

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

Biotechnology

8(2) 2009



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Rada Programowa *Acta Scientiarum Polonorum*

Kazimierz Banasik (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn),
Florian Gambuś (Kraków), Franciszek Kluza (Lublin), Edward Niedźwiecki (Szczecin),
Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Jerzy Sobota (Wrocław) – przewodniczący,
Stanisław Socha (Siedlce), Waldemar Uchman (Poznań)

Rada Naukowa serii *Biotechnologia*

Danuta Witkowska (Wrocław) – przewodnicząca, Włodzimierz Bednarski (Olsztyn),
Włodzimierz Grajek (Poznań), Anna Maraz (Budapeszt, Węgry),
Zdzisław Targoński (Lublin), Vesna Zechner-Krpan (Zagrzeb, Chorwacja)

Korekta:
mgr Elżbieta Winiarska-Grabosz
Janina Szydłowska

Łamanie
Halina Sebzda

Projekt okładki
Daniel Morzyński

ISSN 1644-065X

*Wydanie publikacji dofinansowane ze środków Uniwersytetu Przyrodniczego
we Wrocławiu*

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,
Wrocław 2009

Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki
ul. Sopocka 23, 50-344 Wrocław, tel./fax 71 328-12-77
e-mail: wyd@up.wroc.pl <http://www.up.wroc.pl>

Nakład 200 + 16 egz. Ark. wyd. 3,4 Ark. druk. 3,0
Druk i oprawa: EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka Jawna
ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek

AKTYWNOŚĆ KERATYNOLITYCZNA ORAZ TWORZENIE BIOFILMU PRZEZ MONOKULTURY I KULTURY MIESZANE BAKTERII I DROŹDŹY

Grzegorz Szczepaniak, Anna Rodziewicz, Katarzyna Baranowska
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. W badaniach wykorzystano 3 szczepy bakterii: *Bacillus subtilis* B3, *B. cereus* B7c, *Flavobacterium multivorum* P1 oraz jeden szczep należący do drożdży *Geotrichum candidum* PH1. Obserwacje mikroskopowe wykazały, iż wszystkie badane szczepy zarówno w monokulturach, jak i w hodowlach skojarzonych wykazywały tendencję do adhezji na powierzchni szkła, a następnie tworzyły biofilm. Ponadto, w podłożu zawierającym pióra kurze jako źródło C i N, syntetyzowały i wydzielały pozakomórkowe keratynazy, których najwyższe aktywności oznaczono w hodowli *B. cereus* B7c (21,7 J.K.) oraz *F. multivorum* P1 (18,25 J.K.). Hodowle mieszane bakterii *B. cereus* x *F. multivorum* i bakteryjno-drożdzowe *B. cereus* x *G. candidum*, podobnie jak monokultura drożdży *G. candidum* PH1 charakteryzowały się niższą aktywnością keratynaz, wynoszącą 13 jednostek.

Słowa kluczowe: biofilm, adhezja, keratynazy, kultury mieszane

WSTĘP

Wśród mikroorganizmów wykazujących zdolność do degradacji keratyny piór, oprócz bakterii z rodzajów *Bacillus* i *Micrococcus*, wyróżnić można drożdże *Geotrichum* sp. i *Rhodotorula* sp., jak i grzyby strzępkowe: *Mucor* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. i inne [Rodziewicz i Łaba 2005]. Większość syntetyzowanych przez te drobnoustroje keratynaz to enzymy indukcyjne, wykazujące specyficzność gatunkową w zakresie mechanizmu działania oraz optymalnego pH i temperatury [Gupta i Ramnani 2006]. Wykazano, że podczas hodowli w środowisku, w którym keratyna jest jedynym źródłem węgla i azotu, keratynolizę poprzedza zjawisko adhezji komórek do powierzchni piór. Ponadto, nadmiar węgla w stosunku do azotu (C:N 3,4:1) spowalnia wzrost drobnoustrojów i powoduje, że nadwyżka zasymilowanego węgla, nie zużyta na budowę składników cytozolu lub w procesach oddechowych, zostaje przekształcona w pozakomórkową macierz (EPS) [Sutherland 2001]. Za agregację bakterii, prowadzącą w konsekwencji do uformowania

Adres do korespondencji – Corresponding author: Grzegorz Szczepaniak, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław, e-mail: grzegorz.szczepaniak@up.wroc.pl

licznych mikrokolonii tworzących błonę biologiczną, odpowiedzialny jest m.in. system quorum-sensing. Mechanizm ten umożliwia pełniejsze wykorzystanie potencjału genetycznego mikroorganizmów, poprzez wydzielanie induktorów ekspresji genów charakterystycznych tylko dla osiadłych form komórkowych. Zdaniem Baj i Markiewicz [2006] taka zmiana fenotypu zależy głównie od charakteru kolonizowanej powierzchni.

Bakterie z rodzaju *Bacillus* to jedna z najczęściej wykorzystywanych w przemyśle grup mikroorganizmów. Degradacja takich biopolimerów jak np.: keratyn, kolagenu, elastyny czy skrobi, poprzez sekrecję odpowiednich egzoenzymów, a także biosynteza antybiotyków, insektycydów to tylko niektóre przykłady świadczące o ich biotechnologicznej przydatności. Wielu badaczy sugeruje, iż rozkład odpadów keratynowych przy udziale *Bacillus licheniformis* może być ekologiczną i tanią metodą recyklingu tego uciążliwego materiału organicznego, przy jednoczesnym uzyskaniu wysokoazotowych nawozów czy materiału opałowego [Burt i Ichida 1999].

Doskonalenie procesu rozkładu keratyny przez drobnoustrojowe enzymy polega nie tylko na optymalizacji warunków ich uzyskiwania, ale także na poszukiwaniu nowych źródeł keratynaz wśród innych mikroorganizmów glebowych lub też izolowanych bezpośrednio z surowców keratynowych. W ten sposób w kręgu zainteresowania badaczy znalazły się bakterie z gatunku *Flavobacterium multivorum* oraz drożdże *Geotrichum candidum*. Badania procesu keratynolizy w warunkach tworzenia biofilmu, z udziałem monokultur zarówno bakterii, drożdży, jak i grzybów strzępkowych pozwalają określić aktywność produkowanych przez nie keratynaz oraz ich udział w biodegradacji keratyny. Jednak w przyrodzie rzadko spotykane są monogatunkowe błony biologiczne. Warstwowa budowa biofilmu generująca gradienty chemiczne umożliwia koegzystencję różnych rodzajów drobnoustrojów i tworzenie multigatunkowych, współpracujących ze sobą zespołów mikroorganizmów.

Celem pracy była ocena zdolności formowania biofilmu przez pojedyncze i mieszane kultury drożdży *Geotrichum candidum* i bakterii: *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, a także *Flavobacterium multivorum* na powierzchni szkła oraz piór kurzych. Ponadto w pracy oceniano potencjalny synergizm w rozkładzie keratyny przez mieszane kultury ww. drożdży i bakterii w warunkach tworzenia biofilmu na powierzchni degradowanych piór.

MATERIAŁ I METODY

Mikroorganizmy. Materiał badawczy stanowiły 4 szczepy mikroorganizmów, w tym trzy zaliczone do bakterii: *Bacillus subtilis* B3 (izolat pochodzący z gleby), *B. cereus* B7c (izolat z odpadów keratynowych), *Flavobacterium multivorum* P1 (izolat pochodzący z gleby) oraz jeden szczep drożdży – *Geotrichum candidum* PH1 (izolat z odpadów keratynowych). Wszystkie badane szczepy znajdują się w kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Bakterie przechowywane są w temperaturze 4°C, na skosach bulionowych, natomiast drożdże na skosach YM.

Interakcje drożdży i bakterii badano metodą płytkową na podłożach stałych: 1) YM ($\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$): glukoza 20, bactopecton 5, ekstrakt drożdżowy 3, ekstrakt słodu 3, agar 20; 2) BG ($\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$): glukoza 10, bulion odżywczy 8, agar 20. Wzajemne interakcje określono pomiędzy: A) *G. candidum* PH1 a *B. subtilis* B3; B) *G. candidum* PH1 a *B. ce-*

reus B7c C) *G. candidum* PH1 a *F. multivorum* P1. Na pierwszym etapie wykonano posiew powierzchniowy pojedynczych szczepów: drożdży na podłoże YM, bakterie na podłoże BG. Płytki inkubowano przez 24 h w temperaturze 30°C aż do uzyskania jednolitej murawy. Następnie z obu płytek sterylnie wycięto korkoborem słupki o średnicy 1 cm i przeniesiono na płytkę z jałowym podłożem BG. Płytki inkubowano przez 3 doby w temperaturze 30°C. Wzrost szczepów i wzajemne interakcje oceniano makroskopowo w celu wyboru par mikroorganizmów nie wykazujących antagonizmów.

Hodowle bakterii i drożdży w monokulturach i kulturach mieszanych prowadzono w trzech różnych podłożach w kolbach Erlenmayera o pojemności 0,25 dm³. Dodatkową powierzchnię adhezji stanowiły umieszczone w każdej kolbie dwie płytki szklane o łącznej powierzchni 4 cm². Stosowano podłoża: 1) YM; 2) SG (g·dm⁻³): glukoza 20; K₂HPO₄ 5,2; KH₂PO₄ 3,18; (NH₄)₂SO₄ 0,6; CaCl₂ 0,5; ekstrakt drożdżowy 0,5; MgSO₄ · 7H₂O 0,3; 3) LB (g·dm⁻³): hydrolizat kazeiny 10; NaCl 10; ekstrakt drożdży 5; pH – 7,5. Równolegle prowadzono dwu- i pięciodobowe hodowle przy wstrząsaniu 168 obr./min w temperaturze 28°C. Po zakończeniu każdej z hodowli przemywano płytki sterylną wodą destylowaną w celu usunięcia niezwiązanych komórek. Następnie w mikroskopie świetlnym obserwowano powstałe struktury błon biologicznych przy 625-krotnym powiększeniu. Uzyskane obrazy dokumentowano przy użyciu aparatu typ Kodak EasyShare CX6330 oraz kamery CCD CAMERA z wykorzystaniem programu komputerowego USB AV CAPTURE.

Ocena zdolności bakterii i drożdży do biodegradacji keratyny piór drobiowych.

Prowadzono hodowle wglębne pojedynczych i mieszanych kultur bakterii oraz drożdży w kolbach o pojemności 0,5 dm³, zawierających 0,1 dm³ podłoża SP o składzie identycznym jak ww. podłoże SG z wyjątkiem glukozy, którą zastąpiono jednym procentem (m/v) piór drobiowych stanowiących jedyne źródło węgla i azotu. Kolby wstrząsano w temperaturze 28°C przez 8 dób. Próby płynu pohodowlanego pobierano co 24 godziny, wirowano w temperaturze +4°C, a następnie w otrzymanych supernatantach oznaczano wskaźniki keratynolizy: 1) **aktywność keratynolityczną (AK)** w temperaturze 40°C, w czasie 20 min i w pH 7,5 wobec keratyny rozpuszczalnej 2 mg/ml przygotowanej według Wawrzekiewicz i in. [1987]. Jednostkę aktywności (AK) definiowano jako przyrost absorbancji (A_{280}) o 0,01 w przeliczeniu na 1 cm³ płynu pohodowlanego na 1 min; 2) **aktywność proteolityczną** wobec 2% substratu kazeiny w temperaturze 30°C, w czasie 20 min i w pH 7,5. Jednostkę aktywności definiowano jako wzrost absorbancji (A_{280}) o 0,01 w przeliczeniu na 1 cm³ płynu pohodowlanego na 1 minutę [Łaba i Rodziewicz 2004]; 3) **uwalnianie aminokwasy** na podstawie przyrostu wolnych grup aminowych w płynie hodowlanym metodą z użyciem kwasu trójnitrobenzenosulfonowego (TNBS) [Snyder i Sobociński 1975]; 4) **obecność związków sulfhydrylowych** oznaczano kolorymetrycznie metodą Ellmana za pomocą DTNB (kwasu 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoesowego) z cystaminą [Riener i in. 2002]. Biofilmy tworzone przez bakterie na powierzchni piór badano metodą mikroskopii świetlnej przy powiększeniu 625-krotnym.

WYNIKI I OMÓWIENIE

1. Wzajemne interakcje drobnoustrojów w kulturach mieszanych

Podstawą dwuorganizmowych hodowli drobnoustrojów są pozytywne interakcje pomiędzy poszczególnymi szczepami. Przeprowadzono 3 dwuorganizmowe hodowle na podłożu stałym, a mianowicie: 1) *G. candidum* PH1 i *B. subtilis* B3; 2) *G. candidum* PH1 i *B. cereus* B7e; 3) *G. candidum* PH1 i *F. multivorum*. Makroskopowa ocena wzrostu i stref jego inhibicji pomiędzy koloniami bakterii i drożdży wykazała jedynie konkurencję o przestrzeń i składniki pokarmowe w przypadku hodowli numer 1 i 2 (fot. 1A i B). Hamowanie wzrostu bakterii *F. multivorum* P1 przez drożdże z *G. candidum* PH1 zdefiniowano jako antybiozę (fot. 1C). Zatem badania interakcji pomiędzy wybranymi szczepami drożdży i bakterii nie wykluczyły żadnej pary z dalszych badań w hodowlach mieszanych.



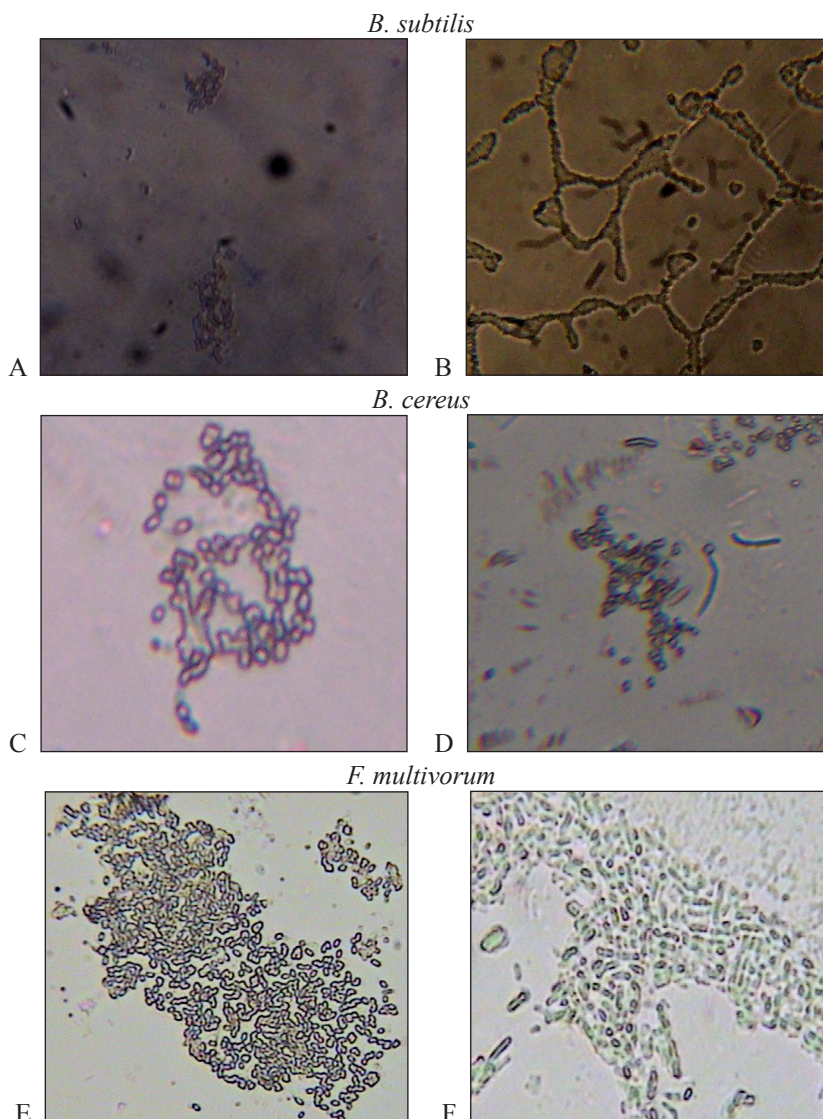
Fot. 1. Wzajemne interakcje drożdży i bakterii na podłożu stałym: A) *G. candidum* PH1 (górze)/*B. subtilis* B3 (dół); B) *G. candidum* PH1 (górze)/*F. multivorum* P1 (dół); C) *G. candidum* PH1 (górze)/*B. cereus* B7e (dół)

Phot. 1. Interaction tests between yeasts and bacteria on Petri plates: A) *G. candidum* PH1 (top)/*B. subtilis* B3 (bottom); B) *G. candidum* PH1 (top)/*F. multivorum* P1 (bottom); C) *G. candidum* PH1 (top)/*B. cereus* B7e (bottom)

2. Tworzenie biofilmów przez pojedyncze oraz mieszane kultury drożdży i bakterii

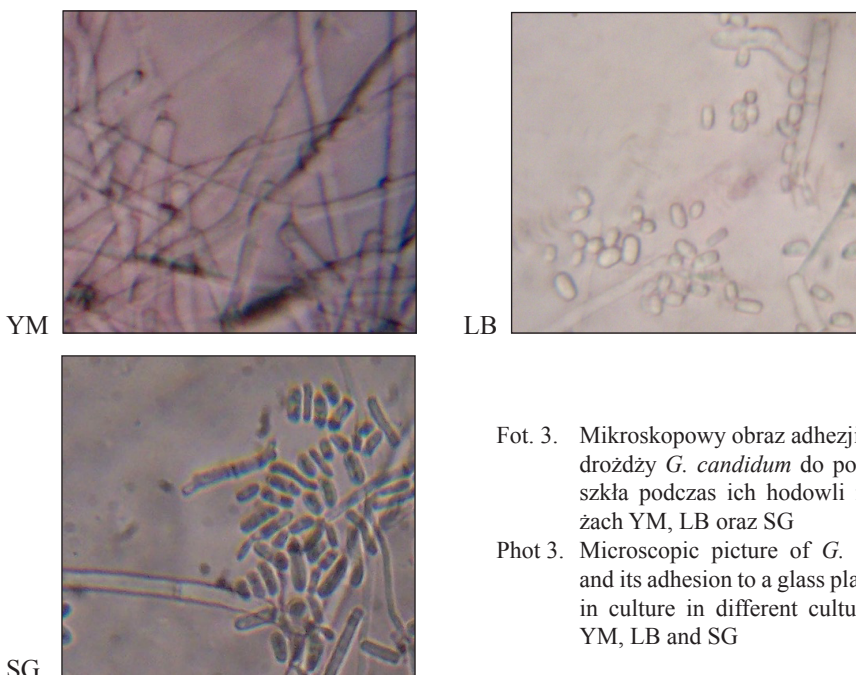
Zdolność adhezji komórek do powierzchni stałych jest jednym z początkowych, a zarazem kluczowych etapów formowania biowarstwy. Mechanizm ten zależy ściśle od rodzaju powierzchni, jak i czynników środowiskowych. Obserwacje mikroskopowe powierzchni płytek szklanych dowiodły, iż na intensywność tworzenia aglomeratów komórkowych duży wpływ wywiera rodzaj stosowanego medium hodowlanego. Ponadto, skład podłoża prawdopodobnie indukował również zmiany w morfologii komórek bakterii i drożdży. Bakterie *B. subtilis* B3 w podłożu YM charakteryzowały się bardzo słabym wzrostem. Prawdopodobnie, brak sprzyjających warunków wzrostu skutkowało wyższą adhezją do powierzchni szkła już w drugiej dobie hodowli (fot. 2A). Intensywniejszy wzrost szczepu *B. subtilis* B3 zaobserwowano na podłożu syntetycznym z glukozą (SG), gdzie uformowały się mniej upakowane aglomeraty komórkowe po pięciu dobach trwania hodowli (fot. 2B). W przypadku bakterii *B. cereus* B7c zarówno podłoża YM, jak i SG zapewniało podobny poziom wzrostu komórek oraz zbliżony stopień adhezji (fot. 2C i 2D). Bakterie *F. multivorum* P1 również ulegały adhezji do powierzchni abiotycznej,

tworząc mniej (podłoże LB) lub bardziej zbite skupiska komórek (podłoże YM) (fot. 2E i 2F). Obserwacje powierzchni płytek szklanych pochodzących z hodowli drożdży *G. candidum* PH1 wykazały znacznie większe różnice w morfologii komórek, a także w stopniu ich upakowania i adhezji, w zależności od stosowanego medium. Podłoża SG oraz LB wyraźnie sprzyjały formowaniu cylindrycznych artrospor, natomiast YM – długich i septowanych strzępek (fot. 3).



Fot. 2. Mikroskopowy obraz adhezji komórek bakterii do powierzchni szkła: A, C, E – podłoże YM; B, D – podłoże SG, F – podłoże LB

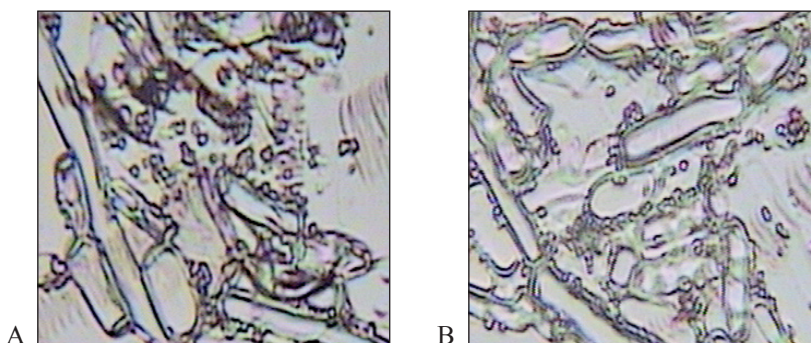
Phot. 2. Microscopic pictures of bacterial adhesion to a glass plate surface: A, C, E – YM culture medium; B, D – SG culture medium; F – LB culture medium



Fot. 3. Mikroskopowy obraz adhezji komórek drożdży *G. candidum* do powierzchni szkła podczas ich hodowli na podłożach YM, LB oraz SG

Phot 3. Microscopic picture of *G. candidum* and its adhesion to a glass plate surface in culture in different culture media: YM, LB and SG

W przypadku hodowli mieszanych: *B. subtilis* B3 z *G. candidum* PH1 oraz *B. cereus* B7e z *G. candidum* PH1, nie zaobserwowano wspólnej adhezji drobnoustrojów do powierzchni szklanych płytek. Natomiast skojarzone kultury bakterii *F. multivorum* P1 i drożdży *G. candidum* PH1 wykazywały nie tylko zdolność do koegzystencji, ale i do wspólnego formowania błony biologicznej (fot. 4A i 4B). Komórki drożdży, jak i bakterii otoczone egzopolisacharydową macierzą uległy wyraźnemu skróceniu i pogrubieniu w porównaniu do form planktonicznych.



Fot. 4. Mikroskopowy obraz adhezji komórek drożdży *G. candidum* i bakterii *F. multivorum* do powierzchni szkła w hodowli mieszanej na podłożach: A – YM, B – LB

Phot. 4. Microscopic picture of *G. candidum* and *F. multivorum* and their adhesion to a glass plate surface in mixed culture in different culture media: A – YM, B – LB

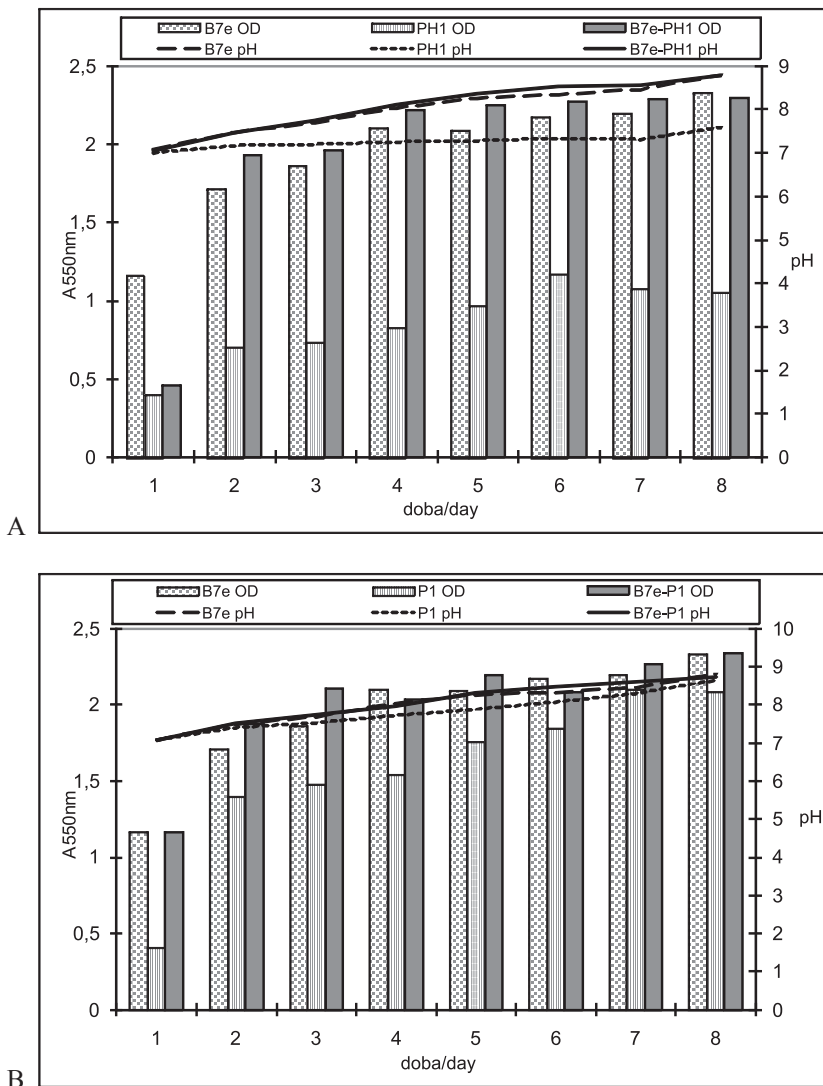
3. Biodegradacja keratyny piór drobiowych

Większość badań biodegradacji piór kurzych prowadzona była z udziałem pojedynczych szczepów bakterii lub grzybów strzępkowych i w mniejszym stopniu drożdży [Ichida i in. 2001, Kim i in. 2001, Rodziewicz i Łaba 2006]. W badaniach własnych stosowano mieszane kultury bakterii oraz bakterii z drożdżami *Geotrichum*. Kontakt komórek mikroorganizmów z keratyną mógł się odbywać w wyniku adhezji, a ta z kolei wymagała odpowiednich warunków hodowlanych. Wybór podłoża syntetycznego, w którym źródło węgla i azotu stanowił dodatek keratyny piór, był efektem wcześniejszych badań, prowadzonych przez Rajak i in. [1991] oraz Kaul i Sumbali [1999]. Degradację keratyny przez monokultury (*B. cereus* B7e z *G. candidum* PH1, *F. multivorum* P1) jak i kultury mieszane (*B. cereus* B7e – *G. candidum* PH1 oraz *F. multivorum* P1 – *G. candidum* PH1) oceniano na podstawie kilku parametrów kontrolnych: wzrostu mikroorganizmów i zmian odczynu środowiska (rys. 1A i B), a także przyrostu grup tiolowych i aminowych aminokwasów w płynie pohodowlanym (rys. 2A i B). Ponadto, oznaczano poziom białek rozpuszczalnych i aktywności enzymów proteolitycznych oraz keratynolitycznych wydzielonych do środowiska hodowlanego (rys. 3 i 4).

Najwyższe aktywności proteolityczne wykazane w monokulturach *G. candidum* PH1, *B. cereus* B7e i *F. multivorum* P1 na syntetycznym podłożu z keratyną piór wynosiły odpowiednio 62,25 JP (w 1 dobie), 82 JP (w 3 dobie) oraz 39,75 JP (w 7 dobie). W hodowlach mieszanych poziom proteolizy był wyrównany. Najwyższą wartość 47 JP osiągnął on w pierwszej dobie dla hodowli *B. cereus* i *F. multivorum* oraz w drugiej dobie dla hodowli *B. cereus* i *G. candidum* (rys. 4A). W miarę upływu czasu – aktywności te obniżały się (z wyjątkiem pojedynczej hodowli *F. multivorum* P1). Zależność tę również zauważyła w swoich badaniach Kornilowicz [1995], która za główną przyczynę inhibicji aktywności proteolitycznej uznała nagromadzenie produktów rozkładu keratyny.

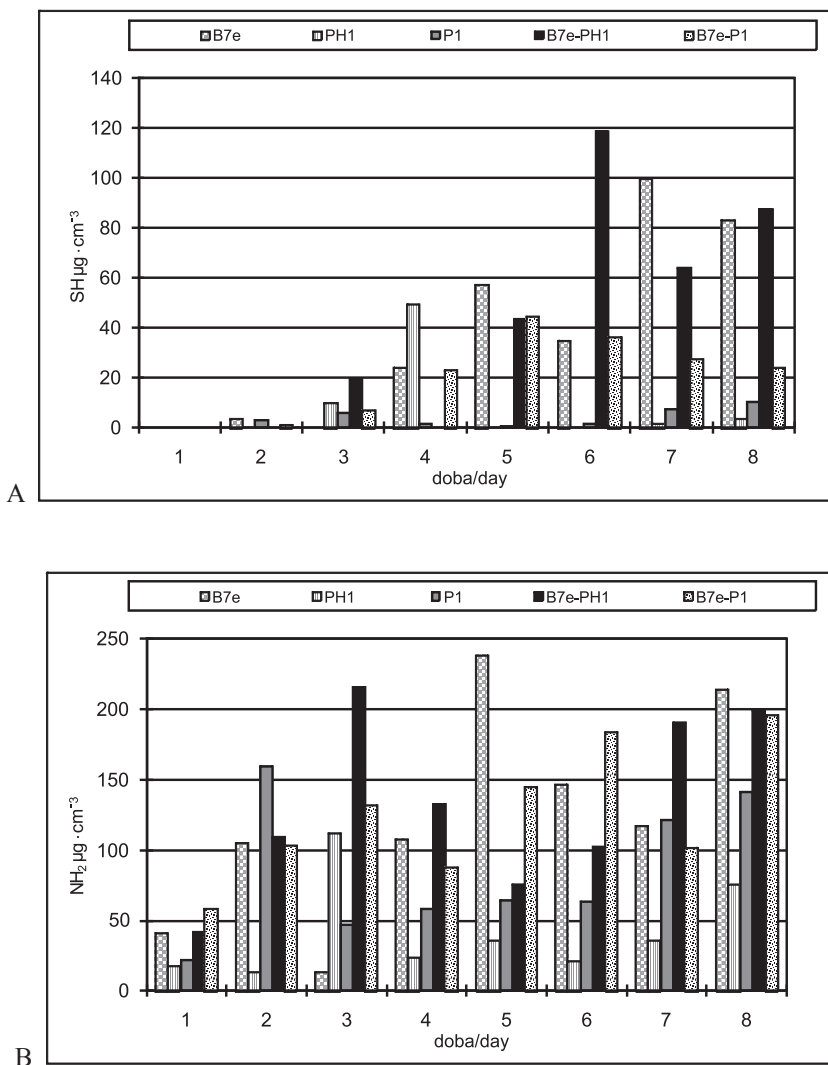
Ogólnie, najwyższą aktywnością charakteryzowały się enzymy proteolityczne syntetyzowane przez bakterie *B. cereus* B7e – 82 JP w 3 dobie hodowli. Odczyn środowiska w tym czasie oscylował w granicach pH 7,5–8,0. Badania Rodziewicz i Łaby [2006] wskazują, że jest to optymalny odczyn dla enzymów proteolitycznych wydzielanych przez bakterie *B. cereus*. Enzymy proteolityczne w płynie pohodowlanym uzyskanym z pojedynczej hodowli drożdży *G. candidum* PH1 już w pierwszej dobie wykazywały wysoką aktywność (62,25 JP). Maksymalne aktywności proteolityczne oznaczone w hodowlach mieszanych (*B. cereus* B7e i *G. candidum* PH1) okazały się niższe. Widoczny jest zatem negatywny wpływ drożdży na zdolności proteolityczne bakterii (rys. 4A). Po asymilacji łatwiej dostępnych źródeł węgla i azotu we wszystkich hodowlach wyraźnie podwyższało się stężenie wskaźników postępującej keratynolizy. Na pierwszym etapie zgodnie z mechanizmem keratynolizy doszło do deaminacji uwolnionych aminokwasów, co wpłynęło na podniesienie odczynu środowiska [Kornilowicz 1995]. W pierwszych dobach hodowli najwyższe stężenie grup aminowych oznaczono w płynie pohodowlanym mieszanej kultury *G. candidum* PH1 x *B. cereus* B7e ($215 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), co w porównaniu z monokulturami było wyższe i sugeruje współdziałanie keratynaz obu szczepów (rys. 2B). W ostatniej, tj. ósmej dobie najwyższe stężenie grup NH_2 zanotowano jednak dla hodowli pojedynczej kultury *B. cereus* B7e. Kolejna faza degradacji keratyny to sulfitoliza, polegająca na denaturacji substratu przez usuwanie mostków dwusiarczkowych [Onifade i in. 1997]. Produktami sulfitolizy były m.in. grupy sulfhydrylowe, których najwyższe stężenie oznaczono w skojarzonych kulturach *G. candidum* PH1 x *B. cereus* B7e

($118 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) (rys. 2A). Najniższe stężenia grup SH pod koniec ósmiodobowej hodowli oznaczono w pojedynczych hodowlach bakterii *F. multivorum* P1 i drożdży *G. candidum* (rys. 2A). W wyniku dalszej proteolizy nastąpiło przekształcenie częściowo zdegradowanej keratyny do rozpuszczalnych produktów, czego potwierdzeniem było rosnące stężenie białka w płynach pochodzących z wszystkich hodowli zarówno pojedynczych, jak i mieszanych (rys. 3).



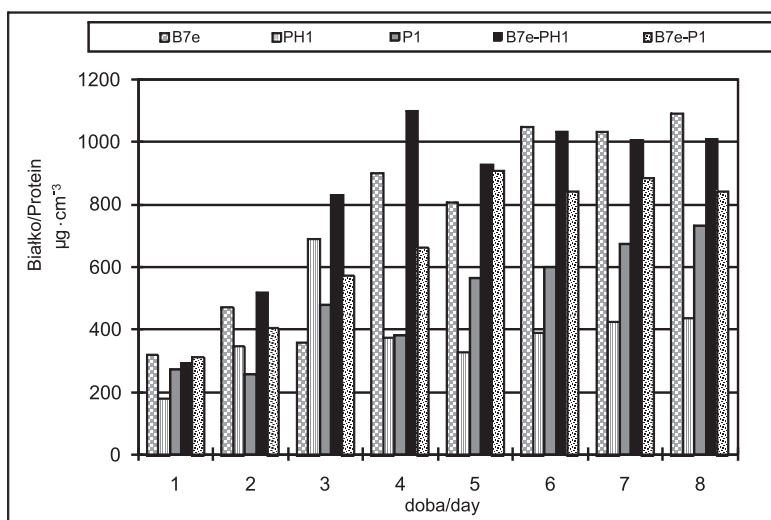
Rys. 1. Wzrost bakterii i drożdży (OD) oraz zmiany odczynu płynów pochodzących w procesie biodegradacji piór kurzych przez pojedyncze i mieszane kultury: A – *B. cereus* B7e i *G. candidum* PH1; B – *B. cereus* B7e i *F. multivorum* P1

Fig. 1. Bacterial and yeast growth (OD) and changes in pH of culture medium during the biodegradation of chicken feathers keratin by single and mixed cultures: A – *B. cereus* B7e i *G. candidum* PH1; B – *B. cereus* B7e i *F. multivorum* P1



Rys. 2. Wydzielanie grup sulfhydrylowych i aminowych przez pojedyncze i mieszane kultury drożdży i bakterii w procesie biodegradacji piór kurzych: A – grupy SH; B – grupy NH_2

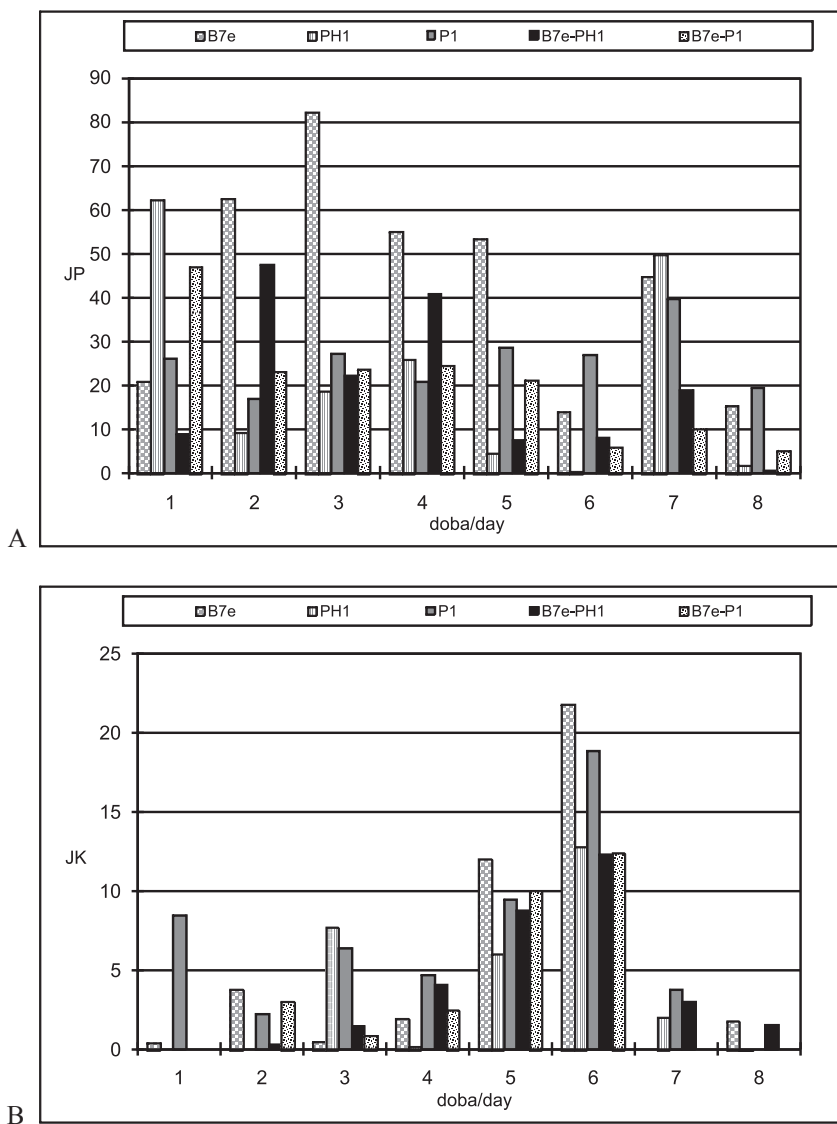
Fig. 2. SH and NH_2 groups released during the biodegradation of chicken feathers keratin by single and mixed cultures of yeasts and bacteria: A – SH groups; B – NH_2 groups



Rys. 3. Poziom białek rozpuszczalnych w płynach pochodzących pojedynczych i mieszanych kultur drożdży i bakterii

Fig. 3. Amount of soluble protein in culture media of single and mixed cultures of yeasts and bacteria

Aktywność keratynaz wyrażona w jednostkach JK jednoznacznie określiła, które mikroorganizmy mogą być stosowane do degradacji keratyny piór. Przeprowadzone badania wykazały, że szczep *B. cereus* B7e najwyższą aktywność uzyskał w szóstej dobie, osiągając aktywność 21,7 JK (rys. 4B), przy odczynie środowiska wynoszącym pH 8,3 (rys. 1A i B). Jednocześnie była to najwyższa aktywność keratynolityczna uzyskana w badaniach. Maksymalną aktywność keratynaz wydzielanych pozakomórkowo przez bakterie *F. multivorum* P1 oraz drożdże *G. candidum* PH1 oznaczono również w szóstej dobie hodowli, kiedy wynosiły one odpowiednio 18,25 JK i 12,75 JK (rys. 4B). Na uwagę zasługuje jednak fakt, iż enzymy syntezowane przez drożdże osiągnęły wysoką aktywność już w trzeciej dobie hodowli. Wydzielane były więc wcześniej niż bakteryjne. Brak podobnej aktywności w trzeciej dobie hodowli mieszanych kultur *G. candidum* PH1 x *B. cereus* B7c sugeruje inhibicyjne oddziaływanie bakterii na komórki drożdży, prawdopodobnie wywołane konkurencją o łatwo przyswajalne składniki podłoża oraz czynniki wzrostowe. Mieszane hodowle drobnoustrojów *B. cereus* B7c x *F. multivorum* P1, jak i *B. cereus* B7c x *G. candidum* PH1 nie sprzyjały zwiększonej syntezie pozakomórkowych keratynaz, których najwyższa aktywność (uzyskana także w 6. dobie) ustaliła się na poziomie 12 JK (rys. 4B). Jednak przyrosty stężenia rozpuszczalnych produktów deaminacji i sulfitolizy były wyższe niż w pojedynczych hodowlach *F. multivorum* P1 i *G. candidum* PH1.

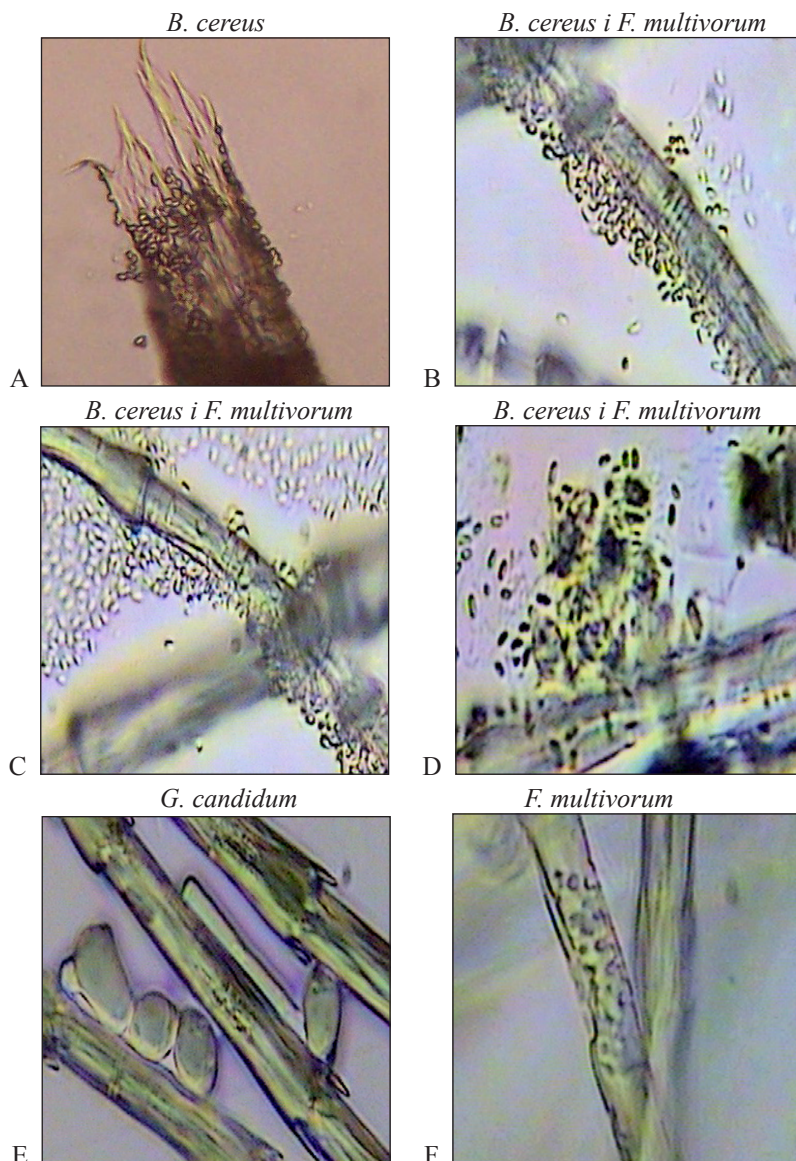


Rys. 4. Biosynteza proteaz (A) i keratynaz (B) przez badane mikroorganizmy w monokulturach i kulturach mieszanych

Fig. 4. Biosynthesis of proteolytic (A) and keratinolytic (B) enzymes by single and mixed cultures of yeasts and bacteria

Częściowo zdegradowane pióra, które nie uległy jeszcze całkowitemu upłynięciu podczas ośmiodobowej hodowli, obserwowano pod mikroskopem świetlnym. Rejestracja obrazu mikroskopowego w postaci fotografii ukazuje wysoki stopień adhezji bakterii na powierzchni piór oraz zaawansowany proces formowania biofilmu. Najbardziej zaawansowane, trójwymiarowe biofilmy obserwowano w hodowli mieszanych kultur bakterii *B. cereus* B7e i *F. multivorum* P1 (fot. 5B, C, D). Komórki bakterii niemal z każdej stro-

ny otaczały promień pióra, tworząc grubą biowarstwę EPS. Znacznie mniej rozwinięty biofilm zaobserwowano w przypadku monokultury *B. cereus* B7e (fot. 5A). Monokultury drożdży *G. candidum* PH1 (fot. 5E) i bakterii *F. multivorum* P1 (fot. 5F) oraz hodowle skojarzone tych szczepów (brak zdjęcia) wykazały również mniej rozwinięte struktury biofilmu na badanych powierzchniach biologicznych w postaci piór kurzych.



Fot. 5. Mikroskopowy obraz biofilmów uformowanych na powierzchni piór kurzych przez komórki drożdży i bakterii w hodowlach pojedynczych i mieszanych
 Phot. 5. Microscopic picture of yeast and bacterial biofilms formed on the surface of poultry feather rachis in single and mixed cultures

PODSUMOWANIE

Bakterie z rodzajów *Bacillus* i *Flavobacterium* oraz drożdże *Geotrichum* tworzyły biofilm na powierzchni piór w monokulturach i kulturach mieszanych w podłożu syntetycznym. Wydzielały one pozakomórkowe enzymy keratynolityczne, które degradowały keratynę piór, będącą źródłem węgla i azotu. Najwyższą aktywnością charakteryzowały się keratynazy bakterii: *B. cereus* B7e oraz *F. multivorum* P1. W skojarzonych hodowlach *G. candidum* PH1 i *B. cereus* B7e oraz *F. multivorum* P1 z *B. cereus* B7e aktywność keratynaz degradujących pióra była niższa. Zatem, próba zwiększenia wydajności procesu keratynolizy w warunkach tworzenia biofilmu, przez zastosowanie mieszanych kultur drożdży i bakterii, nie wykazała synergistycznych oddziaływań pomiędzy zastosowanymi szczepami. Dalsze badania winny obejmować zróżnicowaną grupę drobnoustrojów i zmierzać w kierunku optymalizacji warunków biodegradacji.

Wszystkie badane szczepy bakterii oraz drożdże *Geotrichum* tworzyły na powierzchni szkła oraz na powierzchni piór błonę biologiczną. Dwugatunkowy (bakteryjno-drożdzowy) biofilm na powierzchni szkła zaobserwowano jedynie w hodowli mieszanej *F. multivorum* P1 i *G. candidum* PH1. Na powierzchni piór – najbardziej rozbudowany biofilm formowały skojarzone gatunki *B. cereus* B7e i *F. multivorum* P1. Badania wykazały zmienność morfologiczną mikroorganizmów w warunkach tworzenia biofilmu.

PIŚMIENNICTWO

- Baj J., Markiewicz Z., 2006. *Biologia molekularna bakterii*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- Burt E.H., Ichida J.M., 1999. Occurrence of feather-degrading Bacilli in the plumage of birds. *The Auk*, 116, 364–372.
- Gupta R., Ramnani P., 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 21–33.
- Ichida J., Krizova L., LeFevre A., Kenner H., Elwell D., Burt E., 2001. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *J. of Microbiol. Methods*, vol. 47, 199–208.
- Kaul S., Sumbali G., 1999. Production of extracellular keratinases by keratinophilic fungal species inhabiting feathers of living poultry birds (*Gallus domesticus*): A comparison. *Mycopathologia*, vol. 146, 19–24.
- Kim J.M., Lim W.J., Suh H.J., 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochemistry*, vol. 37, 287–291.
- Korniłowicz T., 1991–1992. Badania nad mikroflorą zasiedlającą surowe odpady keratynowe w glebie. *Acta Mycologia*, vol. 27(2), 231–245.
- Łaba W., Rodziewicz A., 2004. Biodegradacja odpadów keratynowych z przemysłu drobiowego przy udziale bakterii z rodzajów *Bacillus* i *Sarcina*. *Acta Scientiarum Polonorum: Biotechnologia*, 3 (1–2), 109–120.
- Onifade A.A., Al-Sane N.A., Al-Musallam A.A., Al-Zarban S., 1998. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology*, vol. 66, 1–11.
- Rajak R.C., Parwekar S., Malviya H., Hasija S.K., 1991. Keratin degradation by fungi isolated from the grounds of a gelatin factory in Jabalpur, India. *Mycopathologia*, vol. 114, 83–87.

- Riener Ch.K., Kada G., Gruber H.J., 2002. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem.*, vol. 373, 266–276.
- Rodziewicz A., Łaba W., 2005. Biological degradation of feather keratin by saprophytic bacteria. *Polish Journal of Chemical Technology*, 7 (2), 46–49.
- Rodziewicz A., Łaba W., 2006. Keratyny i ich biodegradacja, *Biotechnologia*, 2.
- Snyder S.L., Sobociński P.Z., 1975. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic amid method for the determination of Amines. *Analytical Biochemistry*, vol. 64, 284–288.
- Sutherland I.W., 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3–9.
- Wawrzkiwicz K., Łoborzewski J., Wolski T., 1987. Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, vol. 25, 261–268.

KERATINOLYTIC ACTIVITY AND BIOFILM FORMATION BY SINGLE AND DUAL CULTURES OF BACTERIA AND YEAST

Abstract. In the present study, we used three bacterial strains: *Bacillus subtilis* B3, *B. cereus* B7e, *Flavobacterium multivorum* P1 and one strain of yeast *Geotrichum candidum* PH1. Microscopic observation demonstrated, that all examined strains show adhesion and biofilm formation ability to a glass plate surface, in mono- as well as dual cultures. Furthermore, all strain synthesized and secreted extracellular keratinases in medium supplemented with poultry feathers as a single source of carbon and nitrogen. The highest keratynolytic activity was observed in single cultures of *B. cereus* B7c and *F. multivorum* P1, 21,7 J.K and 18,25 J.K, respectively. In the same medium, mixed cultures of *B. cereus* x *F. multivorum* and *B. cereus* x *G. candidum* as well as single culture of *G. candidum* PH1 showed lower keratynolytic activity (about 13 J.K.).

Key words: biofilm, adhesion, keratinases, mixed cultures

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2009

Do cytowania – For citation: Szczepaniak G., Rodziewicz A., Baranowska K., 2009. Aktywność keratynolityczna oraz tworzenie biofilmu przez monokultury i kultury mieszane bakterii i drożdży. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* 8(2), 3–15.

UZDOLNIENIA LITYCZNE GRZYBÓW Z RODZAJU *TRICHODERMA* W OBECNOŚCI BIOMASY FITOPATOGENÓW

Danuta Witkowska, Justyna Stolaś, Anna Kancelista,
Michał Piegza

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. W prezentowanej pracy przebadano uzdolnienia trzech szczepów grzybów strzępkowych z rodzaju *Trichoderma* w kierunku produkcji enzymów litycznych efektywnych w degradacji ścian komórkowych mikroorganizmów patogenicznych, a istotnych w procesie zwanym mykoparazytyzmem. We wglębnych hodowlach wstrząsanych stosowano dwa podłoża o zmiennym składzie, nie tylko ze względu na proste składniki mineralne, ale także odmienne pod kątem złożonych źródeł węgla, będących równocześnie induktorami ocenianych hydrolaz. Stwierdzono zróżnicowanie w produkcji badanych enzymów, a najwyższymi uzdolnieniami do biosyntezy chitynaz i β -1,3-glukanaz charakteryzował się szczep *Trichoderma hamatum* C1 (odpowiednio 1,17 nKat·ml⁻¹, 27 nKat·ml⁻¹). Aktywne w produkcji chitynaz i laminarynaz szczepy grzybów strzępkowych mogą być przydatne jako szczepionki w ochronie roślin przed patogennymi grzybami.

Słowa kluczowe: *Trichoderma*, fitopatogen, mykoparazytyzm, chitynazy, laminarynazy, glukanazy

WSTĘP

Ściana komórkowa grzybów strzępkowych stanowi kompleks zbudowany z licznych polimerów, m.in. β -1,3- β -1,6-glukanu, chityny, mannanu oraz białek. Jest to struktura bardzo dynamiczna, ulegająca nieustannym zmianom (np. podczas morfogenezy, podziałów komórkowych czy wzrostu) i różniąca się nieznacznie pomiędzy różnymi gatunkami grzybów [Adams 2004]. Prowadzone w ostatnich latach badania naukowe potwierdzają, że antagonistyczne działanie grzybów z rodzaju *Trichoderma* wobec patogenów w związane jest w dużej części z produkcją enzymów hydrolitycznych (chitynazy, β -1,3-glukanazy, proteazy), niszczących polimery ściany komórkowej fitopatogenicznych grzybów. Enzymy grzybów *Trichoderma*, poza bezpośrednim udziałem w antagonistycznych

Adres do korespondencji – Corresponding author: Michał Piegza, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław, e-mail: michal.piegza@wnoz.up.wroc.pl

interakcjach między różnymi organizmami (mykoparazytyzmie), uczestniczą również w procesach rozwoju i różnicowania, żywienia oraz autolizy.

W hodowlach laboratoryjnych prowadzących do oceny uzdolnień enzymatycznych wykazano, że najlepszymi warunkami indukcji zewnątrzkomórkowych chitynaz jest wzrost *Trichoderma* w podłożu zawierającym oczyszczoną chitynę, grzybnię lub ścianę komórkową jako jedyne źródło węgla. Chitynazy pochodzące z różnych źródeł wykazują jednak inne mechanizmy indukcji, tzn. podczas zjawiska mykoparazytyzmu rodzaj wydzielanego enzymu jest ściśle związany z grzybem-gospodarzem. Zauważono również, że glukoza, sacharoza albo produkty degradacji chityny mogą powodować inhibicję chitynaz, co może świadczyć o regulacji ich biosyntezy na poziomie represji katabolicznej. Dalsze badania chitynaz wskazały, że niektóre z nich (choć w niewielkich ilościach) są produkowane konstytucyjnie, np. CHIT 42, CHIT 33 czy N-acetylo- β -D-glukozoaminidaza (102 kDa). Chitynazy mogą być syntetyzowane także w warunkach stresowych lub głodowych, obniżając sztywność ściany komórkowej, a dodatkowo antybiotyki inhibują powiązane z błoną komórkową syntetazy składników ściany komórkowej, co uniemożliwia fitopatogenowi naprawę litycznego efektu działania hydrolaz [Kubicek i in. 2001, Chugh i Wallace 2001, Patil i in. 2000].

Obok chitynaz istotny udział w degradacji biopolimerów ścian komórkowych grzybów patogenicznych mają także β -1,3-glukanazy. Szczepy *T. harzianum* produkują od 1 do 7 typów β -1,3-glukanaz. Stwierdzono również występowanie synergistycznego działania między β -1,3-glukanazami a antybiotykami peptydowymi (peptabole) w procesie parazytyzmu *T. harzianum* wobec fitopatogenów. Peptabole lub trichorzianine A i B mają zdolność inhibicji syntetaz β -glukanu (enzym odpowiedzialny za syntezę β -glukanu ściany komórkowej) izolowanych z plazmalemmy *B. cinerea*. Efekt działania peptaboli może być potęgowany poprzez dodatek β -1,3-glukanaz *T. harzianum*, co powoduje wzrost ich skuteczności antygrzybowej [Markovich i Kononova 2003].

Celem prezentowanej pracy była ocena uzdolnień trzech szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma* do wytwarzania głównie β -1,3-glukanaz i chitynaz, tj. enzymów ważnych w zwalczaniu fitopatogenicznych grzybów. Dodatkowo oceniono również aktywności enzymów towarzyszących celulo- i ksylanolitycznych. Najbardziej aktywne spośród badanych szczepów mogą być przydatne jako komponenty mikrobiologicznych szczepionek stosowanych w ochronie roślin.

MATERIAŁ I METODY

Mikroorganizmy. Grzyby strzępkowe pochodzące z kolekcji czystych kultur Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu należące do rodzaju *Trichoderma* reprezentowane były przez 3 szczepy: *Trichoderma hamatum* T2, *T. hamatum* C1, *T. harzianum* T33.

Podłoża hodowlane. Wykorzystano trzy różne podłoża hodowlane: MGP (KH_2PO_4 2,0 g·l⁻¹, MgSO_4 1,0 g·l⁻¹, CaCl_2 1,0 g·l⁻¹, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,0 g·l⁻¹, pepton 2,0 g·l⁻¹, glukoza 5,0 g·l⁻¹) uzupełniane wyciekami kukurydzianymi (2% WK), inaktywowaną termicznie biomasą drożdży paszowych (2% BDP) i/lub inaktywowaną biomasą trzech szczepów rodzaju *Fusarium* – *F. culmorum* M292, *F. graminearum* KF375, *F. avenaceum* 1 (2% BF3), podłoże MGP uzupełniane 6% BF3 oraz podłoże Saunders'a (KH_2PO_4 0,20 g·l⁻¹,

K_2HPO_4 0,15 g·l⁻¹, NaH_2PO_4 2,00 g·l⁻¹, Na_2HPO_4 1,50 g·l⁻¹, NH_4NO_3 0,60 g·l⁻¹, $NaNO_3$ 3,80 g·l⁻¹, $MgSO_4$ 0,30 g·l⁻¹, pepton 5,00 g·l⁻¹, glukoza 5,00 g·l⁻¹) z dodatkiem BF3 (tab. 1). Biomasa grzybów, szczególnie biopolimery ścian komórkowych stanowiły źródło węgla i jednocześnie działały jako induktor badanych enzymów.

Tabela 1. Wykaz stosowanych podłoży
Table 1. Index of media used in the study

	Skrót Abbreviation	Nazwa podłoża Medium designation	Komplementacja Complementation
Podłoże 1 Medium 1	P I	MGP	2% WK 2% BDP 2% BF3
Podłoże 2 Medium 2	P II	MGP	6% BF3
Podłoże 3 Medium 3	P III	SAUNDERS	3% BF3

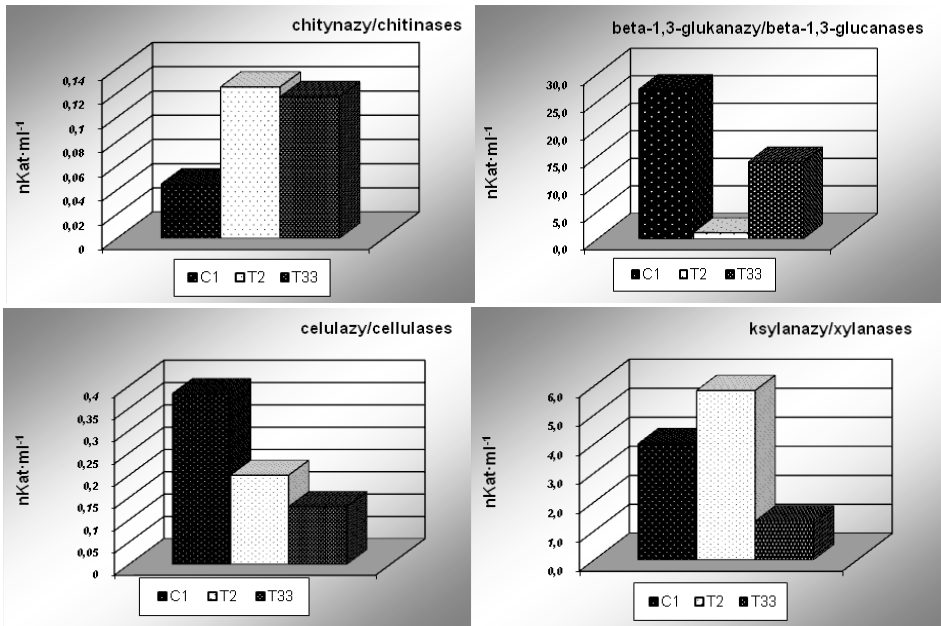
Przebieg hodowli. Hodowle zaszczepiano 0,5 ml zawiesiny zarodników grzybów *Trichoderma* (~10⁸ kom·ml⁻¹), a następnie inkubowano na wyrząsarce typu G10 Gyrotory® Shaker przez 7 dni w temperaturze 28°C przy ~170 rpm. Podczas 7-dniowej hodowli, codziennie kontrolowano pH, korygując jego wartość do ~5,5. Po 7 dobach odwirowano biomasę w wirówce Sigma 3-16K (5444 x g, 20 min, 5°C). Otrzymane supernatanty sączono przez filtr o średnicy porów 0,20 μm, zapewniając tym samym ich jałowość.

Metody analityczne. W otrzymanych z hodowli grzybów supernatantach oznaczano następujące aktywności: β-1,3-glukanazy, chitynazy, ksylanazy oraz celulazy [Witkowska i Maj 2002, Witkowska i Piegza 2006]. Aktywności enzymów wyrażano w jednostkach aktywności enzymatycznej nKat·ml⁻¹, wykorzystując uwolnione w wyniku reakcji enzymatycznej związku redukujące kwas 3,5-dinitrosalicylowy do kwasu 3-amino-5-nitrosalicylowego, w wyniku czego tworzy się barwny kompleks. Intensywność zabarwienia mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 530 nm [Miller 1959].

Hodowle dwuorganizmowe. Porównanie wzajemnych interakcji pomiędzy grzybami z rodzaju *Trichoderma* a wybranymi grzybami patogennymi wykonano na podłożu PDA. Krążki (średnica 10 mm) sterylnie wycięte korkoborem z 7-dobowej hodowli płytkowej układane były na świeżym agarowym podłożu w odległości 20 mm między sobą. Po 7-dobowej inkubacji w temperaturze 25°C oceniano wzajemny wpływ badanych mikroorganizmów na swój wzrost [Piegza i in. 2002].

WYNIKI I OMÓWIENIE

Przeprowadzono hodowle wstrząsane w podłożach mineralnych z różnymi złożonymi źródłami węgla. Wśród testowanych grzybów *Trichoderma* w podłożu MGP z dodatkiem 2% WK, 2% BDP, 2% BF3 najlepszym producentem aktywnych laminarynaz był *T. hamatum* C1 (27,17 nKat·ml⁻¹) (rys. 1). Szczep *T. harzianum* T33 wykazywał o połowę niższe aktywności β-1,3-glukanaz (14,0 nKat·ml⁻¹), natomiast aktywność *T. hamatum* T2 była znikoma.



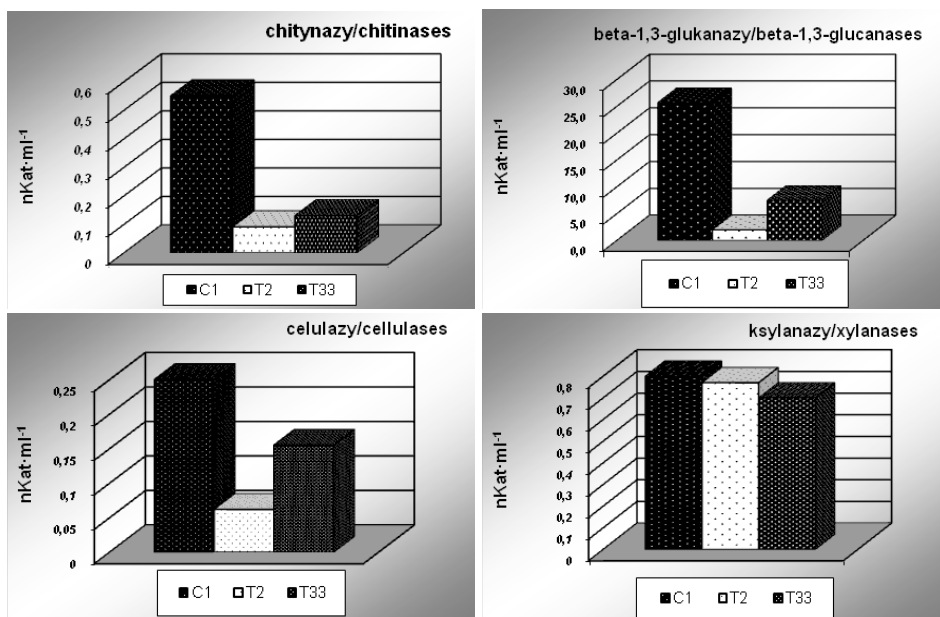
Rys. 1. Aktywność enzymów hydrolitycznych w podłożu MGP z dodatkiem: WK (2%), BDP (2%), BF3 (2%)

Fig. 1. Hydrolases activity in MGP medium supplemented with: WK (corn waste) 2%, BDP (feed yeasts biomass) 2%, BF3 2%

Aktywności enzymów chitynolitycznych były na niższym poziomie w porównaniu do β -1,3-glukanaz. Wśród grzybów testowanych najaktywniejszym ich producentem okazał się szczep *T. hamatum* T2 (0,125 nKat·ml⁻¹) oraz *T. harzianum* T33 (0,117 nKat·ml⁻¹). Pomimo że w oddziaływaniach między grzybami główną rolę odgrywają chitynazy i β -1,3-glukanazy, jednak interesującym zagadnieniem wydała się ocena poziomu biosyntezy innych enzymów wpływających na możliwość kolonizowania środowiska zawierającego części roślinne, zwłaszcza że w podłożu hodowlanym znajdowały się wycinki kukurydziane zawierające elementy celulozy i ksylanu. Dlatego też dodatkowo oceniono syntezę enzymów towarzyszących, tj. celulaz i ksylanaz. Pierwsze z nich najwydatniej biosyntetyzowane były przez szczep C1 (0,37 nKat·ml⁻¹), natomiast drugie przez szczep T2 (5,4 nKat·ml⁻¹).

Zmiana składników pożywki na korzyść większej liczby biopolimerów ścian komórkowych w inaktywowanej termicznie biomase grzybów *Fusarium* w zróżnicowany sposób wpłynęła na biosyntezę hydrolaz przez trzy badane szczepy. Szczególnie wyraźnie zareagował szczep C1, zwiększając prawie 14-krotnie aktywność chitynaz. W przypadku pozostałych szczepów osiągnięto wyniki nieznacznie niższe niż w poprzedniej hodowli, co może świadczyć o mniejszych możliwościach tych szczepów do korzystania z określonych substratów w podłożu jako źródła węgla i induktorów syntezy chitynaz. Szczep C1, podobnie jak w poprzedniej hodowli, wyróżnił się także spośród testowanych szczepów najwyższą aktywnością β -1,3-glukanaz. Pozostałe szczepy, czyli T2 i T33 syntetyzowały ten enzym na poziomie 5–20-krotnie niższym w porównaniu do C1.

Uzdolnienia do produkcji pozostałych enzymów, tj. celulaz i ksylanaz, badanych szczepów w zmodyfikowanej pożywce (z dodatkiem tylko BF3) były na ogół znacznie niższe (rys. 2). Można sądzić, że zabrakło induktora, którym w poprzedniej hodowli były wytłoki kukurydziane. W związku z tym osiągnięto 1,5- i 3,4-krotnie niższy poziom aktywności dla celulaz biosyntetyzowanych przez szczepy C1 i T2 oraz 1,5-; 4-; i 6,8-krotnie niższy poziom aktywności ksylanaz odpowiednio dla szczepów T33, C1, T2.



Rys. 2. Aktywność enzymów hydrolitycznych w podłożu MGP z dodatkiem BF3 (6%)

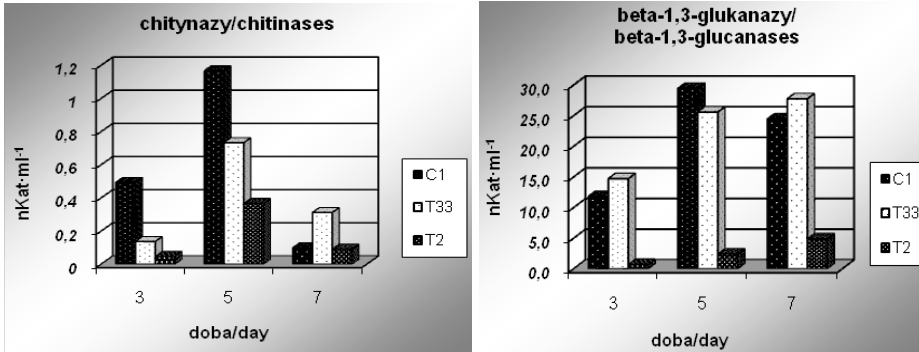
Fig. 2. Hydrolases activity in MGP medium supplemented with BF3 (6%)

Nie tylko rodzaj źródła węgla i induktorów mają wpływ na poziom aktywności produkowanych enzymów, ale także składniki pożywki mineralnej. Stosując w kolejnym eksperymencie podłoże wg Saundersa (źródło azotu NaNO_3 i NH_4NO_3), a w obu jako źródło węgla oraz induktor BF3 (biomasa grzybów *Fusarium*), uzyskano inny obraz aktywności β -1,3-glukanaz i chitynaz dla trzech badanych szczepów *Trichoderma*.

Największe zmiany w kierunku zwiększenia aktywności enzymatycznej dotyczyły chitynaz. Osiągnięto w tych warunkach hodowlanych najwyższe aktywności tych enzymów u wszystkich badanych szczepów grzybów strzępkowych, w porównaniu do poprzednich hodowli. Szczep C1 uzyskał ok. 30-krotny wzrost aktywności chitynaz w stosunku do hodowli w podłożu PI, a dwukrotnie w stosunku do hodowli w podłożu PII. Szczep T33 produkował chitynazy o ok. 7-krotnie wyższej aktywności w porównaniu do hodowli PI i PII, a szczep T2 3-krotnie wyższej w stosunku do hodowli I i 7-krotnie wyższej niż w hodowli PII (rys. 3).

Mniejsze zmiany w aktywnościach syntetyzowanych enzymów zaobserwowano w przypadku β -1,3-glukanaz, ale tylko w przypadku szczepów C1 i T2. Natomiast dla

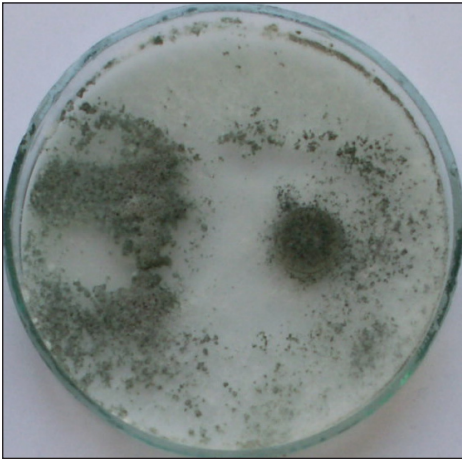
szczepu T33 pożywka PIII okazała się bardzo sprzyjająca, gdyż osiągnięto 2-krotny wzrost aktywności tego enzymu.



Rys. 3. Dynamika biosyntezy β -1,3-glukanaz i chitynaz produkowanych przez szczepy testowane w podłożu Saunders'a z dodatkiem BF3

Fig. 3. Dynamics of β -1,3-glucanase and chitinase biosynthesis by the tested strain in Saunders medium with BF3

Badano także hodowle dwuorganizmowe, wskazując na wyraźne ograniczenie wzrostu grzybów patogenicznych przez grzyby z rodzaju *Trichoderma* (fot. 1 i 2).



Fot. 1. Efekt wzajemnego oddziaływania na siebie grzybów *T. harzianum* T33 (z prawej) i *F. poae* KF617 (z lewej) po 7-dniowym okresie wspólnego wzrostu na podłożu PDA (25°C)

Phot. 1. Interaction between *T. harzianum* T33 (right) and *F. poae* KF617 (left) after 7 days of dual culture on PDA medium



Fot. 2. Efekt wzajemnego oddziaływania na siebie grzybów *T. hamatum* C1 (z prawej) i *F. avenaceum* 1 (z lewej) po 7-dniowym okresie wspólnego wzrostu na podłożu PDA (25°C)

Phot. 2. Interaction between *T. hamatum* C1 (right) and *F. avenaceum* 1 (left) after 7 days of dual culture on PDA medium

Badania innych autorów [El-Katatny i in. 2000, Noronha i in. 2000, De Marco i in. 2003] dowodzą także szerokiej możliwości produkcji β -1,3-glukanaz i chitynaz przez grzyby *Trichoderma* i ich roli w mykoparazytyzmie, czyli jednym z ważniejszych mechanizmów wykorzystywanych przez grzyby strzępkowe w biokontroli fitopatogenów. Wielu autorów [El-Katatny i in. 2000, Noronha i in. 2000, De Marco i in. 2003, Markovich i Kononowa 2003] zwraca uwagę na indukowany charakter biosyntezy tych enzymów, stosując w hodowlach źródła węgla będące induktorami, takie jak biomasa grzybów strzępkowych (z obecnymi w ścianach komórkowych biopolimerami) lub nawet czyste oczyszczone ściany komórkowe.

El-Katatny i in. [2000] w poszukiwaniu aktywnych pod względem produkcji chitynaz i laminarynaz szczepów *Trichoderma* przebadali 24 izolaty, stosując minimalne podłoża mineralne z dodatkiem chityny lub laminarynu – jako jedyne źródło węgla, a jednocześnie induktor badanych enzymów. Najwyższe aktywności uzyskiwane przez tych autorów wynoszące $5,95 \text{ nKat}\cdot\text{ml}^{-1}$ β -1,3-glukanaz i chitynaz $29,3 \text{ pKat}\cdot\text{ml}^{-1}$ były znacznie niższe, w porównaniu do wartości aktywności tych enzymów osiągniętych w prezentowanej pracy, odpowiednio $28 \text{ nKat}\cdot\text{ml}^{-1}$ i $1,1 \text{ nKat}\cdot\text{ml}^{-1}$. Autorzy tej pracy wykazali także, że zastępując w hodowli chitynę i laminaryn przez rozdrobnioną i wysuszoną grzybnię fitopatogenów, można osiągnąć podobny poziom aktywności enzymów.

Noronha i in. [2000] zastosowali natomiast w podłożach hodowlanych *Trichoderma harzianum* ściany komórkowe różnych fitopatogenów (*Pythium* sp., *R. solani*, *S. rolfsii*) jako źródło węgla i induktor badanych enzymów. W wyniku hodowli prowadzonych w takich podłożach uzyskali zmienny poziom aktywności biosyntezy enzymów, tj. odpowiednio 10,8; 7,91; 4,61 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$. Efekt ten tłumaczyli zależnością aktywności β -1,3-glukanaz od różnej zawartości induktora, czyli glukanu, w ścianach komórkowych fitopatogenów. Wraz ze zwiększeniem ilości β -glukanów w ogólnej masie ściany komórkowej grzyba – obserwowano równoległy wzrost aktywności enzymów.

Inni autorzy [De Marco i in. 2003, Vázquez-Garcidueñas i in. 1998] w wyniku badań nad syntezą β -1,3-glukanaz wysunuli podobne spostrzeżenia, sugerując równocześnie wyraźną zależność w poziomie biosyntezy laminarynaz i chitynaz od obecności ściany komórkowej grzyba strzępkowego, a szczególnie od jej składu procentowego biopolimerów.

Inne badania wskazują na to, że oczyszczone chitynazy skutecznie hamują szeroką gamę fitopatogenów poprzez lizę ich ścian komórkowych, a także inhibicję kiełkowania zarodników [Markovich i Kononowa 2003]. Dowodzi to ważnej roli enzymów syntetyzowanych przez grzyby strzępkowe *Trichoderma* w procesach oddziaływania z grzybami patogennymi roślin i uzasadnia celowość badań zmierzających do opracowania odpowiednich szczepionek skutecznych w ochronie roślin przed patogennymi grzybami.

WNIOSKI

1. Spośród badanych szczepów grzybów *Trichoderma hamatum* C1 charakteryzował się najwyższymi uzdolnieniami do produkcji β -1,3-glukanaz, bez względu na zastosowane podłoże hodowlane.

2. Podłoża mineralne zawierające wyłącznie polimery ścian komórkowych biomasy grzybów z rodzaju *Fusarium* efektywniej sprzyjały biosyntezie chitynaz szczepów z rodzaju *Trichoderma*.

3. Aktywności enzymów towarzyszących, tj. celulaz i ksylanaz były wyższe w hodowlach z dodatkiem wyłoków kukurydzianych (prócz biomasy) niż wyłącznie z dodatkiem biomasy grzybów.

4. Aktywne w produkcji chitynaz i β -1,3-glukanaz szczepy grzybów strzępkowych mogą być przydatne jako szczepionki w ochronie roślin przed patogenami.

PIŚMIENNICTWO

- Adams D.J., 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, 150, 2029–2035.
- Chugh J.K., Wallace B.A., 2001. Peptaibols: models for ion channels. *Biochemical Society Transactions*, 29, 565–570.
- De Marco J.L., Valadares-Inglis M.C., Felix C.R., 2003. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 33–38.
- El-Katatny M.H., Somitsch W., Robra K.H., El-Katatny M.S., Gübitz G.M., 2000. Production of Chitinase and β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for Control of the Phytopathogenic Fungus *Sclerotium rolfisii*. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 3, 173–180.
- Kubicek C.P., Mach R.L., Peterbauer C.K., Lorito M., 2001. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology*, 83, 11–23.
- Markovich N.A., Kononova G.L., 2003. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39, 4, 389–400.
- Miller G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, 31, 426–428.
- Noronha E.F., Kipnis A., Junqueira – Kipnis A.P., Ulhoa C.J., 2000. Regulation of 36-kDa β -1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, 188, 19–22.
- Patil R.S., Ghormade V.V., Deshpande M.V., 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 7, 473–483.
- Piegza M., Stempniewicz R., Witkowska D., 2002. Ocena antagonizmu drożdży *Geotrichum candidum* w stosunku do toksynotwórczych grzybów rodzaju *Fusarium*, *Żywność Nauka Technologia Jakość*, suplement 3, 32, 136–148.
- Vázquez-Garcidueñas S., Leal-Morales C.A., Herrera-Estrella A., 1998. Analysis of the β -1,3-Glucanolytic System of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4, 1442–1446.
- Witkowska D., Maj A., 2002. Production of Lytic Enzymes by *Trichoderma* spp. and Their Effect on the Growth of Phytopathogenic Fungi. *Folia Microbiol.*, 47, 3, 279–282.
- Witkowska D., Piegza M., 2006. Capability of *Geotrichum candidum* yeasts for cellulases and xylanases biosynthesis., *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 9, 4.

LYTIC CAPABILITY OF *TRICHODERMA* MOULDS IN THE PRESENCE OF PHYTOPATHOGENIC BIOMASS

Abstract. In the present work the ability of three *Trichoderma* mould strains to lytic enzymes biosynthesis, effective in degradation of pathogenic microorganisms cell walls, was examined. These enzymes play a very important role in the mycoparasitism process. In shaking cultures two different media types were used, in regard not only in case of mineral components, but also different kind of carbon source, which was simultaneously an inductor for the synthesis of hydrolases. The differentiation in biosynthesis of enzymes was confirmed. The highest capability to produce chitinases and β -1,3-glucanases characterized the *Trichoderma hamatum* C1 strain (1,17 nKat·ml⁻¹, 27 nKat·ml⁻¹, respectively). The mould strains, active in biosynthesis of chitinase and laminarinase, could be useful as microbiological vaccines in plant protection against pathogenic moulds.

Key words: *Trichoderma*, phytopathogenic, mycoparasitism, chitinases, laminarinases, glucanases

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2009

Do cytowania – For citation: Witkowska D., Stolaś J., Kancelista A., Piegza M., 2009. Uzdolnienia lityczne grzybów z rodzaju *Trichoderma* w obecności biomasy fitopatogenów. Acta Sci. Pol. Biotechnol. 8(2), 17–25.

WYSTĘPOWANIE BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ AKTYWNYCH WZGLĘDEM *LISTERIA* W SERACH REGIONALNYCH WYTWARZANYCH W OKRĘGU TATRZAŃSKO-BESKIDZKIM*

Anna Sip, Michał Więckowicz, Agnieszka Olejnik-Schmidt,
Anna Gardo, Roksana Gorlas, Włodzimierz Grajek

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Streszczenie. Celem pracy było wyizolowanie z serów regionalnych bakterii fermentacji mlekowej oraz przeprowadzenie ich selekcji pod kątem zdolności do antagonistycznego oddziaływania na *Listeria*. Dokonano również wstępnej charakterystyki czynników odpowiedzialnych za antagonizm względem *Listeria* oraz zidentyfikowano bakterie o najsilniejszej listeriobójczej aktywności. Bakterie te przebadano ponadto w kierunku obecności genów bakteriocyn klasy IIa (bakteriocyn listeriobójczych). Materiałem izolacyjnym było pięć rodzajów serów regionalnych: bundz, bryndza, gołka niewędzona, gołka wędzona oraz warkocze. Jako podłoża izolacyjne stosowano pożywkę MRS i M17. Antylisterijną aktywność pozyskanych izolatów oznaczano metodą punktowo-dyfuzyjną względem bakterii *Listeria innocua*. Identyfikacji wybranych bakterii fermentacji mlekowej dokonywano metodą analizy sekwencji genu kodującego 16S rRNA, a geny bakteriocyn klasy IIa wykrywano, stosując zdegenerowane startery oligonukleotydowe. W wyniku prac izolacyjnych pozyskano 1000 czystych kultur bakterii fermentacji mlekowej. Co trzecia z nich wykazywała antagonistyczną aktywność względem *Listeria*. Najwięcej bakterii zdolnych do antylisterijnego działania wykryto w obrębie populacji LAB wyizolowanych z bryndzy i gołki niewędzonej. Wśród kultur aktywnych wobec *Listeria* dominowały kultury o działaniu bakteriobójczym. Działanie to było przede wszystkim następstwem konkurencji oraz syntezy kwasów organicznych i H₂O₂. Jedynie niecały 1% badanych kultur, oprócz wymienionych związków, syntezował także inne metabolity o działaniu antylisterijnym. Były nimi bakteriocyny. Zdolność do ich syntezy posiadały bakterie, które zidentyfikowano jako *Lactococcus garvieae*, *Leuconostoc mesenteroides* oraz *Lactobacillus plantarum*.

* Praca wykonana w ramach projektu badawczego własnego nr 2044/B/P01/2008/35 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

W genomie bakterii *Lactobacillus plantarum* wykryto ponadto obecność genów bakteriocyn klasy IIa. W chwili obecnej badana jest struktura, mechanizm działania i genetyczne podstawy biosyntezy listeriobójczych bakteriocyn bakterii *Lc. garvieae*, *Leu. mesenteroides* oraz *Lb. plantarum*.

Słowa kluczowe: polskie sery regionalne, *Listeria monocytogenes*, bakterie fermentacji mlekowej, antylisteryjna aktywność, bakteriocyny klasy IIa

WSTĘP

W ostatnich latach olbrzymi niepokój wywołują informacje o występowaniu w żywności bakterii chorobotwórczych, takich jak: *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Yersinia* i enterotoksycznych *E. coli* [Tauxe 2002]. Spośród wymienionych grup drobnoustrojów szczególne zagrożenie dla człowieka stwarzają bakterie *Listeria monocytogenes*. Bakterie te mogą być przyczyną poronień, uszkodzeń płodów, przedwczesnych porodów oraz wodogłowia noworodków. Mogą wywoływać także zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, żołądka, jelit i stawów oraz prowadzić do posocznicy [Faber i Peterkin 1991, Doganay 2003, McLauchlin i in. 2004]. W grupie chorób bakteryjnych przenoszonych drogą pokarmową infekcje wywoływane przez *L. monocytogenes*, czyli tzw. listeriozy, mają najwyższy współczynnik śmiertelności, który często przekracza 20% [CDC 2000, McLauchlin i in. 2004, Orndorff i in. 2006]. Dla porównania, śmiertelność salmonelloz wynosi 0,38%, a infekcji wywoływanych przez *Campylobacter* jest zwykle niższa niż 0,1% [Mead i in. 1999]. Minimalna dawka infekcyjna *L. monocytogenes* nie została dokładnie ustalona. Z raportów medycznych wynika jednak, że dla zdrowego dorosłego człowieka wynosi ona prawdopodobnie co najmniej $10^3 \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1}$, natomiast dla osób z grupy podwyższonego ryzyka może być ona nawet niższa niż $10^2 \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1}$. Do grupy podwyższonego ryzyka należą kobiety w ciąży, noworodki, ludzie o obniżonej odporności immunologicznej oraz osoby po 55 roku życia [Lovett 1989, Schlech 1996, 2000, Liu 2008].

Ryzyko zakażeń żywności *L. monocytogenes* jest bardzo duże, gdyż drobnoustrój ten powszechnie występuje w wodzie, glebie, na powierzchni roślin, a także w przewodzie pokarmowym 5–10% ludzi i zwierząt [Guerra i in. 2001, Okutani i in. 2004, Liu 2008, Wagner i McLauchlin 2008]. *L. monocytogenes* często są także izolowane z pomieszczeń produkcyjnych [Silva 1998, 2003, Noves i in. 2008]. **Prawdopodobieństwo występowania *L. monocytogenes* w żywności** zwiększa jeszcze fakt, że drobnoustrój ten jest bardzo odporny na działanie czynników fizykochemicznych. Przeżywa w środowisku o pH dochodzącym do 3,3, a_w do 0,83 oraz wytrzymuje nawet 30% stężenie NaCl [Cole i in. 1990, Gandhi i Chikindas 2007, Liu 2008, Wagner i McLauchlin 2008]. Z powyższych względów *L. monocytogenes* występuje w ok. 10% produktów żywnościowych wytwarzanych w warunkach przemysłowych oraz w aż 30% produkowanych metodami chałupniczymi. W większości z nich liczebność *L. monocytogenes* nie przekracza jednak $10^2 \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1}$ [Loncarevic i in. 1995, Cordano i Rocourt 2001, Gameiro i in. 2007, Durmaz 2008, Little i in. 2008]. Zakażenie na takim poziomie nie stanowi zagrożenia zdrowotnego, ale fakt, że drobnoustrój ten może namnażać się w trakcie przechowywania chłodniczego, budzi uzasadnione obawy.

Niszczanie komórek bakterii *L. monocytogenes* klasycznymi metodami takimi jak: zamrażanie, solenie, suszenie, zakwaszanie czy utrwalanie chemiczne jest mało efek-

tywne [Liu 2008, Wagner i McLauchlin 2008]. Dlatego też w laboratoriach na całym świecie prowadzone są intensywne badania nad opracowaniem lepszych metod ograniczania rozwoju tych bakterii. Obecnie olbrzymim zainteresowaniem cieszy się możliwość wykorzystywania bakterii fermentacji mlekowej (LAB; ang. lactic acid bacteria) do zwalczania *Listeria*. Wiele bakterii fermentacji mlekowej jest bowiem zdolnych do syntezy związków działających bakteriobójczo na *L. monocytogenes*. Należą do nich m.in.: kwasy organiczne, H₂O₂, związki systemu laktoperoksydazy, diacetyl, aldehyd octowy i bakteriocyny [Daeschel 1989, Abee i in. 1995, Cleveland i in. 2001, O'Sullivan 2002, Grajek i Sip 2004, Galvez i in. 2007].

Spośród wymienionych związków najsilniejszą bakteriobójczą aktywność względem chorobotwórczych dla człowieka *L. monocytogenes* mają bakteriocyny klasy IIa. Ich aktywność determinuje obecność konserwatywnego motywu aminokwasowego YGNGV-C na końcu aminowym. Charakterystyczną cechą listeriobójczych bakteriocyn klasy IIa jest również obecność w łańcuchu polipeptydowym przynajmniej dwóch cząsteczek cysteiny połączonych wiązaniem dwusiarczkowym [Ennahar i in. 1999, 2000]. Najbardziej znanymi przedstawicielami bakteriocyn klasy IIa są pediocyny (pediocyna AcH/PA1/SJ-1). Do klasy tej należą także enterocyny (enterocyna A i enterocyna P), leukocyny (leukocyna A/705 i leukocyna B), bawarcyny (bawarcyna A i bawarcyna MN), sakacyny (sakacyna A, P i 604), bakteriocyny *Carnobacterium* (diwercyna V41, piscikolina 126, karnobakteriocyny B2 i BM1) oraz mundticyna [Sip i in. 2009]. Bakteriobójczą aktywność względem *Listeria* wykazują także niektóre bakteriocyny klasy I, czyli bakteriocyny lantybiotykowe. Najlepiej opisaną z nich jest nizyna [Hansen 1994, Sorbino-Lopez i Martin-Beloso 2008].

Źródłem drobnoustrojów aktywnych wobec *Listeria* są często produkty fermentowane w sposób spontaniczny [Casia i in. 1996, Ferchichi i in. 2001, Alvarado i in. 2005, Todorov i Dicks 2006, Topisirovic 2006, Belgacem i in. 2008]. Przykładem takich produktów są sery wytwarzane w okręgu tatrzańsko-beskidzkim. Mimo że sposób ich produkcji sprzyja występowaniu *Listeria*, jak dotąd nie odnotowano żadnego przypadku listeriozy będącego efektem ich konsumpcji. W związku z tym istnieje uzasadnione przypuszczenie, że mikroflora czynna w procesie fermentacji dobrze zabezpiecza je przed rozwojem *Listeria*. Dlatego też w ramach niniejszej pracy postanowiono przebadać najpopularniejsze w Polsce sery regionalne pod kątem występowania w nich LAB zdolnych do oddziaływania na *Listeria*. Zidentyfikowanie bakterii skutecznie niszczących *Listeria*, dokładne zbadanie ich właściwości oraz ustalenie, jakie związki są odpowiedzialne za ich działanie antylisteryjne, może przyczynić się do opracowania na ich bazie nowych kultur starterowych lub ochronnych.

MATERIAŁ I METODY

Izolacja bakterii fermentacji mlekowej

Materiałem izolacyjnym były sery takie jak: bundz, bryndza, gołka niewędzona, gołka wędzona oraz warkocze. Wszystkie badane sery zostały wyprodukowane w warunkach chałupniczych w okręgu tatrzańsko-beskidzkim. W ramach pracy przebadano 25 prób serów, po 5 z każdego rodzaju.

Próby serów o masie 10 g zawieszano w 90 ml cytrynianu trójsodowego, homogenizowano, rozcieńczano w wodzie peptonowej metodą rozcieńczeń dziesiętnych i posiewano na płytki Petriego, które zalewano dwoma pożywkami: pożywką MRS i pożywką M17. Obie pożywki zawierały 2% agaru. Posiane płytki inkubowano w temp. 30°C przez 72 h, a następnie izolowano z nich wyraźnie oddzielone kolonie o morfologii charakterystycznej dla bakterii fermentacji mlekowej. Z każdej próby sera izolowano po 40 kolonii (po 20 z każdego podłoża). Wyizolowane kolonie przenoszono do płynnych pożywek, analogicznych do podłoża izolacyjnych, i hodowano w temperaturze 30°C przez 24 h. Otrzymane kultury wstępnie identyfikowano, stosując metody fenotypowe. Czyste kultury LAB zabezpieczano. W tym celu 24-godzinne ich hodowle odwirowywano (5,5 tys. g, 10 min), otrzymaną biomasę przemywano, zawieszano w świeżej pożywce hodowlanej z dodatkiem 2% (v/v) glicerolu i zamrażano w temp. -20°C.

Badanie antylisteryjnej aktywności

Zabezpieczone czyste kultury bakterii fermentacji mlekowej łagodnie rozmrażano w temperaturze pokojowej i przenoszono do świeżych pożywek hodowlanych (1 ml zawiesiny bakterii/10 ml pożywki MRS lub M17). Posiane podłoża inkubowano w temp. 30°C przez 14h. Otrzymane kultury stosowano jako inokulum do zaszczerpienia świeżych pożywek. Pożywki zaszczerpiano 2% (v/v) inokulatami, inkubowano w temp. 30°C przez 24 h, a następnie testowano aktywność otrzymanych płynów hodowlanych. Aktywność badano metodą punktowo-dyfuzyjną wobec bakterii *Listeria innocua* (ATCC 19111).

W celu oznaczenia antylisteryjnej aktywności badanych kultur 20 µl próby przygotowanych płynów hodowlanych nanoszono na powierzchnię płytek Petriego z podłożem BHI+1% agaru zaszczerpionym 10^6 jtk·ml⁻¹ bakterii wskaźnikowych. Płytki inkubowano w temp. 37°C przez 14 h. Po inkubacji mierzono w mm średnice powstałych stref przejaśnień (całkowitych lub częściowych). Całkowite przejaśnienia (całkowite zahamowanie wzrostu) traktowano jako wyznacznik działania bakteriobójczego, a częściowe objawiające się jedynie zmniejszeniem gęstości murawki – jako efekt działania bakteriostatycznego.

W celu określenia jakie czynniki są odpowiedzialne za antagonizm względem *L. innocua*, aktywny płyn hodowlany rozdzielano poprzez wirowanie (5,5 tys. g, 10 min) na dwie frakcje – biomasy i supernatantu. Frakcja biomasy (B) zawieszanej w wodzie peptonowej służyła do badania zjawiska konkurencji, a frakcja supernatantu (S) była wyznacznikiem aktywności wszystkich zewnątrzkomórkowych metabolitów wytworzonych przez badane kultury. Supernatanty płynów hodowlanych poddawano też dodatkowej obróbce. Część z nich (Sn) doprowadzano do pH 6,5 za pomocą 1 N NaOH w celu wyeliminowania działania kwasów organicznych, a część (Snk) poddawano jeszcze dodatkowo działaniu katalazy (68000 IU·ml⁻¹), by rozłożyć H₂O₂. W zneutralizowanych supernatantach oznaczano aktywność innych niż kwasy organiczne pozakomórkowych metabolitów. W celu wyeliminowania aktywności enzymów proteolitycznych supernatanty, po sprawdzeniu termoodporności zawartych w nich związków aktywnych wobec *Listeria*, ogrzewano w temp. 80°C przez 10 min. Frakcję Sno za innymi autorami nazywano ekstraktem aktywnym lub ekstraktem bakteriocyn [Parente i in. 1995, Sip i in. 2009].

Identyfikacja wybranych bakterii fermentacji mlekowej

Z wybranych kultur bakterii fermentacji mlekowej (kultur o najsilniejszej antylisteryjnej aktywności) izolowano genomowe DNA. Izolacje prowadzono za pomocą gotowych zestawów Genomic Mini (A&A BIOTECHNOLOGY) w sposób zgodny z protokołem podanym przez producenta.

Wyizolowane genomowe DNA wykorzystywano jako matrycę do reakcji PCR, w której amplifikowano sekwencje 16S rDNA. Analizę PCR prowadzono z wykorzystaniem starterów: S-D-Bact-0008-a-S-20, S-*-V-Univ-1492-b-A-21. Profil termiczny reakcji PCR (15 cykli) charakteryzował się następującymi warunkami: etap wstępnej denaturacji (95°C, 5 min), etap przyłączania starterów (48°C, 1 min), elongacja (72°C, 1,5 min) oraz etap syntezy końcowej (72°C, 3 min). Produkty reakcji PCR oczyszczano następnie za pomocą zestawu GenElute™ (SIGMA). Po oczyszczeniu produkty amplifikacji наносzono na 1% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny (0,5 µg·ml⁻¹) i rozdzielano elektroforetycznie (fot. 1). Elektroforezę prowadzono w buforze TBE (1x) przy stałym natężeniu 60 mA przez 45 minut. Równolegle oznaczano stężenie badanych produktów (DNA). Pomiarów stężenia dokonywano za pomocą spektrofotometru NanoDrop. Oczyszczone amplikony 16S rDNA wysyłano do pracowni sekwencjonowania (Genomed, Warszawa). Wyniki sekwencjonowania analizowano za pomocą programu VectorNTI (Invitrogen) oraz serwisu BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) i na ich podstawie dokonywano identyfikacji wytypowanych bakterii.

Wykrywanie obecności genów bakteriocyn klasy IIa

Fragmety genów kodujących syntezę listeriobójczych bakteriocyn klasy IIa amplifikowano, stosując zdegenerowane startery. Jako matrycę do reakcji ich wybiórczej amplifikacji stosowano DNA wytypowanych kultur bakteryjnych. Startery oraz warunki reakcji PCR są przedmiotem zgłoszenia patentowego.

Badanie wrażliwości bakteriocyn na działanie enzymów, temperatury i pH

Ekstrakty bakteriocyn (frakcja Snk) inkubowano z 1 mg·ml⁻¹ pronazy E, proteinyzy K, pepsyny, trypsyny, α-chymotrypsyny, α-amylazy, katalazy i lipazy (Sigma). Inkubacje prowadzono przez 2 h w warunkach optymalnych dla działania stosowanych enzymów. Po inkubacji oznaczano aktywność badanych prób i wyrażano ją w AU·ml⁻¹ ml, czyli jednostkach oznaczających odwrotność najwyższego rozcieńczenia zdolnego jeszcze do bakterioobójczego działania na *L. innocua*. Do oznaczeń aktywności stosowano metodę krytycznych rozcieńczeń.

W celu zbadania wrażliwości bakteriocyn na działanie temperatury przygotowane ekstrakty ogrzewano w temp. 80 i 100°C przez 10, 20 i 30 min oraz w temp. 121°C przez 15 min. Po ogrzewaniu oznaczano ich aktywność w sposób analogiczny do przedstawionego powyżej.

W celu określenia wpływu pH na aktywność bakteriocyn ich ekstrakty doprowadzano do pH w zakresie od 2,0 do 10,0 (Δ = 0,5) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 h. Korekty pH dokonywano za pomocą 1 N NaOH lub 1 N HCl. Po inkubacji – pH wszystkich prób doprowadzano do poziomu wyjściowego, czyli wartości 6,5. Aktywność tak przygotowanych prób oznaczano metodą krytycznych rozcieńczeń.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Występowanie w serach regionalnych bakterii aktywnych wobec *Listeria*

Przedmiotem badań były sery regionalne, takie jak: bundz, bryndza, gołka wędzona i niewędzona oraz warkocze. Wszystkie badane sery zostały wytworzone w warunkach chałupniczych w okręgu tatrzańsko-beskidzkim i stanowiły efekt spontanicznych fermentacji. W fermentacjach tych brały udział mikroorganizmy wprowadzone wraz z zakwasem oraz obecne zarówno w surowcu, jak i całym otoczeniu produkcyjnym. Wybrane do badań sery przebadano szczegółowo pod kątem występowania bakterii aktywnych wobec *Listeria*. W tym celu wyizolowano z nich 1000 czystych kultur bakterii fermentacji mlekowej (po 200 z każdego rodzaju sera). Kultury te reprezentowały dominujące w nich grupy bakterii fermentacji mlekowej.

Spśród 1000 badanych kultur aż 355 (35,5%) było zdolnych do antagonistycznego oddziaływania na *Listeria* (tab. 1). Ponad połowa z nich została wyizolowana z bryndzy i gołki niewędzonej. Wymienione sery stanowiły więc najbogatsze źródło LAB aktywnych wobec *Listeria*. Przeciętnie co druga pozyskana z nich kultura działała antagoniście na *Listeria*. Najmniej kultur zdolnych do antylisterijnego działania stwierdzono w obrębie populacji LAB z warkoczy serowych. Aktywne wobec *Listeria* kultury stanowiły bowiem jedynie 4,5% wyizolowanych z nich LAB.

Tabela 1. Aktywność bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z serów regionalnych względem *Listeria*

Table 1. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from regional cheeses

Źródło izolacji Isolation source	Liczba kultur aktywnych względem <i>Listeria</i> / liczba badanych kultur Number of isolates with antilisterial activity/ number of cultures examined	Odsetek kultur Percentage of cultures [%]			
		aktywnych względem <i>Listeria</i> with antilisterial activity	bardzo aktywnych* względem <i>Listeria</i> with high antilisterial activity*	działających bakteriobójczo na <i>Listeria</i> with bactericidal activity against <i>Listeria</i>	działających bakteriostatycznie na <i>Listeria</i> with bacteriostatic activity against <i>Listeria</i>
bundz	81/200	40,5	8,5	21,5	19,0
bryndza	94/200	47,0	10,5	32,0	15,0
gołka niewędzona	93/200	46,5	27,5	23,0	23,5
gołka wędzona	78/200	39,0	10,0	24,0	15,0
warkocze	9/200	4,5	0	0	4,5
Łącznie Total	355/1000	35,5	11,3	20,1	15,4

* kultury bardzo aktywne – kultury dające sfery przejaśnienia o średnicy ponad 12 mm
cultures with high antilisterial activity – cultures with inhibition zones above 12 mm in diameter

Analizując antylisteryjną aktywność wybranych LAB, której wyznacznikiem była wielkość stref przejaśnień, stwierdzono, że jest ona wyraźnie zróżnicowana. Najsilniejszą aktywność względem *Listeria* wykazywały LAB wyizolowane z gołki niewędzonej. Prawie co trzecia pozyskana z nich kultura była bardzo aktywna w stosunku do *Listeria* i w teście punktowo-dyfuzyjnym dawała strefę przejaśnienia o średnicy ponad 14 mm. Kultury o takiej aktywności stanowiły jednocześnie prawie 60% wszystkich aktywnych wobec *Listeria* kultur pozyskanych z tego sera. W pozostałych serach dominowały natomiast kultury o niskiej antylisteryjnej aktywności, których płyny hodowlane dawały przejaśnienia o średnicy ok. 11 mm.

W obrębie kultur aktywnych względem *Listeria* znajdowały się izolaty o działaniu zarówno bakteriobójczym, jak i bakteriostatycznym. Większość kultur wyizolowanych z bundzu, bryndzy i gołki wędzonej działało na *Listeria* bakteriobójczo. Kultury bakteriobójcze wobec *Listeria* wyizolowane z wymienionych serów stanowiły od 53,1 do 68% wszystkich pozyskanych z nich kultur o działaniu antylisteryjnym (tab. 1 i 2). W przypadku gołki wędzonej udział izolatów bakteriobójczych i bakteriostatycznych w populacji kultur aktywnych był zbliżony. Jedynie wśród izolatów z warkoczy serowych nie wykryto kultur o działaniu bakteriobójczym.

Tabela 2. Zestawienie wyników badań aktywności 355 izolatów zdolnych do antylisteryjnego działania

Table 2. Various test results regarding activity of 355 isolates capable of antilisterial action

Źródło izolacji Isolation source	Udział kultur Percentage of cultures [%]				
	działających bakteriobójczo na <i>Listeria</i> with bactericidal activity against <i>Listeria</i>	działających bakteriostatycznie na <i>Listeria</i> with bacteriostatic activity against <i>Listeria</i>	zdolnych do syntezy pozakomórkowych metabolitów aktywnych względem <i>Listeria</i> able to synthesize extracellular metabolites with antilisterial activity	zdolnych do syntezy bakteriocyn aktywnych względem <i>Listeria</i> able to synthesize antilisterial bacteriocins	działających antagonistycznie na <i>Listeria</i> w następstwie konkurencji z antagoniczną aktywnością (competition) against <i>Listeria</i>
bundz	53,1	46,9	49,4 (20,0)	0	54,3 (22,0)
bryndza	68,1	31,9	44,7 (21,0)	0	36,0 (17,0)
gołka niewędzona	49,5	50,5	53,8 (25,0)	5,4 (2,5)	21,5 (10,0)
gołka wędzona	61,5	38,5	69,2 (27,0)	10,3 (4,0)	93,6 (36,5)
warkocze serowe	0	100	0	0	77,8 (3,5)
Łącznie Total	56,6	43,4	52,4 (18,6)	2,5 (0,9)	50,1 (17,8)

Wyniki w nawiasach dotyczą całej badanej populacji LAB
Results in brackets relate to the whole studied population of LAB

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań stwierdzono więc, że w badanych serach występuje wiele bakterii fermentacji mlekowej aktywnych wobec *Listeria*. Ustalono również, że największy potencjał antylisteryjny mają LAB uczestniczące w procesie produkcji gołek i bryndzy. Uzyskane wyniki wykazały jednocześnie, że mikroflora naszych serów ma znacznie większy potencjał antylisteryjny niż mikroflora innych opisanych w literaturze produktów regionalnych [Gurira i Buys 2005, Topisirovic i in. 2006].

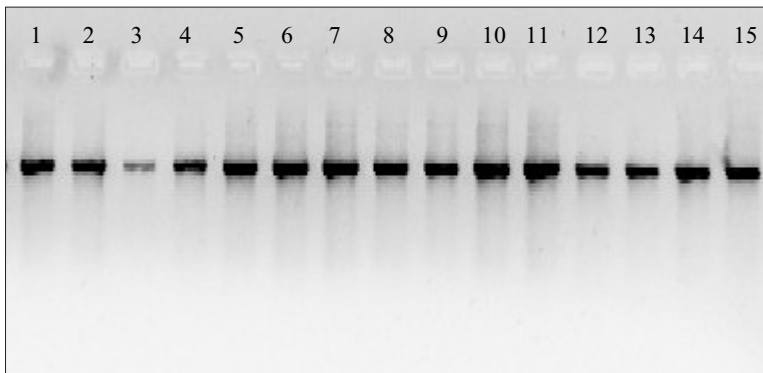
Analiza antylisteryjnej aktywności bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z serów regionalnych

355 aktywnych wobec *Listeria* kultur wyizolowanych z badanych serów poddano dalszym szczegółowym badaniom. Badania te miały na celu ustalenie przyczyn ich antagonizmu względem *Listeria*. Ich wyniki w syntetyczny sposób zebrano w tabeli 2.

Przeprowadzone badania wykazały, że aktywność większości badanych LAB była następstwem konkurencji i/lub syntezy pozakomórkowych metabolitów, którymi były głównie kwasy organiczne i H_2O_2 . Jedynie 13 izolatów, czyli zaledwie 2,5% aktywnych kultur było zdolnych do syntezy innych metabolitów działających na *Listeria*. Metabolity te nadawały aktywność zneutralizowanym i poddanym obróbce katalazą supernatantom ich płynów hodowlanych. Na podstawie doświadczeń innych autorów oraz wyników kolejnych badań stwierdzono, że związkami aktywnymi wobec *Listeria* były bakteriocyny [Parente i in. 1995, Sip i in. 2009]. Obecność kultur zdolnych do ich syntezy wykryto tylko w obrębie populacji LAB wyizolowanych z gołek.

Identyfikacja bakterii fermentacji mlekowej o najsilniejszej aktywności wobec *Listeria*

Do identyfikacji wytypowano 15 kultur o najsilniejszej bakteriobójczej aktywności względem *Listeria* (fot. 1). 13 z nich było zdolnych do syntezy bakteriocyn. Dwa pozostałe izolaty ograniczały natomiast wzrost *Listeria* jedynie w następstwie konkurencji.



1–15 amplicony 16S rDNA izolatów o najsilniejszej aktywności wobec *Listeria*
1–15 16S rDNA amplicons of isolates with superior antilisterial activity

Fot. 1. Elektroforetyczny rozdział ampliconów 16S rDNA
Phot. 1. Electrophoretical pattern of 16S rDNA amplicons

Bakterie zdolne do syntezy bakteriocyn zidentyfikowano jako *Lactococcus garvieae*, *Leuconostoc mesenteroides* oraz *Lactobacillus plantarum*. Ustalono również, że LAB,

których biomasa miała najsilniejsze działanie antylisteryjne, były bakteriami *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* oraz *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (tab. 3). Wszystkie zidentyfikowane bakterie wyizolowano z gołek. Analizując wyniki oznaczeń aktywności (testów dyfuzyjnych), stwierdzono również, że spośród wszystkich przebadanych prób najsilniej na *Listeria* działały ekstrakty bakteriocyn bakterii *Lactococcus garvieae*. Fakt ten potwierdzają załączone zdjęcia (fot. 2).

Tabela 3. Charakterystyka filogenetyczna bakterii fermentacji mlekowej o najsilniejszej aktywności względem *Listeria*

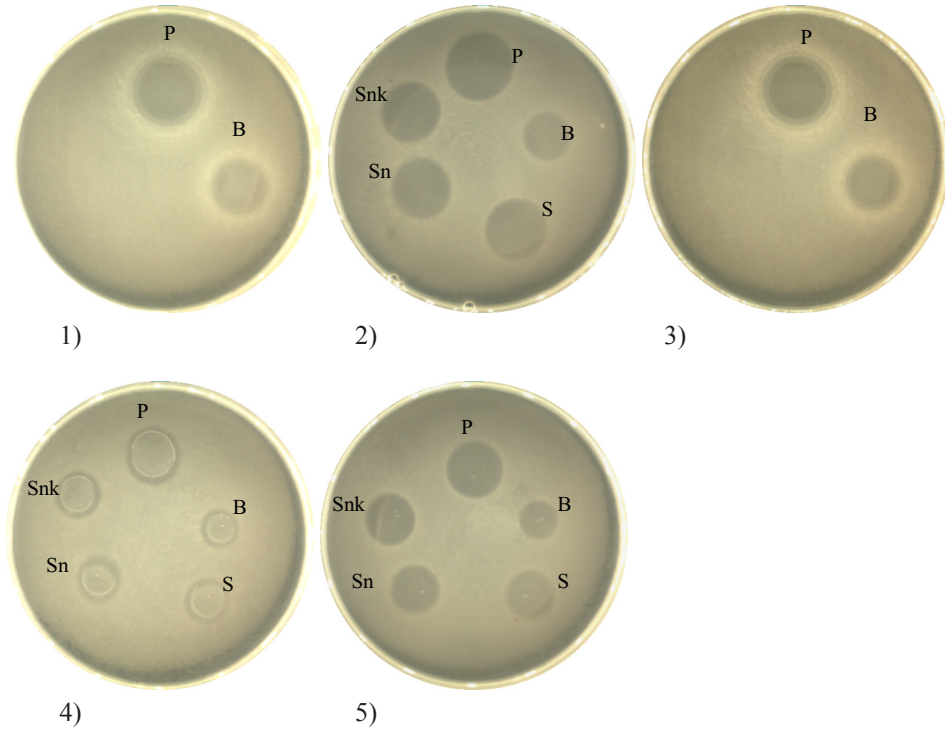
Table 3. Phylogenetic characterization lactic acid bacteria isolates with superior antilisterial activity

Oznaczenie próby Sample number	Morfologia komórek Cell morphology	Produkcja bakteriocyn Bacteriocin production	Obecność genów bakteriocyn klasy IIa Presence of class IIa bacteriocin coding gene	Długość analizowanej sekwencji Length of analyzed sequence	Wynik filogenetycznej identyfikacji* Phylogenetic identification result*
1	paciorowce G(+) streptococci G(+)	-	+	1500 pz	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
2	paciorowce G(+) streptococci G(+)	+	-	1500 pz	<i>Lactococcus garvieae</i>
3	paciorowce G(+) streptococci G(+)	-	+	1500 pz	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
4	paciorowce G(+) streptococci G(+)	+	-	1500 pz	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
5	pałeczki G(+) rods G(+)	+	+	1500 pz	<i>Lactobacillus plantarum</i>

*w oparciu o porównanie sekwencji ampikonów 16S rDNA
on the basis of sequence analysis of 16S rDNA amplicons

Zidentyfikowane w pracy bakterie *Lc. garvieae* pod względem fizjologicznym przypominają bakterie *Lc. lactis* [Elliot i in. 1991, Rodrigues i in. 1991]. W odróżnieniu od nich mogą być jednak chorobotwórcze dla ryb słodkowodnych i bydła rogatego [Cagiran 2004]. *Lactococcus garvieae* dobrze namnażają się w środowisku wodnym, zwłaszcza w zanieczyszczonych zbiornikach. Ich rozwojowi sprzyja gwałtowny wzrost temperatury do poziomu powyżej 15°C. Ze względu na to, że bakterie te mogą być przyczyną infekcji ryb słodkowodnych i powodować masowe ich śnięcia, zwłaszcza w okresach letnich, stanowią one duży problem dla hodowców ryb. Szczególnie wirulentne są one dla pstrąga tęczowego (LD₅₀=10) [Eldar i in. 1996, Kav i Erganis 2008]. *Lactococcus garvieae* mogą

powodować także *mastitis* u bydła rogatego. Ich wpływ na organizm człowieka nie został jeszcze dokładnie zbadany. Ustalono już jednak, że hemolizujące serotypy *Lc. garvieae* w organizmie człowieka mogą wywoływać objawy zbliżone do infekcji *Staphylococcus aureus*. Z tego też względu bakterie te przez niektórych autorów są uznawane za potencjalnie chorobotwórcze [Elliot i in. 1991, Kav i Erganis 2008].



Fot. 2. Strefy przejśnień powstałe w wyniku działania płynu hodowlanego (P), biomasy (B) oraz zewnątrzkomórkowych metabolitów (S, Sn, Snk) bakterii: 1) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, 2) *Lactococcus garvieae*, 3) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 4) *Leuconostoc mesenteroides*, 5) *Lactobacillus plantarum*; aktywność oznaczana metodą punktowo-dyfuzyjną względem bakterii *Listeria innocua*

Phot. 2. Inhibition zones caused by the activity of culture liquid (P), cell biomass (B) and extracellular metabolites (S, Sn, Snk) of the following bacteria): 1) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, 2) *Lactococcus garvieae*, 3) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 4) *Leuconostoc mesenteroides*, 5) *Lactobacillus plantarum*; antilisterial activity was evaluated against *Listeria innocua* by a diffusion test

Obecność *Lc. garvieae* w surowym mleku oraz serach produkowanych w warunkach chałupniczych została, jak dotąd, stwierdzona zaledwie przez kilku autorów [Villani i in. 2002]. Według nich była ona następstwem niskiej higieny produkcji. W związku z tym niezbędne wydaje się zbadanie źródeł obecności tych bakterii w analizowanych serach oraz ustalenie, czy są one bezpieczne dla człowieka.

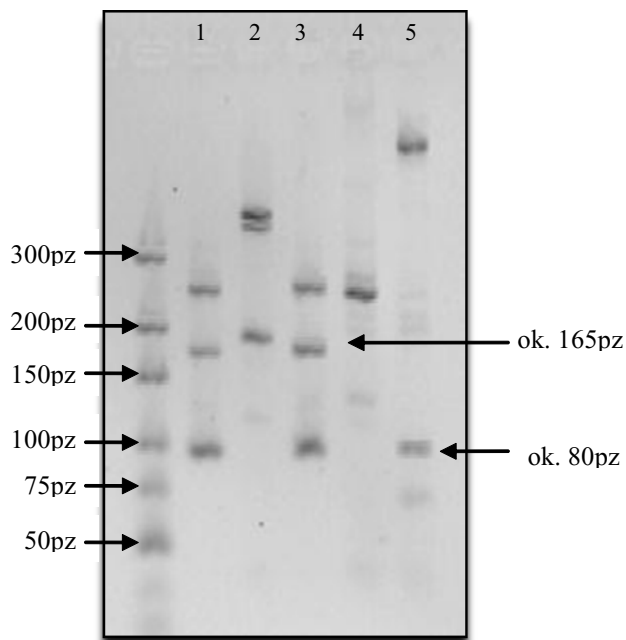
Na podstawie wyników przeprowadzonych badań stwierdzono również, że bakterie *Lc. garvieae* odgrywają ważną rolę w procesie produkcji gołek i kształtują ich właściwości

organoleptyczne (dane nieprezentowane). Z danych literaturowych wynika ponadto, że niektóre ich szczepy są zdolne do syntezy bakteriocyn lub innych bakteriobójczych peptydów działających na *Listeria* i *Clostridium*. Szczególnie silną aktywność wobec *Listeria* wykazuje garviecyna L1-5 – mała ($M_{cz} = 2,5\text{kDa}$), termostabilna bakteriocyna [Villani i in. 2002]. Można zatem przypuszczać, że bakterie te uczestniczą także w kształtowaniu trwałości produktów mlecznych. Zdolność do syntezy bakteriocyn mają też niektóre szczepy bakterii *Lactobacillus plantarum* i *Leuconostoc mesenteroides*. Kilka wytwarzanych przez nie bakteriocyn (np. pediocyna AcH, bakteriocyna AMA-K, mesenterycyna Y105), podobnie jak bakteriocyny zidentyfikowanych w pracy bakterii, wykazuje aktywność wobec *Listeria* [Todorov i in. 2008, Sip i in. 2009]. Z danych literaturowych wynika, że do syntezy listeriobójczych bakteriocyn klasy I (np. nizyny), klasy IIa (np. laktokokcyny MMFII) i klasy IIb (np. laktokokcyny A, B i M) i są zdolne także niektóre szczepy bakterii *Lc. lactis* [De Vuyst 1994, Morgan i in. 1995, Ferchichi i in. 2001]. Cechy tej nie wykryto jednak u izolatów pozyskanych w ramach pracy. Stwierdzono jedynie, że w następstwie konkurencji o składniki pokarmowe ograniczają one rozwój *Listeria*.

Zidentyfikowane bakterie przebadano także w kierunku obecności genów listeriobójczych bakteriocyn klasy IIa. Wszystkie bakteriocyny tej klasy wykazują bowiem silną aktywność względem *Listeria*. Aktywność tej klasy bakteriocyn wobec *Listeria* jest jednocześnie znacznie wyższa niż innych opisanych w literaturze bakteriocyn [Ennahar i in. 1999, 2000, Sip i in. 2009].

Przeprowadzone badania wykazały, że w genomie bakterii *Lb. plantarum* znajdują się poszukiwane geny. Ich obecności nie stwierdzono natomiast u zdolnych do syntezy bakteriocyn bakterii *Leu. mesenteroides* oraz bakterii *Lc. garvieae* (fot. 3). Na tej podstawie stwierdzono, że metabolity powyższych bakterii nie były bakteriocynami klasy IIa. Do klasy tej należały natomiast aktywne względem *Listeria* związki wytwarzane przez bakterie *Lb. plantarum*. Nieoczekiwanie w genomie bakterii oraz *Lc. lactis* subsp. *cremoris* i *Lc. lactis* subsp. *lactis*, których supernatanty płynów hodowlanych były pozbawione aktywności, wykryto obecność genów bakteriocyn klasy IIa.

W środowisku naturalnym laktokoki będące producentami bakteriocyn klasy IIa występują prawdopodobnie bardzo rzadko. Zdolność do syntezy tej klasy listeriobójczych bakteriocyn została bowiem, jak dotąd, stwierdzona zaledwie u jednego szczepu bakterii *Lc. lactis*, który wyizolowano z tradycyjnych tunezyjskich fermentowanych produktów mlecznych. Szczep ten był producentem laktokokcyny MMFII [Ferchichi i in. 2001]. W związku z tym, że *Lc. lactis* są powszechnie wykorzystywane w mleczarstwie, w wielu laboratoriach prowadzone są badania nad wprowadzaniem do nich genów bakteriocyn klasy IIa, głównie pediocyny AcH (nad otrzymywaniem na drodze rekombinacji bakteriocynopozytywnych listeriobójczych laktokoków) [Revirigo i in. 2004, Rodriguez i in. 2005]. W pracy pozyskano natomiast naturalne bakteriocynogenne *Lc. lactis*. Bakterie te mogą więc mieć olbrzymi potencjał aplikacyjny i być w przyszłości wykorzystywane do otrzymywania zabezpieczonych przed *Listeria* fermentowanych produktów mlecznych. W chwili obecnej niezbędne jest jednak wyjaśnienie przyczyn braku ekspresji genów listeriobójczych bakteriocyn u wyizolowanych *Lc. lactis*.



1 – *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, 2 – *Lactococcus garvieae*, 3 – *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*,
4 – *Leuconostoc mesenteroides*, 5 – *Lactobacillus plantarum*
produkty amplifikacji genów bakteriocyn klasy IIa mają masę ok. 165 i/lub 80 pz
amplicons of a class IIa bacteriocin gene coding fragment have approximately 80 bp and/or 165 bp

Fot. 3. Elektroforetyczny rozdział produktów amplifikacji genów bakteriocyn klasy IIa
Phot. 3. Gel electrophoresis of amplified class IIa bacteriocins gene coding fragments

Wstępna charakterystyka bakteriocyn aktywnych względem *Listeria*

W pracy dokonano również wstępnej charakterystyki aktywnych wobec *Listeria* bakteriocyn produkowanych przez bakterie *Lc. garvieae*, *Lc. mesenteroides* i *Lb. plantarum*. Charakterystyka bakteriocyn obejmowała badania ich wrażliwości na działanie enzymów, temperatury i pH.

Przeprowadzone testy wykazały, że listeriobójcze bakteriocyny wszystkich badanych bakterii były wrażliwe na działanie enzymów proteolitycznych (tab. 4). Podobnie jak większość bakteriocyn ulegały całkowitej inaktywacji pod wpływem działania pronazy E, proteinazy K, pepsyny, trypsyny oraz α -chymotrypsyny. Obróbka katalazą, lipazą i α -amylazą nie wpływała natomiast na ich aktywność. Na tej podstawie stwierdzono, że badane bakteriocyny były prostymi białkami.

Wszystkie badane bakteriocyny aktywne wobec *Listeria* były jednocześnie związkami o wysokiej termooporności. Wytrzymały 10-minutowe ogrzewanie w temperaturze 100°C. Częściowo traciły aktywność w trakcie dłuższego ogrzewania w temperaturze 100°C, a całkowitej inaktywacji ulegały dopiero po 15 min ogrzewania w temp. 121°C. Bakteriocyny wyizolowanych bakterii były też stabilne w środowisku o pH od 2,0 do 10,0. Pod względem właściwości fizykochemicznych przypominały więc większość opisanych w literaturze bakteriocyn aktywnych wobec *Listeria* [Ennahar i in. 1999, 2000, Sip i in. 2009].

W chwili obecnej badana jest struktura wstępnie scharakteryzowanych bakteriocyn oraz genetyczne podstawy ich biosyntezy. Wyniki tych badań powinny dostarczyć danych, na podstawie których możliwe będzie dokonanie dokładnej ich klasyfikacji oraz ustalenie, czy są one nowymi, czy może już opisanymi w literaturze bakteriocynami.

Tabela 4. Wpływ enzymów, ogrzewania i pH na aktywność bakteriocyn bakterii *Lactococcus garvieae*, *Leuconostoc mesenteroides* i *Lactobacillus plantarum*
Table 4. The effect of enzymes, heating and pH value on the activity of bacteriocins produced by *Lactococcus garvieae*, *Leuconostoc mesenteroides* i *Lactobacillus plantarum*

Obróbka Treatment	Aktywność* Activity [AU · ml ⁻¹]		
	<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
przed obróbką before treatment	1600	800	800
enzymy: enzymes:			
pronaza E pronase E	0	0	0
proteinaza K proteinase K	0	0	0
trypsyna trypsin	0	0	0
pepsyna pepsin	0	0	0
α -chymotrypsyna α -chymotrypsin	0	0	0
α -amylaza α -amylase	1600	800	800
lizozym lisosyme	1600	800	800
katalaza catalase	1600	800	800
lipaza lipase	1600	800	800
ogrzewanie: heating:			
10 min 80°C	1600	800	800
20 min 80°C	1600	800	800
30 min 80°C	1600	800	800
10 min 100°C	1600	800	800
20 min 100°C	800	400	400
30 min 100°C	400	400	400
15 min 121°C	0	0	0
pH:			
2,0–8,0 ($\Delta = 0,5$)	1600	800	800
8,5–9,5	800	800	800
10,0	800	400	400

*aktywność oznaczana metodą krytycznych rozcieńczeń względem bakterii *Listeria innocua*
activity evaluated by a dilution method regarding *Listeria innocua* cultures

PODSUMOWANIE

Przeprowadzone badania wykazały, że sery regionalne wytwarzane w okręgu tatrzańsko-beskidzkim są bogatym źródłem bakterii fermentacji mlekowej aktywnych wobec *Listeria*. Bakterie te w następstwie syntezy kwasów organicznych, H_2O_2 i bakteriocyn silnie ograniczają wzrost *Listeria*. Ustalono, że spośród wymienionych związków najsilniejszą aktywność wobec *Listeria* mają bakteriocyny, których producentami są bakterie *Lc. garvieae*, *Leu. mesenteroides* i *Lb. plantarum*. Silną aktywność listeriobójczą wykazuje również biomasa bakterii *Lc. lactis* subsp. *cremoris* i *Lc. lactis* subsp. *lactis*.

Badania molekularne wykazały, że bakteriocyna bakterii *Lb. plantarum* jest bakteriocyną klasy IIa i ma właściwości zbliżone do pediocyny AcH, która jest jednocześnie jedyną opisaną w literaturze bakteriocyną produkowaną przez *Lb. plantarum* [Ennahar i in. 1998]. Bakterie te nie są jednak typowymi jej producentami. Prawdopodobnie w efekcie horyzontalnego transferu genów nabyły zdolności do jej syntezy. Możliwe, że ze zjawiskiem tym mamy do czynienia również w przypadku bakterii *Lb. plantarum* pozyskanych z naszych serów.

Listeriobójcze bakteriocyny bakterii *Lc. garvieae* i *Leu. mesenteroides* nie były natomiast przedstawicielami bakteriocyn klasy IIa. W ich genomie nie wykryto bowiem charakterystycznych dla tej klasy bakteriocyn sekwencji nukleotydowych. Sekwencje te występowały natomiast w genomie bakterii *Lc. lactis*, które jednak w oparciu o wyniki testów hodowlanych uznano za bakteriocynonegatywne (nieprodukujące bakteriocyn). Negatywne wyniki testów aktywności nie są jednak jednoznacznym dowodem na to, że badane bakterie były pozbawione zdolności syntezy listeriobójczych bakteriocyn klasy IIa. Poszukiwane bakteriocyny mogły być bowiem produkowane przez *Lc. lactis* w stężeniu zbyt niskim, by możliwe było dokonanie ich detekcji mało czułymi metodami dyfuzyjnymi przedstawionymi w pracy. Powszechnie wiadomo również, że *Lc. lactis* mają silną aktywność proteolityczną. Jeżeli więc procesowi produkcji enzymów proteolitycznych towarzyszy produkcja bakteriocyn, to związki te mogą ulec inaktywacji w środowisku hodowlanym. W świetle tych danych niezbędne wydaje się przeprowadzenie dokładnych badań hodowlanych i molekularnych w celu ustalenia korelacji pomiędzy występowaniem genów listeriobójczych bakteriocyn a ich ekspresją. Zagadnienia te są już przedmiotem badań prowadzonych przez autorów pracy.

Z uwagi na niski próg detekcji metod dyfuzyjnych stosowanych jako główne narzędzie skринingowe celowe wydaje się również przebadanie wszystkich pozyskanych w ramach pracy kultur pod kątem obecności genów bakteriocyn klasy IIa. Badania te powinny pozwolić na pozyskanie większej ilości kultur o listeriobójczym potencjale bakteriocynowym.

PIŚMIENNICTWO

- Abee T., Krockel L., Hill C., 1995. Bacteriocins, modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.*, 28, 169–185.
- Alvarado C., Garcia-Almendarez B.E., Martin S.E., Regalado C., 2005. Anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan mexican-style cheese. *Current Microbiol.*, 51, 110–115.

- Belgacem Z.B., Ferchichi M., Prevost H., Dusset X., Monai M., 2008. Screening for anti-listerial bacteriocin-producing lactic acid bacteria from "gueddid" a traditionally Tunisian fermented meat. *Meat Sci.*, 78, 513–521.
- Cagiran H., 2004. Biotyping of *Lactococcus garvieae* isolated from Turkey. *J. Fish. Aquatic Sci.*, 21, 267–269.
- Casia D., Requena T., Gomez R., 1996. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus curvatus* IFPL105. *J. Appl. Microbiol.*, 81, 35–41.
- CDC, 2000. Multistate outbreak of listeriosis – United States, 2000. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 49, 1129–1130.
- Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., Chikindas M.L., 2001. Bacteriocins, safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 1–20.
- Cole M., Jones M., Holyoak C., 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.*, 69, 63–69.
- Cordano A.M., Rocourt J., 2001. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. *Int. J. Food Microbiol.*, 70, 175–178.
- Daeschel M.A., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.*, 1, 164–167.
- De Vuyst L., 1994. Bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains, [w:] Bacteriocins of lactic acid bacteria. Ed. De Vuyst L I Vandamme E, London 1994, 143–149.
- Doganay M., 2003. Listeriosis, clinical presentation. *FEMS Immunol. Medic. Microbiol.*, 35, 173–175.
- Durmaz H., 2008. Fate of *Listeria monocytogenes* in Carra cheese during manufacture and ripening. *J. Food Safety*, 29, 253–260.
- Eldat A., Ghittino C., Asanta L., Bozzetta E., Gorla M., Prearo M., Bercovier H., 1996. *Enterococcus serolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Current Microbiol.*, 32, 85–88.
- Elliot J.A., Collins M.D., Pigott N.E., Facklam R.R., 1991. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 2731–2734.
- Ennahar S., Assobhei O., Hasselmann C., 1996. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE92. *J. Food Protect.*, 61, 186–191.
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A., 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev.*, 24, 85–106.
- Ennahar S., Sonomoto K., Ishizaki A., 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria, antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. Bioeng.*, 87, 705–716.
- Faber J.M., Peterkin P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiol Rev.*, 55, 476–511.
- Ferchichi M., Fere J., Mabrouk K., Monai M., 2001: Lactococcin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a Tunisian dairy product. *FEMS Microbiol. Letters*, 205, 49–55.
- Galvez A., Abriouel H., Lopez R.L., Omar N.B., 2007. Bacteriocin-based strategies for food bio-preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 120, 51–70.
- Gameiro N., Ferreira-Dias S., Ferreira M., Brito L., 2007. Evolution of *Listeria monocytogenes* populations during the ripening of naturally contaminated raw ewe's milk cheese. *Food Control*, 18, 1258–1262.
- Gandhi M., Chikindas M. L., 2007. *Listeria*, a foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.*, 113, 1–15.

- Grajek W., Sip A., 2004. Biologiczne utrwalanie żywności z wykorzystaniem metabolitów bakterii mlekowych, [w:] Bakterie fermentacji mlekowej. Klasyfikacja, metabolizm, genetyka, wykorzystanie. Red. Libudysz Z., Wyd. Politechniki Łódzkiej, 175–226.
- Guerra M.M., McLauchlin J.M., Bernardo F.A., 2001. *Listeria* in ready to eat unprocessed foods produced in Portugal. *Food Microbiol.*, 18, 423–429.
- Gurira O.Z., Buys E.M., 2005. Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. *Food Microbiol.*, 22, 159–168.
- Hansen J.N., 1994. Nisin as a model food preservative. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 34, 69–93.
- Kav K., Erganis O., 2008. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout farms. *Biuletyn Inst. Wet. Puławy*, 52, 223–226.
- Little C.L., Rhoades J.R., Sago S.K., Harris J., Greenwood M., Mithani V., Grant K., McLauchlin J., 2008. Microbiological quality of retail cheese made from raw, thermized or pasteurized milk in UK. *Food Microbiol.*, 25, 304–312.
- Liu D., 2008. Epidemiology, [in:] *Handbook of Listeria monocytogenes*. Red. Liu D. CRC Press, New York, 27–60.
- Loncarevic S., Danielsson-Tham M.L., Tham W., 1995. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semisoft cheeses in retail outlets in Sweden. *Int. J. Food Microbiol.*, 26, 245–250.
- Lovett J., 1989. *Listeria monocytogenes*, [in:] *Foodborne bacterial pathogens*. Marcel Dekker, New York, 283–310.
- McLauchlin J., Mitchell R.T., Smerdon W.J., Jewell J., 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis, a hazard characterization for use in microbiological risk assessment of food. *Int. J. Food Microbiol.*, 92, 15–33.
- Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., Mccaig L. F., Bresse J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V., 1999. Food-related illness and death in United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 607–625.
- Morgan S., Rossand R.P., Hill C., 1995. Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococcin A, B and M. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2995–3001.
- Noves E., Silva A.C., Roche S.M., Velge P., Brito L., 2008. Virulence of *Listeria monocytogenes* isolated from the cheese dairy environment, other foods and clinical cases. *J. Med. Microbiol.*, 57, 411–415.
- O’Sullivan L., Ross R.P., Hill C., 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochemie*, 84, 593–604.
- Okutani A., Yumiko O., Yamamoto S., Igimi S., 2004. Overview of *Listeria monocytogenes* contamination. *Int. J. Food Microbiol.*, 93, 131–140.
- Orndorff P.E., Hamrick T.S., Smoak I.W., Havell E.A., 2006. Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. *Vet. Microbiol.*, 114, 1–15.
- Parente E., Brienza C., Moles M., Ricciardi A., 1995. A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *J. Microbiol. Methods*, 22, 95–108.
- Reviriego C., Fernandez A., Horn N., Rodriguez E., Martin M.L., Fernandez L., Rodriguez J.M., 2004. Production of pediocin PA-1, and coproduction of nisin A and pediocin PA-1, by *Lactococcus lactis* strains of dairy origin. *Int. Dairy J.*, 15, 45–49.
- Rodrigues U.M., Aguirre M., Facklam R.R., Collins M.D., 1991. Specific and intraspecific molecular typing of lactococci based on polymorphism of DNA encoding rRNA. *J. Appl. Bacteriol.*, 71, 509–516.
- Rodriguez E., Calzada J., Arques J.L., Rodriguez J.M., Nunez M., Medina M., 2005. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *Int. Dairy J.*, 15, 51–57.
- Schlech W.F., 1996. Overview of listeriosis. *Food Control*, 4/5, 183–186.
- Schlech W.F., 2000. Foodborne listeriosis. *Clin. Infect. Dis.*, 31, 770–775.

- Silva M.C.D, Almeida R.C.C., Alves M.A.O., Almeida P.F., 2003. Occurrence of *Listeria* spp. in critical points and the environment of Minas Frescal cheese processing. *Int. J. Food Microbiol.*, 81, 241–248.
- Silva M.C.D., Hofer E., Tibana A., 1998. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Food Protect.*, 61, 354–356.
- Sip A., Krasowska M., Więckowicz M., Grajek W., 2009. Metody skryningu bakteriocynogennych bakterii fermentacji mlekowej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1, 5–26.
- Sip A., Więckowicz M., Krasowska M., 2009. Charakterystyka listeriobójczych bakteriocyn bakterii fermentacji mlekowej klasy IIa. *Biotechnologia (w druku)*.
- Sorbino-Lopez A., Martin-Beloso O., 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *Int. Dairy J.*, 18, 329–343.
- Tauxe R.V., 2002. Emerging foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*, 78, 31–41.
- Todorov S.D., Dicks L.M.T., 2006. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria, comparison of the bacteriocins. *Process Biochem.*, 41, 11–19.
- Todorov S.D., Nyati H., Meincken M., Dicks L.M.T., 2007. Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. *Food Control*, 18, 656–664.
- Topisirovic L., Kojic M., Fire D., Golic N., Strahinic I., Lozo J., 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 112, 230–235.
- Wagner M., McLaughlin J., 2008. Biology, [in:] *Handbook of Listeria monocytogenes*. Red. Liu D. CRC Press, New York, 3–26.
- Villani F., Aponte M., Blaiotta G., Maurello G., Pepe O., Moschetti G., 2002. Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *J. Appl. Microbiol.*, 90, 430–439.

OCCURRENCE OF LACTIC ACID BACTERIA WITH ACTIVITY AGAINST *LISTERIA* IN POLISH REGIONAL CHEESES PRODUCED IN THE TATRZAŃSKO-BESKIDZKI DISTRICT

Abstract. The main objective of this study was the isolation and selection of lactic acid bacteria capable of showing antagonistic activity against *Listeria*. The main factors contributing to such activity were examined and characterized and strains with superior antilisterial activity were selected and identified as well. Furthermore, a PCR analysis of genomic DNA isolated from strains with relevant antilisterial activity was performed in order to determine, whether these bacteria are capable of producing class IIa antilisterial bacteriocins. Five different polish artisanal cheeses were chosen as a source of isolation of bacterial strains: bundz, bryndza, non-smoked golka, smoked golka and warkocze. The isolated microorganisms were primarily cultivated on MRS and M17 media. The antilisterial activity was evaluated by diffusion tests against an indicator strain – *Listeria innocua*. Phylogenetic identification of the strains with highest antilisterial activity was performed by 16S rDNA sequencing. The presence of class IIa bacteriocin coding gene within the genome of selected strains was detected using a panel of degenerate PCR primers. About 1000 cultures of lactic acid bacteria were obtained during the studies presented in this paper. Nearly one third of these cultures showed an antagonistic activity against *Listeria*. The greatest number of active strains were among the lactic acid bacteria isolated from bryndza and non-smoked golka and these strains were able to synthesize mainly hydrogen peroxide and organic acids.

Only less than 1% of examined bacteria showed the ability of synthesizing other metabolites with antilisterial activity – the bacteriocins. Strains identified as *Lactococcus garvieae*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* showed the ability to synthesize such metabolites. Furthermore, the presence of class IIa bacteriocin coding gene within the genomic DNA of these bacteria was also detected. The structure, modes of action and biosynthesis pathways of bacteriocins synthesized by *Lc. garvieae*, *Leu. mesenteroides* and *Lb. plantarum* are still examined by the authors.

Key words: polish regional cheeses, *Listeria monocytogenes*, lactic acid bacteria, antilisterial activity, IIa class bacteriocins

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2009

Do cytowania – For citation: Sip A., Więckowicz M., Olejnik-Schmidt A., Gardo A., Gorlas R., Grajek W., 2009. Występowanie bakterii fermentacji mlekowej aktywnych względem *Listeria* w serach regionalnych wytwarzanych w okręgu tatrzańsko-beskidzkim. Acta Sci. Pol. Biotechnol. 8(2), 27–44.

SPIS TREŚCI CONTENTS

Grzegorz Szczepaniak, Anna Rodziewicz, Katarzyna Baranowska

- Aktywność keratynolityczna oraz tworzenie
biofilmu przez monokultury i kultury mieszane
bakterii i drożdży..... 3
Keratinolytic activity and biofilm formation by single
and dual cultures of bacteria and yeast

Danuta Witkowska, Justyna Stolaś, Anna Kancelista, Michał Piegza

- Uzdolnienia lityczne grzybów z rodzaju *Trichoderma*
w obecności biomasy fitopatogenów..... 17
Lytic capability of *Trichoderma* moulds
in the presence of phytopathogenic biomass

Anna Sip, Michał Więckowicz, Agnieszka Olejnik-Schmidt, Anna Gardo, Roksana Gorlas, Włodzimierz Grajek

- Występowanie bakterii fermentacji mlekowej aktywnych względem *Listeria*
w serach regionalnych wytwarzanych w okręgu tatrzańsko-beskidzkim 27
Occurrence of lactic acid bacteria with activity against *Listeria* in polish regional
cheeses produced in the tatrzańsko-beskidzki district