

Alicja SZWED

Antagonistyczne oddziaływanie bakterii z ryzosfery lucerny na wybrane grzyby glebowe. Cz. III. Niektóre właściwości substancji antybiotycznej ekstrahowanej z podłoża hodowlanego szczepu bakterii *Pseudomonas* sp.

Антагонистическое действие бактерий из ризосферы люцерны на некоторые почвенные грибы. Часть III. Избранные свойства антибиотического вещества, экстрагированного из питательной среды штамма бактерий *Pseudomonas* sp.

Antagonistic Effect of Bacteria From the Rhizosphere of Lucerne on Selected Soil Fungi. Part III. Selected Properties of Antibiotic Substance Extracted from Culture Medium of Bacteria Strain, *Pseudomonas* sp.

Powszechnie wiadomo, że wśród bakterii gramoujemnych zasiedlających ryzosferę roślin licznie reprezentowany jest rodzaj *Pseudomonas*, który stanowi niekiedy 40–50% ogólnej populacji bakterii ryzosferycznych.

Zdaniem wielu autorów (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11) bakterie z tego rodzaju mogą być antagonistami patogenów roślinnych, co często związana jest z ich uzdolnieniem do produkcji antybiotyków.

Jak stwierdzono w poprzedniej pracy (10), *Pseudomonas* sp. szczep nr 94 wydzielal do podłoża stałego substancje barwne o działaniu przeciugrzybowym. Celem więc niniejszej pracy było podjęcie prób ekstrakcji wymienionego barwnika z podłoża pohodowlanego badanej bakterii oraz określenie niektórych jego właściwości.

MATERIAŁ I METODY*

Ze względu na ujemne wyniki, jakie zyskano w badaniach aktywności antybiotycznej płynów pohodowlanych bakterii *Pseudomonas* sp. szczep nr 94 (10) podjęto próby wyekstrahowania substancji oddziałujących hamująco na wzrost grzybów ze stałego podłoża pohodowlanego tej

* Panu doc. dr hab. Janowi Jaroszowi serdecznie dziękuję za udostępnienie szczepów bakterii testowych.

bakterii. Dla uzyskania odpowiedniej ilości materiału doświadczalnego, hodowlę bakterii prowadzono w kilkudziesięciu równoległych powtórzeniach na stałej pożywce mineralnej o składzie: glukoza 1 g; K_2HPO_4 — 1 g; KNO_3 — 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2 g; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,1 g; $FeCl_3$ — 0,01 g; woda dest. 1000 cm³; agar 15 g.

Zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami (10) do ekstrakcji substancji o działaniu antybiotycznym przystępowano wówczas, gdy w podłożu stwierdzano nagromadzenie się różowo-czerwonego barwnika. Po odrzuceniu części pożywki objętej wzrostem bakterii *Pseudomonas sp.* pozostałość homogenizowano z dodatkiem różnych rozpuszczalników organicznych, jak acteon, eter etylowy, benzen, *n*-heksan, cykloheksan, *n*-oktan, eter naftowy. Następnie ekstrakty te sprawdzono pod względem aktywności antybiotycznej nanosząc jednakowe ich ilości na krążki bibułowe. Przed wyłożeniem na pożywkę zaszczipioną organizmem testowym (*Penicillium sp.* nr 95, 5; *Verticillium album* nr 118) rozpuszczalniki z krążków bibułowych całkowicie odparowano. Ponieważ ekstrakt benzenowy wydawał się we wstępnych próbach najbardziej obiecujący, stanowił on podstawę do dalszych badań. Ekstrakt ten odparowywano w temp. ok. 20°C, a następnie osuszano nad chlorkiem wapnia i przechowywano w szczelnie zamkniętych naczyniach w temp. +5°C. Otrzymaną po odparowaniu surową substancję antybiotyczną oznaczono symbolem Ps 94.

Przy badaniu właściwości otrzymanej substancji z uzyskanego ekstraktu sporządzano roztwór macierzysty — 1 cm³ roztworu zawierał 1000 mcg surowego ekstraktu badanej substancji. Wyekstrahowany barwnik poddano badaniom, oznaczając niektóre jego właściwości, mianowicie:

1) wpływ pH pożywki na aktywność antybakteryjną badanej substancji określano metodą seryjnych podwójnych rozcieńczeń (2) w agarze odżywczym o pH 6,0; 6,5; 7,0; 8,0. Pożywkę z określonymi dawkami badanej substancji (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 mcg/cm³ pożywki) zaszczipiono powierzchniowo zawiesiną bakterii testowej — *Sarcina lutea** — o gęstości ok. 10⁶ komórek/cm³ (inokulum 0,05 cm³). Po 24 godz. określano minimalną hamującą koncentrację (MIC) badanej substancji wobec bakterii testowej;

2) określenie wrażliwości badanej substancji na temperaturę. Roztwór macierzysty zawierający 1000 mcg/cm³ badanej substancji wstawiono do łaźni z gotującą się wodą. Po upływie 5, 15 i 30 min. przetrzymywania badanej substancji w łaźni metodą seryjnych podwójnych rozcieńczeń w agarze odżywczym (pH 6,5) określono minimalną hamującą koncentrację (MIC) substancji Ps 94 wobec *Sarcina lutea*;

3) spektrum antybiotyczne i MIC badanej substancji wobec wybranych szczepów bakterii gramododatnich i gramoujemnych oraz drożdży określano metodą podaną w punkcie 1.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W tabeli 1 przedstawiono wyniki obrazujące wpływ pH pożywki hodowlanej na aktywność antybakteryjną substancji Ps 94. Działalność antybakteryjna substancji Ps 94 uwidoczniła się najwyraźniej przy pH 6,5 gdzie wynosiła 4,68 mcg/cm³ pożywki. Natomiast przy wyższych wartościach pH 7 i 8 substancja ta działała już ok. 3 razy słabiej niż przy pH 6,5.

Wpływ czasu przetrzymywania badanej substancji we wrzącej wodzie na jej aktywność antybakteryjną przedstawiono w tabeli 2.

Po czasie 5 i 15 min przetrzymywania badanej substancji w gotującej wodzie MIC substancji Ps 94 hamująca wzrost *Sarcina lutea* wynosiła 6,25 mcg/cm³ pożywki. Natomiast po 30 min. aktywność antybakteryjna substancji Ps 94 była 2 razy mniejsza i wynosiła 12,5 mcg/cm³ pożywki. Jak z tego wynika wysokie temperatury osłabiają aktywność antybiotyczną preparatu Ps 94. Metodą

Tab. 1. Wpływ wartości pH pożywki na działalność antybakteryjną substancji Ps 94
The influence of pH medium on antibacterial activity of Ps 94

pH podłoża	MIC substancji Ps 94 w mcg/cm ³ wobec <i>Sarcina lutea</i>
6,0	6,25
6,5	4,68
7,0	12,5
8,0	12,5

Tab.2. Wrażliwość substancji Ps 94 na temperaturę
Sensitiveness of the substance of Ps 94 to temperature

Czas przetrzymywania substancji Ps 94 w gotującej się wodzie	MIC substancji Ps 94 w mcg/cm ³ wobec <i>Sarcina lutea</i>
5 min	6,25
15 min	6,25
30 min	12,5

Tab. 3. Spektrum antybiotyczne i minimalna hamująca koncentracja (MIC) substancji Ps 94
Antibiotic spectrum and minimum inhibiting concentration (MIC) of the substance of Ps 94

Mikroorganizmy testowe	Podłoże hodowlane	MIC substancji Ps 94 w mcg/cm ³
<i>Bacillus circulans</i> IP 5121	agar odżywczy	4,68
<i>Bacillus brevis</i> IP 5286	"	1,56
<i>Bacillus pumilus</i> IP 5286	"	3,12
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 8145	"	1,56
<i>Bacillus subtilis</i> Oxford	"	4,68
<i>Bacillus alvei</i> IP 5248	"	4,68
<i>Bacillus lentus</i> IP 5273	"	4,68
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	"	9,37
<i>E. coli</i> ROW	"	> 100
<i>Sarcina lutea</i> R 262	"	4,68
<i>Staphylococcus albus</i>	"	75
<i>Streptococcus pyogenes</i>	"	100
<i>Proteus vulgaris</i>	"	> 100
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	"	> 100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	brzeczka	100
<i>Candida humicola</i>	"	100
<i>Rhodotorula rubra</i>	"	> 100
<i>Candida lipolytica</i>	"	> 100
<i>Mycoderma vini</i>	"	> 100

seryjnych podwójnych rozcieńczeń w pożywce określano także spektrum antybiotyczne i MIC badanej substancji wobec wybranych szczepów bakterii i drożdży.

Wyniki zebrane w tabeli 3 wskazują na dużą wrażliwość na substancję Ps 94 bakterii gramododatnich z rodzaju *Bacillus*. Szczególnie wrażliwymi gatunkami bakterii z tego rodzaju były *Bacillus brevis* i *Bacillus cereus*, których wzrost był

całkowicie zahamowany w obecności 1,56 mcg/cm³ pożywki surowej substancji Ps 94. Okazało się również, że niektóre ziarniaki gramododatnie (*Sarcina lutea*, *Micrococcus lysodeikticus*) były także bakteriami wrażliwymi na badaną substancję. Minimalna hamująca koncentracja substancji Ps 94 dla *Sarcina lutea* wynosiła 4,68 mcg/cm³ pożywki, a dla *Micrococcus lysodeikticus* 9,37 mcg/cm³. Natomiast bakterie *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus albus* były mniej wrażliwe na działanie badanej substancji (MIC od 75–100 mcg/cm³ pożywki).

Oporniejszymi na działanie badanej substancji Ps 94 od bakterii gramododatnich okazały się bakterie gramoujemne oraz drożdże, u których zahamowanie wzrostu obserwowano dopiero przy koncentracji badanej substancji wynoszącej 100 i powyżej 100 mcg/cm³ pożywki.

WNIOSKI

Na podstawie uzyskanych wyników można wyprowadzić następujące wnioski:

- 1) działalność antybakteryjna substancji Ps 94 była zależna od pH podłoża hodowlanego i zaznaczyła się najwyraźniej przy pH 6,5.
- 2) wysoka temperatura osłabiała aktywność antybakteryjną badanej substancji.
- 3) surowa substancja Ps 94 wykazywała silne działanie antybakteryjne zwłaszcza dla bakterii gramododatnich.

PIŚMIENNICTWO

1. Brown M. E.: Seed and root bacterization. Ann. Rev. Phytopath. **12**, 181–197, 1974.
2. Ericsson H. M., Sherriss J. C.: Antibiotic sensitivity testing. Acta Pathol. Microbiol. Scand. B, suppl. **217**, 1971.
3. Evans J. R., Napier E. J., Yates P.: Isolation of a new antibiotic from a species of *Pseudomonas*. J. Antibiotics **29**, 8, 850–852, 1976.
4. Ezruch E. W., Strelkowa L. A.: Wzaimodejstwie bakterij z patogennymi grzybami rodzaju *Verticillium* Wallr. Mikol. i fitopatol. **13**, 4, 283–286, 1979.
5. Filippow W. W., Ambreew L. N., Bazilinskaja N. W.: Rasprostranienie fitopatogennych grzybów rodzaju *Verticillium* Izd. „Nauka” 1978.
6. Kanada N., Ishizaki W., Inoue W., Oshima M., Handa A., Kitahara T.: DB-2073, a new alkylresorcinol antibiotic I. Taxonomy, isolation and characterization. J. Antibiotics **28**, 12, 935–942, 1975.
7. Korzybski T., Kowszyk-Gindifer Z., Kuryłowicz W.: Antybiotyki izolowane z rodzaju *Pseudomonas* (*Pseudomonadaceae*). W: Antybiotyki — pochodzenie, rodzaje i właściwości. II, 1173–1191, PZWL, Warszawa 1977.
8. Panteleew A. A., Bagbasarijan A. Z.: Izpolzowanie bakterij — antagonistów rodzaju *Pseudomonas* dla borby z antraknozom dyni. Mikol. i fitopatol. **6**, 3, 261–268, 1972.

9. Pibopliczko W. N., Garagulja A. D.: Antagonisticheskoe dejstvie bakterij rodov *Pseudomonas* i *Bacillus* na wozbuditelej kornevoj gnili ozimoy pszenicy. Mikoł. i fitopatol. **13**, 1, 53–57, 1979.
10. Szwed A.: Antagonistyczne oddziaływanie bakterii z ryzosfery lucerny na wybrane grzyby glebowe. Cz. II. Określenie charakteru oddziaływania przeciwgrzybowego wybranego szczepu bakterii. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio E, vol. XLI 23, 1986.
11. Tsukiura H., Hanada M., Saito K., Fujisawa K., Miyaki T., Koshiyama H., Kawaguchi H.: Sorbistin, a new aminoglycoside antibiotic complex of bacterial origin. 1. Production, isolation and properties. J. Antibiotics **29**, 11, 1137–1146, 1976.

РЕЗЮМЕ

Штамм *Pseudomonas* sp. № 94, отличающийся сильными антагонистическими способностями по отношению к почвенным грибам, выделяет в питательную среду пигмент противогрибного действия. Была предпринята попытка экстракции пигмента из питательной среды исследуемых бактерий. Для экстракции антибиотического вещества были использованы органические растворители, а именно: ацетон, этиловый эфир, бензен, *n*-гексан, циклогексан, *n*-октан, петролейный эфир. Поскольку бензеновый экстракт представлялся наиболее перспективным после проведения вступительных проб, он и применялся в дальнейших исследованиях.

Полученное после отпарения растворителя сырое антибиотическое вещество было обозначено как *Ps* 94.

Извлеченный путем экстракции пигмент исследовался с целью определения некоторых его свойств, а именно:

- 1) влияния pH питательной среды на антибактерийное действие исследуемого вещества,
- 2) чувствительности исследуемого вещества к температуре,
- 3) антибиотического спектра и минимальной тормозной концентрации (MIC) исследуемого вещества по отношению к избранным грамположительным и грамотрицательным бактериям, а также дрожжам.

Антибактерийное действие вещества *Ps* 94 наиболее отчетливо проявилось при pH 6,5, где оно достигло 4,68 мкг/см³ питательной среды. Высокая температура ослабила антибактерийную активность вещества *Ps* 94. Его сырое вещество проявляло сильное антибактерийное действие прежде всего по отношению к грамположительным бактериям.

SUMMARY

Pseudomonas sp. No. 94 which was characterized by strong antagonistic abilities toward soil fungi, released colour substances with antimycotic activity to the solid medium. The purpose of the present work was an attempt to extract a dye from post-cultivation medium of the investigated bacterium. To extract the substance of antibiotic effect the following organic solvents were used: acetone, diethyl ether, benzene, *n*-hexan, cyclo-hexan, *n*-octane, oil ether. Benzene extract constituted the bases for further investigations because in initial tests it appeared most promising.

The raw antibiotic substance obtained after the solvent was vaporized, was marked with the symbol of *Ps* 94.

The extracted dye underwent examinations where some of its properties were marked, and these were as follows:

- 1) the influence of pH culture medium on anti-bacterial effect of the investigated substance,
- 2) determining sensitiveness of the investigated substance to temperature,

