

Jóźwik, Zbigniew / Knazik, Monika

Bakterie glebowe z cmentarzyska kultury pucharów lejkowatych w Pawłowie, stan. 3, pow. Sandomierz

Archeologia Polski Środkowowschodniej 6, 164-168

2001

Artykuł został zdigitalizowany i opracowany do udostępnienia w internecie przez Muzeum Historii Polski w ramach prac podejmowanych na rzecz zapewnienia otwartego, powszechnego i trwałego dostępu do polskiego dorobku naukowego i kulturalnego. Artykuł jest umieszczony w kolekcji cyfrowej bazhum.muzhp.pl, gromadzącej zawartość polskich czasopism humanistycznych i społecznych.

Tekst jest udostępniony do wykorzystania w ramach dozwolonego użytku.

ZBIGNIEW JÓZWIK, MONIKA KNAZIAK

BAKTERIE GLEBOWE Z CMENTARZYSKA KULTURY PUCHARÓW LEJKOWATYCH W PAWŁOWIE, STAN. 3, POW. SANDOMIERZ

Prowadzone od szeregu lat w Zakładzie Fizjologii Roślin UMCS w Lublinie badania nad izolacją i charakterystyką antybiotyczną bakterii z próbek glebowych Spitsbergenu (Jóźwik 1993, 1994, 1996, 1998) skłoniły autorów tej pracy do analiz mikrobiologicznych bakterii izolowanych z próbek pobranych ze stanowiska archeologicznego w Pawłowie, cmentarzysko kultury pucharów lejkowatych (KPL), datowane na 3500 r. przed Chrystusem (B. Bargieł, M. Florek 1999).

Pomysł przeprowadzenia takich badań z miejsc kulturowych w Polsce wiąże się z wcześniejszymi pracami Józwika (1993, 1994, 1998) nad izolacją i charakterystyką antybiotyczną bakterii z XVII-wiecznego stanowiska łowców wielorybów „Viking” na Zachodnim Spitsbergenie.

MATERIAL

1. Próbkę glebową pobrane przez Z. Józwika w sierpniu 1999 roku z grobów nr 3, 5, 6 KPL w Pawłowie.

2. Podłoża do izolacji bakterii: uniwersalne, dla promieniowców, Bunta i Rovixy, Sautona i agar odżywczy 1,4%.

METODY

Izolacja drobnoustrojów glebowych: 1 g gleby przeniesiono do kolby z 99 ml jałowej wody destylowanej. Wytrząsano na wytrząsarce 10 minut. Zawiesinę gleby sączono. Uzyskany przesącz traktowano jako podstawowe rozcieńczenie badanej próbki glebowej w stosunku 1:100 (1×10^{-2}). Z tego rozcieńczenia pobrano 1 ml zawiesiny glebowej i przenoszono do kolby z 99 ml jałowej wody destylowanej. Następnie z rozcieńczenia 1×10^{-4} pobrano 10 ml tej zawiesiny i przeniesiono do kolby z 99 ml jałowej wody destylowanej, uzyskując rozcieńczenie 1:100 000 (1×10^{-5}). Rozcieńczenia 1×10^{-5} używano do dalszych badań.

0,5 ml roztworu z 0,00001 g materiału glebowego wysiewano na płytki Petriego z pożywkami: uniwersalną, dla promieniowców, Bunta i Rovixy i Sautona.

Płytki inkubowano w temperaturach: pokojowej ($\sim 20^\circ\text{C}$) i 37°C przez 14 dni. Zliczano wyrosłe kolonie bakteryjne. Pojedyncze kolonie przenoszono na skosy agarowe. Wyizolowane szczepy przechowywano w temperaturze pokojowej w zaciemnionym miejscu.

Uzyskany materiał posłużył do przeprowadzenia dalszych badań.

TESTY RÓŻNICUJĄCE

1. Morfologia kolonii bakteryjnych

Opis morfologiczny wyizolowanych kolonii bakteryjnych pozwala rozdzielić mieszaninę bakteryjną na określone grupy, ułatwia także szybkie scharakteryzowanie mikrobiologiczne różnych typów gleb z możliwością podawania procentowego udziału określonych form morfologicznych bakterii.

Poszczególne rodzaje i gatunki bakterii tworzą kolonie odmienne pod względem wyglądu zewnętrznego, różniące się między sobą wielkością, kształtem, konsystencją i zabarwieniem. Cechy te są stałe tylko w ściśle określonych warunkach hodowlanych. Pozwala to na ustalenie wstępnej przynależności systematycznej.

Po dokonaniu obserwacji i opisanu wyglądu zewnętrznego kolonii bakteryjnych na określonych typach podłoża, wyizolowane szczepy wysiewano na skosy agarowe.

2. Wzrost na skosach agarowych

W opisie wzrostu bakterii na skosach agarowych uwzględniono:

- typ wzrostu (jednolity z brzegiem równym lub falistym, paciorkowaty, rozproszony, drzewiasty, koronkowaty),
- konsystencja (sprawdzamy za pomocą ezy),
- stopień wzrostu (brak, słaby, średni, obfity),
- wzniesienie „rysy” (niskie, wysokie),
- powierzchnia wzrostu (równa, falista, płatowata, strzępiasta),
- barwa i przejrzystość.

Dalsze badania kolonii drobnoustrojów prowadzono na podłożu płynnym: bulion i bulion z solą fizjologiczną (wpływ zasolenia na wzrost danej kolonii).

TYPY WZROSTU NA PODŁOŻU PŁYNNYM

Wyróżniamy 3 typy wzrostu na podłożu płynnym: osad na dnie próbówki, zmętnienie podłoża oraz wzrost powierzchniowy. Taki podział umożliwia klasyfikowanie bakterii z uwagi na zapotrzebowanie tlenowe:

- bezwzględne beztlenowce (osad),
- względne beztlenowce (osad + zmętnienie, zmętnienie) i
- bezwzględne tlenowce (błonka, kożuszek, nalot).

Wykonano także preparaty mikroskopowe i barwiono je metodą Grama.

3. Morfologia mikroskopowa bakterii (barwienie wg Grama)

Większość bakterii można obserwować w mikroskopie świetlnym jedynie po ich uprzednim wybarwieniu. Najczęściej stosowaną do celów diagnostycznych metodą barwienia drobnoustrojów jest metoda Grama. Wynik tego barwie-

nia pozwala zaliczyć oglądane komórki do jednej z dwóch grup bakterii: Gram-dodatnich lub Gram-ujemnych. Preparaty mikroskopowe umożliwiają ponadto określenie wielkości komórek bakteryjnych, ich kształtu oraz ugrupowań.

4. Testy biochemiczne

Testom biochemicznym poddano bakterie wykazujące się dobrym wzrostem na agarze odżywczym 1,4% po 24h inkubacji w temperaturze 37°C. Bardzo słaby wzrost pozostałych szczepów (kolonie wyrastały dopiero po kilkudniowej lub kilkunastodniowej inkubacji) uniemożliwił zbadanie ich właściwości biochemicznych.

Do testów wykorzystano system API 20 NE. System ten jest wystandaryzowaną mikrometodą zawierającą 8 testów powszechnie stosowanych i 12 testów asymilacyjnych określających zdolność adaptacji enzymatycznej. Biochemiczny szereg API składa się z 20 mikroprobówek zawierających odwodnione podłoża i substraty.

Mikroprobówki przeznaczone do testów powszechnie stosowanych napełniano zawiesiną bakterii w roztworze fizjologicznym soli, który rozpuszcza zawartość mikroprobówki. Reakcje biochemiczne zachodzące w czasie inkubacji powodują zmianę zabarwienia samoistnie, bądź po dodaniu odczynnika wskaźnikowego. Mikroprobówki przeznaczone do testów asymilacyjnych napełniano minimalną ilością pożywki. Wzrost bakterii w hodowli jest uzależniony wyłącznie od zdolności zużycia odpowiedniego substratu.

System API 20 NE jest przeznaczony do identyfikacji drobnoustrojów Gram-ujemnych nie należących do rodziny *Enterobacteriaceae* i nie wymagających podłoży wzbogaconych. Identyfikacji dokonywano w oparciu o książkę kodową.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Prace wykopaliskowe prowadzone przez pracowników Katedry Archeologii UMCS w Lublinie na cmentarzysku KPL w Pawłowie, zwróciły uwagę na możliwość pobrania próbek glebowych z tego stanowiska archeologicznego, a następnie ich analizę mikrobiologiczną, również pod kątem antagonizmu wobec saprofitycznych prątków kwasoopornych.

W niniejszej pracy przeprowadzono izolację bakterii z pięciu próbek glebowych pobranych przez Józwicka w Pawłowie z obiektów: nr 3 – dwie próbki, nr 5 – jedna próbka, nr 6 – dwie próbki, w sierpniu 1999 r.

Doświadczenia prowadzono w temperaturach 20°C i 37°C, na czterech podłożach bakteriologicznych: pożywce uniwersalnej, pożywce Bunta i Rovixy, pożywce dla promieniowców i podłożu Sautona. Trzy pierwsze są to pożywki selektywne o odczynie lekko zasadowym, który sprzyja rozwojowi bakterii glebowych. Podłoże Sautona stosowane jest do hodowli saprofitycznych prątków kwasoopornych.

Uzyskano kilkaset kolonii bakteryjnych, z których po wstępnej selekcji w oparciu o testy wzrostowe wyodrębniono 79 szczepów. Materiał ten posłużył do przeprowadzenia testów morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych.

W temperaturze 20°C wyizolowano 53 szczepy bakteryjne, pozostałe 26 w temperaturze 37°C (tab. 1). Uwzględniając

warunki temperaturowe charakterystyczne dla obszarów Polski południowo-wschodniej (gdzie średnia roczna temperatura – wg W. Wiszniewskiego – wynosi ok. 22°C) zrezygnowano z użycia do izolacji temperatury 4°C. W takiej temperaturze izolowano bakterie z gleb Spitsbergenu. Jednak optymalną temperaturą dla drobnoustrojów i z tamtego obszaru okazała się temperatura zbliżona do 20°C.

W oparciu o podział bakterii, izolowane bakterie zaliczyć można do grupy mezofili – o optymalnych temperaturach rozwoju w granicach od 20°C do 40°C.

Spśród czterech podłoży izolacyjnych najmniej drobnoustrojów izolowano na podłożu Sautona – 11 szczepów. Niemal równorzędnymi okazały się pożywki: Bunta i Rovixy – 24 szczepy, dla promieniowców – 23 szczepy i pożywka uniwersalna – 21 szczepów.

Wzrost bakterii glebowych na różnych podłożach i w różnych warunkach przedstawia tabela nr 1.

Tab. 1. Ilość izolowanych szczepów bakteryjnych na różnych typach podłoży i w różnych temperaturach

Podłoże izolacyjne	Liczba izolowanych szczepów	Temperatura izolacji	
		20°C	37°C
Pożywka Bunta i Rovixy	24	17	7
Pożywka dla promieniowców	23	14	9
Pożywka uniwersalna	21	13	8
Pożywka Sautona	11	9	2
Razem	79	53	26
		79	

Przy opisach kolonii bakteryjnych brano pod uwagę barwę, typ wzrostu, kształt, powierzchnię i przejrzystość kolonii. Kultury poszczególnych szczepów wykazują bardzo zróżnicowane zabarwienie: białe, kremowe, żółte, pomarańczowe, bordo, szare oraz odcienie tych kolorów. Niektóre z nich wytwarzają również barwniki dyfundujące do podłoża – 15 szczepów (18,99%).

Zdolność do wytwarzania barwników zabarwiających podłoże lub zawartych w komórkach bakteryjnych jest uwarunkowana genetycznie, stanowi więc cechę diagnostyczną. Barwniki posiadają zróżnicowaną budowę chemiczną. Wiele z nich to pochodne takich związków jak: karotenoidy, pirole, azochinony, antocyjany (Schlegel 1996). Według Zabłockiego (1955) na ich wytwarzanie ma wpływ pH podłoża, źródła węgla i azotu, temperatura, dostęp tlenu i światła. Barwniki zabarwiające podłoże mają zdolność przechodzenia przez błonę komórkową i są rozpuszczalne w wodzie.

W obrębie izolowanych szczepów wydzielono kolonie rosnące na powierzchni pożywki – 49 szczepów (62,03%) oraz kolonie wrastające w podłoże – 30 szczepów (37,97%), z czego 4 szczepy były wrosłe w podłoże całkowicie a 1 szczep brzegami.

Większość szczepów charakteryzowała się powierzchnią gładką i błyszczącą. Według Schlegela (1996) wiele szcze-

pów bakteryjnych świeżo wyizolowanych ze środowiska rośnie na podłożu agarowym w formie takich właśnie kolonii (formy S). Powierzchnia ich komórek zatrzymuje dużo wody wskutek obecności O-swoistych wielocukrów. Formy S mogą spontanicznie przechodzić w formy R (ang. Rough, szorstki) tworząc kolonie płaskie i szorstkie. W ścianach komórek form R – jak podaje Kunicki-Goldfinger – brak jest częściowo lub zupełnie pewnych kompleksów lipidowo-wielocukrowych. U wielu szczepów chorobotwórczych brak tego kompleksu znosi ich chorobotwórcze właściwości (cecha diagnostyczna).

Wzrost poszczególnych szczepów bakteryjnych obserwowano również na skosach agarowych, bulionie i bulionie z 7% NaCl.

Typ wzrostu drobnoustrojów w hodowlach płynnych zależy od cech gatunkowych i jest wykorzystywany do ustalenia przynależności systematycznej (W. Kunicki-Goldfinger 1998).

Na bulionie większość bakterii – 45 szczepów – rosła w postaci osadu, co świadczy o ich przynależności do bezwzględnych beztlenowców (anaerobów). Wzrost dyfuzyjny (w postaci zmętnienia) stwierdzono u 9 szczepów, a w postaci zmętnienia i osadu u 15 szczepów. Takie typy wzrostu są charakterystyczne dla bakterii, które potrzebują mniejszej zawartości tlenu do wzrostu – mikroaerofili (względnych beztlenowców). Tylko 2 szczepy wyrosły w postaci kożucha, 1 w postaci kożucha i zmętnienia i 1 w postaci błonki i zmętnienia. Taki wzrost wykazują bakterie tlenowe (aeroby), które zawierają w ścianie komórkowej więcej substancji hydrofobowych (W. Kunicki-Goldfinger 1998). Spośród 79 szczepów tylko sześć nie wyrosło na podłożu płynnym.

Bakterie są mało wrażliwe na zmiany wartości osmotycznej podłoża, co nie oznacza, że ich wzrost i czynności fizjologiczne są od tego czynnika niezależne. Większość bakterii może rosnąć tylko przy określonym ciśnieniu osmotycznym i po przekroczeniu pewnej granicy ich funkcje zostają zahamowane (W. Kunicki-Goldfinger 1998). Opierając się na zapotrzebowaniu drobnoustrojów na NaCl, można podzielić je na gatunki halofilne, rosnące dobrze przy niskich stężeniach NaCl, względne halofile wyrastające dobrze przy wyższych jego stężeniach oraz bezwzględne halofile (cyt. K. Kotelko i wsp. 1977). Dodanie NaCl do bulionu spowodowało zahamowanie wzrostu 38 szczepów. Wyrosłe w tych warunkach w postaci osadu – 29 szczepów, osadu i zmętnienia – 8 szczepów, kożucha – 1 szczep, kożucha i zmętnienia – 3 szczepy, należy wstępnie zaliczyć do umiarkowanych halofili, czyli bakterii słonolubnych.

Podjęto też próbę wstępnej charakterystyki morfologicznej wyizolowanych szczepów. W tym celu wykonano preparaty mikroskopowe barwiąc je metodą Grama. Stosując tę złożoną metodę barwienia można wyróżnić wśród bakterii dwie grupy. W pierwszym przypadku bakterie barwią się na fioletowo i nie odbarwiają się pod wpływem alkoholu. Są to bakterie Gram+. Druga grupa bakterii, która ulega odbarwieniu pod wpływem alkoholu barwi się fuksyną na kolor czer-

wony. Są to bakterie Gram-. Swoistość zabarwienia wynika z różnic w budowie ściany komórkowej tych dwóch grup bakterii, a konsekwencją odmiennej budowy osłon komórkowych są zasadnicze różnice w ich właściwościach fizjologicznych. W oparciu o tę metodę barwienia do bakterii Gram+ zaszeregowano 53 szczepy (67,09%), natomiast pozostałe 26 szczepów (32,91%) do Gram-.

Wśród badanych szczepów najliczniejsze okazały się ziarniaki (97,47%), a wśród nich 7 paciorkowców. Wyizolowano również 2 pałeczki (2,53%) (tab. 2). Ziarniaki były również dominującą grupą morfologiczną bakterii izolowanych z gleb Spitsbergenu.

Tab. 2. Formy morfologiczne wyizolowanych szczepów bakteryjnych

Forma morfologiczna	Barwienie wg Grama	Liczba izolowanych szczepów	Gram +	Gram -
Ziarniaki		70	53	17
Paciorkowce		7	–	7
Pałeczki		2	–	2
Razem		79	53	26
			79	

Antagonizm wyizolowanych bakterii wobec *Mycobacterium* 279 badano metodą Gratii (P. Frederiq 1957) na pożywkach izolacyjnych i na agarze odżywczym 1,4% – jako podłożu uniwersalnym dla wzrostu większości bakterii.

Niestety żaden z sprawdzonych w ten sposób szczepów nie produkował antybiotyków zdolnych do zahamowania wzrostu *Mycobacterium*. Antagonizmu szczepów wrastających w podłoże ze względów metodycznych nie można było zbadać metodą Gratii.

W monografii Chmiela i Grudzińskiego (1998) u szczepów dzikich w warunkach optymalnych dla wzrostu, mechanizmy regulacyjne zapewniają dominację procesów związanych ze wzrostem i rozmnażaniem komórek nad przemianami prowadzącymi do gromadzenia antybiotyków, które nie spełniają zasadniczych funkcji metabolicznych, więc ich synteza podlega najczęściej silnej represji. Derepresja następuje zwykle w warunkach ograniczenia lub zahamowania wzrostu drobnoustrojów w późnym okresie rozwoju hodowli. Poza tym wiele szczepów dzikich produkuje antybiotyki w ilościach niewielkich, czasem wręcz niewykrywalnych przy użyciu standardowych metod analitycznych.

Sama wydajność syntezy antybiotyków w dużym stopniu zależy od pH środowiska, temperatury i warunków pokarmowych. Być może więc składniki stosowanych pożywek obniżały u badanych szczepów wydajność procesów biochemicznych prowadzących do wytwarzania antybiotyków, lub też warunki w których badano antagonizm okazały się dla tych drobnoustrojów na tyle korzystne (optymalne), że procesy wzrostu i rozmnażania komórek zdominowały te, które prowadzą do syntezy antybiotyków.

Kontynuując badania nad antagonizmem izolowanych ze stanowiska archeologicznego Pawłów bakterii należałoby dobrać odpowiednie parametry, które warunkowałyby tworzenie antybiotyków.

W kolejnym etapie badań szczepy bakteryjne wykazujące się dobrym wzrostem na agarze odżywczym 1,4% poddano testom biochemicznym. Pozostałe szczepy jako materiał muzealny posłużą do kolejnych badań.

Do przeprowadzenia testów wykorzystano system API 20 NE, który w końcowym etapie umożliwia identyfikację badanych drobnoustrojów.

Spośród 29 szczepów poddanych testom biochemicznym 4 z nich udało się oznaczyć do gatunku. Są to odpowiednio: szczep 13 – *Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida*, szczep 27 – *Pasteurella haemolytica*, szczep 69 – *Brevundimonas vesicularis*, szczep 22 – *Burkholderia cepacia* lub *Burkholderia gladioli*. W przypadku szczepu nr 22 konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych testów by wykluczyć jedną z możliwości.

Założeniem niniejszej pracy, poza izolacją drobnoustrojów na wybranych podłożach, było poszukiwanie bakterii, antagonistów prątką gruźlicy, co jest zasadniczym nurtem badań w zakresie tematyki mikrobiologicznej Zakładu Fizjologii Roślin UMCS.

Możliwości pozyskiwania z terenów Polski nowych szczepów glebowych producentów antybiotyków są w zasadzie minimalne. Stąd wcześniejsze badania Józwicka na

nowym terenie jakim jest Spitsbergen, a obecnie stanowiska archeologiczne w Polsce.

Pracą tą rozpoczęto nowy cykl badań.

Wprawdzie z próbek pobranych z Pawłowa, z grobów nr: 3, 5 i 6 nie udało się uzyskać szczepów antagonistów prątką gruźlicy to jednak dzięki testom (morfologicznym, fizjologicznym i biochemicznym), którym poddano izolowane bakterie, otrzymano szereg interesujących wyników, które wzbogacą charakterystykę tego stanowiska o dane mikrobiologiczne.

WNIOSKI

1. Wśród bakterii wyizolowanych z próbek glebowych ze stanowiska archeologicznego w Pawłowie 97,47% stanowiły ziarniaki.
2. Najwięcej drobnoustrojów wyizolowano na pożywce Bunta i Rovixy (30,38%), a optymalną temperaturą izolacji była temperatura ok. 20°C.
3. W badanej mikroflorze przewagę stanowiły beztlenowce (56,96%).
4. Wśród badanych szczepów nie wykazano antagonistów prątką gruźlicy.

Poza charakterystyką mikrobiologiczną warstwy kulturowej, podjęte badania mogą również poszerzyć wyniki analizy antropologicznej odnośnie zachorowalności społeczeństwa pradziejowego.

LITERATURA

- Bargieł B., Florek M.
2000 Pierwszy sezon badań wykopaliskowych na cmentarzysku kultury pucharów lejkowatych w Pawłowie, stan. 3; woj. Świętokrzyskie, APŚ, t. 5, s. 25-32.
- Chmiel A., Grudziński S.
1998 *Biotechnologia i chemia antybiotyków*, Warszawa.
- Frédéricq P.
1957 Colicines. Ann. Rev. Microbiol. 2, 7.
- Józwick Z.
1993 Antagonism of bacteria isolated from the soils of Western Spitsbergen, Bellsund region. XX Polar Symposium. Lublin, 177-180.
1994 Isolation and antagonism of soil bacteria in the Bellsund region in Western Spitsbergen. Wyprawy geograficzne na Spitsbergen. UMCS Lublin, 157-160.
1996 Bacteria from the occupation layers of the archeological locality Renardbreen („Viking”) in Western Spitsbergen. XXIII Sympozjum Polarne, Sosnowiec, 45-49.
- 1998 Isolation and antagonism of soil bacteria from Western Spitsbergen. XXV International Polar Symposium. Warszawa, 103-111.
- Józwick Z., Flis-Bujak M., Magierski J.
1994 Microbiological and chemical characterization of culture layers of the archeological stand Renardbreen („Viking”) in the Bellsund region of Western Spitsbergen. Wyprawy geograficzne na Spitsbergen. UMCS Lublin, 169-177.
- Kotełko K., Sedlaczek L., Lachowicz T.M.
1977 *Biologia bakterii*, Warszawa.
- Kunicki-Goldfinger W.
1998 *Życie bakterii*, Warszawa.
- Zabłocki B.
1955 *Podstawy chemii bakteryjnej*, Warszawa.

ZBIGNIEW JÓZWIK, MONIKA KNAZIAK

SOIL BACTERIA OF AN ARCHEOLOGICAL STUDY PLACE AT PAWLÓW

Seventy-nine bacterial strains were isolated in a place of archaeological studies at Pawłów dating back to the year 3.500 B. C. (Funnel Beaker culture).

On the basis of morphological and physiological tests 70 strains were classified into cocci, 7 strains into streptococci, and the others into bacilli. Fifty – three strains were Gram- positive, and

26 strains – Gram-negative. The most numerous microorganisms were isolated at 20°C in Bunta and Rovixy medium.

Anaerobes predominated in the studied microflora.

No antagonists of tuberulous bacilli were found among the studied strains.

Translated by Józef Wawrzyszek

Zakład Fizjologii Roślin UMCS w Lublinie