

Z Katedry Fizjologii Roślin Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS
Kierownik: prof. dr Adam Paszewski

Jan JAROSZ

Tworzenie substancji antybiotycznej przez *Bacillus* sp. nr 26 (20) a

Образование антибиотической субстанции из *Bacillus* sp. № 26(20)a

Formation of Antibiotic Substance by *Bacillus* sp. No. 26(20)a

W poprzednich doniesieniach podano wyniki badań nad wpływem wyciągów z larw mola woskowego (*Galleria mellonella* L.) na wzrost prątków kwasoopornych na podłożu z antybiotykami i sulfatiazolem (2, 3, 12). W ostatnich pracach badano wpływ produktów metabolizmu szczepu *Bacillus galleriae* nr 7 n. sp. (8), wydzielonego z flory jelit larw mola woskowego, na wzrost prątków kwasoopornych (9, 10). Działanie to jest prawdopodobnie związane z obecnością substancji antybiotycznie aktywnych, wytwarzanych przez mikroflorę larw mola woskowego.

W pracy niniejszej badano warunki powstawania substancji czynnej antybiotycznie w hodowli *Bacillus* sp. nr 26(20)a. Szczep ten cechuje silne działanie antybiotyczne o spektrum skierowanym również wobec *Mycobacterium* sp. ATCC nr 607. Często izolowano podobne laseczki tlenowe z flory bakteryjnej przewodu pokarmowego larw mola woskowego.

MATERIAL I METODY

Badane szczepy zostały wyizolowane z flory jelitowej larw mola woskowego (*Galleria mellonella* L.) na agarze odżywcym przez Barbarę Dudziak. Szczepy te zaliczono do rodzaju *Bacillus*. Szczepy testowe — *Bacillus subtilis* ATCC nr 6633, *Bacillus brevis*, 5286, *Bacillus cereus*, 8145, *Escherichia coli* ROW, *Micrococcus lysodeikticus* i *Candida arborea* sprowadzono z Państwowego Zakładu Higieny, a *Mycobacterium* sp. ATCC nr 607 i *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv z Instytutu Gruźlicy w Warszawie.

Własności antybiotyczne na podłożach stałych badano przy pomocy metody

Tab. 2. Wpływ jonów cynkowych i manganawych na aktywność antybiotyczną szczepów z rodzaju *Bacillus*
 The influence of zinc and manganese on antibiotic activity of the strains of *Bacillus* genus

Badany szczep Examined strain	Agar odżywczy 1,4% Nutrient agar	Podłoże NK/2-Syma NK/2-Sym's medium	Podłoże NK/2-Syma z cynkiem i manganem NK/2-Sym's medium with zinc and manganese
Średnica strefy zahamowania wzrostu <i>Bac. brevis</i> w mm Diameter of the zone of growth inhibition of <i>Bac. brevis</i> 5286 in mm			
Nr 8	8	13	19
Nr 12(38)	12	12	14
Nr 13(39)	16	12	15
Nr 15(19)	11	16	19
Nr 26(20)a	19	16	23
Nr 26(20)b	9	11	13
Nr 5AK	12	8	14

przez Helenę Makulus* *Myc. sp.* ATCC nr 607 i *Myc. tuberculosis* H₃₇Rv. Najwyższą aktywność antybiotyczną wykazywały przesącze bakterieryjne przygotowane z 8-dniowych hodowli, tj. po okresie, kiedy obserwowano autolizę komórek bakteryjnych (tab. 3).

Filtrat bakteryjny ogrzewany do 100°C przez 5 min. nie wykazywał spadku aktywności. Czynniki antybiotyczne były termostabilne. Stwierdzono stosunkowo szybką inaktywację czynnika w temp. 37°C oraz wolną w temp. 4°C (tab. 4).

DYSKUSJA

Feeney, Lightbody i Garibaldi (4) stwierdzili, że obecność cynku w podłożu jest nieodzowna do wytwarzania subtyliny. Syntezę tego polipeptydu warunkuje również obecność soli manganu w podłożu. Howell i Tauber (6) donoszą o wpływie manganu na syntezę subtenoliny innego antybiotyku, wytwarzanego przez *Bac. subtilis*.

W podjętych badaniach stwierdzono, że jony cynkowe i manganawe wpływają na wytwarzanie przez różne gatunki z rodzaju *Bacillus* substancji czynnych antybiotycznie (tab. 2). Należy przypuszczać, że dzia-

* Maszynopis pracy magisterskiej znajduje się w Katedrze Fizjologii Roślin UMCS.

Tab. 3. Działanie antybiotyczne szczepu nr 26/20/a na podłożu NK/2-Syma z cynkiem i manganem

Antibiotic activity of the strain No. 26/20/a in NK/2-Sym's medium with zinc and manganese

Drobno- ustrój testowy Test micro- organism	Okres inku- bacji szczepu w godz. Incuba- tion pe- riod of strain in hrs	Metoda seryjnych rozcieńczeń Method of serial dilution						Metoda cylinder- kowa Cylindri- cal method	Metoda Gratii Method of Gra- tia
		50%	30%	15%	5%	1%	Kon- trola* Con- trol*		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC nr 6633	48	++	+++	+++	+++	+++	+++	brak stref lack of zones	⊙ 13 mm
	96	+	++	++	+++	+++	+++	⊙ 10 mm	
	144	+	+	++	+++	+++	+++	⊙ 14 mm	
	192	-	+	+	++	+++	+++	⊙ 15 mm	
<i>Bacillus brevis</i> 5286	48	+	++	++	+++	+++	+++	⊙ 12 mm	⊙ 20 mm
	96	-	-	-	+	+++	+++	⊙ 17 mm	
	144	-	-	-	+	++	+++	⊙ 21 mm	
	192	-	-	-	+	+++	+++	⊙ 21 mm	
<i>Escherichia coli</i> ROW	48	+++	+++	+++	+++	+++	+++	brak stref lack of zones	brak stref lack of zones
	96	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	144	++	+++	+++	+++	+++	+++		
	192	++	+++	+++	+++	+++	+++		
<i>Mycobacterium</i> sp. ATCC nr 607	48	+++	+++	+++	+++	+++	+++	brak stref lack of zones	⊙ 11 mm
	96	-	-	++	+++	+++	+++	⊙ 12 mm	
	144	-	-	-	++	+++	+++	⊙ 18 mm	
	192	-	-	-	+	+++	+++	⊙ 20 mm	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	48	+++	+++	+++	+++	+++	+++	brak stref lack of zones	nie badano not exa- mined
	96	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	144	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	192	+++	+++	+++	+++	+++	+++		

Objaśnienia: +++ wzrost bardzo dobry, ++ dobry, + słaby, — brak wzrostu.

* Wzrost drobnoustrojów testowych na podłożu NK/2-Syma (pH 7,2) bez filtratu bakteryjnego.

Explanation: + + + very good growth, + + good, + weak, — no growth.

* Growth of test micro-organisms in NK/2-Sym's medium (pH 7.2) without bacterial filtrate.

Tab. 4. Inaktywacja czynnika aktywnego w przesączu bakteryjnym
w temp. 37 i 4°C

Inactivation of the active agent in bacterial filtrate at temp. 37° and 4°C

Drobnoustrój Micro-organism	4°C	37°C	Kontrola Control
	Średnica strefy zahamowania wzrostu po 21 dniach w mm Diameter of the zone of growth inhibition after 21 days in mm		
<i>Bacillus brevis</i> 5286	21	11	22

łanie to wiąże się ze znanym wpływem kationów dwuwartościowych (głównie magnezu) na biosyntezę cząsteczki białka. Podczas syntezy polipeptydów bakteryjnych o charakterze antybiotyków jony cynkowe i manganawe bowiem, jak się wydaje, pełnią rolę kofaktorów. Antybiotyki izolowane z rodzaju *Bacillus* są przeważnie polipeptydami, w nielicznych przypadkach — białkami (11).

Uczulenie *Myc. sp.* ATCC nr 607 i innych prątków kwasoopornych wyciągami z larw mola woskowego (2, 3, 12) na penicylinę, chloromycetynę, aureomycynę i oksytetramycynę wiąże się — być może — z synergizującym działaniem antybiotyków, wytwarzanych przez florę bakteryjną larw mola, ze stosowanymi lekami. W obrębie antybiotyków polipeptydowych, wytwarzanych przez rodzaj *Bacillus*, znane są bowiem przypadki silnego synergizmu, np. subtyliny, antybiotyku, wytwarzanego przez *Bac. subtilis*, ze streptomycyną, bacytracyny, innego antybiotyku, izolowanego z laseczki siennej, z penicyliną (1, 7, 11).

PIŚMIENNICTWO

1. Anderson H. H., Chin Y.: Antibiotic Activity of Subtilin and Streptomycin in the Presence of BAL. Science, **106**, 643—644 (1947).
2. Dudziak B., Józwick Z., Paszewski A.: Experiments on the Activity of Several Extracts from the Larvae of *Galleria mellonella* L. on *Mycobacterium tuberculosis* 607. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C, **17**, 453—461 (1962), Lublin 1963.
3. Dudziak B., Jarosz J., Paszewski A.: The Effect of Extracts from the Larvae of *Galleria mellonella* L. on the Growth of Acid-fast Bacteria. Fol. Soc. Sci. Lubl., sectio B, **3/4**, 39—43 (1963), Lublin 1964.
4. Feeney R. E., Lightbody K. D., Garibaldi J. A.: Zinc as an Essential Element for Growth and Subtilin Formation by *Bacillus subtilis*. Arch. Biochem., **15**, 13—15 (1947).
5. Hamon Y.: Étude des images sensibilité des *Escherichia coli* pathogènes pour le nourrisson a diverses colicines types. Ann. Inst. Pasteur, **95**, 117—121 (1958).
6. Howell S. E., Tauber H.: Subtenolin: An Antibiotic from *Bacillus subtilis*.

- II. Isolation and Chemical Properties. Proc. Soc. Exp Biol. Med., 67, 432—447 (1948).
7. Jann G. J., Streitfeldt M. N., Salle A. J.: Fastness of *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* to Subtilin and to Combination of Subtilin and Streptomycin. J. Bact., 63, 353—362 (1952).
 8. Jarosz J.: The Main Taxonomic Data of the Species *Bacillus galleriae* nr 7. Fol. Soc. Sci. Lubl., sectio B, vol. 9, 33—36 (1969).
 9. Jarosz J.: Investigations on the Biological Activity of Metabolites of the Strain *Bacillus galleriae* nr 7. Fol. Soc. Sci. Lubl., sectio B, vol. 9, 37—40 (1969).
 10. Józwick Z.: Effect of Metabolic Products of *Bacillus galleriae* No. 7, J. Jarosz on Four Saprophytic Acid-fast Tubercle Bacilli. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio D, 21, 402—405 (1966), Lublin 1967.
 11. Korzybski T., Kowszyk-Gindifer Z., Kuryłowicz W.: Antibiotics, Origin, Nature and Properties. Pergamon press., PWN — Polish Scientific Publishers, Warszawa 1967, 1, 48—159.
 12. Paszewski A.: Influence of an Enzyme Extract from the Larvae of *Galleria mellonella* L. together with Penicillin or Sulphathiazole on the Growth of *Mycobacterium tuberculosis* 607. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C, 14, 435—438 (1959), Lublin 1960.

РЕЗЮМЕ

Исследовали антибиотические свойства штаммов рода *Bacillus*, изолированных из пищеварительного тракта личинок пчелиной моли (*Galleria mellonella* L.). Констатировано, что 85% штаммов обладают антибиотическим действием, спектр которого направлен, главным образом, против грамположительных бактерий и микобактерий.

Цинковые и марганцевые ионы, добавленные в субстрат NK/2-Syma в количестве 0,01% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ и 0,015% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ стимулировали образование субстанций, обладающих антибиотическими свойствами, в зависимости от штамма в разной степени.

Определена зависимость между периодом инкубации *Bacillus* sp. № 26(20)а) и антибиотической активностью. Наибольшая антибиотическая активность констатирована после периода максимального размножения палочек, т. е. после 8 дней инкубации, когда появляется аутолиз бактериальных клеток.

SUMMARY

Antibiotic properties were studied in the strains of *Bacillus* genus isolated from the alimentary tract of *Galleria mellonella* L. In 85% of the examined strains the antibiotic activity with its spectre directed mainly at gram-positive bacteria and acid-fast tubercle bacilli was found out.

Zinc and manganese added to NK/2-Sym's medium at the amount

of 0.01% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.015% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ stimulated differently, depending on the strain, the formation of active antibiotic substances.

The relation between the incubation period of *Bacillus* sp. No. 26(20)a and the antibiotic activity was determined. The highest antibiotic activity was observed after the period of maximum bacillus multiplication i.e. after 8 days of incubation when the autolysis of bacterial cells occurred.