

Adam SZEMBER, Wiesław SŁUPCZYŃSKI

**Wpływ promieni ultrafioletowych na niektóre właściwości bakterii
mlekowych**

Влияние ультрафиолетовых лучей на некоторые свойства молочнокислых
бактерий

Influence of Ultra-Violet Rays on Some Properties of Lactic Acid Bacteria

Na temat wpływu niejonizujących promieni ultrafioletowych na drobnoustroje istnieje bardzo dużo doniesień naukowych (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13). Jak wiadomo, promienie UV mogą oddziaływać w różny sposób na aktywność bakterii. Przedawkowanie naświetlania mikroorganizmów tymi promieniami prowadzi do śmierci komórek. Natomiast naświetlanie dawkami subletalnymi promieni ultrafioletowych wywołuje mniej lub bardziej trwałe zmiany we właściwościach fizjologicznych napromieniowanych drobnoustrojów. Zmiany te mają często charakter mutacji (3, 4, 5, 7, 12, 16).

Spośród wielu różnorodnych drobnoustrojów, bakterie fermentacji mlekowej odgrywają poważną rolę w gospodarce człowieka. Szczególnie w przemyśle mleczarskim i serowarskim poszukuje się szczepów tych bakterii o właściwościach najbardziej dla niego przydatnych. W niniejszym doświadczeniu prześledzono wpływ promieniowania UV na wybrane szczepy bakterii mlekowych, biorąc pod uwagę ich przemysłową przydatność.

MATERIAŁ I METODY

Z siadłego mleka oraz z kiszonek spożywczych i paszowych wyosobniono szczepy bakterii mlekowych i hodowano je po uzyskaniu tzw. czystych kultur na pożywkach płynnych o składzie chemicznym przystosowanym do ich wzrostu (14).

Wyosobnione szczepy poddano diagnozie, określając przede wszystkim ich zdolność wykorzystywania różnych związków organicznych jako jedynych źródeł energii. Badano także ich wytrzymałość na zasolenie środowiska, zdolność redukowania różnych stężeń błękitu metylenowego, stopień zakwaszania pożywki oraz zdolność wytwarzania acetoiny na podłożu Clarka. W tym ostatnim przypadku posłużono się odczynem Voges-Proskauera. Badano także u wyosobnionych szczepów bakterii mlekowych zdolność do wytwarzania substancji antybiotycznych, stosując metody opisane przez Szembera (15).

Z kolekcji wyosobnionych i zdiagnozowanych bakterii mlekowych wybrano cztery szczepy, w tym dwa uzdolnione do wytwarzania substancji antybiotycznych. Szczepy te poddano naświetlaniu przez określony czas promieniami ultrafioletowymi. Dla celów porównawczych przeprowadzono analogiczne próby ze szczepem muzealnym *Lactobacillus acidophilus*. Wrażliwość bakterii na antybiotyki sprawdzano za pomocą standardowych krążków bibułowych.

Szczepy bakterii mlekowych przygotowywano do naświetlania ultrafioletem w następujący sposób: hodowle tych bakterii przeszczepiano 3-krotnie co 3 dni na płynne pożywki o optymalnym dla nich składzie. Następnie наносzono sterylną pipetką na płytki Petriego z identyczną pożywką jak poprzednio tylko zestaloną agarem, po 0,1 ml zawiesiny w płynie fizjologicznym wzrostu badanych bakterii. Bagietką szklaną dokładnie rozprowadzono zawiesinę bakterii na powierzchni pożywki agarowej i po kilkuminutowym podsuszeniu w termostacie o temperaturze 28°C, poddawano ją naświetlaniu promieniami ultrafioletowymi. W tym celu użyto rurowej lampy UV (produkcji holenderskiej — Philips 10 V 30 W), stosując 10 i 20 cm odległości od powierzchni naświetlanych płytek. Naświetlanie przeprowadzano przez 10—30 sekund, a następnie płytki Petriego wstawiano do termostatu o temp. 28°C, w którym pozostawały aż do momentu pojawienia się wzrostu bakterii na ich powierzchni. Z poszczególnych kolonii odszczepiano bakterie i poddawano je ponownej diagnozie w wyżej podanym zakresie. Równolegle z naświetlanymi UV bakteriami mlekowymi, prowadzono hodowle kontrolne tych samych szczepów.

WYNIKI BADAŃ

W pierwszej serii doświadczenia z dwóch szczepów bakterii mlekowych (nr 1 i 2), które poddano naświetlaniu promieniami ultrafioletowymi, pobrano wzrost z losowo wybranych kolonii i przeszczepiono na pożywki płynne. Uzyskano w ten sposób dwa nowe, napromieniowane UV szczepy, które poddano ponownej diagnozie. Jej wyniki zebrano w tab. 1.

Z zamieszczonych w tabeli danych wynika, że naświetlanie szczepu promieniami ultrafioletowymi spowodowało pewne zmiany w jego właściwościach fizjologicznych. Na przykład, pod wpływem krótkiego naświetlania UV badany szczep ziarniaka (nr 1) wykazywał nieco zwiększone zdolności ukwaszania podłoża, przy utracie zdolności do wytwarzania acetoiny. Na ogół nie zaobserwowano u tego szczepu utraty uzdolnień do wykorzystywania użytych w doświadczeniu źródeł energii z wyjątkiem ksylozy, która była niedostępna dla bakterii naświetlonych promieniami ultrafioletowymi z odległości 10 cm przez 30 sekund. Ponadto,

Tab. 1. Wpływ naświetlania promieniami ultrafioletowymi (UV) na niektóre właściwości wybranych szczepów bakterii mlekowych

Influence of ultra-violet rays (UV) on some properties of lactic acid bacteria selected strains

Nr szcze- pu	Czas naświe- tlenia w sek.	Odle- głość w cm	Wzrost w stęże- niach NaCl %				Fermentuje											Odczyn Voges- -Proska- uera	Zakwa- sza pożywkę do pH		
			2	4	6.5	7.5	ksylozę	ramnozę	arabinozę	glukozę	fruktozę	galaktozę	mannozę	sorbozę	laktozę	sacharozę	maltozę			skrobię	mannitol
1	0	0	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	4,4
	10	10	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	4,0
	10	20	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	3,9
	30	10	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	4,9
2	0	0	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	3,9
	10	10	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	4,0
	10	20	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	4,3
	30	10	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0

Objaśnienia: 1 — szczep bakterii mlekowych z rodzaju *Streptococcus*, 2 — szczep bakterii mlekowych z rodzaju *Streptobacterium*.
 Explanations: 1 — lactic acid bacteria strain of *Streptococcus* genus, 2 — lactic acid bacteria strain of *Streptobacterium* genus.

szczep naświetlany uzyskał zdolność rozkładania arabinozy i galaktozy, których nie potrafił wykorzystać szczep wyjściowy.

Wrażliwszy od ziarniaka na promieniowanie ultrafioletowe okazał się szczep pałeczek mlekowych, który po naświetleniu miał nieco zmniejszone uzdolnienia do ukwaszania podłoża, przy równoczesnej utracie uzdolnień do wytwarzania acetoiny oraz wykorzystywania mannozy, laktozy, maltozy, gdy napromieniowano go z odległości 10 cm — już po 10 sekundach naświetlania.

W drugiej serii doświadczeń naświetlano szczepy bakterii mlekowych uzdolnione do produkcji substancji antybiotycznych. Napromieniowanie ultrafioletem przeprowadzano z odległości 20 cm przez 30 sekund. Z wyrosłych na płytkach Petriego kolonii wyodrębniono losowo kilka szczepów, które poddano ponownej diagnozie. Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 2. Z zamieszczonych w niej danych wyraźnie widać, że pod wpływem napromieniowania ultrafioletem uległy zmianom właściwości fizjologiczne szczepów wyjściowych. Zmiany te dotyczyły przede wszystkim utraty lub poważnego osłabienia wrażliwości na niektóre antybiotyki albo też w kilku przypadkach — uwrażliwienia szczepów na aureomycynę (szczep 1b), erytromycynę i neomycynę (szczepy 2b i 2c) oraz na penicylinę i erytromycynę (szczep 3b). Ponadto zaobserwowano utratę zdolności niektórych szczepów powstałych w wyniku napromieniowania szczepu wyjściowego ultrafioletem do wykorzystywania poszczególnych cukrów diagnostycznych jako jedynych źródeł węgla.

Wyniki uzyskane przez nas sugerują, aby w dalszych doświadczeniach sprawdzić, czy zmiany powstałe we właściwościach fizjologicznych bakterii mlekowych na skutek naświetlania promieniami ultrafioletowymi są mutacjami, gdyż dopiero wtedy można by myśleć o praktycznym wykorzystaniu przez przemysł mleczarski otrzymanych mutantów.

WNIOSKI

Uzyskane w niniejszym doświadczeniu wyniki upoważniają do wypowiedzenia następujących wniosków:

1. Za pomocą napromieniowania szczepów bakterii mlekowych promieniami ultrafioletowymi można uzyskać szczepy o uzdolnieniach różniących się w zasadniczy sposób od posiadanych przez szczepy wyjściowe.
2. Uzyskano zarówno szczepy niewrażliwe na użyte w naszym doświadczeniu antybiotyki, jak i takie, które utraciły zdolność wykorzystywania niektórych cukrów diagnostycznych.
3. Niektóre z uzyskanych szczepów wykazywały silniejsze właściwości kwaszenia środowiska, co może okazać się cechą przydatną w przemyśle rolno-spożywczym.

Tab. 2. Zmiany niektórych właściwości szczepów wyjściowych po ich naświetleniu promieniami ultrafioletowymi
Changes of some features of initial strains after radiating them with ultra-violet rays

Nr szczepu	Mutant	Wrażliwość na						glukozę	Fermentuje						
		penicy- linę	strepto- mycinę	chloro- mycetynę	aureomy- cynę	erytromy- cynę	aureomy- cynę		fruktozę	galaktozę	maltozę	sacharozę	laktozę	rafinozę	arabinozę
1	K	-	+	++	-	+++	+	++	++	+	++	++	+++	+	+
	a	-	-	-	-	++	-	+++	+	-	-	-	+	+	-
	b	-	-	+	+	+	-	++	+	-	-	-	+	-	+
	c	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
2	K	-	+++	+++	+++	-	-	++	+	+	+	++	+++	+	+
	a	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	++	-	-
	b	-	-	+	++	+++	+++	+	-	+	-	+	+	-	-
	c	-	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-	+	+	-	-
3	K	-	+++	+	+++	-	+	++	+	+	++	++	+++	+	+
	a	-	-	+	+++	-	+	+	+	+	+	+	++	+	+
	b	+++	-	+++	+++	+++	-	+	-	+	+	++	++	-	+
	c	-	-	+	+	-	-	++	-	-	+	+	+++	+	+

Objaśnienia: 1, 2 — szczepy bakterii mlekowych z rodzaju *Streptococcus*, 3 — szczep bakterii z gatunku *Lactobacillus acidophilus*, K — szczepy kontrolne nie naświetlane promieniami ultrafioletowymi (UV), a, b, c — mutanty powstałe po naświetleniu promieniami UV szczepów wyjściowych; — niewrażliwy na antybiotyk, nie fermentuje cukru, + słabo wrażliwy na antybiotyk, słabo fermentuje cukier, ++ silnie wrażliwy na antybiotyk, silnie fermentuje cukier, +++ bardzo silnie wrażliwy na antybiotyk, bardzo silnie fermentuje cukier.

Explanations: 1, 2 — lactic acid bacteria strains of *Streptococcus* genus, 3 — bacteria strain of *Lactobacillus acidophilus* genus, K — control strains not radiated with ultra-violet rays (UV), a, b, c — mutants which originated after radiating initial strains with UV rays; — insensitive to antibiotic, does not ferment sugar, + weakly sensitive to antibiotic, ferments sugar weakly, ++ highly sensitive to antibiotic, ferments sugar strongly, +++ very highly sensitive to antibiotic, ferments sugar strongly.

PIŚMIENICTWO

1. Barner H.D., Cohen S.S.: The Relation of Growth to the Lethal Damage Induced by Ultraviolet Irradiation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 71, 149, 1955.
2. Charles R.L., Zimmerman L.N.: Dark Reactivation in Ultraviolet Irradiated *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 71, 611, 1956.
3. Curry J., Greenberg J.: Filament Formation in Radioresistant Mutants of *Escherichia coli* S after Treatment with Ultraviolet Light and Radiomimetic Agents. J. Bacteriol. 83, 38, 1962.
4. Dobrzański W.T.: Działanie letalne i mutagenne promieniowania ultrafioletowego na bakterie. Post. Mikrobiol. IV, 1, 3—56, 1965.
5. Dobrzański W.T.: Wlijanije razlicznych faktorow na czurowsitielnost' sztamma *Staphylococcus aureus* 209 P k ultrafioletowomu obłuczeniju. Bull. Acad. Pol. Sci. 505, 1964.
6. Dobrzański W.T.: UV Induction of Streptomycin-Resistance in *Staphylococcus* (strain 209 P). Bull. Pol. Acad. Sci. 9, 8, 1961.
7. Doudney C.O., Haas F.L.: Some Biochemical Aspects of the Post-Irradiation Modification of Ultraviolet-Induced Mutation Frequency in Bacteria. Genetics 45, 1481, 1960.
8. Giese A.C., Iverson R.M., Sanders R.T.: Effect of Nutritional State and other Conditions on Ultraviolet Resistance and Photoreactivation in Yeast. J. Bacteriol. 74, 271, 1957.
9. Newcombe H.B., Whitehead H.A.: Photoreversal of Ultraviolet Induced Mutagenic and Lethal Effects in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 61, 243, 1951.
10. Ogaj D.: Wlijanije UV na žiznesposobnost' molocznokislogo strieptokokka. Taszkient, Woprosy Mikrobiologii 1966.
11. Opara-Kubińska Z., Kuryło-Borowska Z., Szybalski W.: Effect of Ultraviolet Light on the Molecules Properties of Normal and Halogenated Deoxiribonucleic Acid. Biochim., Biophys. Acta 12, 410, 1963.
12. Shankel D. M.: Mutational Synergism of Ultraviolet Light and Caffeine in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 64, 410, 1962.
13. Suzuki K., Swada F., Iwama I.: Effects of Chloramphenicol on RNA Synthesis in *Escherichia coli* Irradiated with Ultraviolet Light. Biochim., Biophys. Acta 37, 369, 1960.
14. Szember A.: Kiszunki ziemniaczane i ich mikroflora. Acta Microbiol. Pol. 1, 339, 1952.
15. Szember A., Szulga E.: Rozpowszechnienie wśród bakterii mlekowych szczepów uzdolnionych do wytwarzania substancji antybiotycznych. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio E, vol. XXI, 13, Lublin 1967.
16. Zelle M.R., Ogg J.E., Hollaender A.: Photoreactivation of Induced Mutation and Inactivation of *Escherichia coli* Exposed to Various Wave Length of Monochromatic Ultraviolet Radiation. J. Bacteriol. 75, 190, 1958.

РЕЗЮМЕ

Выделенные из кислого молока и силоса штаммы молочнокислых бактерий подавались диагнозу, определяя при этом их некоторые физиологические свойства. Для дальнейших исследований брались 4 штамма бактерий, подвергнутых ультрафиолетовому облучению на расстоянии 10—20 см в течение 10—30 сек. Из

выросших на агаровой среде штаммов молочнокислых бактерий, выдержавших облучение, снова выделялись штаммы и снова поддавались диагнозу. В результате диагноза установлено, что вследствие облучения исходных штаммов были получены новые штаммы, своими признаками отчетливо отличающиеся от исходных (табл. 1 и 2). Таким образом, доказано, что таким несложным путем можно было бы получить штаммы молочнокислых бактерий, полезные пищевой промышленности.

Krytyczna WSKAŁA SUMMARY

Lactic acid bacteria strains isolated from sour milk and silages were subject to diagnosis and physiological properties of some of them were determined. Four bacteria strains from the collection were selected for further examinations. They were irradiated with ultra-violet for 10—30 seconds from the distance of 10—20 cm. From the colonies of lactic acid bacteria grown on agar medium, which survived after irradiation, the strains were isolated again and subject to next diagnosis. In result of it it appeared that due to radiation of primary strains new strains of the features quite different from the features of initial strains (Tab. 1 and 2) were obtained.

It was proved that in this simple way very useful lactic acid bacteria strains can be obtained, which can be used in agricultural-food industry.