

Jiří Stárka:

## Rozklad oxalátů půdními mikroorganismy

(Oddělení obecné mikrobiologie, biologická fakulta Karlovy university, Praha)

Do půdy přichází každoročně poměrně velké množství oxalátů s rostlinnými bytky, ale nedochází k jejich nahromadění. Osudu oxalátů v půdě však byla dosud věnována jen nepatrná pozornost. Rozpustné soli šťavelové kyseliny jsou známy svojí poměrně značnou toxicitou pro většinu mikroorganismů a proto jejich odbourávání bylo spíše hledáno v čistě chemických procesech.

Tak na př. Wehmer (1891) pozoroval, že roztoky oxalátů jsou samovolně oxydovány za účasti denního světla. K samovolné oxydaci může dojít i v půdě, kde dochází nejdříve k vysrážení Ca oxalátů a dále k jeho pomalému rozkladu na CO<sub>2</sub>. Tato oxydace není způsobena žádnými specifickými substancemi, ani pH půdy zde nehraje rozhodující úlohu. Kysličníky kovů (Al, Fe, Si, Ba, Ca, Cr, Cu, Pb, Mn, Zn) a ferroalumosilikáty oxydaci podporují. I v okyselených půdách (pH = 3,2 až 6,88) byly oxaláty za 15 dní rozloženy z 60 až 80 %, podobně jako v půdách neutrálních. Oxydační proces není přerušen ani sterilisací půdy (Puri, Rai a Kapur 1946).

Rozklad oxalátů v půdě však není jen procesem anorganickým. První doklady o účasti bakterií přinesl Bassalik (1913), který mezi 90 bakteriemi a houbami izolovanými z půdy, z nichž tři dovedly aktivně štěpit šťavelany, nalezl bakterii s významnými oxalolytickými vlastnostmi a nazval ji *Bacillus extorquens*. Tato bakterie dovede využít šťavelanu jako jediného zdroje uhlíku a energie. Od důkladné studie Bassalikovy objevily se jen ojedinělé zprávy o rozkladu oxalátů, avšak bez snahy nebo úspěchu izolovat specifického rozkladače. Jsou uvedeny v práci Bhatové a Barkerové (1948), kteří našli nového rozkladače, příbuzného Bassalikovu *B. extorquens*, a nazvali jej *Vibrio oxaliticus*. Jmenovaní autoři stanovili charakteristiky tohoto nového druhu a sledovali oxydaci oxalátu a formiátu jeho promytými suspensemi. Janotovi (1950) se dokonce podařilo najít v půdě Bassalikovu bakterii, kterou na základě její morfologické a biochemické charakteristiky zařadil k rodu *Pseudomonas* (*Pseudomonas extorquens* Bassalik). Dalšího nového rozkladače isolovali Kambata a Bhat (1953) a Jayasuriya (1954).

Schopnost asimilovat oxaláty je značně rozšířena u hub, které za vhodných podmínek je dovedou vytvářet především z cukrů a za jiných podmínek opět dále metabolisovat. První zprávy jsou ve zmíněné práci Wehmerové (1891), další doklady přinesli Bach a Fournier (1935), Chrzaszcz a Zakomorny (1933) a j. a jsou přehlednuty ve Fosterově (1949) monografii. Aktinomycety podle zjištění Pridhamova a Gottliebova (1948) oxaláty zpravidla nedovedou využít, naproti tomu některé druhy *Proactinomyces* jsou dobrými rozkladači (Müller 1950).

Úkolem této práce bylo ověřit přítomnost bakterií štěpících oxaláty v našich půdách a zrevidovat tuto vlastnost u mikroorganismů s tak vydatnou přízpusobivostí jako jsou aktinomycety.

### Isolace bakterií

Asi 1 g čerstvé půdy byl roztřepán ve 100 ml tekutého BB media v baňce, které byly inkubovány při 28°. Za 24 hodin se projevil sice slabý, avšak patrný růst (zákal). Současná alkalisace media naznačovala nahromadování alkalických kationtů uvolněných asimilací oxalátů, jejichž úbytek byl prokazatelný titračně N/10 KMnO<sub>4</sub> (tab. 1).

Tabulka 1

Půdní vzorek*)	1. pasáž pH za 3 dni	2. pasáž pH za 3 dni
Zahradní listovka	8,0 7,6	8,8 8,5
Zahradní listovka s rašelinou	7,4 7,4	8,1 8,3
Rašelina	7,6 7,6	8,4 8,3

\*) Počáteční pH BB media bylo 7,0.

BB medium (Bhat a Barker 1948)

COOH . COOK	0,1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,05 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05 g
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,01 g
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,002 g
CaSO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,001 g
H <sub>2</sub> O destil. do 100 ml	pH = 7,0

Z nahromadovacích kultur po několikanásobném přeočkování byly očkovány po naředění misky s BB agarem (na 100 ml BB media přidáno těsně před vylitím na misky 2 ml M/10 CaCl<sub>2</sub>, odděleně sterilisovaného). Kolonie oxalotických bakterií vytvářely průhledné zony po odbourání šťavelanu vápenatého, jemně rozptýleného v agaru. Isolací na téže půdě získány čisté kultury gramnegativních drobných krátkých tyčinek až vibrií, tvořící na BB agaru drobné bezbarvé až bílé kolonie o průměru asi 1 mm za 48 hod. Podle kulti-vačních charakteristik (růst na masopectonovém bujonu a BB agaru s kvasničným extraktem) a morfologického obrazu podobají se Bhatem a Barkerem (1948) popsanému *Vibrio oxaliticus*.

### Isolace aktinomycet

Aktinomycety byly izolovány\*) obvyklým způsobem na McBeth-Scalesově agaru a přeočkovány na BB agar. Testováno bylo 16 kmenů aktinomycet, z nichž 6 dovedlo růst na BB agaru a štěpit oxaláty. Jejich charakteristika na obou půdách je uvedena v tabulce 2:

\*) Isolaci provedli ochotně V. Matelová a J. Protiva.

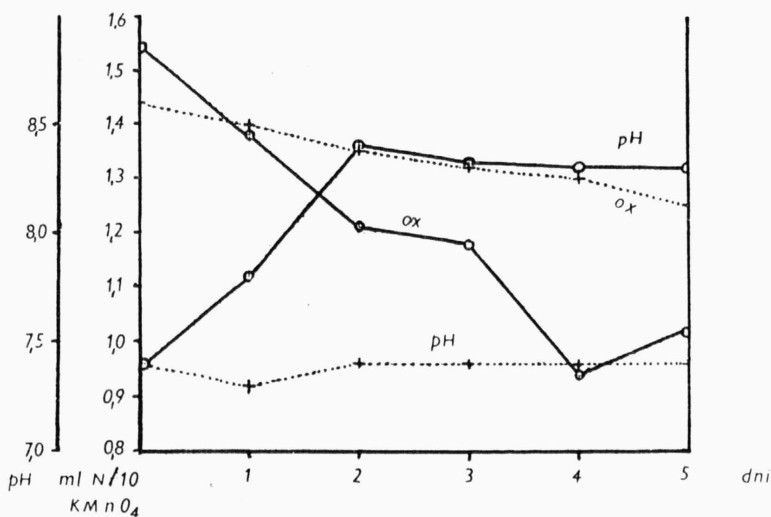
Tabulka 2

Kmen číslo	BS agar			BB agar		
	mycelium	vzduš. hyfy	pigment v prostř.	mycelium	vzduš. hyfy	pigment v prostř.
A 1	bílé	bílé	hnědý	bílé	bílé	0
A 2	šedé	bílé	0	šedozelené	bílé	0
A 3	bílé	bílé	žlutozelené	bílé	bílé	0
A 4	hnědé	šedé	červený	šedohnědý	šedé	červený
A 5	šedé	šedé	0	šedé	šedé	0
A 6	šedé	šedé	0	šedé	šedé	0

### Asimilace šťavelové kyseliny

Isolovaná kultura oxalolytických bakterií byla naočkována do skleněného válce obsahu 2000 ml, naplněného 1000 ml tekuté BB půdy a provzdušňována přes sintrovou destičku pomocí vibračního motorku. Jako kontrola sloužila stejně upravená avšak nenaočkovávaná nádoba, provzdušňovaná týmž způsobem. Kultivační teplota byla 20° v rozptýleném denním světle. Úbytek oxalátů byl stanoven ve 20 ml vzorech převedením na Ca·sůl, která po oddělení na sintrovém filtru byla rozpuštěna ve 4/N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a za horka (80 až 90°) titrována 0,1/N KMnO<sub>4</sub> (T o m í č e k 1950).

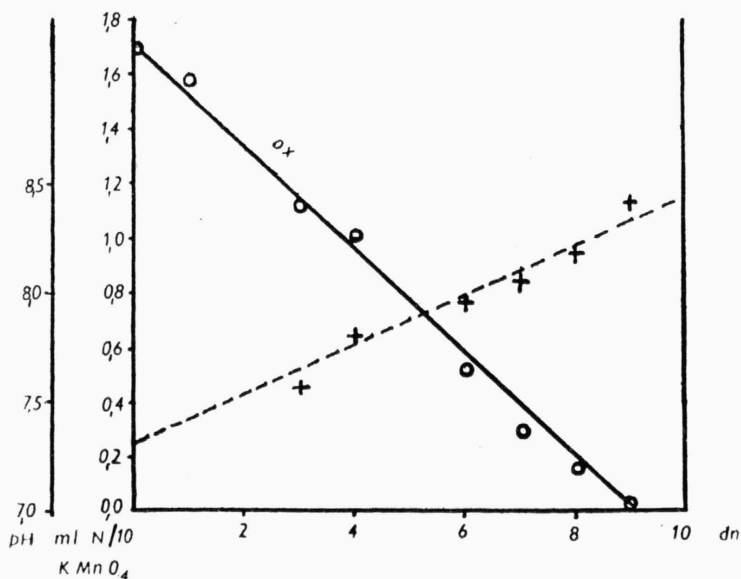
Zatím co v kontrolní nádobě obsah šťavelanu za 5 dní poklesl oxidační vzdušným kyslíkem jen nepatrně a pH se od počátku nezměnilo, v naočko-



Obr. 1. Úbytek oxalátů ve vzdušné kultuře bakterií. ox = úbytek oxalátů v ml N/10 KMnO<sub>4</sub>, . . . . kontrola

vaném válci se již za 24 hodin objevil zákal a úbytek oxalátů. Za 5 dní byla přibližně jedna třetina oxalátů odbourána a pH stoupl až na 8,3.

Obdobný pokus byl proveden s kmenem *Actinomyces* sp. A 3 rovněž na BB mediu. Očkováno bylo suspenzí spor z šikmého agaru (zkumavka  $\varnothing$  20 mm na 1000 ml půdy). V kontrolním nenačkovaném válci poklesl obsah oxalátů za 9 dní s 1,7 na 1,45 ml spotř. N/10  $\text{KMnO}_4$  ve vzorku.



Obr. 2. Úbytek oxalátů ve vzdušné kultuře aktinomycety ————— = pH

Aktinomyceta rostla poměrně dobře na syntetické půdě bez růstových faktorů a vytvářela kuličkovité mycelium. Ve srovnání s růstem na glukosovém bujonu byla tvorba biomasy ovšem značně pomalejší a slabší. Byla-li přidána v paralelním pokuse glukosa (0,1 %), aby byl stimulován počáteční růst, rozklad oxalátů probíhal vzhledem k většímu množství asimilujících buněk v daném objemu rychleji. Podobný účinek měl i asparagin (0,01 %). Desetinásobné zvýšení obsahu oxalátů v mediu (na 1 %) mělo jasně brzdivý vliv a aktinomyceta nerostla ani pátý den kultivace.

Tabulka 3

BB medium + zdroj dusíku (0,066 % N)	0 den		12. den		
	pH	N/10 $\text{KMnO}_4$	pH	N/10 $\text{KMnO}_4$	suš. v mg
$\text{NH}_4\text{Cl}$	7,5	1,70	7,0	0,06	10,0
$\text{KNO}_3$	7,5	1,70	8,5	0,1	5,8
Asparagin	7,5	1,70	8,5	0,22	20,4
Sterilní kontrola	7,5	1,70	7,6	1,42	

Při kultivaci kmene A 3 za statických podmínek (500 ml baňky se 100 ml media) na tekuté BB půdě se ukázal zdroj dusíku jako velmi významný pro intenzitu rozkladu oxalátů (tab. 3).

Nejlépe byly štávelany využity na  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , nejméně na asparaginu, ačkoli zde byla podle očekávání sušina nejlepší. Asparagin byl zároveň využit jako zdroj uhlíku a energie přednostně před oxaláty.

## Závěr

V zahradní půdě a v rašelině jsou hojné bakterie patřící velmi pravděpodobně k druhu *Vibrio oxaliticus* a podílejí se s dalšími mikroby, především aktinomycetami, na odbourávání štávelanů, pokud se vyskytnou v půdě s rostlinnými zbytky nebo jako metabolity hub.

Isolované bakterie i aktinomycety dovedou využít oxalátů rozpustných i nerozpustných ve vodě jako jediného zdroje energie a uhlíku. V obou případech je asimilace podstatně urychlena provzdušňováním. Aktinomycety jsou zřejmě velmi aktivními rozkladači oxalátů. Z 16 testovaných kmenů štěpilo oxaláty jako jediný zdroj C 6 kmenů. Vybraný kmen A 3 spotřeboval za 5 dní kultivace substrát ze 66%, zatím co bakterie za stejnou dobu využily pouze 40%. Za 9 dní byl u aktinomycety veškerý oxalát rozložen, u bakterií i při delší kultivaci se pohybovalo množství nevyužitého oxalátu kolem 50%.

Je možno očekávat, že v půdě se vyskytují ještě další mikroby schopné štěpit oxaláty a že jejich rozklad není tedy zdaleka procesem výlučně chemickým. Rozkladači oxalátů nejsou zajímaví pouze s hlediska půdně mikrobiologického. Oxaláty jsou poměrně chudým zdrojem energie a jejich metabolismus je dosud nejasný. Uvažuje se o meziprojektu kyselině mravenčí, vzniklé dekarboxylací kyseliny štávelové. Lze očekávat, že další studium oxalolytických bakterií přinese do této otázky, významné nejen pro biochemii mikrobrů, nýbrž i rostlin a živočichů, více světla.

## Literatura

- Bach D. a Fournier J. (1935): Sur l'assimilation de l'acide oxalique par l'*Aspergillus niger*. Comp. rendus 20 : 982—984.
- Bassalik K. (1913): Über die Verarbeitung der Oxalsäure durch *Bacillus extorquens* n. sp. Jahrb. wiss. Bot. 53 : 255—302.
- Bhat J. V. a Barker H. A. (1948): Studies on a new oxalate-decomposing bacterium, *Vibrio oxaliticus*. J. Bact. 55 : 359—368.
- Foster J. W. (1949): Chemical activities of fungi. N. York 1949.
- Chrzaszcz T. a Zakomorny M. (1933): Biochemische Umbildung des Zuckers durch Schimmelpilze. Die Umbildung der Fumarsäure, Anhäufung der Ameisensäure und der Chemismus der Oxalsäurebildung. Biochem. Z. 259 : 156—167.
- Janota L. (1950): Utilization of oxalic acid by *Pseudomonas extorquens*. Med. doswiadczalna i mikrobiol. 2 : 131—132.
- Jayasuriya G. C. N. (1954): Some properties of an oxalate-decomposing bacterium. J. Gen. Microbiol. 10 (1) : VI.
- Khambata S. R. a Bhat J. V. (1953): Studies on a new oxalate-decomposing bacterium, *Pseudomonas oxaliticus*. J. Bact. 66 : 505—507.
- Müller H. (1950): Oxalsäure als Kohlenstoffquelle für Mikroorganismen. Arch. Mikrobiol. 15 : 137—148.
- Pridham T. G. a Gottlieb D. (1948): The utilization of carbon compounds by some *Actinomycetales* as an aid for species determination. J. Bact. 56 : 107—114.

- Puri A. M., Rai B. a Kapur R. K. (1946): Oxidation of nitrites and oxalates in soil. Soil Sci. 62 : 121—136.
- Tomíček O. (1950): Kvantitativní analyza. Praha.
- Wehmer C. (1891): Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze. Botan. Z. 49 : 233—246.

И. Старка

## Разложение солей щавелевой кислоты микроорганизмами в почве

В огородной почве и в торфе находится множество бактерий, относящихся, как кажется, к виду *Vibrio oxaliticus*. Бактерии этого вида принимают участие с другими микробами, прежде всего с актиномицетами, в процессе разложения солей щавелевой кислоты, находящихся в большинстве случаев в почве с остатками растений или в виде метаболитов грибов.

Изолированные бактерии и актиномицеты способны использовать растворимые и нерастворимые в воде соли щавелевой кислоты в качестве единственного источника энергии и углерода. В обоих случаях аэрация ускоряет процесс ассимиляции. Кажется, что актиномицеты наиболее активно разлагают соли щавелевой кислоты. Из 16 штаммов 6 штаммов использовали соли щавелевой кислоты в качестве источника углерода. Штамм № А<sub>3</sub> разложил в течение 5 дней выращивания 66% субстрата, между тем как бактерии только 40% за это же время. Через 9 дней актиномицеты расщепили все соли щавелевой кислоты, но бактерии и в течение продолжительного выращивания использовали их лишь около 50%.

Можно предположить, что в почве находятся еще и другие микробы, способные разлагать соли щавелевой кислоты и может быть, что процесс разложения не только химический процесс. Микробы, разлагающие соли щавелевой кислоты интересны не только с точки зрения почвенной микробиологии. Соли щавелевой кислоты являются сравнительно бедным источником энергии и до сих пор их метаболизм не изучен, однако предполагается существование муравьиной кислоты, возникшей декарбоксилизацией щавелевой кислоты. Можно надеяться, что дальнейшее изучение метаболизма бактерий, расщепляющих соли щавелевой кислоты, более объяснит этот вопрос, интересный не только для биохимии микробов, но и для биохимии растений и животных.

J. Stárka:

## Decomposition of Oxalates by Soil Microorganisms

In the garden soil and in the peat they are abundant bacteria belonging very probably to the genus *Vibrio oxaliticus*. They participate with other microbes, first of all with actinomycetes, in the decomposition of oxalates coming in the soil with plants' rests or as metabolites of fungi etc.

Isolated bacteria and actinomycetes can use oxalates both dissolved or insolubles in water as sole source of energy and carbon. In both cases the assimilation is substantially enhanced by aeration. The actinomycetes are evidently very active decomposers of oxalates. Of 16 strains tested oxalates are splitted as sole source of carbon by 6 strains. Selected strain A<sub>3</sub> used 66 % of substrate in five days of cultivation, whilst bacteria utilised only 40 % in the same time. In nine days oxalate was completely decomposed by the actinomycete, but the bacteria leaved about 50 % of oxalate even by longer cultivation unused.

It can be expected that in the soil they exist still more oxalate-splitting microbes. Thus the decomposition of oxalates in the soil could not be considered as a solely chemical process. The decomposers of oxalates are interesting not only from the standpoint of soil microbiology — oxalates are comparatively a poor source of energy and their metabolism is known very incompletely. It could be expected that the further study of oxalate-splitting bacteria will throw more light upon this question, important not only in the biochemistry of microbes, but also of plants and animals.