

ANTAGONISTIČKO DJELOVANJE NEKIH
OBLIKA RODA STREPTOMYCES IZ ZEMLJE
CRVENICE S OTOKA PRVIČA U DALMACIJI

BOŽIDAR STILINOVIĆ i ZLATKO PAVLETIĆ

(Iz Instituta za botaniku Sveučilišta u Zagrebu)

1. UVOD

Red *Actinomycetales* je danas jedna od najintenzivnije istraživanih grupa organizama na polju mikrobiologije. Ovih pet karakteristika govori zašto se toj grupi pridaje tako velika važnost:

1. Uloga u raznim prirodnim procesima,
2. Uzročnici nekih teških bolesti,
3. Uzročnici kvarenja namirnica i drugih materija,
4. Sposobnost sinteze vitamina,
5. Produkcija antibiotika.

Prvi rad o *Actinomycetales* objavio je Ferdinand Cohn (1875), označivši filamentarni organizam nađen u lakrimalnom kanalu kao *Streptothrix Foersteri*.

Harz (1877) daje ime *Actinomyces bovis* uzročniku jedne zaraze kod goveda, a imao je zrakastu građu i bio sličan gljivama. Po njemu je kasnije i cijeli red dobio ime *Actinomycetales*.

Od mnogih kasnijih istraživača spomenut ćemo najvažnije, kao što su Trevisan (1889), Tsiklinsky (1889), Haas (1906), Pinoy (1913), Jensen (1930, 1932), Orskov (1923), Waksman (1950). Naročito se intenzivno istražuju aktinomiceti posljednjih dvadeset godina zbog svoje sposobnosti lučenja antibiotika.

U našoj se zemlji također posvećuje velika pažnja aktinomicetima i mnoge naučne ustanove istražuju njihovu problematiku. Istražuju se razna antagonistička svojstva pojedinih sojeva, a u posljednje se vrijeme mnogo radi na dobivanju vitamina B₁₂ iz nekih vrsta roda *Streptomyces* (*S. griseus*). Treba međutim istaći da se istraživanja u našim institutima vrše uglavnom s poznatim sojevima koje često dobivamo iz inostranstva i čija je vrijednost već uglavnom poznata. Aktinomiceti koji žive u našim

tlima još su uvijek nedovoljno istraženi, jer mnogi razlozi za sada onemogućuju široko i detaljno ispitivanje. S tim u vezi objavljeno je kod nas vrlo malo radova naših stručnjaka. Značajniji su radovi B. A. G o v o r - č i n a (1953, 1956, 1957, 1959) i M. S. T o d o r o v i ć a (1953).

U rujnu prošle godine počeli smo na Institutu za botaniku u Zagrebu istraživati uzorke zemlje crvenice s otoka Prvića (nedaleko Šibenika), da izoliramo i ustanovimo one oblike streptomicesa, koji djeluju antagonistički prema nekim drugim bakterijama.

2. METODIKA RADA

a) Uzimanje uzoraka

Uzorci su uzimani sterilno, s dubine 2 do 6 cm (*Streptomyces* su aerobi) i spremeni u sterilne staklenke s čepovima u obliku zavrtnja.

b) Izolacija

Suspenzija zemlje je bila razmazana po hranjivoj podlozi i stavljena u termostat na 28° C 6—8 dana, za koje su se vrijeme razvile kolonije streptomiceta. U našim se ispitivanjima kao dobra podloga za selekciju pokazao C z a p e k o v agar (NaNO₃ — 2g, K₂HPO₄ — 1g, MgSO₄·7H₂O — 5g, KCl — 0,5g, FeSO₄ — 0,01g, saharoza — 30g, agar — 15g, destilirana voda 1000 ml, pH=7).

Nakon razvitka mikroorganizama pristupili smo drugoj fazi izolacije, tzv. razmnažanju. Sterilnom ezom precijepljeni su organizmi koje smo željeli izolirati na drugoj ploči i pravili smo po njoj razmaze. Nakon inkubacije 6 do 8 dana kod 28° C razvile su se na ploči čiste kulture u dovoljnoj količini za dalja ispitivanja.

Treći stupanj izolacije vršen je prijenosom na kosi agar. Za kosi agar mogu se koristiti razne podloge kao npr: C z a p e k o v agar, škrobni agar, krumpir glukoza agar (Potato glucose agar), hranjivi agar (Nutrient agar) itd. U našem slučaju upotrijebljen je modificirani Czapekov agar.

Inkubacija na kosom agaru trajala je također 6 do 8 dana kod 28° C, a tako dobivene čiste kulture držane su u epruvetama dugo vremena u nepromijenjenom stanju. Time je i sam proces izolacije bio završen.

c) Determinacija

Danas se klasifikacija i određivanje streptomicesa vrši na temelju promatranja morfoloških i fizioloških svojstava organizama u kulturama.

Od stalnih morfoloških svojstava streptomicesa za klasifikaciju su najvažniji struktura i naknadne promjene vegetativnog micelija, produkcija i izgled zračnog micelija te veličina i oblik samih spora.

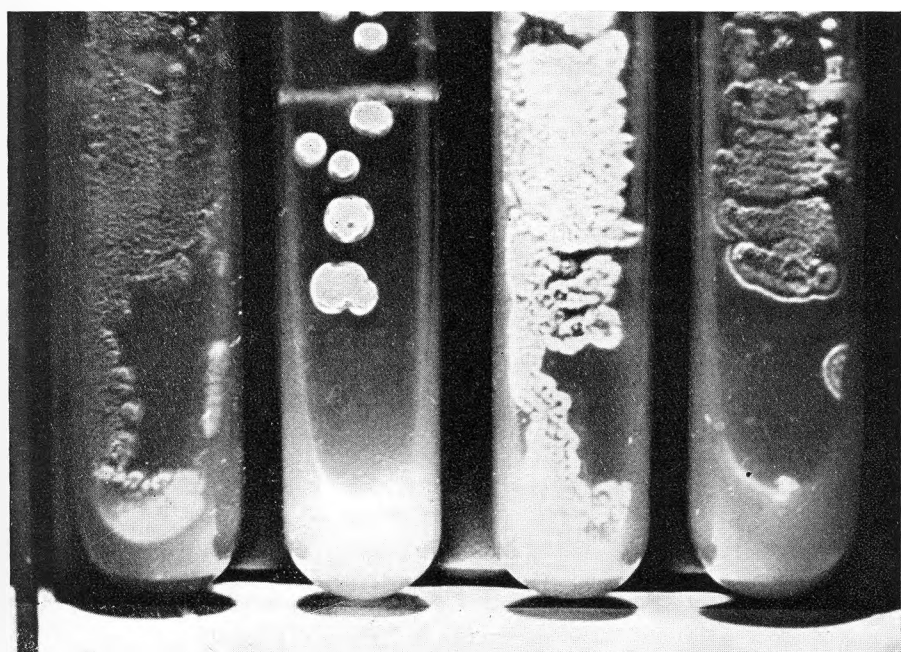
Od fizioloških svojstava spomenut ćemo pigmentaciju vegetativnog i zračnog micelija, stvaranje topljivog pigmenta na raznim medijima, hidrolizaciju škroba, likvefakciju želatine, koagulaciju i peptonizaciju mlijeka, stvaranje mirisa itd.



a

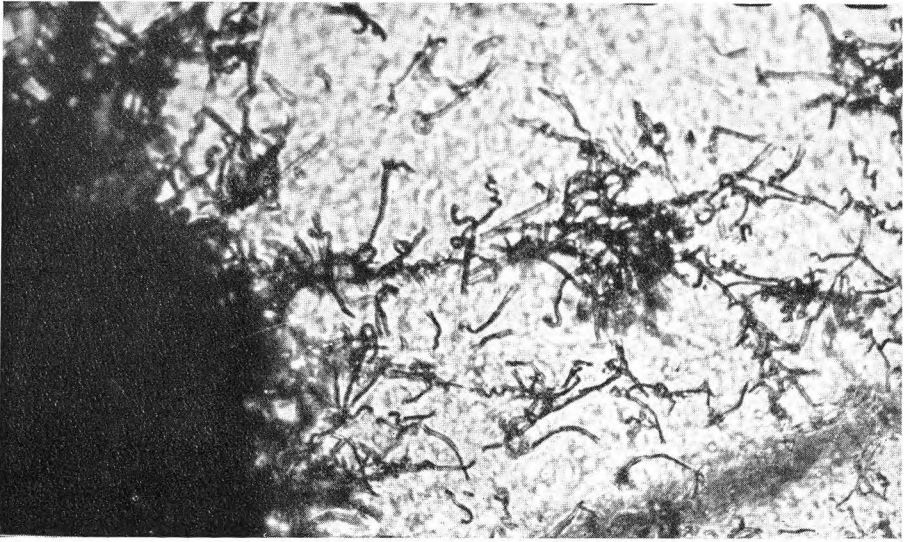


b

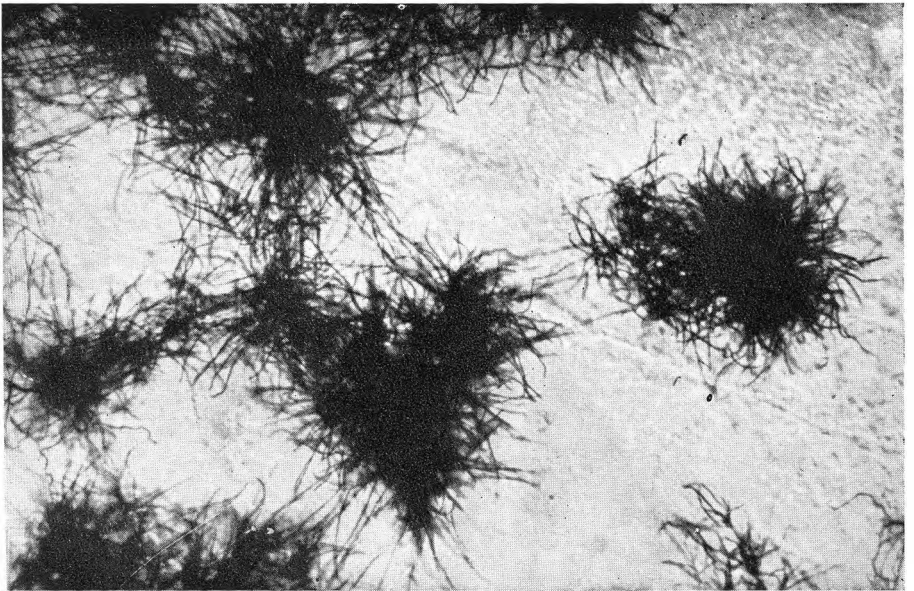


c

SLIKA 1.

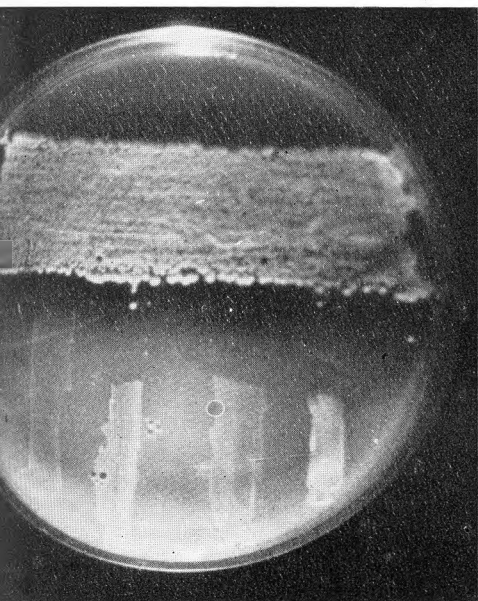


a

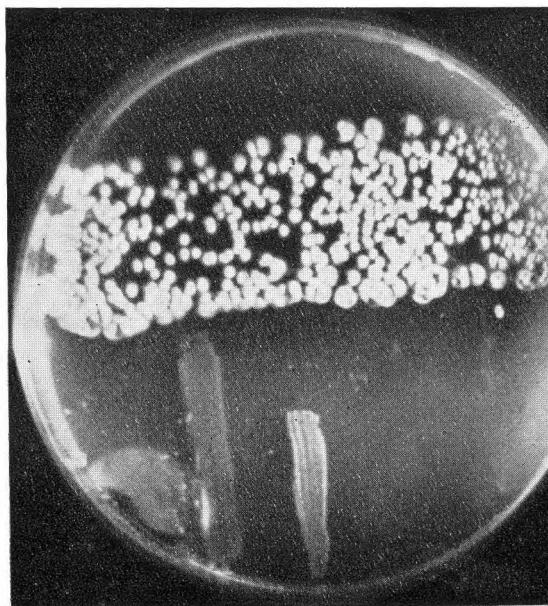


b

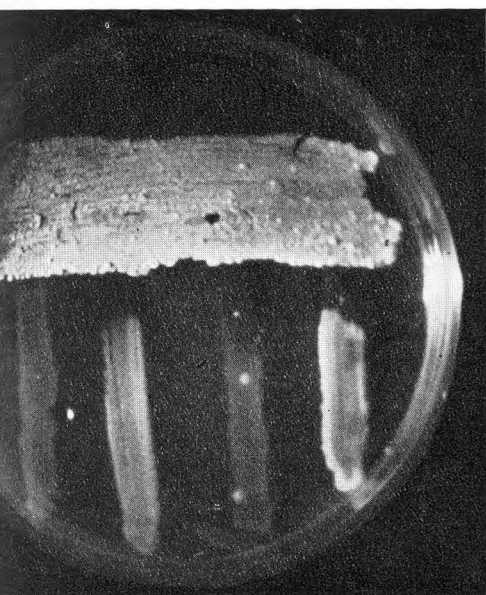
SLIKA 2.



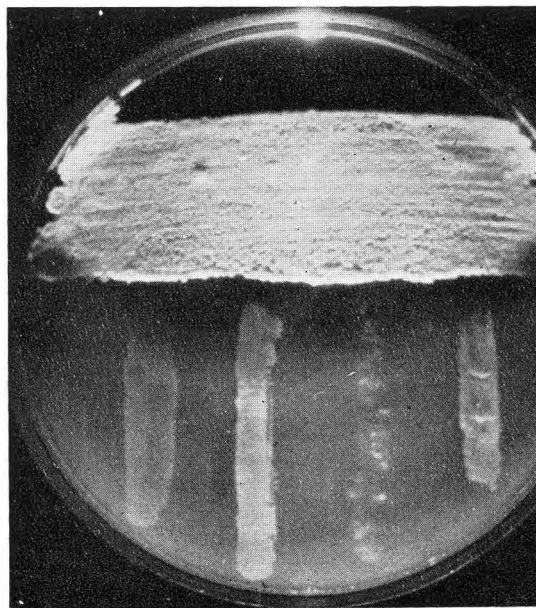
1 2 3 4



1 2 3 4



1 2 3 4



1 2 3 4

SLIKA 3.

Sl. 1: *Kulture istraživanih Streptomyces oblika:*

- a) Razvitak kultura na selektivnoj podlozi
- b) Kulture streptomicesa na ploči za razmnožavanje
- c) Čiste kulture na kosom agaru

Sl. 2: *Morfološke karakteristike ispitivanih oblika:*

- a) *Streptomyces* oblik sa spiralno savijenim sporoforima.
Preparat pripremljen po Henrici-ju (400 ×)
- b) *Streptomyces* oblik sa ravnim sporoforima.
Preparat pripremljen po Henrici-ju (80 ×)

Sl. 3: *Antimikrobno djelovanje nekih izoliranih kultura:*

- a) i b) Grupa *Streptomyces ruber* (oblici 4. i 9)
(1) *Escherichia coli*, (2) *B. subtilis*, (3) *Staphylococcus* sp.,
(4) *Sarcina lutea*
- c) Grupa *Streptomyces flavus* (oblik 7)
(1) *E. coli*, (2) *B. subtilis*, (3) *Staphylococcus* sp., (4) *Sar. lutea*
- d) Grupa *Streptomyces antibioticus* (oblik 15)
(1) *E. coli*, (2) *B. subtilis*, (3) *Staphylococcus* sp., (4) *Sar. lutea*

Za ispitivanje fizioloških svojstava upotrebljavaju se neke standardne podloge: želatina (Meat peptone gelatin), mlijeko, hranjiva juha (Nutrient broth), juha s glukozom (Glucose broth), hranjivi agar (Nutrient agar), glukoza agar (Glucose agar), sintetička podloga sa škrobom (Starch agar), krumpir (Potato plug).

Za neke vrste upotrebljavaju se specijalne podloge, kao npr: krvni agar, Loefflerov koagulirani serum, Calcium malate agar, Glucose asparagine agar itd.

Kako se iz ovoga vidi, klasifikacija streptomicesa je složen proces koji zahtijeva veliko iskustvo i strpljenje.

Današnji ključevi za određivanje imaju mnogo nedostataka, jer je klasifikacija aktinomiceta, posebno streptomicesa, još uvijek u stadiju evolucije. U ključu za određivanje aktinomiceta Waksman-a i Lechevalier-a (1953) kaže se između ostalog da je svježe izoliranoj kulturi puno lakše dati novo specifično ime nego pokušati njezinu identifikaciju s već opisanim vrstama. Bilo je čak sugerirano da se uvedu grupe koje bi obuhvatale slične vrste a nosile ime karakteristične vrste.

To je i uvedeno, pa imamo grupe stvorene na osnovu raznih zajedničkih svojstava npr.: po obliku sporofora, pigmentaciji medija poznatog sastava, na osnovu antimikrobnog spektra itd.

Na kraju treba naglasiti da se svaka koncepcija o diferencijaciji streptomicesa može smatrati samo privremenom, ali nikako konačnom.

d) Ispitivanje antimikrobnih svojstava

Testiranje se vrši na takvim podlogama koje sadržavaju supstance potrebne za rast kako ispitivanog organizma tako i bakterija na kojima se test vrši. U našim dosadašnjim istraživanjima služili smo se podlogom ovog sastava: pepton 5 g, glukoza 20 g, NaCl 5 g, agar 15 g, destilirana voda 1000 ml, pH=7,2 (Glucose peptone agar).

Za utvrđivanje antimikrobnih svojstava upotrijebljena je uobičajena metoda s unakrsnim pruganjem (agar cross streak method) koja se sastoji u tome da se na razmaz ispitivane vrste streptomicesa (širine 2 do 3 cm) povuku okomito razmazi raznih sojeva bakterija. Ako dotični organizam posjeduje antimikrobna svojstva, nastaje lijepo vidljiva zona inhibicije u kojoj bakterije ne rastu.

Primijenjena je i metoda filter diskova (Disk method), pomoću koje se ispituje jakost dobivenog antibiotika. Diskovi od filter papira određenog promjera i sterilizirani urone se u tekući medij u kojem raste ispitivana vrsta i postave na ploču, koja je ravnomjerno inokulirana jednom bakterijskom vrstom. U slučaju djelovanja pojave se oko diskova čisti krugovi koji označuju zonu inhibicije. Mjerenjem promjera krugova može se prema ustaljenim pravilima ocijeniti jakost novog antibiotika. Nakon toga slijedi standardizacija antibiotika, koncentracija, kemijska izolacija i još neka ispitivanja, kojima se mi nismo u ovom radu bavili.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Uzorci zemlje uzimani su sterilno na opisan način s dubine 2 do 6 cm. Uzeto je ukupno 50 uzoraka iz 10 vinograda (po 5 iz svakoga). Tlo iz kojeg su vađeni uzorci je zemlja crvenica (terra rossa), čiji je pH mjeren u vodi iznosio 7,4.

Suspenzija se dobila razmućivanjem 1 g zemlje u 10 do 15 ml vode. Zasiјavanje je vršeno pomoću Drygalskog štapića na tri ploče s modificiranim Czapekovim agarom. Tehnika zasiјavanja izgledala je ovako: u tri petrijevke ulili smo po 15 ccm podloge i ostavili da se stvrdne. Nakon toga prenesena je pomoću Drygalskog štapića kap suspenzije na prvu ploču i ravnomjerno razmazana po cijeloj površini. Istim štapićem (ne uzimajući ponovo materijal) napravljeni su razmazi po površini druge i treće ploče.

Svrha je takvog zasiјavanja podloge da se količina istraživanog materijala postepeno smanji, tako da se na nekim mjestima kolonije razvijaju iz jedne jedine klice, pa postanu pogodne za dalju izolaciju. Inokulirane ploče držane su 6 do 8 dana u termostatu kod 28° C. Nakon razvitka na selektivnoj podlozi (slika 1.a), presađivane su kolonije streptomyceta na ploču za razmnožavanje. Pesađivanje se vršilo pomoću sterilne eze, kojom su se po ploči pravili razmazi. Svaki presađeni oblik razmazan je po malom dijelu površine, pri čem se pazilo da se razmazi međusobno ne dodiruju. Za podlogu je upotrijebljen Czapekov modificirani agar ili podloga sa škrobom (škrob 10 g, K₂HPO₄ 0,3 g, MgCO₃ 1 g, NaCl 0,5 g, NaNO₃ 1 g, agar 15 g, destilirana voda 1000 ml pH=7,0). Nakon inkubacije od 8 dana kod 28° C razvitak kolonija bio je završen (slika 1.b).

Tako razmnožene kulture prenašane su na ukošeni agar, razmazane po površini podloge i stavljene u termostat kod 28° C 8 dana. Za kosi medij upotrijebljen je modificirani Czapekov agar na kojem su svi izolirani oblici pokazali dobar rast. Dobivene čiste kulture (slika 1.c) držane su na sobnoj temperaturi i čuvane od svjetla.

Opisanom metodom izolirano je 18 različitih oblika streptomyceta, koji su dalje istraživani radi određivanja antimikrobnog djelovanja i determinacije.

Prvi korak nakon izolacije bilo je ispitivanje antagonističkih svojstava dobivenih oblika i njihovo izdvajanje od neaktivnih formi. Svi oblici testirani su pomoću metode unakrsnog pruganja najmanje dva puta, pri čemu je kao zajednička podloga služio glukoza pepton agar (Glucose peptone agar).

Kao test organizmi upotrijebljene su gram pozitivne i gram negativne bakterije. Od gram pozitivnih uzeti su sojevi *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus* sp., *Sarcina lutea*, a od gram negativnih *Escherichia coli*.

Od 18 istraživanih streptomyceta oblika 8 je pokazalo izrazito antimikrobno djelovanje, i to uglavnom prema gram pozitivnim bakterijama. Izraženo u postocima to iznosi 40% ukupnog broja izoliranih oblika.

Jakost prirodne koncentracije antibiotika u hranjivom tekućem mediju istraživana je pomoću metode filter diskova (standardizacija nije

zasad vršena). Kao hranjivi tekući medij upotrijebljena je samo glukoza juha (Glucose broth) ovog sastava: glukoza 10 g, mesni ekstrakt 5 g, pepton 5 g, NaCl 5 g, destilirana voda 1000 ml, pH=7,2.

Za test podlogu služio je glukoza pepton agar inokuliran sa suspenzijom spora *Bacillus subtilis*. U tu svrhu rasla je kultura *B. subtilis* na hranjivom agaru 10 dana kod 37° C. Nakon sporulacije stanice su skinute i suspendirane u fiziološkoj otopini a suspenzija je pasterizirana kod 60° C 30 minuta da se unište vegetativne forme stanica. Suspenzija je do upotrebe čuvana u hladioniku kod 4° C. Test organizmi rasli su u Erlenm. tikvicama 8 dana kod 28° C.

Polaganje diskova vršeno je na ovaj način: sterilni diskovi uhvate se pincetom (steriliziranom na plamenu), urone jednim rubom u medij i drže uronjeni 15 sekundi. Zatim se izvade i 3 puta stresu da se ukloni suvišna tekućina te oprezno polože na površinu ploče. Ploče su nakon polaganja diskova inkubirane 24 sata kod 30° C. Promjer zona inhibicije mjerene je pomoću šestara i prenesen na milimetarski papir.

Oblici koji su pokazali antimikrobno djelovanje određivani su po ključu S. A. W a k s m a n-a i M. A. L e c h e v a l i e r-a (1953).

Kako smo već u metodici rada spomenuli, klasifikacija streptomicesa je vrlo složen proces pa smo se za sada ograničili da na osnovu antimikrobnog djelovanja te nekih morfoloških i fizioloških svojstava odredimo samo grupe u koje bi dobiveni oblici spadali.

Morfološka svojstva, tj. izgled vegetativnog i zračnog micelija, istraživana su metodom po H e n r i c i-ju. Kapljica rastopljenog agara stavljena je na objektno stakalce, inokulirana sporama i razmazana u tanki sloj po staklu.

Razmaz je inkubiran u sterilnoj i vlažnoj petrijevki kod 28° C. Nakon razvitka organizma stakalce se osuši, fiksira i oboji. Tako su kolonije promatrane zajedno s vegetativnim i zračnim micelijem u neporemećenom obliku.

Od boja upotrijebljene su Methyl violet, Gentiana violet, Gramm i Karbol fuksin (za spore). Važno je spomenuti da su svi izolirani oblici gram pozitivni, što je uostalom karakteristika roda *Streptomyces*.

U toku ispitivanja morfoloških svojstava, ustanovljene su dvije glavne forme zračnih micelija, pa smo ispitivane oblike mogli svrstati u dvije grupe.

Prva grupa obuhvaća 5 oblika sa spiralno savijenim sporoforima (slika 2.a) a u drugu spadaju 3 oblika s ravnim sporoforima (slika 2.b). Spore su ispitivane na objektnom stakalcu pod imerzijom i prethodno obojene karbol fuksinom ili methyl violetom. Ustanovljeni su kuglasti, cilindrični i elipsoidalni oblici spora. Vegetativni miceliji izoliranih oblika pokazali su raznolike pigmentacije, od crvene do ljubičaste boje. Svi antagonistički oblici koje smo izolirali luče u podlogu topljivi pigment, što je važno s obzirom na klasifikaciju. Za istraživanje karakteristika kultura upotrijebljene su opisane standardne podloge.

Na kraju navodimo oblike antagonističkih streptomicesa po broju pod kojim su izolirani.

Oblici 4, 9 (grupa *Streptomyces ruber*)

Oba oblika odlikuju se crvenom bojom vegetativnog micelija. Zračni micelij je slabo razvijen i na sintetskom agaru izgleda kao tanak ružičasto-bijeli pokrov. Sporofori su ravni (ne prave spirale), a spore okrugle do ovalne.

Želatina: likvefakcija umjerena, oba oblika stvaraju topljiv smeđi pigment.

Škrob: slaba hidrolizacija.

Glukoza juha: pahuljičasti sediment, pigmentiraju juhu svijetlosmeđe do tamnosmeđe.

Hranjivi agar: 4. rast naboran maslinastozelenkast,
9. rast smeđast, površina sjajna.

Glukoza agar: 4. rast maslinastozelenkast,
9. rast obilan koraljnocrven.

Mlijeko: peptonizacija.

Antagonistička svojstva: oba oblika aktivni su protiv gram pozitivnih bakterija (slika 3.a, b).

Napomena: na proteinskim medijima oba oblika stvaraju smeđi topljiv pigment.

Na osnovu opisanih svojstava mogu se ovi oblici svrstati u grupu *Streptomyces ruber*.

Oblici 5, 7, 10, 14 (grupa *Streptomyces flavus*)

Ovi oblici odlikuju se žutim rastom na mnogim medijima te stvaranjem topljivog žućkastog do zlatnožutog pigmenta kako na sintetičkim tako i na kompleksnim organskim podlogama. Sporofori su više ili manje spiralo savijeni, a boja zračnog micelija je bijela (7), sivobijela (5), sumporastožuta (10) i mišjesiva (14).

Kulture su snažno proteolitičke i dijastatične.

Želatina: sva četiri oblika jako likvefiraju, 5, 7, 9. stvaraju žućkasti, dok 14. oblik luči zlatnožuti topljivi pigment.

Škrob: jaka hidrolizacija.

Glukoza juha: dobro razvijen micelij na površini, topljivi pigment svijetložut.

Mlijeko: peptonizacija s koagulacijom.

Glukoza agar: 5. rast žut, topljivi pigment žut,
7. rast žućkastosmeđe boje, topljivi pigment žućkast,
10. rast žućkast, topljivi pigment žut,
14. rast žućkast, zračni pigment mišjesivkast, topljivi pigment zlatnožut.

Antagonistička svojstva: sva četiri oblika aktivna su protiv gram pozitivnih bakterija (slika 3.c).

Napomena: na proteinskim medijima nikad ne stvaraju smeđi pigment.

Oblici 12, 15 (grupa *Streptomyces antibioticus*)

Vegetativni micelij je žućkast (12) i narančastožut (15).

Zračni micelij je zelenkast (12) i mišjesivkast (15) a sporofori su dugi i ravni. Spore su okrugle do ovalne.

Želatina: tamnosmeđi rast na površini, tamni pigment prodire u donji neotopljeni sloj.

Škrob: hidroliza znatna.

Mlijeko: peptonizacija bez koagulacije.

Glukoza agar: rast smeđi, oba oblika luče smeđi topljivi pigment.

Antagonistička svojstva: oba oblika su aktivna protiv gram pozitivnih i gram negativnih bakterija (slika 3.d).

Napomena: antimikrobno djelovanje te produkcija smeđeg topljivog pigmenta na proteinskim podlogama, bili su osnovni faktori pri uvrštavanju ovih oblika u grupu *Streptomyces antibioticus*.

PREGLED REZULTATA

Glavni su rezultati ovog našeg rada ovi:

1. Oblici roda *Streptomyces* u tlu otoka Prvića istraživani su kod nas prvi put.
2. Dosadašnjim istraživanjem izolirano je 18 oblika koji se međusobno razlikuju po morfološkim i fiziološkim svojstvima.
3. Svi izolirani oblici su pigmentirani, od toga 9 luče topljivi pigment u podlogu.
4. Svi oblici su gram pozitivni.
5. Antimikrobno djelovanje pokazalo je 8 oblika.
6. Protiv gram pozitivnih bakterija djeluje 6 oblika, a protiv gram pozitivnih i gram negativnih bakterija 2 oblika.
7. Utvrđeno je da antagonistički oblici pripadaju grupama: *Streptomyces ruber* (2), *S. flavus* (4) i *S. antibioticus* (2).

LITERATURA

- Cohn, F. (1875): Untersuchungen über Bakterien. II. Beitr. Biol. Pflanzen, 1 (3): 141.—204.
- Frobisher, M. (1959): Fundamentals of Microbiology. W. B. Saunders Co.
- Govorčin, B. A. (1953): Antibakterijska svojstva aktinomiceta. Tehnički pregled 5—6, 213.
- Govorčin, B. A. (1956): Produkcija luteomycina pomoću *Streptomyces flaveolus*. Tehnički pregled 3. 43—52.
- Govorčin, B. A. (1957): Produkcija umbramycina pomoću *Streptomyces olivaceus*. Tehnički pregled 5—6, 179—187.
- Govorčin, B. A. (1959): Produkcija rhombomycina pomoću *Streptomyces antibioticus*. Tehnički pregled 4, 105—113.

- Haas, E.** (1906): Beitrag zur Kenntnis der Actinomyceten. Centrbl. Bakt., I, 40: 180—186.
- Harz, C. O.** (1877—1878): Actinomyces bovis, ein neuer Schimmel in den Geweben des Rindes. Deut. Zeitsch. Thiermed., 5: 125—140.
- Jensen, H. L.**, (1930, 1932): The genus Micromonospora Orskov, a little known group of soil microorganisms. Proc. Linn. Soc. N. S. W., 55: 231—249; 57: 175—180.
- Orskov, J.** (1923): Investigations into the morphology of the ray fungi. Levin and Munksgaard, Kobenhavn.
- Pinoy, E.** (1913): Actinomycoses et mycetomes. Bull. Inst. Past., 11: 929—938, 977—984.
- Todorović, M. S.** (1953): Prilog proučavanju Actinomyces spp iz naših zemljišta. Zemljište i biljka, 2: 440—468.
- Trevisan, V. and De Toni, G.** (1889): Schizomycetaceae. Saccardo's Sylloge Fungorum, Padua, 8.
- Tsiklinsky, P.** (1889): Sur les mucédinees thermophiles. Ann. Inst. Pasteur, 13: 500—505.
- Waksman, S. A.** (1950): The Actinomycetes. Ann. Crypt. et Phyt. The Chronica Botanica Co., Waltham, Mass.
- Waksman, S. A., and Lechevalier, M. A.** (1953): Guide to the Classification and Identification of the Actinomycetes and Their Antibiotics. William & Wilkins Co., Baltimore.

ZUSAMMENFASSUNG

DIE ANTAGONISTISCHE WIRKUNG MANCHER STREPTOMYCES-FORMEN AUS DER ROTERDE DER INSEL PRVIĆ IN DALMATIEN

Božidar Stilinović und Zlatko Pavletić

Aus roter Erde, die dem Boden der Insel Prvić in Dalmatien entnommen wurde, isolierte man mit standardisierten Methoden, gewisse Formen der Gattung *Streptomyces*, und untersuchte ihre antimikrobiische Wirkung. Auf diese Art sind 18 Formen, die sich untereinander durch morphologische und physiologische Eigenschaften unterscheiden, isoliert worden.

Alle isolierten Formen sind pigmentiert, 9 davon scheiden schmelzbares Pigment in die Unterlage. Alle sind Gramm positiv.

Antimikrobiische Wirkung zeigten 8 Formen. Wider die Gramm positiven wirken 5 Formen, und 3 Formen gegen die Gramm positiven und die Gramm negativen Bakterien. Es wurde festgestellt, dass die antagonistischen Formen zu den Gruppen *Streptomyces ruber* (2), *Streptomyces flavus* (4) und *Streptomyces antibioticus* (2) gehören.