофьева-Бельговская, А.А., Орлова, Н.В. /1956./: Особенности роста и развития актиномицетов - продуцентов стрептомицина, биомицина и тетрамицина в условиях глубокого биосинтеза антибиотика
Изв. АН СССР, Серия биолог. 5. 59-66.
- Прокофьева-Бельговская, А.А. /1963./: Строение и развитие актиномицетов
Издательство Ак. Наук СССР, Москва
- Сухаревич, В.И., Яковлева, Е.П., Цыганов, В.А. /1972./:
Изменчивость актиномицетов при выращивании на агаризованных средах с различными окислительно-восстановительными условиями
Микробиология, 41. 508-512.

Цыперович, А.С., Кодратева, Л.Г., Лысенков, Н.В., Слуховская, М.А., Этингер, А.С. /1975./: Динамика образования отдельных ферментов протеолитического комплекса при выращивании Streptomyces griseus

Микробиология, 44. 37-41.

Шамина, З.Б. /1964./: наблюдения за ядерными элементами в процессе спорообразования у актиномицетов

Микробиология, 33. 831-835.

DEBRECENI ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Biológia Intézet

Dr. V i t á l i s Sándor

A Streptomyces griseus differenciálódása és
enzimszintézisének szabályozása

Kandidátusi értekezés

tézisei

Debrecen, 1978.

I. Kitűzött feladatok és tudományos előzmények

A Streptomycesek fonalas növekedésű és konidiumokat /más néven "konidio-spórákat" vagy rövidítve "spórákat"/ képző baktériumok. Sejtfelépítésüket és genetikai sajátosságukat tekintve más baktériumokhoz hasonlóan tipikus prokaryota szervezetek. Életciklusukat, differenciálódásukat tekintve több sajátosságukban is fejlettebbek más baktériumoknál, spóráképzésük a gombák konidium-képzésére emlékeztet.

A Streptomycesek gyakorlati jelentősége a sokféle antibiotikum termelésére való képességükből, változatos biokémiai aktivitásukból és a talaj biológiai folyamataiban játszott szerepükből adódik. Elméleti szempontból az teszi fontossá tanulmányozásukat, hogy fejlődésük differenciálódási modellként vizsgálható. Konidiumképzésük a genetikai rendszer egyszerűségét, a biokémiai-morfogenetikai folyamatok bonyolult összekapcsolását és rendezettségét tekintve olyan előnyöket kínál, melyek más differenciálódási modellek közül csak a bacillusok sporulációjában találhatók meg. A Streptomycesek differenciálódása a különböző fonaltípusok térbeli elkülönültsége és a térbelileg távolabb található sejtekben zajló folyamatok összerendezéséhez szükséges kölcsönhatások vonatkozásában még fejlettebbnek is látszik a bacillusok spóráképzésénél. Két hasonló használhatóságu dif-

ferenciálódási modell lehetőséget nyújthat egymást kiegészítő információk nyérésére és bizonyos általánosításra is. A Bacillusok sporulációja viszonylag ismert /már a modell egyes korlátai is láthatók/ a Streptomycesek életciklusa, differenciálódása és szabályozó rendszerei nagyobb részben feltérképezetlenek /legalábbis nagyon hézagos, rendszerezetlen, gyakran felszínes ismereteink vannak ezekről a kérdésekről/. Ez indokolja ezen újabb differenciálódási modell legfontosabb sajátosságainak és viselkedése főbb jellemzőinek megismerésére irányuló adatgyűjtő munkát.

A *Streptomyces griseus* differenciálódását az 52-1 jelű, streptomycint termelő szülő törzs és ennek 45H jelű, streptomycint nem termelő mutánsa életciklusának összehasonlításával kezdtük tanulmányozni. Korán felismertük, hogy a 45H mutáns életciklusa folyékony táptalajban is teljes, azaz bőségesen képez spórákat, az 52-1 törzs ilyen körülmények között nem képes a spóráképzésig eljutni fejlődésében.

A két törzs fejlődését összehasonlítva kerestem az életciklus korábbi szakaszaiban a spóráképzés mikroszkópi vizsgálattal kimutatható előzményeit. Kerestem az eltérő irányokban fejlődő és a fejlődés különböző szakaszáig eljutott fonalak megkülönböztetésére alkalmas eljárásokat és jegyeket. Tisztázni kívántam az "öreg vegetatív" és "reproduktív" fonalak, ill. ágak viszonyát a fejlődésben.

A Streptomycesek életciklusát a különböző szerzők más-más kritériumok alapján eltérő módon osztják szakaszokra.

Nem tisztázott a viszony sem a különböző szerzők által leírt szakaszok között, sem a Streptomycesek életciklusának szakaszai és az egyszerűbb baktériumok populációs /növekedési/ ciklusának szakaszai között. Az irodalmi adatok is túl hiányosak ahhoz, hogy az egyeztetés elvégezhető legyen. A Streptomycesek életciklusának jellemzésére különböző koru tenyészetekben a növekedés sebességéről és "kiegyensúlyozottságáról" a főbb makromolekuláris komponensek mennyiségének és arányainak változásai alapján kívántam információkat szerezni. Összefüggéseket kerestem a növekedési sajátosságok és a tenyészetben található különböző fonaltípusok megjelenése és aránya között.

Az enzimszintézis életciklussal összefüggő szabályozásáról a két eltérő differenciálódású törzs tenyészetében néhány, markerként választott enzim mennyiségének mérhető változásai alapján kívántam tájékozódni.

Célul tűztem ki, hogy az életciklus egyes szakaszaira leginkább jellemző génexpressziós, biokémiai és morfogenetikus folyamatokról vázlatos képet alkossak a növekedésbeli sajátosságok, enzimaktivitásbeli változások és a citológiai képben megfigyelhető változások /átépülések/ irányának és sebességének összevetése alapján. Ez egyúttal az életciklus szakaszokra osztásának kritikai áttekintését is jelenti.

Az életciklusban megnyilvánuló szabályozások és a gén-szintű szabályozó /alap/ mechanizmusok közötti lehetséges kapcsolatról egy életciklustól függően változó mennyiségben

termelődő markerenzim, a β -galaktozidáz indukciójának tanulmányozásával kívántam adatokat nyerni. Tájékozódni kívántam az indukálhatóság feltételei és sajátosságai mellett annak esetleges életciklustól függő változásairól is.

A *Streptomyces griseus* β -galaktozidáza esetében az indukció mértéke nem volt egyértelműen megítélhető az *E. coli* lac-operonra kidolgozott számítási módok és megfontolások alapján. Ez tette szükségessé, hogy az indukció mértéke és az indukált enzim mennyiségének változása közötti összefüggést és a befolyásoló tényezők erre kifejtett hatását matematikailag elemezzem. Céлом ebben a *Streptomyces* indukciójának számítására és megítélésére is alkalmas összefüggések megtalálása volt.

Az enzimindukció tanulmányozásával tájékozódni kívántam a *Streptomyces* génexpresszióját szabályozó alapmechanizmus /mechanizmusok?/ jellegéről: a transzkripciónak, translációnak és az aktiv enzim kialakulásának időbeli viszonyáról, specifikus gátlásuk következményeiről, az enzim mRNS-ének és a kész enzimnek a stabilitásáról, és mindezen tényezők indukcióban játszott szerepéről. Kerestem azokat a sajátosságokat, melyek az enzimindukció és differenciálódás kapcsolatára utalhatnak az általam vizsgált *Streptomyces* mutánsban.

II. Alkalmazott módszerek

1. Az életciklus vizsgálata: Felszinen nőtt spórákat használtam előzetesen megtisztítva a szuszpenziót a vegetatív fonalaktól és aberráns alakoktól /ultrahang-kezelés, lizozinos emésztés és szaharóz-ficoll rétegen keresztül centrifugálás/. 1,5-1,8 millió spóra pro ml táptalaj sűrűségben oltottam le és 27 °C-on rázatva, standard levegőzést biztosító módon tenyésztettem. Egy-egy vizsgált időpontban 3-3 párhuzamos tenyészetet dolgoztam fel: mintát vettem mikroszkópos vizsgálathoz, majd a myceliumot elválasztottam a tápfolyadéktól és mostam /16 óras kor előtt centrifugálással, idősebb tenyészetek esetén szűréssel/. A mycéliumot és a tenyésztő folyadékot -20 °C-on tároltam további feldolgozásig.

A tápfolyadékból közvetlenül, a mycéliumból szuszpendálás és ultrahanggal végzett feltárás után mértem a proteáz, alkalikus foszfatáz, β -galaktozidáz és β -glükozidáz aktivitásokat, a myceliumban ezek mellett mértem a DNS, RNS és fehérjék mennyiségét is /ultrahang-rezisztens frakcióban ez utóbbi három mérésére szoritkoztam/. A kapott mennyiségeket 1 ml tenyészetre számoltam és a mycélium DNS tartalmára vonatkoztattam.

Nukleinsavak mérése, a kismolekulájú zavaró szennyezéseket hideg 0,5 n perklórsavval /PCA/ oldottam ki. A csapadékot alkohol-éteres mosás után 70 °C-on 1,5 n PCA-val

extraháltam. A DNS mennyiségét az extraktumban a dezoxi-ribóz mennyisége alapján a Richards-szerinti érzékenyített difenilamin-reakcióval, az RNS mennyiségét a ribóz mennyisége alapján floroglucin-reakcióval Ashwell leírása szerint határoztam meg.

A fehérjék mennyiségének mérése: A minták fehérjéit triklórecetsavval kicsapva különítettem el a zavaró kis-molekulájú szennyezésektől. A csapadékot alkoholos mosás után 1 n NaOH-dal extraháltam 27 °C-on 24 órán át, majd desztillált vízzel 0,1 n-ra hígítottam. A fehérjék mennyiségét Lowry szerint mértem és bovin szérum albumin ekvivalens mennyiségével fejeztem ki.

Enzimaktivitások mérése: A β -galaktozidáz aktivitását Lederberg módszerének egy változatával mértem pH 6,5-ön, orto-nitrofenil- β -D-galaktozid bontása során felszabaduló o-nitrofenol lugosítás utáni fotometriai meghatározásával. A β -glükózidáz aktivitását ugyanezen elv alapján, de p-nitrofenil- β -D-glükózid szubsztráttal és pH 7,2-es közegben mértem.

Az alkalikus foszfatáz aktivitását Garen és Levinthal módszerének módosításával pH 8,0-on mértem p-nitrofenil-foszfát hasítása alapján.

A proteázok aktivitását Remazol-Red festékkel kovalensen kötött kazein bontása közben felszabaduló és szulfosalicilsavban oldódó színes termékek mennyiségének fotometriás mérésével határoztam meg. A szubsztrátot és a mérési

módszert Biróval és Békésivel állítottuk elő, ill. dolgoztuk ki.

Mikroszkópos vizsgálatok

Mintavétel és fixálás: Tisztított glutárdialdehid 6 %-os, pH 7,2-re pufferelt szacharózos oldatával fixáltam. 1 ml lehűtött fixálóba 0,5 ml tenyészetet mértem és egy éjszakán át fixáltam 0-4 °C-on. A fixáló felesleget háromszori desztillált vizes mosással távolítottam el. A megkötött glutárdialdehid szabadon maradt aldehid csoportjait borohidriddel redukálva iktattam ki a további reakciókból. A mosott, fixált szuszpenziókból keneteket készítettem.

Feulgen-reakció - a magekvivalensek mikroszkópos kimutatására. A savas hidrolizist Hashim módosítása szerint 42 %-os foszforsavval szobahőn végeztem 1 órán át. Schiff-reagenssel 0-4 °C-on egy éjszakán át festettem. Az eredményt anoptral-kontraszt berendezéssel 578 nm hullámhosszu közel monokromatikus fényben vizsgáltam. A fáziskontraszt eljárás és monokromatikus fény festett preparátumok vizsgálatára való alkalmazásának elvi alapjait Hellio -val dolgoztam ki.

Perjódsav-Schiff reakció / "PAS" / poliszacharidok sejtenbelüli feltüntetésére. McManus és Hotschkiss szerint végeztem. A reakció eredményét 578 nm-en anoptralkontraszt berendezéssel olajimmerziós nagyításban vizsgáltam.

Metilzöld-pironin festés a DNS és RNS feltüntetésére. Kurnick eljárásának módosításával pH 5,0-ön festettem. A metilzölddel festett részleteket 644 nm-en, a pironinnal festetteket 545 nm-en azonosítottam olajimmerziós nagyításban.

"Sejtfal-festés" és tájékozódás a fonalak jellegéről. Guttstein tanninos és Bisset és Hale foszformolibdénsavas pácolást alkalmazó eljárásából indultam ki. A két pácolási módot egymással kombináltam és bázikus festékek igen híg oldatával festettem. A mikroszkópos vizsgálatot speciálisan beállított felülvilágító berendezéssel áteső-réső fény kombinációjával végeztem. Ez az eljárás a sejtfalak kirajzolása mellett tájékoztatást ad a fonalak differenciálódásának irányáról és az elért fejlődési szakaszcól is.

2. Az enzimindukció vizsgálata

24 órás folyékony táptalajban tenyésztett mycéliumot szüréssel különítettem el a tenyésztő folyadéktól, majd új táptalajban szuszpendáltam meghatározott sűrűségben. A szuszpenziót az egyes sorozatoknak megfelelően szétosztottam és hozzáadtam az egyes sorozatokban vizsgálni kívánt anyagokat, majd 3 ml-ként szétmértem fiolákba. /Az azonos sűrűséget állandó keveréssel biztosítottam/ A fiolákat 27 °C-on tovább rázattam. Egy-egy fiola tartalma teljes egészében mintaként szolgált, minden vizsgált időpontban 3-3 párhuzamos mintát vettem.

A levett mintákban a további fehérjeszintézist chloram-

phenicol / 80 μg per ml/ hozzáadásával állítottam le, majd szüréssel elválasztottam a mycéliumot a tápfolyadéktól. A minták feldolgozásában az életciklus vizsgálatánál leírt módszereket alkalmaztam a fehérjék, enzimek és DNS meghatározására.

A transzkripció gátlásának hatását rifampicin vagy actinomycin D, ill. ethidium-bromid hozzáadása után a fehérjék és az indukált enzim mennyiségének változását mérve vizsgáltam. A transzlációs rendszer közreműködését chloramphenicolal hasonló módon tanulmányoztam.

Az indukció mértékét az egységnyi templáton folyó indukált enzim-mRNS transzkripciójának átlagos sebességével jellemeztem.

III. A munka során kidolgozott új vizsgálati módszerek értékelési, ill. számítási módok

1./ A tenyészetben található fonaltípusok gyors és megbízható felismerésére, s így a differenciálódás előrehaladásának megítélésére használható festési és mikroszkópos vizsgálati eljárást dolgoztam ki. Az eljárás foszformolibdén-savas és tanninos kezelés után bázikus festékek keverékével pontosan meghatározott körülmények között kivitelezett festésből, majd kombinált ráeső-áteső fényben végzett mikroszkópi vizsgálatból áll. Az eljárással biztosan felismerhetők a különböző koru vegetatív fonalak /fiatal, átmeneti,

ill. öreg/ a lizált fonalak maradványai és a spóra-
képzés különböző fokozatait képviselő reprodukтив
ágak.

- 2./ A különböző citokémiai reakciókkal /pl. PAS-, Feulgen-
reakció, stb./ halványan szineződő képletek mikrosz-
kópi vizsgálatára bevezettem a megfelelő hullámhosz-
szuságu közel monokromatikus fény- és fáziskontraszt
/ "anoptralkontraszt" / mikroszkóp használatát.
Hellio - val bizonyítottuk, hogy ilyen módon a kontraszt
a festésre specifikusan fokozható.
- 3./ A proteázok aktivitásának nagyszámu minta esetén is
használható, a korrábiaknál egyszerűbb mérésére
Békésivel és Biróval dolgoztunk ki módszert. /A módszer
Remazol Red festékkal kovalensen kötött kazein emész-
tése során felszabaduló, szulfoszalicilsavban oldódó
szines fragmentumok spektrofotometriás mérésén ala-
pul./.
- 4./ Az életciklus vizsgálata során a kémiai komponensek
és enzimaktivitások mért mennyiségét a DNS mennyisé-
gére vonatkoztattam, így az egy sejtre jutóval ará-
nyos mennyiségeket kaptam. A növekedés mértékét is
a sejtszámmal arányos DNS mennyiségével jellemeztem.
Ebben a vonatkoztatási rendszerben áttekinthetőbb a
változások iránya és jellege, mint más /pl. száraz-
anyagra vagy fehérjetartalomra számított/ adatok al-
kalmazásával.

5./ Matematikailag elemeztem az indukció mértéke és az indukált enzim mennyiségének változása közötti összefüggéseket. Egy operon indukciójának mértékét /i/ annak valószínűségével definiáltam, hogy az operátora szabad, azaz nem kötődik hozzá represszor. Az enzimszint és változása, s az indukció mértéke közötti összefüggést

$$\kappa_1 a i = \frac{1}{D} \left[\frac{d^2 E}{dt^2} + (\mu + \kappa_2) \frac{dE}{dt} + \mu \kappa_2 \cdot E \right]$$

formában találtam meg / κ_1 = transzláció sebességét, a = az RNS szintetizáló apparátus állapotát jellemző állandók; D = a DNS mennyisége; μ = a mRNS, κ_2 = az enzim bomlásának állandója; E = a vizsgált enzim mennyisége/.

Uj eredmények

1./ Kémiai, biokémiai, biofizikai módszerekkel és citológiai vizsgálatokkal a folyékony táptalajban növekvő Streptomycesek életciklusát többoldaluan, komplex módon jellemeztem.

A biomassa növekedésében a DNS és fehérjék mennyiségének sorozatos mérésével külön választottam a sejtek szaporodásából és a meglévő sejtek citoplazmájának méretnövekedéséből adódó komponenst.

Ultrahang segítségével elkülönítve a reproduktív fonalakat a vegetatív fonalaktól külön-külön jellemeztem a két fonaltípus növekedését, citológiai és kémiai jellegzetességeik változásait.

Igy az életciklus egyes szakaszainak legfontosabb eseményeiről az irodalomból ismertnél részletesebb és reálisabb képet nyertem és magyarázatot kaptam több ellentmondásra, ami az eltérő vizsgálati módszerek alkalmazásából és egyoldalú értelmezéséből adódott.

2./ A Streptomycesek életciklusában két élesen különböző fejlődési fázist és ezeken belül öt /három + kettő/ jól megkülönböztethető szakaszt írtam le:

I. Vegetatív fázis

1. Csirázás
2. Vegetatív /≠kvázi-exponenciális/ növekedés
3. Átmeneti szakasz /≠ első lizis/

II. Reproductiv fázis

4. Reproductiv növekedés

5. Morfogenezis /= spóráképződés/ és másod- dik lizis

A S. griseus 45H törzs életciklusa folyékony táptalajban is teljes, minden fejlődési szakaszon zavartalanul végighalad. A streptomycint termelő S. griseus 52-1 törzs fejlődése süllyesztett tenyészetben már a reproductiv fázis kezdetén elakad és a reproductiv program egyes elemei elszigetelten összerendezetlenül jelennek meg. Jellemző a poliszaccharidok igen nagyfokú felhalmozódása egyes fonalszakaszokban. A fonalak felépítése heterogénné válik és a tenyészet spóráképzés nélkül előregszik. /Irodalmi adatokból következtetve süllyesztett tenyészetben kevés Streptomyces törzs életciklusa teljes és zavartalan. A reproductiv fázis lefolyása ilyen viszonyok között rendszerint nehezített, gyakran el is akad./

3./ A Streptomycesek életciklusának vegetativ növekedési szakasza analóg az egyszerűbb baktériumok populációs ciklusának exponenciális növekedési szakaszával, de az egyezés csak részleges és igen mélyreható különbségek is kimutathatók. A sejtszám és a DNS mennyiségének időbeli alakulása a Streptomyces tenyészetek vegetativ növekedési szakaszában is exponenciális

egyenlettel írható le. A sejtek főbb makromolekuláris komponenseinek aránya viszont, más baktériumtenyészetektől eltérően, a kvázi-exponenciális /vegetatív/ növekedés során is nagymértékben változik: a fehérje: DNS arány végig nő, az RNS:DNS arány csúcson halad át. Azaz nem változatlan összetételű, nem egymással egyenértékű sejtek termelődnek újra az egymást követő generációkban. A tenyészet ebben az életszakaszban is fejlődik.

- 4./ A vizsgált marker-enzimek mennyiségének tenyésztési időtől függő változásai a Streptomycesek életciklusának génszintű vezérlésében szekvenciális indukciók, ill. derepressziók és repressziók közreműködését mutatják.

Jellemző néhány vizsgált enzim / β -galaktozidáz, β -glükózidáz, intra- és extracelluláris proteázok, alkalikus foszfatáz/ fokozódó felhalmozódása a vegetatív növekedési szakasz közepétől kezdődően az átmeneti szakasz elején kialakuló többé-kevésbé éles csúcsertékük eléréséig. A csucs elérése után mennyiségük csökken. Az alkalikus foszfatáz és a proteázaktivitás a reproduktív növekedés végén - morfogenetikus szakasz kezdetén újabb csúcson halad át. A S. gr. 52-1 törzs fejlődésének reproduktív fázisában a regulációs zavar azzal jár, hogy a proteázok és az alkalikus foszfatáz mennyisége gyorsabban nő,

mint a jól differenciálódó törzsben és a csucs elérése után is magas marad.

5./ Citológiai sajátosságaik és kémiai összetételük alapján jellemeztem a *Streptomyces* fonalak fejlődését és az egyes fejlődési szakaszokban fellelhető főbb fonaltípusokat. Kimutattam, hogy spórákban és reproduktív ágakban egy genomhoz lényegesen kisebb citoplazma tartozik, mint vegetatív fonalakban. A kisebb citoplazmában viszont az RNS koncentrációja nagy /vegetatív fonalak citoplazmájában hasonlóan nagy RNS koncentráció csak a legintenzívebb növekedés során az életciklus korábbi szakaszában fordul elő/.

A reproduktív ágak nem a korábban is meglévő vegetatív fonalak átalakulásával jönnek létre, kialakulásuk kezdetétől alapvetően különböznek azoktól és a két fonaltípusban a változások ellentétes irányúak később is. A S. gr. 45H törzs tenyészetében a reproduktív növekedési szakaszban szintetizált DNS-nek több mint 40 %-a a reproduktív ágakban található.

6./ Mutánst izoláltam, melyben a β -galaktozidáz szintézise indukálható, ugyanakkor szintjének differenciálódással összefüggő szabályozása változatlan, azaz a S. gr. 52-1 szülő törzssel azonos maradt. A β -galaktozidáz szintézise az izolált mutánsban a táptalajhoz adott laktózzal vagy kisebb mértékben más szénhidrátokkal /elsősorban galaktózzal/ indukálható. A laktóz hozzáadása után kb. két órával kezd fo-

kozódni az enzimszintézis. Nem maga a laktóz vagy galaktóz az induktor, hanem egy endogén metabolit, mely a megfelelő életszakaszban a laktóz hiányában is képződik, s melynek képződését induktív mutánsban a laktóz /vagy kisebb mértékben más cukor/ hozzáadása fokozni képes. A Streptomycesek β -galaktozidázának nem a táptalajban lévő laktóz hasítása a feladata.

7./ Bizonyítottam, hogy *S. griseus*-ban egyik, az életciklus keretében szabályozott marker enzim, a β -galaktozidáz szintézise labilis mRNS szintézisének keresztül szabályozódik. Az enzim-mRNS féléletideje 15 perc, lényegesen hosszabb, mint az egyszerűbb baktériumokban vagy a kvázi-exponenciálisan növekedő *S. hygroscopicus*-ban mért féléletidők.

A β -galaktozidáz indukálhatósága arra az életszakaszra korlátozódik, amikor induktor nélkül is emelkedik kissé az enzimszint. Ez kettős kontrollra utal: egyik az induktor szintjétől függő transzkripció-szabályozás és másik az életszakasztól / = differenciálódási stádiumtól / függő szabályozás. /A β -galaktozidáz és más fehérjék szintézisében rövidebb időközönkénti, egymással nem szinkron ingadozások még bonyolultabb, többszörös szabályozásra engednek következtetni/.

Az értekezés tárgyköréből megjelent közlemények

- Vitális, S., Szabó, G., Vályi-Nagy, T. /1963/: Comparison of the morphology of streptomycin-producing and non-producing strains of Streptomyces griseus
Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 14, 1-15.
- Szabó, G., Vályi-Nagy, T., Vitális, S. /1963/: A Streptomyces griseus életciklusát reguláló új, endogén faktor /oroszul/ pp. 282-292. in "Genetika Mikroorganizm" /Proc. Conf. Mikrobiol. Genetics, Moscow, 1962/ Gosz. Izd. Med. Lit. Moszkva
- Szabó, G., Békési, I., Vitális, S. /1967/: Mode of action of factor-C, a substance of regulatory function in cytodifferentiation
Biochim. Biophys. Acta 145. 155-165.
- Szabó, G., Vitális, S. /1967/: A differenciálódás tanulmányozása mikroorganizmusokon
MTA Biol. Oszt. Közl. 10. 53-60
- Szeszák, F., Szabó, G., Vitális, S. /1967/: Isolation of different mycelial fractions from submerged culture of Streptomyces griseus strain by density gradient centrifugation
Zbl. Bakt. II. Abt. 121. 19-40.
- Szabó, G., Vályi-Nagy, T., Vitális, S. /1967/: An endogenous factor regulating the life cycle of Streptomyces griseus
Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 18. 237-243.
- Vitális, S., Szabó, G. /1969/: Cytomorphological effect of factor C in submerged culture on the hyphae of Streptomyces griseus strain No: 52-1
Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 20. 85-92.
- Vitális, S., Hellio, R. /1969/: Principe de la mesure des colorations cytochimiques a l'aide du microscope à contraste de phase
Ann. Inst. Pasteur 117. 231-242.
- Szeszák, F., Szabó, G., Vitális, S. /1969/: Heterogeneity of Streptomyces mycelium and streptomycin production pp. 130-136. in: Genetics and Breeding of Streptomyces. Proceedings of Internat. Symp. Dubrovnik ed. G. Sermonti, M. Alacevic, Yug. Acad. Sci. Arts. Zagreb
- Békési, I., Biró, S., Vitális, S. /1977/
Proteolitikus enzimaktivitás meghatározása komplex biológiai rendszerekben
Kisérlet. Orvostud. 29. 16-20.

Vitális, S., Szabó, G. /1978/: Enzyme induction in Streptomyces griseus pp. 327-334. in "Nocardia and Streptomyces. Proc. Internat. Symp. Warsaw, oct. 4-8. 1976" ed. M. Mordardski, W. Kurylowicz, J. Jeljaszewicz - Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York

Előadások:

Vitális, S., Szabó, G., Vályi-Nagy, T. /1962/: Streptomycint termelő és nem termelő Streptomyces griseus törzsek életciklusának vizsgálata sülylyesztett tenyészetben
Előadás a Magyar Mikrobiológiai Társaság Kongresszusán /Kivonat német nyelven Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 10. 1. 71./

Szabó, G., Vitális, S., Békési, I. /1966/: Endogenous factor in differentiation of Streptomyces griseus. Proc. Soc. gen. Microbiol. 1966. London. J. gen. Microbiol. 44. V.

Szabó, G., Vitális, S. /1966/: A Streptomyces griseus differenciálódásáról
Előadás a Magyar Biológiai Társaság Tudományos ülésén, Pécs, 1966.

Szabó, G., Vitális, S., Békési, I. /1966/: Az endogenous factor regulating the differentiation of Streptomyces griseus
IX. Internat. Congress for Microbiol. Moscow, 1966. Abstr. p. 11.

Szeszák, F., Szabó, G., Vitális, S. /1966/: Isolation of fractions with different morphological and antibiotic producing characteristics from mycelium of Streptomyces griseus
IX. Internat. Congress for Microbiol. Moscow, 1966. Abst. p. 231.

Szabó, G., Schlammdinger, J., Vitális, S. /1969/: Effect of factor C a substance of regulatory function in cytodifferentiation, upon enzyme production
Madrid, FEBS 1969. Abstracts p. 1022.

Szabó, G., Vitális, S., Schlammdinger, J. /1968/: Influence on enzyme production of factor C, a substance of regulatory function in cytodifferentiation
Proc. XII. Internat. Congr. Genet. Tokyo 1968. Vol. I. p. 22.

Vitális, S., Kiss, A., Szabó, G. /1973/: A β -galaktozidáz indukciója és enzimológiai sajátosságai Streptomyces griseusban
Előadás a Magyar Biológiai Társaság 1973. ápr. 16.-i Tudományos Ülésén

Szabó, G., Vitális, S., Erdei, J., Békési, I. /1973/:
A differenciálódás szabályozásának tanulmányozása Streptomycesekben. - Eredmények és problémák. Beszámoló a "Bioreguláció - Genetikai szabályozás mechanizmusa" témakör kutatóinak tanácskozásán. 1973. ápr. Szeged

Vitális, S., Somogyi, B. /1975/: A β -galaktozidáz indukciójának analízise Streptomyces griseusban
Magyar Biofizikai Társaság és Magyar Biokémiai Társaság 1975 évi Vándorgyűlése, Debrecen /Abstr. Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 11. 187/

Vitális, S., Szabó, G. /1977/:
Enzimindukció a Streptomycesek differenciálódásában
Előadás a Magyar Biofizikai, Magyar Biokémiai és Magyar Élettani Társaságok 1977. évi közös Vándorgyűlésén, Pécs juni. 30-juli. 2.

Vitális, S., Vargha, Gy., Szabó, G. /1977/: Streptomycesek életciklusának vizsgálata
Előadás a Magyar Farmakológiai Társaság Kemoterápiás Szekciójának Tudományos ülésén 1977. május, Hajduszoboszló