

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXVIII, 8

SECTIO C

1973

Instytut Biologii UMCS  
Zakład Fizjologii Roślin

Zbigniew JOZWIK

**Własności antybiotyczne 42 szczepów flory jelitowej larw *Galleria mellonella* L. w stosunku do *Mycobacterium* sp.**

Антибиотические свойства 42 штаммов кишечной флоры личинок *Galleria mellonella* L. по отношению к *Mycobacterium* sp.

Antibiotic Properties of 42 Strains from the Intestinal Flora of *Galleria mellonella* L. Larvae in Relation to *Mycobacterium* sp.

WSTĘP

Metelnikow (12) wykazał, że larwy mola woskowego *Galleria mellonella* L. są odporne na zakażenia wysokowirulentnymi bakteriami gruźlicy i że odporność ta związana jest ze specyficznym czynnikiem, rozkładającym lipido-woski. Substancja ta, zawarta w limfie owadów, posiada zdolność niszczenia prątków gruźlicy również *in vitro*. Według Oliviera (13), przyczyną hamowania wzrostu prątków jest substancja o charakterze antybiotycznym, znajdująca się w ustroju larw. Prace Oliviera potwierdzili Kuzniecowa i Wojciechowski (10). Warto także wspomnieć o primycynie, antybiotyku izolowanym przez Vályi-Nagy i współprac. (16), działającym na prątki kwasooporne. Mikroorganizm produkujący ten antybiotyk izolowano z przewodu pokarmowego larw mola woskowego.

Te interesujące badania, prowadzone od pierwszych lat XX wieku, nad wpływem ekstraktów z larw mola woskowego na wzrost prątków gruźlicy podjął Paszewski (14). Przetrzywał on *Mycobacterium* 607 w ekstraktach z gąsienic przez 24 godziny, a następnie na bakterie te działał sulfatiazolem i penicyliną. Okazało się, że wyciągi enzymatyczne z larw uczulają saprofityczne prątki kwasooporne na działanie sulfatiazolu i penicyliny. W dalszych badaniach prowadzonych pod kierunkiem Paszewskiego (1, 2) wykluczono naturę enzymatyczną

Tab. 1. Opis morfologiczny i własności biochemiczne szczepów bakteryjnych czynnych antybiotycznie

Morphological description and biochemical properties of bacterial strains active antibiotically

Test Test	Nr szczepu Strain No.			
	4-bis	12-bis	26-bis	37-bis
Barwienie Staining	laseczki Gram + bacilli Gram +	ziarniaki Gram + cocci Gram +	ziarniaki Gram + cocci Gram +	laseczki Gram + bacilli Gram +
Ruch Movement	+	+	-	+
Indol Indole	-	-	-	-
Arabinoza Arabinose	+	+/-	+/-	+/-
Laktoza Lactose	-	+/-	+/-	-
Sacharoza Saccharose	+/-	+/-	+/-	+/-
Glukoza Glucose	+/-	+/-	+/-	+/-
Odczyn Voges-Proskauera Voges-Proskauer reaction	+	-	-	+
Methyl-Red	+	-	-	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
Upłynnianie żelatyny Gelatin: liquefaction	+	-	-	+
Mleko lakmusowe Litmus milk	+	skrzep kwas clot acid	skrzep kwas clot acid	+
Redukcja azotanów Nitrate reduction	+	-	-	+
Koagulaza Coagulase	-	-	-	-
Katalaza Catalase	+	-	-	+

Ciąg dalszy tabeli 1 — Table 1 continued

Peroksydaza Peroxidase	+	-	-	+
Esteraza Esterase	+	-	-	+
Wzrost w temperaturze 4°C Increase at 4°C	-	-	-	-
Wzrost w temperaturze 25°C Increase at 25°C	+	+	+	+
Wzrost w temperaturze 37°C Increase at 37°C	+	+	+	+

czynnika aktywnego (1), a następnie zbadano wpływ innych chemoterapeutyków na uczulone, saprofityczne prątki kwasooporne.

Skąpe wiadomości o znaczeniu mikroflory jelitowej gąsienic mola woskowego dla procesów trawienia wosku były podstawą do badań nad znalezieniem szczepów hydrolizujących wosk pszczeli. Dzięki wyizolowała ok. 500 szczepów bakteryjnych z przewodu pokarmowego larw *G. mellonella*. Niektóre z tych szczepów, jak wykazali Jarosz (8) i Józwick (9), produkują antybiotyki zdolne do zahamowania wzrostu prątków gruźlicy.

Trudno obecnie zająć zdecydowane stanowisko, jaka istnieje zależność między czynnymi przeciwprątkowo ekstraktami z larw *G. mellonella* a metabolizmem niektórych szczepów flory jelitowej tych larw, to jednak pierwsze doniesienia Vályi-Nagy i współprac. (16), a także Józwicka (9), stwierdzające obecność substancji czynnych antybiotycznie w filtratach bakteryjnych niektórych szczepów izolowanych z larw mola woskowego, zachęciły do szerszego opracowania materiału bakteryjnego w kierunku poszukiwania antybiotyków przeciwprątkowych i bardziej wnikliwego zbadania tych substancji.

#### MATERIAŁ

Szczepy: 42 szczepy bakteryjne, wyizolowane przez B. Dudziak z przewodu pokarmowego larw młodych *G. mellonella* L. (larwy o długości 0,8—1,5 cm). Szczepy te oznaczono numerami od 1-bis do 42-bis.

Z tych szczepów: 4-bis, 12-bis, 26-bis i 37-bis działały antybiotycznie na prątki kwasooporne (tab. 1).

Saprofityczne prątki kwasooporne: *Mycobacterium* 607, *Mycobacterium* 279, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium phlei* i *Mycobacterium butyricum* z Muzeum Szczepów Zakładu Fizjologii Roślin UMCS w Lublinie.

Prątki gruźlicy otrzymane z Kliniki Ftizjatrycznej AM w Lublinie: nr 766 wrażliwy na Sm, INH i PAS i nr 500 oporny na 8 µg/ml Sm, 0,4 µg/ml INH i 2 µg/ml PAS. Szczep nr 827 oporny na 0,4 µg/ml INH wrażliwy na Sm i PAS, nr 1076 oporny na 2 µg/ml PAS i 8 µg/ml Sm wrażliwy na INH i szczep nr 1073 wrażliwy na Sm, INH i PAS. Szczep *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>w</sub>.

Z Muzeum Szczepów Mikrobiologii Ogólnej UMCS w Lublinie: *Bacillus subtilis* ATCC nr 6633, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus* sp. Puławy, *Bacillus firmus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Escherichia coli* K-12, *Proteus vulgaris*, *Aerobacter Aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus citreus*, *Streptococcus lactis* i *Staphylococcus albus*.

Z Muzeum Szczepów Zakładu Mikrobiologii Szczegółowej UMCS w Lublinie: *Saccharomyces mellis*, *Saccharomyces nedwigii* (garrecki), *Candida utilis* (palz), *Schizosaccharomyces acidovoratus*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Kloeckera apiculata*.

Podłoża: agar odżywczy, Sautona, Čapeka, Hellera, Hart-Hillsa, Andersona M-9, Garibaldiego-Feeney, NK-2 Syma, Čapeka-Doxa i Kozera.

Zwierzęta doświadczalne: chomiki syryjskie *Mysocricetus auratus* (Waterh) z Zakładu Biochemii UMCS w Lublinie.

Enzymy: pronaza firmy Koch-Light, pepsyna firmy Fluka i trypsyna firmy Koch-Light.

## METODY

Przygotowanie filtratów bakteryjnych: Do butli Legroux z 50 ml bulionu, pH 7,2 wprowadzano zawiesinę *Bacillus* sp. 4-bis. Inkubowano w temp. 37°, a następnie po 1—21 dniach oddzielano masę bakteryjną i doprowadzano odczyn filtratu do pH 7,2. Metabolity sączono przez filtr Schotta G-4, a następnie G-5.

Do oznaczania działania substancji antybiotycznej stosowano trzy metody:

1. Metodę podwójnych warstw agarowych Gratii (5).
2. Metodę cylinderkową.

3. Metodę seryjnych rozcieńczeń. Filtrat bakteryjny, otrzymany po 1—21 dniach inkubacji *Bacillus* sp. 4-bis, dodawano do podłoża Sautona w ilościach: 50, 30, 20, 10, 5, 1, 0,5 i 0,1%. Wprowadzano po 0,01 mg/ml 5-dniowej kultury saprofitycznych prątków kasoopornych. Zawiesinę prątków przygotowywano przez roztrarcie wilgotnej masy bakterii w moździerzach bakteryjnych, tak aby stężenie końcowe wynosiło 1 mg/ml. Za kontrolę przyjęto wzrost prątków na podłożu Sautona i podłożu Sautona z bulionem w stosunku 1:1. W przypadku szczepów patogennych filtrat bakteryjny dodawano w ilościach 50, 30 i 5% do podłoża Löwensteina-Jensena przed skoszeniem, a następnie na skosach rozprowadzano homogenną zawiesinę prątków. Kontrolę stanowiła pożywka Löwensteina-Jensena i podłoże Löwensteina-Jensena zmieszane z bulionem w stosunku 1:1. Dla saprofitycznych prątków wyniki sprawdzano po 4 dniach, dla szczepów patogennych po 4 tygodniach inkubacji w temp. 37°C.

## OPIS DOŚWIADCZEŃ I WYNIKI

Własności antybiotyczne 42 szczepów bakteryjnych w stosunku do *Mycobacterium* sp. (metoda Gratii): Spośród 42 szczepów (36 ziarniaków Gram+ i 6 laseczek Gram+) tylko cztery wytwarzały substancję czynną w stosunku do saprofitycznych prątków kwasoopornych. Były to laseczki Gram+: 4-bis i 37-bis oraz ziarniaki Gram+: 12-bis i 26-bis. Najbardziej czynny antybiotycznie jest szczep 4-bis (tab. 2). Najwrażliwszy spośród pięciu szczepów *Mycobacterium* sp. na działanie substancji antybiotycznej, tworzonej przez szczep 4-bis, jest *Myc. smegmatis*.

Charakterystyka szczepu 4-bis. Szczep 4-bis jest tlenową laseczką, zarodnikującą — z rodzaju *Bacillus*.  $0,8 \times 2,5 \mu$ . Tworzy łańcuszki.

Tab. 2. Działanie antybiotyczne 42 szczepów flory jelitowej larw *Galleria mellonella* L. w stosunku do saprofitycznych prątków kwasoopornych (metoda Gratii) Antibiotic effect of 42 strains from the intestinal flora of *Galleria mellonella* L. larvae on saprophytic acid-fast tubercle bacilli (Gratii's method)

Szczep badany nr Studied strain No.	Strefy zahamowania wzrostu (mm) Zones of growth inhibition (mm)				
	<i>Mycobacterium</i> 607	<i>Mycobacterium</i> 279	<i>Mycobacterium</i> <i>smegmatis</i>	<i>Mycobacterium</i> <i>phlei</i>	<i>Mycobacterium</i> <i>butyricum</i>
1-bis do 3-bis	—	—	—	—	—
4-bis	21	20	23	19	22
5-bis do 11-bis	—	—	—	—	—
12-bis	15	14	16	14	15
13-bis do 25-bis	—	—	—	—	—
26-bis	15	15	17	14	15
27-bis do 36-bis	—	—	—	—	—
37-bis	14	15	16	15	16
38-bis do 42-bis	—	—	—	—	—

Wybór podłoża. Substancja antybiotyczna nie była wytwarzana na podłożach: Sautona, NK-2 Symba, Čapeka, Čapeka-Doxa, Garibaldi i współprac., Hart Hillsa, Hellera i Andersona M-9. Stwierdzono natomiast wytwarzanie antybiotyku na agarze odżywczym i podłożu Kozera z cytrynianem sodu. Czynniki antybiotyczne otrzymane na agarze odżywczym dawały największe strefy zahamowania wzrostu *Mycobacterium*. Kolejne doświadczenia prowadzono w oparciu o agar odżywczy.

Wpływ pH na tworzenie antybiotyku. Zależność między pH podłoża a działaniem substancji antybiotycznie czynnej sprawdzano metodą Gratii. Do płytek Petriego wlewano po 9 ml agaru odżywczego (1,4%), doprowadzając uprzednio pH do wartości: 6,0, 6,4, 7,0, 7,4, 7,6, 8,0 i 8,4.

Na tak przygotowane podłoża wsiewano szczep *Bacillus* sp. 4-bis. Szczepy prątków rozprowadzano w miękkim podłożu Sautona (0,6%, pH 7,2) i nawarstwiano je na wyrosnięte i zabite chloroformem kolonie szczepu *Bacillus* sp. 4-bis. Inkubowano przez 24 godz. w temp. 37°C.

Tab. 3. Wpływ pH na tworzenie substancji antybiotycznej przez szczep *Bacillus* sp. 4-bis (metoda Gratii)

Effect of pH on the production of antibiotic substance by *Bacillus* sp. 4-bis (Gratii's method)

pH podłoża Medium pH	Strefy zahamowaniu wzrostu (mm) Zones of growth inhibition (mm)				
	<i>Mycobacterium</i> 607	<i>Mycobacterium</i> 279	<i>Mycobacterium</i> <i>smegmatis</i>	<i>Mycobacterium</i> <i>phlei</i>	<i>Mycobacterium</i> <i>butyricum</i>
6,0	12	8	10	11	11
6,4	14	13	11	13	13
6,6	16	15	14	14	16
7,0	19	20	17	17	22
7,2	21	18	23	19	18
7,4	18	15	18	16	16
7,6	17	14	18	15	15
8,0	15	11	17	13	13
8,4	15	10	17	13	11

Optymalne pH dla produkcji czynnika aktywnego zamyka się w granicach 6,8—7,2 dla *Myc.* 279 i *Myc. butyricum* oraz 7,0—7,4 dla *Myc.* 607, *Myc. phlei* i *Myc. smegmatis*. Średnia wielkość stref dla *Myc. smegmatis* wynosiła 23 mm (tab. 3).

Zależność między okresem inkubacji szczepu *Bacillus* sp. 4-bis a produkcją antybiotyku. W celu zbadania wpływu okresu inkubacji szczepu *Bacillus* sp. 4-bis na produkcję antybiotycznej substancji zastosowano metodę cylinderkową i metodę seryjnych rozcieńczeń. Kulturę szczepu *Bacillus* sp. 4-bis prowadzono sposobem powierzchniowym w temp. 37°C na bulionie. W czasie 1—21 dni inkubacji szczepu 4-bis odzielano metabolity od kożucha bakteryjnego.

Tab. 4. Wpływ okresu inkubacji szczepu *Bacillus* sp. 4-bis na aktywność antybiotyczną filtratów bakteryjnych (metoda cylinderkowa)  
Effect of the incubation period of *Bacillus* sp. 4-bis on the antibiotic activity of bacterial filtrates (cylindrical method)

Okres inkubacji w dniach Incubation in days	Strefy zahamowania wzrostu (mm) Zones of growth inhibition (mm)					Kontrola Control
	<i>Mycobacterium</i> 607	<i>Mycobacterium</i> 279	<i>Mycobacterium</i> <i>smegmatis</i>	<i>Mycobacterium</i> <i>phlei</i>	<i>Mycobacterium</i> <i>butyricum</i>	
1	—	—	—	—	—	—
2	19	15	22	18	18	—
3	23	22	25	24	24	—
4	30	29	35	32	34	—
5	32	29	36	34	35	—
6	29	28	29	32	31	—
7	28	28	30	32	31	—
8	28	28	30	30	30	—
9	28	29	30	31	30	—
10	27	28	29	30	29	—
11	27	28	28	29	28	—
12	13	12	15	14	15	—
13	13	13	14	14	14	—
14	13	12	15	13	15	—
15	18	17	19	18	19	—
16	18	16	19	19	19	—
17	17	16	20	18	20	—
18	17	17	20	18	20	—
19	17	16	19	17	20	—
20	17	16	19	17	19	—
21	16	16	18	17	19	—

Wartość *pH* doprowadzano do 7,2. Metabolity z kolejnych dni inkubacji szczepu 4-bis dodawano w metodzie seryjnych rozcieńczeń do podłoża Sautona w ilości od 50 do 0,1%. W metodzie cylinderkowej wypełniano studzienki filtratami z kolejnych dni prowadzenia kultury szczepu 4-bis (tab. 4 i 5).

Tab. 5. Wpływ okresu inkubacji *Bacillus* sp. 4-bis na aktywność antybiotyczną filtratów bakteryjnych w stosunku do saprofitycznych prątków kwasoopornych: Effect of the incubation period of *Bacillus* sp. 4-bis on the antibiotic activity of bacterial filtrates against saprophytic acid-fast tubercle bacilli: *Mycobacterium* 607, *Mycobacterium* 279, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium phlei* i *Mycobacterium butyricum* (metoda seryjnych rozcieńczeń — method of serial dilutions)

Okres inkubacji w dniach Incubation in days	Filtraty bakteryjne w podłożu Sautona (%) Bacterial filtrates in Sauton's medium (%)								Kontrola Control	
	50	30	20	10	5	1	0,5	0,1	I*	II**
1	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2—11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
12	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
13	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
14	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
15—21	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+

- \* Podłoże Sautona.
- \*\* 50% podłoża Sautona + 50% bulionu.
- Sauton's medium.
- \*\* 50% Sauton's medium + 50% bouillon.

Spektrum działania antybiotycznego. Spektrum antybiotyczne szczepu *Bacillus* sp. 4-bis oznaczano przy użyciu metody cylinderkowej wobec drobnoustrojów należących do różnych grup morfologicznych: laseczek Gram+, pałeczek Gram—, ziarniaków i drożdży. Do doświadczeń użyto filtraty czterodniowe (tab. 6).

Wpływ temperatury i czasu przetrzymywania na aktywność antybiotycznie czynnej substancji. Aktywność filtratu bakteryjnego z 4-dniowej kultury szczepu 4-bis podanego gotowaniu przez 30 min. nie zmieniła się. Czynniki aktywne nie ulegały również inaktywacji po przetrzymywaniu w temp. 4°C, po-  
kcyjowej i 37°C przez okres trzech miesięcy.

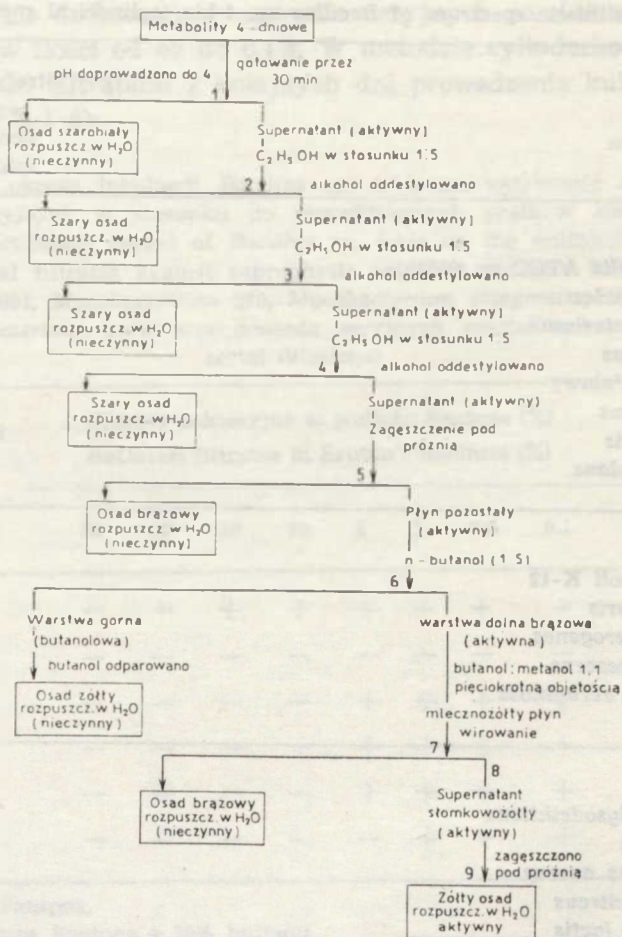


Tab. 6. Spektrum antybiotyczne szczepu *Bacillus* sp. 4-bis (metoda cylinderkowa)  
Antibiotic spectrum of *Bacillus* sp. 4-bis (cylindrical method)

Drobnoustrój Microorganism	Strefy zahamowania wzrostu (mm) Zones of growth inhibition (mm)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC nr 6663	12
<i>Bacillus mycoides</i>	—
<i>Bacillus megaterium</i>	—
<i>Bacillus cereus</i>	13
<i>Bacillus</i> sp. Puławy	14
<i>Bacillus firmus</i>	—
<i>Bacillus brevis</i>	—
<i>Bacillus circulans</i>	—
<i>Escherichia coli</i> K-12	17
<i>Proteus vulgaris</i>	—
<i>Aerobacter aerogenes</i>	—
<i>Serratia marcescens</i>	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	19
<i>Sarcina lutea</i>	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	—
<i>Micrococcus citreus</i>	18
<i>Streptococcus lactis</i>	—
<i>Staphylococcus albus</i>	—
<i>Saccharomyces mellis</i> , <i>Saccharomyces nedwigii</i> (garecki), <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> , <i>Saccharomyces cervisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces acidodevoratus</i> , <i>Candida utilis</i> (plaz) <i>Kloeckera apiculata</i> .	—

Działanie substancji antybiotycznej na prątki zjadliwe. Dodatek 5% filtratu bakteryjnego, 4-dniowej kultury szczepu *Bacillus* sp. 4-bis, powodował całkowite zahamowanie wzrostu szczepów: *Myc. tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub>, 766, 1073, 500, 827 i 1076.

Schemat 1



Próba oczyszczenia antybiotycznie czynnej substancji. Preparat oczyszczano według schematu 1. Wyjściowym materiałem były filtry 4-dniowej kultury szczepu *Bacillus* sp. 4-bis. Każdorazowo brano po 500 ml filtratu. Aktywność frakcji z kolejnych wariantów schematu oczyszczania antybiotyku sprawdzano metodą cylinderkową. W miarę odrzucania zanieczyszczeń od antybiotyku zwiększała się jego aktywność. Wytrącenie białka przez zakwaszenie filtratu do wartości pH 4 i zagotowanie dało o 5–10 mm większe strefy w porównaniu z kontrolą. Po zastosowaniu metody, według schematu 1, utrzymano substancję dającą strefy o średnicy większej o 15–25 mm od kontroli. W końcowym etapie oczyszczania substancji antybiotycznie czynnej (przejsie 9 na schemacie 1) otrzymano surowy osad, czynny antybiotycznie, który wypadał z roztworu po zagęszczeniu pod próżnią

supernatantu, otrzymanego z przejścia 8. Osad słomkowożółty, dobrze rozpuszczalny w wodzie, a nierozpuszczalny w alkoholu, chloroformie, eterze i benzenie.

Charakterystyka substancji antybiotycznej. Preparat antybiotyczny poddawano działaniu pronazy (500  $\mu\text{g/ml}$ ) przy  $37^{\circ}\text{C}$  w ciągu 1—72 godz. Potem pronazę inaktywowano przez ogrzewanie do  $100^{\circ}\text{C}$  (substancja antybiotyczna jest termostabilna) i po ostudzeniu doprowadzano do  $\text{pH}$  7,2. Pronaza nie inaktywowała antybiotyku. Również trypsyna (100  $\mu\text{g/ml}$ ) i pepsyna (100  $\mu\text{g/ml}$ ) nie trawiły substancji antybiotycznej.

Substancja antybiotyczna wykazuje pozytywną reakcję ninhydrynową i Molischa, redukuje jony  $\text{Mn}^{+7}$  do  $\text{Mn}^{+4}$ , nie redukuje  $\text{FeCl}_3$ . Daje ujemną próbę z płynem Lugola i ujemną reakcję Fehlinga.

Oznaczanie składu aminokwasowego filtratu bakteryjnego i podłoża bulionowego. Analiza na zawartość aminokwasów w częściowo oczyszczonych filtrach bakteryjnych (schemat 1) wykonana została na analizatorze Unichrom firmy Beckmana. Wykonano także analizę na zawartość aminokwasów w podłożu bulionowym, które podobnie jak filtry poddane zostało oczyszczeniu zgodnie ze schematem 1. Zestawienie procentowej zawartości aminokwasów przedstawiono w tab. 7.

Toksyczność substancji antybiotycznej. Filtrat oczyszczony i zagęszczony do 1/50 objętości (50 mm strefy zahamowania wzrostu) podawano: 4 zwierzętom dootrzewnowo (0,1 ml preparatu) 4 zwierzętom podskórnie (0,1 ml preparatu) i 2 zwierzętom kontrolnym (0,1 ml bulionu dootrzewnowo). Zwierzęta zniosły zabieg dobrze. Czynniki antybiotyczne nie jest toksyczne dla chomika.

#### DYSKUSJA

Cztery szczepy wyosobnione z przewodu pokarmowego larw *G. mellonella* wykazują antybiotyczne działanie w stosunku do saprofitycznych prątków kwasoopornych. Szczep *Bacillus* 4-bis wydziela substancję antybiotyczną. Substancja ta hamuje wzrost i działa bakteriobójczo na prątki. Antybiotyk tworzony przez *Bacillus* 4-bis nie jest identyczny z substancją zawartą w ekstraktach enzymatycznych z larw *G. mellonella*, hamującą wzrost *Mycobacterium*, ponieważ jest termostabilny (11, 12).

Bulion okazał się najlepszą pożywką do intensywnego wytwarzania antybiotyku przez *Bacillus* sp. 4-bis. Na podłożu Kozera czynnik aktywny wytwarzany był w mniejszych ilościach. Dodatek cynku i manganu do podłoża nie wpłynął dodatnio na produkcję antybiotyku. Pod tym

Tab. 7. Udział aminokwasów w filtracie bakteryjnym i podłożu bulionowym  
 Participation of amino acids in the bacterial filtrate and bouillon medium

Lp. No.	Aminokwasy Amino acids	Filtrat (%) Filtrate (%)	Bulion (%) Bouillon (%)
1.	kwaskwas asparaginowy aspartic acid	7,65	8,10
2.	treonina threonine	1,87	3,49
3.	seryna serine	2,26	3,88
4.	kwaskwas glutaminowy glutamic acid	5,81	10,89
5.	prolina proline	3,20	4,71
6.	glicyna glycine	4,82	8,43
7.	alanina alanine	2,91	5,98
8.	cystyna cystine	0,38	0,47
9.	walina valine	2,97	3,31
10.	metionina methionine	1,47	1,12
11.	izoleucyna isoleucine	1,28	1,81
12.	leucyna leucine	2,72	2,92
13.	tyrozyna tyrosine	1,62	0,82
14.	fenyloalanina phenylalanine	1,98	1,42
15.	lizyna lysine	9,17	9,66
16.	histrydina histidine	2,12	2,32
17.	arginina arginine	1,62	5,54
Suma Sum		53,85	74,87
	amoniak ammonia	3,52	1,86

względem wyniki różniły się od uzyskanych w badaniach nad subtyliną i subtenoliną (6, 7).

Istotny wpływ na aktywność antybiotyczną filtratów bakteryjnych miało stężenie jonów wodorowych podłoża. Przy  $pH$  6,8—7,4 najintensywniej syntetyzowała się substancja antybiotyczna i najsilniej działała na saprofityczne prątki kwasooporne.

Gotowanie 30-minutowe jak również przetrzymywanie w temperaturze pokojowej i  $37^{\circ}C$  w ciągu 3 miesięcy nie inaktywowało antybiotyku.

Z przeprowadzonych badań nad działaniem antybiotyku na bakterie należące do różnych grup systematycznych interesujący wydaje się fakt hamowania wzrostu *Escherichia coli*. Mogłoby to rzucić pewne światło na brak bakterii z grupy *E. coli* w przewodzie pokarmowym *G. mellonella*. Dudziak nie udało się izolować tych pałeczek z mikroflory gąsienic mola woskowego. Wydaje się, że wstępne badania nad naturą antybiotyku wskazują na budowę polipeptydową substancji czynnej, chociaż substancja antybiotyczna nie ulegała trawieniu pepsyną, trypsyną i pronazą. Warto podkreślić, że małe cykliczne peptydy i peptydy zawierające D-aminokwasy są raczej odporne na działanie enzymów proteolitycznych, a często w skład antybiotyków peptydowych wchodzi aminokwasy nie spotykane w białkach. W większości przypadków są to aminokwasy konfiguracji D (3).

Wnioskiem wiążącym pewne nadzieje z substancją czynną jest jej działanie *in vitro* na wzrost szczepów patogennych. Podkreślić również należy, że czynnik aktywny nie wywiera szkoliwego wpływu na organizm chomika syryjskiego.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Dudziak B., Józwick Z., Paszewski A.: Experiments of 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).
2. Dudziak B., Józwick Z., Paszewski A.: Sulphathiazole and Sulphamethazine in Investigations on the Action of Extracts of the Larvae of *Galleria mellonella* L. on *Mycobacterium tuberculosis* 607. Fol. Soc. Scient. Lublinensis sectio B **3/4**, (1963/64).
3. Elmore D. T.: Peptydy i białka. PWRiL, Warszawa 1970, 115.
4. Feeney R. E., Lightbody H. D., Garibaldi J. A.: Zinc as an Essential Element for Growth and Subtilin Formation by *Bacillus subtilis*. Arch. Biochem. **15**, 13 (1947).
5. Fréderiq P.: Colicines. Ann. Rev. Microbiol. **2**, 7 (1957).
6. Garibaldi J. A., Feeney R. E.: Subtilin Production. Ind. Eng. Chem. **41**, 432 (1949).

7. Howell S. F., Tauber H.: Subtenolin: an Antibiotic from *Bacillus subtilis*. II. Isolation and Chemical properties. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **67**, 432 (1948).
8. Jarosz J.: Antybiotyczne własności niektórych laseczek zarodnikujących z rodzaju *Bacillus*, wydzielonych z mikroflory jelitowej larw mola woskowego (*Galleria mellonella* L.). Praca doktorska (maszynopis) UMCS, Lublin 1971.
9. Jóźwik Z.: The Effect of Metabolic Products of *Bacillus Galleria* No 7 on four Saprophytic Acid-fast Tubercle Bacilli. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio D **21**, 401—405 (1966).
10. Kuzniecowa A., Wojciechowski E.: Wpływ wyciągów z larw *Galleria mellonella* na wzrost prątków gruźlicy. Med. Dośw. Microb. **2**, 245 (1950).
11. Mankiewicz E.: The Action of Lipidolytic Enzymes of Larvae of *Galleria mellonella* on Virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Can. J. Med. Sci. **30**, 106 (1952).
12. Metalnikov S.: O przyczynach immuniteta po odnoszeniju k tubierkuloznoj infekcyi u pszelinoy moli (*Galleria mellonella*). Chark. Mied. Żurnał. **2**, 110 (1906).
13. Olivier H. R.: Antibiotic Action of an Extract of *Galleria mellonella*. Nature **159**, 4066, 685 (1947).
14. Paszewski A.: Influence of an Enzyme Extract from the Larvae of *Galleria mellonella* together with Penicilin or Sulphathiazole on the Growth of *Mycobacterium tuberculosis* 607. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C **14**, 435—438 (1959).
15. Paszewski A.: Über den Einfluss von Extracten aus den Raupen von *Galleria mellonella* L. sowie von *Bacillus Galleria* Nr 7 Metaboliten auf *Mycobacterium* sp. Inter. Kongress für Chem. Vienna. **563**, 566 (1967).
16. Vályi-Nagy T., Úsi J., Szylágyi J.: Primycin a New Antybiotic. Nature **441**, 174, 1105—1106 (1954).

## РЕЗЮМЕ

Из 42 штаммов кишечной флоры личинок *Galleria mellonella* L. 4 штамма: 4-bis, 12-bis, 26-bis, 37-bis проявляют антибиотическое действие по отношению к сапрофитическим кислостойчивым палочкам. Штамм *Bacillus* sp. 4-bis обладает наибольшей антибиотической активностью. Из сапрофитов наиболее чувствительным на действие антибиотического вещества является *Mycobacterium smegmatis*. Максимальная антибиотическая активность у культуры штамма *Bacillus* sp. 4-bis на бульонной питательной среде приходится на 4—5 ден. Эти штаммы бактериоцидны по отношению к сапрофитическим кислостойчивым палочкам, задерживают рост *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> и штаммов *Mycobacterium*, изолированных у больных, штаммы которых чувствительны и устойчивы к классическим лекарствам.

Антибиотическое вещество не влияет на сирийских хомяков.

## SUMMARY

Of 42 strains from the intestinal flora of wax moth larvae — *Galleria mellonella* L., four strains (4-bis, 12-bis, 26-bis, 37-bis) showed antibiotic action against saprophytic acid-fast tubercle bacilli. The strain *Bacillus* sp. 4-bis had the highest antibiotic activity. Of saprophytes, *Mycobacterium smegmatis* appeared to be most sensitive to the action of antibiotic substance. The maximum accumulation of active substance was found in the 5-day-old culture of *Bacillus* sp. 4-bis on a bouillon medium. The antibiotic substance had a bacteriostatic effect on saprophytic acid-fast tubercle bacilli, it inhibited the growth of *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> and also of *Mycobacterium* strains, isolated from patients, which were sensitive and resistant to classical drugs.

The antibiotic substance had no harmful effect on the Syrian hamsters.

