

Z Katedry Mikrobiologii Rolnej Wydziału Rolniczego WSR w Lublinie
Kierownik: doc. dr Adam Szember

Adam SZEMBER i Eliza SZULGA

**Rozpowszechnienie wśród bakterii mlekowych szczepów uzdolnionych
do wytwarzania substancji antybiotycznych**

Occurrence of Antibiotic-Producing Strains among Lactic Bacteria

Wytwarzanie antybiotyków przez niektóre szczepy bakterii mlekowych należy niewątpliwie do ciekawszych właściwości tych mikroorganizmów. Od dawna wielu autorów zwracało uwagę na fakt hamowania wzrostu innych gatunków bakterii nie tylko na skutek wytwarzania kwasu przez bakterie fermentacji mlekowej, lecz także poprzez wytworzenie substancji antybiotycznych (7, 22, 25 i in.).

Obecnie dysponujemy bogatą literaturą zarówno na temat wytwarzania antybiotyków przez określone szczepy bakterii mlekowych, jak również ich działania na różne mikroorganizmy (1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 i in.). Pewne rodzaje antybiotyków wytwarzane przez bakterie mlekowe wyosobniono, oczyszczono i zbadano ich skład chemiczny (4, 5, 17, 18).

Do najlepiej poznanych antybiotyków, wytwarzanych przez bakterie mlekowe, należy nizyna, produkowana przez niektóre szczepy *Streptococcus lactis*. Występuje ona w kilku odmianach, różniących się między sobą składem aminokwasowym. Bakterie mlekowe produkujące antybiotyki, a przede wszystkim szczepy nizynotwórcze, znalazły zastosowanie w praktyce, głównie w przemyśle spożywczym przy zwalczaniu szkodliwych fermentacji (6, 9, 15, 16, 19).

Posiadanie uzdolnień do wytwarzania substancji antybiotycznych u bakterii mlekowych skłoniło Hirscha i Wheathera (11) do prześledzenia częstości występowania wspomnianej cechy wśród różnych szczepów tej grupy bakterii. Autorzy ci wyosobnili z takich środowisk, jak: surowe mleko, pasteryzowane mleko, ser, kał ludzki i bydłowy oraz z wymazów z gardła i nosa, 553 szczepy bakterii mlekowych. Wykryli,

że 25% tych szczepów wykazywało uzdolnienia do produkcji substancji antybiotycznych hamujących wzrost organizmów testowych, takich jak: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*. Byłoby rzeczą pożyteczną zbadanie, czy w naszych warunkach równie często spotyka się wśród bakterii mlekowych szczepy wytwarzające antybiotyki.

BADANIA WŁASNE

Celem niniejszej pracy było zbadanie, w jakim stopniu zdolność do wytwarzania substancji antybiotycznych jest rozpowszechniona wśród bakterii mlekowych wyosabnianych z różnych środowisk.

Materiał i metody badań

Bakterie mlekowe wyosabniano z następujących środowisk: mleko surowe, mleko zsiadłe, śmietanka surowa, ser twarogowy, kiszona kapusta, kiszonki paszowe oraz ścieki z krochmalni, rzeźni drobiu i drożdżowni.

Wymienione środowiska posiewano na płytki Petriego z pożywką o następującym składzie:

glikoza	10 g
laktoza	10 g
pepton („Bacutil”)	5 g
agar	15 g
woda drożdżowa	200 ml
woda wodociągowa	1000 ml
BCP	10 ml (0,5% wodny roztwór indykatora — purpury bromo-krezolowej)

Pożywkę doprowadzano przy pomocy NaOH do $pH = 7$. Była to podstawowa pożywka hodowlana, na której można było łatwo odróżnić wyrosłe kolonie bakterii mlekowych od kolonii innych bakterii.

Z wyrosłych na tej pożywce kolonii wyosabniano losowo szczepy bakterii, które następnie poddano obserwacjom makro- i mikroskopowym. Próby te miały na celu ustalenie, czy wyizolowane szczepy należą do bakterii mlekowych.

Po oczyszczeniu u szczepów tych badano uzdolnienia do wytwarzania substancji antybiotycznych, hamujących wzrost mikroorganizmów testowych. Ponieważ w niniejszych badaniach nie poszukiwano optymalnych warunków dla produkcji antybiotyków przez bakterie mlekowe, wszystkie wyosobnione szczepy hodowano w temp. 28°C. W tym celu namnażano je w 20 ml pożywki podstawowej, zestalonej w postaci słupek. Po namnożeniu się bakterii kultury poddawano pasteryzacji (2-minutowe ogrzewanie we wrzącej wodzie aż do momentu upłynięcia się agaru), a następnie dzielono na 2 porcje. Do jednej z nich dodawano odpowiednich ilości $NaHCO_3$ celem zneutralizowania nadmiaru kwasu mlekowego, wytworzonego przez badane szczepy. W ten sposób uzyskiwano 2 równoległe próby z hodowli każdego ze szczepów, z których jedna była neutralizowana do $pH = \text{ok. } 6$. Równocześnie przygotowywano odpowiednią liczbę płytek Petriego z jałową pożywką podstawową. Z płytek tych usuwano środkowy pasek o szerokości 1,5 cm. W utworzoną rynienkę nalewano spasteryzowane kultury poszczególnych szczepów bakterii mlekowych. W poprzek wypełnionych i zestalonych rynienek posiewano mikroorganizmy te-

Tab. 1. Procent szczepów antybiotycznych wśród bakterii mlekowych wyosobnionych z różnych środowisk
Percentage amounts of antibiotic strains of lactic bacteria isolated from various media

Środowisko wyosobnienia szczepów	Liczba badanych szczepów		Liczba szczepów hamujących wzrost				% szczepów hamujących wzrost				% szczepów hamujących wzrost obu orga- nizmów testowych	
			<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Escherichia coli</i>			
	paciorkowce	pałeczki	paciorkowce	pałeczki	paciorkowce	pałeczki	paciorkowce	pałeczki	paciorkowce	pałeczki	paciorkowce	pałeczki
Mleko surowe	50	0	4	0	2	0	8,0	0	4,0	0	4,0	0
Mleko kwaśne	68	12	8	2	4	0	11,7	16,6	5,8	0	5,8	0
Śmietanka	30	0	3	0	2	0	10,0	0	6,6	0	6,6	0
Twarog	30	0	3	0	1	0	10,0	0	3,3	0	3,3	0
Kiszona kapusta	14	20	4	3	1	0	28,5	15,0	7,1	0	7,1	0
Kiszonka paszowa	100	20	9	0	3	0	9,0	0	3,0	0	3,0	0
Ścieki z krochmalni	31	30	7	0	8	0	22,5	0	25,8	0	12,9	0
Ścieki z rzeźni drobiu	30	20	2	0	3	0	6,6	0	10,0	0	0	0
Ścieki z drożdżowni	17	13	3	0	2	0	17,6	0	11,7	0	5,8	0

stowe. Jako mikroorganizmy testowe służyły dzikie szczepy *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*.

Brak wzrostu organizmu testowego na pasie środkowym podłoża na obu płytach Petriego (z dodatkiem NaHCO_3 i bez dodatku) świadczył o obecności substancji antybiotycznej nagromadzonej w podłożu podczas hodowli badanych szczepów bakterii mlekowych.

Wyniki badań

Wśród wyosobnionych szczepów, wykazujących uzdolnienia antybiotyczne, najliczniejsze były te, które powstrzymywały wzrost *Bacillus subtilis*. Tylko w dwóch przypadkach, a mianowicie u szczepów bakterii mlekowych wyosobnionych ze ścieków krochmalni i ścieków rzeźni drobiu, znaleziono nieco więcej szczepów antybiotycznych wobec *Escherichia coli*. Wśród tych właśnie szczepów zauważono takie, które hamowały wzrost tylko *Escherichia coli*, nie hamując wzrostu *Bacillus subtilis* (tab. 1).

Większość szczepów wytwarzających antybiotyki była paciorkowcami. Najwyższy procent szczepów antybiotycznych w stosunku do *Bacillus subtilis* znaleziono wśród bakterii wyosobnionych z kiszzonej kapusty i ze ścieków krochmalni. Najmniej było ich wśród bakterii mlekowych butujących w ściekach rzeźni drobiu.

Wśród szczepów bakterii mlekowych wyosobnionych ze ścieków krochmalni stosunkowo najwięcej szczepów hamowało wzrost obu organizmów testowych.

Badając pałeczki fermentacji mlekowej stwierdzono, że tylko wśród wyosobnionych z kwaśnego mleka i z kiszzonej kapusty występowały szczepy uzdolnione do powstrzymywania wzrostu *Bacillus subtilis*. Nie znaleziono żadnej pałeczki fermentacji mlekowej hamującej wzrost *Escherichia coli*.

DYSKUSJA

Na ogólną liczbę 370 zbadanych szczepów paciorkowców mlekowych znaleziono 43 szczepy hamujące wzrost *Bacillus subtilis*. Stanowi to 11,6%. Szczepów hamujących wzrost *Escherichia coli* było 26, czyli 7%. Szczepów bakterii mlekowych powstrzymujących wzrost obu organizmów testowych stwierdzono jeszcze mniej, bo tylko 5,9% ogólnej liczby szczepów antybiotycznych.

Ze 103 zbadanych szczepów pałeczek mlekowych, 5 hamowało wzrost *Bacillus subtilis*, a więc tylko 4,8%.

WNIOSKI OGÓLNE

Z przeprowadzonych badań wynika, że:

1. Wśród bakterii mlekowych wyosabnianych z różnych środowisk, jak się wydaje, można zawsze znaleźć pewną liczbę szczepów wytwarzających antybiotyki hamujące wzrost *Bacillus subtilis* lub *Escherichia coli*.
2. Znalezione w niniejszym doświadczeniu szczepy bakterii mlekowych, wytwarzające antybiotyki, były głównie paciorkowcami. Tylko nieliczne szczepy pałeczek fermentacji mlekowej miały także te uzdolnienia.
3. W naszych warunkach badawczych szczepy wytwarzające antybiotyki hamujące wzrost jednego z użytych mikroorganizmów testowych wystąpiły najliczniej wśród bakterii mlekowych wyosabnianych z kiszonej kapusty i ze ścieków krochmalni.

PIŚMIENNICTWO

1. Baribo L. E., Foster E. M.: Inhibition of Lactic Organisms by Cheese Starter Cultures. Dairy Science, 13, 1949.
2. Baribo L. E., Foster E. M.: Some Characteristics of the Growth Inhibitor Produced by a Lactic *Streptococcus*. Dairy Sci., 34, 1951.
3. Baribo L. E., Foster E. M.: The Production of a Growth Inhibitor by Lactic *Streptococci*. Dairy Sci., 34, 1951.
4. Berridge N. J.: Preparation of the Antibiotic Nisin. Biochemical Journal, 45, 1949.
5. Berridge N. J., Newton T., Abraham E. P.: Purification and Nature of the Antibiotic Nisin. Biochemical J., 52, 1952.
6. Blau T.: Bakteriostatische Wirkung von Milchsäurestreptokokken auf Buttersäurebazillen. Milchwissenschaft, 5, 1950.
7. Bloch H.: Acid-Fast Bacteria. Annual Review of Microbiology, 7, 1953.
8. Galesloot Th. E.: Bildung von Nisin durch antibiotische Säurewecker. Ned. Melk en Zuiveltijdschr., 11, 1957.
9. Galesloot Th. E.: Einfluss von Nisin auf das Wachstum von Bakterien, die möglicherweise bei bakteriellen Prozesse in Käse und Schmelzkäse beteiligt sind. Ned. Melk en Zuiveltijdschr., 11, 1957.
10. Grossowics N. J., Kaplan D., Schneerson S.: Production of an Antibiotic Substance by *Lactobacillus*. Fourth International Congress for Microbiology, Kopenhagen, 137, 1947.
11. Hirsch A., Wheather D. M.: The Production of Antibiotics by *Streptococci*. J. Dairy Res., 18, 1951.
12. Hirsch A., Grinsted E.: The Differentiation of the Lactic *Streptococci* and the Antibiotics. J. Dairy Res., 18, 1951.
13. Hirsch A., Grinsted E., Chapman H., Mattick A. T. R.: A Note on the Inhibition of an Anaerobic Spore-former in Swiss-type Cheese by a Nisin Producing *Streptococcus*. J. Dairy Res., 18, 1951.

14. Hirsch A., Mc Clinstock M., Mocquot G.: Observations on the Influence of Inhibitory Substances Produced by the *Lactobacilli* of Gruyere Cheese on the Development of Anaerobic Spore-formers. *J. Dairy Res.*, 19, 1952.
15. Hirsch A., Grinsted E.: Methods for the Growth and Enumeration of Anaerobic Spore-forms from Cheese with Observations of the Effect of Nisin. *J. Dairy Res.*, 21, 1954.
16. Lipińska E.: Mikrobiologiczne metody zapobiegania wadom sera wywołanym przez bakterie kwasu masłowego. *Acta Microbiologica Polonica*, 5, 1956.
17. Mattick A. T. R.: The Lactic *Streptococci* (Including Their Antibiotics Activity). Fourth Int. Congress for Microbiology, Kopenhaga, 519, 1947.
18. Mattick A. T. R., Hirsch A.: Further Observations on Inhibitory Substance (Nisin) from Lactic *Streptococci*. *Lancet*, 5, 1947.
19. Mc Clinstock M., Serres L., Marzlof J. J., Hirsch A., Mocquot G.: Action inhibitrice des streptocoques producteurs de nisine sur le développement des sporules anaérobies dans le fromage de Gruyère fondu. *J. Dairy Res.*, 19, 1952.
20. Moycho W., Gromska W.: Antagonizm występujący w mleku między *Streptococcus lactis* a *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Microbiol. Pol.*, 5, 1956.
21. Pette I. W., Kooy J. S.: The Inhibition of Butyric Acid Fermentation by Antibiotic Producing Starter. XIII International Dairy Congress, Haga, 1, 1954.
22. Połonskaja M. S.: Antibiotičeskije wieszczestwa acidofilnych bakterij. *Mikrobiologija*, 21, 1952.
23. Połonskaja M. S., Leonowicz W. W., Bibierdiewa M. P.: Antibiotičeskije wieszczestwa acidofilnych bakterij. *Biulletien' Nauczno-Tiechničeskoj Inf. po Sielskochozjajstwiennoj Mikrobiologii*, Leningrad, 1, 1956.
24. Rasić J., Mitić S.: Contribution à l'étude de l'activité antibiotique des souches de culture du yoghourt. *Le Lait*, 43, 1963.
25. Richard O.: Die Beziehungen des beweglichen Buttersäurebazillen (*Clostridium butyricum* Prażmowski) zum Silofutter. Fourth Int. Congress for Microbiology, Kopenhaga, 522, 1947.
26. Ritter P.: Ein Beitrag zur Frage der Nisinbildung von *Streptococcus lactis*. *Pathol., et Microbiol.*, 26, 1963.
27. Sudenko W. I. W.: Antibiotičeskije swojstwa mołoczno-kisłych bakterij żeludoczno-kiszecznego trakta człowieka i ich izmieničiwost'. *Mikrobiol. Ż.*, 26, 1964.
28. Sudenko W. I. W.: Widowej sostaw antagonisticzeskich sztamow mołoczno-kisłych bakterij żeludoczno-kiszecznego trakta człowieka. *Mikrobiol. Ż.*, 25, 1963.
29. Szkundowa Ju. W., Jegorow N. S., Owczarowa T. P.: Izuczenije wlijanija niekotorych usłowij kultiwirowanija *Streptococcus lactis* na obrazowanije nisina. *Anibiotiki*, 10, 1965.
30. Vincent I., Veometh R., Riley R. P.: Antibacterial Activity Associated with *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bact.*, 78, 1959.
31. Whitehead H. R.: A Substance Inhibiting Bacterial Growth Produced by Certain Strains of Lactic *Streptococci*. *Biological J.*, 27, 1933.
32. Winkler S.: About Antibiotic Effects of *Lactobacilli* on Propionic Bacteria. XIII Intern. Dairy Congress, Haga, 1953.
33. Zeilinger A., Binder W.: Versuche zur Herstellung Käseereisicheren Silofutters. *Milchwissenschaft Berichte*, 6, 1956.

Распространение среди молочнокислых бактерий штаммов, способных к образованию антибиотических веществ

Резюме

Из различных сред, таких как сырое молоко, кислое молоко, непастеризованные сливки, творог, квашенная капуста, кормовые силосы, стоки крахмального завода, птицебойни и дрожжевого завода выделено 370 штаммов стрептококков и 103 штамма палочек молочнокислого брожения. Исследовалась способность выделенных штаммов молочнокислых бактерий к образованию антибиотических веществ, задерживающих рост тестовых микроорганизмов. В качестве тестовых микроорганизмов применялись дикие штаммы *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*.

Установлено, что 11,6% стрептококков и 4,8% всех палочек молочнокислого брожения образовали антибиотики, тормозящие рост тестовых микроорганизмов.

Наибольшее число штаммов, образующих антибиотики, найдено среди молочнокислых бактерий, выделенных из квашеной капусты и стоков крахмального завода.

Occurrence of Antibiotic-Producing Strains among Lactic Bacteria

Summary

Three hundred and seventy strains of *Streptococci* and 103 strains of milk-fermenting *bacilli* were isolated from various media, such as uncooked milk, sour milk, non-pasteurized cream, curd cheese, sauerkraut, feed silage sewage from a starch factory, poultry abattoir and yeast factory. The isolated lactic bacteria strains were tested for their ability to produce antibiotic substances checking the growth of test microorganisms; wild strains of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* were used for that purpose.

It was found that 11.6% of the *Streptococci* and 4.8% of the *Lactobacilli* produced antibiotics which checked the growth of the test organisms.

The greatest number of antibiotic-producing strains was found among lactic bacteria isolated from sauerkraut and from sewage from a starch factory.