



MIKROBIOLOGIA ŚRODOWISKOWA I PRZEMYSŁOWA

AKTUALNE TRENDY ORAZ PERSPEKTYWY

Redakcja:
Kinga Kalbarczyk, Kamil Maciąg

Lublin 2023

**Mikrobiologia środowiskowa
i przemysłowa: aktualne trendy
oraz perspektywy**

Mikrobiologia środowiskowa i przemysłowa: aktualne trendy oraz perspektywy

Redakcja:
Kinga Kalbarczyk
Kamil Maciąg

Lublin 2023

**Wydawnictwo Naukowe TYGIEL składa serdeczne podziękowania
zespółowi Recenzentów za zaangażowanie w dokonane recenzje
oraz merytoryczne wskazówki dla Autorów.**

Recenzentami niniejszej monografii byli:

- prof. dr hab. inż. Elżbieta Zofia Płaskowska
- dr hab. Urszula Kosikowska
- dr hab. Łukasz Łacmański, prof. IITD PAN
- dr hab. n. med. Agnieszka Magryś
- dr hab. Danuta Witkowska
- dr Karolina Archacka
- dr n. farm. Anna Biernasiuk
- dr inż. Radosław Drozd
- dr Małgorzata Dziekiewicz-Mrugasiewicz
- dr inż. Agata Fabiszewska
- dr inż. Magdalena Frąk
- dr n. o zdr. Mariola Janiszewska
- dr Agnieszka Kuźniar
- dr inż. Aneta Pater
- dr inż. Agnieszka Pluta-Kubica

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:

Monika Maciąg

Projekt okładki:

Marcin Szklarczyk

Korekta:

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.

ISBN 978-83-67881-10-4

Wydawca:

Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.

ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin

www.wydawnictwo-tygiel.pl

Spis treści

Bartosz Rył

Porównanie wrażliwości *Fusarium oxysporum* i *Fusarium culmorum* na olejki eteryczne z szyszek chmielu 7

Paulina Czoska, Renata Głońska, Krzysztof Piotr Bielawski, Magda Rybicka

Wpływ przeciwciał IgY izolowanych z żółtka jaja kurzego na przeżywalność bakterii *Campylobacter jejuni*..... 19

Aleksandra Banaszczyk, Joanna Nowicka, Rafał Wiench, Piotr Kuroпка, Magdalena Pajczkowska

Ocena optymalnego czasu wchłaniania błękitu toluidyny i kurkuminy przez wybrane drobnoustroje – badania wstępne 27

Sylwia Rząd-Kosidło

Wpływ fermentacji mlekowej na przebieg procesu technologicznego i wybrane wyróżniki jakościowe piwa 41

Katarzyna Guz-Regner, Maciej Wernecki

Antagonizm hodowlanych bakterii izolowanych z wód torfowych („Żurawie Bagno”, lubuskie)..... 59

Karolina Zygmunt, Wojciech Witarski, Katarzyna Piórkowska

Wpływ wybranych pożywek hodowlanych na proliferację bydłeczych komórek satelitarnych *in vitro* 81

Klaudia Tettefer, Agnieszka Rożek, Anna Czarnecka-Skwarek

Wpływ bakterii cyklu siarkowego oraz materii ilastej na powstawanie żelazowych faz siarczkowych 90

Katarzyna Guz-Regner, Nicole Kryniecka

Wydajność produkcji biocelulozy przez *Acetobacter xylinus* w hodowlach na bazie buforu cytrynianowo-fosforanowego 100

Dorota Wiczorek, Katarzyna Miśkiewicz, Dorota Gendaszewska

Wpływ czynników środowiskowych na dimorfizm drożdży *Yarrowia lipolytica* i biosyntezę proteaz zewnątrzkomórkowych 111

Marta Pietrzak, Katarzyna Prochoń, Anna Lisowska, Natalia Wrońska

Celuloza bakteryjna – zastosowanie w medycynie oraz perspektywy na przyszłość 128

Monika Asztemborska

Mykoremediacja – przykład remediacji gleby skażonej radioizotopami 135

Weronika Brudz, Aleksandra Omelaniuk, Wanesa Sasal, Dawid Gniazdo Funkcje bakteryjnych białek z rodziny IgaA.....	151
Sylwia Andrzejczak-Grządko, Joanna Lindecka, Roksana Zadworna, Ewa Bigus Ocena zdolności szczepów <i>Staphylococcus aureus</i> izolowanych od zwierząt do tworzenia biofilmu	158
Arkadiusz Marek Płatek Bakterie <i>Bacillus subtilis</i> w produkcji zwierzęcej – definicja, schemat działania, celowość stosowania, zalecenia, korzyści	168
Natalia Rosłonowska, Martyna Wilk Mykotoksyny w paszach dla drobiu	176
Marianna Gos, Olga Fidecka, Aleksandra Gumowska, Dominika Jankowska, Joanna Banasiewicz Próba identyfikacji wybranych izolatów bakterii z ekranów dotykowych automatów do odbierania paczek.....	188
Dawid Gmiter, Weronika Brudz, Aleksandra Omelaniuk, Anna Kowalik, Julia Jurkiewicz Wprowadzenie do analizy genomów bakteryjnych: kontrola jakości, składanie i adnotacja funkcjonalna	200
Indeks Autorów	212

Porównanie wrażliwości *Fusarium oxysporum* i *Fusarium culmorum* na olejki eteryczne z szyszek chmielu

1. Wprowadzenie

Pestycydy stosowane są w uprawach roślin od dekad. Ich zadaniem jest ochrona roślin uprawnych przed agrofagami, które przyczyniają się do utraty plonów i pogorszenia ich jakości [1]. Światowe zużycie pestycydów w latach 2000-2019 wzrosło o 36% osiągając wartość 4,2 mln ton [2], z czego około 47,5% stanowią herbicydy, 29,5% insektycydy, 17,5% fungicydy, 5,5% – inne [3]. Pomimo pozytywnych aspektów związanych z zastosowaniem tych preparatów, ich wykorzystanie niesie za sobą szereg zagrożeń. Syntetyczne pestycydy nie są obojętne dla środowiska, w szczególności flory i fauny. Część z nich należy do związków trudnodegradowalnych [4]. Związki te wykrywane są zarówno w ekosystemach lądowych, jak i wodnych, co potęguje efekt akumulacji w tkankach organizmów żywych [5]. Problemy środowiskowe wywoływane stosowaniem pestycydów to m.in. skażenie wód powierzchniowych i gruntowych, będące efektem splukiwania tych preparatów wraz z opadem atmosferycznym, skażenie gleb, a w konsekwencji zniszczenie pożytecznej autochtonicznej mikrobioty glebowej oraz przedostawanie się polutantów do powietrza atmosferycznego [1], czego efektem jest oddziaływanie środków ochrony roślin na organizmy nie będące zamierzonym celem ich stosowania i spadek bioróżnorodności [4].

Preparaty stosowane w ochronie roślin nie są obojętne także dla zdrowia człowieka. Występowanie zmian chorobowych w efekcie ekspozycji na pestycydy zależy nie tylko od jednostkowej szkodliwości poszczególnych związków chemicznych wchodzących w ich skład, ale także od stopnia narażenia na kontakt z tym czynnikiem i podatności osobniczej. Wśród osób bardziej narażonych wyróżnia się dzieci, kobiety ciężarne oraz ludzie w podeszłym wieku [6]. W organizmach zwierząt środki te mogą być metabolizowane do innych związków, które są wydalane lub mogą podlegać bioakumulacji w tkance tłuszczowej [7]. Wśród chorób do których wystąpienia mogą przyczyniać się syntetyczne środki ochrony roślin można wyróżnić: zmiany nowotworowe: m.in. oponiak [8], rak pęcherza [9, 10], rak płuc [11], rak jelita grubego [12], rak piersi [13], białaczka [14], a także choroba Parkinsona [15], cukrzyca typu II [16] i zmniejszenie płodności u mężczyzn [17]. Jako rozwiązanie problemu związanego ze szkodliwością syntetycznych pestycydów oraz faktem, że zrezygnowanie z ich użytkowania we współczesnym rolnictwie wydaje się niemożliwe, nasuwa się potrzeba opracowania bezpieczniejszych, mniej toksycznych, działających wysoce specyficznie, łatwiej biodegradowalnych preparatów.

Potencjalnym źródłem związków chemicznych wykazujących szerokie spektrum aktywności biologicznej są rośliny wyższe. Obecnie znanych jest ponad 381 tysięcy

¹ bartoszyryl@gmail.com, Koło Naukowe Biotechnologów, Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski; www.uni.opole.pl; Szkoła Doktorska Uniwersytetu Opolskiego, Wydział Chemii, Katedra Farmacji i Chemii Ekologicznej, Uniwersytet Opolski, www.uni.opole.pl.

takich roślin [18]. Źródłem dwóch trzecich nowo identyfikowanych rocznie związków chemicznych są rośliny wyższe [19] – do tej pory odkryto ponad 8000 substancji pochodzenia roślinnego [20]. Różnego rodzaju ekstrakty roślinne, żywice, olejki eteryczne i poszczególne fitozwiązki są więc szeroko badane nie tylko pod względem potencjalnego zastosowania medycznego [21], ale także jako środki ochrony roślin – określane zbiorczo jako „green pesticides” [22]. Termin ten odnosi się do środków stosowanych do zwalczania szkodników roślin, zachowujących przy tym takie właściwości, jak: wyższa kompatybilność z komponentami środowiska niż w przypadku syntetycznych pestycydów [23], większe bezpieczeństwo dla zdrowia człowieka i środowiska [24, 25], łatwa biodegradacja [25, 26], możliwość stosowania w uprawach ekologicznych i wysoki stopień akceptacji społecznej [26].

Chmiel zwyczajny (*Humulus lupulus* L.) od wieków wykorzystywany jest w piwowarstwie, nie tylko ze względów na walory sensoryczne, jakie wnosi do produktu finalnego, ale także z racji jego działania konserwującego. We wcześniejszych badaniach własnych dowiedziono aktywności olejków eterycznych z szyszek chmielu wobec bakterii [27]. W światowej literaturze jest niewiele doniesień dotyczących wrażliwości grzybów strzępkowych z rodzaju *Fusarium*, będących jednymi z najgroźniejszych patogenów roślin [28], na olejki eteryczne pozyskiwane z chmielu.

2. Materiały i metody

Materiał roślinny stanowiły szyszki chmielu *Humulus lupulus* L. trzech odmian – Marynka, Iunga oraz Lubelski. Wykorzystany materiał dostępny był w formie suszonych szyszek chmielowych, pochodzących ze zbiorów w Puławach, zapakowanych próżniowo w worki z nieprzezroczystego tworzywa sztucznego. Olejki eteryczne sporządzono z wykorzystaniem techniki hydrodestylacji w aparacie Derynga. W tym celu w kolbie okrągłodennej umieszczono odważone porcje szyszek chmielu poszczególnych odmian (50 g), zalewano porcją wody destylowanej tak, by lustro cieczy przykryło materiał roślinny (500 cm³). Kolbę połączoną z nasadką aparatu Derynga ogrzewano do osiągnięcia wrzenia. Od rozpoczęcia wrzenia cieczy proces hydrodestylacji prowadzono przez 1,5 godziny. Po zakończeniu procesu określano objętość uzyskanego ekstraktu i zlewano olejek do probówki typu Eppendorf, uszczelnionej następnie przy użyciu warstwy parafilmu i zabezpieczonej folią aluminiową przed dostępem promieni słonecznych. Pozyskane olejki eteryczne przechowywano w chłodziarce, w temperaturze 4±2°C do czasu rozpoczęcia dalszych badań. Wstępny zakres badań zakładał otrzymanie olejku eterycznego z szyszek chmielu wszystkich trzech odmian, jednak okazało się, że uzyskano niesatysfakcjonującą ilość olejku eterycznego z szyszek chmielu odmiany Lubelski przy wykorzystaniu tej metody: z jednego cyklu hydrodestylacji (50 g szyszek chmielu) uzyskiwano olejek eteryczny w objętości >0,1 cm³, co uniemożliwiało odebranie porcji olejku eterycznego z odbieralnika aparatu. Ostateczna hipoteza badawcza musiała więc ulec zmianie – ograniczono się jedynie do badań aktywności przeciwgrzybiczej ekstraktów pozyskanych z szyszek chmielu odmian Marynka i Iunga.

Aktywność przeciwmikrobiologiczna uzyskanych ekstraktów badana była wobec materiału biologicznego, który stanowiły dwa szczepy fitopatogennych grzybów strzępkowych wyizolowanych z porażonych ziarniaków pszenicy – *Fusarium oxysporum* i *Fusarium culmorum*. Do oceny aktywności przeciwgrzybiczej ekstraktów zastosowano metodę zatrucia podłoża. Jako stałe podłoże hodowlane w badaniach zastosowano

agar glukozowo-ziemniaczany (PDA, ang. *Potato Dextrose Agar*). Próbę kontrolną względną stanowiło podłoże PDA bez dodatku ekstraktów z szyszek chmielu, natomiast próby badawcze stanowiło podłoże PDA z dodatkami olejków eterycznych z szyszek chmielu w stężeniach: 0,25%; 0,50%; 0,75%; 1,00% i 1,50% dla olejku z szyszek chmielu odmiany Marynka oraz 0,25%; 0,50% i 0,75% dla olejku z szyszek chmielu odmiany Iunga. Przedziały stężeń ekstraktów zastosowanych w badaniach limitowane były uzyskaną ilością olejków eterycznych i wysokim zapotrzebowaniem na preparat o potencjalnym charakterze przeciwwgrzybicznym w zastosowanej metodzie. Bezwzględna próba kontrolną stanowił natomiast komercyjny olejek eteryczny z tymianku firmy ETJA – badania przeprowadzono w przedziale stężeń – 0,25%; 0,50%; 0,75%; 1,00% i 1,50%. Jałowe podłoże PDA rozlane miarowo (20 cm³) do kolb stożkowych upłynniano i schładzano do temperatury ok. 40°C. W przypadku prób badawczych do upłynnionego podłoża wprowadzano miarowo objętości poszczególnych ekstraktów odpowiadające zadanym stężeniom. Tak przygotowane próby dokładnie mieszano. Tak sporządzone podłoża hodowlane wylewano do szalek Petriego o średnicy 85 mm i po zestaleniu centralnie wykładano inokulum grzyba w postaci krążka. Krążki inokulum o średnicy 10 mm wycinano opalonym korboborem z 10-dobowych hodowli *F. oxysporum* i *F. culmorum* rosnących na podłożu Martina, inkubowanym w temperaturze 25 ±3°C. Przygotowane próby inkubowano w temperaturze 25 ±3°C przez 14 dni, dokonując co 24 godziny linearnego pomiaru grzybni. W każdej z prób pobierano dwa pomiary – odległości między dwoma najbardziej oddalonymi krawędziami grzybni oraz wymiaru w płaszczyźnie pod kątem prostym do płaszczyzny pierwszego pomiaru. Wyniki stref wzrostu podano w milimetrach, w wielkość stref wzrostu grzybni wliczono średnicę krążka inokulum. Na podstawie uzyskanych wyników stref wzrostu grzybni obliczono indeksy tempa wzrostu (T) według wzoru [29]:

$$T = \frac{A}{D} + \frac{b_1}{d_1} + \dots + \frac{b_x}{d_x} \quad (1)$$

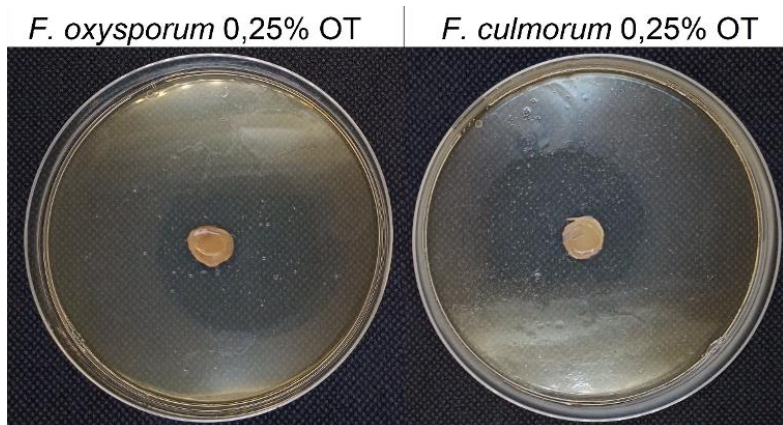
gdzie: T – indeks tempa wzrostu, A – średnia arytmetyczna z pomiarów kolonii grzyba [mm], D – czas trwania doświadczenia [dni], b1(...)*b*_x – przyrost średnicy kolonii [mm], d1(...)*d*_x – liczba dni od ostatniego pomiaru.

3. Wyniki badań

Ekstrakty uzyskane z materiału roślinnego na drodze hydrodestylacji w aparacie Derynga miały słomkowo-żółtą barwę i intensywny aromat zbliżony do aromatu suszonych szyszek chmielu. Uzyskane objętości ekstraktów z szyszek chmielu poszczególnych odmian przy wykorzystaniu tej metody różniły się znacznie – najlepszy wynik osiągnięto dla hydrodestylacji szyszek chmielu odmiany Marynka (ok. 1,0 cm³ ze 100 g suchego materiału roślinnego), w przypadku odmiany Iunga wynosił on 0,5 cm³ ze 100 g suszonej szyszki chmielowej. Natomiast dla odmiany Lubelski uzyskano śladowe ilości olejku przy wykorzystaniu tej techniki (poniżej 0,1 cm³ ze 100 g materiału roślinnego), co uniemożliwiało pobranie ekstraktu z odbieralnika aparatu. Ilość otrzymanych olejków eterycznych przy wykorzystaniu tej techniki była więc limitowana poprzez ilość uzyskanego ekstraktu z szyszek chmielu konkretnych odmian, co w dalszym postępowaniu przekładało się na ograniczenie zakresu przeprowadzonych z wykorzystaniem tych ekstraktów badań.

Otrzymane ekstrakty z szyszek chmielu odmian Marynka i Iunga wykorzystane zostały w dalszym etapie badań – określono ich aktywność hamującą wzrost dwóch fitopatogennych gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium* – *Fusarium oxysporum* i *Fusarium culmorum*.

Metodą zatruwania podłoży oceniono wrażliwość *F. oxysporum* oraz *F. culmorum* na uzyskane olejki eteryczne z szyszek chmielu odmian Marynka i Iunga. Uzyskano zróżnicowane wyniki zahamowania wzrostu, zarówno ze względu na odmianę chmielu, z której pozyskano ekstrakt, jak i gatunek *Fusarium*, wobec którego zastosowano olejki. Uzyskane wyniki indeksów tempa wzrostu (T) dla prób kontrolnych wyniosły: $T = 81,09 \pm 0,75$ w przypadku *F. oxysporum* oraz $T = 83,04 \pm 4,25$ dla *F. culmorum*. Najniższe stężenie (0,25%) olejku z szyszek chmielu odmiany Marynka spowodowało nieznaczną stymulację wzrostu *F. oxysporum*. Silniejszą aktywnością hamującą w najwyższym stężeniu zastosowanym dla obu badanych ekstraktów (0,75%) cechował się olejek z szyszek chmielu odmiany Iunga. Także w stężeniach 0,25% i 0,50% olejek z szyszek chmielu odmiany Iunga cechował się wyższą aktywnością hamującą wzrost tego grzyba. Najniższą wartość T odnotowano dla najwyższego analizowanego stężenia olejku z szyszek chmielu odmiany Marynka (1,50%) – wyniosła ona $61,46 \pm 2,83$ (dla *F. oxysporum*). Szczep *Fusarium oxysporum* cechował się wyższą wrażliwością na olejki eteryczne z szyszek chmielu obu odmian. Zastosowany jako bezwzględna próba kontrolna handlowy olejek tymiankowy firmy ETJA hamował w pełni rozwój obu szczepów *Fusarium* już w najniższym badanym stężeniu (rys. 1.). Wyniki uzyskanych indeksów tempa wzrostu przedstawiono w tabeli 1.



Rysunek 1. Reakcja *Fusarium oxysporum* i *Fusarium culmorum* na handlowy olejek eteryczny z tymianku firmy ETJA; 0,25% OT – olejek eteryczny z tymianku w stężeniu 0,25% [opracowanie własne]

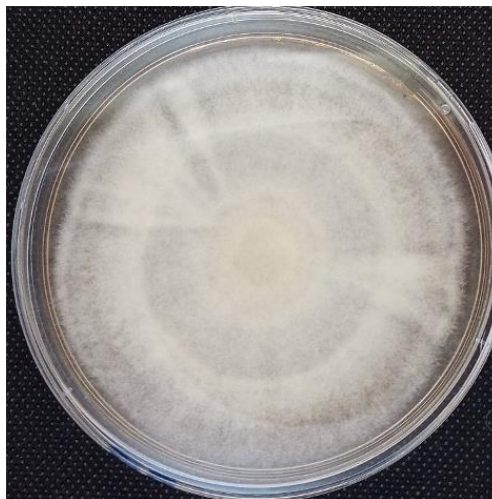
Tabela 1. Indeksy tempa wzrostu uzyskane przy zastosowaniu olejków eterycznych z szyszek chmielu wobec *F. oxysporum* i *F. culmorum*

Stężenie ekstraktu/Gatunek	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
Próba kontrolna		
0,00%	81,09 ±0,75	83,04 ±4,25
Olejek eteryczny z szyszek chmielu odmiany Marynka		
0,25%	82,18 ±0,71	82,86 ±0,00
0,50%	77,87 ±0,71	78,71 ±1,41
0,75%	76,09 ±1,41	77,81 ±0,71
1,00%	73,47 ±3,54	74,16 ±0,00
1,50%	61,46 ±2,83	65,45 ±1,41

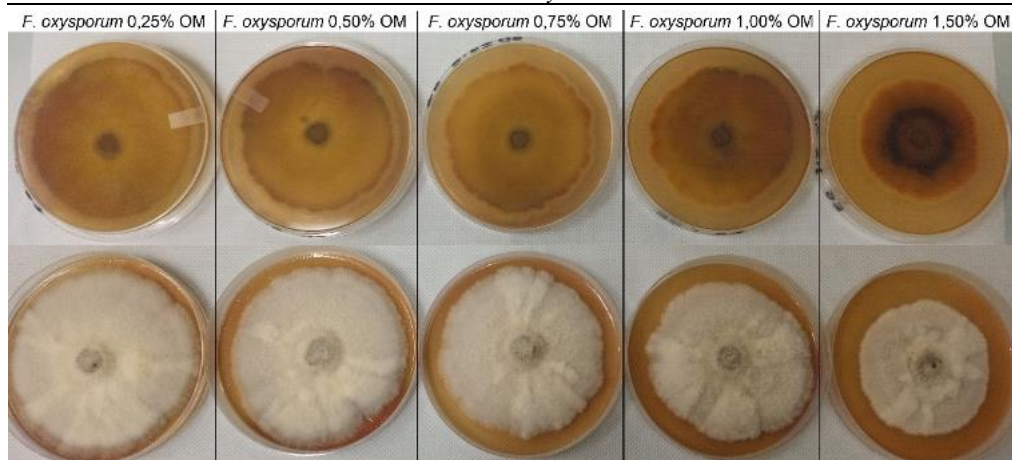
Olejek eteryczny z szyszek chmielu odmiany Iunga		
0,25%	75,81 ±0,71	77,87 ±0,71
0,50%	73,16 ±0,00	75,47 ±1,41
0,75%	69,45 ±0,71	71,09 ±0,00
Olejek Tymiankowy (próba kontrolna bezwzględna)		
0,25%	10,71 ±0,00	10,71 ±0,00
0,50%	10,71 ±0,00	10,71 ±0,00
0,75%	10,71 ±0,00	10,71 ±0,00
1,00%	10,71 ±0,00	10,71 ±0,00
1,50%	10,71 ±0,00	10,71 ±0,00

Źródło: opracowanie własne.

W trakcie prowadzenia doświadczenia zaobserwowano także występowanie zmian makroskopowych w wyglądzie grzybni *Fusarium oxysporum* i *Fusarium culmorum*. Grzybnia *F. oxysporum* w porównaniu do próby kontrolnej (rys. 2.) wydzielala różowo-brązowy barwnik, widoczny zarówno w podłożu hodowlanym, jak i samej grzybni. Zabarwienie widoczne było na obrzeżach kolonii w postaci pierścienia oraz w środkowej części grzybni. Efekt zaobserwowano zarówno w obecności olejku eterycznego z szyszek chmielu odmiany Marynka i Iunga, jednak zabarwienie było intensywniejsze dla ekstraktu uzyskanego z szyszek chmielu odmiany Marynka. Intensywność zabarwienia grzybni oraz podłoża hodowlanego rosła wraz ze wzrostem stężeń zastosowanego olejku z szyszek chmielu odmiany Marynka (rys. 3.), natomiast przy zastosowaniu olejku z odmiany Iunga stężenie 0,50% cechowało się słabszym zabarwieniem niż 0,25% i 0,75%. W przypadku *F. culmorum* zaobserwowano spadek intensywności wydzielania brązowego barwnika – wprost proporcjonalny do wzrostu stężenia zastosowanego olejku eterycznego. Efekt widoczny był zarówno w obecności olejku z szyszek chmielu odmiany Marynka, jak i Iunga.



Rysunek 2. *Fusarium oxysporum* – próba kontrolna (bez dodatku olejku eterycznego z szyszek chmielu)
[opracowanie własne]



Rysunek 3. Wydzielanie barwnika przez grzybnicę *Fusarium oxysporum* w odpowiedzi na zastosowany olejek eteryczny z szyszek chmielu odmiany Marynka. Na fotografiach przedstawiono awers i rewers szalek dla poszczególnych stężeń ekstraktów zastosowanych w badaniach - 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,00% i 1,50% [opracowanie własne]

4. Dyskusja

Ekstrakty chmielowe wykazujące różne kierunki aktywności biologicznej pozyskiwać można z wykorzystaniem szeregu metod, zarówno ze świeżego, jak i suszonego materiału roślinnego. Do najczęściej wykorzystywanych metod należą: maceracja, hydrodestylacja, ekstrakcja ciągła w aparacie Soxhleta, ekstrakcja nadkrytycznym CO₂ [30-32]. Dobór metod pozyskiwania ekstraktów, jak i służących temu celowi rozpuszczalników przekłada się ostatecznie na skład jakościowo-ilościowy i aktywność biologiczną [30, 33]. Ekstrakty te wykazywać mogą działanie przeciwgrzybicze [34-39], przeciwbakteryjne [27, 31, 32, 35-37, 39, 40], przeciwwirusowe [41, 42], przeciwmalaryczne [43, 44], przeciwutleniające [41, 45, 46], przeciwzapalne [45, 47] i przeciwnowotworowe [48, 49].

Do związków chemicznych zawartych w szyszkach chmielu zaliczyć można α - i β -kwasy należące do frakcji żywic miękkich, olejki eteryczne oraz szereg związków należących do grup katechin, kwasów fenolowych, flawonoli, stylbenów, a także unikalne dla chmielu prenyloflawonoidy takie jak ksantohumol, 6-prenylonaringenina i 8-prenylonaringenina, którym przypisuje się szczególnie istotną rolę w kształtowaniu aktywności biologicznej ekstraktów z szyszek chmielu [30, 46, 50].

Zaobserwowano umiarkowaną aktywność olejków eterycznych pozyskanych na drodze hydrodestylacji w aparacie Derynga wobec fitopatogennych grzybów – *Fusarium oxysporum* i *Fusarium culmorum*. W światowej literaturze brakuje doniesień na temat wrażliwości tych gatunków fitopatogenów na olejki eteryczne z szyszek chmielu. W badaniach z 2023 roku [51] wykazano wpływ nanokapsułkowanego olejku chmielowego na *Fusarium graminearum* – zastosowanie nanoemulsji istotnie hamowało wzrost grzyba, stopień kiełkowalności zarodników oraz wytwarzanie mykotoksyny – deoksyniwalenolu.

Hamujące działanie ekstraktów chmielowych, uzyskanych z szyszek chmielu poddanych wcześniej procesowi ekstrakcji dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym określono w publikacji Bartmańskiej i in. [35]. Aktywność określono wobec grzybów *Fusarium oxysporum* AM21 i *F. culmorum* AM10. Pozyskano cztery typy ekstraktów z szyszek chmielu w dwóch wariantach – zawierających ksantohumol oraz pozbawionych ksanto-

humolu. Ekstrakty zawierające ksantohumol otrzymano przez ekstrakcję rozpuszczalnikami – chlorkiem metylenu, octanem etylu, acetonem i metanolem. Ekstrakty pozbawione ksantohumolu otrzymano poprzez usunięcie tego związku z ekstraktów bazowych zawierających ksantohumol. Określono aktywność przeciwwgrzybiczą uzyskanych ekstraktów w stężeniu $1,0 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$. Najsilniejsze działanie hamujące wzrost *F. culmorum* AM10 wynoszące $55,9 \pm 0,79\%$, odnotowano przy zastosowaniu ekstraktu zawierającego ksantohumol, otrzymanego przy użyciu octanu etylu. Jednak, gdy zastosowano ten ekstrakt, ale pozbawiony ksantohumolu strefy zahamowania wzrostu grzybni były znacznie niższe i wyniosły $41,4 \pm 0,39\%$. Podobny stopień zahamowania wzrostu *F. culmorum* AM10 wynoszący $54,6 \pm 0,39\%$ odnotowano przy zastosowaniu ekstraktu acetonowego zawierającego ksantohumol (w przypadku tego ekstraktu pozbawionego ksantohumolu – $45,2 \pm 0,79\%$). Z kolei przy zastosowaniu ekstraktu metanolowego zawierającego ksantohumol stopień zahamowania wzrostu grzybni wyniósł $53,1 \pm 0,4\%$, a dla ekstraktu pozbawionego ksantohumolu – $41,1 \pm 1,04\%$. Najsłabsze zahamowanie wzrostu *F. culmorum* AM10 spowodował ekstrakt uzyskany chlorkiem metylenu – w przypadku ekstraktu zawierającego ksantohumol stopień zahamowania wyniósł $37,5 \pm 0,79\%$, a ekstraktu pozbawionego ksantohumolu – $34,2 \pm 0,4\%$. Także ekstrakt otrzymany octanem etylu zawierający ksantohumol najsilniej, bo na poziomie $50 \pm 0,45\%$ hamował wzrost *F. oxysporum* AM21, ale dla wariantu tego ekstraktu pozbawionego ksantohumolu stopień zahamowania wzrostu grzyba wyniósł tylko $7,8 \pm 0,77\%$. Jednak najsłabsze działanie względem tego szczepu wykazał metanolowy ekstrakt pozbawiony ksantohumolu ($4,7 \pm 1,18\%$), a wśród ekstraktów zawierających ksantohumol najsłabsze działanie wykazał ekstrakt otrzymany chlorkiem metylenu – $31,6 \pm 2,68\%$ zahamowania. W badaniu oceniono także dawki MIC50 (minimalne stężenie hamujące wzrost 50% mikroorganizmów) ekstraktów zawierających ksantohumol. Dla *F. culmorum* AM10 wartości MIC50 ekstraktów zawierających ksantohumol wykonanych octanem etylu, acetonem oraz metanolem wynosiły $0,5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$, natomiast ekstrakt wykonany chlorkiem metylenu nie wykazał tej aktywności nawet w najwyższym badanym stężeniu ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$). W przypadku *F. oxysporum* AM21 wartość MIC50 dla ekstraktu wykonanego octanem etylu wyniosła $1,0 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$, natomiast dla pozostałych trzech ekstraktów wartość MIC50 wykraczała poza najwyższe analizowane stężenie ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$). Otrzymane przez autorów tego badania wyniki, w przypadku ekstraktów pełnych (nie pozbawionych ksantohumolu) wykazywały wyższą aktywność, niż zastosowane w badaniach własnych olejki eteryczne. Wynikać mogło to z różnic osobniczych pomiędzy wykorzystanymi do badań szczepami *Fusarium* oraz różnic w metodyce otrzymywania ekstraktów – w przytoczonych badaniach wykorzystano nie olejki eteryczne, a maceraty sporządzone z szyszek chmielu poddanych wcześniej procesowi ekstrakcji CO_2 w stanie nadkrytycznym.

Atmaca i in. [34] określili wpływ ekstraktu metanolowego z szyszek chmielu na zahamowanie wzrostu *F. culmorum*. W celu określenia aktywności przeciwwgrzybiczej ekstraktu wykorzystano metodę zatruwania podłoża – sporządzono podłoża hodowlane zawierające ekstrakty w stężeniach 1,00%, 2,00%, 4,00% i 8,00% rozтворzone w podłożu PDA. Próbę kontrolną stanowiło podłoże PDA bez dodatku ekstraktu. Uplynnione podłoża wylano do szalek o średnicy 90 mm i zaszczerpiono krążkami inokulum o średnicy 6 mm pochodzącymi z 7 dniowej hodowli *F. culmorum*. Po 7 dniach inkubacji w temperaturze $24 \pm 1^\circ\text{C}$ zmierzono średnice wzrostu grzybni [mm]. Obliczono procentowe zahamowanie wzrostu względem próby kontrolnej. W przypadku stężenia 1,00% nie

zaobserwowano zahamowania wzrostu, w stężeniu 2,00% zahamowanie wyniosło 47,85%, dla stężenia wynoszącego 4,00% zahamowanie wyniosło 51,68%, natomiast dla najwyższego stężenia (8,00%) zahamowanie wzrostu względem próby kontrolnej sięgało 92,77%. W badaniach własnych przy zastosowaniu ekstraktu chmielowego w stężeniach do 1,00%, w przeciwieństwie do przedstawionych wyżej wyników, zaobserwowano umiarkowaną aktywność hamującą wzrost *F. culmorum*. Zestawienie wyników uzyskanych dla wyższych stężeń ekstraktów jest niemożliwe, ze względu na górna granicę stężeń wykorzystanych w badaniach własnych wynoszących 0,75% dla olejku z szyszek chmielu odmiany Iunga i 1,50% dla olejku z szyszek odmiany Marynka. Autorzy zastosowali ekstrakty metanolowe, w przeciwieństwie do wykorzystanych w badaniach własnych olejków eterycznych pozyskanych na drodze hydrodestylacji. Istotny wpływ na różnicę w uzyskanych wynikach może wywierać także osobnicza wrażliwość zastosowanych szczepów *F. culmorum*.

5. Podsumowanie

Fitopatogenne grzyby strzępkowe z rodzaju *Fusarium* – *F. oxysporum* i *F. culmorum* wyizolowane z porażonych ziarniaków pszenicy wykazały umiarkowaną wrażliwość na olejki eteryczne uzyskane na drodze hydrodestylacji w aparacie Derynga suszonych szyszek chmielu odmian Marynka i Iunga. W przypadku odmiany Lubelski pozyskanie olejku eterycznego w ilości wystarczającej do wykonania oznaczeń choćby w ograniczonym zakresie stężeń było niemożliwe przy wykorzystaniu tej techniki ekstrakcji. Górne wartości stężeń olejków eterycznych wykorzystanych do oznaczeń były limitowane uzyskiem ekstraktu z materiału roślinnego przy wykorzystaniu tej techniki. W przedziale stężeń do 0,75% wyższą aktywnością hamującą wzrost grzybów rodzaju *Fusarium* cechował się olejek z szyszek chmielu odmiany Iunga – uzyskane wyniki indeksów tempa wzrostu (T) wyniosły: $T = 69,45 \pm 0,71$ dla *F. oxysporum* (w porównaniu do próby kontrolnej: $T = 81,09 \pm 0,75$) oraz $T = 71,09 \pm 0,00$ dla *F. culmorum* (próba kontrolna: $T = 83,04 \pm 4,25$). Najniższą wartość T osiągnięto przy zastosowaniu olejku eterycznego z szyszek chmielu odmiany Marynka zastosowanego w najwyższym analizowanym stężeniu – 1,50%. Wartość T dla *F. oxysporum* wyniosła: $61,46 \pm 2,83$, natomiast dla *F. culmorum*: $65,45 \pm 1,41$. Handlowy olejek tymiankowy firmy ETJA powodował całkowite zahamowanie wzrostu obu gatunków grzybów już w najniższym zastosowanym stężeniu (0,25%). Zaobserwowano także zmiany makroskopowe w wyglądzie grzybni – w przypadku *F. oxysporum*: objawiające się wydzielaniem różowo-brązowego barwnika, natomiast *F. culmorum*: spadkiem intensywności wydzielania przez grzybnię brązowego barwnika. Ze względu na potencjalne zmiany w metabolizmie grzyba, istotnym aspektem dalszych badań nad wykorzystaniem tych ekstraktów w kontrolowaniu rozwoju *Fusarium* spp. wydaje się określenie występowania ewentualnych zmian w wydzielaniu mykotosyn i innych wtórnych metabolitów pod wpływem zastosowanych preparatów.

Literatura

1. Aktar W., Sengupta D., Chowdhury A., *Impact of Pesticides Use in Agriculture: Their Benefits and Hazards*, Interdisciplinary Toxicology, 2(1), 2009, s. 1-12.
2. FAO, *World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2021*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rzym 2021.
3. Sharma A., Kumar V., Shahzad B., Tanveer M., Sidhu G.P.S., Handa N., Kohli S.K., Yadav P., Bali A.S., Parigar R.D., Dar O.I., Singh K., Jasrotia S., Bakshi P., Ramakrishnan

- M., Kumar S., Bhardwaj R., Thukral A.K., *Worldwide Pesticide Usage and Its Impacts on Ecosystem*, SN Applied Sciences, 1(11), 2019, s. 1446.
4. Kumar S., Sharma A.K., Rawat S.S., Jain D.K., Ghosh S., *Use of Pesticides in Agriculture and Livestock Animals and Its Impact on Environment of India*, Asian Journal of Environmental Science, 8(1), 2013, s. 51-57.
 5. Gupta S., Gupta K., *Bioaccumulation of Pesticides and Its Impact on Biological Systems*, [w:] Srivastava P.K., Singh V.P., Singh A., Tripathi D.K., Sungh S., Prasad S.M., Chauhan D.K. (red.), *Pesticides in Crop Production: Physiological and Biochemical Action*, John Wiley & Sons Ltd., 2020.
 6. Kim K.H., Kabir E., Jahan S.A., *Exposure to Pesticides and the Associated Human Health Effects*, Science of the Total Environment, 575, 2017, s. 525-535.
 7. Nicolopoulou-Stamati P., Maipas S., Kotampasi C., Stamatis P., Hens L., *Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture*, Frontiers in Public Health, 4, 2016, s. 148.
 8. Samanic C.M., De Roos A.J., Stewart P.A., Rajaraman P., Waters M.A., Inskip P.D., *Occupational Exposure to Pesticides and Risk of Adult Brain Tumors*, American Journal of Epidemiology, 167(8), 2008, s. 976-985.
 9. Amr S., Dawson R., Saleh D.A., Magder L.S., StGeorge D.M., El-Daly M., Squibb K., Mikhail N.N., Abdel-Hamid M., Khaled H., Loffredo C.A., *Pesticides, Gene Polymorphisms and Bladder Cancer Among Egyptian Agricultural Workers*, Archives of Environmental & Occupational Health, 70(1), 2015, s. 19-26.
 10. Koutros S., Silverman D.T., Alavanja M.C., Andreotti G., Lerro C.C., Heltshe S., Lynch C.F., Sandler D.P., Blair A., Beane Freeman L.E., *Occupational Exposure to Pesticides and Bladder Cancer Risk*, International Journal of Epidemiology, 45(3), 2016, s. 792-805.
 11. Luqman M., Javed M.M., Daud S., Raheem N., Ahmad J., Khan A.U., *Risk Factors for Lung Cancer in the Pakistani Population*, Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 15(7), 2014, s. 3035-3039.
 12. Koutros S., Lynch C.F., Ma X., Lee W.J., Hoppin J.A., Christensen C.H., Andreotti G., Freeman L.B., Rusiecki J.A., Hou L., Sandler D.P., Alavanja M.C.R., *Aromatic Amine Pesticide Use and Human Cancer Risk: Results from the U.S. Agricultural Health Study*, International Journal of Cancer, 124(5), 2009, s. 1206-1212.
 13. El-Zaemey S., Heyworth J., Fritschi L., *Noticing Pesticide Spray Drift from Agricultural Pesticide Application Areas and Breast Cancer: A Case-Control Study*, Australian and New Zealand Journal of Public Health, 37(6), 2013, s. 547-555.
 14. Vinson F., Merhi M., Baldi I., Raynal H., Gamet-Payrastrre L., *Exposure to Pesticides and Risk of Childhood Cancer: A Meta-Analysis of Recent Epidemiological Studies*, Occupational and Environmental Medicine, 68(9), 2011, s. 694-702.
 15. Pezzoli G., Cereda E., *Exposure to Pesticides or Solvents and Risk of Parkinson Disease*, Neurology, 80(22), 2013, s. 2035-2041.
 16. Tang M., Chen K., Yang F., Liu W., *Exposure to Organochlorine Pollutants and Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis*, PLOS ONE, 9(10), 2014, 85556.
 17. Mehrpour O., Karrari P., Zamani N., Tsatsakis A.M., Abdollahi M., *Occupational Exposure to Pesticides and Consequences on Male Semen and Fertility: A Review*, Toxicology Letters, 230(2), 2014, s. 146-156.
 18. <http://www.worldfloraonline.org>, [data dostępu: 19.01.2023].
 19. El-Snafi A.E., *Chemical Constituents and Medical Importance of Galium Aparine – a Review*, Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences, 05(03), 2018, s. 1739-1744.
 20. Pandey K.B., Rizvi S.I., *Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2(5), 2009, s. 270-278.
 21. Elshafie H.S., Camele I., *An Overview of the Biological Effects of Some Mediterranean Essential Oils on Human Health*, BioMed Research International, 2017, 9268468.

22. Mossa A.T.H., *Green Pesticides: Essential Oils as Biopesticides in Insect-Pest Management*, Journal of Environmental Science and Technology, 9(5), 2016, s. 354-378.
23. Opende K., Suresh W., Dhaliwal G.S., *Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints*, Biopesticides International, 4(1), 2008, s. 63-84.
24. El-Ghany A., Roushdy M., Abboud M., *Efficacy of Certain Plant Extracts as Safe Fungicides Against Phytopathogenic and Mycotoxigenic Fungi*, Agricultural and Biological Sciences Journal, 1(3), 2015, s. 71-75.
25. Zaker M., *Natural Plant Products as Eco-friendly Fungicides for Plant Diseases Control – A Review*, The Agriculturists, 14(1), 2016, s. 134-141.
26. Gurjar M.S., Ali S., Akhtar M., Singh K.S., *Efficacy of Plant Extracts in Plant Disease Management*, Agricultural Sciences, 3(3), 2012, s. 425-433.
27. Rył B., Sporek M., Krzyśko-Łupicka T., *The Bactericidal Effect of Extracts from Humulus lupulus L. Marynka Variety on Selected Bacteria*, Ecological and Chemical Engineering A, 27(1-2), 2020.
28. Mirghasempour S.A., Studholme D.J., Chen W., Zhu W., Mao B., *Molecular and Pathogenic Characterization of Fusarium Species Associated with Corn Rot Disease in Saffron from China*, Journal of Fungi, 8, 2022, s. 515.
29. Krzyśko-Łupicka T., Sokół S., Sporek M., Piekarska-Stachowiak A., Walkowiak-Lubczyk W., Sudół A., *Effectiveness of the Influence of Selected Essential Oils on the Growth of Parasitic Fusarium Isolated from Wheat Kernels from Central Europe*, Molecules, 26, 2021, 6488.
30. Knez Hrnčič M., Španinger E., Košir I.J., Knez Ž., Bren U., *Hop Compounds: Extraction Techniques, Chemical Analyses, Antioxidative, Antimicrobial, and Anticarcinogenic Effects*, Nutrients, 11(2), 2019, s. 257.
31. Kobus-Cisowska J., Szymanowska-Powałowska D., Szczepaniak O., Kmiecik D., Przeor M., Gramza-Michałowska A., Cielecka-Piontek J., Smuga-Kogut M., Szulc P., *Composition and In Vitro Effects of Cultivars of Humulus lupulus L. Hops on Cholinesterase Activity and Microbial Growth*, Nutrients, 11(6), 2019, 1377.
32. Rój E., Tadić V.M., Mišić D., Žižović I., Arsić I., Dobrzyńska-Inger A., Kostrzewa D., *Supercritical Carbon Dioxide Hops Extracts with Antimicrobial Properties*, Open Chemistry, 13, 2015, s. 1157-1171.
33. Zhang Q.W., Lin L.G., Ye W.C., *Techniques for Extraction and Isolation of Natural Products: A Comprehensive Review*, Chinese Medicine, 13, 2018, 20.
34. Atmaca S., Şimşek Ş., Denek Y.E., *Antifungal Effect of Some Plant Extracts Against Factors Wheat Root Rot*, American Institute of Physics Conference Proceedings, 1833(1), 2017, 020073.
35. Bartmańska A., Wałęcka-Zacharska E., Tronina T., Popłoński J., Sordon S., Brzezowska E., Bania J., Huszcza E., *Antimicrobial Properties of Spent Hops Extracts, Flavonoids Isolated Therefrom, and Their Derivatives*, Molecules, 23(8), 2018, 2059.
36. Mizobuchi S., Sato Y.A., *A New Flavanone with Antifungal Activity Isolated from Hops*, Agricultural and Biological Chemistry, 48(11), 1984, s. 2771-2775.
37. Mizobuchi S., Sato Y.A., *Antifungal Activities of Hop Bitter Resins and Related Compounds*, Agricultural and Biological Chemistry, 49(2), 1985, s. 399-403.
38. Niknejad F., Mohammadi M., Khomeiri M., Razavi S., Aalami M., *Antifungal and Antioxidant Effects of Hops (Humulus lupulus L.) Flower Extracts*, Advances in Environmental Biology, 8, 2015, s. 395-401.
39. Stompor M., Żarowska B., *Antimicrobial Activity of Xanthohumol and Its Selected Structural Analogues*, Molecules, 21, 2016, s. 608.
40. Bocquet L., Sahpaz S., Bonneau N., Beaufay C., Mahieux S., Samaillie J., Roumny V., Jacquin J., Bordage S., Hennebelle T., Chai F., Quetin-Leclercq J., Neut C., Rivière C., *Phenolic Compounds from Humulus lupulus as Natural Antimicrobial Products: New*

- Weapons in the Fight against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus, Leishmania mexicana and Trypanosoma brucei Strains*, Molecules, 24(6), 2019, 1024.
41. Di Sotto A., Checconi P., Celestino I., Locatelli M., Carissimi S., De Angelis M., Rossi V., Limongi D., Toniolo C., Martinolli L., Di Giacomo S., Palamara A.T., Nencioni L., *Antiviral and Antioxidant Activity of a Hydroalcoholic Extract from Humulus lupulus L.*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018, 5919237.
 42. Liu X., Bai J., Jiang C., Song Z., Zhao Y., Nauwynck H., Jiang P., *Therapeutic Effect of Xanthohumol Against Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses*, Veterinary Microbiology, 238, 2019, 108431.
 43. Frölich S., Schubert C., Bienzle U., Jenett-Siems K., *In vitro Antiplasmodial Activity of Prenylated Chalcone Derivatives of Hops (Humulus lupulus) and Their Interaction with Haemin*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 55(6), 2005, s. 883-887.
 44. Srinivasan V., Goldberg D., Haas G.J., *Contributions to the Antimicrobial Spectrum of Hop Constituents*, Economic Botany, 58, 2004, s. 230-238.
 45. Hurth Z., Faber M.-L., Gendrisch F., Holzer M., Haarhaus B., Cawelius A., Schwabe K., Schempp C.M., Wölfle U., *The Anti-Inflammatory Effect of Humulus lupulus Extract In Vivo Depends on the Galenic System of the Topical Formulation*, Pharmaceuticals, 15, 2022, s. 350.
 46. Zugravu C.A. Bohiltea R.E., Salmen T., Pogurschi E., Otelea M.R., *Antioxidants in Hops: Bioavailability, Health Effects and Perspectives for New Products*, Antioxidants, 11, 2022, s. 241.
 47. Nicácio K.d.J., Ferreira M.S., Katchborian-Neto A., Costa M.L., Murgu M., Dias D.F., Soares M.G., Chagas-Paula D.A., *Anti-Inflammatory Markers of Hops Cultivars (Humulus lupulus L.) Evaluated by Untargeted Metabolomics Strategy*, Chemistry & Biodiversity, 19(4), 2022, e202100966.
 48. Jiang C.H., Sun T.L., Xiang D.X., Wei S.S., Li W.Q., *Anticancer Activity and Mechanism of Xanthohumol: A Prenylated Flavonoid from Hops (Humulus lupulus L.)*, Frontiers in Pharmacology, 9, 2018, s. 530.
 49. Sławińska-Brych A., Mizerska-Kowalska M., Król S.K., Stepulak A., Zdzisińska B., *Xanthohumol Impairs the PMA-Driven Invasive Behaviour of Lung Cancer Cell Line A549 and Exerts Anti-EMT Action*, Cells, 10(6), 2021, 1484.
 50. Karabin M., Hudcová T., Jelínek L., Dostálek P., *Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use*, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15(3), 2016, s. 542-567.
 51. Jiang H., Zhong S., Schwarz P., Chen B., Rao J., *Antifungal Activity, Mycotoxin Inhibitory Efficacy, and Mode of Action of Hop Essential Oil Nanoemulsion Against Fusarium Graminearum*, Food Chemistry, 400, 12023, 34016.

Porównanie wrażliwości *Fusarium oxysporum* i *Fusarium culmorum* na olejki eteryczne z szyszek chmielu

Streszczenie

Celem badań była ocena wrażliwości fitopatogennych grzybów na olejki eteryczne z szyszek chmielu. Materiał do badań stanowiły grzyby strzępkowe z rodzaju *Fusarium* – *F. oxysporum* i *F. culmorum* wyizolowane z porażonych ziarniaków pszenicy. Metodą hydrodestylacji w aparacie Derynga otrzymano olejki eteryczne z szyszek chmielu odmian Marynka i Iunga. Aktywność przeciwgrzybiczą pozyskanych preparatów oceniono metodą zatrufania podłóż w pożywce PDA. Bezwzględna próbę kontrolną stanowił handlowy olejek tymiankowy firmy ETJA. Próby inkubowano w temperaturze 25 ±3°C przez 14 dób. Na podstawie uzyskanych wyników przyrostu grzybni wyznaczono indeksy tempa wzrostu.

Badania wrażliwości fitopatogenów na uzyskane preparaty wykazały zróżnicowane wyniki zahamowania wzrostu, zarówno ze względu na wykorzystany gatunek *Fusarium*, jak i odmianę chmielu, z której uzyskano ekstrakt. Wyższą wrażliwością na zastosowane olejki cechował się szczep *F. oxysporum*, jednak najniższe zasto-

sowane stężenie olejku z szyszek chmielu odmiany Marynka spowodowało stymulację wzrostu tego szczepu. Niższe wyniki indeksu tempa wzrostu grzybni otrzymano dla olejku uzyskanego z szyszek chmielu odmiany Iunga. Handlowy olejek tymiankowy powodował całkowite zahamowanie wzrostu grzybni już w najniższym zastosowanym stężeniu. W odpowiedzi na zastosowane ekstrakty grzybnia *F. oxysporum* wydzielala różowo-brązowy barwnik, natomiast w przypadku *F. culmorum* zaobserwowano zmniejszenie intensywności wydzielanego brązowego barwnika.

Słowa kluczowe: *Humulus lupulus* L., odmiana Marynka, odmiana Iunga, aktywność fungistatyczna, aktywność przeciwgrzybicza

Comparison of susceptibility of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium culmorum* to essential oils from hop cones

Abstract

The purpose of the study was to assess the susceptibility of phytopathogenic fungi to essential oils from hop cones. The material for the study consisted of filamentous fungi of the genus *Fusarium* – *F. oxysporum* and *F. culmorum* isolated from infested wheat grains. Using the hydrodistillation method in the Deryng apparatus, essential oils were obtained from hop cones of the Marynka and Iunga varieties. The antifungal activity of the extracted preparations was evaluated by poisoned food technique in PDA medium. The absolute control sample was commercial thyme oil from ETJA company. The samples were incubated at 25 ±3°C for 14 days. Mycelial growth rate indices were determined from the obtained results.

Phytopathogen susceptibility tests on the preparations obtained showed varying results in growth inhibition, both due to the *Fusarium* species used and the hop variety from which the extract was obtained. The *F. oxysporum* strain was characterized by higher sensitivity to the applied essential oils, but the lowest concentration of oil from hop cones of the Marynka variety resulted in growth stimulation of *F. oxysporum*. Lower mycelial growth rate index results were observed for the oil obtained from hop cones of the Iunga variety. Commercial thyme oil caused complete inhibition of mycelial growth at the lowest applied concentration. In response to the applied extracts, the mycelium of *F. oxysporum* secreted a pinkish-brown dye, while in the case of *F. culmorum* a reduction in the intensity of the brown dye secreted was observed.

Keywords: *Humulus lupulus* L., Marynka variety, Iunga variety, fungistatic activity, antifungal activity

Wpływ przeciwciał IgY izolowanych z żółtka jaja kurzego na przeżywalność bakterii *Campylobacter jejuni*

1. Wprowadzenie

1.1. *Campylobacter jejuni* i kamylobakteriozy

Bakterie z rodzaju *Campylobacter* to Gram-ujemne pałeczki, które powszechnie występują w układzie pokarmowym zwierząt hodowlanych oraz dziko żyjących. Są jednymi z najmniejszych bakterii (0,5-5 μm długości) o spiralnym kształcie, który w połączeniu z obecnością wici na jednym lub obu biegunach komórki warunkuje ich dużą ruchliwość [1]. Jako mikroaerofile do wzrostu wymagają obniżonej zawartości tlenu, a optymalne warunki ich namnażania to 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂ oraz temperatura 41,5°C [2]. *Campylobacter jejuni* wywołują u ludzi odzwierzęcą chorobę zwaną kamylobakteriozą, która jest najczęściej występującą zoonozą w Unii Europejskiej. W 2021 roku odnotowano aż 127 tys. zakażeń, podczas gdy najbardziej znanych salmonelloz odnotowano 60 tys. przypadków [3]. Główne źródło zakażeń bakteriami *Campylobacter* stanowi drób, a do zakażenia dochodzi najczęściej po spożyciu nieodpowiednio przetworzonego mięsa drobiowego lub jaj. Kamylobakteriozy są wiodącą przyczyną bakteryjnego zapalenia żołądka [4], któremu towarzyszą objawy typowe dla zakażenia układu pokarmowego takie jak biegunka, wymioty, gorączka oraz osłabienie. U osób należących do grup podwyższonego ryzyka może dochodzić również do poważniejszych powikłań, m.in. krwotoków z jelit, zapalenia trzustki, otrzewnej, pęcherzyka żółciowego oraz poronienia. Jedną z największych konsekwencji zakażenia *C. jejuni*, którą odnotowuje się u 1-2 przypadków na 100 tys., jest wystąpienie zespołu Guilliana-Barre’go o podłożu autoimmunologicznym, który charakteryzuje ostre zapalenie demielinizacyjne włókien nerwowych prowadzące do porażenia nerwowo-mięśniowego [5].

1.2. Kurze przeciwciała IgY

Kurze przeciwciała IgY to odpowiednik ludzkich bądź zwierzęcych przeciwciał klasy IgG. Cechują się one większą masą (180 kDa) od przeciwciał IgG (150 kDa), obecnością dodatkowej domeny w łańcuchu ciężkim przeciwciała oraz brakiem regionu zawiasowego. Dzięki tym cechom przeciwciała IgY wykazują znacznie większą odporność na trawienie. Zachowują one 40% aktywności nawet po 8 godzinach inkubacji z enzymem trawiennym – chymotrypsyną, są stabilne w szerokim zakresie pH (4 do 9) oraz temperaturze do 65°C. Ponadto posiadają zdolność neutralizacji toksyn, hamowania i inaktywacji

¹ p.czoska@immunolab.com.pl, Zakład Badawczo-Wdrożeniowy Ośrodka Salmonella IMMUNOLAB sp. z o.o., www.immunolab.com.pl.

² r.glosnicka@immunolab.com.pl, Zakład Badawczo-Wdrożeniowy Ośrodka Salmonella IMMUNOLAB sp. z o.o., www.immunolab.com.pl.

³ krzysztof.bielawski@ug.edu.pl, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, www.biotech.ug.edu.pl.

⁴ magda.rybicka@biotech.ug.edu.pl, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, www.biotech.ug.edu.pl.

bakteryjnych enzymów, a nawet zapobiegania adhezji patogenów do komórek gospodarza [6]. Kurze przeciwciała IgY są łatwiejsze i tańsze do pozyskania niż przeciwciała z surowicy zwierząt takich jak np. króliki. Sama metoda ich pozyskiwania jest również znacznie bardziej humanitarna od inwazyjnego pobierania krwi, które wymaga nakłucia i jest wysoce stresujące dla zwierząt. Z jednego jaja kurzego można otrzymać do 100 mg przeciwciał IgY z czego 2-10% stanowią przeciwciała specyficzne [7]. Wszystkie wymienione cechy sprawiają, że przeciwciała IgY są doskonałym kandydatem do podawania doustnego i działania w przewodzie pokarmowym. Przeprowadzono dotychczas wiele badań na zwierzętach gospodarskich m.in. na kurach, koniach i trzodzie chlewnej, w których wykazano ich pozytywne działanie lecznicze lub profilaktyczne w przypadku zakażeń bakteryjnymi patogenami przewodu pokarmowego [8].

1.3. Cel pracy

Celem przeprowadzonych doświadczeń była ocena wpływu przeciwciał IgY izolowanych z żółtek jaj kur immunizowanych antygenem *C. jejuni* na przeżywalność bakterii *C. jejuni* w warunkach *in vitro*.

2. Część doświadczalna

2.1. Antygen *Campylobacter jejuni* do immunizacji kur

W celu wytworzenia specyficznych przeciwciał IgY skierowanych przeciwko bakteriom *C. jejuni* wykorzystano wyizolowany ze środowiska (próby pobrane od kur z objawami biegunkowymi) szczep bakterii, dla którego przeprowadzono szereg badań serologicznych, biochemicznych oraz genetycznych w celu potwierdzenia jego przynależności do rodzaju *Campylobacter* oraz określenia i potwierdzenia cech patogenności. Bakterie hodowano w warunkach mikroaerofilnych (5% O₂, 10% CO₂, 42°C, 48 h, 150 rpm), w pożywce MH, a po zakończeniu hodowli zwirowano i inaktywowano 0,5% formaldehydem (inkubacja 24 h, 37°C, 150 rpm). Inaktywowany osad zawieszono w soli fizjologicznej i za pomocą pomiaru densytometrycznego wyznaczono liczbę bakterii – CFU/ml (CFU, ang. *colony forming unit*).

2.2. Immunizacja kur

Badania z wykorzystaniem kur przeprowadzone zostały po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej w Olsztynie (rezolucja nr 38/2021). Inaktywowane bakterie podawano 20 kurom w odstępie dwóch tygodni, w ilości 3x10⁹ CFU (pierwsza dawka) lub 6x10⁹ CFU (kolejne dawki) oraz objętości 1ml w iniekcji domięśniowej (mięsień piersiowy). Podawany preparat zawierał adiuwant Freund'a w celu wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej (pierwsza dawka zawierała adiuwant kompletny Freund'a, kolejne – adiuwant niekompletny Freund'a). Jaja immunizowanych kur zbierane były codziennie od podania trzeciej dawki antygeny i przechowywane w 4°C do czasu izolacji przeciwciał.

2.3. Izolacja przeciwciał

W celu izolacji przeciwciał żółtka zostały oddzielone od białek. Do delipidacji wykorzystano metodę wodną z dodatkową delipidacją przeprowadzoną za pomocą 0,01% węgla aktywnego. W skrócie, żółtka zawieszono w 9 objętościach wody i inkubowano przez noc w 4°C i pH 5,0. Zawiesinę zwirowano (11 000xg, 30 min, 4°C), a do frakcji wodnej dodano 0,01% węgla aktywnego, którą inkubowano przez 30 min w temperaturze

pokojoyej. Zawiesinę zwirowano (11 000 g, 30 min, 4°C) a frakcję wodną przesączono przez bibułę filtracyjną. Następnie zawiesinę zagęszczono za pomocą ultrafiltracji przy użyciu kasety o wielkości porów 100 kDa. Z zagęszczonej frakcji wodnej przeprowadzono precypitację 1,5M chlorkiem sodu, z którym inkubowano przeciwciała 2 h w temperaturze pokojowej. Zawiesinę zwirowano (14 000 g, 20 min, 4°C), a uzyskany osad zawieszono w roztworze soli fizjologicznej i oznaczono stężenie przeciwciał metodą spektrofotometryczną (pomiar przy 280 nm) uwzględniając współczynnik absorpcji równy 1,33 ml/mg dla przeciwciał IgY. Następnie przeprowadzono badanie czystości wyizolowanych przeciwciał z wykorzystaniem metody elektroforezy w warunkach denaturujących w żelu poliakrylamidowym oraz oceniono miano specyficznych przeciwciał za pomocą aglutynacji próbówkowej, w której wykorzystano antygen użyty do immunizacji kur.

2.4. Badanie wpływu przeciwciał IgY na przeżywalność bakterii *C. jejuni*

Szczep *C. jejuni* został wyhodowany w warunkach mikroaerofilnych (5% O₂, 10% CO₂, 42°C, 48 h) na podłożu CCDA. Bakterie zostały zawieszono w roztworze soli fizjologicznej, a następnie zawiesinę użyto do inokulacji pożywki MH w kolbach tak, aby uzyskać 10⁶ CFU/ml. Następnie do kolb dodawano przeciwciała IgY w celu uzyskania stężenie 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml lub 0,05 mg/ml, do kontroli negatywnej zamiast przeciwciał dodano sól fizjologiczną. Zastosowano jedną dawkę przeciwciał w trzech różnych punktach czasowych: w czasie inokulacji, po 8 lub 24 godzinach inkubacji. Kolby inkubowano 48 h w warunkach mikroaerofilnych z wytrząsaniem (5% O₂, 10% CO₂, 42°C, 150 obr./min). W trakcie hodowli prowadzono pomiar liczby bakterii poprzez miareczkowanie seryjnych rozcieńczeń hodowli za pomocą urządzenia do posiewów spiralnych (Interscience, Francja) na podłożu CCDA. Płytki były inkubowane w warunkach mikroaerofilnych (5% O₂, 10% CO₂, 42°C, 48 h), a następnie przeprowadzono odczyt w celu zliczenia kolonii i oznaczenia liczby żywych bakterii za pomocą automatycznego licznika kolonii (Interscience, Francja).

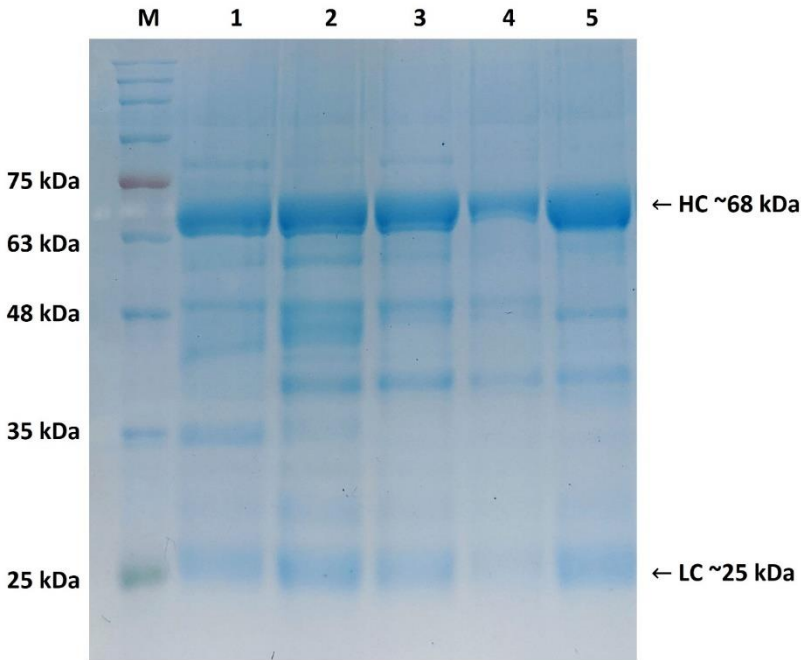
2.5. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej w oprogramowaniu Statistica 13 (StatSoft). Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA dla układów z powtarzanymi pomiarami. Różnice pomiędzy wartościami średnimi oznaczeń oceniono testem Tukeya. Weryfikację statystyczną prowadzono na poziomie istotności $p < 0,05$.

3. Wyniki

3.1. Izolacja przeciwciał IgY

Wykorzystana w niniejszym badaniu metoda izolacji umożliwiła otrzymanie specyficznych przeciwciał IgY skierowanych przeciwko antygenowi *C. jejuni*. Potwierdzono to badaniem miana za pomocą aglutynacji próbówkowej z wykorzystaniem antygeny, którym immunizowano kury oraz seryjnymi rozcieńczeniami przeciwciał (wykazano miano 1:320). Rozdział czterech prób izolowanych przeciwciał IgY anty-*C. jejuni* wykazał oczekiwany wzór prążków, zgodny z rozkładem uzyskanym po rozdziale elektroforetycznym przeciwciał wzorcowych IgY. W obrazie po elektroforezie w warunkach denaturujących widoczne są prążki odpowiadające zarówno łańcuchom ciężkim przeciwciał o masie 68 kDa (HC, ang. *heavy chains*) oraz łańcuchom lekkim przeciwciał o masie 25 kDa (LC, ang. *light chains*) (rys. 1.).



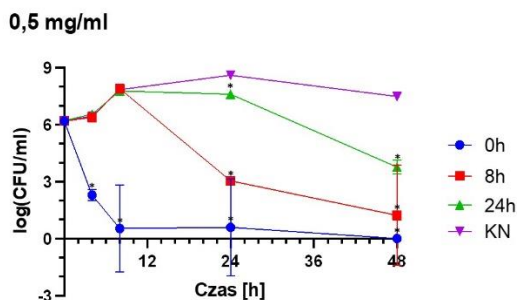
Rysunek 1. Obraz po rozdziale elektroforetycznym w warunkach denaturujących; HC (ang. *heavy chains*) – łańcuchy ciężkie; LC (ang. *light chains*) – łańcuchy lekkie; M – marker molekularny; ścieżki od 1 do 4 – wyizolowane z żółtek przeciwciała IgY anty-*C. jejuni*; ścieżka 5 – wzorcowe przeciwciała IgY [opracowanie własne]

3.2. Badanie wpływu przeciwciał IgY na przeżywalność bakterii *C. jejuni*

Badanie przeżywalności *C. jejuni* w obecności przeciwciał IgY przeprowadzono dla trzech różnych końcowych stężeń IgY: 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml oraz 0,05 mg/ml. Oprócz zastosowania różnych stężeń przeciwciała dodawano w trzech różnych punktach czasowych prowadzonej hodowli: przy inokulacji, po 8 godzinach hodowli oraz po 24 godzinach hodowli. W każdym eksperymencie uwzględniono kontrolę negatywną (KN) do której zamiast przeciwciał dodawano sól fizjologiczną.

3.2.1. Stężenie 0,5 mg/ml

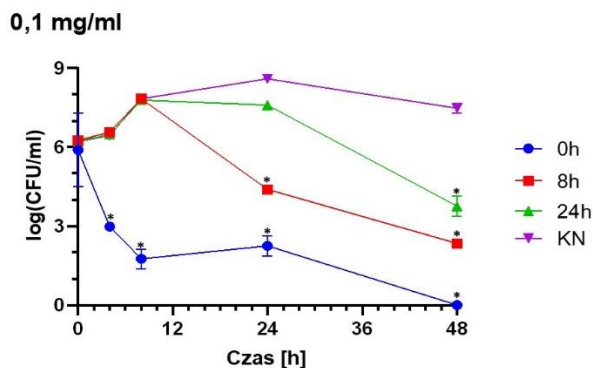
W przypadku zastosowania stężenia końcowego 0,5 mg/ml przeciwciał IgY w hodowli zaobserwowano znaczący spadek ilości żywych bakterii w porównaniu z kontrolą negatywną dla każdego badanego punktu czasowego dodania przeciwciał. Przy dodaniu przeciwciał IgY w czasie inokulacji i po 8 godzinach inkubacji redukcja ilości żywych bakterii wyniosła 6 log, w przypadku dodania IgY po 24 godzinach inkubacji wynosiła 3 log (rys. 2).



Rysunek 2. Wzrost *C. jejuni* z przeciwciałami IgY o końcowym stężeniu 0,5 mg/ml dodanymi w czasie inokulacji (0 h), po 8 h lub 24 h inkubacji; KN – kontrola negatywna nie traktowana przeciwciałami; CFU (ang. *colony forming unit*); statystycznie istotne różnice w porównaniu do kontroli negatywnej oznaczono * ($p < 0,05$) [opracowanie własne]

3.2.2. Stężenie 0,1 mg/ml

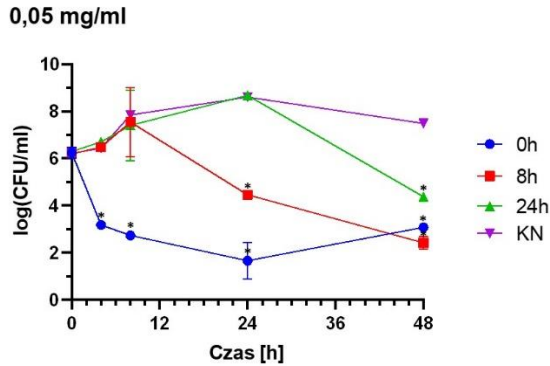
W przypadku zastosowania stężenia końcowego 0,1 mg/ml przeciwciał IgY w hodowli również zaobserwowano znaczący spadek ilości żywych bakterii w porównaniu z kontrolą negatywną dla każdego badanego czasu dodania przeciwciał. Przy dodaniu przeciwciał IgY w czasie inokulacji redukcja ilości żywych bakterii wyniosła 6 log, w przypadku dodania IgY po 8 godzinach wyniosła 5 log, a w przypadku dodania po 24 godzinach inkubacji redukcja osiągnęła wartość 4 log (rys. 3).



Rysunek 3. Wzrost *C. jejuni* z przeciwciałami IgY o stężeniu końcowym 0,1 mg/ml dodanymi w czasie inokulacji (0 h), po 8 h lub 24 godzinach inkubacji; KN – kontrola negatywna nie traktowana przeciwciałami; CFU (ang. *colony forming unit*); statystycznie istotne różnice w porównaniu do kontroli negatywnej oznaczono * ($p < 0,05$) [opracowanie własne]

3.2.3. Stężenie 0,05 mg/ml

W przypadku zastosowania najniższego z badanych stężeń przeciwciał IgY – 0,05 mg/ml w hodowli ponownie zaobserwowano spadek ilości żywych bakterii w porównaniu z kontrolą negatywną dla każdego badanego czasu dodania przeciwciał. Efekt był jednak słabszy niż w przypadku zastosowania stężeń 0,5 mg/ml oraz 0,1 mg/ml. Dla wszystkich badanych czasów dodania zaobserwowano redukcję wynoszącą 3-4 log (rys. 4).



Rysunek 4. Wzrost *C. jejuni* z przeciwciałami IgY o stężeniu końcowym 0,05 mg/ml dodanymi w czasie inokulacji (0 h), po 8 h lub 24 godzinach inkubacji; KN – kontrola negatywna nie traktowana przeciwciałami; CFU (ang. *colony forming unit*); statystycznie istotne różnice w porównaniu do kontroli negatywnej oznaczono * ($p < 0,05$) [opracowanie własne]

4. Dyskusja

4.1. Zastosowanie kurzych przeciwciał IgY

Kurcze przeciwciała IgY aktualnie używane są głównie w celu opracowywania i wytwarzania testów diagnostycznych ze względu na odmienną budowę od przeciwciał klasy IgG, która warunkuje ich stabilność oraz brak krzyżowych reakcji z kluczowymi czynnikami diagnostycznymi takimi jak czynnik reumatoidalny. Ponadto IgY nie wiąże się do białek układu dopełniacza, fragmentu stałego przeciwciał (Fc), białka A oraz G, co również ułatwia ich użycie w celach diagnostycznych [9]. Warto podkreślić możliwość zastosowania tych przeciwciał również jako czynnika profilaktycznego i leczniczego, który stosować można w wielu organizmach. Zastosowanie kurzej immunoglobuliny Y w zwalczaniu patogenów bakteryjnych może być alternatywą dla terapii antybiotykowych, których nadużycia są problemem globalnym [10]. Istnieje wiele przesłanek potwierdzających możliwość zastosowania przeciwciał IgY do pasywnej immunizacji przeciw patogenom bakteryjnym. Efektywność użycia tych przeciwciał potwierdzono w wielu badaniach *in vitro* [11-14] oraz *in vivo* [12, 15, 16]. Doustne podanie kurzych przeciwciał IgY w ramach pasywnej immunizacji może być szczególnie efektywne w zwalczaniu patogenów układu pokarmowego. Wysoka stabilność tych przeciwciał z niskim pH oraz zwiększona odporność na proteolizę w porównaniu z przeciwciałami IgG sprawia, że są doskonałym kandydatem do tego typu aplikacji [10].

4.2. Zwalczanie bakterii *Campylobacter jejuni* przy użyciu przeciwciał IgY

W przeprowadzonych przez nasz zespół badaniach wykazano zdolność przeciwciał IgY izolowanych z żółtek jaj kurzych skierowanych przeciw antygenowi *C. jejuni* do zahamowania wzrostu tego patogenu. W 2020 roku bakterie *Campylobacter* wywołały 120 946 przypadków kamylobakteriozy w Unii Europejskiej [3]. W naszych badaniach z powodzeniem wyizolowaliśmy i oczyściliśmy specyficzne przeciwciała IgY skierowane przeciw patogenemu szczepowi *C. jejuni*. Wynik badań wskazuje jednoznacznie potencjał użycia tych przeciwciał do zahamowania wzrostu i żywotności odzwierzcącego patogenu *Campylobacter jejuni in vitro*.

4.3. Podsumowanie

W kontekście globalnego problemu jakim jest wzrost antybiotykooporności i nadużywanie terapii antybiotykowych, użycie kurzych przeciwciał IgY może być ważnym czynnikiem prewencyjnym oraz leczniczym w przypadku pojawiających się zoonoz. Ilość przypadków kampylobakteriozy wywoływanej przez bakterie *Campylobacter jejuni*, która aktualnie jest najczęściej występującą chorobą odzwierzęcą w Unii Europejskiej, potencjalnie może zostać zredukowana poprzez nieskomplikowaną i nieinwazyjną aplikację kurom przeciwciał IgY z paszą lub wodą. Terapia przeciwciałami IgY może być nową strategią dążenia do redukcji ilości bakterii *C. jejuni* w jelitach kur, co w konsekwencji powinno przyczynić się do redukcji występowania przypadków kampylobakterioz u ludzi. Ponadto produkcja i izolacja dużych ilości wysokiej jakości i czystości przeciwciał IgY jest ekonomicznie opłacalna i powinna zostać rozważona jako cenne źródło efektywnego i bezpiecznego czynnika alternatywnego dla użycia antybiotyków. Nasze badania przeprowadzone zostały jedynie *in vitro*, kolejne działania powinny skupić się na potwierdzeniu wykazanej efektywności na modelu zwierzęcym w badaniach *in vivo* oraz testach klinicznych.

Uwagi ogólne/Podziękowania

Składamy serdeczne podziękowania pracownikom firmy Immunolab zaangażowanym w przygotowanie i przeprowadzenie części eksperymentalnej opisywanych doświadczeń, w szczególności Aleksandrze Kościuk oraz Karolinie Tarsalewskiej.

Literatura

1. Bolton D.J., *Campylobacter virulence and survival factors*, Food Microbiology, 48, 2015, s. 99-108.
2. Mace S., Haddad N., Zagorec M., Tresse O., *Influence of measurement and control of microaerobic gaseous atmospheres in methods for Campylobacter growth studies*, Food Microbiology, 52, 2015, s. 169-176.
3. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. EFSA Journal, 19, 2021.
4. Humphrey T., O'Brien S., Madsen M., *Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective*, International Journal of Food Microbiology, 117(3), 2007, s. 237-257.
5. Allos B.M., *Campylobacter jejuni Infections: Update on Emerging Issues and Trends*, Clinical Infectious Diseases, 32, 2001, s. 1201-1206.
6. Muller S., Schbert A., Zajac J., Dyck T., Oelkrug C., *IgY antibodies in human nutrition for disease prevention*, Nutritional Journal, 14, 2015, nr art. 109.
7. Sudjarwo S.A., Eraiko K., Sudjarwo G.W., Koerniasari, *The potency of chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) specific as immunotherapy to Mycobacterium tuberculosis infection*, Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research, 8(3), 2017, s. 91-96.
8. Yang Y.H., Park D., Yang G., Lee S.H., Bae D.K., Kyung J., Kim D., Choi E.K., Son J.C., Hwang S.Y., Kim Y.B., *Anti-Helicobacter pylori effects of IgY from egg yolk of immunized hens*, Laboratory Animal Research, 28(1), 2012, s. 55-60.
9. Pereira E.P.V., van Tilburg M.F., Florean E.O.P.T., Guedes M.I.F., *Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review*, International Immunopharmacology, 73, 2019, s. 293-303.
10. Lee L., Samardzic K., Wallach M., Frumkin L.R., Mochly-Rosen D., *Immunoglobulin Y for Potential Diagnostic and Therapeutic Applications in Infectious Diseases*, Frontiers in Immunology, 12, nr art. 696003, 2021.

11. Bustos C.P., Leiva C.L., Gambarotta M., Guida N., Chacana P.A., *In vitro Inhibitory Activity of IgY Antibodies Against Salmonella Ser. Newport Isolated from Horses*, Journal of Equine Veterinary Science, 103. nr art. 103657, 2021.
12. Kassim N., Mtenga A.B., Shim W.B., Chung D.H., *The in vitro and in vivo efficacy of hen IgY against Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus*, Journal of Microbiology and Biotechnology, 22(10), 2012, s. 1423-1431.
13. Solhi R., Alebouyeh M., Khafri A., Rezaeifard M., Aminian M., *In vitro evaluation of cross-strain inhibitory effects of IgY polyclonal antibody against H. pylori*, Microbial Pathogenesis, 110, 2017, s. 682-687.
14. Tobias F.L., Garcia L.N., Kanashiro M.M., Medina-Acosta E., Brom-de-Luna J.G., de Almeida C.M., Azevedo Junior R.R., Lemos M., Vieira-da-Motta O., *Growth inhibition of Staphylococcus aureus and escherichia coli strains by neutralizing IgY antibodies from ostrich egg yolk*, Brazilian Journal of Microbiology, 43(2), 2012, s. 544-551.
15. Ibrahim el-S.M., Rahman A.K., Isoda R., Umeda K., Van Sa N., Kodama Y., *In vitro and in vivo effectiveness of egg yolk antibody against Candida albicans (anti-CA IgY)*, Vaccine, 26 (17), 2008, s. 2073-2080.
16. Li X., Liu H., Xu Y., Xu F., Wang L., You J., Li S., Jin L., *Chicken egg yolk antibody (IgY) controls Solobacterium moorei under in vitro and in vivo conditions*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 168(6), 2012, s. 1448-1458.

Wpływ przeciwciał IgY izolowanych z żółtka jaja kurzego na przeżywalność bakterii *Campylobacter jejuni*

Streszczenie

Kampylobakteriozy to najczęściej występujące zoonozy w Unii Europejskiej od 2005 roku. Wywoływane są przez G (-), mikroaerofilne bakterie z rodzaju *Campylobacter* i są szeroko rozpowszechnione w środowisku. Stanowią naturalną florę wielu zwierząt, w szczególności hodowlanych, z czego drób stanowi główne źródło zakażeń. Od wielu lat opracowywane są metody pozwalające na ograniczenie rozprzestrzeniania się tych bakterii oraz redukcję ich ilości w jelitach kurzych. Pomimo zwiększania higieny i obostrzeń związanych z chowem i ubojem zwierząt nie odnotowano zmniejszenia ilości zachorowań. Do tej pory nie opracowano również skutecznej metody immunizacji. W opisanych badaniach wykazaliśmy, że wykorzystanie przeciwciał IgY izolowanych z żółtek jaj kurzych może przyczynić się do zahamowania namnażania i przeżywalności bakterii *Campylobacter jejuni* i stanowić alternatywę dla stosowanej antybiotykoterapii będącej przyczyną globalnego problemu jakim jest wzrost lekooporności bakterii.

Słowa kluczowe: *Campylobacter jejuni*, kampylobakteriozy, przeciwciała IgY, pasywna immunizacja

Effect of egg yolk IgY antibodies on *Campylobacter jejuni* growth

Abstract

Campylobacteriosis is the most common zoonotic disease in the European Union since 2005. It is caused by G (-), microaerophilic bacteria of the genus *Campylobacter* which is widely distributed in the environment. This bacterium, is part of the natural flora of many animals, especially farm animals, of which poultry is the main source of infections. For many years, methods have been developed to limit the spread of these bacteria and reduce their number in the chicken intestines. Despite increasing hygiene and restrictions related to farming and slaughterhouses, no reduction in the disease incidence was recorded. So far, no effective method of immunization has been developed. In the described studies, we have shown that the use of IgY antibodies isolated from hen egg yolks can contribute to the inhibition of *Campylobacter jejuni* growth and become an alternative to antibiotic use which is global issue considering growing antimicrobial resistance.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, campylobacteriosis, IgY antibodies

Ocena optymalnego czasu wchłaniania błękitu toluidyny i kurkuminy przez wybrane drobnoustroje – badania wstępne

1. Wprowadzenie

Stosowanie światła jako środka leczniczego miało swoje początki już w starożytności [1]. Informacje na ten temat można znaleźć w opracowaniach medycznych pochodzących ze starożytnego Egiptu czy Indii [2], kiedy to niektóre choroby skóry leczono właśnie światłem słonecznym [3]. Na przełomie XVIII i XIX wieku korzystne efekty osiągnano stosując światło w leczeniu np. szkorbutu, gruźlicy czy reumatyzmu [2]. Obecnie światło czy światłolecznictwo ma powszechne zastosowanie w medycynie [1].

Procesem wykorzystującym światło jest terapia fotodynamiczna (PDT, ang. *photodynamic therapy*) [3], której początki sięgają 1900 roku, kiedy to Oscar Raab wykazał, że akrydyna w połączeniu ze światłem zabija pantofelka [2, 3]. Pierwsza terapia fotodynamiczna zastosowana u człowieka miała miejsce w 1904 roku i dotyczyła pacjenta z nowotworem skóry [3]. Z kolei, pierwszą antybakteryjną terapię PDT (aPDT, ang. *antimicrobial photodynamic therapy*), z zastosowaniem błękitu toluidyny, przeprowadzono w 1960 roku [3].

Terapia fotodynamiczna opiera się na 3 głównych elementach: światło, fotouczulacz oraz tlen [2-4]. Jej istotą jest niszczenie komórek poprzez reaktywne formy tlenu, które powstają w wyniku współdziałania tych 3 składowych elementów. Barwnik, wzbudzony światłem, reaguje z tlenem co prowadzi do wytworzenia tlenu singletowego i wolnych rodników [4, 5].

PDT ma szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach medycyny [6, 7]. Może być wykorzystywana m.in. w terapii zmian nowotworowych, okulistyce, neonatologii, gastroenterologii, kardiologii, neurologii, dermatologii czy stomatologii [6-8]. Jest to też dobra alternatywa w leczeniu niektórych zakażeń, również tych przebiegających z wytworzeniem struktur biofilmu, wywołanych zarówno przez bakterie, grzyby, ale także przez wirusy czy pasożyty [6-8]. Jest to szczególnie cenne w dobie narastającej lekooporności drobnoustrojów [7]. Warto zaznaczyć, że PDT może stać się skuteczną opcją leczenia przy braku

¹ aleksandra.banaszczyk@student.umw.edu.pl, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu; www.umed.wroc.pl.

² joanna.nowicka@umw.edu.pl; Katedra i Zakład Mikrobiologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, www.umed.wroc.pl.

³ rwiench@sum.edu.pl, Zakład Chorób Przyzębia i Błony Śluzowej Jamy Ustnej, Wydział Nauk Medycznych, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

⁴ piotr.kuropka@upwr.edu.pl, Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, www.upwr.edu.pl.

⁵ magdalena.pajaczkowska@umw.edu.pl, Katedra i Zakład Mikrobiologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, www.umed.wroc.pl.

efektów terapii miejscowej i braku możliwości zastosowania leczenia ogólnoustrojowego [9].

Istotnym elementem PDT jest fotouczulacz [6]. Powinien on charakteryzować się selektywnością w stosunku do komórek czy tkanek, wybiórczą kumulacją w miejscu docelowym, brakiem toksyczności w odniesieniu do zdrowych tkanek, znanym i trwałym składem. Dodatkowo powinien być tani, łatwy w pozyskaniu i szeroko dostępny [8-10]. Główne grupy fotouczulaczy to fenotiazyny, ftalocyjaniny, pochodne hematoporfiryny (porfiryny i chloryny), cyjaniny, pochodne psoralenu oraz barwniki akrydynowe [8, 11].

Jednym z najczęściej stosowanych fotouczulaczy jest błękit toluidyny (TBO, ang. *toluidyne blue orto*) [12, 13]. Jest to syntetyczny, niebieski, kationowy barwnik z grupy fenotiazyn [8, 10, 12], ze szczytem absorpcji 630 nm [13]. TBO jest hydrofilowy, ma małą cząsteczkę i dobrą rozpuszczalność w wodzie [12, 13]. Nie posiada zapachu ani smaku [13]. Kurkumina i ryboflawina natomiast to fotouczulacze naturalne [10]. Kurkumina jest hydrofobowa i występuje w kłączach kurkumy [10]. To polifenol o dobrej rozpuszczalności w tłuszczach [14] z zakresem absorpcji 300-500 nm [14]. Ryboflawina, czyli witamina B₂, to fotouczulacz hydrofilowy [14]. Maksymalny zakres absorpcji w jej przypadku wynosi 365-445 nm [15].

Skuteczność terapii fotodynamicznej w istotny sposób uzależniona jest od czasu wchłaniania fotouczulaczy przez drobnoustroje i jest to jednocześnie najmniej przebadany etap algorytmu postępowania aPDT [12]. W pracy oceniono optymalny czas inkubacji potrzebny do wchłaniania poszczególnych fotouczulaczy – błękitu toluidyny orto oraz kurkuminy z ryboflawiną – przez wybrane szczepy wzorcowe.

Staphylococcus aureus, *Streptococcus pyogenes* oraz *Candida albicans* to istotne czynniki etiologiczne przede wszystkim zakażeń skóry i tkanek miękkich [16, 17]. Są to jednocześnie istotne czynniki sprawcze zakażeń dotyczących jamy ustnej i gardła [18-20].

S. aureus to ziarniak Gram-dodatni, często kolonizujący przedśrodek nosa, a także skórę, głównie w miejscach wilgotnych [21]. Jest jednocześnie jednym z najczęstszych czynników etiologicznych zakażeń o zróżnicowanym obrazie klinicznym występujących u ludzi na całym świecie [22]. *S. pyogenes* może bytować na błonach śluzowych górnych dróg oddechowych, zarówno u dzieci, jak i osób dorosłych [21]. Może powodować infekcje miejscowe, głównie skóry i gardła, ale także zagrażające życiu infekcje ogólnoustrojowe [21, 23]. Grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida* to komensale kolonizujące głównie jamę ustną, jelita, pochwę i skórę [24, 25]. Nie wywołują zakażeń u osób zdrowych, stanowią jednak zagrożenie w przypadku osłabionego układu odpornościowego czy długotrwałej hospitalizacji [25]. Spośród nich, *Candida albicans* jest najczęstszym czynnikiem sprawczym zarówno zakażeń powierzchniowych, jak i ogólnoustrojowych [24].

W ostatnich latach zwraca się szczególną uwagę na interakcje jakie zachodzą pomiędzy mikroorganizmami, skupiając się w głównej mierze na wzajemnych oddziaływaniach pomiędzy bakteriami i grzybami [26, 27]. *S. aureus* i *C. albicans* często „współdziałają” razem w chorobach jamy ustnej, np. w zapaleniu przyzębia czy zakażeniach związanych ze stosowaniem protez zębowych [27].

Celem pracy była ocena czasu wchłaniania wybranych fotouczulaczy przez szczepy wzorcowe *S. aureus*, *S. pyogenes* i *C. albicans*.

2. Materiał

Badania przeprowadzono na szczepach wzorcowych pochodzących z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych (ATCC, ang. *American Type Culture Collection*): *S. aureus* (ATCC 6538), *S. pyogenes* (ATCC 19615) oraz *C. albicans* (ATCC 90028).

Do badań wybrano 2 fotouczulacze, preparaty handlowe dopuszczone do stosowania klinicznego w stomatologii: błękit toluidyny orto oraz kurkuminę z ryboflawiną (CMS Dental).

3. Metody

3.1. Przechowywanie szczepów

Szczepy przechowywano w płynnym podłożu tryptozowo-sojowym (BioMaxima S.A. Lublin) z dodatkiem 15% glicerolu w głębokim zamrożeniu (-80°C). Każdy szczep zamrażano w kilku powtórzeniach.

3.2. Hodowla szczepów

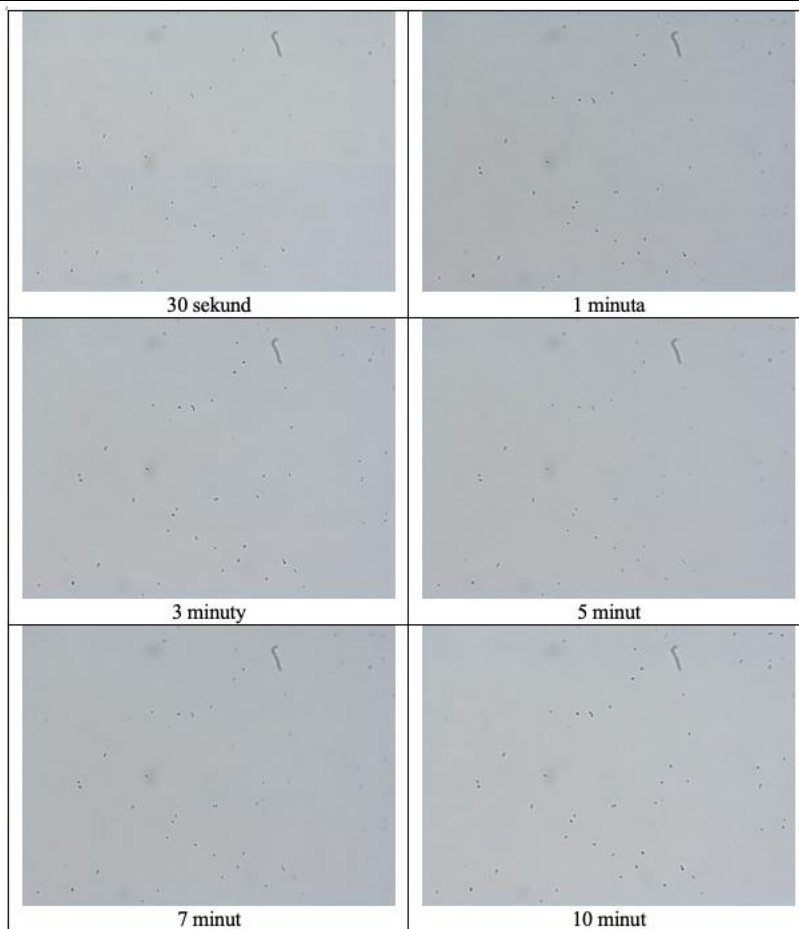
Przed każdym cyklem doświadczalnym szczepy namnażano w odpowiednich dla nich warunkach. *S. aureus* hodowano na agarze tryptozowo-sojowym (BioMaxima S.A. Lublin) – 37°C, 24 godz., w środowisku tlenowym, *S. pyogenes* na podłożu Columbia Agar (Biomérieux) – 37°C, 48 h, w warunkach podwyższonego poziomu CO₂, a *C. albicans* na podłożu Sabouraud Dextrose Agar (BioMaxima S.A. Lublin) – 37°C, 24 h, w warunkach tlenowych.

3.3. Ocena wchłaniania fotouczulaczy

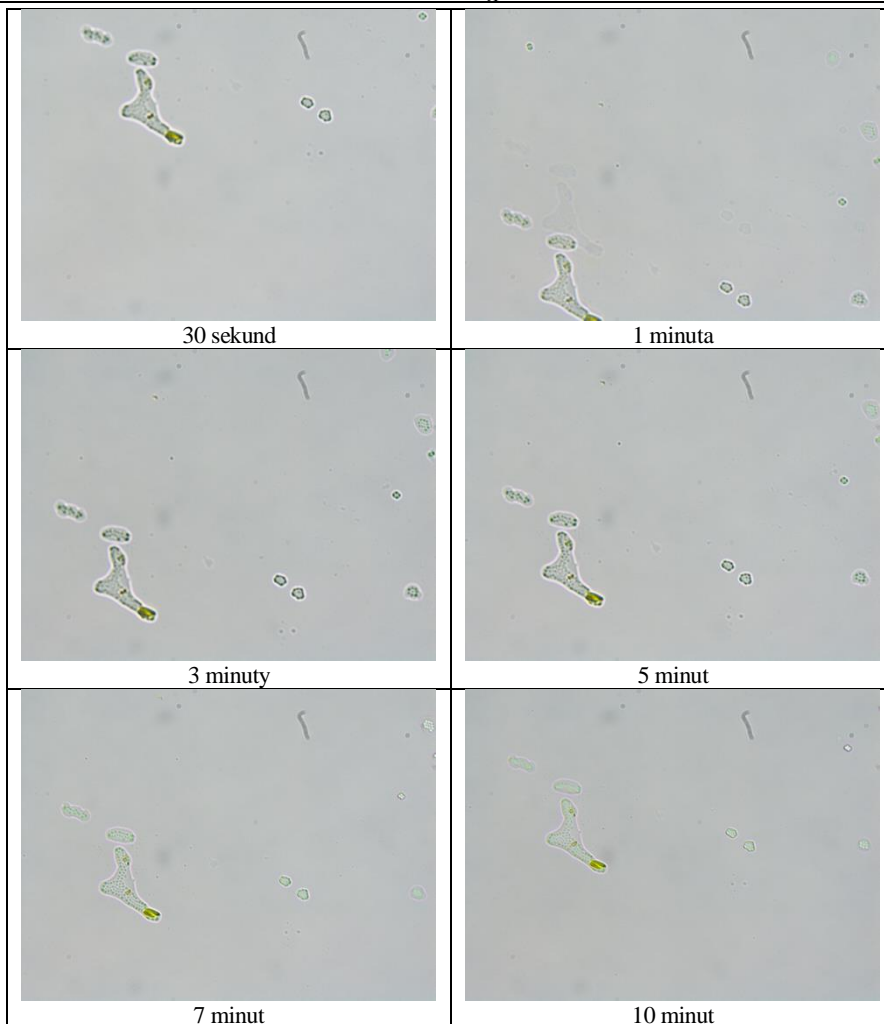
Do oceny absorpcji fotouczulaczy zastosowano metodę obserwacji mikroskopowej w czasie rzeczywistym. Ze świeżej hodowli analizowanych szczepów przygotowywano zawiesinę o gęstości 1 w skali McFarlanda (0,9% NaCl). Tak przygotowaną zawiesinę (100 ul) nanoszono na szkiełko podstawowe, dodawano fotouczulacz (10 ul), dokładnie mieszano, przykrywano szkiełkiem nakrywkowym a następnie analizowano i dokumentowano z zastosowaniem mikroskopu świetlnego Nikon Eclipse 80i (powiększenie 600x). Dokumentację fotograficzną wykonywano co 30 sekund przez 10 min. Ocena absorpcji fotouczulaczy przeprowadzana była przez jednego obserwatora.

4. Wyniki

Wchłanianie orto TBO oraz kurkuminy z ryboflawiną przez *S. aureus* (ATCC 6538) przedstawiono odpowiednio na rysunkach 1 i 2.

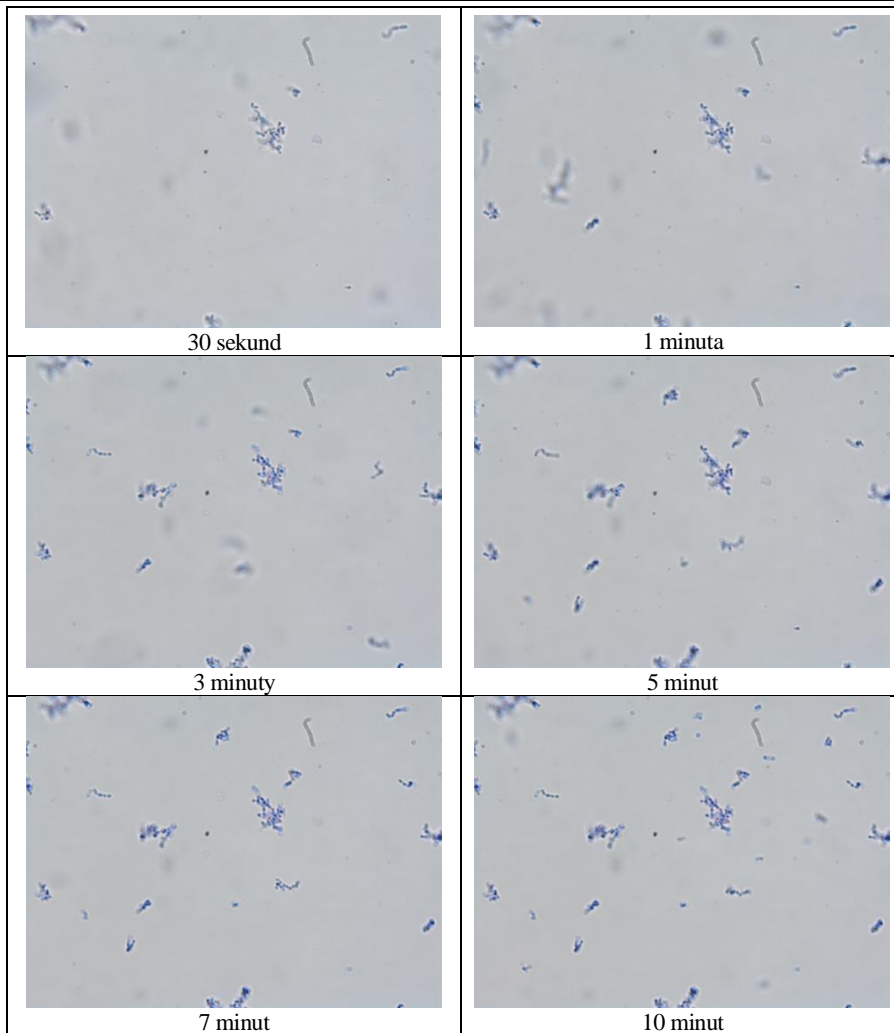


Rysunek 1. Wchłanianie orto TBO przez szczep wzorcowy *S. aureus* [opracowanie własne]

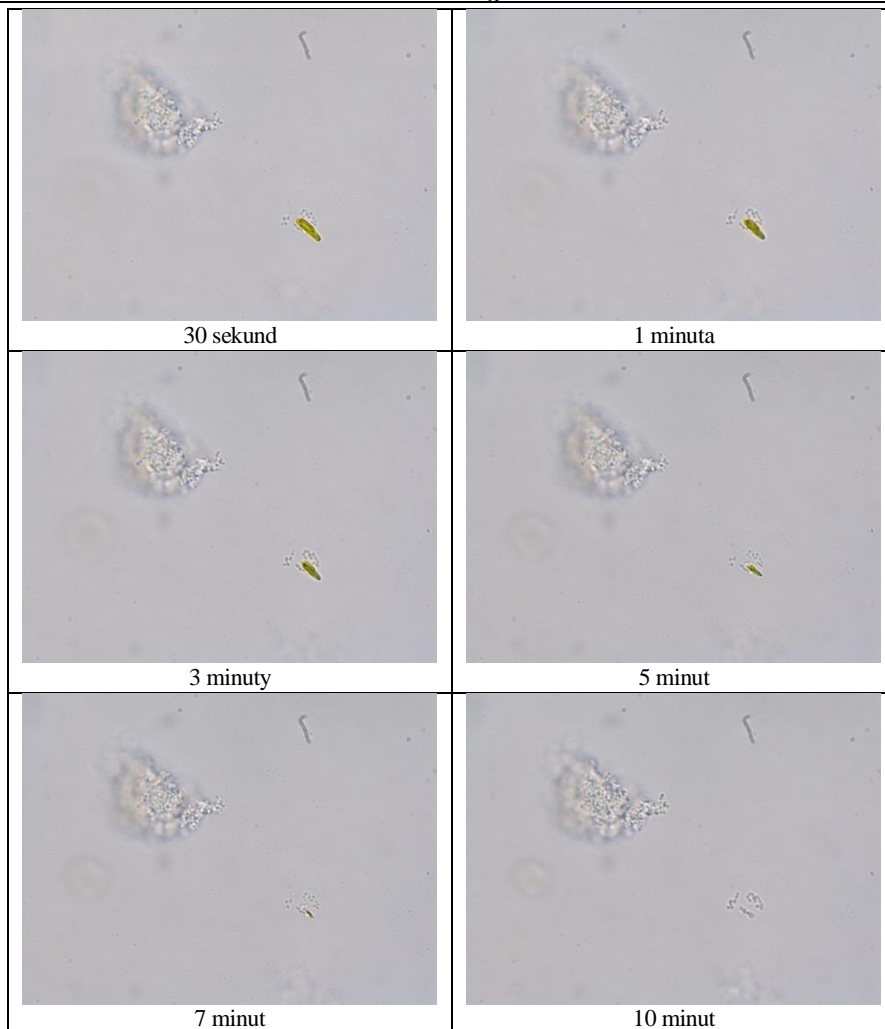


Rysunek 2. Wchłanianie kurkuminy z ryboflawiną przez szczep wzorcowy *S. aureus* [opracowanie własne]

Wchłanianie orto TBO oraz kurkuminy z ryboflawiną przez *S. pyogenes* (ATCC 19615) przedstawiono odpowiednio na rysunkach 3 i 4.

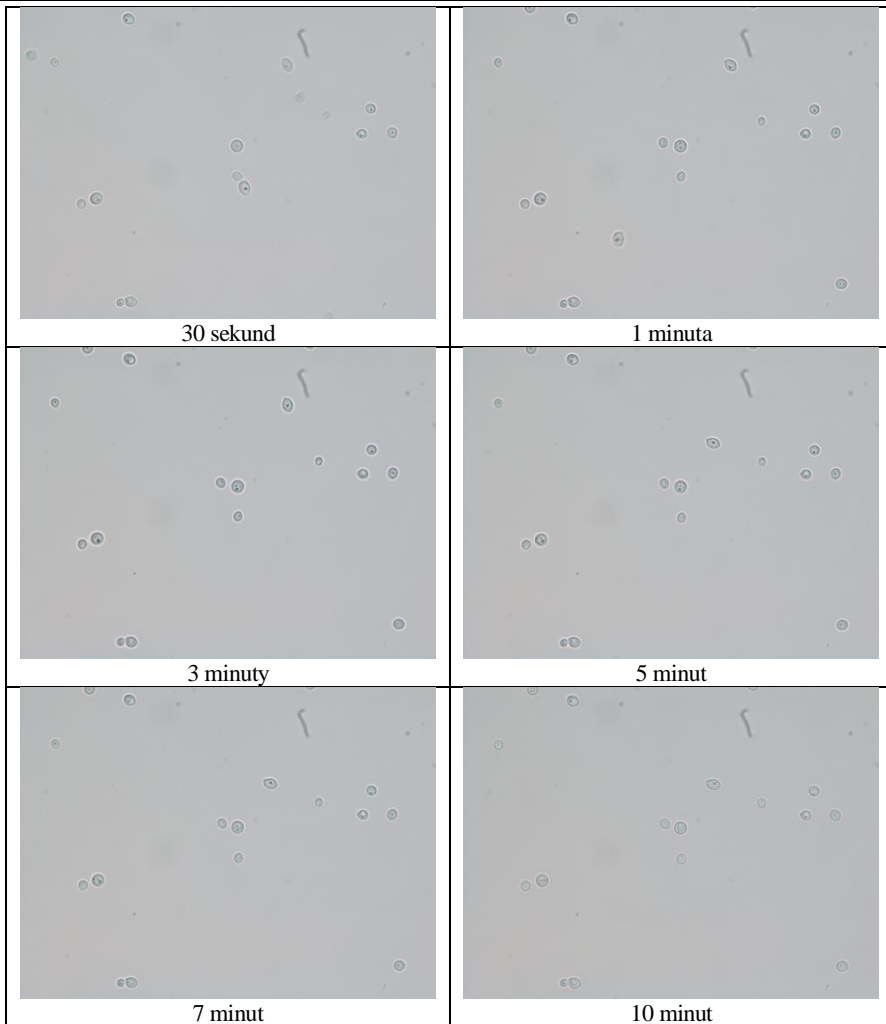


Rysunek 3. Wchłanianie orto TBO przez szczep wzorcowy *S. pyogenes* [opracowanie własne]

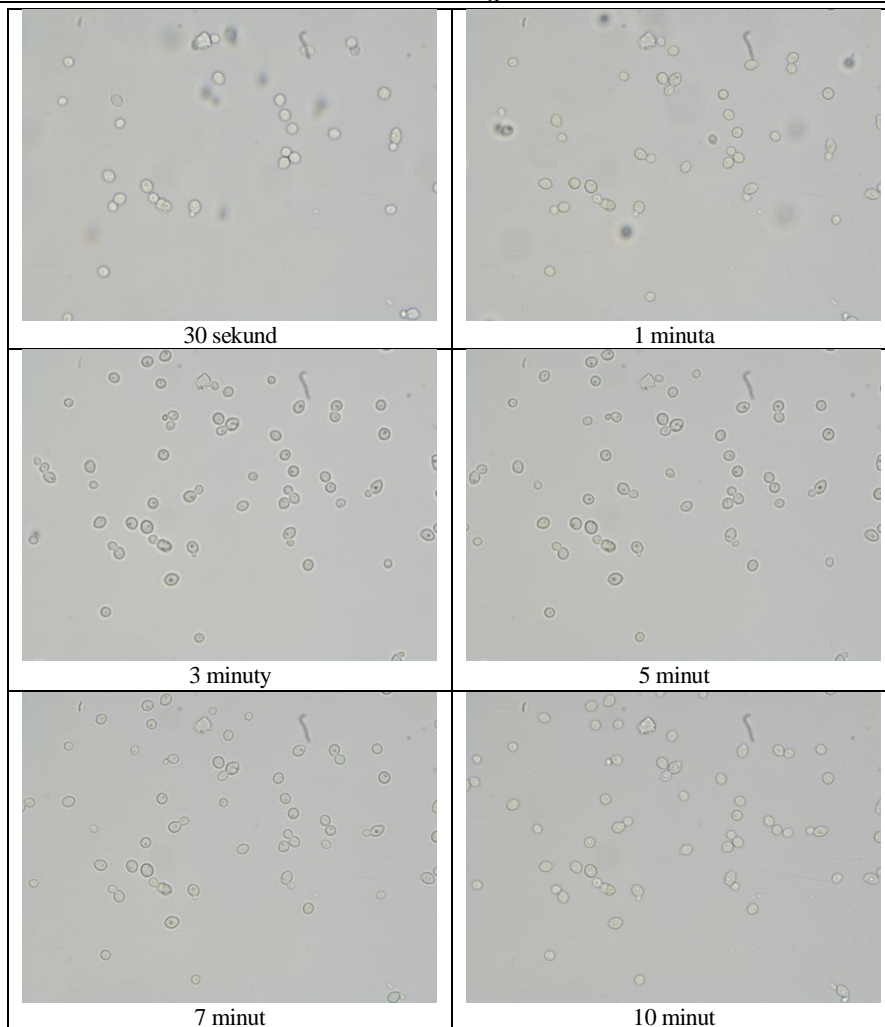


Rysunek 4. Wchłanianie kurkuminy z ryboflawiną przez szczep wzorcowy *S. pyogenes* [opracowanie własne]

Wchłanianie orto TBO oraz kurkuminy z ryboflawiną przez *C. albicans* (ATCC 90028) przedstawiono odpowiednio na rysunkach 5 i 6.



Rysunek 5. Wchłanianie orto TBO przez szczep wzorcowy *C. albicans* [opracowanie własne]



Rysunek 6. Wchłanianie kurkuminy z ryboflawiną przez szczep wzorcowy *C. albicans* [opracowanie własne]

Porównanie szybkości wchłaniania fotouczulaczy przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Porównanie czasu i intensywności wchłaniania orto TBO i kurkuminy z ryboflawiną przez szczepy wzorcowe drobnoustrojów

gatunek	orto TBO	kurkumina z ryboflawiną
<i>S. aureus</i>	wchłaniają barwnik od pierwszej minuty; od 3 minuty na skalę pełnej niebieskości; nie tracą barwnika	wchłaniają barwnik od pierwszej minuty; komórki pogrupowane; z czasem delikatnie ciemnieją
<i>S. pyogenes</i>	niebieskie od początku; w ciągu 10 minut stopniowo wchłaniają barwnik	lekkie wchłanianie barwnika od pierwszej minuty; komórki pogrupowane; po 5 minutach wchłanianie barwnika jest bardziej intensywne; po 9 minutach większość komórek jest zabarwiona
<i>C. albicans</i>	od 3-4 minuty pojedyncze komórki wchłaniają barwnik	słabe wchłanianie barwnika

Źródło: opracowanie własne

5. Dyskusja

Terapia fotodynamiczna to nieinwazyjny rodzaj terapii prowadzący do nieodwracalnego uszkodzenia komórek docelowych. Jest potencjalną metodą terapii nowotworów czy leczenia wybranych zakażeń wywołanych przez drobnoustroje, np. bakterie czy grzyby [12]. Skuteczność PDT a także możliwość równoczesnego stosowania innych metod terapeutycznych powodują, że PDT ma obecnie szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach medycyny [6, 7, 28].

Stosowany fotouczulacz, jak i jego optymalny czas inkubacji, niezbędny do wchłaniania przez drobnoustroje, wydają się kluczowe dla skuteczności aPDT. Jak już zaznaczono wcześniej jest to najmniej przebadany etap antybakteryjnej terapii fotodynamicznej [12].

Do badań wybrano szczepy wzorcowe bakterii, jak i grzyba drożdżopodobnego. Zarówno *S. aureus*, *S. pyogenes*, jak i *C. albicans* mogą bytować w wybranych miejscach organizmu człowieka i jednocześnie mogą być czynnikiem sprawczym zakażeń o różnym obrazie klinicznym [21-25].

Ocena mikroskopowa wykazała lepsze wchłanianie fotouczulaczy przez bakterie niż *C. albicans*. Mniejsza skuteczność całego procesu PDT w odniesieniu do grzybów może wynikać z różnic w wielkości komórek grzybiczej i bakteryjnej. Inna budowa komórki grzyba, szczególnie ściany komórkowej, może stanowić dodatkową barierę dla fotouczulaczy [29]. *S. aureus* wchłaniał orto TBO praktycznie od pierwszej minuty. Od 3 minuty wszystkie komórki wykazywały niebieski, intensywny kolor. Warto zaznaczyć, że nie wykazano utraty barwnika przez cały okres mikroskopowania. Podobnie było z kurkumina. Komórki również były zabarwione od pierwszych chwil mikroskopowania, z czasem barwa była bardziej intensywna. Zaobserwowano pogrupowanie w większe skupiska komórek *S. aureus* pod wpływem kurkuminy z ryboflawiną. Wchłanianie orto TBO przez *S. pyogenes* nie było tak nasilone jak w przypadku *S. aureus*, ale też zaczynało się od pierwszych chwil inkubacji z barwnikiem. Wykazano stopniowe wchłanianie TBO przez cały okres obserwacji. Stopniowe wchłanianie wykazano też w przypadku kurkuminy z ryboflawiną. Komórki wchłaniają barwnik od początku, ale po 5 minutach wchłanianie jest bardziej intensywne a dopiero po 9 minutach większość komórek paciorkowca została zabarwiona. Podobnie jak w przypadku *S. aureus* wykazano pogrupowanie komórek. W przypadku *C. albicans* stwierdzono, że dopiero od 3-4 minuty pojedyncze komórki były zabarwione. Większość wchłonęła barwnik około 7 minuty. Wchłanianie kurkuminy z ryboflawiną było bardzo słabe. Komórki nie zmieniały intensywności zabarwienia prawie przez cały okres mikroskopowania.

Shein i wsp. oceniając skuteczność PDT z zastosowaniem TBO w odniesieniu do wyizolowanych z zakażeń oka *Staphylococcus epidermidis* i *S. aureus* stosowali 20 minutowy okres inkubacji fotouczulacza z komórkami gronkowców [30]. Inny zespół badawczy, analizujący efektywność terapii fotodynamicznej w inaktywacji biofilmu *S. epidermidis* i *S. aureus* zastosował 30 minutowy okres inkubacji TBO [31]. 30-minutowy okres inkubacji gronkowca złocistego z kurkumina o różnym stężeniu zastosował także zespół Yuan i wsp. [32].

Soria-Lozano i wsp. porównywali skuteczność fotoinaktywacji drobnoustrojów próchnicotwórczych: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* oraz *C. albicans* pod wpływem trzech fotouczulaczy (błękit metylenowy, róż bengalski, kurkumina) [33]. Autorzy pracy zastosowali różny czas ich inkubacji z drobnoustrojami: <1 minuta, 1 godzina i 3 godziny. W przypadku błękitu metylenowego i różu bengalskiego wykazano,

że wydłużony okres inkubacji (np. 1 godzina) zmniejszał stężenie fotouczulacza niezbędne do redukcji liczebności paciorkowców w porównaniu do krótszego czasu inkubacji (<1 minuta). W przypadku kurkuminy taki efekt zaobserwowano tylko w odniesieniu do *S. sanguis* [33].

Badania przeprowadzone przez Wiench i wsp. [12] wykazały duże różnice w optymalnym czasie wchłaniania błękitu toluidyny przez wybrane gatunki grzybów z rodzaju *Candida*. Najwyższy odsetek komórek zabarwionych zaobserwowano po 7 i 10 minutach wchłaniania barwnika. W przypadku większości szczepów autorzy wykazali stopniową jego utratę z cytoplazmy komórek po 5 i 10 minutach inkubacji z barwnikiem [12]. Wykazano również, że szczep *Candida glabrata* ulegał agregacji w duże struktury, co miało uchronić komórkę przed wnikaniem barwnika. Struktury te pojawiały się w okresie 3-5 minut od dodania TBO. Autorzy nie zaobserwowali podobnych mechanizmów ochronnych w przypadku innych grzybów z rodzaju *Candida* [12].

Kolejny zespół badawczy przy ocenie wpływu czasu inkubacji kurkuminy na skuteczność PDT w odniesieniu do grzybów drożdżopodobnych (*C. albicans*, *C. glabrata*, *Candida dubliniensis*) stosował inny okres inkubacji dla formy planktonowej grzybów i tych w utworzonej strukturze biofilmu. Komórki planktonowe inkubowano przez 1 minutę, 5, 10 i 20 minut. Z kolei, komórki w strukturze biofilmu poddawano działaniu kurkuminy przez 5 i 20 minut. Kurkumina stosowana była w stężeniu 5, 10 i 20 μM w odniesieniu do formy planktonowej grzybów i 20, 30 oraz 40 μM w odniesieniu do biofilmu. Autorzy nie wykazali istotnych statystycznie różnic w fotoinaktywacji wybranych grzybów w zależności od czasu inkubacji z kurkumina. W przypadku kurkuminy o najwyższym stężeniu (20 μM) wykazano całkowitą inaktywację grzybów zarówno po 5, 10, jak i 20 minutach inkubacji. Dodatkowo w przypadku *C. albicans* i *C. glabrata* po inkubacji przez okres 1 minuty z kurkumina o stężeniu 20 μM wykazano prawie 90% fotoinaktywację. PDT z kurkumina była również skuteczna wobec grzybów w strukturze biofilmu. Najwyższe, 94% zmniejszenie żywotności komórek wykazano dla *C. albicans*. Dla *C. glabrata* i *C. dubliniensis* procent ten wynosił odpowiednio 89% i 85%. Warto zaznaczyć, że w przypadku biofilmu 20 minutowy okres inkubacji z kurkumina o stężeniu 40 μM skutkował największym zmniejszeniem żywotności komórek [29].

6. Podsumowanie

Na skuteczność całego procesu aPDT wpływa wiele czynników, m.in. rodzaj zastosowanego fotouczulacza, jego stężenie czy optymalny czas inkubacji niezbędny do wchłaniania barwnika przez komórki drobnoustroju. Dodatkowo istotny jest również rodzaj zastosowanego lasera i ustawień jego parametrów [34, 12]. Zmienne parametry całego procesu aPDT mogą być przyczyną uzyskania rozbieżnych wyników dotyczących efektywności aPDT [34]. Optymalny czas inkubacji niezbędny do wchłaniania barwnika przez drobnoustroje może być uzależniony od rodzaju fotouczulacza [29].

Literatura

1. Jamróz-Wilkońska L., Wilkoński W., *Terapia fotodynamiczna w leczeniu zapalenia przyzębia*, Stomatologia po dyplomie, 11, 2014, 11.
2. Osmałek T., Gośliński T., *Rozwój badań dotyczących fotodynamicznej terapii onkologicznej*, Farmacja Polska, 65, 2009, s. 549-552.
3. Ghorbani J., Rahban D., Aghamiri S., Teymouri A., Bahador A., *Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview*, Laser Therapy, 27, 2018, s. 293-302.

4. Gholami L., Shahabi S., Jazaeri M., Hadilou M., Fekrazad R., *Clinical applications of antimicrobial photodynamic therapy in dentistry*, *Frontiers in Microbiology*, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.1020995/full> [data dostępu: 05.01.2023].
5. Kwaśny M., *Metoda fotodynamicznego leczenia w dermatologii*, *Forum Dermatologicum*, 4, 2018; s. 138-147.
6. Correia J.H., Rodrigues J.A., Pimenta S., Dong T., Yang Z., *Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions*, *Pharmaceutics*, 13, 2021, <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/9/1332> [data dostępu: 25.08.2021].
7. Sadowska B., Paszkiewicz M., Więcowska-Szakiel M., Różalska B., *Wybrane strategie zwalczania biofilmów w zakażeniach, Część 2, Terapia fotodynamiczna*, *Forum Zakażeń*, 5, 2014, s. 279-286.
8. Szulc M., Ziętek M., *Zastosowanie terapii fotodynamicznej w chorobach przyzębia – na podstawie piśmiennictwa*, *Czasopismo Stomatologiczne*, 8, 2007, s. 527-535.
9. Czajkowska K., Czajkowski M., Matuszewski M., Nowicki R.J., Sokołowska-Wojdyło M., *Terapia fotodynamiczna w dermatologii*, *Farmacja współczesna*, 12, 2019, s. 15-22.
10. Martins Antunes de Melo W.C., Celiešiūtė-Germanienė R., Šimonis P., Stirkė A., *Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) for biofilm treatments. Possible synergy between aPDT and pulsed electric fields*, *Virulence*, 12, 2021, s. 2247-2272.
11. Mozayeni M.A., Vatandoost F., Asnaashari M., Shokri M., Azari-Marhabi S., Asnaashari N., *Comparing the Efficacy of Toluidine Blue, Methylene Blue and Curcumin in Photodynamic Therapy Against Enterococcus faecalis*, *Journal of Lasers in Medical Science*, 11, 2020, s. 49-54.
12. Wiench R., Nowicka J., Pajęczkowska M., Kuroпка P., Skaba D., Kruczek-Kazibudzka A., Kuśka-Kielbratowska A., Grzech-Leśniak K., *Influence of Incubation Time on Ortho-Toluidine Blue Mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy Directed against Selected Candida Strains-An In Vitro Study*, *International Journal of Molecular Science*, 22, 2021, <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/20/10971> [data dostępu: 11.10.2021].
13. Samulak-Zielińska R., Dembowska E., Wiernicka-Menkiszak M., *System FotoSan w terapii fotodynamicznej chorób przyzębia*, *Magazyn Stomatologiczny*, 7, 2010, s. 49-53.
14. Xie L., Ji X., Zhang Q., Wei Y., *Curcumin combined with photodynamic therapy, promising therapies for the treatment of cancer*, *Biomedicine&Pharmacotherapy*, 146, 2022, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332221013548> [data dostępu: 22.12.2021].
15. Wangsuwan S., Meephansan J., *Comparative Study Of Photodynamic Therapy With Riboflavin-Tryptophan Gel And 13% 5-Aminolevulinic Acid In The Treatment Of Mild To Moderate Acne Vulgaris*, *Clinical Cosmetic and Investigational Dermatology*, 5, 2019, s. 805-814.
16. Todd O.A., Peters B.M., *Candida albicans and Staphylococcus aureus Pathogenicity and Polymicrobial Interactions: Lessons beyond Koch's Postulates*, *Journal of Fungi (Basel)*, 4, 2019, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6787713/>, [data dostępu: 04.09.2019].
17. Pato C., Melo-Cristino J., Ramirez M., Friães A., *Streptococcus pyogenes Causing Skin and Soft Tissue Infections Are Enriched in the Recently Emerged emm89 Clade 3 and Are Not Associated With Abrogation of CovRS*, *Frontiers in Microbiology*, 9, 2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6189468/> [data dostępu: 09.10.2018].
18. Patel M., *Oral Cavity and Candida albicans: Colonisation to the Development of Infection*, *Pathogens*, 10, 2022, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8953496/> [data dostępu: 10.03.2022].

19. Garbacz K., Jarzembowski T., Kwapisz E., Daca A., Witkowski J., *Do the oral Staphylococcus aureus strains from denture wearers have a greater pathogenicity potential?*, Journal of Oral Microbiology, 23, 2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6225501/> [data dostępu: 23.10.2018].
20. Ogawa T., Terao Y., Sakata H., Okuni H., Ninomiya K., Ikebe K., Maeda Y., Kawabata S., *Epidemiological characterization of Streptococcus pyogenes isolated from patients with multiple onsets of pharyngitis*, FEMS Microbiology Letters, 318, 2011, s. 143-151.
21. Szewczyk M.E., *Diagnostyka bakteriologiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2019, s. 14-42.
22. Cheung G.Y.C., Bae J.S., Otto M., *Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus*, Virulence, 12, 2021, s. 547-569.
23. Cunningham M.W., *Pathogenesis of group A streptococcal infections*, Clinical Microbiology Reviews, 13, 2000, s. 470-511.
24. Henriques M., Silva S., *Candida Albicans Virulence Factors and Its Pathogenicity*, Microorganisms, 29, 2021, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8065973/> [data dostępu: 29.03.2021].
25. Czechowicz P., Nowicka J., Gościński G., *Virulence Factors of Candida spp. and Host Immune Response Important in the Pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis*, International Journal of Molecular Science, 23, 2022, <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/11/5895> [data dostępu: 23.05.2022].
26. Lelonkiewicz M., Nowicka J., Pajączkowska M., Neubauer D., *Aktywność in vitro lipopeptydów wobec wielogatunkowego biofilmu jamy ustnej – badania wstępne*, [w:] Mołdoch-Mendoń I., Szymczyk P. (red.), *Mikroorganizmy i rośliny – wykorzystanie w nauce i przemyśle*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., 2022, s. 14-27.
27. Tambone E., Marchetti A., Ceresa C., Piccoli F., Anesi A., Nollo G., Caola I., Bosetti M., Fracchia L., Ghensi P., Tassarolo F., *Counter-Acting Candida albicans-Staphylococcus aureus Mixed Biofilm on Titanium Implants Using Microbial Biosurfactants*, Polymers (Basel), 23, 2021, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8348062/>, [data dostępu: 23.07.2021].
28. Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., Sączko J., Kędzierska K., Knap-Czop K., Kotlińska J., Michel O., Kotowski K., Kulbacka J., *Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations*, Biomedicine & Pharmacotherapy, 106, 2018, s. 1098-1107.
29. Andrade M.C., Dias Ribeiro A.P., Dovigo L.V., Brunetti I.L., Giampaolo E.T., Bagnato V.S., Pavarina A.C., *Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of Candida spp.*, Archives of Oral Biology, 58, 2013, s. 200-210.
30. Shen J., Liang Q., Su G., Zhang Y., Wang Z., Baudouin C., Labbé A., *In Vitro Effect of Toluidine Blue Antimicrobial Photodynamic Chemotherapy on Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus Isolated from Ocular Surface Infection*, Translation Vision Science & Technology, 21, 2019, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6590089/> [data dostępu: 21.06.2019].
31. Sharma M., Visai L., Bragheri F., Cristiani I., Gupta P.K., Speziale P., *Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52, 2008, s. 299-305.
32. Yuan Y., Liu Q., Huang Y., Qi M., Yan H., Li W., Zhuang H., *Antibacterial Efficacy and Mechanisms of Curcumin-Based Photodynamic Treatment against Staphylococcus aureus and Its Application in Juices*, Molecules, 27, 2022, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9612228/> [data dostępu: 21.10.2022].
33. Soria-Lozano P., Gilaberte Y., Paz-Cristobal M., Pérez-Artiaga L., Lampaya-Pérez V., Aporta J., Pérez-Laguna V., García-Luque I., Revillo M.J., Rezusta A., *In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms*,

BMC Microbiology, 15, 2015, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4584123/> [data dostępu: 26.09.2015].

34. Wiench R., Skaba D., Matys J., Grzech-Leśniak K., *Efficacy of Toluidine Blue-Mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy on Candida spp. A Systematic Review*, *Antibiotics* (Basel). 10, 2021 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33806003/> [data dostępu: 25.03.2021].

Ocena optymalnego czasu wchłaniania błękitu toluidyny i kurkuminy przez wybrane drobnoustroje – badania wstępne

Streszczenie

Antybakteryjna terapia fotodynamiczna (aPDT) może stanowić alternatywę lub wspomagającą metodę leczenia zakażeń dotyczących skóry i/lub błon śluzowych. Ma ogromne zastosowanie m.in. w dermatologii czy stomatologii. Jej skuteczność w istotny sposób uzależniona jest od czasu wchłaniania fotouczulaczy (PS) przez drobnoustroje i jest to jednocześnie najmniej przebadany etap algorytmu postępowania aPDT.

W pracy oceniono czas inkubacji potrzebny do wchłaniania poszczególnych fotouczulaczy przez wzorcowe szczepy *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* i *Candida albicans*. Do badań wybrano preparaty handlowe dopuszczone do stosowania klinicznego w stomatologii: błękit toluidyny orto (TBO) oraz kurkuminę z ryboflawiną.

Do oceny absorpcji PS zastosowano metodę obserwacji mikroskopowej w czasie rzeczywistym. Materiał analizowano z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego Nikon Eclipse 80i (powiększenie 600x). Dokumentację fotograficzną wykonywano co 30 sekund przez 10 min. Ocena absorpcji fotouczulaczy przeprowadzana była przez jednego obserwatora.

Stwierdzono duże różnice w czasie wchłaniania fotouczulaczy przez wybrane drobnoustroje. Najkrótszy czas wchłaniania zarówno TBO, jak i kurkuminy z ryboflawiną wykazano dla *S. aureus*, najdłuższy dla *C. albicans*. Słowa kluczowe: terapia fotodynamiczna, TBO, kurkumina, mikroorganizmy

Assessment of optimal uptake time for toluidine blue and curcumin by selected microorganisms – preliminary studies

Abstract

Antibacterial photodynamic therapy (aPDT) may be an alternative or supportive treatment for infections affecting the skin and/or mucous membranes. Among others, it is widely used in dermatology or dentistry. Its effectiveness largely depends on the time of uptake of photosensitizers (PS) by microorganisms, with this factor also being the least studied element of the aPDT algorithm.

As part of the research, the incubation time needed for the absorption of individual photosensitizers by standard strains of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Candida albicans* was evaluated. The study was conducted using agents approved for clinical use in dentistry – toluidine blue ortho (TBO) and curcumin with riboflavin.

To assess PS uptake, real-time microscopic observation was used. The material was analyzed using a Nikon Eclipse 80i light microscope (600x magnification). Photographic documentation was made every 30 seconds for 10 minutes. The absorption of photosensitizers was assessed by one observer.

Large differences in the uptake times of photosensitizers by selected microorganisms have been observed. The shortest uptake time of both TBO and curcumin and riboflavin was found for *S. aureus*, while the longest for *C. albicans*.

Keywords: photodynamic therapy, TBO, curcumin, microorganism

Wpływ fermentacji mlekowej na przebieg procesu technologicznego i wybrane wyróżniki jakościowe piwa

1. Wprowadzenie

Od kilku lat w Polsce obserwuje się znaczący rozwój przemysłu piwowarskiego nie tylko na poziomie browarów komercyjnych, ale przede wszystkim browarów rzemieślniczych, restauracyjnych oraz kontraktowych. Wynikiem tych zmian jest tzw. piwna rewolucja, czyli wzrost znaczenia na rynku piw rzemieślniczych oraz ciągle rozszerzanie oferty browarów o nowe style piwne nieprodukowanych jak dotąd na skale masową w Polsce. Jednym z najpopularniejszych stylów piwa w XXI wieku był lager. Obecnie obserwuje się znaczący spadek spożycia piw tego stylu na rzecz stylów kraftowych. Wysycenie rynku popularnymi dotychczas stylami spowodowało wytworzenie niszy dla stylów mniej popularnych ukierunkowanych przede wszystkim na poszukujących nowych smaków klientów. Stąd wynika tworzenie nowych wariacji oraz odtwarzanie już tradycyjnych receptur piw, z czym wiąże się wzrost popularności piw kwaśnych.

Piwa kwaśne uważane są za jedne z najstarszych stylów piw komercyjnych. Pierwotnie prawdopodobnie wszystkie piwa były poddane zakwaszeniu spontanicznemu do czasu, aż człowiek nie nauczył się przedłużać ich trwałości. Skutkiem tego było dodawanie do brzezki chmielu znanego z właściwości przeciwbakteryjnych, a powodującego przedłużenie świeżości piwa. Tradycyjnie zakwaszana spontanicznie brzezka poddawana była długotrwałej, nawet kilkuletniej fermentacji i dojrzewaniu. W piwach otrzymywanych podczas fermentacji spontanicznej dominują szczepy bakterii kwasu mlekowego, takie jak *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, kwasu octowego, takie jak *Acetobacter aceti* czy *Acetobacter liquefaciens* oraz drożdże *Brettanomyces*. Rosnąca popularność piw kwaśnych jest czynnikiem sprzyjającym tworzeniu nowych rozwiązań kontrolowanej fermentacji w celu szybkiego zakwaszenia brzezki i uzyskania produktu końcowego o znormalizowanej jakości. Opracowane zatem zostały metody takie jak zakwaszanie brzezki w kotle, bezpośrednie zakwaszanie kwasem mlekowym, czy zakwaszanie wynikające z kofermentacji drożdży i bakterii kwasu mlekowego. W komercyjnym piwowarstwie obecność bakterii kwaszących uznawana jest za wadę powodującą psucie się piwa, wpływając niekorzystnie na trwałość oraz cechy organoleptyczne. Jednakże w stylach tradycyjnych piw takich jak: lambic, berliner weisse, czy gueuze obecność bakterii lub kwaśny profil smakowy wytwarzany przez nie, jest determinantą do uznania ich za piwa kwaśne. Dzięki różnorodności szczepów bakterii oraz drożdży, jak również metod zakwaszania, otrzymywane są piwa o wielowymiarowym i złożonym profilu. Powyższe czynniki wpływają również na jakość końcowego produktu i ich finalny odbiór przez konsumentów. Obecność mikroorganizmów kwaszących jest kluczowa w kształtowaniu smaku, aromatu oraz przede wszystkim właściwości prozdrowotnych. Przez to piwa kwaśne mogą być uznawane za żywność prozdrowotną

¹ sylwia.rzad@up.lublin.pl, Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, up.lublin.pl.

łącząc w sobie korzyści probiotyczne wynikające z fermentacji przy udziale bakterii kwasu mlekowego oraz właściwości antyoksydacyjne, dzięki zawartości związków przeciwutleniających pochodzących ze słodu.

W związku z powyższym zbadano wpływ fermentacji mlekowej brzeczki na przebieg procesu fermentacji alkoholowej przy użyciu różnych szczepów bakterii oraz drożdży. Określono również wpływ fermentacji mlekowej na wybrane wyróżniki jakościowe piwa.

2. Bakterie kwasu mlekowego w technologii piwa

W tradycyjnym piwowarstwie obecność LAB (bakterie kwasu mlekowego) jest uważana za wadę powodującą psucie się piwa i niekorzystne zmiany organoleptyczne [1]. Jednakże w produkcji piw kwaśnych stylów tj. lambic, Berliner Weisse, czy gueuze są kluczowym dodatkiem kształtującym smak, aromat oraz właściwości prozdrowotne [2]. Różnorodność szczepów oraz metod zakwaszania determinuje złożoność profili smakowych oraz jakość produktu końcowego [3].

Bakterie kwasu mlekowego to pałeczki Gram-dodatnie, spośród których największe znaczenie w technologii piwa kwaśnego mają *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* oraz *Lactobacillus delbrueckii* [4]. Klasyfikuje się je przede wszystkim ze względu na metabolizm, czyli na homofermentatywne, które przetwarzają cukry do kwasu mlekowego oraz na heterofermentatywne, które oprócz kwasu mlekowego produkują również etanol, kwas octowy, dwutlenek węgla [5]. Ponadto zdolność LAB do wytwarzania bakteriocyn wykorzystano w produkcji słodu jako działanie przeciwgrzybicze oraz hamujące wytwarzanie mikotoksyn [2, 6]. LAB, do wzrostu wykorzystują węglowodany proste zawarte w brzeczce, z czego większość z nich preferuje glukozę. Konwersja innych cukrowców tj. maltoza czy fruktoza następuje dopiero po wyczerpaniu zapasu glukozy [7]. Zawarte w brzeczce minerały, takie jak magnez czy potas oraz peptydy i wolne aminokwasy, działają stymulująco na wzrost bakterii [8]. LAB są klasyfikowane jako względne beztlenowce, toteż najaktywniejszy wzrost obserwuje się w brzeczce nienatlenionej [4]. Szczepy z gatunku *Lactobacillus* są chętnie używane do produkcji piw kwaśnych ze względu na szybkość i wydajność produkcji kwasu mlekowego oraz efektywnego obniżania pH brzeczki do ok. 3,1-3,2, bez wytwarzania związków aromatycznych, co skutkuje uzyskaniem „czystego” kwaśnego smaku [2, 9].

W nowoczesnym browarnictwie wyzwaniem jest utrzymanie żywotności bakterii w brzeczce gotowanej z chmielem ze względu na zawartość izo- α -kwasów, które hamują wzrost bakterii gram-dodatnich. Dowiedziono, iż kofermentacja drożdży *Sacchromyces cereviae* wraz z *Lactobacillus paracasei* zwiększa stabilność i szanse na przeżycie bakterii w chmielonej brzeczce, przy jednoczesnym wytwarzaniu kwasu mlekowego przez bakterie oraz etanolu przez drożdże [10]. Poszczególne szczepy LAB wykazują różną tolerancję na chmiel. Dowiedziono, iż geny HorA i HorC zwiększają odporność *L. brevis* na izo- α -kwasy, co jest cechą wyróżniającą ten szczep spośród innych LAB [11]. *L. brevis* należy do szczepów obligatoryjnie heterofermentatywnych, czyli oprócz kwasu mlekowego może wytwarzać również kwas octowy, etanol oraz CO₂. Może być on używany do produkcji piwa kwaśnego, jednak większość doniesień literaturowych kategoryzuje go do grupy bakterii powodujących psucie się piwa [12, 13]. Jak dowodzą badania, *L. brevis* jest jednym z najbardziej odpornych na czynniki stresowe, szczepów

LAB. Obecność izo- α -kwasów nie hamuje jego wzrostu, tak jak dzieje się to w przypadku *L. plantarum*. Ponadto na jego wzrost nie wpływa obecność etanolu, czy niskie pH [14]. Co więcej, wykazano, iż w warunkach niekorzystnych, *L. brevis* nie wytwarza siarczku dimetylu, którego obecność w piwie uważana jest za wadę [15]. Dowiedziono, iż odporność *L. brevis* na czynniki wielostresowe ma związek z obecnością genów *hitA*, *horA* i *horC* [11].

W niektórych piwach kwaśnych fermentowanych spontanicznie tj. Lambic czy american coolship ale, obserwuje się obecność szczepu *Pediococcus damnosus*, który wyróżnia się wysoką tolerancją na chmiel oraz zdolnością do obniżania pH brzeczki poniżej 3, wykazując wzrost w niskim pH [16]. Ze względu na wytwarzanie diacetylu, który odpowiada za niekorzystny aromat piwa, nie jest powszechnie używany w kontrolowanej fermentacji piw kwaśnych [17]. Ponadto wykazuje zdolność do produkcji egzopolisacharydów zwiększających lepkość piwa, co przekłada się na późniejsze problemy z filtracją oraz wpływa negatywnie na teksturę piwa [18, 19].

Dowiedziono, iż *L. plantarum* jest elastyczny pod względem dostosowywania się do środowiska i warunków tam panujących, modyfikując swój metabolizm komórkowy [20]. Dzięki ekspresji genów oraz dostosowywaniu składu lipidów w błonie komórkowej, *L. plantarum* uodparnia się na stres, mogąc przetrwać w środowisku o zawartości etanolu powyżej 9% [21, 22].

Lactobacillus plantarum, spośród wszystkich LAB, jest uważany za najsilniejszy inhibitor wzrostu pleśni i drożdży niekorzystnych w produkcji piwa. Dzięki swojej zdolności do obniżania pH poprzez produkcję kwasu mlekowego, octowego, nadtlenu wodoru czy bakteriocyn, skutecznie hamuje rozwój grzybów, co przekłada się na przedłużenie trwałości produktu końcowego [23]. Dowiedziono, iż *L. plantarum* ma zdolność do względnie szybkiego obniżania pH i do wytwarzania dużej ilości kwasu mlekowego w porównaniu do innych szczepów LAB, jednak nie wykazuje odporności na izo- α -kwas i inne warunki stresowe [14].

3. Sposoby zakwaszania piw

Pierwotną metodą zakwaszania piwa była fermentacja spontaniczna, w której następowała kooperacja wielu rodzajów drożdży, a w trakcie fermentacji następowała naprzemienna sukcesja bakterii oraz drożdży [24]. Wiązało się to z nieoczekiwanymi rezultatami, niejednorodną jakością końcową produktu i trudnością w ujednoczeniu procesu. Z tego powodu wraz z rozwojem technologii zaczęto poszukiwać nowych i bardziej optymalnych sposobów zakwaszania piw [19]. Jednym z najpopularniejszych sposobów w dzisiejszych czasach jest zakwaszanie w kotle, dające możliwość doboru odpowiednich warunków fermentacji, dzięki czemu w efekcie uzyskuje się piwo o znormalizowanej jakości [25].

3.1. Zakwaszanie pierwotne przy użyciu szczepów dzikich

W przypadku piw kwaśnych warzonych metodą tradycyjną wykorzystuje się proces fermentacji spontanicznej, gdzie zaszczepienie mikroorganizmami zachodzi podczas ekspozycji brzeczki w otwartej przestrzeni. Beczki są wystawiane na zaszczepienie w miasiącach zimowych, co umożliwia szybkie schłodzenie brzeczki i zapobiega zakażeniu niepożądanymi mikroorganizmami. Ta ekspozycja pozwala na zaszczepienie mikroorganizmami obecnymi w powietrzu w browarze [24, 26]. W przypadku bardziej nowoczesnych

browarów beczki wraz z brzeczka wstawiane są do specjalnych chłodzi, co pozwala na szybkie jej schłodzenie i produkcję piwa przez cały rok [27]. Podczas szczepienia spontanicznego zachodzi proces fermentacji mieszanej, gdzie szczepy drożdży dzikich i bakterii współpracują ze sobą, skutkując w uzyskanie niepowtarzalnego aromatu i profilu smakowego piwa. W przeciwieństwie do piw warzonych z użyciem kultur czystych, piwa kwaśne uzyskane w fermentacji spontanicznej charakteryzują się nie tylko różnorodnością mikrobiologiczną, ale i unikalnym przekrojem aromatycznym [28]. Dodatkowo w stylach tj. lambic, czy gueuze, bakterie LAB mogą być ekstrahowane z drewnianych beczek, w których zachodzi dojrzewanie nawet przez kilka lat [29]. Dowiedziono, iż spontaniczna ekstrakcja mikroorganizmów zachodzi sukcesywnie w czterech etapach. Pierwsza faza trwająca od tygodnia do miesiąca obejmuje rozwój chorobotwórczych pałeczek tj. *Escherichia coli*, czy *Klebsiella pneumoniae*, bakterii kwasu octowego oraz drożdży innych niż *Saccharomyces* spp. [19]. Następnie do końca 4 miesiąca fermentacja zdominowana zostaje przez drożdże *Saccharomyces* oraz *Brettanomyces*. W kolejnych miesiącach fermentacji przodują bakterie kwaszące LAB oraz AAB (bakterie kwasu octowego), produkujące w przeważającej części kwas mlekowy oraz octowy. Charakterystycznym jest to, iż fermentacja alkoholowa zachodzi równocześnie z fermentacją mlekową [26]. Od ósmego miesiąca następuje kofermentacja oraz dojrzewanie z udziałem bakterii LAB, AAB oraz drożdży *Brettanomyces* oraz *Saccharomyces* [28, 30]. Dowiedziono, iż dwuletnia fermentacja piwa Lambic owocuje w uzyskanie ok. 400 szczepów bakteryjnych i ok. 1700 szczepów drożdży [30].

3.2. Zakwaszanie w kotle

Zakwaszanie w kotle (*fast kettle souring*) jest metodą pozwalającą na szybkie uzyskanie wymaganej kwasowości przy jednoczesnym osiągnięciu pożądanej goryczki z chmielu. Zakwaszanie tym sposobem używane jest przy produkcji piw stylów takich jak Berliner Weiße oraz gose [31]. Istotą tej metody jest dodanie bakterii do niechmielonej brzeczki schłodzonej do temperatury optymalnej dla rozwoju LAB w czasie, gdy brzeczka dalej znajduje się w kotle warzelnym. Następnie brzeczka pozostawia się na określony czas fermentacji (24-48 godziny lub dłużej) aż do osiągnięcia pH 3-3,7. Po uzyskaniu odpowiedniego poziomu pH, brzeczka gotuje się wraz z chmielem w ilości odpowiedniej do otrzymania należytej goryczki [19, 25]. Żywotność LAB nie pozostaje dłużej determinantą do dobrania odpowiedniej ilości chmielu oraz α -kwasów, ze względu na ich wcześniejszą inaktywację w procesie drugiego gotowania. W kolejnej fazie następuje schłodzenie brzeczki oraz zaszczepienie drożdżami w fermentorze w celu zainicjowania fermentacji alkoholowej [31]. Na tym etapie ważne jest dobranie szczepu drożdży odpornego na warunki stresowe, takie jak niskie pH [32]. Zaletą tej metody jest indywidualny dobór parametrów na różnych etapach odmiennych dla drożdży i bakterii tj. poziom natlenienia, czy temperatura [31]. Ponadto zakwaszanie w kotle pozwala na uzyskanie w krótkim czasie odpowiedniego poziomu kwasowości [25]. Jednakże ze względu na krótki czas fermentacji mlekowej, piwo uzyskane tą metodą charakteryzuje się jednorodną kwasowością, co odróżnia go od złożoności aromatu uzyskiwanego przy szczepieniu i zakwaszaniu spontanicznym [31]. Dla piwowarów istotną wadą tej metody uniemożliwiającą wyprodukowanie kolejnej warki, jest zajęcie kotła warzelnego na czas fermentacji mlekowej oraz późniejsze ryzyko infekcji bakteriami brzeczki piwa niezakwaszanego [33].

3.3. Zakwaszanie kwasem mlekowym

Ze względu na długi czas fermentacji, nieprzewidywalne rezultaty oraz skomplikowany proces produkcji, zaczęto szukać alternatyw dla zakwaszania biologicznego piwa [19]. Jednym z nich jest użycie kwasów spożywczych po lub w trakcie fermentacji brzezki. Spośród kwasu fosforowego, octowego oraz mlekowego, ten ostatni należy do najczęściej wybieranych środków zakwaszających ze względu na brak lub niewielki wpływ na cechy organoleptyczne piwa [31]. Jednakże takie piwa, w przeciwieństwie do piw zakwaszanych biologicznie, nie charakteryzują się złożonością aromatu, a jedynie jednorodnie kwaśnym smakiem [14]. Ponadto taki sposób zakwaszania jest zabroniony przez niemieckie prawo czystości piwa (Reinheitsgebot), do którego stosują się tradycyjne browary [34]. W badaniach dowiedziono, iż kolejność dodatku kwasu mlekowego i drożdży ma wpływ na wybrane cechy jakościowe piwa. Mniejsze zmętnienie produktu końcowego wywołane zostało przez dodatek kwasu mlekowego przed fermentacją alkoholową [14]. Spowodowane to być może większą wydajnością flokulacji drożdży w brzezce o niższym pH oraz mniejszą efektywnością tworzenia się związków białkowo-fenolowych, powodujących zmętnienie [35]. Jednakże zmętnienie w piwach zakwaszanych kwasem mlekowym było większe niż przy zakwaszaniu LAB, a zawartość kwasów organicznych (mlekowy, octowy, pirogronowy, mrówkowy) stosunkowo niższa [36].

3.4. Zakwaszanie z użyciem słoów kwaszących

Najrzadziej używaną metodą zakwaszania jest dodatek słoów kwaszących do zacieru. Dodawanie słoju kwaszącego do zasypu kiedyś było powszechną praktyką, dziś jednak została zastąpiona przez bardziej wydajne metody zakwaszania [37]. Dodatek 5% słoów kwaszących w całej objętości zacieru pozwala na obniżenie pH poniżej 4,6 [38]. Wadą słoów kwaszących jest ich cena w porównaniu do innych metod zakwaszania i wpływ na stabilność organoleptyczną piwa [39].

4. Cel badań

Celem badań było zaprojektowanie wytworzenia i oceny piwa kwaśnego, a także określenie wpływu fermentacji mlekowej brzezki na przebieg procesu fermentacji alkoholowej i wybrane wyróżniki jakości piwa.

Cel ten został zrealizowany poprzez:

- Projektowanie i recepturowanie piwa;
- Przygotowanie brzezki piwnej z wykorzystaniem warzelnii półautomatycznej;
- Przygotowanie piwa poddanego fermentacji mlekowej przy użyciu szczepu *Lactobacillus plantarum*;
- Przygotowanie piwa poddanego fermentacji mlekowej przy użyciu szczepu *Lactobacillus brevis*;
- Przygotowanie piwa poddanego fermentacji mlekowej i alkoholowej przy użyciu szczepu *Saccharomyces boulardii*;
- Ocena przydatności różnych szczepów probiotycznych w procesie fermentacji piwa.

5. Materiały i metody

5.1. Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiła brzezka piwna poddana fermentacji w zbiornikach ciśnieniowych z udziałem *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* oraz *Saccharomyces boulardii* i *Saccharomyces cerevisiae* US-05 (próba kontrolna) pobierana od pierwszego do dwudziestego dnia fermentacji. Wszystkie próbki przechowywano do czasu analizy w temperaturze -18°C .

5.2. Przygotowanie szczepów bakterii i drożdży

Szczepy użyte w doświadczeniu pozyskano z Katedry Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Użyto szczepów bakterii *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus brevis* oraz drożdży *Saccharomyces boulardii* i *Saccharomyces cerevisiae* Safale US-05. Wszystkie szczepy wykazywały wzrost w różnych temperaturach (22°C , 28°C , 37°C), różnym stopniu natlenienia oraz w warunkach wytrząsania.

Hodowlę otrzymano poprzez zaszczepienie sterylnej brzezki piwnej kulturami starterowymi. Sterylną brzezkę o temperaturze pokojowej przelano do 4 kolb o pojemności 500 cm^3 . Do każdej kolby dodano 20 cm^3 płynnej kultury starterowej. Hodowlę prowadzono przez 55 godzin w temperaturze 21°C przy użyciu wytrząsarki laboratoryjnej.

Kolba I: 400 cm^3 brzezki + 20 cm^3 inokulum w postaci płynnej hodowli *Saccharomyces cerevisiae* Safale US-05

Kolba II: 400 cm^3 brzezki + 20 cm^3 inokulum w postaci płynnej hodowli *Lactobacillus plantarum*

Kolba III: 400 cm^3 brzezki + 20 cm^3 inokulum w postaci płynnej hodowli *Lactobacillus brevis*

Kolba IV: 400 cm^3 brzezki + 20 cm^3 inokulum w postaci płynnej hodowli *Saccharomyces boulardii*

5.3. Przygotowanie i fermentacja brzezki

Do przygotowania brzezki użyto słodu pilzneńskiego (Viking Malt, jęczmienny) oraz słodu pszenicznego (Viking Malt) w stosunku 67% do 33%. Do procesu zacierania użyto 4 litry wody na 1 kg słodu. Warzenie przeprowadzono z użyciem półautomatycznej linii do produkcji brzezki piwnej firmy Gestar. Do procesu użyto wody wodociągowej zakwaszonej uprzednio kwasem mlekowym do pH 5,5. Ześrutowany sód poddany został zacieraniu w następujący sposób: 45 min. w 65°C , 15 min. w 72°C , a następnie 2 min. w 78°C . Po zakończeniu procesu, zacier oddzielony został od wysłodzin oraz poddany filtracji. Następnie brzezkę gotowano przez 1,5 godziny bez dodatku chmielu, do uzyskania ciężaru właściwego brzezki 1,035 SG ($8,8^{\circ}\text{P}$). Brzezkę schłodzono do temperatury 25°C w kadzi wirowej Whirpool, bez natleniania, połączonej z płytowym wymiennikiem ciepła. Schłodzoną brzezkę przelano do czterech ciśnieniowych zbiorników fermentacyjnych, a następnie zaszczepiono inokulum, w następujący sposób:

- Zbiornik fermentacyjny: 7500 cm^3 brzezki + 420 cm^3 inokulum w postaci płynnej hodowli drożdży *Saccharomyces cerevisiae* US-05 (próba kontrolna);
- Zbiornik fermentacyjny: 7500 cm^3 brzezki + 420 cm^3 inokulum w postaci płynnej hodowli bakterii *Lactobacillus plantarum*;

- Zbiornik fermentacyjny: 7500 cm³ brzezki + 420 cm³ inokulum w postaci płynnej hodowli bakterii *Lactobacillus brevis*;
- Zbiornik fermentacyjny: 7500 cm³ brzezki + 420 cm³ inokulum w postaci płynnej hodowli drożdży *Saccharomyces boulardii*.

Fermentację w zbiornikach prowadzono w temperaturze 21°C. W przypadku zbiorników 2 i 3 prowadzono fermentację przez 5 dni wyłącznie przy użyciu bakterii LAB. Po 5 dniach do brzeczki fermentowanych przez *Lactobacillus plantarum* (zbiornik 2) oraz *Lactobacillus brevis* (zbiornik 3) dodano po 450 cm³ płynnej hodowli drożdży górnej fermentacji *Saccharomyces cerevisiae* Safale US-05. Fermentację prowadzono przez 21 dni w temperaturze 21°C. Chmielenie na zimno przeprowadzono w trakcie fermentacji cichej. W tym celu 7 dni przed butelkowaniem, dodano mieszankę chmieli do brzezki w zbiornikach ciśnieniowych w ilości 20 g.

Tabela 1. Chmiel użyte w trakcie chmielenia na zimno

Nazwa chmielu	Data ważności	Zawartość α -kwasów	Ilość na 1 zbiornik
Chmiel Lubelski (PL) Granulat T-90	31.01.2024 r.	5,4%	10 g
Chmiel Styrian Cardinal (SLO) Granulat T-90	31.01.2024 r.	12,5%	5 g
Chmiel Styrian Gold (SLO) Granulat T-90	30.01.2024 r.	4,6%	5 g
Suma			20 g

Źródło: opracowanie własne.

6. Metodyka badań oceny parametrów fizykochemicznych brzezki

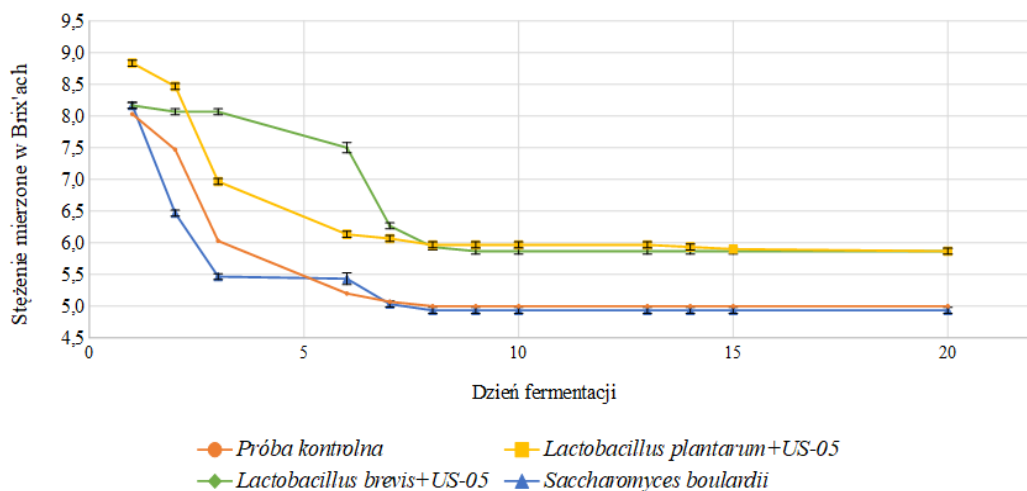
Oznaczanie zawartości ekstraktu ogólnego brzezki wykonano według metody Obiedzińskiego (2009) [40]. Analizie poddano wszystkie próby pobierane od początku do końca procesu fermentacji. Pomiar wykonano trzy razy dla każdej próbki. Pomiaru pH dokonywano przy użyciu pH-metru CP-401 [41]. Oznaczanie kwasowości czynnej brzezki metodą miareczkowania pH-metrycznego wykonano według metody Klepacakiej (2005) [42]. Oznaczania zawartości związków lotnych (etanolu oraz gliceryny) brzezki dokonano za pomocą chromatografii gazowej ze spektrometrem mas (GC/MS) [43].

7. Wyniki badań

7.1. Zmiany ekstraktu ogólnego podczas fermentacji brzezki

Oznaczenie ekstraktu ogólnego wykonano zgodnie z metodą Obiedzińskiego (2009) [40]. Zmiany ekstraktu ogólnego przedstawiono na rysunku 1. Zmierzona wartość w stopniach Brix'a, przed zaszczepieniem drobnoustrojami wynosiła 8,8°Bx. Najbardziej dynamiczne zmiany zaobserwowano w ciągu 7 dni od zaszczepienia brzezki. 3 początkowe dni fermentacji charakteryzowały się nagłym spadkiem poziomu ekstraktu w większości prób. *Lactobacillus brevis* wyróżniał się jako jedyny spośród innych prób wystąpieniem fazy opóźnienia fermentacji i gwałtowny spadek stężenia mierzonego w stopniach Brix'a nastąpił dopiero między 5 a 6 dniem fermentacji, co było wynikiem dodania w 5 dniu szczepu drożdży piwowskich. *S. boulardii* osiągnął największe tempo fermentacji, redukując stężenie mierzone w stopniach Brix'a z 8,2 na 6,5 w ciągu 24 godzin od za-

inicjowania brzeczki drobnoustrojami. Po fazie wykładniczej fermentacji zakończonej w 6 dniu, następował wolniejszy spadek stężenia mierzonego w stopniach Brix'a. W 7 dniu fermentacji wartość stężenia mierzonego w stopniach Brix'a we wszystkich próbach utrzymywała się na stałym poziomie aż do końca fermentacji, co świadczy o zakończonym etapie fermentacji burzliwej po około tygodniu od zaszczepienia. W końcowych dniach fermentacji poziom stężenia mierzonego w stopniach Brix'a utrzymywał się na stałym poziomie. Piwa fermentowane przy użyciu bakterii LAB osiągnęły wyższy poziom stężenia mierzonego w stopniach Brix'a w ostatnim dniu, co świadczy o mniejszym odfermentowaniu cukrów niż w przypadku piw fermentowanych wyłącznie z użyciem drożdży.

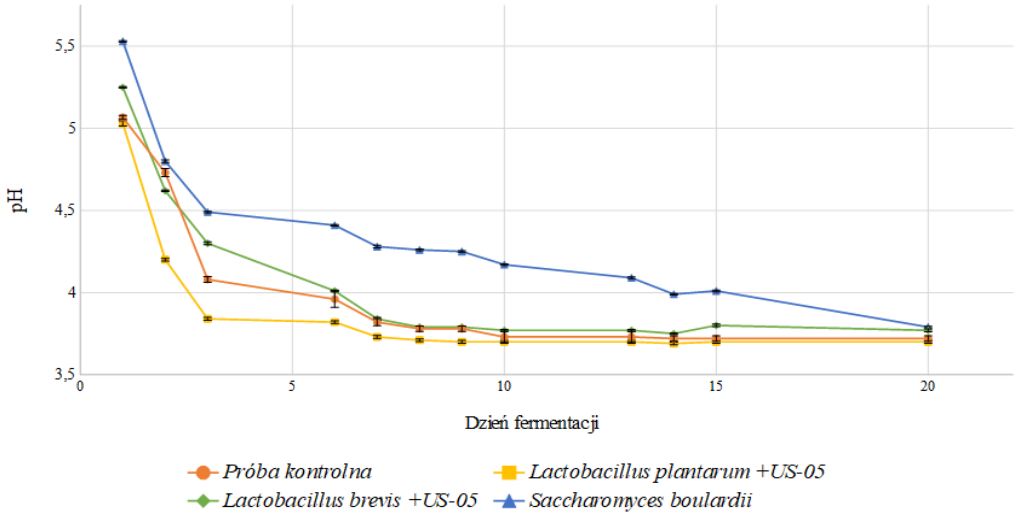


Rysunek 1. Wykres zmian stężenia mierzonego w stopniach Brix podczas fermentacji brzeczki z udziałem *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces boulardii* oraz US-05 (próba kontrolna) [opracowanie własne]

7.2. Zmiany pH podczas fermentacji brzeczki

Główny metabolit wytwarzany przez bakterie LAB, jakim jest kwas mlekowy, wpływa na obniżenie wartości pH. Zmiany pH w trakcie fermentacji przedstawiono na rysunku 2. Najbardziej dynamiczne zmiany pH zaobserwowano po 48 godzinach od zaszczepienia brzeczki drobnoustrojami w przypadku wszystkich prób. Po tym czasie tempo spadku pH uległo znacznemu spowolnieniu, jednakże przez cały okres fermentacji (20 dni) pH wciąż mało nieznacznie. Spośród wszystkich szczepów największą aktywność obniżania pH zauważono w przypadku *L. plantarum*, który zakwasił piwo do pH 3,7. Ponadto brzeczka z *L. plantarum* najszybciej osiągnęła pH poniżej 4 w czasie 48 godzin od zaszczepienia. Szczep *L. brevis* wykazał niższą aktywność niż *L. plantarum*, zakwaszając piwo poniżej pH 4 dopiero po 144 godzinach od szczepienia. Finalnie po 20 dniach fermentacji, pH w przypadku obu szczepów nie różniło się znacząco. Podczas fermentacji próby kontrolnej zakwaszanie odbywało się z podobną efektywnością jak u *L. plantarum* oraz *L. brevis*, co może sugeruje niską aktywność zakwaszającą badanych szczepów lub spontaniczne zakażenie próby kontrolnej na etapie warzenia piwa. Najmniejszą efektywność spośród wszystkich szczepów osiągnął *S. boulardii*, najwolniej zakwaszając piwo, jednak dorównał innym szczepom w końcowej fazie fermentacji osiągając pH 3,79. Podsumo-

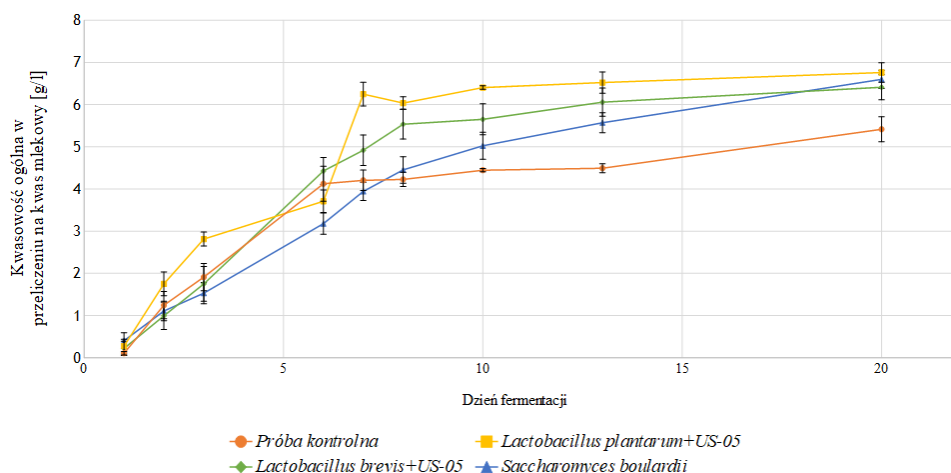
wując, w przypadku wszystkich piw największy spadek pH zaobserwowano w ciągu pierwszych 48 godzin, jednak największą zdolność do redukcji pH w najkrótszym czasie charakteryzował się szczep *L. plantarum*, a najniższą aktywnością zakwaszającą *S. boulardii*. Finalnie jednak po zakończeniu fermentacji, wszystkie szczepy zakwasiły piwo w zakresie pH 3,7-3,79.



Rysunek 2. Wykres zmian pH podczas fermentacji brzezki z udziałem *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces boulardii* oraz US-05 (próba kontrolna) [opracowanie własne]

7.3. Zmiany kwasowości ogólnej podczas fermentacji brzezki

Oznaczenie kwasowości ogólnej wykonano według metody Klepackiej (2005) [42]. Kwasowość potencjometryczną podano w przeliczeniu na kwas mlekowy, który był kwasem dominującym w próbkach. Wyniki przedstawiono na rys. 3. Największy wzrost kwasowości potencjometrycznej we wszystkich próbach obserwowano w trakcie pierwszego tygodnia fermentacji. Po 8 dniach szybkość produkcji kwasu mlekowego spadła i utrzymywała się na względnie stałym poziomie. Po 20 dniach *L. plantarum* wytworzył największą ilość kwasu mlekowego (6,77 g/l), *L. brevis* charakteryzował się niewiele mniejszą zdolnością wytwarzania kwasu mlekowego (6,39 g/l). Brzeczki zaszczepioną *S. boulardii* w ciągu pierwszych siedmiu dni charakteryzował najwolniejszy wzrost kwasu mlekowego. Do 20 dnia utrzymywała się tendencja wzrostowa. Finalnie po 20 dniach fermentacji szczepy *L. brevis*, *L. plantarum*, *S. boulardii* wytworzyły kwas mlekowy w podobnym zakresie $6,58 \pm 0,18$ g/l.

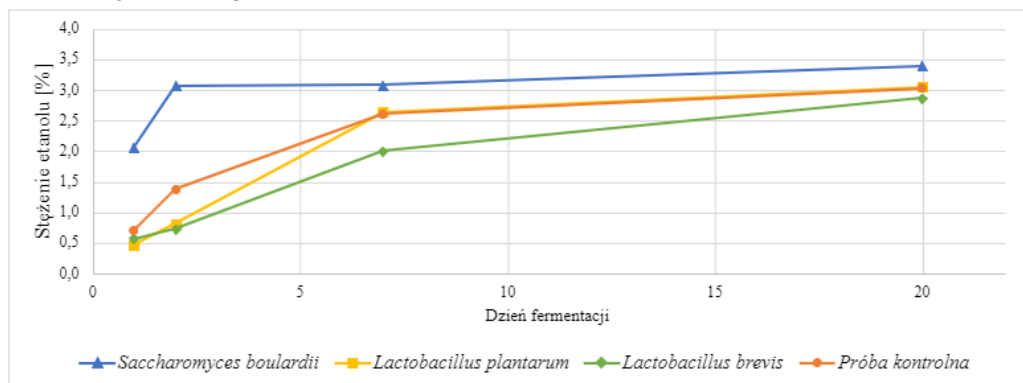


Rysunek 3. Wykres zmian kwasowości ogólnej podczas fermentacji brzezki z udziałem *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces boulardii* oraz US-05 (próba kontrolna) [opracowanie własne]

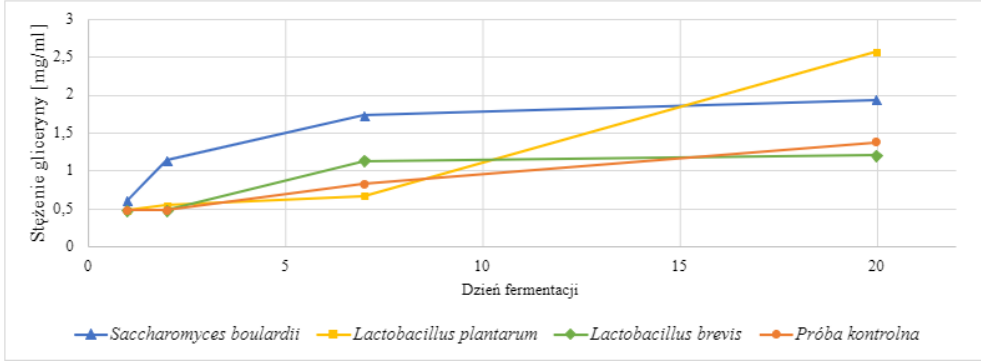
7.4. Związki lotne zidentyfikowane w piwach

W próbkach piw oznaczono ilościowo zawartość glicerolu oraz etanolu i ich zmiany stężenia w trakcie trwania fermentacji. Poddano analizie próbki pochodzące z 1, 2, 7 i 20 dnia fermentacji. Oznaczone ilościowo stężenie glicerolu oraz etanolu w funkcji czasu przedstawiają wykresy na rysunkach 4 i 5. Stężenia powyższych związków zmieniały się w trakcie trwania fermentacji, co wskazuje na dynamiczny metabolizm mikroorganizmów. Wszystkie piwa osiągnęły zawartość etanolu w zakresie 2,8-3,4%. Najwyższe stężenie etanolu po 20 dniach fermentacji osiągnęło piwo fermentowane z użyciem *Saccharomyces boulardii*, najniższe zaś piwo fermentowane z udziałem *Lactobacillus brevis*.

W przypadku zmian stężenia gliceryny u piw fermentowanych z użyciem *L. brevis* i *S. boulardii* największe zmiany zauważono w ciągu pierwszych 7 dni fermentacji, natomiast w przypadku *L. plantarum* najbardziej dynamiczne zmiany zauważono w trakcie trwania fermentacji cichej. *L. plantarum* osiągnął najwyższe stężenie gliceryny w 20 dniu fermentacji (2,56 mg/l).



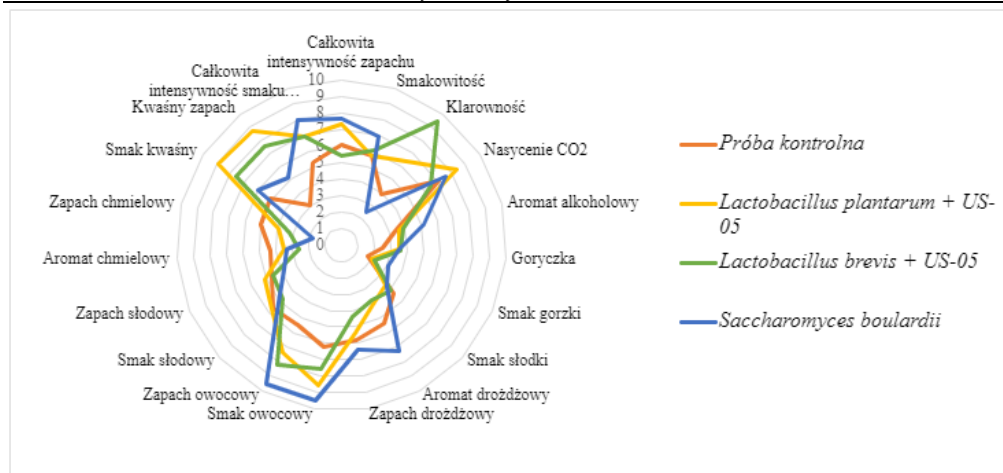
Rysunek 4. Wykres zmian stężenia etanolu w trakcie trwania fermentacji brzezki z udziałem *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces boulardii* oraz US-05 (próba kontrolna) [opracowanie własne]



Rysunek 5. Wykres zmian stężenia gliceryny w trakcie trwania fermentacji brzezki z udziałem *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces boulardii* oraz US-05 (próba kontrolna) [opracowanie własne]

7.5. Ocena organoleptyczna piwa

Wszystkie piwa zostały poddane ocenie organoleptycznej z udziałem 10 osób. Ocenę przeprowadzono w pomieszczeniu oświetlonym białym światłem, w temperaturze pokojowej. Znormalizowane próbki piwa podawane w przezroczystym szkle oznaczone były kodem liczbowym. Próbki podawane były w ilości około 50 ml w temperaturze $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Wszystkie próbki piwa oceniane były w czasie jednej sesji w tym samym czasie. Uczestnicy oceniali wybrane atrybuty zapachowe, aromatyczne oraz smakowe według intensywności w nieustrukturyzowanej skali ciągłej. Punkty końcowe tej skali odpowiadały 1 (najniższe natężenie) i 10 (największa intensywność). Oceniane zostały cechy zapachowe takie jak: zapach kwaśny, chmielowy, słodowy, owocowy, drożdżowy oraz smak kwaśny, słodki, gorzki, słodowy, owocowy, aromat chmielowy, drożdżowy, alkoholowy, intensywność goryczki, nasycenie dwutlenkiem węgla, klarowność oraz ogólna smakowitość [5]. Wyniki przedstawiono na rysunku 6. Przeprowadzona analiza organoleptyczna wykazała, iż konsumenci nie wyczuwają większych różnic pomiędzy badanymi próbkami piw. Poszczególne wyróżniki jakościowe uzyskiwały podobne noty spośród wszystkich prób. Piwa otrzymane z wykorzystaniem bakterii (*Lactobacillus plantarum* oraz *Lactobacillus brevis*) uzyskały noty najwyższe w kierunku kwaśnego smaku oraz zapachu. Z kolei piwo otrzymane z użyciem *Saccharomyces boulardii* charakteryzowało się najwyższymi ocenami w wyróżniku zapach i smak owocowy. Wszystkie piwa uzyskiwały zdecydowanie najniższe noty odnośnie zapachu, aromatu chmielowego oraz goryczki, co wynika ze specyfiki produkcji piwa kwaśnego oraz metody chmielenia. Piwa uzyskane z użyciem samych drożdży (próba kontrolna i *Saccharomyces boulardii*) charakteryzowały się najniższą oceną klarowności. Spośród wszystkich piw najwyższą ocenę uzyskało piwo fermentowane z użyciem *Lactobacillus plantarum*, najniższą zaś próba kontrolna, która otrzymała najniższe oceny w kierunku smaku, zapachu i aromatu.



Rysunek 6. Wyniki oceny organoleptycznej piw fermentowanych z udziałem *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces boulardii* oraz US-05 (próba kontrolna) przedstawione na wykresie radarowym [opracowanie własne]

8. Dyskusja

Piwa kwaśne uważane są za jedne z najstarszych stylów piw komercyjnych. Otrzymywane są poprzez dodanie do brzezki bakterii kwaszących lub drożdży wytwarzających kwas mlekowy. Różnorodność szczepów oraz metod zakwaszania determinuje złożoność profilu smakowego oraz jakość produktu końcowego [2]. W wielu pracach badano użycie różnych szczepów bakterii tj. *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. delbruecki* oraz drożdży w celu otrzymania optymalnego produktu spełniającego wymogi sensoryczne, jak i technologiczne określane dla piw kwaśnych [10, 44, 45]. Ponadto opracowywano technologie produkcji piw kwaśnych, tak aby zakwaszanie przebiegało w warunkach optymalnych do otrzymania jednorodnego jakościowo piwa [4, 44]. Dowiedzono również, iż synergistyczne działanie składników polifenolowych z piwa oraz właściwości probiotycznych i prebiotycznych wynikających z użycia bakterii kwasu mlekowego do fermentacji brzezki może być czynnikiem do otrzymania funkcjonalnego produktu prozdrowotnego [46, 47]. W prezentowanej pracy omówiono wpływ fermentacji mlekowej brzezki na przebieg procesu fermentacji alkoholowej i wybrane wyróżniki jakości piwa.

Wyniki tej pracy pokazują, że skład mikrobiologiczny piwa wpływa na właściwości chemiczne, sensoryczne oraz zmiany fizykochemiczne podczas fermentacji i dojrzewania piwa. W przypadku zmian ekstraktu ogólnego oraz cukrów redukujących zauważono, iż bakterie charakteryzuje opóźnienie fazy fermentacji alkoholowej. Gwałtowny spadek cukrów zauważa się dopiero po fazie dodania drożdży do brzezki. Podobne wyniki uzyskał Tenhoviirta (2019) [4], gdzie wydajność fermentacji bez udziału drożdży była niewielka. Jednocześnie jednak dodatek drożdży i bakterii niesie za sobą ryzyko niespójnego rozwoju mikroorganizmów i mniejszą wydajność przy wytwarzaniu metabolitów wtórnych przez bakterie.

Pomiar pH jest istotną metodą śledzenia fermentacji bakterii LAB, a jego poziom zależny jest od kwasowości wynikającej z tworzenia się kwasów organicznych. Stąd oczywista jest zależność pH od ilości kwasów organicznych i ogólnej kwasowości. Aktywność pH w przypadku każdej z prób wyglądała następująco: szybki spadek pH w ciągu

pierwszych dni, następnie powolny nieznaczny spadek aż do końca fermentacji. Nie zauważono natomiast wzrostu pH w końcowych dniach fermentacji, jaki w swoich badaniach zauważyli Toh i in. (2018) [48] oraz Tenhovirta (2019) [4]. Końcowy trend spadkowy w pH może sugerować proces autolizy drożdży, co wg Kunze (1999) [49] może mieć negatywny wpływ na wyniki oceny sensorycznej. Zauważono, że najszybszy spadek pH następował przed dodaniem szczepów drożdży do piwa. Początkowo szybkie obniżanie pH piwa przez bakterie bez użycia drożdży dowodzi, iż proces zakwaszania przebiega wydajniej przy dwustopniowym prowadzeniu procesu fermentacji. Podobne wyniki uzyskała Alcine Chan (2019) [10]. Ponadto jego badanie pokazywało również, iż przetrwanie bakterii w wysokochmielonej brzeczce ma większe szanse powodzenia w przypadku kofermentacji z drożdżami. Stąd można wysunąć wnioski, iż najefektywniejsza i najbezpieczniejsza dla przeżycia probiotyków byłaby współfermentacja drożdży i bakterii, warunkiem jednak musiałby być dodatek drożdży po okresie odpowiedniego zakwaszania brzeczki przez bakterie. Peyer (2017) [31] z kolei w swoich badaniach sugeruje, iż ekspozycja drożdży na bezpośrednie działanie środowiska kwaśnego przyczynia się do opóźnienia ich wzrostu i zmniejszenia wydajności fermentacji. W badaniu podkreślono również istotny fakt, iż komórki drożdży w środowisku stresowym produkować mogą nieakceptowalne organoleptycznie związki tj. aldehyd octowy czy diacetyl. Ponadto Ciosek (2019) [44] wykazała, że wzrost drożdży i wykorzystanie przez nie cukrów w trakcie fermentacji jest mniej wydajne w środowisku kwaśnym. Zmierzone stężenie kwasu mlekowego w poszczególnych próbkach było takie jak oczekiwano po wcześniejszej analizie literatury. Według Tonsmeire (2014) [33] piwem kwaśnym można nazywać produkt zawierający od 3 do 6 g/l kwasu mlekowego i którego pH waha się w okolicach 3,7. Najwydajniejszą produkcją kwasu mlekowego i obniżania pH charakteryzował się szczep *L. plantarum*, który jako jedyny po 6 dniach wytworzył ilość kwasu mlekowego przekraczającą 6,7 g/l i finalnie wytworzył go najwięcej spośród wszystkich szczepów probiotycznych. Nieco wolniejszą produkcją kwasu mlekowego charakteryzował się *L. brevis* (6,4 g/l), co jest porównywalne z wartościami osiągniętymi przez te szczepy w badaniach Tenhovirta (2019) [4]. Z drugiej jednak strony, w innym badaniu *L. plantarum* wytworzył kwas mlekowy w okolicach 4 g/l, a *L. brevis* 1,1 g/l [15]. Warto jednak zwrócić uwagę na możliwość otrzymania błędnych wyników poprzez metodę zastosowaną do zmierzenia ilości kwasu mlekowego. Obliczanie kwasowości ogólnej na kwas mlekowy niesie za sobą ryzyko nakładania się innych kwasów organicznych, co może kolidować z otrzymaniem prawidłowego wyniku. Do otrzymania wiarygodnych wyników należałoby wykorzystać metody umożliwiające wykrywanie czystego kwasu mlekowego np. metodę chromatografii cieczowej. Najmniej efektywnym spadkiem pH i tworzeniem kwasu mlekowego charakteryzował się szczep *S. boulardii*, który jednak osiągnął wartości pH bardziej zadowalające, niż sugerowała literatura. Jak podaje Mulero-Cerezo (2019) [45] oraz Pereira de Paula (2021) [50] piwo otrzymane z użyciem *S. boulardii* osiągało minimalne pH w zakresie 4,52-4,7. Po 7 dniach fermentacji najniższe pH osiągnęła brzeczka fermentowana przy udziale *L. plantarum* (3,73), jednak badanie Dysvik (2020) [14] sugeruje, że szczep ten może zakwaszać brzeczki poniżej pH 3,2. W przytoczonej publikacji *Lactobacillus brevis* również zakwaszył brzeczki do niższego pH. Przyczyną takiego stanu rzeczy mogą być inne warunki procesu tj. wyższa temperatura fermentacji oraz fermentacja w mniejszej laboratoryjnej skali u Dysvik, co może wpływać na meta-

bolizm drobnoustrojów. Jak dowodzi Østle (2005) [51], wyższa temperatura wpływa na wzrost szybkości metabolizmu drobnoustrojów i efektywniejszą redukcję pH.

W eksperymencie przeprowadzonym i opisanym w niniejszej pracy dowiedziono, że wykorzystanie cukrów i zmiany ekstrakt ogólnego w trakcie fermentacji zmieniały się w zależności od rodzaju użytego szczepu i rodzaju mikroorganizmów. Ekstrakt ogólny skorelowany jest ze stężeniem etanolu. W przypadku piw fermentowanych wyłącznie przy użyciu drożdży *Saccharomyces boulardii* nagły spadek ekstraktu następował już po 24 godzinach od zaszczepienia brzezki, co przekłada się na wzrostu stężenia etanolu. W przypadku piw fermentowanych początkowo tylko przy użyciu samych bakterii zauważono niewielki spadek ekstraktu ogólnego, a tym samym niewielki początkowy wzrost stężenia alkoholu. Najbardziej dynamiczne zmiany ekstraktu zaobserwowano dopiero po zaszczepieniu kwaśnej brzezki drożdżami. Zmiany te jednak nie były tak gwałtowne w kwestii zmian stężenia etanolu, co może świadczyć o ograniczeniu wydajności drożdży przez metabolity bakteryjne. Najwyższą końcową zawartość etanolu osiągnęło piwo otrzymane z *S. boulardii* – 3,4%, co jest wartością porównywalną z wynikami opisanymi przez Capece (2018) [52], gdzie piwo fermentowane z użyciem *S. boulardii* wytworzyło 3,83% etanolu oraz z wynikami uzyskanymi przez Pereira de Paula (2020) [50], gdzie zawartość etanolu wynosiła 3,42%. Jak podaje Dysvik (2020) [14], szczepy LAB redukowały glukozę po 21 dniach fermentacji do wartości bliskich zeru, w przeciwieństwie do badań zamieszczonych w roz. 5.4, gdzie glukoza w brzezczkach fermentowanych z udziałem *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus brevis* zredukowana została do poziomu 1,1-1,2 g/l. Świadczyć to może o odmiennym metabolizmie drożdży piwarskich w brzezczkach zakwaszanych wcześniej przez LAB i w brzezczkach uzyskanych przez kofermentację, czyli jednoczesnym dodaniu bakterii i drożdży. Świadczy to o wpływie bakterii kwasu mlekowego, jak i ich metabolitom, na metabolizm drożdży piwarskich i ich rozwoju w warunkach stresowych, takich jak niskie pH, czy obecność kwasów organicznych w dużym stężeniu. W przypadku piw fermentowanych z użyciem bakterii zawartość alkoholu wynosiła 2,86% (*L. brevis*) i 3,04% (*L. plantarum*), przy czym są to wartości niższe niż opisywane do tej pory w literaturze. We wcześniejszych badaniach oba szczepy osiągały zawartość alkoholu pomiędzy 3,2-5% [4, 14]

Zauważono również różnice w produkcji glicerolu przez poszczególne szczepy. W początkowych fazach fermentacji najwydajniejszy wzrost stężenia glicerolu cechował szczep *S. boulardii*, następnie nie zaobserwowano znaczącego dalszego wzrostu glicerolu podczas reszty fermentacji. Najwyższe końcowe stężenie glicerolu wytworzył szczep *L. plantarum* (2,56mg/ml), co jest wartością wyższą niż średnie wyniki uzyskane przez Dimizio [53], gdzie szczep *L. thermotolerans* wytworzył maksymalną ilość glicerolu w piwie na poziomie 1,4 mg/ml. Glicerol wpływa na odczuwanie intensywności smaku, a także na odczucie pełniejszego aromatu. Zauważalna ilość glicerolu w piwie wyprodukowanym z użyciem *L. plantarum* mogła wpłynąć na uzyskanie przez nie najwyższego wyniku w kwestii oceny organoleptycznej. Wysoka ilość glicerolu w piwie jest pożądana ze względów organoleptycznych, natomiast jego zakres minimalny dla korzystnego odczuwania atrybutów organoleptycznych w piwie pozostaje niejasny. Pewnym natomiast jest, że glicerol w piwie w pewnym stężeniu wpływa na odczucia sensoryczne [54]. W celu ustalenia progu wpływania glicerolu na właściwości sensoryczne należałoby przeprowadzić badania dla określenia optymalnego zakresu stężeń gliceryny w określonych napojach, zwłaszcza w piwie.

Było to jedno z nielicznych badań porównujących możliwość wykorzystania pałeczek kwasu mlekowego i drożdży fermentacji mlekowej jako kultur starterowych w warzeniu piwa innym niż dotychczas przedstawiano sposobem zakwaszania. Większość prac skupiała się bowiem na metodzie zakwaszania w kotle, co równało się z zatrzymaniem pracy bakterii przed dodaniem drożdży lub ich jednoczesnej fermentacji. Uzyskanie niskochmielnego piwa wysokojakościowego niefiltrowanego i niepasteryzowanego jest możliwe jedynie poprzez zastosowanie odpowiednich strategii warzenia. Praca ta pokazuje, że można uzyskać zadowalające jakościowo i organoleptycznie piwo poprzez odpowiednie prowadzenie procesu i kofermentację mikroorganizmów w odpowiedniej kolejności i przy odpowiednich parametrach. Badanie to również dowodzi, iż poszczególne szczepy użyte do otrzymania piwa wykazują różnice fizykochemiczne w trakcie fermentacji i dojrzewania piwa.

9. Wnioski

- Piwa kwaśne wyprodukowane z użyciem różnych gatunków bakterii kwasu mlekowego i drożdży probiotycznych różnią się między sobą właściwościami sensorycznymi, stężeniem etanolu, glicerolu, kwasu mlekowego i innych cech fizykochemicznych. Zaobserwowane różnice pozwalają na modyfikacje technologii wytwarzania piw w celu kreowania nowych piw o ciekawych właściwościach sensorycznych.
- Fermentacja mlekowa z użyciem różnych szczepów bakterii kwasu mlekowego i drożdży probiotycznych wpływa na przebieg fermentacji alkoholowej brzożki.
- Odpowiednie prowadzenie procesu i kofermentację mikroorganizmów w odpowiedniej kolejności i przy odpowiednich parametrach pozwala uzyskać zadowalające jakościowo i organoleptycznie piwo.
- Optymalizacja warunków otrzymywania piwa, w tym dobór odpowiednich szczepów mikroorganizmów pozwala na wyższą kontrolę nad przebiegiem i powtarzalnością procesów, co pozwala uzyskać produkt powtarzalny o wyższej jakości.
- Piwo funkcjonalne otrzymane w wyniku fermentacji z użyciem mikroorganizmów probiotycznych jest akceptowalne organoleptycznie przez konsumentów.
- Użycie drożdży heterofermentatywnych może być alternatywą dla tradycyjnego zakwaszania piwa przez bakterie LAB pod kątem akceptowalności smakowej i cech fizykochemicznych.

Literatura

1. Rodríguez-Saavedra M., González De Llano D., Moreno-Arribas M.V., *Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: Microbiological quality and food safety*, Food Research International, 138(Part A), 2020, s. 65-75.
2. Peyer L.C., Axel C., Lynch K., Zannini E., Jacob F., Arendt I.E.K., *Inhibition of Fusarium culmorum by carboxylic acids released from lactic acid bacteria in a barley malt substrate*, Food Control, 69, 2016, s. 227-236.
3. Peyer L.C., Zannini E., Jacob F.I Arendt E.K., *Growth study, metabolite development, and organoleptic profile of a malt-based substrate fermented by lactic acid bacteria*, Journal of the American Society of Brewing Chemists, 73(4), 2015, s. 303-313.
4. Tenhoviirta S., *The effects of lactic acid bacteria species on properties of sour Beer*, Helsingin yliopisto, University of Helsinki Department of Food and Nutrition. EKT series 1890, 2019, s. 120-135.
5. Narayanan N., Roychoudhury P.K., Srivastava A., *L(+) lactic acid fermentation and its produkt polymerization*, Biotechnology Industry, 7(2), 2004, s. 8-15.

6. Crowley S., Mahony J., Morrissey J.P., van Sinderen D., *Transcriptomic and morphological profiling of Aspergillus fumigatus Af293 in response to antifungal activity produced by Lactobacillus plantarum*, *Microbiology*, 159(Pt 10), 2013, s. 2014-2024.
7. Kandler O., *Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria*, Antonie Van Leeuwenhoek, 49(3), 1983, s. 209-224.
8. Wegkamp A., Teusink B., De Vos W.M., Smid E.J., *Development of a minimal growth medium for Lactobacillus plantarum*, *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 2010, s. 57-64.
9. Giraffa G., Chanishvili N., Widyastuti Y., *Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology*, *Research in Microbiology*, 161, 2010, s. 480-487.
10. Alcine Chan M.Z., Chua J.Y., Toh M., Liu S.Q., *Survival of probiotic strain Lactobacillus paracasei L26 during co-fermentation with S. cerevisiae for the development of a novel beer beverage*, *Food Microbiology*, 82, 2019, s. 541-550.
11. Bergsveinson J., *Role of Plasmids in Lactobacillus brevis BSO 464 Hop Tolerance and Beer Spoilage*, *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 2014, s. 1234-1241.
12. Shizuka A., Iijima K., Koji S., Motoyama Y., Tomoo O., Kitagawa Y., *Rapid detection and identification of beer-spoilage lactic acid bacteria by microcolony method*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(2), 2009, s. 124-129.
13. Janagama K. J., Tam M., Sukkhyun H., Lourdes Nadala M., Nadala C., Samadpour M., *Dipstick assay for rapid detection of beer spoilage organisms*, *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 101(6), 2018, s. 1913-1919.
14. Dysvik A., La Rosa S.L., De Rouck G., Rukke E.O., Westereng B., Wicklund T., *Microbial Dynamics in Traditional and Modern Sour Beer Production*, *Applied and Environmental Microbiology*, 86, 2020, s. 80-88
15. Zhao Y., Wu X., Siegmundfeldt H., *Comparative gene analysis of beer tolerant and sensitive Lactobacillus brevis*, *Food Science and Technology*, 43, 2023, s. 1-9
16. Geissler A.J., Behr J., Von Kamp K., Vogel R.F., *Metabolic strategies of beer spoilage lactic acid bacteria in Beer*, *International Journal of Food Microbiology*, 216, 2016, s. 60-68.
17. Krogerus K., Gibson B.R., *125th anniversary review: diacetyl and its control during brewery fermentation*, *Journal of the Institute of Brewing*, 119, 2013, s. 86-97.
18. Van Oevelen D., Verachtert H., *Slime Production by Brewery Strains of Pediococcus Cerevisiae*, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 37:1, 1979, s. 34-37.
19. Bossaert S., Crauwels S., De Rouck G., Lievens B., *The power of sour – A review: Old traditions, new opportunities*, *In BrewingScience*, 72, 2019, s. 3-4.
20. Papadimitriou K., Alegria A., Bron P.A., De Angelis M., Gobbetti M., Kleerebezem M., Lemos J.A., Linares D.M., Ross P., Stanton C., Turrone F., Van Sinderen D., Varmanan P., Ventura M., Zuniga M., Tsakalidou E., Kok J., *Stress Physiology Of Lactic Acid Bacteria*, *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 80, 2016, s. 837-890.
21. Alegria E., López I., Ignacio Ruiz J., Sáenz J., Fernández E., Zarazaga M., Dizy M., Torres C., Ruiz-Larrea F., *High tolerance of wild Lactobacillus plantarum and Oenococcus oeni strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol*, *FEMS Microbiology Letters*, 230, 2004, s. 53-61.
22. Yang X., Kunling T., Li L., Rina S., Zhang J., Ai G., Zhong J., *Transcriptional regulator ACRR increases ethanol tolerance through regulation of fatty acid synthesis in Lactobacillus plantarum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 85, 2019, s. 16-19.
23. Riesute R., Salomskiene J., Moreno D.S., Gustiene S., *Effect of yeasts on food quality and safety and possibilities of their inhibition*, *Trends in Food Science & Technology*, 108, 2021, s. 1-10.
24. Verachtert H., Derdelinckx G., *Belgian acidic beers: daily reminiscences of the past*, *Cerevisia* 38, 2014, s. 121-128.
25. Osburn K., Amaral J., Metcalf S.R., Nickens D.M., Rogers C.M., Sausen C., Caputo R., Miller J., Li H., Tennessen J.M., Bochman M.L., *Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production*, *Food Microbiology*, 70, 2018, s. 76-84.

26. Verachtert H., Debourg A., *Properties of Belgian acid beers and their microflora. Part I. The production of gueuze and related refreshing acid beers*, *Cerevisia*, 20, 1995, s. 37-41.
27. Spitaels F., Wieme A.D., Janssens M., Aerts A., Van Landschoot L., *The microbial diversity of an industrially produced lambic beer shares members of a traditionally produced one and reveals a core microbiota for lambic beer fermentation*, *Food Microbiology*, 49, 2015, s. 23-32.
28. Spitaels F., Wieme A.D., Janssens M., Aerts M., Daniel H.M., Van Landschoot A., De Vuyst L., Vandamme P., *The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic Beer*, *PLoS One*, 9, 2014, s. 78-90.
29. De Keersmaecker J., *The Mystery of Lambic Beer*, *Scientific American*, 275, 1996, s. 74-80.
30. De Roos J., De Vuyst L., *Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages*, *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 2018, s. 115-119.
31. Peyer L., *Lactic acid bacteria fermentation of wort as a tool to add functionality in malting, brewing and novel beverages, doctoral dissertation. PhD Thesis*, University College Cork, Food and Nutritional Sciences - Doctoral Theses, 116, 2017.
32. Grajek W., Szymanowska D., *The influence of environmental stresses on Saccharomyces cerevisiae yeast in ethanol fermentation*, *Biotechnologia*, 3(82), 2008, s. 46-63.
33. Tonsmeire M., *American sour beers: Innovative techniques for mixed fermentations*, Colorado: Brewers Publications, 10, 2014.
34. Narziss L., *The German Beer Law*, *Journal of the institute of brewing*, 90, 1984, s. 351-358.
35. Rogers C.M., Veatch D., Covey A., Staton C., Bochman M.L., *Terminal Acidic shock inhibits sour beer bottle conditioning by Saccharomyces cerevisiae*, *Food Microbiology*, 57, 2016, s. 151-158.
36. Dysvik A., Liland K. H., Myhrer K. S., Westereng B., Rukke E.-O., de Rouck G., Wicklund T., *Pre-fermentation with lactic acid bacteria in sour beer production*, *Journal of the Institute of Brewing*, 125, 2019, s. 342-356.
37. Pater A., *Metody regulacji pH zacieru słodowego i ich wpływ na jakość oraz przebieg wytwarzania brzezki piwnej*, *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 1, 2019, s. 47-51.
38. O'Connor B., *Winning with wheat beer. Brewing non-alcoholic wheat beer with sour wort produces better quality – and maximises yield through targeted adjustment of pH value*, *Brewer And Distiller International- Brewing Technology*, 03, 2020, s. 44-47.
39. O'Connor B., Blieninge S., *Sour wort - Biological acidification made easy*, *Brewing Technology*, 06, 2019, s. 44-48.
40. Obiedziński M., *Wybrane zagadnienia z analizy żywności*, Wydawnictwo SGGW, 2009.
41. Piecyk M., *Kwasy organiczne, kwasowość produktów spożywczych. Wybrane zagadnienia z analizy żywności*, Wydawnictwo SGGW, 2009.
42. Klepacka M., Drużyńska B., *Analiza żywności: skrypt. Cz. 1*, Fundacja „Rozwój SGGW”, 2005.
43. Stój A., Czernecki T., Domagała D., Targoński Z., *Application of volatile compound analysis for distinguishing between red wines from Poland and from other European countries*, *South African Journal of Enology and Viticulture*, 38(2), 2017, s. 245-263.
44. Ciosek A., Naggy V., Szczepanik O., Fulara K., Poreda A., *Wpływ nachmielenia brzezki na bakterie kwasu mlekowego*, *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 12, 2019, s. 46-50.
45. Mulero-Cerezo J., Briz-Redón A., Serrano-Aroca A., *Saccharomyces cerevisiae var. Boulardii: valuable probiotic starter for craft beer production*, *Applied Sciences*, 9, 2019, s. 32-40.
46. Lu J., Zhao H., Chen J., Fan W., Dong J., Kong W., Cai G., *Evolution of phenolic compounds and antioxidant activity during malting*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 2007, s. 110-119.

47. Rodrigues K.L., Henrique Araújo T., Schneedorf J.M., de Souza Ferreira C., de Oliveira Isac Moraes G., Sinigaglia Coimbra R., Rodrigues M.R., *A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents*, Journal of Functional Foods, 21, 2016, s. 58-69.
48. Toh D.W.K., Chua J.Y., Liu S.Q., *Impact of simultaneous fermentation with Saccharomyces cerevisiae and Torulasporadelbrueckii on volatile and non-volatile constituents in Beer*, LWT - Food Science and Technology, 91, 2018, s. 26-33.
49. Kunze W., *Technologia piwa i słodu*, przeł. A. Brudzyński, Wyd. PIWOCHMIEL Sp. z o.o., 1, seria 1, Warszawa 1999.
50. Pereira de Paula B., de Souza Lago H., Firmino L., Júnior W.J.L., Dutra Corrêa M.F., Guerra A.F., Signori Pereira K., Zarur Coelho M.A., *Technological features of Saccharomyces cerevisiae var. bouldardii for potential probiotic wheat beer development*, LWT - Food Science and Technology, 135, 2021, s. 152-160.
51. Østlie H.M., Treimo J., Narvhus J.A., *Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk*, International Dairy Journal, 15, 2005, s. 989-997.
52. Capece A., Romaniello R., Pietrafesa A., Siesto G., Pietrafesa R., Zambuto M., Romano P., *Use of Saccharomyces cerevisiae var. bouldardii in co-fermentations with S. cerevisiae for the production of craft beers with potential healthy value-added*, International Journal of Food and Microbiology, 284, 2018, s. 22-30.
53. Domizio P., House J.F., Joseph C.M.L., Bisson L.F., Bamforth C.W., *Lachancea thermotolerans as an alternative yeast for the production of Beer*, Journal of Brewing Institute, 122, 2016, s. 599-604.
54. Xiangdong Z., Procopio S., Becker T., *Flavor impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: a review*, Journal of Food Science and Technology, 52, 2015, s. 102-109.

Wpływ fermentacji mlekowej na przebieg procesu technologicznego i wybrane wyróżniki jakościowe piwa

Streszczenie

Dokonano przeglądu literatury publikacji z zakresu browarnictwa, w szczególności produkcji piw zakwaszanych biologicznie. Zaprojektowano oraz wytworzono warianty piw kwaśnych z wykorzystaniem mikroorganizmów *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* oraz *Saccharomyces bouldardii*. Piwa otrzymane z wykorzystaniem powyższych szczepów zostały ocenione fizykochemicznie. Dokonano oceny pH, ekstraktu ogólnego, kwasów organicznych, etanolu oraz gliceryny. Dowiedziono, że piwa kwaśne otrzymane z użyciem powyższych mikroorganizmów różnią się między sobą wyróżnikami fizykochemicznymi. Ponadto zaoobserwowano, że optymalizacja warunków otrzymywania piwa, w tym dobór odpowiednich szczepów mikroorganizmów pozwala na wyższą kontrolę nad przebiegiem i powtarzalnością procesów, co pozwala uzyskać produkt powtarzalny o wyższej jakości.

Słowa kluczowe: piwa kwaśne, piwa probiotyczne, bakterie kwasu mlekowego, zakwaszanie w kotle, *Saccharomyces bouldardii*

Influence of lactic acid fermentation on the course of technological process and beer quality

Abstract

Review of publications in the field of brewing, in particular the production of biologically acidified beers has been presented. Variants of sour beers were designed and produced using the microorganisms *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Saccharomyces bouldardii*. Beers obtained with the use of the above strains were evaluated physicochemically. The pH, total extract, organic acids, ethanol and glycerin were assessed. It has been proven that sour beers obtained with the use of the above-mentioned microorganisms differ in physicochemical characteristics. In addition, it was observed that the optimization of beer production conditions, including the selection of appropriate strains of microorganisms, allows for greater control over the course and repeatability of processes, which allows to obtain a repeatable product of higher quality.

Keywords: sour beer, probiotic beer, lactic acid bacteria, kettle souring, *Saccharomyces bouldardii*

Antagonizm hodowlanych bakterii izolowanych z wód torfowych („Żurawie Bagno”, lubuskie)

1. Wprowadzenie

Zjawisko narastania oporności bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki jest poważnym światowym problemem, który dotyka całe społeczeństwa w krajach zarówno rozwijających się, jak i wysokorozwiniętych. Za przyczynę tego zjawiska uznaje się powszechny dostęp do antybiotyków i zbyt częste ich stosowanie w różnych dziedzinach życia, m.in. w medycynie, weterynarii i rolnictwie, a w szczególności w hodowli zwierząt w opasie i prewencji chorób [1]. Według Klein'a i współ. [2], na podstawie danych z bazy IMS Health's MIDAS, globalne zużycie antybiotyków w latach 2000-2015 wzrosło o 65%, przede wszystkim w krajach o niskich i średnio-niskich dochodach, takich jak Turcja, Tunezja, Algieria czy Rumunia. Pokazuje to, że problemem nie jest już ograniczony dostęp do nowoczesnej antybiotykoterapii, ale zła polityka antybiotykowa i niski poziom świadomości społeczeństw skutkujący nadużyciem czynników przeciwdrobnoustrojowych. Z danych światowych w samym sektorze rolniczym notuje się ok. 100 000-200 000 ton rocznego zużycia antybiotyków i ich pochodnych. Związki te trafiają w końcu do środowiska przyrodniczego, zanieczyszczając wody powierzchniowe i gruntowe, co z kolei ma niebagatelne znaczenie dla rozprzestrzeniania się oporności mikrobiologicznej [1]. Dlatego też, bez wdrożenia odpowiedniego racjonalnego programu zarządzania środkami farmaceutycznymi i nadzoru zużycia antybiotyków w poszczególnych krajach na świecie, trend ten będzie się nasilać. Już teraz prognozuje się, że do 2030 roku nastąpi dalszy wzrost o 15% zużycia antybiotyków. Niepokojącym zjawiskiem jest również wzrost światowej konsumpcji antybiotyków nowej generacji, w tym leków tzw. ostatniej szansy, takich jak glicylocykliny, oksazolidyny i karbapenemy. Taki stan rzeczy inicjuje znamienny przyrost częstości występowania klinicznych szczepów opornych na niemalże wszystkie znane terapie stosowane w leczeniu ludzi. W konsekwencji częściej obserwuje się niepowodzenia w antybiotykoterapiach i wzrost wskaźnika umieralności pacjentów hospitalizowanych w placówkach szpitalnych z powodu zakażeń wewnątrzszpitalnych szczepami alertowymi [2].

Odpowiedzią na szybkie tempo narastania zjawiska antybiooporności mogą być strategie związane z poszukiwaniem nowych, skuteczniejszych czynników przeciwbakteryjnych. Taki kierunek badań realizowany jest w drodze chemicznej modyfikacji istniejących znanych związków antibakteryjnych o szerokim spektrum działania [3-6] lub eksploracji naturalnych środowisk w pozyskiwaniu potencjalnych szczepów produkujących bioaktywne metabolity [7, 8], czy też odkrywanie naturalnych produktów pochodzenia mikrobiologicznego z użyciem zaawansowanych technik detekcyjnych, m.in.

¹ katarzyna.guz-regner@edu.wroc.pl, Zakład Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, www.biologia.uwr.edu.pl.

² maciej.wernecki@uwr.edu.pl, Zakład Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, www.biologia.uwr.edu.pl.

chromatograficznych, genomicznych, metabolomicznych i bioinformatycznych [9-13]. Strategia poszukiwań nowych producentów bioaktywnych związków podejmowana jest na całym świecie w różnych ośrodkach badawczych, czego wyrazem jest stale powiększająca się lista nowych wariantów związków przeciwdrobnoustrojowych, czy też szczepów z unikatowymi profilami aktywności metabolicznej i biologicznej względem patogenów, w tym wcześniej uznawanych za niehodowalne [9, 11, 14, 15]. Powszechnie przyjmuje się, że obok roślin głównymi producentami bioaktywnych związków są drobnoustroje, zwłaszcza bakterie i grzyby strzępkowe. Obecnie poznano i opisano ok. 60 000-80 000 naturalnych produktów pochodzenia mikrobiologicznego (ang. *Natural Products*, NPs), z czego blisko połowa z nich (ok. 34 000) wykazuje jakąkolwiek aktywność biologiczną. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że ponad 40 000 znanych związków jest produkowana przez bakterie, a wśród nich aż ponad 23 000 przez aktinobakterie [11, 12]. Substancje te obejmują różnorodne klasy naturalnych związków organicznych, które powstają głównie w szlakach metabolizmu wtórnego. Nieliczne z nich stanowią nisko-cząsteczkowe pierwotne metabolity, takie, jak indol, acetoina, etanol, izopropanol, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, aminy, amidy, ketony, alkany, alkeny, nukleozydy i inne, będące produktami przemian aminokwasów, białek, cukrów i związków tłuszczowych w pierwotnym metabolizmie komórkowym [16]. Najlicniejszą grupę związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej stanowią jednak wtórne metabolity, a wśród nich m.in. bakteriocyny, biocydy, antybiotyki, lantybiotyki, barwniki, biosurfaktanty, immunomodulatory, laktonowe czynniki QS (ang. *Quorum Sensing*) i ich inhibitory, toksyny, organosiarkowe związki lotne, terpenoidy, związki aromatyczne i wiele innych [7, 8]. W większości przypadków metabolity te wytwarzane są przez bakterie, głównie z rodziny *Actinomycetaceae* [10-12, 14, 17]. Bakterie produkujące bioaktywne metabolity występują powszechnie w środowisku, stąd mogą być izolowane zarówno z gleb, wód słodkich i słonych, jak również z organizmów żywych. Ważnym źródłem takich bakterii mogą być także miejsca związane z działalnością człowieka (tereny zurbanizowane i rolnicze) oraz środowiska z ekstremalnymi warunkami do życia, takie jak osady sedymentacyjne mórz i oceanów, obszary halitowe, kominy hydrotermalne, gejzery, rejony polarne i pustynne, wysokogórskie, czy torfowiska [13, 15, 17-26].

W dalszym ciągu podejmowane są metody eksploracji środowisk w kierunku izolacji i detekcji szczepów bakteryjnych i ich naturalnych produktów z potencjalną aplikacyjnością w różnych sektorach gospodarki i biotechnologii. Są to zarówno typowe klasyczne metody hodowlane z modulacją warunków inkubacji w zakresie temperatury, pH, czynników wzrostowych i odżywczych w strategii OSMAC (ang. *One Strain Many Compounds*), jak i zaawansowane techniki hodowli *in situ* naśladujące naturalne warunki środowiskowe w strategiach iChip czy mikrokultur bakteryjnych [9, 22]. Każda z tych strategii może prowadzić do aktywacji cichych klastrów genów w bakteriach, inicjujących produkcję różnych, dotąd nieznanych nowych bioaktywnych związków. Zastosowanie wyżej wymienionych metod przyczyniło się więc do odkrycia nowych wtórnych metabolitów, m.in. teiksobaktyny, antybiotyku o aktywności względem bakterii gramdodatnich produkowanego przez bakterie *Eleftheria terrae*, granatowo-fioletowego barwnika o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych w szczepie *Duganella* sp. B2, chaksalaktin A-C z klasy makrolaktonów poliketydowych oraz Lasso peptydów u *Streptomyces leeuwenhoekii* C34, czy czynnika hamującego wzrost patogenów wytwarzanego przez szczepy nierosnące w klasycznych metodach hodowlanych *ex situ* [9, 22]. Niestety powyższe techniki detekcji

bakterii produkujących wtórne metabolity mają też ograniczenia, związane chociażby z nieprzewidywalnością aktywności metabolicznej w szczepach na skutek subtelnych zmian warunków zachodzących w środowisku hodowlanym, jego komponentów i czynników inicjowanych przez zbiorowość społeczną w wzajemnych interakcjach [9, 27, 28]. Niemniej pozwalają one, w odróżnieniu od technik genomicznych i metagenomicznych, fizycznie pozyskać i stworzyć kolekcje unikatowych szczepów bakteryjnych z potencjałem aplikacyjnym.

Stosunkowo szybkim i łatwym sposobem wyłaniania środowiskowych producentów związków bioaktywnych jest wykonanie testów bezpośrednich oddziaływań antagonistycznych w metodach hodowlanych. Antagonizm drobnoustrojów jest bowiem powszechnym zjawiskiem w przyrodzie i odgrywa ważną rolę w zmniejszaniu liczebności komórek innych grup mikroorganizmów, w tym konkurentów zajmujących tę samą niszę ekologiczną. Ograniczeniem tej metody jest izolacja i detekcja jedynie szczepów dających się hodować na zdefiniowanych pożywkach wzrostowych oraz ujawnienie ich określonego fenotypu w konkretnych warunkach testowania. Niemniej interakcje antagonistyczne można uznać za jedno z powszechnie stosowanych testów w badaniach przesiewowych w poszukiwaniu bakterii będących producentami naturalnych produktów metabolizmu komórkowego [9, 10, 12].

Celem niniejszej pracy była izolacja bakterii z wód torfowych i określenie ich potencjału inhibicyjnego względem bakterii w testach oddziaływań antagonistycznych.

2. Metodologia badawcza

W badaniach oddziaływań antagonistycznych użyto szczepów bakteryjnych wyizolowanych z naturalnych środowisk i zdeponowanych w kolekcji Zakładu Mikrobiologii Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Szczepy o wyraźnej aktywności przeciwbakteryjnej zidentyfikowano metodami fenotypowymi i genetycznymi.

2.1. Izolacja bakterii z wód torfowych metodami hodowlanymi

Szczepy bakteryjne izolowano z wód ($n = 9$) pochodzących z torfowiska „Żurawie Bagno” (lubuskie). Próbkę wód posiewano na stałe podłoża – (1) agar odżywczy (AO) o składzie [$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$]: wyciąg mięsny 4,0 g, wyciąg drożdżowy 1,7g, pepton 4,0g, enzymatyczny hydrolizy kazeiny 5,4 g, agar 20,0 g o pH 4,0; 5,0; 6,0 i 7,0 oraz (2) agar R2A o składzie [$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$]: kwaśny hydrolizat kazeiny 0,5g, glukoza 0,5g, proteose pepton 0,5 g, wyciąg drożdżowy 0,5 g, pirogronian sodu 0,3g, skrobia 0,5g, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, agar 20,0 g o pH 4,0; 5,0; 6,0 i 7,0. Do pożywek dodawano 0,6% wodnego roztworu cykloheksamidu o końcowym stężeniu w pożywce $30 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ w celu powstrzymania wzrostu grzybów pleśniowych i drożdżopodobnych obecnych w próbkach wód. Wodę torfową, zarówno nierozcieńczoną, jak i rozcieńczoną 10-krotnie w jałowym płynie fizjologicznym (wodnym roztworze 0,85% NaCl), posiewano powierzchniowo po 0,1ml na serię płytek agarowych każdego rodzaju podłoża. Tak założone hodowle inkubowano w temp. 25°C przez 5 dni. Po okresie inkubacji zliczano wyrosłe kolonie dla każdej serii pożywek, a następnie wyliczano całkowitą liczbę bakterii w 1ml próbki wody, TCB [$\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$] (ang. *Total Concentration of Bacteria*). Do dalszych badań, na podstawie różnic w makromorfologii kolonii wyodrębniono 40 szczepów bakteryjnych z podłoża R2A o pH 7,0. Szczepy te przesiewano na podłoża AO o pH 7,0 i inkubowano w temp. 25°C przez 5 dni.

2.2. Biotesty – międzybakteryjne oddziaływania antagonistyczne

Do badania antagonistycznych interakcji użyto 40 izolatów wyłonionych po wstępnej analizie jakościowej, uwzględniającej różnice w wyglądzie kolonii na podłożu R2A. Analizę oddziaływania międzybakteryjnego wykonano w zmodyfikowanym teście dyfuzyjnym, będącym kombinacją metod płytek dwuwarstwowych i nakropleń według Long'a i Azam'a [29]. Izolaty posiewano równolegle na podłoże AO o pH 7,2 i do bulionu odżywczego o pH 7,2, które następnie inkubowano w temp. 25°C przez 3 dni do uzyskania w płynnej pożywce gęstości optycznej (OD) w skali 1,5-2,0 McF. Wartość OD zawiesin bakteryjnych oceniano przy użyciu densytometru DensiLAMeterII. Do nakroplenia w biotestach użyto szczepów bakteryjnych zawieszonych w bulionie, które traktowano jako potencjalnych „producentów”. Z namnożonych szczepów bakteryjnych na podłożach AO przygotowano zawiesiny w jałowym płynie fizjologicznym (pf) o gęstości optycznej w skali 0,5McF. Zawiesiny te traktowano jako szczepy „testowe” (wskaźnikowe), które następnie stosowane były w testach oddziaływań antagonistycznych w systemie płytek dwuwarstwowych.

Zawiesiny szczepów „testowych” w objętości 30 μ l wprowadzano do 3ml upłynnionego 0,6% agaru odżywczego o składzie [$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$]: wyciąg mięsny, 4,0 g, wyciąg drożdżowy 1,7 g, pepton 4,0 g, enzymatyczny hydrolizy kazeiny 5,4 g, NaCl 3,5 g, agar 6,0 g, pH 7,2. Całość natychmiast wylewano do standardowych płytek Petriego z przygotowanym wcześniej 2,0% agarem odżywczym. Na powierzchnię zastygłych hodowli nakrapiano po 10 μ l bulionowych zawiesin szczepów „producentów” w układzie 3x3. Testy antagonistycznych interakcji wykonywano w trzech powtórzeniach. Tak założone hodowle inkubowano w temp. 25°C przez 3 dni.

Oddziaływania antagonistyczne stwierdzano, po zaobserwowaniu strefy zahamowania wzrostu szczepów „testowych” w obszarze nakropleń zawiesin szczepów „producentów”. Za potencjalnych producentów substancji antibakteryjnych uznano szczepy, które wytworzyły strefy zahamowania wzrostu bakterii „testowych” o długości co najmniej 2 mm. W interpretacji przeciwbakteryjnej aktywności szczepów „producentów” przyjęto opisową skalę: słaba aktywność dla średnich długości stref inhibicji wzrostu wynoszących $\geq 1,0$ -5,0 mm, umiarkowana dla stref w przedziale $>5,0$ -9,0 mm, silna dla stref w przedziale $>9,0$ -20,0 mm i bardzo silna dla stref $>20,0$ mm.

2.3. Analiza fenetyczna i filogenetyczna

2.3.1. Profil fenotypowy szczepów bakteryjnych

W określeniu właściwości fenotypowych izolatów z wód torfowych, które posiadały aktywność przeciwbakteryjną względem przynajmniej trzech testowanych szczepów, przeprowadzono analizy cech morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych. Szczepy bakteryjne namnażano na agarze odżywczym AO, a wyrosłe kolonie poddano ocenie makroskopowej uwzględniającej ich barwę, wielkość i powierzchnię. Przeprowadzono także analizę mikroskopową w świetle przechodzącym (Opta-Tech MB200) w celu określenia kształtu komórek, przynależności do grupy Gram i obecności form przetrwalnych (spor).

W badaniu właściwości fizjologicznych i biochemicznych izolatów stosowano zawiesiny bakteryjne w jałowym pf o mianie 0,5McF ($1,5 \times 10^8$ cfu \cdot ml $^{-1}$). Do testów wzrostowych w podłożach hodowlanych użyto zawiesin szczepów o końcowym mianie

10^4 cfu·ml⁻¹. Zakres temperatur wzrostu (10, 18, 25, 30, 35, 40, 45 i 50°C) określono w 2, 3 i 7 dobie inkubacji szczepów w bulionie odżywczym o składzie [g·dm⁻³]: wyciąg mięsny 4,0 g, wyciąg drożdżowy 1,7 g, pepton 4,0 g, enzymatyczny hydrolizy kazeiny 5,4 g, NaCl 3,5 g (pH 7,2), oceniając stopień zmętnienia hodowli przy użyciu densytometru (DensiLAMeterII). Tolerancję izolatów bakteryjnych na NaCl badano stosując bulion odżywczy o pH 7,2 o składzie [g·dm⁻³]: wyciąg mięsny 4,0 g, wyciąg drożdżowy 1,7 g, pepton 4,0 g, enzymatyczny hydrolizy kazeiny 5,4 g zawierający odpowiednio 0,0; 0,5; 3,0; 7,0; 10,0 i 12,0% NaCl. Bulion odżywczy z dodatkiem i bez NaCl zaszczipiano zawiesinami bakteryjnymi i inkubowano w temp. 25°C przez 48 godz. Po okresie inkubacji oceniano stopień zmętnienia hodowli przy użyciu densytometru (DensiLAMeterII). Wzrost izolatów w różnych zakresach pH określano na stałych podłożach AO o składzie [g·dm⁻³]: wyciąg mięsny 4,0g, wyciąg drożdżowy 1,7 g, pepton 4,0 g, enzymatyczny hydrolizy kazeiny 5,4 g, NaCl 3,5 g, agar 20,0 g i R2A o składzie [g·dm⁻³]: kwaśny hydrolizat kazeiny 0,5 g, glukoza 0,5 g, proteose pepton 0,5 g, wyciąg drożdżowy 0,5 g, pirogronian sodu 0,3 g, skrobia 0,5 g, MgSO₄ x 7H₂O 0,05 g, agar 20,0 g. Podłoża te traktowano jako podłoża bazowe z odpowiednio dobranymi buforami o wartościach pH od 4,0 do 9,0 w odstępach co 1,0. W badaniu zastosowano bufony: cytrynianowo-fosforanowy (pH 4,0-5,0), fosforanowy (pH 6,0-8,0) i wodorowęglanowy (pH 9,2), które sporządzono zgodnie z instrukcją wg Janowca [30]. Na jałowe podłoża agarowe nakrapiano po 10μl zawiesin bakteryjnych i inkubowano w temp. 25°C przez 3 dni. Po okresie inkubacji oceniano wizualnie wzrost bakterii w miejscach nakropień. W przypadku negatywnego wzrostu szczepów na podłożach wydłużano czas inkubacji o kolejne 2 doby i dokonywano ponownej oceny wzrostu. Wszystkie testy wzrostowe badanych szczepów bakteryjnych wykonywano w trzech powtórzeniach. Aktywność katalazy oceniano poprzez wytwarzanie się pęcherzyków po dodaniu kropli 3% H₂O₂ do hodowli izolatów na agarze odżywczym. Aktywność oksydazy określono natomiast na podstawie utleniania N,N,N,N-tetrametylo-p-fenylenodiaminy w paskowym teście OXItest (BioMaxima, Polska). Rozkład związków wielkocząsteczkowych oznaczano na podłożach z dodatkiem 1,0% skrobi, 1,0% Tween (40 i 80) i kazeiny, zgodnie z zaleceniami Janowca [30]. Zdolność bakterii do rozpuszczania Ca₃(PO₄)₂ wykrywano z zastosowaniem metodyki według Katznelsona i Bose'a [31] na pożywkach wzbogaconych o składzie [g·dm⁻³]: pepton 5,0 g, ekstrakt wołowy 3,0 g, ekstrakt drożdżowy 0,5 g, glukoza 10,0 g, 10% K₂HPO₄ 50 ml, 10% CaCl₂ 100 ml, agar 20,0 g, pH 7,0-7,4 oraz minimalnych o składzie [g·dm⁻³]: ekstrakt drożdżowy 0,5g, glukoza 10,0 g, LD-asparaginian 2,0 g, KCl 0,1 g, NaCl 0,1 g, MgSO₄ 0,5 g, 10% K₂HPO₄ 50 ml, 10% CaCl₂ 100 ml, agar 20,0 g, pH 7,0-7,2. Szczepy posiewano punktowo na podłoża testowe, a po inkubacji w temp. 25°C przez 3 dni, oceniano intensywność wzrostu kolonii i zmiany wyglądu podłoża wokół nich.

Zdolność wykorzystania różnych związków organicznych będących źródłami węgla i azotu dla analizowanych izolatów oceniano za pomocą zestawów testów diagnostycznych API 20E i API 50CH (bioMérieux). Zawiesinę identyfikowanych szczepów przygotowano na roztworach soli fizjologicznej (API NaCl 0,85% Medium do testów API 20E) oraz API 50CHB/E Medium, w modyfikacji bez czerwieni fenolowej do testów API 50CH. W wykrywaniu związków wytwarzanych przez bakterie zastosowano standardowe reagenty: odczynnik James'a (wykrywanie indolu), odczynniki VP1 i VP2 (wykrywanie acetoiny/acetylometylokarbinolu w teście Voges'a-Proskauer'a) oraz NIT1, NIT2 i sproszkowanego Zn (wykrywanie azotynów i wolnego N₂).

2.3.2. Filogeneza szczepów bakteryjnych

Testowane izolaty z wód torfowych, które powodowały inhibicję wzrostu przynajmniej trzech szczepów bakteryjnych w dyfuzyjnym teście oddziaływań antagonistycznych, poddano detekcji genetycznej. Szczepy o numerach: I.7, 11; II.9; oraz III.1, 2, 8, 13, 14 i 15 namnażano na AO w temp. 25°C przez 24 godz. Po okresie inkubacji izolowano i oczyszczano materiał genetyczny szczepów przy użyciu zestawu do selektywnej izolacji kwasów nukleinowych ze złożeń krzemowych (Bacterial&Yeast Genomic DNA Purification Kit EURx). Wyekstrahowany DNA przechowywano w temp. 4°C do czasu przeprowadzenia analizy metodą PCR. Fragmenty genów 16S rRNA badanych izolatów amplifikowano w reakcji PCR z użyciem mieszanki reakcyjnej o składzie: 20 µl Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific), 2 µl Starter fD1 10 µM 5'-AGAG TTTGATCCTGGCTCAG-3' (GenoMed), 2 µl Starter rD1 10 µM 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' (GenoMed), 1 µl DNA matrycowe, 15 µl woda. Dodatkowo przygotowano kontrolę negatywną (matryca DNA zastąpiona wodą ultraczystą) i kontrolę pozytywną (DNA genomowe *E. coli*). Warunki amplifikacji dla reakcji PCR były następujące: 5 min w 98°C w celu denaturacji DNA, następnie 30 cykli denaturacji w 98°C przez 1 min, hybrydyzacja startera w 58°C przez 1 min i wydłużanie nici w 72°C przez 2 minuty (Bio-Rad T100).

Produkty uzyskane metodą PCR, po dodaniu 4 µl buforu obciążającego DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific) rozdzielono na 1,0% żelu agarozowym, a prążki DNA uwidoczniono za pomocą barwnika fluorescencyjnego Midori Green Advanced (Nippon Genetics). Jako wzorca wielkości DNA użyto Perfect 100bp DNA Ladder (EURx). Elektroforezę przeprowadzono w buforze TAE przy napięciu 8 V·cm⁻¹, przez około 30 minut. Po zakończeniu elektroforezy amplifikowane produkty w metodzie PCR o wielkości ok. 1500 pz wycinano z żelu w postaci bloczków, a następnie wyizolowano je z agarozy zestawem GeneMATRIX AGAROSE OUT DNA Purification Kit (firmy EURx). Jakość i stężenie produktów oceniano metodą spektrofotometryczną. Sekwencjonowanie produktów wykonano metodą Sanger (Genomed, Warszawa) z wykorzystaniem startera fD1. Dane z sekwencjonowania Sanger opracowano używając programu komputerowego SeqTrace.

Izolaty bakteryjne zidentyfikowano przez porównanie sekwencji konserwatywnych z biblioteką znanych sekwencji genów 16S rRNA w SILVA rRNA Database (www.arb-silva.de) przez dopasowanie wielu sekwencji przy wykorzystaniu SINA Aligner (v1.2.11) i bazy danych w wersji SILVA SSU 138.1. Sekwencje porównano narzędziem SSU-ALIGN 0.1.1. Drzewo filogenetyczne skonstruowano metodą największego prawdopodobieństwa za pomocą IQ-TREE 2.0.7. Zastosowano model ewolucyjny TIM3+F+R2 wybrany przez ModelFinder. Wiarygodność topologii drzewa oceniono korzystając z metody bootstrap (UFBoot2) wykonując 1000 powtórzeń. Drzewo filogenetyczne zwiualizowano za pomocą narzędzie iTOL v6. Procentowe podobieństwo sekwencji obliczono wykorzystując narzędzia z biblioteki cogent3.

2.4. Testy statystyczne

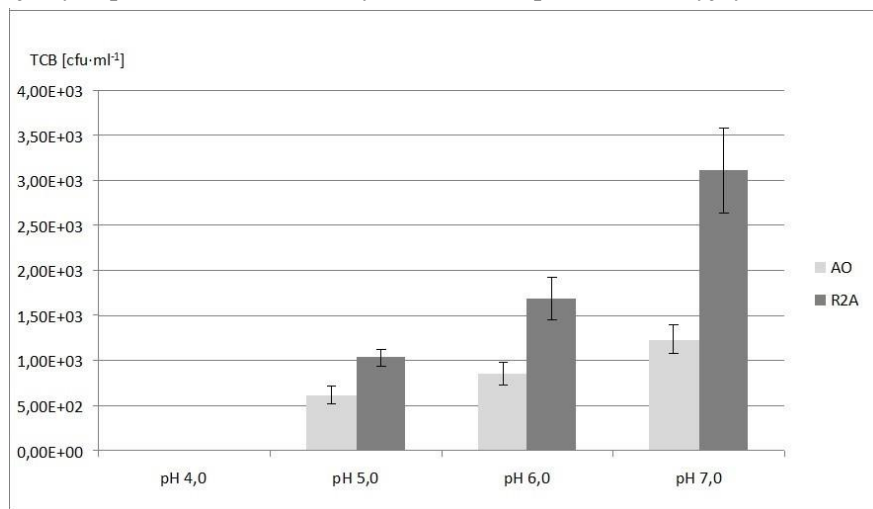
W analizie statystycznych różnic liczebności izolatów w zależności od zastosowanych podłoży (AO i R2A) użyto testu ANOVA/MANOVA (Statistica ver. 13.3, StatSoft Polska). Stopień intensywności wzrostu bakterii [TCB cfu·ml⁻¹] na różnych typach podłoży (AO o pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 i R2A o pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0) analizowano testem post-hoc Fishera

na poziomie istotności statycznej $p < 0,05$. Ponadto, test ANOVA Friedmana i Kruskala-Wallisa zastosowano do porównania aktywności biologicznej pomiędzy szczepami wyizolowanymi z wód torfowych. Stopień aktywności inhibicyjnej szczepów „producentów” względem szczepów „testowych” zgrupowano w cztery kategorie bioaktywności (zgodnie z inf. w 2.2.). Istotność statystyczną określano na poziomie $p < 0,05$.

3. Wyniki

3.1. Izolacja bakterii z wód torfowych metodami hodowlanymi

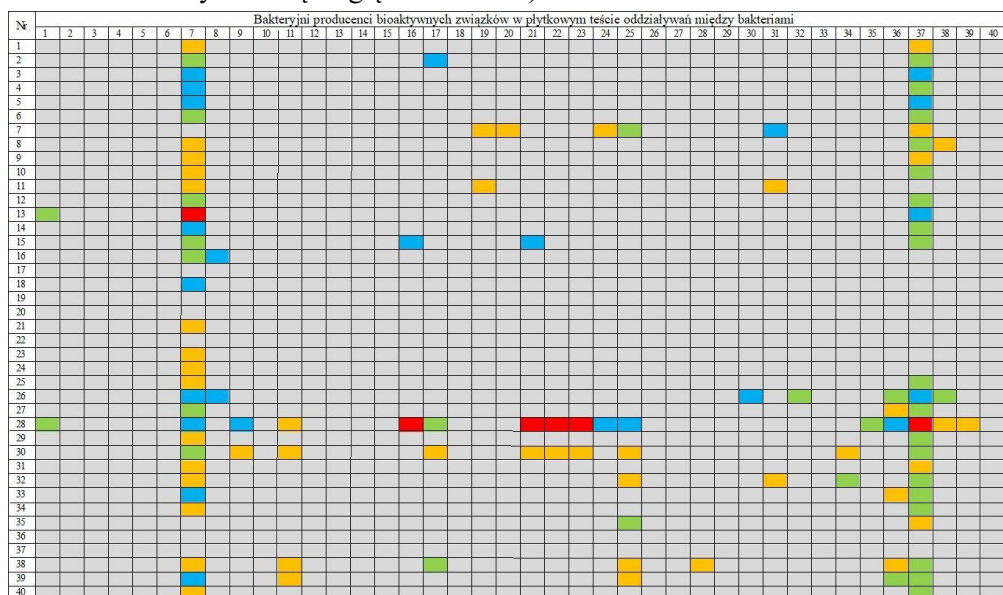
W izolacji szczepów bakteryjnych z wód torfowych użyto dwóch rodzajów pożywek AO i R2A z różnymi wartościami pH (4,0; 5,0; 6,0 i 7,0). Intensywność wzrostu bakterii w tych podłożach była wyraźnie zróżnicowana. Najlepszy wzrost izolatów zaobserwowano na podłożu R2A aniżeli na podłożu AO (ANOVA/MANOVA, $F(3,14) = 4,85$; $p < 0,02$). Średnia liczba bakterii hodowanych na R2A była wyraźnie wyższa i wynosiła od $1,0 \times 10^3$ cfu·ml⁻¹ do $3,1 \times 10^3$ cfu·ml⁻¹, gdy tymczasem na AO od $6,2 \times 10^2$ cfu·ml⁻¹ do $1,2 \times 10^3$ cfu·ml⁻¹ (wykres 1). Ponadto, zaobserwowano, że wzrost o 1 jednostkę pH w podłożach hodowlanych prowadziło do wzrostu liczby wyrosłych kolonii bakteryjnych. Wzrost bakterii był zdecydowanie lepszy w obu typów podłoży o pH 7,0 ($p < 0,01$) niż w pozostałych zakresów pH 5,0 i 6,0. Liczba jednostek tworzących kolonie (ang. *Colony-Forming Unit*, CFU) na podłożach o pH 7,0 była wyższa, odpowiednio o ok. 40-45% na agarze R2A i 37-25% na AO. Niemniej pożywka typu R2A inicjowała wzrost bakterii znacznie lepiej przy pH 5,0; 6,0 i 7,0, aniżeli pożywka AO. Wniosek ten potwierdza analiza statystyczna na poziomie istotności odpowiednio, $p < 0,02$ i $p < 0,0001$. Na pożywkach o pH 4,0, niezależnie od ich składu chemicznego, nie zaobserwowano wzrostu bakterii. Wyniki analiz mogą sugerować przydatność pożywek typu R2A w badaniach ilościowych bakterii w próbkach środowiskowych, w tym habitatów o specyficznych warunkach wzrostu i rozwoju m.in. torfowisk. Dlatego też z hodowli na R2A wyodrębniono kolonie bakterii różniące się makromorfologią do dalszych badań w poszukiwaniu potencjalnych producentów naturalnych związków przeciwbakteryjnych.



Wykres 1. Średnia całkowita liczba bakterii w wodach pobranych z torfowiska „Żurawie Bagno” (lubuskie), TCB [cfu·ml⁻¹] oznaczona w metodach hodowlanych na podłożach AO i R2A [opracowanie własne]

3.2. Bioaktywność szczepów bakteryjnych - biotesty

Do testów oddziaływań antagonistycznych użyto szczepów bakteryjnych pasażowanych z podłoża R2A na podłoże AO. Z trzech serii próbek wód torfowych (I/ W1-3, II/ W4-6, III/ W7-9) uzyskano 40 szczepów różniących się wyglądem kolonii na podłożu agarowym. Wszystkie izolaty charakteryzowały się zbliżonymi wymaganiami odżywczymi (AO/ R2A o pH 7,0) i tempem wzrostu w warunkach laboratoryjnych (24-48 godz., temp. 20-25°C, warunki tlenowe). To pozwoliło zastosować jednolite warunki inkubacji w badaniach interakcji antagonistycznych między bakteriami. Wyniki biotestów aktywności przeciwbakteryjnej izolatów z wód torfowych przedstawiono w formie macierzy (rys. 1) oraz w zestawieniu zbiorczym z wybranymi cechami fenotypowymi (morfologią komórki i bioaktywnością względem bakterii) w tabeli 1.



Rysunek 1. Stopień inhibicji wzrostu izolatów bakteryjnych z wód torfowych w testach oddziaływań antagonistycznych. Objasnienie: cyfry w kolumnie – numeracja szczepów „testowych”, cyfry w wierszu – numeracja szczepów „producentów”, oznaczenia numerowe, 1-12 określają kolejność izolatów dla zbioru I/1-12; 13-23 dla zbioru II/1-11; 24-40 dla zbioru III/1-17; stopień aktywności inhibicji wzrostu oznaczono kolorami: szarym - brak aktywności względem szczepów bakteryjnych, żółtym – słaby stopień aktywności ($\geq 1,0$ -5,0 mm śr. dł. inhibicji); zielonym – umiarkowany stopień ($> 5,0$ -9,0 mm śr. dł. inhibicji); niebieskim – silny stopień ($> 9,0$ -20,0 mm śr. dł. inhibicji); czerwonym – bardzo silny stopień ($> 20,0$ mm śr. dł. inhibicji) [opracowanie własne]

Tabela 1. Wybrane cechy fenotypowe i biologiczne izolatów bakteryjnych o potencjalnych właściwościach inhibicyjnych względem bakterii izolowanych z wód torfowych

Nr izolatu	Morfologia komórki	Bioaktywność względem szczepów	Liczba szczepów z inhibicją wzrostu w stopniu			
			słabym	umiarkowanym	silnym	bardzo silnym
I.1	pałeczka G(-)	2/40	0	2	0	0
I.7	pałeczka G(+)	32/40	15	7	9	1
I.8	pałeczka G(+)	2/40	0	0	2	0
I.9	ziarniak G(+)	2/40	1	0	1	0
I.11	pałeczka G(+)	4/40	4	0	0	0

II.4	pałeczka G(-)	2/40	0	0	1	1
II.5	pałeczka G(+)	4/40	1	2	1	0
II.7	pałeczka G(+)	2/40	2	0	0	0
II.8	ziarniak G(+)	1/40	1	0	0	0
II.9	pałeczka G(-)	3/40	1	0	1	1
II.10	pałeczka G(-)	2/40	1	0	0	1
II.11	pałeczka G(-)	2/40	1	0	0	1
III.1	pałeczka G(+)	2/40	1	0	1	0
III.2	pałeczka G(+)	7/40	4	2	1	0
III.5	pałeczka G(+)	1/40	1	0	0	0
III.7	pałeczka G(+)	1/40	0	0	1	0
III.8	pałeczka G(+)	3/40	2	0	1	0
III.9	pałeczka G(+)	1/40	0	1	0	0
III.11	ziarniak G(+)	2/40	1	1	0	0
III.12	pałeczka G(+)	1/40	0	1	0	0
III.13	pałeczka G(+)	6/40	3	2	1	0
III.14	pałeczka G(+)	28/40	5	18	4	1
III.15	pałeczka G(+)	3/40	2	1	0	0
III.16	ziarniak G(+)	1/40	1	0	0	0
suma		24/40	47	37	24	6
liczba szczepów producentów			18	10	12	6

Źródło: opracowanie własne.

W teście dyfuzyjnym wykonano 1600 interakcji w układzie bakteria-bakteria, w którym zaobserwowano zaledwie 114 (7,2%) przypadków inhibicji wzrostu testowanych izolatów bakteryjnych pochodzących z próbek wód torfowych. Antybakteryjną aktywność posiadało 24 z 40 izolatów bakteryjnych (60%), w tym 18 szczepów (75%) względem przynajmniej dwóch testowanych szczepów bakteryjnych ($p < 0,02$). Za najbardziej wrażliwe uznano 4 szczepy (10%): III.5 vs 16; III.7 vs 10; III.3 vs 7 i III.15 vs 7, za najmniej wrażliwe zaś 5 szczepów (12.5%): I.9; II.4; II.9 III.1 i III.12 vs 1. W teście inhibycyjnym szczep III.5 wykazywał zróżnicowany stopień wrażliwości na potencjalne bioaktywne związki pochodzenia bakteryjnego. Wzrost tego szczepu był hamowany w stopniu odpowiednio silnym i bardzo silnym ($>9,0$ mm inhibicja wzrostu) przez 10 izolatów/ producentów bioaktywnych związków, umiarkowanym ($>5,0-9,0$ mm) przez 3 szczepy bakteryjne i słabym ($<5,0$ mm) przez 3 szczepy. Dużą wrażliwość względem 7 szczepów producentów bioaktywnych związków wykazywał izolat III.3. Inhibicja wzrostu tego szczepu była powodowana odpowiednio w stopniu umiarkowanym przez 3 szczepy bakteryjne i silnym przez 4 szczepy. Wzrost dwóch pozostałych szczepów III.7 i III.15, mimo wrażliwości wobec odpowiednio 10 i 7 izolatów/producentów, był w 71-80% stosunkowo słabo hamowany przez szczepy bakteryjne pochodzące z wód torfowych. Ponadto testem mediany w aktywności biologicznej producentów ($n = 24$) wykazano duży udział izolatów z aktywnością inhibycyjną na poziomie słabym (1,0-5,0 mm, 75% szczepów) i silnym (9,1-20,0 mm, 50% szczepów) (Chi^2 AVOVA = 9,6; $df = 3$, $p < 0,05$).

Spektrum aktywności antybakteryjnej producentów względem testowanych bakterii był zróżnicowany (Chi^2 AVOVA $p = 0,016$). Aktywność przeciwbakteryjną względem przynajmniej 5 szczepów bakteryjnych wykazywały 4 izolaty (I.7 vs 32, III.14 vs. 28, III.2 vs 7, III.13 vs 6). Pozostałe szczepy posiadały aktywność antybakteryjną odpowiednio:

2 względem 4 szczepów (5,0%), 3 względem 3 szczepów (7,5%), 9 względem 2 szczepów (22,5%) oraz 6 względem 1 szczepu (15%). Generalnie, izolaty z wód torfowych powodowały inhibicję wzrostu bakterii testowych najczęściej w stopniu słabym (>1,0-5,0 mm) i umiarkowanych (>5,0-9,0 mm), odpowiednio w 41% i 32,5% przypadków. W teście dyfuzyjnym 40% izolatów nie wykazało żadnej aktywności inhibicyjnej względem testowanych szczepów, a wzrost 6 z nich (VII.5, 7, 8, 10, i VIII.13, 14) nie był hamowany przez żaden z nich.

Wykazano korelację na poziomie istotności statystycznej w biologicznej aktywności producentów w zależności od cech morfologicznych i fizjologicznych (χ^2 AVOVA Kruskala-Walisa $H(1) = 5,3$; $n = 100$, $p < 0,02$), gdzie najczęściej pałeczki gramodatnie posiadały jakąkolwiek biologiczną aktywność względem wszystkich testowanych bakterii. Na tej podstawie uszeregowano szczepy bakteryjne w kolejności od szerokiego do wąskiego spektrum aktywności inhibicyjnej: I.7 (32 z 40) > III.14 (28 z 40) > III.2 (7 z 40) > III.13 (6 z 40) > II.5 i I.11 (4 z 40) > II.9, III.15 i III.8 (3 z 40) (χ^2 AVOVA Kruskala-Walisa $H(4) = 9,7$; $n = 81$, $p < 0,05$). Większość z nich (7 z 9), z wyjątkiem szczepów II.9 i III.8 należało do grupy pałeczek gramodatnich. Dwa pozostałe szczepy intensywnie produkowały pigmenty odpowiednio granatowo-fioletowy (II.9) i żółto-pomarańczowy (III.8). Ponadto izolaty I.7 i III.14 wykazywały bardzo szerokie spektrum aktywności przeciwbakteryjnej zarówno względem bakterii gramodatnich i gramujemnych, niezależnie od mikromorfologii komórek. Stopień aktywności przeciwbakteryjnej obu tych szczepów/producentów był stosunkowo zróżnicowany; z przewagą umiarkowanego i bardzo silnego efektu inhibicji wzrostu testowanych izolatów bakteryjnych, odpowiednio 23 z 28 dla szczepu III.14 i 18 z 32 dla szczepu I.7.

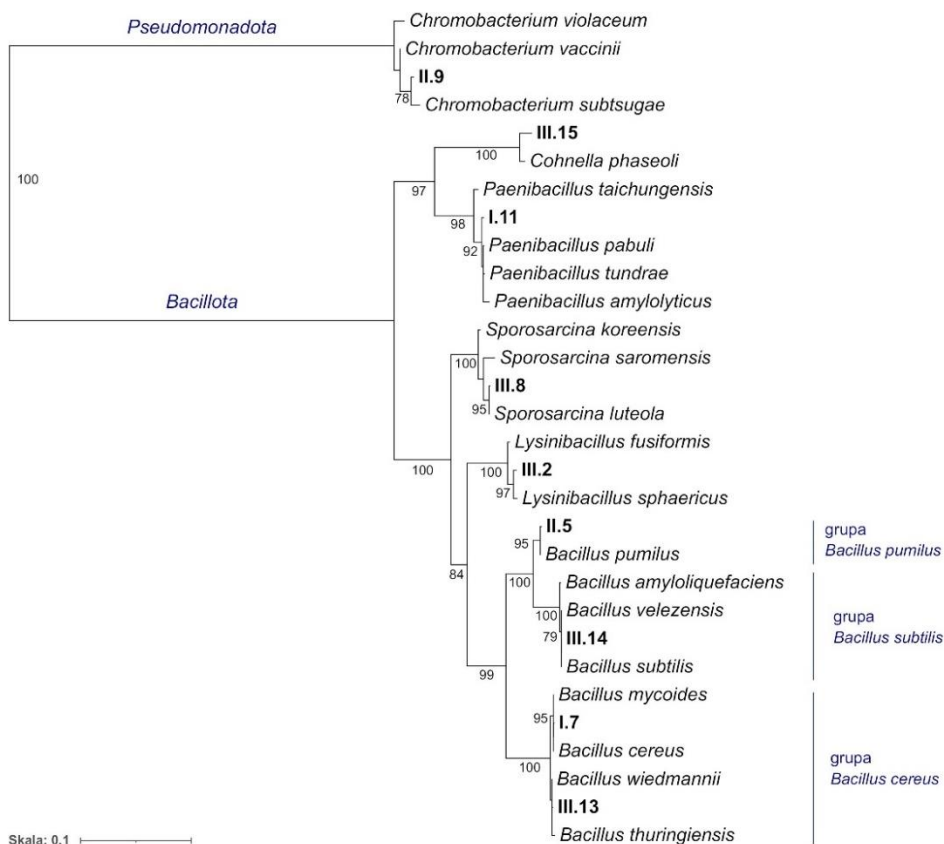
Pozostałe szczepy bakteryjne z aktywnością względem 3-7 szczepów posiadały jedynie wąskie spektrum działania wobec pałeczek gramodatnich. Przy czym większość z nich (5 z 7), z wyjątkiem izolatów II.5 i II.9, ogólnie słabo hamowało wzrost bakterii testowych. Generalnie, żaden z tych szczepów z bioaktywnością nie powodował własnej inhibicji wzrostu, co może sugerować udział innych związków biotycznych niż pigmenty i/lub autoinduktory/efektory QS uczestniczących w oddziaływaniach między drobnoustrojami.

Ponadto, wśród środowiskowych izolatów bakteryjnych wykazano obecność szczepów z bioaktywnością względem przynajmniej 2 szczepów w układzie oddziaływań z efektem inhibicji wzrostu od stopnia silnego aż po słaby (χ^2 AVOVA Kruskala-Walisa $H(4)=15,0$; $n=93$, $p<0,005$). W takim układzie oddziaływań zaszeregowano 16 z 40 szczepów w następującej kolejności: I.8, II.4, 9, 10 i 11 (śr. stref inhibicji: 14,0-19,0 mm) > I.1, 7, 9 oraz II.5 i III.2, 11, 14 (śr. stref inhibicji: 5,3-6,8 mm) > III.8, 13, 15 oraz II.7 (śr. stref inhibicji: 3,0-4,5 mm). Mimo stosunkowo wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej szczepów I.8, II.4, 9, 10 i 11, ich działanie ograniczało się jedynie względem nielicznych pałeczek gramodatnich. Umiarkowany stopień inhibicji wzrostu bakterii testowych, zarówno gramodatnich, jak i gramujemnych, zaobserwowano jedynie u szczepów I.7 i III.14. Pozostałe szczepy posiadały wąskie spektrum aktywności przeciwbakteryjnej w stopniu umiarkowanym (I.1, II.5, III.2 i 11) lub słabym (I.11, II.7 i III.8, 13, 15).

3.3. Profil fenotypowy i filogeneza szczepów bakteryjnych

Izolaty z wód torfowych, które powodowały inhibicję wzrostu względem przynajmniej trzech szczepów bakteryjnych w dyfuzyjnym teście oddziaływań antagonistycznych scharakteryzowano genetycznie (rys. 2) oraz fenotypowo na podstawie wybranych cech

biochemicznych i aktywności enzymatycznej przy użyciu zestawów diagnostycznych systemu API (rys. 3 i 4). Bliższa analiza filogenetyczna izolatów bakteryjnych o aktywności przeciwbakteryjnej wykazała przynależność szczepów do dwóch typów, głównie *Bacillota* (syn. *Firmicutes*) i w mniejszym stopniu *Pseudomonadota* (daw. *Proteobacteria*), klasy β -*Proteobacteria* (rys. 2).



Rysunek 2. Drzewo filogenetyczne szczepów bakteryjnych izolowanych z wód torfowych „Żurawie Bagno”.
 Objaśnienie: wartości wsparcia kładów (bootstrap) wyższe od 75 zostały umieszczone przy węzłach. Skala kładów została podana w liczbie substytucji na pozycję przyrównania. Numery dostępowe sekwencji 16SrDNA znajdujących się w bazie GenBank zostały umieszczone w tekście [opracowanie własne]

Na podstawie analizy sekwencji 16S rDNA taksonów w bazie SILVA określono stopień zgodności genetycznej izolatów środowiskowych. W obrębie *Bacillota* (dawniej *Firmicutes*) uzyskano następujące rejestry; I.7 zbliżony w 99,92% do *Bacillus cereus* (GenBank KF831382), III.13 w 99,92% do *B. wiedmannii* (GenBank KU198626) (oba izolaty z grupy *B. cereus*), III.14 w 99,79-100% do *B. amyloliquefaciens* (GenBank CP006058)/*subtilis* (GenBank EU825670), III.2 w 98,58-99,12% do *Lysinibacillus forminis* (GenBank AB167226)/*sphaericus* (GenBank KY312813) (oba izolaty spokrewnione genetycznie z grupą *B. subtilis*) oraz z grupy *B. pumilus*: II.5 w 99,9% do *B. pumilus* (GenBank CP000813). Pozostałe szczepy zgrupowano w *Paenibacillacea* z rodzajami *Paenibacillus* (I.11 w 99,74% do *P. tundrae*) i *Cohnella* (III.15 w 99,08% do *C. phaeseoli*)

oraz w *Caryophanaceae* z rodzajem *Sporosarcina* (III.8 w 98,42-99,92% do *S. saromensis* (GenBank AB243859)/*luteola* (GenBank KF254736). W grupie β -*Proteobacteria*, aktywność przeciwbakteryjną w teście oddziaływań antagonistycznych wykazano jedynie dla gramujemnej pałeczki, szczepu II.9 zidentyfikowanego jako *Chromobacterium subtsugae* (w 99,9% zgodności z *C. subtsugae*, GenBank AY344056).

Silną inhibicję wzrostu pałeczek gramdodatnich powodował izolat z rodzaju *Chromobacterium* (II.9). Wśród szczepów bakteryjnych o umiarkowanej aktywności przeciwbakteryjnej zidentyfikowano gramdodatnie laseczki z grup: *B. cereus* (I.7), *B. subtilis* (III.2 i III.14) oraz *B. pumilus* (II.5). Pozostałe szczepy: *P. tundrae* (I.11), *S. saromensis/luteola* (III.8), *B. wiedmannii* (III.13) i *C. phaseoli* (III.15) cechowała względna słaba aktywność inhibicyjna wobec szczepów testowych.

Wymienione izolaty były zdolne wzrastać w płynnej pożywce bulionowej (pH 7,2) w dość szerokich zakresach temperatur inkubacji od 10-18°C do 35-45°C (rys. 3).

Charakterystyka izolatów	I.7	I.11	II.5	II.9	III.2	III.8	III.13	III.14	III.15
Wygląd kolonii na agarze odżywczym po okresie inkubacji 72h w temp. 25°C									
kolor	biały	żółto-brązowy	mleczno-biały	granatowo-fioletowy	kremowy	beżowy	biały	jasno biały	kremowy
średnica (mm)	2,0 – 4,0	2,0 – 4,0	1,0 – 2,0	1,0 – 3,0	1,0 – 3,0	1,0 – 2,0	1,0 – 2,0	2,0 – 4,0	1,0 – 3,0
kształt	nieregularny, płaski, szorstki, suchy, nieprzezroczysty	okrągły, płaski, słuzowy, gładko-lśniący, nieprzezroczysty	nieregularny, płaski, gładko-lśniący, nieprzezroczysty	okrągły, wypukły, brzeg regularny, gładko-lśniący, nieprzezroczysty	okrągły, wypukły, brzeg regularny, gładko-lśniący, nieprzezroczysty	okrągły, wypukły, brzeg regularny, gładki, nieprzezroczysty	nieregularny, płaski, szorstki, suchy, nieprzezroczysty	nieregularny, płaski, szorstki, matowy, słuzowy, nieprzezroczysty	okrągły, wypukły, brzeg regularny, gładki, matowy, nieprzezroczysty
Mikromorfologia komórek									
barw. met. Grama obecność spor	pałeczka G(+) +	pałeczka G(+) +	pałeczka G(+) +	pałeczka G(-) -	pałeczka G(+) +	ziarniak G(+) +	pałeczka G(+) +	pałeczka G(+) +	pałeczka G(+) -
Wzrost w bulionie odżywczym w zakresach temperatur [°C]	10 - 35	10 - 40	10 - 45	18 - 40	18 - 35	18 - 40	10 - 45	18 - 45	18 - 35
Wzrost w bulionie odżywczym z dodatkiem NaCl [%] w temp. 25°C	0,0 – 0,5	0,0 – 0,5	0,0 – 10,0	0,0 – 1,0	0,0 – 7,0	0,0 – 7,0	0,0 – 0,5	0,0 – 7,0	0,0 – 0,5
Wzrost na podłożu R2A agar w zakresach pH w temp. 25°C	5,0 – 9,0	5,0 – 8,0	5,0 – 9,0	5,0 – 9,0	6,0 – 9,0	6,0 – 9,0	5,0 – 9,0	5,0 – 8,0	6,0 – 9,0
Wzrost na podłożu agarze odżywczym w zakresach pH w temp. 25°C	5,0 – 9,0	5,0 – 8,0	5,0 – 9,0	5,0 – 9,0	0,6 – 8,0	6,0 – 9,0	5,0 – 9,0	4,0 – 8,0	6,0 – 8,0
Rozkład Ca ₃ (PO ₄) ₂	-	+	-	(+)	-	-	-	-	-
Test na obecność:									
katalaza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
oksydaza	+	-	+	+	-	+	+	+	+

Rysunek 3. Cechy morfologiczne i fizjologiczne izolatów bakteryjnych z wód torfowych: I.7 (*Bacillus* sp.), II.11 (*Paenibacillus tundrae*), II.5 (*B. pumilus*), II.9 (*Chromobacterium subtsugae*), III.2 (*Lysinibacillus forminis/sphaericus*), III.8 (*Sporosarcina saromensis/luteola*), III.13 (*B. wiedmannii*), III.14 (*B. amyloliquefaciens*), III.15 (*Cohnella phaseoli*). Objaśnienie: (+), słaba reakcja; +, reakcja pozytywna/wzrost; -, reakcja negatywna/ brak wzrostu [opracowanie własne]

Ponad połowę szczepów (5 z 9) zaliczono do grupy mezofili z zakresem wzrostu w temp. od 18°C do 40°C i optimum temp. 25-35°C, a wśród nich szczepy z rodzaju *Bacillus* (III.14) z tolerancją na wyższą temperaturę inkubacji, 45°C. Pozostałe 4 szczepy bakteryjne tj. *Paenibacillus* spp. (I.11) oraz *Bacillus* spp. z grup *B. cereus* (I.7, III.13) i *B. pumilus* (II.5) wykazywały cechy psychrotolerancji, zdolne do wzrostu nawet w temp. $\leq 10^\circ\text{C}$. Połowa szczepów preferowała jedynie niskie stężenie soli NaCl (0,5%) w bulionie odżywczym, z wyjątkiem szczepów III.2, 8, 14 ($\leq 7,0\%$ NaCl) i II.5 ($\leq 10,0\%$ NaCl). Wszystkie izolaty posiadały zdolność do wzrostu w dość szerokich zakresach pH (5,0-9,0) na stałych pożywkach AO i R2A. Zaliczono je do grupy bakterii obojętnolubnych z tolerancją na niższe wartości H⁺ jako acidotolerancyjne. Ponadto u 77% szczepów wy-

kazano aktywność katalazy i oksydazy, izolaty I.11 i III.2 były jedynie katalazododatnie. Profil biochemiczno-enzymatyczny 9 izolatów był zróżnicowany. Na podstawie wybranych cech biochemicznych w testach paskowych API wykazano, że ponad połowa szczepów (5 z 9) wykorzystywała wiele różnych związków węgla w warunkach zarówno tlenowych i beztlenowych. Pozostałe szczepy (III.2, 8, 14, 15) utylizowały związki węgla w warunkach tlenowych (rys. 4).

Charakterystyka izolatów	I.7	I.11	II.5	II.9	III.2	III.8	III.13	III.14	III.15
Produkcja:									
Acetylmetylokarbinol	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Indol	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Aktywność enzymów:									
Esteraza	-	-	+	+	-	-	(+)	+	-
Ureaza	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Redukcja azotanów	+	+	-	+	-	+	+	+	-
Deaminaza (NH ₄ ⁺)	+	+	+	(+)	+	+	+	+	-
β-galaktozydaza (eskulina)	+	+	+	-	-	+	-	+	+
β-glukozydaza	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Hydrolyza:									
Kazeina na agarze mlecznym	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Glikogen	+	+	-	(+)	-	-	+	+	+
Skrobia	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Tween 40	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Tween 80	+	-	-	+	-	-	+	+	-
Utylizacja/ fermentacja:									
D-glukoza	+	+	+	+	-	-	+	-	+
D-fruktoza	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	-	(+)	-	+	+
D-ryboza	+	+	+	+	-	+	+	+	+
D-mannoza	-	+	+	-	-	-	+	-	+
D-trehaloza	+	+	+	+	-	+	+	+	+
D-ksyloza	-	+	+	-	-	-	-	-	+
D-laktoza	+	+	-	-	-	+	-	-	+
D-mannitol	-	+	+	-	-	-	-	+	-
D-sorbitol	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Salicyna	+	+	+	-	-	-	-	+	+
D-celobioza	-	-	+	-	-	+	-	+	+
D-maltoza	+	+	+	-	-	-	+	+	+
N-acetyl-β-glukozamina	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Cytrynian	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Kwas jabłkowy	+	-	-	+	+	+	-	+	+
Warunki wzrostu	F/AN	F/AN	F/AN	F/AN	T	T	F/AN	T	T

Rysunek 4. Cechy fenotypowe izolatów z wód torfowych: I.7 (*Bacillus* sp.), II.11 (*P. tundrae*), II.5 (*B. pumilus*), II.9 (*C. subtsugae*), III.2 (*L. forminis/sphaericus*), III.8 (*S. saromensis/luteola*), III.13 (*B. wiedmannii*), III.14 (*B. amyloliquefaciens*), III.15 (*C. phaseoli*). Objasnienie: (+), słaba reakcja pozytywna; +, reakcja pozytywna; -, reakcja negatywna; T, tlenowiec; F/AN, fakultatywny beztlenowiec [opracowanie własne]

Najlepszymi źródłami węgla i energii dla niemalże wszystkich izolatów (ok. 88%, 8 z 9) były 1,0% D-glukoza, D-fruktoza, D-ryboza, D-trehaloza, D-maltoza i/lub glicerol. Podobnie, niemalże wszystkie szczepy, z wyjątkiem szczepu III.8 hydrolyzowały przynajmniej jeden rodzaj biopolimeru. W testach biochemicznych stwierdzono u 7 z 9 szczepów aktywność proteolityczną, u 6 aktywność amylolityczną, z czego 2 były jedynie zdolne do rozkładu skrobi, oraz u 4 aktywność lipolityczną z rozkładem Tween 40 i/lub 80. Źródłem biogenego azotu dla tych szczepów były związki organiczne z przemian aminokwasów i/lub mocznika. Około 67% szczepów, 6 z 9 (I.7, 11, II.9, III.8, 13 i 14) posiadało zdolność redukcji azotanów do azotynów, a zaledwie 2 szczepy: *Paenibacillus* sp.

(I.11) *C. subtsugae* (II.9) do pozyskiwania fosforu ze źródeł nieorganicznych tj. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Najbardziej aktywne biochemicznie i enzymatycznie były szczepy z rodzajów: *Paenibacillus*, *Cohnella* oraz *Bacillus*, w tym gatunki *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* i *B. sp.* z grupy *B. cereus*. Około 55% szczepów, głównie z rodzaju *Bacillus* posiadało zdolność do produkcji acetoiny (acetylometylokarbinolu) w teście VP i tylko 1 szczep, *Paenibacillus* spp. (I.11) wytwarzał indol z tryptofanu. Stosunkową słabą aktywność biochemiczno-enzymatyczną w testach API wykazywały szczepy zidentyfikowane do rodzajów *Lysinibacillus* (III.2) i *Sporosarcina* (III.8).

4. Dyskusja

Zjawisko antybiotykooporności patogenów jest poważnym problemem w sektorze zdrowia publicznego na całym świecie i może ono stanowić zagrożenie dla zdrowia, a nawet życia człowieka. Wbrew pozorom, zjawisko to może również przynosić ogromne straty w gospodarce, w szczególności w sektorze rolniczym, w tym hodowli zwierząt gospodarskich. Główną przyczynę tego zjawiska upatruje się w powszechnym, nadmiernym i często nieuzasadnionym użyciu chemioterapeutyków w profilaktyce i leczeniu ludzi i zwierząt. Związki te oraz ich metabolity również krążą w środowisku i dlatego można je wykryć w próbkach pobieranych nawet w odległych zakątkach świata i miejscach od ludzkich siedzib [1]. Niestety, stała ich obecność w środowisku często prowadzi do naruszenia struktury zbiorowości mikrobiologicznej różnych ekosystemów, w których w drodze selekcji i zmienności genetycznej mikroorganizmów przeważać będą szczepy odporne na antybiotyki i inne środki przeciwdrobnoustrojowe, w tym także dezynfekcyjne i konserwujące. Głównym mechanizmem powstawania takich wielolekoopornych szczepów bakteryjnych jest horyzontalny transfer nośników genetycznych powszechnie występujący u prokariotów i zapewniający im przetrwanie w niekorzystnych do życia środowiskach [1, 3, 5]. Miejscami z szybko postępującą selekcją bakterii opornych na środki przeciwbakteryjne są przede wszystkim ośrodki zdrowia publicznego, w szczególności placówki szpitalne. Z racji stosowania antybiotykoterapii i reżimu sanitarnego wyższego poziomu, w takich miejscach kształtuje się swoisty profil mikrobiomu z dominacją szczepów wielolekoopornych odpowiedzialnych za zakażenia wewnątrzszpitalne i wysoki wskaźnik umieralności hospitalizowanych pacjentów [32-35].

Tworzenie nowych czynników antybakteryjnych i ich implementacja w sektorze farmaceutycznym stało się jednym z priorytetowych zadań w zakresie zdrowia publicznego na całym świecie. Alternatywnym działaniem jest poszukiwanie naturalnych produktów pochodzenia mikrobiologicznego w różnych środowiskach i organizmach żywych (roślin, zwierząt, w tym człowieka). Cennym źródłem związków o aktywności biologicznej mogą być bakterie, które ze względu na powszechne występowanie w różnych środowiskach i ogromną różnorodność są szczególnym obiektem zainteresowań naukowców, w tym mikrobiologów, chemików i biotechnologów. Od momentu odkrycia w latach 40. ubiegłego wieku streptomycyny wytwarzanej przez *Streptomyces griseus*, nieprzerwanie trwają poszukiwania w środowisku nowych szczepów bakteryjnych, z potencjalną aplikacyjnością w medycynie, rolnictwie i biotechnologii (m.in. w kosmetologii, przemyśle spożywczym, ochronie środowiska czy inżynierii biomateriałowej) [24]. Bakterie mogą wytwarzać w różnych szlakach metabolicznych liczne zróżnicowane pod względem chemicznym naturalne produkty. Wśród z nich zidentyfikowano bioaktywne związki, należące do takich grup jak: (i) poliketydy, PK obejmujące m.in. makrolidy, związki aromatyczne, polieny, barwniki np. ciemnofioletowy antybiotyko klostrubiny wytwarzany

przez *Clostridium beijerinckii*, (ii) peptydy szlaku nierybosomalnej syntezy (tzw. NRP, ang. *Non-Rybosomal Peptides*) obejmujące m.in. liniowe i cykliczne peptydy z unikatowymi motywami, (iii) metabolity pochodzenia poliketydowo-peptydowego, obejmujące m.in. czerwoną prodygiozynę, antybiotyki i biocyny tj. altiomycynę, albicydynę czy reutericykliny, oraz (iv) peptydy szlaku rybosomalnej syntezy i post-translacyjnej modyfikacji, głównie bakteriocyny o obiecującym potencjale terapeutycznym. Większość z nich, głównie poliketydy oraz peptydy szlaków syntezy rybosomalnej i nierybosomalnej, posiada szerokie spektrum aktywności biologicznej, m.in. względem bakterii gramujemnych i gramodatnich, w tym klinicznych szczepów wielolekoopornych tj. karbapenemoopornych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, metycylinoopornych i vankomycynoopornych szczepów *S. aureus*, wankomycynoopornych ziarniaków *Enterococcus* sp., penicylinoopornych paciorkowców *Streptococcus pneumoniae*, czy szczepów z rodzaju *Mycobacterium* odpowiedzialnych za gruźlicę i mykobakteriozy u ludzi. Peptydy i peptydopodobne metabolity mają zatem szerokie zastosowanie m.in. w medycynie, weterynarii, rolnictwie i biotechnologii. Co ciekawe produkcja takich związków nie jest jedynie domeną bakterii glebowych tj. promieniowców i myksobakterii [12, 36-38], ale również bakterii oportunistycznych i patogennych z rodzajów *Xanthomonas*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Burkholderia* czy z rzędu *Enterobacteriales* (m.in. *Serratia* sp., *Yersinia* sp.) [39].

Jedną ze strategii pozyskiwania cennych metabolitów bakteryjnych jest izolacja i detekcja potencjalnych producentów ze środowiska. W naszych badaniach wykazaliśmy, że wody torfowe, mimo specyficznych parametrów fizykochemicznych charakterystycznych dla torfowisk (niskie pH, ograniczona dostępność biogennych pierwiastków, słabe natlenienie), mogą być doskonałym źródłem szczepów bakteryjnych, w tym producentów związków bioaktywnych. Liczebność bakterii w próbkach wód torfowych pochodzących z torfowiska „Żurawie Bagno” w województwie lubuskim, wynosiła rzędu 10^2 - 10^3 cfu·ml⁻¹ w zależności od pH i żywności pożywek użytych w metodach hodowlanych. To stosunkowo niska liczebność w odróżnieniu do innych środowisk wodnych, w których notuje się dużo wyższą liczbę bakterii 10^5 - 10^9 cfu·ml⁻¹ [40, 41]. Niemniej w naszych badaniach wzrost izolatów z wód torfowych był bardziej preferowany na podłożach R2A o niskiej zawartości substancji odżywczych i odczynie neutralnym, aniżeli na rekomendowanym w badaniach naukowych agarze odżywczym. Ponadto, modyfikacja pożywek R2A czy AO w zakresie odczynu zbliżonego do wartości pH w naturalnym środowisku bytowania tych izolatów, niekoniecznie musi zapewnić dogodne warunki wzrostu i rozwoju rodzimych gatunków w warunkach laboratoryjnych oraz odzwierciedlać rzeczywisty stan liczebności dających się hodować bakterii, w tym acidofilów i acidotolerancyjnych w środowisku. Dodatkowo, pasażowanie szczepów z podłoża R2A na AO nie miało negatywnego wpływu na żywotność szczepów bakteryjnych izolowanych z wód torfowych, co umożliwiło ich hodowlę na standardowych pożywkach diagnostycznych w warunkach laboratoryjnych i prowadzenie dalszych badań. W bieżących badaniach mimo małej liczebności bakterii w wodach torfowych, z podłoża R2A wyizolowano 40 szczepów bakteryjnych z wyróżnieniem 11-17 typów kolonii, uwzględniając teksturę, powierzchnię, kolor, wielkość, kształt, zarys brzegu, zmiany wokół kolonii i ewentualnie inne specyficzne cechy morfologiczne kolonii. Na ogół kolonie bakteryjne były transparentne, płaskie, cielistego koloru lub bezbarwne, okrągłe lub soczewkowate o nieregularnym brzegu.

Większą uwagę zwracały kolonie pigmentowe (białe, czerwone, pomarańczowe, kremowe, żółte, żółto-brązowe, granatowo-fioletowe) świadczące, że te izolaty mogą być źródłem różnych metabolitów wtórnych o znaczeniu biotechnologicznym. W testach oddziaływań antagonistycznych zdecydowana większość izolatów wytwarzających barwniki (24 z 40, 60%) posiadała aktywność inhibicyjną względem szczepów bakteryjnych, gramodatnich i ewentualnie gramujemnych. Na 1600 interakcji bakteria-bakteria w metodzie dyfuzyjnym otrzymano 114 wyników z inhibicją wzrostu środowiskowych szczepów bakteryjnych. Poziom tej inhibicji był dość zróżnicowany, przy czym w 27% przypadków wykazano silny lub bardzo silny efekt hamowania wzrostu bakterii testowych ze średnią długości stref $>9,0$ mm i 32% umiarkowany w zakresie $>5,0-9,0$ mm. Co jest obiecujące w pozyskiwaniu z naturalnych środowisk, m.in. z cennych ekologicznie torfowisk, unikatowych szczepów bakteryjnych z potencjałem biotechnologicznym, w tym wytwarzających czynniki antybakteryjne. W naszych badaniach aktywność inhibicyjną wykazywało 20 izolatów gramodatnich (77%) i zaledwie 6 izolatów gramujemnych (23%), przy czym najliczniejszą grupę stanowiły bakterie zakwalifikowane do typu *Bacillota*. Wśród nich najlepszą aktywność antybakteryjną względem przynajmniej trzech szczepów bakteryjnych posiadały izolaty z rzędu *Caryophanales* z trzech rodzin, w tym *Bacillaceae* z rodzajem *Bacillus* (45% wszystkich izolatów), *Paenibacillaceae* z rodzajami *Paenibacillus* i *Cohnella* oraz *Caryophanaceae* z rodzajami *Lysinibacillus* i *Sporosarcina*. W badaniach tych stwierdzono najczęstszą aktywność przeciwbakteryjną wśród laseczek gramodatnich, w szczególności z rodzaju *Bacillus* i blisko spokrewnione z nimi pałeczki z rodzaju *Lysinibacillus*. W obrębie rodzaju *Bacillus* najliczniej reprezentowane były szczepy z grup *B. cereus* sensu lato, *B. pumilus* i *B. subtilis*. Co nie jest zaskoczeniem, gdyż szczepy te podobnie, jak inne znane środowiskowe bakterie, takie jak aktinobakterie, myksobakterie czy liczne gatunki z rodzaju *Pseudomonas* sp. występują powszechnie w różnych środowiskach i mogą syntetyzować różnorodne klasy związków chemicznych o aktywności biologicznej, w tym liczne enzymy (chitynazy, amylazy, proteazy, lipazy, celulazy, ksylanazy, inulinazy, β -endoglukanazy, nitrogenazy) oraz szereg antybiotyków i związków antybiotykopodobnych m.in. bakteriocyny, lantibiotyki [37, 38, 42-47]. Bakterie te posiadają bardzo różnorodny metabolizm z możliwością wytwarzania zarówno antimikrobiologicznych niskocząsteczkowych metabolitów pierwotnych np. nienasycone kwasy tłuszczowe, alkohole, ketony, kwasy organiczne, aldehydy, aromatyczne węglowodory, jak i szereg wielkocząsteczkowych wtórnych metabolitów. Te ostatnie mogą być reprezentowane przez poliketydy oraz peptydy powstające w szlakach syntezy rybosomalnej i nierybosomalnej [42, 48]. Co czyni, że szczepy te posiadają ogromny potencjał biotechnologiczny m.in. w ochronie środowiska w bioremediacji skażeń i utylizacji metali, rolnictwie w ochronie roślin w produkcji stymulatorów wzrostu i rozwoju roślin, biopestycydów, insektycydów i herbicydów, czy w sektorze farmaceutycznym w produkcji antybiotyków o szerokim spektrum aktywności wobec bakterii gramodatnich i gramujemnych oraz grzybów patogennych [42, 44, 45, 47, 48].

W obrębie pałeczek gramujemnych z kolei najlepszą aktywność wykazywały szczepy z β -*Proteobacteria* z rodzaju *Chromobacterium* (II.9, 10, 11) (11% wszystkich izolatów), które powodowały inhibicję wzrostu 2 lub 3 szczepów bakteryjnych w stopniu silnym/bardzo silnym lub ewentualnie słabym. Te saprofityczne, kosmopolityczne chromobakterie, należące do rzędu *Neisseriales*, wytwarzają liczne enzymy (lipazy, esterazy, peptydazy, amylazy, chitynazy) uczestniczące w rozkładzie wielkocząsteczkowych związków orga-

nicznych, w tym biopolimerów oraz czynniki wirulencji o aktywności cytolitycznej m.in. hemolizyny. Są one również źródłem wtórnych metabolitów, takich jak polihydroksyalkonianów, barwników i antybiotyków (aerocyjanidyny, aerokawiny) oraz czynników QS [49, 50]. Największym zainteresowaniem cieszą się jednak ich naturalne barwniki z grupy benzopiroli (pochodnych indolu), głównie ciemnogramatowa wioleceina i deoksywioleceina o wielofunkcyjnych aktywnościach biologicznych. W licznych badaniach udowodniono aktywność tych związków jako czynników przeciwbakteryjnych hamujących wzrost większości bakterii gramododatnich tj. *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp., w tym szczepów metycylinoopornych oraz *Mycobacterium* sp., a także nielicznych bakterii gramujemnych z klasy *Proteobacteria*, m.in. z rodzajów *Neisseria*, *Pseudomonas* czy *Yersinia* [51, 52].

Pozostałe izolaty z wód torfowych powodowały w różnym stopniu nieznaczającą inhibicję wzrostu 1 ewentualnie 2 szczepów bakteryjnych, wśród których zidentyfikowano pomarańczowo-pigmentowe ziarniaki gramododatnie z rodzaju *Rhodococcus*, liczne pałeczki gramododatnie z rodzaju *Paenibacillus* oraz ciemnobrązowo-pigmentowe pałeczki gramujemne z rodzaju *Paraburkholderia* przedstawiciele β -*Proteobacteria* z rodziny *Burkholderiaceae* (dane własne niepublikowane). Generalnie, ponad połowa izolatów z wód torfowych posiadała aktywność przeciwbakteryjną (24 z 40, 60%), co może wskazywać na powszechność występowania szczepów w środowiskach zdolnych do produkcji czynników przeciwmikrobiologicznych. Działanie takich związków zostało udokumentowane w licznych badaniach, argumentujących ich ekologiczną rolę w zapewnieniu producentom tych związków przewagi konkurencyjnej w ekosystemach i tym samym przetrwanie w siedlisku ich bytowania. Przyjmuje się, że takie mikrobiologiczne metabolity są wykorzystywane m.in. w antagonistycznych i symbiotycznych relacjach międzykomórkowych jako czynniki działające odpowiednio statycznie/bójczo lub stymulująco na komórki w układach biocenotycznych (mikroorganizm-mikroorganizm, mikroorganizm-makroorganizm). Mogą one zatem pełnić funkcje defensywne przed mikrodrapieżnikami lub ofensywne w kolonizacji habitatów, co też wyjaśnia powszechność występowania w środowisku przyrodniczym zjawiska antybiozy [47, 48, 53]. W licznych przypadkach takie metabolity pełnią funkcje regulacyjne i fizjologiczne na poziomie komórkowym oraz jako autoinduktory/ efekторы w komunikacji międzykomórkowej. Te ostatnie wpływają na zjawiska behawioralne, które towarzyszą w swoistych cyklach rozwojowych u niektórych bakterii, formułowaniu biofilmu mikrobiologicznego, przechodzeniu aktywnie metabolicznie komórek wegetatywnych w stan VBNC (ang. *Viable But NonCulturable*, żywotne, ale niedające się hodować) [12, 47].

Utworzona kolekcja izolatów z wód torfowych jest bardzo cennym nabytkiem o nieocenionej wartości naukowej, a dalsze badania pozwolą w niedalekiej przyszłości wyłonić naturalne produkty o przydatności biotechnologicznej. Kontynuacją badań będzie dalsza charakterystyka szczepów pochodzących z torfowiska pod kątem izolacji i detekcji wtórnych metabolitów oraz aplikacyjności tych szczepów w ochronie zdrowia i środowiska.

5. Wnioski

W bieżących badaniach udowodniono, że wody torfowe mogą być bogatym źródłem szczepów bakteryjnych z unikatowymi właściwościami biologicznymi. Ponad połowa izolatów z wód torfowych (60%) w teście dyfuzyjnym wykazywała aktywność inhibicyjną względem 34 (85%) poddanych badaniom bakterii gramododatnich i gramujemnych. Sto-

pień tej aktywności był zróżnicowany, jednak w 30 przypadkach interakcji ujawniono silny efekt antagonizmu w układzie bakteria-bakteria. Najliczniejszymi producentami czynników hamujących wzrost szczepów bakteryjnych stanowiły laseczki gramododatnie z Typu *Bacillota*, głównie z rodziny *Bacillaceae*, obejmujące grupy *sensu lato*: *B. cereus*, *B. subtilis* i *B. pumilus* (45% wszystkich izolatów). Szczepy te również odpowiadały za 70% i 80% inhibicję wzrostu izolatów z wód torfowych. Wśród pałeczek gramujemnych umiarkowaną aktywność przeciwbakteryjną wykazywały szczepy *C. subtsugae* z rodziny *Chromobacteriaceae* (11% izolatów).

Podziękowania

Serdeczne podziękowania dla Pani prof. dr hab. Gabrieli Bugli-Płoskońskiej za cenne uwagi podczas przygotowywania niniejszego manuskryptu i dla Pana mgr Przemysława Żelazko za przekazanie materiału z torfowiska „Żurawie Bagno” za zgodą Regionalnej Dyrekcji Ochrony Środowiska w Gorzowie Wielkopolskim (nr Decyzji WPN-I.6205.4.2017.AZ).

Literatura

1. Laxminarayan R., Duse A., Watal C., Zaidi A.K.M., Wertheim H.F.L., Sumpradit N., Vlieghe E., Hara G.L., Gould I.M., Goossens H., Greko C., So A.D., Bigdeli M., Tomson G., Woodhouse W., Ombaka E., Peralta A.Q., Qamar F.N., Mir F., Kariuki S., Bhatta Z.A., Coates A., Bergstrom R., Wright G.D., Brown E.D., Cars O., *Antibiotic resistance—the need for global solutions*, Lancet Infect. Dis., 13(12), 2013, s. 1057-1098, doi: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.
2. Klein E.Y., Van Boeckel T.P., Martinez E.M., Pant S., Gandra S., Levin S.A., Goossens H., Laxminarayan R., *Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015*, PNAS, 115(5), 2018, s. 3463-3470, doi.org/10.1073/pnas.171729511.
3. Guz-Regner K., Komarnicka U.K., Futoma-Kołoch B., Wernecki M., Cal M., Kozieł S., Ziółkowska A., Bugla-Płoskońska G., *Antibacterial activity and action mode of Cu(I) and Cu(II) complexes with phosphines derived from fluoroquinolone against clinical and multidrug-resistant bacterial strains*, J. Inorg. Chem., 210, 2020, s. 1111-1124, doi:10.1016/j.jinorgbio.2020.111124.
4. Komarnicka U.K., Starosta R., Guz-Regner K., Bugla-Płoskońska G., Kyzioł A., Jeżowska-Bojczuk M., *Phosphine derivatives of sparfloxacin: synthesis, structures and in vitro activity*, J. Mol. Struct., 1096, 2015, s. 55-63, doi:10.1016/j.molstruc.2015.04.044.
5. Guz-Regner K., Komarnicka U.K., *Modyfikacje strukturalne leków – nadzieja w walce z mikroorganizmami i nowotworami*, Laboratorium-Przeg. Ogólnopol., 7-8, 2014, s. 28-31.
6. Bykowska A., Starosta R., Komarnicka U.K., Ciunik Z., Kyzioł A., Guz-Regner K., Bugla-Płoskońska G., Jeżowska-Bojczuk M., *Phosphine derivatives of ciprofloxacin and norfloxacin, a new class of potential therapeutic agents*, J. New Chem., 38, 2014, s. 1062-1071.
7. Guz-Regner K., Krzyżek P., *Bakteryjne lotne związki organiczne - nowe możliwości w diagnostyce i terapii – cz. I*, Laboratorium-Przeg. Ogólnopol., 3-4, 2017, s. 55-59.
8. Guz-Regner K., Krzyżek P., *Bakteryjne lotne związki organiczne - nowe możliwości w diagnostyce i terapii – cz. II*, Laboratorium-Przeg. Ogólnopol., 5-6, 2017, s. 38-43.
9. Atanasov A.G., Zotchev S.B., Dirsch V.M., Supuran C.T., *Natural products in drug discovery: advances and opportunities*, Nature Rev. Drug Dis., 20, 2021, s. 200-216.

10. Sekurova O.N., Schneider O., Zotchev S., *Novel bioactive natural products from bacteria via bioprospecting, genome mining and metabolic engineering*, *Microb. Biotech.*, 12(5), 2019, s. 828-844, doi:10.1111/1751-7915.13398.
11. Katz L., Baltz R.H., *Natural product discovery: past, present, and future*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 2016, s. 155-176, doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5.
12. Berdy J., *Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading*, *J. Antibiot.*, 65(1), 2012, s. 385-395, doi: 10.1038/ja.2012.27.
13. Imhoff J.F., Labes A., Wiese J., *Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products*, *Biotechnol. Adv.*, 29(5), 2011, s. 468-482, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.03.001.
14. Celedon R.S., Diaz L.B., *Natural Pigments of Bacterial Origin and Their Possible Biomedical Applications*, *Microorgan.*, 9(4), art. 739, 2021, s. 1-12, doi:10.3390/microorganisms9040739.
15. Blunt J.W., Copp B.R., Keyzers R.A., Munro M.H.G., Prinsep M.R., *Marine natural products*, *Nat. Prod. Rep.*, 34, 2017, s. 235-294, doi.org/10.1039/c6np00124f.
16. Guz-Regner K., *Bakteryjne pigmenty – dobroczynne związki przyszłości*, *Laboratorium-Przeg. Ogólnopol.*, 3-4, 2016, s. 21-26.
17. Barka E.A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Meier-Kolthoff J.P., Klenk H.-P., Clement C., Ouhdouch Y., Van Wezel G.P., *Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 80(1), 2015, s. 1-43, doi:10.1128/MMBR.00019-15.
18. Tanaka Y., Nishikawa M., Kamisaki K., Hachiya S., Nakamura M., Kuwazuru T., Tanimura S., Soyano K., Takeda K., *Marine-derived microbes and molecules for drug discovery*, *BMC, Inflam. Reg.*, 42, art. 18, 2022, s. 1-12, doi.org/10.1186/s41232-022-00207-9.
19. Benaud N., Edwards R.J., Amos T.G., D'Agostino P.M., Gutierrez-Chavez C., Montgomery K., Nicetic I., Ferrari B.C., *Antarctic desert soil bacteria exhibit high novel natural product potential, evaluated through long-read genome sequencing and comparative genomics*, *Environ. Microbiol.*, 23(7), 2021, s. 3646-3664, doi: 10.1111/1462-2920.15300.
20. McCauley E.P., Pina I.C., Thompson A.D., Bashir K., Weinberg M., Krz S., Crews P., *Highlights of marine natural products having parallel scaffolds found from marine-derived bacteria, sponges, and tunicates*, *Nature, J. Antibio.*, 73, 2020, s. 504-525, doi.org/10.1038/s41429-020-0330-5.
21. El-Helw N.O., El-Gendy A.O., Hassan H.M., Rateb M.E., El-Nesr K.A., *Characterization of natural bioactive compounds produced by isolated bacteria from compost of aromatic plants*, *J. App. Microbiol.*, 126(2), 2019, s. 443-451, doi:10.1111/jam.14085.
22. Rateb M.E., Ebel R., Jaspars M., *Natural product diversity of actinobacteria in the Atacama Desert*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 111, 2018, s. 1457-1477, doi.org/10.1007/s10482-018-1030-z.
23. Guz-Regner K., Szubert K., Wiglusz M., *Badania mikrobiologiczne: Morskie osady denne*, [w:] Michalski R. (red.), *Analityka wód i ścieków – wybrane zagadnienia*, Wydawnictwo Elamed MEDIA GROUP, Katowice 2017, s. 148-159.
24. Kiuru P., D'Auria M.V., Muller C.D., Tammela P., Vuorela H., Yli-Kauhaluoma J., *Exploring marine resources for bioactive compounds*, *Planta Med.*, 80(14), 2014, s. 1234-1246, doi:10.1055/s-0034-1383001.
25. Sanchez L.M., Wong W.R., Riener R.M., Schultz C. J., Linington R.G., *Examining the fish Microbiome: vertebrate-derived bacteria as an environmental niche for the discovery of unique marine natural products*, *Plos One*, 7(5), 2012, e35398, doi.org/10.1371/journal.pone.0035398.

26. Gulder T.A.M., Moore B.S., *Chasing the treasures of the sea — bacterial marine natural products*, Curr. Opin. Microbiol., 12, 2009, s. 252-260, doi.org/10.1016/j.mib.2009.05.002.
27. Rao M.P.N., Xiao M., Li W.-J., *Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications*, 8, art. 1113, 2017, s. 1-13, doi.org/10.3389/fmicb.2017.01113.
28. Wang H., Jiang P., Lu Y., Ruan Z., Jiang R., Xing X.-H., Lou K., Wei D., *Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of Duganella sp. B2*, 15, 2009, s. 119-124, doi.org/10.1016/j.bej.2008.11.008.
29. Long R.A., Azam F., *Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria*, App. Environ. Microbiol., 67(11), 2001, s. 4975-4983, doi: 10.1128/AEM.67.11.4975-4983.2001.
30. Janowiec M (red.), *Mikrobiologia i serologia*, Wydawnictwo PZWL, Warszawa 1988, s. 317-359.
31. Ribeiro C.M., Cardoso E.J.B.N., *Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (Araucaria angustifolia)*, Microbial Res., 167(2), 2012, s. 69-78, doi: 10.1016/j.micres.2011.03.003.
32. Cruz-Lopez F., Martinez-Melendez A., Garza-Gonzalez E., *How does hospital microbiota contribute to healthcare-associated infections?*, Microorgan., 11(1), 2023, art. 192, s. 1-12, doi: 10.3390/microorganisms11010192.
33. Roennerstrand B., Carelli D., Pierre J., Lampi E., *Leviathan versus the super bugs: free riding drives support for EU power over antimicrobial resistance*, J. Europ. Interg., 44(8), 2022, s. 1041-1057, doi.org/10.1080/07036337.2022.2068539.
34. Facciola A., Pellicano G.F., Visalli G., Paolucci I.A., Rullo E.V., Ceccarelli M., D'Aleo F., Di Pietro A., Squeri R., Nunnari G., La Fauci V., *The role of the hospital environment in the healthcare-associated infections: a general review of the literature*, Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci., 23(3), 2019, s. 1266-1278, doi: 10.26355/eurrev_201902_17020.
35. O'Hara N.B., Reed H.J., Afshinnekoo E., Harvin D., Caplan N., Rosen G., Frye B., Woloszynek S., Ounit R., Levy S., Butler E., Mason C.E., *Metagenomic characterization of ambulances across the USA*, Microbiome, 5, art. 125, 2017, s. 1-20, doi:10.1186/s40168-017-0339-6.
36. Bader C.D., Panter F., Mueller R., *In depth natural product discovery – Myxobacterial strains that provided multiple secondary metabolites*, Biotechnol. Adv., 39, art. 107480, 2020, s. 1-9, doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.107480.
37. Gerth K., Pradella S., Perlova O., Beyer S., Mueller R., *Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities – past and future biotechnological aspects with the focus on the genus Sorangium*, J. Biotech., 106, 2003, s. 233-253, doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.07.015.
38. Bhat M.A., Mishra A.K., Bhat M.A., Banday M.I., Bashir O., Rather I.A., Rahman S., Shah A.A., Jan A.T., *Myxobacteria as a source of new bioactive compounds: a perspective study*, Pharmaceut., 13(8), art. 1265, 2021, s. 1-32, doi:10.3390/pharmaceutics13081265.
39. Maglangit F., Yu Y., Deng H., *Bacterial pathogens: threat or treat (a review on bioactive natural products from bacterial pathogens)*, Nat. Prod. Rep., 38, 2021, s. 782-821, doi:10.1039/d0np00061b.
40. Michalik K., Małecka J., Guz-Regner K., *Ocena czystości mikrobiologicznej wód powierzchniowych we Wrocławiu*, [w:] Mołdoch-Mendoń I., Szymczyk P. (red.), *Mikroorganizmy i rośliny – wykorzystanie w nauce i przemyśle*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2022, s. 46-55.
41. Cieniuch G., Guz-Regner K., *Analityka wód i ścieków: Bakteryjna bioróżnorodność w wodach powierzchniowych i metody jej detekcji*, [w:] Michalski R. (red.), *Bezpieczeństwo*

42. Sajid Jamal Q.M., Ahmad V., *Lysinibacilli: a biological factory intended for bio-insecticidal, bio-control, and bioremediation activities*, J. Fungi, 8, art. 1288, 2022, s. 1-19, doi: 10.3390/jof8121288.
43. Hashem A., Tabassum B., Abd-Allah E.F., *Bacillus subtilis: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress*, Saudi J. Biol. Sci., 26, 2019, s. 1291-1297, doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004.
44. Kayath A.C., Kaya-Ongoto M.D., Nicaise M.S., Ngumbi E., *The genus Lysinibacillus: Versalite phenotype and promising future*, Int. J. Sci. Res., 8(1), 2019, s. 1238-1242, doi:10.21275/ART20194281.
45. Lateef A., Adelere I.A., Gueguim-Kana E.B., *The biology and potential biotechnological applications of Bacillus safensis*, Biolog., 70(4), 2015, s. 411-419, doi:10.1515/biolog-2015-0062.
46. Sulaiman I.R., Hsieh Y-H., Jacobs E., Miranda N., Simpson S., *Identification of Lysinibacillus fusiformis Isolated from Cosmetic Samples Using MALDI-TOF MS and 16S rRNA Sequencing Methods*, J. AOAC. Inter., 101(6), 2018, s. 1757-1762, doi.org/10.5740/jaoacint.18-0092.
47. Sansinenea E., Ortiz A., *Secondary metabolites of soil Bacillus spp.*, Biotechnol. Lett., 33, 2011, s. 1523-1538, doi:10.1007/s10529-011-0617-5.
48. Argueller-Arias A., Ongena M., Halimi B., Lara Y., Brans A., Joris B., Ficker P., *Bacillus amyloliquefaciens GAI as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens*, Microb. Cell Fact., 8, art. 63, 2009, s. 1-12.
49. Castro-Gomes T., Cardoso M.S., DaRocha W.D., Laibida L.A., Nascimento A.M.A., Zuccherato L.W., Horta M.F., Bemquerer M.P., Teixeira S.M.R., *Identification of secreted virulence factors of Chromobacterium violaceum*, J. Microbiol., 52, 2014, s. 350-353, doi:10.1007/s12275-014-3202-5.
50. Duran N., Menck C.F.M., *Chromobacterium violaceum: A review of pharmacological and industrial perspectives*, Crit. Rev. Microbiol., 27(3), 2001, s. 201-222, doi.org/10.1080/20014091096747.
51. Pauer H., Hardoim C.C.P., Teixeira F.L., Miranda K.R., da Silva Barbirato D., de Carvalho D.P., Antunes L.C.M., da Costa Leitao A.A., Lobo L.A., Domingues R.M.C.P., *Impact of violacein from Chromobacterium violaceum on the mammalian gut microbiome*, Plos One, 13, 2018, doi.org/10.1371/journal.pone.0203748.
52. Wernecki M., Guz-Regner K., Cal M., Korzeniowska-Kowal A., Tobiasz A., Bugla-Płoskońska G., *Chromobacterium isolates – new variant strains from peatland, IV Ogólnopol. Konf. Naukowo-Szkoleniowa “Wektory i patogeny – w przeszłości i przyszłości”*, Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław, 24 listopada 2017.
53. Diez J., Martinez J.P., Mestres J., Sasse F., Frank R., Meyerhans A., *Myxobacteria: natural pharmaceutical factories*, Microb. Cell Fact., 11, art. 52, 2012, s. 1-3.

Antagonizm hodowlanych bakterii izolowanych z wód torfowych („Żurawie Bagno”, lubuskie)

Streszczenie

Zjawisko antybiotykooporności patogenów jest powszechnym globalnym problemem w sektorze zdrowia publicznego. Stałe i nieracjonalne stosowanie antybiotyków w medycynie, weterynarii i rolnictwie może skutkować niepowodzeniami terapeutycznymi i przynosić ogromne straty w gospodarce. Wyzwaniem stało się poszukiwanie nowych, alternatywnych czynników o potencjale terapeutycznym. Jedną ze strategii jest eksploracja środowisk w pozyskiwaniu naturalnych produktów pochodzenia mikrobiologicznego i ich producentów. W naszych badaniach z wód torfowych wyizolowano metodami hodowlanymi czterdzieści szczepów bakte-

ryjnych, z czego 60% posiadało aktywność inhibicyjną względem bakterii gramododatnich i gramujemnych. Potencjalną bioaktywność izolatów określano w bezpośrednim teście oddziaływań antagonistycznych w metodach dyfuzyjnych na podłożu AO. Dla dziewięciu izolatów wykazujących przeciwbakteryjną aktywność względem przynajmniej 3 szczepów przeprowadzono identyfikację genetyczną i fenotypową. Najliczniejszą grupą bakterii z aktywnością antybakteryjną stanowiły izolaty zaklasyfikowane do Typów *Bacillota* (syn. *Firmicutes*), obejmujące trzy rodziny: *Bacillaceae* (45%), *Paenibacillaceae* i *Caryophanaceae* oraz w mniejszym stopniu β -*Proteobacteria* z rzędu *Neisseriales*, w szczególności gramujemne pałeczki z rodzaju *Chromobacterium* (11%). Szczepy *Bacillus sp.* z grupy *B. cereus* i *B. amyloliquefaciens* z grupy *B. subtilis* powodowały najczęściej inhibicję wzrostu innych bakterii (70-80%). Mimo małej liczebności hodowalnych bakterii w wodach torfowych (10^2 - 10^3 cfu·ml⁻¹), ekosystem wód torfowych może być doskonałym źródłem cennych szczepów bakteryjnych o potencjale biotechnologicznym, wytwarzających metabolity przeciwbakteryjne. Słowa kluczowe: antagonizm bakteryjny, wody torfowe, test dyfuzyjny

Antagonism of culturable bacteria isolated from peat water ("Żurawie Bagno", lubuskie)

Abstract

The phenomenon of antibiotic resistance of pathogens presents a significant problem in the global public health sector. The increasing and often irrational use of antibiotics (in both human and veterinary medicine and in agriculture) can result in therapeutic failures and economic losses. These problems have led to the search for new, alternative agents with therapeutic potential. One avenue of inquiry involves environmental explorations to identify natural microbial products and their producers. In our research, 40 bacterial strains were isolated from peat water using culture-base methods. Of these, 60% showed inhibitory activity against grampositive and gramnegative bacteria. The potential bioactivity of the isolates was determined in a direct test of antagonistic interactions using diffusion methods in AO mediums. Genetic and phenotypic identifications were determined for nine isolates that exhibited antibacterial activity against at least three strains. Bacterial isolates with the most antagonistic activity were classified as *Bacillota* (syn. *Firmicutes*), including three families: *Bacillaceae* (45%), *Paenibacillaceae*, and *Caryophanaceae*, and also, to a lesser extent, *beta-Proteobacteria* from the *Neisseriales* order, especially gramnegative rods of the genus *Chromobacterium* (11%). The strains of *Bacillus sp.* From the *B. cereus* group and *B. amyloliquefaciens* from the *B. subtilis* group inhibited the growth of other bacteria most frequently (70-80%). Despite the low number of culturable bacteria in peat water (10^2 - 10^3 cfu·ml⁻¹), the peatland ecosystem could be an excellent source of valuable bacterial strains with biotechnological potential for producing antibacterial metabolites.

Keywords: bacterial antagonism, peat water, diffusion test

Wpływ wybranych pożywek hodowlanych na proliferację bydlęcych komórek satelitarnych *in vitro*

1. Wstęp

Komórki satelitarne zostały po raz pierwszy opisane w 1961 roku przez dwóch niezależnych badaczy – Alexandra Mauro i Bernarda Katza – którzy zaobserwowali je pomiędzy sarkolemmą a błoną podstawną włókna mięśniowego, badając mięśnie żaby i szczura [1, 2]. Komórki satelitarne stanowią rezerwuuar mięśniowych komórek macierzystych u dorosłych osobników i w warunkach homeostazy organizmu są nieaktywne mitotycznie, znajdując się w tzw. fazie uśpienia (ang. *quiescent state*) – w fazie G₀ cyklu komórkowego. Pod wpływem np. uszkodzenia mięśnia w warunkach *in vivo*, komórki satelitarne aktywują się, intensywnie proliferują, aby finalnie przejść wszystkie etapy miogenezy zakończone uformowaniem włókna mięśniowego. Liczba rezydujących komórek satelitarnych zależy od takich czynników jak wiek, gatunek czy rodzaj włókna mięśniowego [3-5]. Komórki satelitarne mięśni to heterogenna populacja komórek, na którą składają się zarówno komórki macierzyste, jak i progenitorowe, a ich los determinowany jest głównie przez czynniki mikrośrodowiskowe oraz profil ekspresji określonych genów zaangażowanych w miogenezę [6]. Identyfikacja komórek satelitarnych jest możliwa dzięki markerom, które możemy podzielić na czynniki transkrypcyjne jak *Pax3*, *Pax7* i MRF – miogeniczne czynniki regulatorowe (ang. *myogenic regulator factors*) oraz błonowe jak m-kadheryna, nestyna, syndekan - 3 i - 4 [4]. Warto podkreślić, że większość markerów nie jest specyficznych tylko dla komórek satelitarnych i są również obecne w kolejnych stadiach miogenezy oraz wyrażane przez inne typy komórek. Nieaktywne mitotycznie komórki satelitarne wyrażają ekspresję genu *Pax7*, a w wyniku ich aktywacji następuje wzrost ekspresji genów *Myf5* i *MyoD*, które zaangażowane są w początkowy etap miogenezy. Wraz z różnicowaniem się mioblastów (aktywowanych komórek satelitarnych) wzrasta ekspresja genów *Myf6* i *MyoG*, a komórki różnicują w miocyty, które następnie ulegają fuzji i tworzą włókno mięśniowe. Geny *Myf5*, *MyoD*, *Myf6* i *MyoG* należą do rodziny MRF [4]. Pierwotne linie komórkowe komórek satelitarnych stanowią podstawę w badaniach nad początkowymi etapami procesu miogenezy, będącego kluczowym procesem zarówno w życiu prenatalnym – podczas formowania się mięśni, jak i postnatalnym – podczas regeneracji uszkodzonych mięśni szkieletowych. W warunkach *in vivo* zrąb dla komórek satelitarnych stanowią fibroblasty – komórki tkanki łącznej o dużych zdolnościach wydzielniczych oraz pre-adipocyty – prekursorzy komórek tłuszczowych, których obecność jest kluczowa podczas różnicowania się komórek mięśniowych [7]. Rolą fibroblastów jest utrzymanie integralności strukturalnej tkanek oraz wytwarzanie czynników wzrostu (jak FGF, ang. *fibroblast growth factor*) oraz składników

¹ karolina.zygmunt@iz.edu.pl, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt, Instytut Zootechniki PIB, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice k. Krakowa.

² Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt, Instytut Zootechniki PIB, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice k. Krakowa.

³ Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt, Instytut Zootechniki PIB, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice k. Krakowa.

macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*) – kolagenu, fibronektyny, proteoglikanów czy lamininy [8,9]. Badania dowodzą, że kolagen typu V i VI zaangażowany jest w utrzymanie puli komórek satelitarnych, co kluczowe jest w procesie regeneracji mięśni szkieletowych [10]. Tworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej wspierane jest również przez fibroadipogenne komórki progenitorowe (FAP, ang. *fibroadipogenic progenitor cells*), które mają zdolność różnicowania się w fibroblasty i komórki tłuszczowe [11].

Celem niniejszej pracy było porównanie komercyjnie dostępnych pożywek hodowlanych, które mogą znaleźć zastosowanie w hodowli bydłych komórek satelitarnych. Brak komercyjnie dostępnych pożywek hodowlanych przeznaczonych do hodowli bydłych komórek satelitarnych stwarza potrzebę selekcji i optymalizacji dostępnych podłoży hodowlanych przeznaczonych do hodowli innego typu komórek. Głównym kryterium wyboru właściwej pożywki jest zapewnienie wysokiego tempa proliferacji komórek, przy zachowaniu profilu ekspresji genów charakterystycznych dla początkowych etapów miogenezy. Etap proliferacji wspomagany przez czynniki o działaniu mitogennym jest kluczowym elementem procesu miogenezy. Do badań wybrano trzy typy mediów komercyjnych: HSkMC Growth Medium (Cell Applications, Inc.), StemFlex™ Medium (Thermo Fisher Scientific) oraz MesenPRO RS™ Medium (Thermo Fisher Scientific) – przeznaczone odpowiednio do hodowli ludzkich komórek satelitarnych, pluripotencjalnych komórek macierzystych oraz mezenchymalnych komórek macierzystych.

2. Materiały i metody

2.1. Izolacja komórek satelitarnych

Komórki satelitarne zostały pozyskane na drodze trawienia enzymatycznego tkanki mięśniowej gatunku *Bos taurus*, przy pomocy kolagenazy II (2 mg (500 u) /ml; 2-3 ml na g tkanki; Gibco) w sterylnym 1 X stężonym buforze PBS (ang. *phosphate buffered saline*) o pH 7,2 z dodatkiem 4% płodowej surowicy cielęcej – FBS (ang. *fetal bovine serum*) przez okres ok. 2 h, w temperaturze 37°C, delikatnie wytrząsając. Następnie uzyskany nadsącz przemyto w buforze PBS i przefiltrowano przez 70 µm nylonową siatkę. Komórki wysiano na szalki hodowlane pokryte cienką warstwą 0,1% żelatyny (rozpuszczonej w wodzie), w pożywce DMEM (Thermo Fisher Scientific) z dodatkiem 20% FBS (Thermo Fisher Scientific) i zestawem antybiotyków 1x Primocin (InVivogen).

2.2. Pomiar tempa proliferacji bydłych komórek satelitarnych

Komórki satelitarne (pasaż 8) zostały wysiane na 96-dołkowej płytce hodowlanej, w gęstości 3500 komórek na dołek, pokrytych cienką warstwą 0,1% żelatyny, w pożywce DMEM z 20% zawartością FBS i zestawem antybiotyków 1x Primocin. Każda badana grupa składała się z dziesięciu powtórzeń. Po upływie 24 h gęstość komórek została oszacowana przy użyciu fluometrycznego testu CellTiterBlue (Promega). Sporządzono roztwór CellTiterBlue według protokołu producenta, dodano do badanych dołków z komórkami i przeprowadzono inkubację przez 1 h, w warunkach 5% CO₂ i w temperaturze 37°C. Przed doświadczeniem przeprowadzono optymalizację czasu inkubacji komórek satelitarnych w roztworze CellTiterBlue. Intensywność fluorescencji mierzono przy długości fali wzbudzenia 535 nm i emisji 595 nm, przy zastosowaniu czytnika płytek PlateReader AF2200 (Eppendorf). Po pomiarze pożywkę zmieniono na docelową pożywkę badaną, w zależności od grupy – MesenPRO RS™ Medium (Thermo Fisher

Scientific), StemFlex™ Medium (Thermo Fisher Scientific) lub HSkMC Growth Medium (Cell Applications, Inc.). Następnie liczbę komórek oszacowano stosując fluorymetryczny test CellTiterBlue w trzecim, piątym, siódmym i dziesiątym dniu hodowli w testowanych pożywkach. Jednocześnie prowadzono przyżyciowe obserwacje mikroskopowe.

2.3. Wylizanie współczynnika proliferacji

Współczynnik proliferacji obliczono według wzoru:

$$W_p = x_y / x_0 \quad (1)$$

gdzie: W_p – współczynnik proliferacji, x_y – pomiar gęstości komórek testem Cell TiterBlue w trzecim, piątym, siódmym lub dziesiątym dniu hodowli w badanej pożywce, x_0 – pomiar gęstości komórek testem CellTiterBlue przed hodowlą w badanej pożywce.

2.4. Analiza ekspresji genów zaangażowanych w proces miogenezy

Komórki satelitarne (pasaż 8) zostały wysiane na 35 mm szalkach hodowlanych pokrytych cienką warstwą 0,1% żelatyny, w gęstości 70 000 komórek na naczynie, w pożywce DMEM z 20% dodatkiem FBS i zestawem antybiotyków 1x Primocin. Każda badana grupa składała się z trzech powtórzeń. Po 24 h pożywka została zmieniona na MesenPRO RS™ Medium (Thermo Fisher Scientific), StemFlex™ Medium (Thermo Fisher Scientific) lub HSkMC Growth Medium (Cell Applications, Inc.). Po upływie 5 dni komórki zostały zebrane, a RNA wyizolowano kitem PureLink RNA Mini Kit, według protokołu producenta (Thermo Fisher Scientific). Stężenie wyizolowanego RNA zostało zmierzone przy użyciu spektrofotometru NanoDrop2000C (Thermo Fisher Scientific), a integralność RNA została sprawdzona elektroforetycznie na 1,5% żelu agarozowym. Odwrotna transkrypcja została przeprowadzona kitem High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific). Przed przystąpieniem do analizy, we wszystkich testowanych roztworach wyrównano stężenia RNA wodą wolną od RNaz. Metodę qPCR zastosowano celem określenia względnej ekspresji genu zaangażowanego w proces miogenezy – *Pax7* oraz genów z rodziny miogenicznych czynników regulatorowych – MRF (ang. *myogenic regulator factors*) – *Myf5*, *MyoD*, *Myf6* i *MyoG*. Ekspresję normalizowano w odniesieniu do genów *RPL27* i *OAZ1*. Sekwencje primerów zostały zaprojektowane w programie Primer3Web (v. 4.1.0, <https://primer3.ut.ee/>) i wyprodukowane przez firmę Genomed (Polska)(Tabela 1). Analiza ekspresji badanych genów została przeprowadzona z użyciem kitu HS-PCR Mix SYBR, według protokołu producenta (A&A Biotechnology) i QuantStudio 7 Pro System (Thermo Fisher Scientific).

Tabela 1. Sekwencje primerów badanych genów

Gen/Primer	Sekwencja	Długość produktu
<i>Pax7</i> Forward	5' AAGCGGACAAGAAGGAGGAG 3'	114
<i>Pax7</i> Reverse	5' CGGGTTCTGACTCCACATCT 3'	
<i>Myf5</i> Forward	5' TGCTTAGGGAACAGGTGGAA 3'	135
<i>Myf5</i> Reverse	5' AACTGCTGCTCTTTCTGGAC 3'	
<i>MyoD</i> Forward	5' AACACTACAGCGGCGACT 3'	122
<i>MyoD</i> Reverse	5' GTAGTAAAGTGC GGTCGTAGC 3'	
<i>Myf6</i> Forward	5' CCCTTCAGCTACAGACCCAA 3'	118

<i>Myf6</i> Reverse	5' CCTTGGCAGTTATCACGAGC 3'	
<i>MyoG</i> Forward	5' TCCAGTACATAGAGCGCCTG 3'	121
<i>MyoG</i> Reverse	5' CTATGGGAGCTGCATTCACTG 3'	
<i>RPL27</i> Forward	5' ATAATCACCTCATGCCACAA 3'	206
<i>RPL27</i> Reverse	5' CATGACCTTTGCCTCTCGTC 3'	
<i>OAZI</i> Forward	5' TTCGCCAGAGAGAAGGAAGG 3'	143
<i>OAZI</i> Reverse	5' GGACCCAGGTTACTACAGCA 3'	

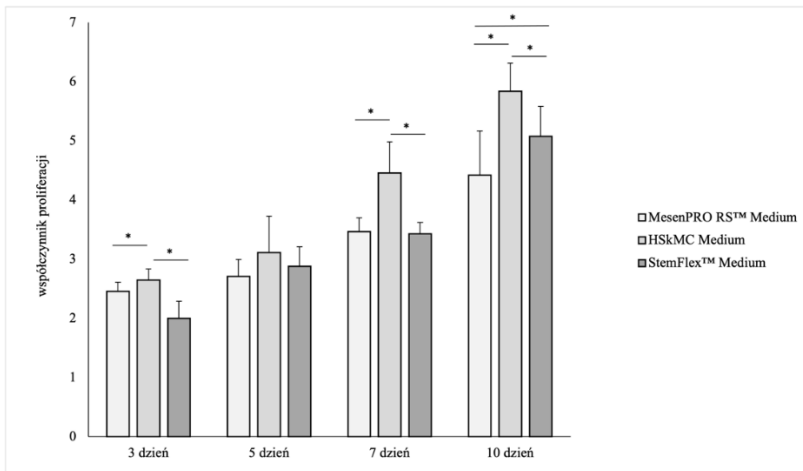
Źródło: opracowanie własne.

2.5. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna uzyskanych wyników została przeprowadzona w programie Statistica (StatSoft, v.13). Rozkład normalny został zbadany testem Shapiro-Wilka. Analizy zostały przeprowadzone w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA).

3. Wyniki

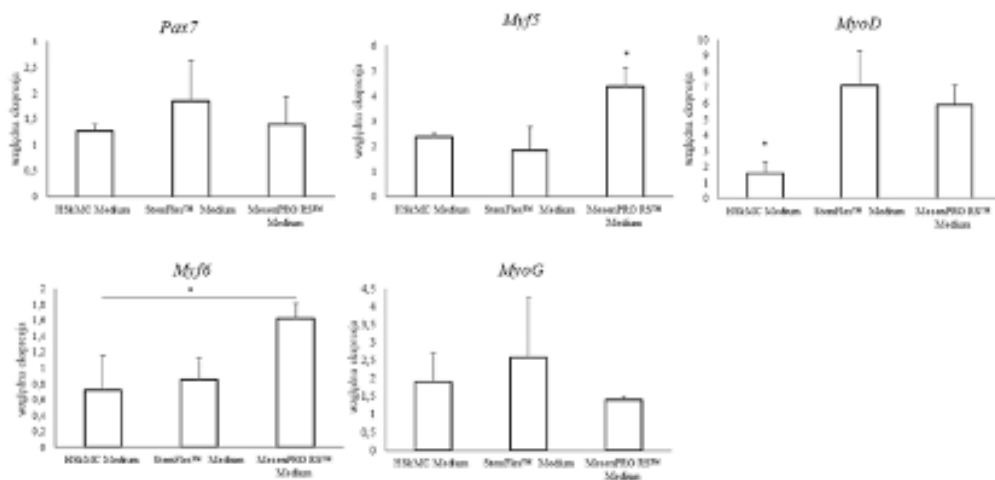
W trzecim, siódmym i dziesiątym dniu eksperymentu istotnie wyższy współczynnik proliferacji komórek satelitarnych wykazywały komórki hodowane w HSkMC Growth Medium ($p < 0,05$). W piątym dniu nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami. W dziesiątym dniu eksperymentu istotnie niższy współczynnik proliferacji obserwowany był w grupie hodowanej w MesenPRO RSTM Medium ($p < 0,05$) (rys. 1).



Rysunek 1. Porównanie tempa proliferacji bydłowych komórek satelitarnych utrzymywanych w mediach MesenPRO RSTM Medium, StemFlexTM Medium lub HSkMC Growth Medium, w trzecim, piątym, siódmym i dziesiątym dniu hodowli; * - wartości średnie różnią się istotnie statystycznie ($p < 0,05$); źródło: opracowanie własne

Analiza ekspresji genów zaangażowanych w proces miogenezy nie wykazała statystycznie istotnych różnic we względnej ekspresji genu *Pax7* pomiędzy komórkami hodowanymi w badanych pożywkach. Istotnie wyższy poziom względnej ekspresji genu *Myf5* zaobserwowano dla komórek inkubowanych w MesenPRO RSTM Medium ($p < 0,05$). Istotnie wyższy poziom względnej ekspresji genu *MyoD* zaobserwowano dla

komórek inkubowanych w StemFlex™ Medium i MesenPRO RS™ Medium ($p < 0,05$). Istotnie wyższy poziom względnej ekspresji genu *Myf6* zaobserwowano dla komórek utrzymywanych w MesenPRO RS™ Medium, w porównaniu do komórek inkubowanych w HSkMC Medium ($p < 0,05$). Nie wykazano statystycznie istotnych różnic we względnej ekspresji genu *MyoG* pomiędzy komórkami hodowanymi w badanych pożywkach (rys. 2).



Rysunek 2. Poziom względnej ekspresji genów zaangażowanych w proces miogenezy bydlęcych komórek satelitarnych hodowanych w pożywkach MesenPRO RS™ Medium, StemFlex™ Medium lub HSkMC Growth Medium; * – wartości średnie różnią się istotnie statystycznie ($p < 0,05$); źródło: opracowanie własne

4. Dyskusja

Kluczowym aspektem wydajnej hodowli komórkowej jest dostarczenie odpowiednich składników pożywki hodowlanej, które są niezbędne do zachowania żywotności komórek i ich proliferacji. Fuzja mioblastów w miotuby zależy od stopnia proliferacji komórek satelitarnych, dlatego zapewnienie odpowiednich warunków wspierających proliferację jest istotnym elementem badania początkowych etapów miogenezy *in vitro*. Celem naszych badań było porównanie wpływu komercyjnie dostępnych pożywek hodowlanych – MesenPRO RS™ Medium, StemFlex™ Medium (Thermo Fisher Scientific) oraz HSkMC Growth Medium (Cell Applications, Inc.) na tempo proliferacji bydlęcych komórek satelitarnych.

Przeprowadzona analiza wykazała, że statystycznie istotnie wyższy współczynnik proliferacji w trzecim, siódmym i dziesiątym dniu hodowli obserwowany był w grupie utrzymywanej w HSkMC Growth Medium przeznaczonym do hodowli ludzkich komórek satelitarnych. Pożywka ta z powodzeniem była stosowana w hodowli ludzkich komórek satelitarnych w badaniach nad wpływem czynnika transkrypcyjnego *RBPJ* na patogenezę mięśniakomięsa prądkowanokomórkowego czy w opracowaniu modeli myszy transgenicznym do badań wpływu leków antysensownych w dystrofii mięśniowej Duchenne'a [12, 13]. Na podstawie otrzymanych wyników, można sugerować, że HSkMC Growth Medium, może z powodzeniem znaleźć zastosowanie również w hodowli bydlęcych komórek satelitarnych.

Na początkowym etapie procesu miogenezy obserwowana jest zwiększona ekspresja genów z rodziny Pax (ang. *Paired box protein*) – głównie genu *Pax7* [5]. Ekspresja *Pax7*

ulega wyciszeniu wraz z postępowaniem aktywacji komórek satelitarnych i odpowiada za utrzymanie ich puli w fazie G₀ cyklu komórkowego. Ekspresja genów *Myf 5* i *MyoD*, która jest obserwowana na początkowym etapie miogenezy, wzrasta pod wpływem genów z rodziny Pax – *Pax7* i *Pax3* [14, 15]. Wraz z postępowaniem proliferacji mioblasty ulegają fuzji w miocyty, a następnie miotuby. Na tym etapie silnie wyrażany jest gen *Myf6*, którego poziom transkrypty zależny jest od genów *Myf5* i *MyoD*, a na końcowym etapie różnicowania ekspresjonowana jest miogenina (*MyoG*) [16].

W przeprowadzonej analizie poziomy względnej ekspresji genów *Myf5* i *MyoD* były istotnie wyższe w grupie utrzymywanej w medium MesenPRO RS™, co mogłoby sugerować, że badana pożywka przeznaczona do hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC, ang. *mesenchymal stem cells*), w hodowli bydlęcych komórek satelitarnych zapewniała wzorzec ekspresji charakterystyczny dla początkowych etapów miogenezy. MSC są multipotencjalnymi komórkami macierzystymi, których głównym źródłem jest szpik kostny i frakcja naczyniowa zrębu tkanki tłuszczowej, a utrzymywanie ich w odpowiednich warunkach *in vitro* pozwala na różnicowanie ich w kierunku różnych linii komórkowych (głównie w kierunku adipocytów, chondrocytów, osteocytów, ale i komórek mięśniowych) [17]. Medium MesenPRO RS™ utrzymuje potencjał mezenchymalnych komórek macierzystych do różnicowania się w komórki pochodzenia mezodermalnego. Na etapie życia zarodkowego mięśnie szkieletowe powstają z mezodermy przyosiowej, dzielącej się na somity: brzuszny – z którego powstaje sklerotom, tworzący następnie kości żeber, kręgosłupa i chrząstkę oraz grzbietowy – z którego powstaje dermomiotom, tworzący następnie skórę oraz mięśnie szkieletowe [18]. Z kolei przeprowadzone badania pozwoliły potwierdzić rolę MSC w regeneracji tkanki mięśniowej oraz w aktywacji różnicowania miogenicznego komórek satelitarnych [19, 20]. Wykazano, że brak obecności MSC przyczyniał się do zmniejszenia zdolności ekspansji mięśniowych komórek satelitarnych, co skutkowało upośledzoną zdolnością regeneracji uszkodzonych włókien mięśniowych [21]. Co ciekawe, Kim i wsp. (2021) w swoich badaniach dowiedli, że komórki satelitarne wraz z pasażowaniem tracą swoje cechy, nabywając właściwości komórek mezenchymalnych – głównie zdolności do wywoływania odpowiedzi przeciwzapalnej przeciwko makrofagom poprzez czynnik wzrostu hepatocytów – HGF (ang. *hepatocyte growth factor*) i prostagładynę – PGE2 [22].

Cechą charakterystyczną zastosowanego Medium MesenPRO RS™ jest zredukowana zawartość surowicy (2%), co przekłada się na zmniejszone tempo proliferacji, jednak pozwala również na utrzymanie komórek w początkowym etapie miogenezy. Zredukowana zawartość surowicy, rekompensowana dodatkiem czynników mitogennych zapewnia większą stabilność warunków hodowli niż suplementowanie surowicą na poziomie 10-20%. Surowica bogata w składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, hormony czy czynniki wzrostu jest ważnym komponentem pożywki w adhezji do podłoża i wzroście komórek adherentnych. Nasze badania pokazały, że na tle innych komponentów takich jak poziom glukozy czy dodatek czynnika mitogennego, surowica ma istotnie wyższy wpływ na tempo proliferacji bydlęcych komórek satelitarnych [23].

Zastosowanie StemFlex™ Medium, przeznaczonego do hodowli pluripotencjalnych komórek macierzystych, nie przyniosło oczekiwanych rezultatów. Komórki satelitarne nie wykazywały zwiększonego tempa proliferacji, a otrzymane wyniki względnej ekspresji genów nie dały jednoznacznej odpowiedzi, co do poziomu różnicowania się komórek satelitarnych.

5. Wnioski

W rutynowej hodowli bydłecych komórek satelitarnych mogą znaleźć zastosowanie HSkMC Growth Medium oraz Medium MesenPRO RS™. Zastosowanie HSkMC Growth Medium zapewnia szybkie tempo proliferacji komórek, z równoczesną niższą ekspresją genów *MyoD* i *Myf6*. Z kolei, zastosowanie Medium MesenPRO RS™ wiąże się z niższym tempem proliferacji oraz wyższą ekspresją genu *Myf5* zaangażowanego w początkowy etap miogenezy.

Podziękowania

Badania finansowane ze środków NCN Miniatura 5 (2021/05/X/NZ9/01365).

Literatura

1. Mauro A., *Satellite cell of skeletal muscle fibers*, The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 9, 1961, s. 493-495.
2. Katz B., *The terminations of the afferent nerve fibre in the muscle spindle of the frog*, Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 243, 1961, s. 221-240.
3. Chal J., Pourquoié O., *Making muscle: Skeletal myogenesis in vivo and in vitro*, In Development (Cambridge), 144, 2017, s. 2104-2122.
4. Chargé S.B.P., Rudnicki M.A., *Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration*, Physiological Reviews, 84, 2004, s. 209-238.
5. Kuang S., Rudnicki M.A., *The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential*, Trends in Molecular Medicine, 15, 2008, s. 82-91.
6. Kuang S., Kuroda K., le Grand F., Rudnicki M.A., *Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle*, Cell, 129, 2017, s. 999-1010.
7. Molina T., Fabre P., Dumont N.A., *Fibro-adipogenic progenitors in skeletal muscle homeostasis, regeneration and diseases*, Open Biology, 11, 2021, 210110.
8. Ravikanth M., Soujanya P., Manjunath K., Saraswathi T.R., Ramachandran C.R., *Heterogeneity of fibroblasts*, Journal of Oral and Maxillofacial Pathology, 15, 2011, s. 247-250.
9. Gillies A.R., Lieber R.L., *Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix*, In Muscle and Nerve, 44, 2011, s. 318-331.
10. Prüller J., Mannhardt I., Eschenhagen T., Zammit P.S., Figeac N., *Satellite cells delivered in their niche efficiently generate functional myotubes in three-dimensional cell culture*, PLoS ONE, 12, 2018, e0202574.
11. Joe A.W.B., Yi L., Natarajan A., le Grand F., So L., Wang J., Rudnicki M.A., Rossi F.M.V., *Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis*, Nature Cell Biology, 12, 2010, s. 153-163.
12. Nagao H., Setoguchi T., Kitamoto S., Ishidou Y., Nagano S., Yokouchi M., Abematsu M., Kawabata N., Maeda S., Yonezawa S., Komiyama S., *RBPJ Is a Novel Target for Rhabdomyosarcoma Therapy*, PLoS one, 7, 2012, e39268.
13. Wu B., Benrashid E., Lu P., Cloer C., Zillmer A., Shaban M., Lu Q., *Targeted skipping of human dystrophin exons in transgenic mouse model systemically for antisense drug development*, PLoS One, 6, 2011, e19906.
14. Kawabe Y.I., Wang Y.X., McKinnell I.W., Bedford M.T., Rudnicki M.A., *Carm1 regulates Pax7 transcriptional activity through MLL1/2 recruitment during asymmetric satellite stem cell divisions*, Cell Stem Cell, 11, 2012, s. 333-345.
15. Hu P., Geles K.G., Paik J.H., DePinho R.A., Tjian R., *Codependent Activators Direct Myoblast-Specific MyoD Transcription*, Developmental Cell, 15, 2008, s. 534-546.

16. Zammit P.S., *Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis*, Seminars in Cell & Developmental Biology, 72, 2017, s. 19-32.
17. Pittenger M.F., Discher D.E., Péault B.M., Phinney D.G., Hare J.M., Caplan A.I., *Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress*, NPJ Regenerative Medicine, 2, 2019, s. 22.
18. Buckingham M., Bajard L., Chang T., Daubas P., Hadchouel J., Meilhac, S., Montarras D., Rocancourt D., Relaix, F., *The formation of skeletal muscle: from somite to limb*, Journal of anatomy, 202, 2003, 59-68.
19. Linard C., Brachet M., L'homme B., *Long-term effectiveness of local BM-MSCs for skeletal muscle regeneration: a proof of concept obtained on a pig model of severe radiation burn*, Stem Cell Research & Therapy, 2018, 299.
20. Wang Y.H., Wang D.R., Guo Y.C., Liu J.Y., Pan J., *The application of bone marrow mesenchymal stem cells and biomaterials in skeletal muscle regeneration*, Regenerative therapy, 15, 2020, s. 285-294.
21. Wosczyzna M.N., Konishi C.T., Perez Carbajal E.E., Wang T.T., Walsh R.A., Gan Q., Wagner M.W., Rando T.A., *Mesenchymal stromal cells are required for regeneration and homeostatic maintenance of skeletal muscle*, Cell Reports, 27, 2019, s. 2029-2035.
22. Kim S., Jung P.Y., Lee J.S., Hwang S., Sohn J.H., Yoon Y., Bae K.S., Eom Y.W. *Cultured human skeletal muscle satellite cells exhibit characteristics of mesenchymal stem cells and play anti-inflammatory roles through prostaglandin E2 and hepatocyte growth factors*, Cell Biology International, 45, 2021, s. 2443-2451.
23. Zygmunt K., Otwinowska-Mindur A., Piórkowska K., Witariski W., *Influence of Media Composition on the Level of Bovine Satellite Cell Proliferation*, Animals. 13, 2023, 1855.

Wpływ wybranych pożywek hodowlanych na proliferację bydlęcych komórek satelitarnych *in vitro*

Streszczenie

Komórki satelitarnie mięśni będące prekursorami mięśni szkieletowych, zaangażowane są w proces miogenezy, gdzie kluczowym etapem jest proliferacja, wspierana przez czynniki o działaniu mitogennym. Celem pracy było porównanie tempa proliferacji komórek utrzymywanych w komercyjnie dostępnych mediach hodowlanych – MesenPRO RS™ Medium, StemFlex™ Medium (Thermo Scientific), HSkMC Growth Medium (Cell Applications). Przeprowadzono pomiar przyrostu liczby proliferujących komórek w trzecim, piątym, siódmym i dziesiątym dniu hodowli, bazując na teście żywotności CellTiterBlue (Promega). Ponadto, określono względną ekspresję genów kluczowych dla procesu miogenezy – *Pax7* i genów z rodziny MRF (*Myogenic Regulator Factor*) metodą qRT-PCR w piątym dniu. Statystycznie wyższy współczynnik proliferacji komórek satelitarnych w trzecim, siódmym i dziesiątym dniu zaobserwowano w grupie utrzymywanej w HSkMC Growth Medium ($p < 0,05$). Analiza ekspresji genów wykazała, że komórki utrzymywane w medium MesenPRO RS™ wykazywały statystycznie wyższy poziom względnej ekspresji genów *Myf5*, *MyoD* i *Myf6* ($p < 0,05$). HSkMC Growth Medium zapewnia szybkie tempo proliferacji komórek, z równoczesną niższą ekspresją genów *MyoD* i *Myf6*. Z kolei, zastosowanie Medium MesenPRO RS™ wiąże się z niższym tempem proliferacji oraz wyższą ekspresją genu *Myf5* zaangażowanego w początkowy etap miogenezy.

Słowa kluczowe: proliferacja, komórki satelitarnie, media hodowlane, miogeneza

Influence of the selected culture media on the proliferation of bovine satellite cells *in vitro*

Abstract

Muscle satellite cells, being the precursors of skeletal muscle, are involved in myogenesis, where the crucial stage is proliferation, supported by mitogenic factors. The aim of the study was to compare the proliferation rate of cells maintained in commercially available cell culture media – MesenPRO RS™ Medium, StemFlex™ Medium (Thermo Scientific), HSkMC Growth Medium (Cell Applications). The increase in the number of proliferating cells was measured on the third, fifth, seventh and tenth day of culture, based on the

CellTiterBlue (Promega) viability assay. In addition, on the fifth day, the relative expression of key genes for the myogenesis process – *Pax7* and genes from the MRF (Myogenic Regulator Factor) family were determined by qRT-PCR. A statistically higher rate of satellite cell proliferation on the third, seventh and tenth day was observed in the group maintained in HSkMC Growth Medium ($p < 0.05$). Gene expression analysis indicated that cells cultured in MesenPRO RS™ medium showed a statistically higher relative expression level of the *Myf5*, *MyoD* and *Myf6* genes ($p < 0.05$). HSkMC Growth Medium provides a higher rate of proliferation, with simultaneous lower expression of *MyoD* and *Myf6* genes. In turn, the use of Medium MesenPRO RS™ is associated with a lower rate of proliferation and higher expression of *Myf5* gene involved in the early stage of myogenesis.

Keywords: proliferation, satellite cells, culture media, myogenesis

Wpływ bakterii cyklu siarkowego oraz materii ilastej na powstawanie żelazowych faz siarczkowych

1. Wprowadzenie

Siarczki są jednymi z najpowszechniej występujących faz mineralnych w warunkach anoksycznych [1]. W zależności od dostępności kationów metali w środowisku, powstają siarczki, np. Fe, Cu, Pb, Zn [2, 3]. W naturalnych środowiskach bogatych w jony żelaza(II) (rzeki, jeziora, osady głębokomorskie) najczęściej stwierdzanym minerałem siarczkowym jest piryt (disiarczek żelaza – FeS₂), którego obecność zaobserwowano już w proterozoicznych skałach osadowych [3]. Geneza tego minerału nie została jednak do końca poznana, szczególnie jeżeli chodzi o jego występowanie w środowiskach sedymentacyjnych. Współczesna wiedza dotycząca możliwych mechanizmów powstawania pirytu i jego prekursorów oparta jest przede wszystkim na wynikach badań laboratoryjnych. Te jednak dostarczają niejednoznacznych informacji z uwagi na trudności prowadzenia eksperymentalnej syntezy. Dotyczą one głównie zachowania warunków stricte beztlenowych, małej ilości powstającego materiału osadowego oraz otrzymania w produktach niewielkich rozmiarów kryształów (co utrudnia identyfikację minerałów). Jedną z hipotez powstawania pirytu, braną pod uwagę przez licznych badaczy jest tzw. szlak polisiarczkowy, który wyjaśnia mechanizm tworzenia pirytu w środowiskach niskotemperaturowych [4-8]. Zgodnie z jego założeniami prekursorami pirytu są początkowo amorficzne monosiarczki żelaza (II), których struktura może ulec uporządkowaniu do zbliżonej mackinawitowi (FeS). W wyniku wieloetapowych przeobrażeń może dochodzić do przekształcenia mackinawitu w magnetyczny greigit (Fe₃S₄), a końcowo w piryt [4]. Warunkiem niezbędnym do zaistnienia takich reakcji jest obecność czynnika utleniającego, np. w postaci polisiarczków bądź siarki zerowalentnej (równania 1-3) [5, 6]. Potwierdzeniem możliwości powstawania pirytu zgodnie z założeniami teorii szlaku polisiarczkowego są piryty z jądrami o charakterze magnetycznym odnajdowane w osadach [5, 7, 8].



We współczesnych środowiskach morskich głównym źródłem jonów S²⁻ do reakcji tworzenia siarczków żelaza są produkty bakteryjnej redukcji siarczanów. Stąd jedną z bardziej dyskutowanych na łamach literatury kwestii jest wpływ mikroorganizmów na proces powstawania minerałów siarczkowych.

¹ k.tetfejer@student.uw.edu.pl, Studenckie Koło Naukowe „Ametyst” G.E.M., Wydział Geologii, Uniwersytet Warszawski, www.geo.uw.edu.pl.

² a.rozek@uw.edu.pl, Katedra Geochemii, Mineralogii i Petrologii, Wydział Geologii, Uniwersytet Warszawski.

³ a.czarnecka6@uw.edu.pl, Katedra Geologii Złożowej i Gospodarczej, Wydział Geologii, Uniwersytet Warszawski.

Z punktu widzenia biogenezy siarczkowych faz mineralnych, najważniejszym procesem przeprowadzanym przez grupę mikroorganizmów sulfidogennych jest proces oddychania siarczanowego. Przebieg tego procesu można opisać równaniem 4 [9]:



Mikroorganizmy redukujące siarczany (MRS) jako skutek uboczny metabolizmu dostarczają do środowiska jony S^{2-} , które następnie mogą reagować z kationami metali M^{2+} tworząc trudno rozpuszczalne sole. Struktura takiego precypitatu może ulec w czasie uporządkowaniu, co prowadzi do tworzenia minerałów. Doniesienia literaturowe potwierdzają udział reduktorów siarczanów w powstawaniu siarczków, takich pierwiastków jak m.in. żelazo [9, 10], miedź [11, 12], cynk [13] oraz Sb, Bi, Co, Cd, Pb, Ni [14].

Poza bezpośrednimi produktami reakcji dysymilacyjnej redukcji siarczanów, istotnym wydaje się także uwolnienie do środowiska innych metabolitów bakteryjnych, np. związków egzopolimerycznych (EPS, ang. *extracellular polymeric substances*). Tworzą one swoisty matriks, który w połączeniu z komórkami bakteryjnymi przypomina strukturę biofilmu. Struktura ta może mieć postać plastra miodu, w którego „oczkach” tworzą się mikronisze stanowiące matryce do zarodkowania minerałów. Biomasa bakteryjna także może stanowić donor miejsc zarodkowania siarczków metali. Ma to związek z budową komórki bakteryjnej. Na jej zewnętrznej powierzchni znajdują się grupy funkcyjne o ładunku ujemnym, np. COOH^- , OH^- , które mogą stanowić miejsca wiązania dodatnio naładowanych jonów. Jony Fe^{2+} związane na powierzchni komórki bakteryjnej mogą w wyniku reakcji z siarkowodorem, powstającym jako produkt metaboliczny MRS, tworzyć odpowiednie siarczki metali.

Niektóre doniesienia literaturowe wskazują jednak, że obecność mikroorganizmów w środowisku może wpływać hamująco na możliwość krystalizacji siarczkowych faz mineralnych [15-18]. Adsorpcja polimerów pochodzenia organicznego może osłabiać zdolność agregacji klastrow żelazowo-siarczkowych (składających się z koloidalnych nanocząstek FeS i amorficznego FeS), odgrywających istotną rolę w procesie krystalizacji pirytu. W konsekwencji wiąże się to z obniżeniem trwałości i reaktywności powstających faz.

Analiza danych literaturowych dotycząca wpływu mikroorganizmów na powstawanie siarczków żelaza wyłania dwie najbardziej prawdopodobne hipotezy:

- fazy siarczkowe powstają na drodze chemiczno-fizycznych procesów, a udział mikroorganizmów polega jedynie na dostarczeniu jonów siarczkowych do reakcji nukleacji faz mineralnych [3, 19];
- mikroorganizmy mogą wpływać na kinetykę powstawania, zdolność agregacji i rozmiar powstających faz mineralnych. Obecność czynnika biotycznego nie tylko sprzyja sorbowaniu kationów metali niezbędnych do reakcji ale również bezpośrednio modyfikuje środowisko fizyczno-chemiczne i stwarza miejsca nukleacji kryształów [5, 6, 20].

Z uwagi na przesłanki o biogenezie żelazowych faz siarczkowych coraz częściej w badaniach eksperymentalnych dotyczących syntezy tych faz uwzględnia się także udział mikroorganizmów w tym procesie.

Kolejnym czynnikiem mogącym mieć wpływ na powstawanie żelazowych faz siarczkowych przy udziale mikroorganizmów jest rodzaj dennego osadu mineralnego, który może stanowić matrycę krystalizacyjną dla wymienionych siarczków. Należy jednak

zauważyć, że w środowisku naturalnym mineralne osady dennie mogą stanowić dodatkowe źródło jonów żelaza. Jednym z powszechnie występujących minerałów w osadach środowisk jeziornych jest illit ($K_{0,65}Al_{0,2}(Al_{0,65}Si_{3,35}O_{10})(OH)_2$) [21], który wraz z minerałami z grupy montmorillonitu-smektytu, glaukonitem i szamozytem tworzy w takich środowiskach osady ilaste o zielonym zabarwieniu. Barwa osadów wynika z podstawień/obecności jonów żelaza w strukturze minerałów. W strukturze illitu jony żelaza (III) mogą być zredukowane do jonów żelaza (II) wówczas gdy osad jest wilgotny, co w konsekwencji zwiększa ładunek warstw i może skutkować wiązaniem pierwiastków w przestrzeniach międzywarstwowych [21]. Aby kontrolować ilość jonów żelazowych w prowadzonych badaniach eksperymentalnych zdecydowano o zastosowaniu matrycy krystalizacyjnej pozabawionej potencjalnego źródła żelaza, jaką może stanowić kaolinit ($Al_2(Si_2O_5)(OH)_4$). Minerale ten należy do grupy minerałów ilastych o budowie pakietowej typu 1:1, gdzie warstwa tetraedryczna połączona jest z warstwą oktaedryczną wspólnymi jonami O^{2-} [22]. W związku z tym charakteryzuje się on niewielką ilością podstawień oraz zerowym bądź niewielkim ładunkiem ujemnym (występującym w miejscach nieciągłości) [23]. Obecność nielicznych podstawień i nieciągłości może sprzyjać wiązaniu kationów Fe^{2+} w strukturze minerału (na powierzchni płytek oraz w przestrzeniach międzypakietowych) i dzięki temu stwarzać miejsca nukleacji siarczków.

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu aktywności sulfidogennych zespołów mikroorganizmów oraz obecności matrycy krystalizacyjnej na proces powstawania siarczkowych faz mineralnych.

3. Algorytm badań

W eksperymencie wykorzystano warianty biotyczne i abiotyczne. W przypadku wariantów z obecnym czynnikiem biotycznym wykorzystano zespoły mikroorganizmów z grupy reduktorów siarczanów, wchodzące w skład kolekcji hodowlanej mikroorganizmów prowadzonej przez Laboratorium Geomikrobiologii i Geochemii Środowiska na Wydziale Geologii UW. Wszystkie hodowle utrzymywano w zmodyfikowanej pożywce Baar'a o składzie: 0,48 g Na_2SO_4 (3,38 mM), $NaC_3H_5O_3$ (1,22 cm^3/dm^3), $FeCl_2$ (1,16 g/dm^3), NH_4Cl (1,0 g/dm^3), KH_2PO_4 (0,14 g/dm^3). Pożywkę odtleniono gazowym N_2 , wyjałowiono w autoklawie i uzupełniono sterylizowanym przez filtr roztworem $FeCl_2$ (1,79 mM). Stosunek molowy Fe : S w tej pożywce wynosił 1 : 2. Rozpuszczone żelazo żelazowe dodawano z 1 M beztlenowego roztworu $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ przygotowanego według algorytmu zaproponowanego przez Picarda i in., 2018 [24]. pH doprowadzono do 7,2 za pomocą NaOH. Eksperymenty z biomineralizacją zaszczerpiono konsorcjum bakteryjnym redukującym siarczany, stosunek inokulum do pożywki wynosił 1:10 (w obliczeniach nie uwzględniono stężenia jonów siarczanowych z transferu inokulum). Kontrole abiotyczne bez inokulum bakterii przygotowano na pożywce Baar'a z dodatkiem roztworu $FeCl_2$, jednak zamiast Na_2SO_4 źródło siarki zamieniono na Na_2S . Siarczek sodu dodawano w ilości odpowiadającej stężeniu jonów siarczkowych po redukcji całkowitej ilości siarczanów w wariancie biotycznym. Fiolki hodowlane o pojemności 100 ml zamknięto korkami z gumy butylowej i inkubowano w komorze rękawicowej (Techni-Dome®, Bel-Art SP Scienceware) w atmosferze argonu, w ciemności, w temperaturze 25°C bez

mieszania. Każdy z czterech wariantów eksperymentu wykonany był w pięciu powtórzeniach terminowanych równocześnie przez okres 2 miesiące.

Dodatkową zmienną eksperymentalną była obecność lub brak matrycy krystalizacyjnej w postaci kaolinu (0,5 g/100 ml) – skały w około 98% zbudowanej z kaolinitu z domieszką illitu i kwarcu. Tabela 1 przedstawia zestawienie wariantów eksperymentu.

Tabela 1. Zestawienie wariantów eksperymentalnych

Rodzaj czynnika	Dodatek matrycy mineralnej	
Czynnik biotyczny	+	-
Czynnik abiotyczny	+	-

Źródło: opracowanie własne.

Po upływie 2 miesięcy osady pohodowlane odwirowywano (1700 rpm) a uzyskany osad suszono w atmosferze argonu w temperaturze 30°C i przechowywano w warunkach próżniowych.

4. Metody analityczne

4.1. Dyfrakcja rentgenowska (XRD)

Identyfikacja uzyskanych eksperymentalnie faz mineralnych powstałych w wyniku badania została wykonana metodą dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) w Pracowni Rentgenowskiej, Laboratorium Mikroskopii Elektronowej, Mikroanalizy i Dyfrakcji Rentgenowskiej (LMEMiDR) na Wydziale Geologii Uniwersytetu Warszawskiego z wykorzystaniem dyfraktometru X-Pert Pro MPD. Próbkę proszkową rejestrowano w układzie Bragg-Brentano. Rejestrację wykonywano z użyciem promieniowania $\text{CoK}\alpha$ ($\text{K}\alpha_2$ 1.79290Å) z użyciem filtra Fe. Parametry prądowe pomiaru wynosiły odpowiednio: natężenie prądu 30 mA, napięcie pobudzające 40V. Do detekcji promieniowania zastosowano szybki detektor PIXcel3D. Całkowity czas pomiaru jednej próbki wynosił 4 godz. Interpretacja otrzymanych dyfraktogramów została wykonana w programie Profex 5.0.2. z wykorzystaniem danych dostępnych w bazie COD (Crystallography Open Database).

4.2. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM-EDS)

Morfologię otrzymanych eksperymentalnie faz mineralnych określono przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM), natomiast skład chemiczny z użyciem techniki spektroskopii przy pomocy sprzężonego z SEM detektora EDS w Środowiskowym Laboratorium Niskotemperaturowej Skaningowej Mikroskopii Elektronowej Cryo-SEM, na Wydziale Geologii Uniwersytetu Warszawskiego. Wykorzystano skaningowy mikroskop elektronowy sprzężony ze skupioną wiązką jonową (FIB) ZEISS Auriga 60 oraz skaningowy mikroskop elektronowy ZEISS Sigma VP. Obserwacje próbek prowadzono w warunkach niskiej próżni. Parametry prądowe obserwacji wynosiły: natężenie prądu 4 pA, napięcie pobudzające 8-20 kV. W celu otrzymania maksymalnej rozdzielczości obrazowania obserwacje prowadzono z wykorzystaniem detektorów elektronów wstecznie rozproszonych (BSE) i elektronów odbitych (SE). Czas obserwacji i analizy próbki wynosił 1 godz.

5. Wyniki

5.1. Analiza dyfrakcyjna prób eksperymentalnych

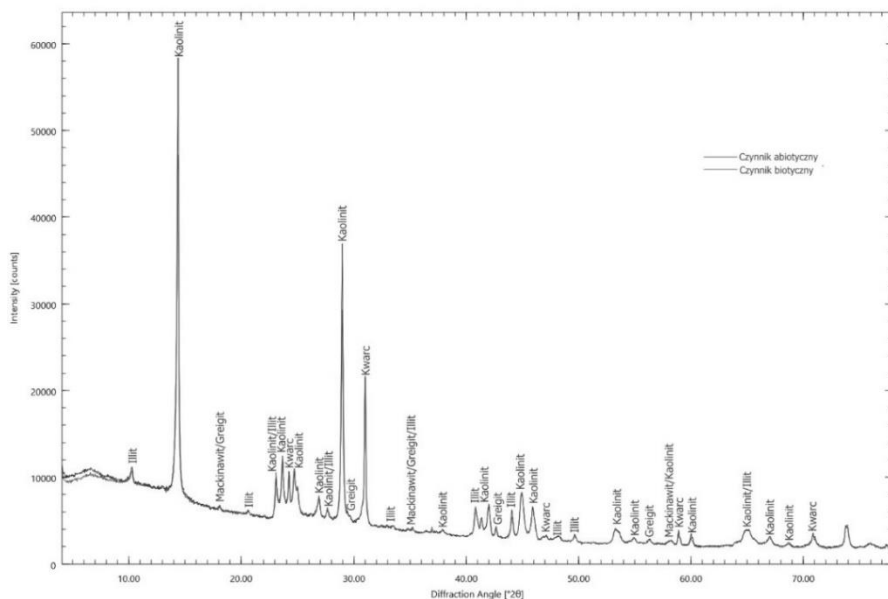
W celu określenia składu mineralnego osadów pochodzących, po okresie 2 miesięcy, poddano je analizie dyfrakcyjnej.

Dane rentgenograficzne prób bez dodatku materii ilastej wskazują, że w przypadku obu wariantów biotycznych i abiotycznych nieobecne były siarczkowe fazy mineralne. Prawdopodobnie w osadach znajdował się jedynie amorficzny monosiarczek, którego brak uporządkowanej struktury wewnętrznej jest powodem braku widocznych na dyfraktogramach refleksów (FeS uwidocznił się zaś w obrazowaniu SEM).

Wyniki proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej osadów biotycznych i abiotycznych pochodzących z wariantów z dodatkiem matrycy krystalizacyjnej przedstawia rysunek 1. Porównane dyfraktogramów tych osadów z danymi z bazy COD wskazuje najprawdopodobniej na obecność w obu wariantach mackinawitu i greigitu, bądź fazy przejściowej pomiędzy tymi dwoma minerałami. Najbardziej charakterystyczny refleks identyfikujący w pełni krystaliczny mackinawit ($d_{001} = 5.033 \text{ \AA}$) opisany przez Lennie'go i in. (1995) jest zlokalizowany w okolicy $20\text{--}21^\circ 2\theta$ [25]. Trudność w identyfikacji mackinawitu w badanych próbkach wynika z zastosowania matrycy mineralnej zawierającej domieszki illitu, którego refleks d_{001} nakłada się na położenie d_{001} mackinawitu. Obecność greigitu w badanych próbkach potwierdziła obecność refleksów odpowiadających opisanym przez Skinnera i in. (1994) pochodzącym od dyfrakcji na kryształach Fe_3S_4 ($18^\circ 2\theta$, $d_{111} = 5.702 \text{ \AA}$) [26]. Badania Jeonga i in. (2008) nad strukturą mackinawitu powstającego w warunkach abiotycznych wskazują na możliwe zwiększenie parametrów komórki elementarnej, gdzie $d_{001} = 5.196 \text{ \AA}$ [27]. Wolthers i in. (2003) podają, że d_{001} szybko powstającego mackinawitu może wynosić nawet 6.60 \AA [28]. Takie zróżnicowanie odstępów płaszczyzn sieciowych w mackinawicie może być spowodowane uwięzieniem cząsteczek wody w strukturze mineralnej w wyniku szybkiego tempa krystalizacji, które sprzyja powstawaniu struktur krystalicznych o niższym stopniu uporządkowania. Zatem możliwe jest zaobserwowanie koincydencji refleksów mackinawitu i illitu, szczególnie w próbkach osadów powstających stosunkowo szybko. Dane literaturowe wskazują, że uporządkowanie struktury od amorficznego monosiarczku do pełni krystalicznego mackinawitu może trwać około 2 lata [3].

Prowadzone badania pokazują również, że w przypadku dodatku matrycy mineralnej nie widać istotnych różnic w składzie mineralnym osadów poeksperymentalnych dla próby biotycznej i abiotycznej. Widoczna jest natomiast niewielka różnica w krystaliczności minerałów ilastych tworzących matrycę. W przypadku obecności czynnika biotycznego obserwowane są refleksy o niższej intensywności, co może sugerować, że obecne mikroorganizmy oddziaływały na matrycę krystaliczną zbudowaną z minerałów ilastych.

Pomimo ostrożności w zachowaniu warunków redukcyjnych podczas prowadzenia i terminowania eksperymentu niektóre próby uległy utlenieniu. Świadczy o tym obecność tlenków i wodorotlenków żelaza w wybranych wariantach, w tym hematytu i goethytu, w których żelazo występuje w formie utlenionej na +3 stopniu utlenienia.



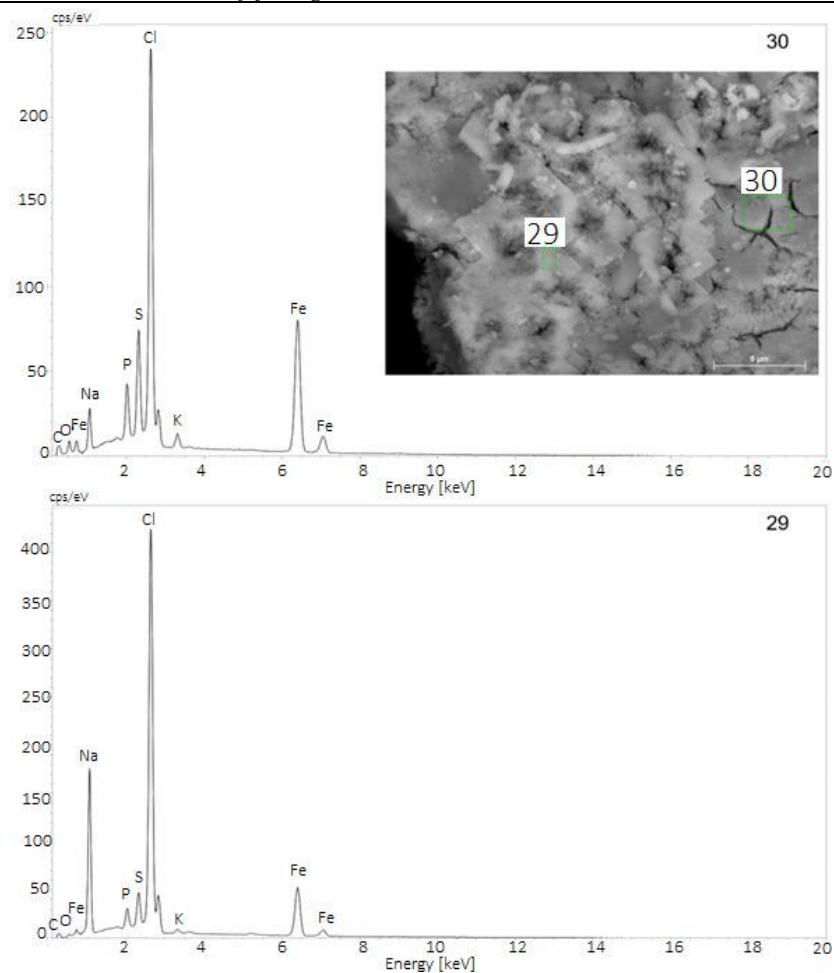
Rysunek 1. Zestawienie dyfraktogramów analizowanych próbek zawierających dodatek matrycy mineralnej [opracowanie własne]

5.2. Analiza chemiczna (SEM-EDS) i obserwacje mikroskopowe (SEM)

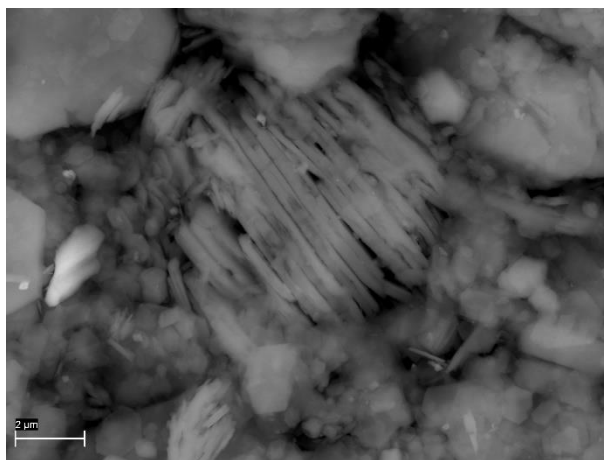
Wyniki jakościowych analiz chemicznych SEM-EDS niejednoznacznie potwierdziły obecność siarczkowych faz mineralnych w próbkach biotycznych i abiotycznych z dodatkiem matrycy mineralnej. Może to być spowodowane zbyt dużym obszarem zbierania informacji przez wiązkę padającą na preparat, stąd otrzymujemy informację zbieraną nie tylko z wytypowanego obszaru, ale także od faz towarzyszących m.in. minerałów ilastych. Na podstawie obserwacji mikroskopowych próbek biotycznych i abiotycznych z dodatkiem materiałów ilastych stwierdzono obecność faz przypominających morfologicznie mackinawit, który tworzy blaszkowe i płytkowe kryształy, posiadające rozmiary dochodzące do kilkudziesięciu nanometrów.

Przeprowadzone analizy chemiczne SEM-EDS potwierdziły również, że w przypadku wariantu abiotycznego przy braku dodatkowej zmiennej otrzymano jedynie sole, m.in. chlorek żelaza i halit, które powstały jako wynik krystalizacji z medium hodowlanego (rys. 2). W przypadku analiz i obserwacji SEM próbek z obecnymi mikroorganizmami zaobserwowano jedynie pojedyncze blaszki/płytki, co sugeruje, że w tych próbach doszło do powstania bardzo słabo krystalicznego mackinawitu, który z uwagi na stopień krystaliczności struktury nie został zidentyfikowany metodą XRD.

Obserwacje samych pakietów minerałów ilastych dostarczyły również niezwykle ciekawych wyników. Rysunek 3 przedstawia pakiet minerałów ilastych pochodzący z próby biotycznej. Poszczególne pakiety są porozsuwane, a w przestrzeniach między nimi znajdują się mikrokryształy, które najprawdopodobniej zarodkowały *in situ*. Spostrzeżenie to znajduje potwierdzenie na dyfraktogramach osadów biotycznych, gdzie widoczne jest nieznaczne przesunięcie refleksów kaolinowych mogące świadczyć o zmianach w ułożeniu atomów. Obserwacje osadów z prób abiotycznych nie potwierdziły podobnych zmian.



Rysunek 2. Analizy SEM-EDS wariantów abiotycznych [opracowanie własne]



Rysunek 3. Błazki minerałów ilarystych z widocznymi rozsuniętymi pakietami [opracowanie własne]

6. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań wyłaniają się następujące wnioski:

- Obecność mikroorganizmów doprowadziła najprawdopodobniej do pojawienia się faz o strukturze mackinawitu (prekursora innych faz siarczkowych) w czasie poniżej 2 miesięcy w wariantach bez dodatku matrycy mineralnej. Można zatem wnioskować, że z jednej strony materia organiczna może przyspieszać pojawianie się prekursora piryty, z drugiej jednak hamować dalszą konwersję mackinawitu;
- W próbach abiotycznych bez dodatku matrycy ilastej nie odnotowano obecności siarczkowych faz mineralnych. Jedynie w wariantach z dodatkiem kaolinu prawdopodobnie udało się otrzymać fazę przejściową pomiędzy mackinawitem a greigitem;
- Dodatek matrycy mineralnej, z uwagi na budowę pakietową, powierzchnię właściwą oraz ładunek, prawdopodobnie przyspieszył powstawanie faz siarczkowych. Należałoby jednak wprowadzić pewne modyfikacje w doborze matrycy mineralnej. Zastosowanie kaolinitu było zasadne z uwagi na strukturę tego minerału oraz jego powszechne występowanie. Jednak w tym przypadku zastosowana matryca domieszowana była niewielkimi ilościami innych minerałów, w tym illitu, który powodował występowanie na dyfraktogramach refleksów pokrywających się z tymi pochodzącymi od faz siarczkowych. Obecność illitu wpłynęła także na pojawienie się dodatkowych, silnych refleksów, które znacznie skomplikowały interpretację otrzymanych danych;
- Obserwacje otrzymanych siarczków w próbach biotycznych i abiotycznych ze zmienną w postaci materiału ilastego nie wykazały istotnych różnic morfologicznych. Dzięki obrazowaniu SEM zaobserwowano, że możliwa jest krystalizacja siarczkowych faz mineralnych w przestrzeniach międzypakietowych kaolinitu.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały pozytywny wpływ aktywności mikrobiologicznej oraz dodatku matrycy mineralnej na powstawanie faz mineralnych w postaci metastabilnych siarczków żelaza – mackinawitu, stanowiącego prekursor w szlaku przemian fazowych w inne utlenione siarczkowe minerały żelaza. Wyniki wskazują, że dodatek matrycy mineralnej promuje powstawanie faz siarczkowych również w przypadku kontroli abiotycznych w czasie poniżej 2 miesięcy. Dzieje się tak prawdopodobnie z uwagi na wytworzenie korzystnych warunków sprzyjających nukleacji faz siarczkowych w przestrzeniach między pakietami ilastymi.

Podziękowania

Badania zostały w części sfinansowane ze środków Rady Konsultacyjnej do spraw Studenckiego Ruchu Naukowego Uniwersytetu Warszawskiego.

Literatura

1. Schieber J., *Iron Sulfide Formation*, [w:] Reitner J., Thiel V. (red.), *Encyclopedia of Geobiology. Encyclopedia of Earth Sciences Series*, Springer, Dordrecht 2011, s. 486-502.
2. Polański A., *Podstawy Geochemii*, Wydawnictwo Geologiczne, Warszawa 1988, s. 163-475.
3. Rickard D., Mussmann M., Steadman J.A., *Sedimentary Sulfides*, *Elements*, 13(2), 2017, s. 117-122.
4. Hunger S., Benning L.G., *Greigite: A True Intermediate on the Polysulfide Pathway to Pyrite*, *Geochemical Transactions*, 8, 2007, s. 1-20.

5. Thiel J., Byrne J.M., Kappler A., Schink B., Pester M., *Pyrite Formation from FeS and H₂S Is Mediated through Microbial Redox Activity*, PNAS, 116(14), 2019, s. 6897-6902.
6. Duverger A., Berg J.S., Busigny V., Guyot F., Bernard S., Miot J., *Mechanisms of Pyrite Formation Promoted by Sulfate-Reducing Bacteria in Pure Culture*, Frontiers in Earth Science, 8, 2020, s. 1-15.
7. Wilkin R., Barnes H., *Pyrite Formation by Reaction of Iron Monosulfides with Dissolved Inorganic and Organic Sulfur Species*, Geochimica et Cosmochimica Acta, 60(21), 1996, s. 4167-4179.
8. Lan Y., Bulter E.C., *Monitoring the Transformation of Mackinawite to Greigite and Pyrite on Polymer Supports*, Applied Geochemistry, 50, 2014, s. 1-6.
9. Goldhaber M.B., *Sediments, Diagenesis, and Sedimentary Rocks: Sulfur-Rich Sediments*, Treatise on Geochemistry, 7(2), 2005, s. 257-288.
10. Johnston D.T., Farquhar J., Wing B.A., Kaufman A.J., Canfield D.E., Habicht K.S., *Multiple Sulphur Isotope Fractionations in Biological Systems: A Case Study with Sulphate Reducers and Sulphur Disproportionators*, American Journal of Science, 305, 2005, s. 645-660.
11. Gramp J.P., Sasaki K., Bigham J.M., Karnachuk O.V., Tuovien O.H., *Formation of Covellite (CuS) under Biological Sulfate-Reducing Conditions*, Geomicrobiology Journal, 23(8), 2006, s. 613-619.
12. Sahinkaya E., Gungor M., Bayrakdar A., Yucesoy Z., Uyanik S., *Separate Recovery of Copper and Zinc from Acid Mine Drainage Using Biogenic Sulfide*, Journal of Hazard Materials, 171(1-3), 2009, s. 901-906.
13. Labrenz M., Druschel G.K., Thomsen-Ebert T., Gilbert B., Welch S.A., Kemner K.M., Logan G.A., Summons R.E., De Stasio G., Bond P.L., Lai B., Kelly S.D., Banfield J.F., *Formation of Sphalerite (ZnS) Deposits in Natural Biofilms of Sulfate-Reducing Bacteria*, Science, 290(5497), 2000, s. 1744-1747.
14. Miller L.P., *Formation of Metal Sulfides through the Activities of Sulfate Reducing Bacteria*, Boyce Thompson Institute, 16, 1950, s. 85-89.
15. Wilkin R., Barnes H., *Formation Processes of Framboidal Pyrite*, Geochimica et Cosmochimica Acta, 61(2), 1997, s. 323-339.
16. Rickard D., Butler L.B., Oldroyd A., *A Novel Iron Sulphide Mineral Switch and Its Implications for Earth and Planetary Science*, Earth and Planetary Science Letters, 189, 2001, s. 85-91.
17. Rickard D., Luther G.W., *Aqueous Metal Clusters in Marine Sediments: Implications for Transport, Mineral Formation and Ecology*, Goldschmit Conference Abstracts, 2003, s. 398.
18. Rickard D., Luther G.W., *Chemistry of Iron Sulfides*, Chemical Reviews, 107, 2007, s. 514-562.
19. Gramp J.P., Bigham J.M., Jones F.S., Tuovien O.H., *Formation of Fe-Sulfides in Cultures of Sulfate-Reducing Bacteria*, Journal of Hazardous Materials, 175, 2010, s. 1062-1067.
20. Berg J.S., Duverger A., Cordier L., Laberty-Robert C., Guyot F., Miot J., *Rapid pyritization in the presence of a sulfur/sulfate-reducing bacterial consortium*, Nature, 10, 2020, s. 1-13.
21. Huggett J.M., *Minerals / Glauconites*, [w:] Alderton D., Elias S.A. (red.), *Encyclopedia of Geology*, Elsevier, London 2005, s. 542-548.
22. Pauling L., *The Structure of the Chlorites*, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 16, 1930, s. 578-582.
23. Schulze D.G., *Clay Minerals*, [w:] Hillel D. (red.), *Encyclopedia of Soils in the Environment*, New York 2005, s. 246-254.

24. Picard A., Gartman A., Clarke D.R., Girgius P.R., *Sulfate-reducing bacteria influence the nucleation and growth of mackinawite and greigite*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 220, 2018, s. 367-384.
25. Lennie A.R., Redfern S.A.T., Schofield P.F., Vaughan D.J., *Synthesis and Rietveld Crystal Structure Refinement of Mackinawite, Tetragonal FeS*, *Mineralogical Magazine*, 59, 1995, s. 677-683.
26. Skinner B.J., Erd R.C., Grimaldi F.S., *Greigite, the Thio-Spinel of Iron; a New Mineral*, *American Mineralogist*, 49, 1994, s. 543-555.
27. Jeong H.Y., Lee J.H., Hayes K.F., *Characterization of Synthetic Nanocrystalline Mackinawite: Crystal Structure, Particle Size, and Specific Surface Area*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(2), 2008, s. 493-505.
28. Wolthers M., Van Der Gaast S.J., Rickard D., *The Structure of Disordered Mackinawite*, *American Mineralogist*, 88, 2003, s. 2007-2015.

Wpływ bakterii cyklu siarkowego oraz materii ilastej na powstawanie żelazowych faz siarczkowych

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu aktywności sulfidogennych zespołów mikroorganizmów oraz materii ilastej na powstawanie żelazowych faz siarczkowych w warunkach laboratoryjnych biotycznych i abiotycznych. Materiał biologiczny stanowiły mikroorganizmy z grupy reduktorów siarczanów. We wszystkich wariantach zastosowano zmodyfikowaną pożywkę Baar'a z dodatkiem FeCl_2 jako źródła żelaza oraz Na_2SO_4 stanowiącego źródło siarki dla reduktorów siarczanów lub Na_2S w wariantach abiotycznych. W celu rozpoznania faz mineralnych otrzymanych jako produkty eksperymentu osady pochodzące poddano analizie rentgenowskiej XRD i obrazowaniu SEM. Wyniki analiz rentgenograficznych oraz analiz chemicznych (SEM-EDS) wykazały obecność mackinawitu oraz greigitu (bądź fazy przejściowej) w próbkach biotycznych i abiotycznych w wariantach z dodatkiem materiału ilastego. Nie stwierdzono obecności siarczków w próbach nie zawierających dodatku materiału ilastego w warunkach abiotycznych. W wariantach biotycznych wykazano obecność drobnokrystalicznego mackinawitu. Na podstawie badań określono, że materiał ilasty może stwarzać matrycę sprzyjającą krystalizacji siarczków oraz sprzyjać ich szybszej nukleacji.

Słowa kluczowe: Siarczkowe minerały żelaza, bakterie redukujące siarczany, minerały ilaste

Influence of sulfur cycle bacteria and clay matter on the formation of iron sulfide phases

Abstract

The purpose of this study was to determine the influence of the activity of sulfideogenic groups of microorganisms and clay matter on the formation of iron sulfide phases in biotic and abiotic laboratory conditions. The biological material consisted of microorganisms from the group of sulphate reducers. All variants use modified Baar's culture medium with the addition of FeCl_2 as a source of iron and Na_2SO_4 as a source of sulfur for sulphate reducers or Na_2S in abiotic variants. In order to identify the mineral phases obtained as products of the experiment, the post-culture sediments were subjected to XRD analysis and SEM imaging. The results of X-ray analyses and chemical analyses (SEM-EDS) showed the presence of mackinawite and greigit (or transition phase) in biotic and abiotic samples in variants with the addition of clay material. No sulphides were found in samples without added clay material under abiotic conditions. The biotic variant showed the presence of weakly crystalline mackinawite. Based on the study, it was determined that the clay material can create a template conducive to the crystallization of sulfides and promote their faster nucleation.

Keywords: Sulfide iron minerals, sulfate-reducing bacteria, clay minerals

Wydajność produkcji biocelulozy przez *Acetobacter xylinus* w hodowlach na bazie buforu cytrynianowo-fosforanowego

1. Wprowadzenie

Acetobacter xylinus to bakteria Gram-ujemna znana ze swoich zdolności do wytwarzania zewnątrzkomórkowej polisacharydowej macierzy pod postacią homopolimeru celulozy. Celuloza bakteryjna (ang. *Bacterial Cellulose*, BC) zwana też celulozą mikrobiologiczną jest istotnym czynnikiem badawczym w czasach narastających problemów natury ekologicznej. Już od kilku dekad środowisko naukowe jest zainteresowane zjawiskiem produkcji celulozy przez bakterie, polimeru charakterystycznego, jak się okazuje nie tylko dla roślin. Świadczy o tym chociażby liczba publikacji związana z BC w światowej bazie PubMed na przestrzeni kilkudziesięciu lat. W okresie od 1960 do 2023 roku na frazę „bakteryjna celuloza” (ang. *bacterial cellulose*) zarejestrowano blisko 11 tys. opracowań naukowych z najwyższym pikiem publikacyjności w latach 2021-2022 (1 856 artykułów). Duża część publikacji stanowi naukowe opracowania w technologicznym pozyskiwaniu biocelulozy w hodowlach bakteryjnych i jej modyfikacji na potrzeby aplikacyjności w różnych dziedzinach życia [1-3]. Powodem, dla którego zainteresowanie BC rośnie z roku na rok to jej unikatowe właściwości fizykochemiczne i biologiczne, a przede wszystkim zalety w cechach reologicznych umożliwiające wykorzystanie nanocelulozy w różnych sektorach gospodarki, m.in. w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym, medycznym, spożywczym, chemicznym, a nawet w bioinżynierii tkankowej [1, 3]. Bioceluloza impregnowana różnymi czynnikami przeciwdrobnoustrojowymi, konserwantami lub biocydami może być użyta m.in. jako nowy, bezpieczny i biodegradowalny materiał opakowaniowy do żywności lub opatrunkowy, a nawet jako nośnik związków terapeutycznych w leczeniu różnych schorzeń u ludzi i zwierząt [4].

Bioceluloza określana jest też „biomateriałem przyszłości”, gdyż jest naturalnym, przyjaznym środowisku biopolimerem produkowanym przez niektóre bakterie octanowe zwane też bakteriami kwasu octowego, AAB (ang. *Acetic Acid Bacteria*). Wśród nich najlepiej poznaną i przebadaną bakterią jest *A. xylinus*. Była ona wielokrotnie opisywana jako główny producent nanofibryl celulozy bakteryjnej [5]. Od 2013 roku *A. xylinus* widnieje pod nazwą *Komagataeibacter xylinus* [6], choć w licznych źródłach literatury obie formy są stosowane zamiennie. Wcześniejsze jej nazwy taksonomiczne to: *Bacterium xylinum* [7], *Bacillus xylinus*, *Acetobacter xylinum*, *Gluconacetobacter xylinus*, *Gluconobacter xylinum* [8], jednak część z nich uznano za niepoprawne w pisowni. Ostatecznie *A. xylinus* został przeniesiony z rodzaju *Acetobacter* do rodzaju *Komagataeibacter* i figuruje pod nazwą gatunkową *K. xylinus* [9]. Obecnie przyjęta taksonomia zakłada

¹ katarzyna.guz-regner@uwr.edu.pl, Zakład Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, www. biologia.uni.wroc.pl.

² 316273@uwr.edu.pl, studentka, Mikrobiologii II stopnia studiów, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, www. biologia.uni.wroc.pl.

przynależność *K. xylinus* (*A. xylinus*) do typu *Pseudomonadota*, klasy *Alfaproteobacteria*, rzędu *Rhodospirillales*, rodziny *Acetobacteraceae* i rodzaju *Komagataeibacter*, który obejmuje ogółem 19 gatunków (www.bacterio.net). Celuloza bakteryjna pochodząca od *A. xylinus*, została po raz pierwszy opisana przez Browna pod koniec XIX wieku i określona jako nierozgałęziona błonka o takiej samej strukturze chemicznej co celuloza roślinna, ale o wyjątkowych cechach wynikających z wysokiej czystości z powodu braku hemicelulozy i ligniny. Już wtedy była stosowana na niewielką skalę do celów praktycznych i przemysłowych [10]. W starożytnych Chinach kożuchy celulozy bakteryjnej utworzone przez grzyby herbaciane Kambucha na powierzchni gleb były wykorzystywane do sporządzania swoistej fermentowanej herbaty [11]. Na strukturę BC i wydajność jej syntezy wpływa wiele czynników, w tym użyty szczep bakteryjny, rodzaj pożywki, źródło pierwiastków biogennych, w tym związków węgla i warunki fizyczne hodowli [12]. Niezależnie od warunków prowadzenia syntezy BC, produkt ten zawsze będzie wolny od trwałych zanieczyszczeń, których usunięcie wymagałoby stosowania dodatkowych kosztów i energochłonnych etapów oczyszczania chemicznego oraz utylizacji odpadów przemysłowych jak w przypadku produkcji celulozy pochodzenia roślinnego. Ponadto, w celu przyspieszenia produkcji celulozy roślinnej często korzysta się z niebezpiecznych dla środowiska związków chemicznych, z których rezygnuje się przy produkcji BC. Dlatego też, substytucja celulozy roślinnej na celulozę bakteryjną, która jest produktem wysokiej czystości i krystaliczności będzie promowana pod względem ekonomicznym i ekologicznym [13]. Dodatkowo do produkcji biopolimerów bakteryjnych można stosować alternatywne surowce ze źródeł wtórnych, takich jak melasa buraczana, syrop glukozowy pochodzący z kukurydzy, skrobia ziemniaczana czy nawet substraty niejadalne, jak np. hydrolizaty tofu, drewno, odpady po produkcji dekstranu, etanolu lub gliceryny [14, 15]. Ponadto, w zależności od potrzeb produkcji, możliwa jest manipulacja w mikro- i makrostrukturze BC wynikająca z wysokiej plastyczności i reaktywności chemicznej tego biopolimeru. W warunkach statycznych, produkt syntezy tworzy zwartą, galaretowatą warstwę celulozy na powierzchni hodowli płynnej. W przypadku prowadzenia hodowli w warunkach niestacyjnych powstające masy celulozy są bardziej delikatne, gdyż spada ilość i stopień polimeryzacji celulozy przy jednoczesnym wzroście stopnia higroskopijności [16]. Niestety konwencjonalne statyczne metody syntezy celulozy bakteryjnej nie nadają się do produkcji przemysłowej na wielką skalę ze względu na wymagany długi czas syntezy. Dlatego wciąż poszukuje się rozwiązań technologicznych w optymalizacji warunków syntezy BC i hodowli bakteryjnej producentów celulozy [17].

Celem niniejszej pracy było przetestowanie warunków inkubacji *A. xylinus* na wydajność produkcji biocelulozy z użyciem pożywki Hestrin-Schramm'a (HS) na bazie buforu cytrynianowo-fosforanowego, uwzględniając cechy fenotypowe i preferencje wzrostowe badanego szczepu. Wyznaczenie optymalnego pH w produkcji celulozy bakteryjnej i zapewnienie stabilności tego procesu w hodowlach laboratoryjnych jest jednym z kluczowych warunków zapewniających wydajność syntezy biopolimerów w warunkach *in vitro*. Podobne testy były przeprowadzone przy użyciu różnych metod i odczynników, jednak uzyskane wyniki badań nie są jednoznaczne [18-21]. Biorąc pod uwagę potencjał *A. xylinus* do syntezy celulozy na skalę przemysłową, warunki panujące w bioreaktorach muszą być ściśle określone. Większość procedur związanych z syntezą celulozy przez szczepy *A. xylinus* dotyczy użycia pożywek o niestabilnych warunkach pH w czasie wzrostu i rozwoju bakterii w hodowlach, co może mieć negatywny wpływ na syntezę

wtórnych metabolitów. Przyjęto zatem koncepcję, że zastosowanie buforu o preferowanym odczynie wzrostu i rozwoju *A. xylinus* zapewni efektywną produkcję biocelulozy z zachowaniem pożądanych cech fizykochemicznych. Testy mają charakter badań wstępnych (ang. *proof of concept*) z oszacowaniem wydajności produkcji celulozy bakteryjnej przez *A. xylinus* w warunkach laboratoryjnych.

2. Metodologia

2.1. Materiał badawczy

W określeniu wydajności produkcji bakteryjnej celulozy przez bakterie w warunkach hodowlanych i jej podstawowych cech użyto referencyjnego szczepu *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53524. W artykule zastosowano zwyczajową nazwę drobnoustroju *A. xylinus*, ze względu na kontekst historyczny i powszechne jej użycie w źródłach literatury.

2.2. Produkcja biocelulozy przez *A. xylinus* w hodowlach *in vitro*

W syntezie biocelulozy przez badany szczep bakteryjny zastosowano zmodyfikowaną płynną pożywkę Hestrin-Schramm'a (HS) o składzie [g/L]: glukoza 20 g, pepton 5 g, wyciąg drożdżowy 5 g [15]. Jako medium użyto buforu cytrynianowo-fosforanowego w różnym zakresie pH (4,0; 4,6; 5,0; 5,6; 6,0; 6,6 i 7,0). Bufory o odpowiednim pH sporządzano według procedury Janowca (1989) [22]. Z hodowli bakterii *A. xylinus* na agarowych podłożach HS (48 godz. w temp. 30°C) przygotowano zawiesiny bakteryjne w jałowym 0,8% wodnym roztworze NaCl o mianie 0,5 McF przy użyciu DensiLAmeter II, a następnie w objętości 0,1 ml zaszczipiano płynne zmodyfikowane pożywki HS, uzyskując końcowe miano bakterii 10⁶ CFU/ml. Hodowle bakterii prowadzono w systemie probówkowym w pięciu powtórzeniach dla każdej próby w warunkach tlenowych, bez wytrząsania, w temp. 30°C przez 7 dni.

2.3. Określanie suchej i mokrej biomasy celulozy metodą wagową

Po okresie inkubacji, ściągano zużyte pożywki, a krążki bakteryjnej celulozy z każdej próby po opłukaniu wodą destylowaną i odsączeniu wody na bibule ważono na analitycznej wadze precyzyjnej Radwag Was 160/C/2 (z dokładnością 0,001mg), uzyskując wartość mokrej masy biopolimeru. Następnie krążki celulozowe suszono w temp. 50°C przez 2 godz. w suszarce Ecocell 55 Standard po czym ponownie ważono, uzyskując wartość suchej masy biopolimeru. Produkcję biocelulozy wyrażano jako wartość suchej masy biopolimeru w g/L w próbce hodowlanej, wydajność tej produkcji zaś jako% plonu biocelulozy, BC wyliczonego z kalkulacji według Wang i wsp. (2018) [23]:

$$\% \text{ plonu BC} = \text{sm. celulozy} \times 100 / \text{m. C}_{\text{org}}$$

gdzie: sm. – śr. arytmetyczna suchej masy celulozy [g/L], m. C_{org} – masa organicznego związku węgla w pożywce [g/L].

Z różnicy mokrej i suchej masy określano ubytek wody z biocelulozy, który wyrażono w %. Procentowy ubytek wody z BC posłużył do wyznaczenia stopienia higroskopijności/zawartości wody w biopolimerze. W badaniu właściwości absorpcyjnych biocelulozy użyto kwaśnych i zasadowych barwników, odpowiednio tuszu chińskiego i fuksyny zasadowej. Krążki celulozowe rozcinano na cienkie plastry i zanurzano w barwnikach rozcieńczonych w wodzie destylowanej w stosunku 1:1 na 15 min. w temp. pok., a następnie oceniano stan ich zabarwienia pod mikroskopem OptaTech Bio 2.0 w całkowitym powiększeniu 400x.

2.4. Testy statystyczne

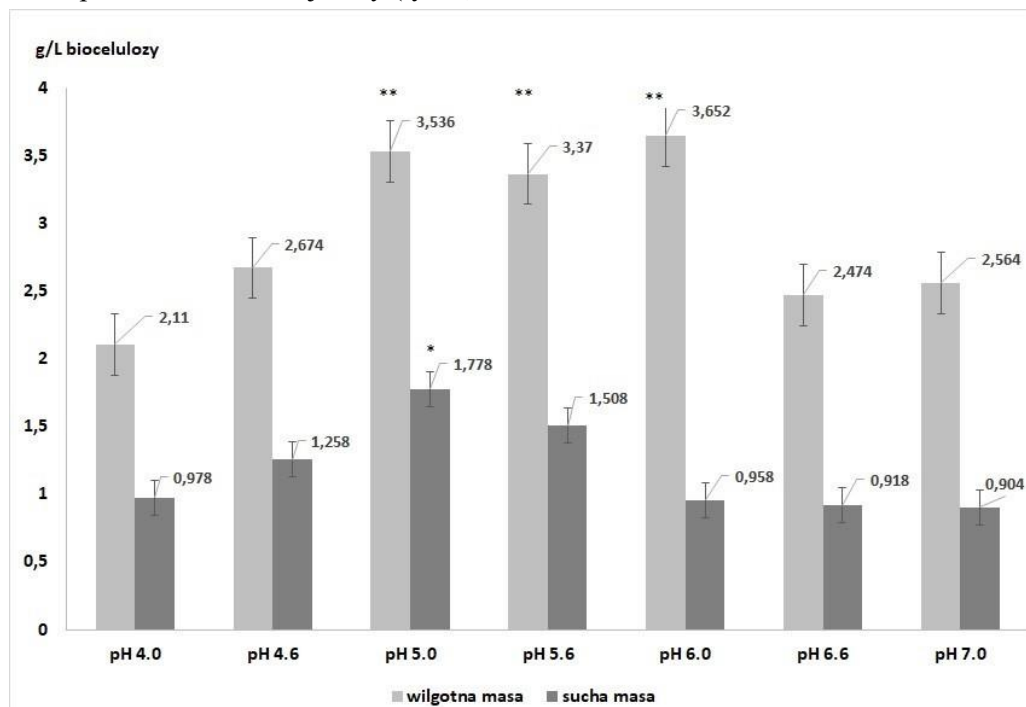
W porównaniu efektywności produkcji biocelulozy przez *A. xylinus* w płynnych buforowanych pożywkach Hestrin-Schramm'a o pH 4,0-7,0 zastosowano jednoczynnikową wariację ANOVA/MANOVA z analizą post-hoc (Test NIR) na poziomie istotności statystycznej ($p < 0,05$) (Statistica 13, Polska).

3. Wyniki i Dyskusja

W obliczu kryzysu energetycznego i ekologicznego związanych m.in. z mikrozanieczyszczeniami tworzyw sztucznych, degradacją lasów i emisją gazów cieplarnianych poszukuje się rozwiązań technologicznych w implementacji naturalnych produktów pochodzenia mikrobiologicznego o potencjalnej aplikacyjności w różnych sektorach gospodarki, w tym medycynie, przemyśle, rolnictwie i w ochronie środowiska. Dużym zainteresowaniem cieszą się wtórne metabolity produkowane przez bakterie, w tym bakteryjna celuloza będąca liniowym homopolimerem D-glukozy połączonych wiązaniami β -1,4-O-glikozydowymi o unikatowych właściwościach fizykochemicznych i reologicznych [24, 25]. Celuloza bakteryjna (BC) w odróżnieniu od celulozy u roślin jest wysoce czystym produktem bez dodatkowych innych domieszek, tj. ligniny, pektyny i hemicelulozy oraz bardziej elastyczna, dzięki unikatowej przestrzennej strukturze [24]. Ponadto, taką biocelulozę charakteryzuje wysoka krystaliczność, wytrzymałość mechaniczna i chłonność wody oraz nietoksyczność i biokompatybilność, co czyni ją obiektem zainteresowań biotechnologów w bioinżynierii materiałowej w produkcji materiałów opatrunkowych, rusztowań i uzupełnień tkankowych czy tekstyliów i opakowań. Zdolność do produkcji celulozy posiada wiele bakterii filogenetycznie niespokrewnionych ze sobą, takie jak Gram-ujemne bakterie: *Acetobacter* spp., *Agrobacterium* spp., *Alcaligenes/Achromobacter* spp., *Azotobacter* spp., *Enterobacter* spp. (zwany też *Aerobacter* spp.), *Gluconacetobacter* spp., *Komagataeibacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Rhodobacter* spp. oraz Gram-dodatnie: *Lactobacillus* spp., *Rhodococcus* spp., *Sarcina* spp. [1, 2, 25, 26]. Co ciekawe również niektórym pałeczkom jelitowym z rodziny *Enterobacteriaceae* (*Escherichia* spp., *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp.) udowodniono zdolność do produkcji mikrofilamentów celulozowych czy nanocelulozy [27]. Jednak najlepiej poznaną grupą bakterii produkujących celulozę są bakterie kwasu octowego, AAB, a wśród nich kosmopolityczne Gram-ujemne pałeczki *Acetobacter/Komagataeibacter* spp. Szczepy tych bakterii są łatwe w hodowlach na klasycznych podłożach mikrobiologicznych, które w procesach fermentacji tlenowej wykorzystują liczne związki organiczne, m.in. cukry, pochodne alkoholi i białka jako substraty do syntezy biocelulozy. Stąd stały się modelowymi mikroorganizmami w badaniach nad biocelulozą [25, 26].

W bieżących badaniach wstępnie oceniono wpływ buforowanych pożywek, składem zbliżonych do klasycznego podłoża Hestrin-Schramm'a (HS), na wydajność produkcji celulozy przez *Acetobacter xylinus* (obecnie *Komagataeibacter xylinus*). Testowane płynne pożywki jako buliony wzbogacone zawierały przede wszystkim pepton, glukozę i wyciąg drożdżowy oraz kwas cytrynowy i fosforan dwusodowy w odpowiednich proporcjach w/v do uzyskania określonych wartości pH roztworów buforowych w skali 4,0; 4,6; 5,0; 5,6; 6,0; 6,6 i 7,0. Zastosowany bufor cytrynianowo-fosforanowy miał zapewnić utrzymanie względnej stałości pH pożywki w trakcie 7-dniowej hodowli *A. xylinus*. Hodowle tych szczepów bakteryjnych prowadzono w optymalnych warunkach wzrostowych w temp. 30°C z dostępem do powietrza atmosferycznego, bez wytrząsania.

W doświadczeniu użyto inokulacji bakterii o dość wysokim mianie 10^6 CFU/ml, co pozwoliło na skrócenie etapów adaptacji i fizjologicznego logarytmicznego wzrostu bakterii oraz uzyskanie fazy stacjonarnej, podczas której towarzyszy synteza wtórnych metabolitów, w tym produkcji biocelulozy. Już w 3-ciej dobie hodowli *A. xylinus* można było zaobserwować delikatne membrany celulozy flotujących na powierzchni wszystkich testowanych płynnych pożywkach, a po 7 dniach w postaci wyraźnych kilkumilimetrowych krążków o zwartej konsystencji i gładkiej powierzchni. Podobne makrostruktury biocelulozy uzyskali Ciecholewska-Juško i wsp. (2021) w hodowlach *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53524 w płynnych pożywkach skrobiowych i klasycznym HS [24]. W przypadku wydajności produkcji biocelulozy przez szczep *A. xylinus*, w naszych badaniach była ona różna w zależności od odczynu pH użytych pożywek (rys. 1). W przeliczeniu na g/L buforowanej pożywki HS wilgotne i suche masy krążków celulozowych wynosiły odpowiednio od 2,11 g ($\pm 0,08$) do 3,652 g ($\pm 0,48$) i od 0,904 g ($\pm 0,12$) do 1,778 g ($\pm 0,24$). Znamienny przyrost ilości celulozy był obserwowany w pożywkach HS o pH 4,6; 5,0 i 5,6, uzyskując odpowiednio 1,258 g/L ($\pm 0,15$), 1,778 g/L ($\pm 0,24$) i 1,508 g/L ($\pm 0,19$) suchej masy biocelulozy. Produkcja celulozy przez *A. xylinus* zachodziła najefektywniej przy pH 5,0 uzyskując stosunkowo najwięcej suchej masy celulozy (test NIR, $F(6, 28) = 3,59$, $p = 0,009$). Ze względu na dużą zawartość wody w celulozie, wielkości wilgotnych mas krążków celulozowych były dwu- lub trzykrotnie wyższe od ich odpowiedników suchej masy (rys. 1).



Rysunek 1. Średnie wartości wilgotnej i suchej masy krążków celulozowych [g/L] wyprodukowanych przez *A. xylinus* (*K. xylinus* ATCC 53524) w buforowanych pożywkach Hestrin-Schramm'a (pH 4,0-7,0) ($n = 35$), słupki z błędami SD, gwiazdkami oznaczono poziomy istotności statystycznej (testy jednoczynnikowej wariacji ANOVA/MANOVA, $F(6, 28)$, * $p < 0,01$; ** $p < 0,02$) [opracowanie własne]

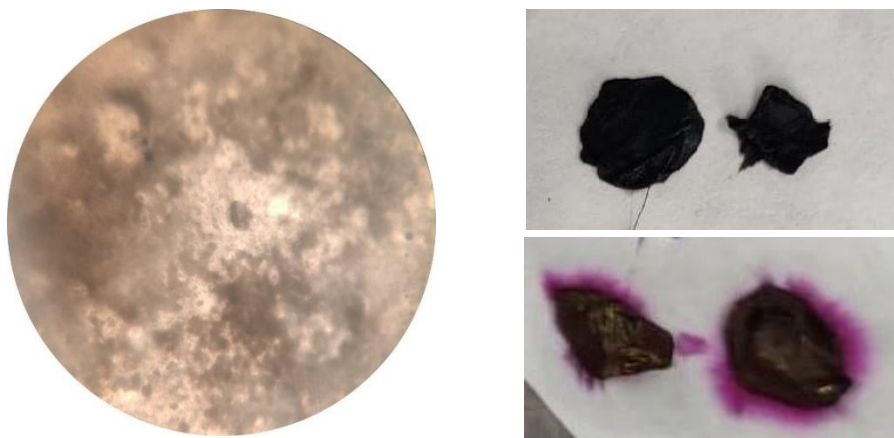
Powstałe różnice w masach bioproduktu mogą wynikać z nieprecyzyjnych czynności związanych z osuszaniem krążków celulozowych o bibułę przed ważeniem wilgotnej masy biopolimeru. Niemniej, zwraca uwagę, że kwaśny odczyn środowiska (pH = 4-6) sprzyja procesom pseudofermentacji tlenowej z udziałem badanego szczepu *A. xylinus*, podczas których powstaje najwięcej metabolitu biocelulozy. Przy czym pH = 4,0 i 6,0 pożywek stanowią już wartości graniczne dla *A. xylinus*, gdzie produkcja biocelulozy zaczyna wyraźnie spadać. Na podobne obserwacje wskazali Lahiri i wsp. (2021), którzy przytoczyli zakres pH w pożywkach od 4,5 do 7,5 w zapewnieniu optymalizacji procesów syntezy biocelulozy przez *A. xylinus*/*K. xylinus* [25]. Jednocześnie zasugerowali rolę kwasu cytrynowego jako czynnik zarówno stymulujący biosyntezę celulozy, jak i dodatkowe źródło węgla i energii dla tej bakterii [25]. Natomiast spadek produkcji bakteryjnej celulozy w pożywkach o pH <4,0 upatruje się w inhibicji enzymów w szlakach metabolizmu komórkowego przez wysokie stężenie jonów H⁺ i/ lub wskutek nagromadzenia się w podłożu kwaśnych metabolitów pierwotnych, zwłaszcza kwasu glukonowego z przemian glukozy, który znacznie obniża aktywność syntaz uczestniczących w szlaku wytwarzania celulozy [24]. Mimo tego, zaletą użytej w testach pożywki HS jest jej prosty skład chemiczny, obejmujący łatwo dostępne źródła węgla organicznego oraz wszystkie niezbędne czynniki wzrostowe, w tym mikro- i makroelementy, witaminy, aminokwasy i zasady azotowe jakich dostarcza wyciąg drożdżowy. Taki zestaw mieszanin związków i jonów zapewnia odpowiednie podłoże w namnażaniu pałeczek *A. xylinus* i stymulacji wtórnego metabolizmu z wytwarzaniem m.in. celulozy. Próby w zwiększeniu wydajności biosyntezy wtórnych metabolitów przez szczepy *Acetobacter/Gluconoacetobacter/Komagataeibacter* były podejmowane przez szereg grup badawczych. Obejmowały one modyfikacje pożywek HS w zakresie alternatywnych źródeł biogenych pierwiastków C i N, w tym propozycje zastąpienia glukozy innymi cukrowcami i ich pochodnymi, użycia substratów poprodukcyjnych (odpadów spożywczych i rolno-przemysłowych) czy suplementacji dodatkowymi czynnikami inicjującymi i stymulującymi biosyntezę celulozy, takich jak etanol, nadtlenek wodoru, kwasy organiczne (mleczan, bursztynian, octan, glukonian) oraz witaminy (kwas p-aminobenzoowy, kwas nikotynowy, kwas askorbinowy, pirydoksyna, biotyna) [3, 28]. Większość z nich była testowana w warunkach laboratoryjnych w hodowlach okresowych, nieliczne zaś w hodowlach ciągłych w chemostatach [3, 24, 28]. Dlatego też, wydajność biosyntezy celulozy w tych podłożach była zdecydowanie zróżnicowana, w zależności od warunków inkubacji, inokulacji i preferencji metabolicznych użytych szczepów bakterii octanowych. W naszych badaniach stwierdziliśmy najlepszą wydajność biosyntezy celulozy w buforowanej pożywce HS o pH 5,0 z prawie 2-krotnie wyższym plonem suchej masy celulozy (5,93% plonu BC) niż w pożywce HS o pH 6,0 (3,19% plonu BC), będącej odpowiednikiem klasycznego podłoża HS (tab. 1). W pozostałych pożywkach HS o pH 4,0; 6,0; 6,6 i 7,0, wydajność produkcji biopolimeru utrzymywała się na zbliżonym poziomie 3,19-3,26% plonu BC, w odróżnieniu od pożywek o pH 4,6 i 5,6, w których produkcja ta była nieco lepsza z plonem BC na poziomie odpowiednio 4,19% i 5,02%.

Tabela 1. Wydajność produkcji i zawartość wody w biocelulozie wytworzonej przez *A. xylinus* w hodowlach na buforowanych pożywkach Hestrin-Schramm'a (n = 35)

Parametry	Wartości pH płynnej pożywki Hestrin-Schramm'a						
	4,0	4,6	5,0	5,6	6,0	6,6	7,0
% plonu BC	3,26	4,19	5,93	5,02	3,19	3,06	3,01
ubytek wilgotnej masy celulozy [g/L]	1,132	1,416	1,758	1,862	2,694	1,556	1,66
% zawartości wody w biocelulozie	53,6	53,0	49,7	55,2	73,8	62,9	64,7

Źródło: opracowanie własne.

W bieżących badaniach oceniono również potencjalną zawartość wody w uzyskanych hodowlach biocelulozy stosując technikę suszenia w podwyższonej temperaturze, 50°C przez 2 godziny. Procentowa zawartość wody w BC w poszczególnych próbach wahała się w dość szerokich zakresach, od 49,7% do 73,8% (tab. 1). Największy ubytek wody z biocelulozy podczas suszenia krążków celulozowych zaobserwowano w pożywkach HS o pH 6,0; 6,6 i 7,0 w odniesieniu do pożywek o niższych wartościach pH wynoszących 4,0-5,6. Ponadto, wszystkie badane krążki celulozowe łatwo i stosunkowo szybko absorbowały wodne roztwory barwników, niezależnie od ich chemicznego charakteru, to jest zarówno gruboziarniste barwniki kwaśne (tusze chiński), jak i drobnoziarniste barwniki anilinowe (fuksyna zasadowa) (rys. 2, wybarwione krążki BC, prawa strona). W preparatach z cienkimi membranami celulozy widoczny jest podbarwiony nieregularny gęsty układ struktury polimeru (rys. 2, lewa strona).



Rysunek 2. Preparat mikroskopowy z wycinkiem bakteryjnej membrany celulozowej podbarwionej tuszem chińskim po lewej stronie (całkowite pow. mikroskopu 400x) oraz barwne krążki bakteryjnej celulozy (BC) po prawej stronie. Od góry BC wybarwiona tuszem chińskim, poniżej zaś fuksyną zasadową [opracowanie własne]

Duża pojemność chłonna BC sprawia, że jest biotechnologicznie doskonałym naturalnym materiałem o pożądanych właściwościach fizycznych, chemicznych i biologicznych. W formie hydrożelu jako nietoksyczny, niealergizujący i biodegradowalny może znaleźć potencjalne zastosowanie m.in. w bioinżynierii medycznej w produkcji materiałów opatrunkowych, nośników leków, biomedycznych implantów, cewników naczyniowych, medycznych podkładów i sztucznej skóry oraz w ochronie środowiska w procesach bio-

remediacyjnych i technologii zielonej energii [2, 3, 25, 28]. W tym ostatnim przypadku wiążą się wielkie nadzieje z BC jako naturalne maty biologiczne/absorbenty w szybkiej i precyzyjnej utylizacji metali i trwałych związków organicznych, w tym ksenobiotyków w rekultywacji środowisk lub oczyszczaniu powietrza z mikrozanieczyszczeń chemicznych, fizycznych i biologicznych [3, 27, 29, 30].

4. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że wydajność produkcji celulozy przez badany szczep *A. xylinus* (*K. xylinus* ATCC 53524) zależy od pH pożywki fermentacyjnej, a w procesie stabilizacji syntezy biocelulozy konieczne jest zastosowanie odpowiednich buforów jako medium dla zapewnienia optymalnego wzrostu i rozwoju szczepu *A. xylinus*. Najbardziej wydajny proces produkcji celulozy przez badany szczep *A. xylinus* uzyskano przy zastosowaniu buforu cytrynianowo-fosforanowego o pH 5,0 w podłożu Hestrin-Schramm'a (HS), uzyskując blisko dwukrotnie wyższy plon biocelulozy (5,93% sm.) niż w pożywce HS o pH 6,0 będącej odpowiednikiem klasycznego podłoża HS. Zaletą takiej biocelulozy jest wysoka pojemność biopolimeru o czym świadczy duża zawartość wody w jego strukturze, niezależnie od warunków inkubacji w buforowanych pożywkach HS.

5. Podsumowanie

W bieżących badaniach wykazano, że% plon celulozy przez badany szczep *A. xylinus* (*K. xylinus*) zależy od użytego pH buforowanej pożywki HS. Niemniej powyższe wyniki wymagają weryfikacji w hodowlach z zastosowaniem dużo większych objętości pożywek i wydłużonego czasu inkubacji oraz użycia bardziej precyzyjnych technik oczyszczania i osuszania biopolimeru, co umożliwi precyzyjne odniesienie rezultatów do danych prezentowanych w światowej literaturze naukowej [24]. Obecne nasze badania mają wartość poznawczą i będą podstawą w planowaniu dalszych analiz w zakresie wydajności produkcji biocelulozy przez bakterie.

Podziękowania

Serdeczne podziękowania Studentom Pani Aleksandrze Gołębiewskiej i Panu Marciniowi Łakomemu za udział w realizacji niniejszego projektu studenckiego w procesie kształcenia na kierunku Mikrobiologii II stopnia studiów WNB UW r.

Powyższe zagadnienie badawcze realizowano w formie projektu studenckiego stosując klasyczne techniki mikrobiologiczne obserwacji bakterii w warunkach *in vitro*. Projekt ten wykonano jako pracę badawczą podczas zajęć laboratoryjnych z przedmiotu „Bakteriologia – kurs rozszerzony” na kierunku Mikrobiologii II stopnia studiów na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego w roku akademickim 2022/2023, ze środków subwencji badawczo-dydaktycznej MEiN.

Literatura

1. Avcioglu N.H., *Bacterial cellulose: recent progress in production and industrial Applications*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 38:86, 2022, s. 1-13.
2. Choi S.M., Rao K.M., Zo S.M., Shin E.J., Han S.S., *Bacterial Cellulose and Its Applications*, Polymers, 14(6), 1080, 2022, s. 1-44.
3. Kamal T., Ul-Islam M., Fatima A., Ullah M.W., Manan S., *Cost-effective synthesis of bacterial cellulose and its applications in the food and environmental sectors*, Gels, 8(9), 552, 2022, s. 1-24.

4. Nagmetova G., Berthold-Pluta A., Garbowska M., Kurmanbayev A., Stasiak-Róžańska L., *Antibacterial activity of biocellulose with oregano essential oil against Cronobacter strains*, Polymers, 12(8), 2020, 1647.
5. Zhu H., Jia S., Wan T., Jia Y., Yang H., Li J., Yan L., Zhong C., *Biosynthesis of spherical Fe₃O₄/bacterial cellulose nanocomposites as adsorbents for heavy metal ions*, Carbohydrate Polymers, 86(4), 2011, s. 1558-1564.
6. Yamada Y., Yukphan P., Lan Vu H.T., Muramatsu Y., Ochaikul D., Tanasupawat S., Nakagawa Y., *Description of Komagataeibacter gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae)*, Journal of General and Applied Microbiology, 58(5), 2012, s. 397-404.
7. Brown A.J., *On an acetic ferment which forms cellulose*, Journal of the Chemical Society (London), 49, 1886, s. 432-439.
8. www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=28448&lvl=0 [data dostępu: 14.04.2023].
9. Hoerd A., Lopez M.G., Meier-Kolthoff J.P., Schleuning M., Weinhold L.M., Tindall B.J., Gronow S., Kyrpidis N.C., Woyke T., Goeker M., *Analysis of 1,000+ Type Strain genomes substantially improves taxonomic classification of Alphaproteobacteria*, Frontiers in Microbiology, 11(4), 468, 2020, s. 1-112.
10. Yang H., Catchmark J.M., *Formation and characterization of spherulike bacterial cellulose particles produced by Acetobacter xylinum JCM 9730 strain*, Biomacromolecules, 11(7), 2010, s. 1727-1734.
11. March A.J., O'Sullivan O., Hill C., Ross R.P., Cotter P.D., *Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples*, Food Microbiology, 38, 2014, s. 171-178.
12. Mohite B.V., Salunke B.K., Patil S.V., *Enhanced production of bacterial cellulose by using Gluconacetobacter hansenii NCIM 2529 strain under shaking conditions*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 169, 2013, s. 1497-1511.
13. Lynd L.R., Weimer P.J., Van Zyl W.H., Pretorius I.S., *Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66(3), 2002, s. 506-577.
14. Shamolina I.I., *Prospects for use of microbial raw material for fabrication of fibre and film materials Review*, Fibre Chemistry, 29(1), 1997, s. 1-8.
15. Sperotto G., Stasiak L.G., Godoi J.P.M.G., Gabiatti N.C., de Souza S., *A review of culture media for bacterial cellulose production: complex, chemically defined, and minimal media modulations*, Cellulose, 28, 2021, s. 2649-2673.
16. Singhsa P., Narain R., Manuspiya H., *Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different Komagataeibacter xylinus strains and carbon sources in static and agitated conditions*, Cellulose, 25, 2018, s. 1571-1581.
17. Bae S.O., Shoda M., *Production of bacterial cellulose by Acetobacter xylinum BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor*, Applied Microbiology and Biotechnology, 67(1), 2005, s. 45-51.
18. Embuscado M.E., Marks J.S., Bemiller J.N., *Bacterial cellulose. I. Factors affecting the production of cellulose by Acetobacter xylinum*, Food Hydrocolloids, 8(5), 1994, s. 407-418.
19. Budhiono A., Rosidi B., Taher, H., Iguchi M., *Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system*, Carbohydrate Polymers, 40(2), 1999, s. 137-143.
20. Verschuren P.G., Cardona T.D., Nout M.R., De Gooijer K.D., Van den Heuvel J.C., *Location and limitation of cellulose production by Acetobacter xylinum established from oxygen profiles*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 89(5), 2000, s. 414-419.
21. Zahan K.A., Pa N., Muhamad I.I., *Monitoring the Effect of pH on Bacterial Cellulose Production and Acetobacter xylinum 0416 Growth in a Rotary Discs Reactor*, Arabian Journal for Science and Engine, 40, 2015, s. 1881-1885
22. Janowiec M. (red.), *Mikrobiologia i serologia*, Wydawnictwo PZWL, Warszawa 1988, s. 322.

23. Wang S.S., Han Y.H., Chen J.L., Zhang D.C., Shi X.X., Ye Y.X., Chen D.L., *Insights into bacterial cellulose biosynthesis from different carbon sources and the associated biochemical transformation pathways in Komagataeibacter sp. W1*, *Polymers*, 10, 963, 2018, s. 1-20.
24. Ciecholewska-Juško D., Broda M., Żywicka A., Styburski D., Sobolewski P., Gorący K., Migdał P., Junka A., Fijałkowski K., *Potato juice, a starch industry waste, as a cost-effective medium for the biosynthesis of bacterial cellulose*, *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 10807, 2021, s. 1-20.
25. Lahiri D., Nag M., Dutta B., Dey A., Sarkar T., Pati S., Edinur H.A., Kari Z.A., Mohd Noor N.H., Ray R.R., *Bacterial Cellulose: Production, Characterization, and Application as Antimicrobial Agent*, *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 12984, 2021, s. 1-18.
26. Olędzki R., Walaszczyk E., *Bionanoceluloza-właściwości, pozyskiwanie i perspektywy zastosowania w przemyśle spożywczym*, *Postępy Mikrobiologii – Advancements Microbiology*, 59(1), 2020, s. 87-102.
27. Hungund B., Prabhu S., Shetty C., Acharya S., Prabhu V., Gupta S.G., *Production of bacterial Ccellulose from gluconacetobacter persimmonis GH-2 using dual and cheaper carbon sources*, *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 5(2), 2013, s. 1-3.
28. Lee K.Y., Buldum G., Mantalaris A., Bismarck A., *More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites*, *Macromolecular Bioscience*, 14, 2014, s. 10-32.
29. Shahzad A., Ullah M.W., Ali J., Aziz K., Javed M.A., Shi Z., Manan S., Ul-Islam M., Nazar M., Yang G., *The versatility of nanocellulose, modification strategies, and its current progress in wastewater treatment and environmental remediation*, *Science of The Total Environment*, 858(2), 2023, 159937.
30. Shoukat A., Wahid F., Khan T., Siddique M., Nasreen S., Yand G., Ullah M.W., Khan R., *Titanium oxide-bacterial cellulose bioadsorbent for the removal of lead ions from aqueous solution*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 2019, s. 965-971.

Wydajność produkcji biocelulozy przez *Acetobacter xylinus* w hodowlach na bazie buforu cytrynianowo-fosforanowego

Streszczenie

Acetobacter xylinus (obecnie zwany jako *Komagataeibacter xylinus*) uznawany jest za bakterię najwydajniej produkującą biocelulozę, która w czasach kryzysu ekologicznego jest materiałem przyszłości. Bioceluloza ta wykazuje wysoką czystość i higroskopijność, co w odróżnieniu od celulozy roślinnej nie wymaga dodatkowych koszt- i energochłonnych etapów obróbki. Od lat bakteryjna celuloza (BC) jest obiektem zainteresowań naukowców na całym świecie jako naturalny surowiec w produkcji przemysłowej i biotechnologii środowiskowej. Ścisłe określenie warunków produkcji jest kluczowe do efektywnego wytwarzania tego biopolimeru na skalę przemysłową. W naszych badaniach oceniono wydajność biosyntezy celulozy przez Gram-ujemne pałeczki *A. xylinus* w pH w zakresach 4,0-7,0 stosując pożywki wzrostowe Hestrin-Schramm'a (HS) na bazie buforu cytrynianowo-fosforanowego. Najlepszą produkcję biocelulozy obserwowano w płynnych pożywkach o pH w zakresach od 4,6 do 5,6 uzyskując 1,26-1,78 g/L suchej masy badanego biopolimeru. Wydajność syntezy biocelulozy w buforowanych pożywkach HS była zróżnicowana z plonem na poziomie 3,01% przy pH 7,0 i 5,93% przy pH 5,0. Niezależnie od wartości pH pożywek, wszystkie wyprodukowane przez *A. xylinus* krążki celulozowe cechowała stosunkowo wysoka zawartość wody (od 49,7% do 73,8%) oraz łatwość absorpcji/wchłaniania barwników kwaśnych i zasadowych. Wyniki badań wskazują na możliwość wykorzystania BC w inżynierii biomateriałowej w produkcji biologicznych mat absorpcyjnych w rekultywacji środowisk lub biokompatybilnych, niealergicznym materiałom opatrunkowym i transplantacyjnym w medycynie.

Słowa kluczowe: bioceluloza, *A. xylinus*, wydajność produkcji

Efficiency of biocellulose production by *Acetobacter xylinus* in cultures based on citrate-phosphate buffer

Abstract

Acetobacter xylinus (also known as *Komagataeibacter xylinus*) is the most efficient bacterium-producing biocellulose, and in times of ecological crisis, it is seen as an important material for future applications. This bio-cellulose exhibits high purity and hygroscopicity. Unlike plant cellulose, bacterial cellulose (BC) does not require additional cost- and energy-intensive processing steps. For years BC has been of interest to scientists around the world as a natural raw material for industrial production and environmental biotechnology. However, a strict definition of production conditions is crucial for the effective production of this biopolymer on an industrial scale. In our study, the efficiency of cellulose biosynthesis by Gram-negative rods of *A. xylinus* was assessed in the pH range of 4.0-7.0 using Hestrin-Schramm (HS) growth medium based on citrate-phosphate buffer. Optimal production of biocellulose was observed in liquid media with pH ranging from 4.6 to 5.6, obtaining 1.26g/L-1.78g/L of dry weight of the tested biopolymer. The yield of BC in buffered HS media varied from 3.01% at pH 7.0 to 5.93% at pH 5.0. The cellulose membranes produced by *A. xylinus* in tested media were characterized by a relatively high-water content (from 49.7% to 73.8%) and an easy absorption of acidic and basic dyes. The research results indicate the potential of biomaterial engineering using BC in the production of absorbent mats for environmental reclamation and also for biocompatible, non-allergic dressing and transplantation materials in medicine.

Keywords: biocellulose, *A. xylinus*, yield of production

Wpływ czynników środowiskowych na dimorfizm drożdży *Yarrowia lipolytica* i biosyntezę proteaz zewnątrzkomórkowych

1. Wstęp

Mikroorganizmy stanowią nie tylko integralną część środowiska, lecz powszechnie wykorzystywane są też przez człowieka. I choć zazwyczaj kojarzone są z byciem czynnikiem etiologicznym chorób u ludzi i zwierząt, wiele z nich wywiera także dobroczynny wpływ na wiele procesów zachodzących w organizmach roślinnych czy zwierzęcych. Wiele gatunków mikroorganizmów odgrywa zasadniczą rolę w środowisku, chociażby poprzez aktywny udział w procesach mineralizacji azotu, poprawy wigoru oraz wpływa na strukturę i zasobność gleb. Życie na ziemi nie byłoby możliwe bez mikroorganizmów i procesów, w których uczestniczą. Dobroczynny wpływ mikroorganizmów na procesy zachodzące w środowisku naturalnym sprawił, że ludzie zaczęli wykorzystywać mikroorganizmy już kilkaset lat temu. Tradycyjne procesy biotechnologiczne stosowano do utrwalania mleka czy warzyw. Przykładów jest znacznie więcej: wytwarzanie serów pleśniowych, chleba, kwasu chlebowego, octu, piwa czy wina. Wraz z postępem naukowym i technologicznym biotechnologia również się zmieniła. Jednak, aby w pełni zdać sobie sprawę z tego jaką rolę drobnoustroje mogą spełniać w przyrodzie oraz życiu człowieka, należy również poznać ich budowę oraz zastanowić się jaki może być związek między nią, a funkcją jaką spełniają w środowisku. Nowoczesna biotechnologia oparta jest na wiedzy o rozwoju i morfologii mikroorganizmów i ścisłej kontroli szlaków enzymatycznych z użyciem narzędzi inżynierii bioprocessowej. Metody te pozwalają na polepszenie wydajności produkcji określonych produktów oraz znalezienie nowych bądź korzystniejszych rozwiązań. Tak oto biotechnologia z drugiej połowy XX wieku, a wraz z nią znajomość fizjologii mikroorganizmów, szlaków metabolicznych i ich roli zaczęła odgrywać znaczącą rolę w rolnictwie, medycynie, diagnostyce czy produkcji związków chemicznych, a także w energetyce, górnictwie, technologii żywności i ochronie środowiska [1].

Największe praktyczne znaczenie w procesach biologicznych mają technologie, w których stosowane są wyłącznie wyizolowane enzymy. Procesy te mogą być kontrolowane i przerywane na określonym i pożądanym etapie, w sposób łatwiejszy, aniżeli z użyciem żywych kultur mikrobiologicznych. Niestety procesy te charakteryzuje również duża niestabilność, ze względu na wrażliwość mikroorganizmów/ enzymów na zmiany środowiska. W związku z tym muszą być prowadzone badania podstawowe, które pozwoliłyby na pokonanie tych barier i produkcję tańszych, a jednocześnie stabilnych

¹ dorota.wieczorek@lit.lukasiewicz.gov.pl, Centrum Materiałów Obuwniczych, Barwionych i Spożywczych, Łódzki Instytut Technologiczny, Sieć Badawcza Łukasiewicz www.lit.lukasiewicz.gov.pl.

² katarzyna.miskiewicz@lit.lukasiewicz.gov.pl, Centrum Materiałów Obuwniczych, Barwionych i Spożywczych, Łódzki Instytut Technologiczny, Sieć Badawcza Łukasiewicz www.lit.lukasiewicz.gov.pl.

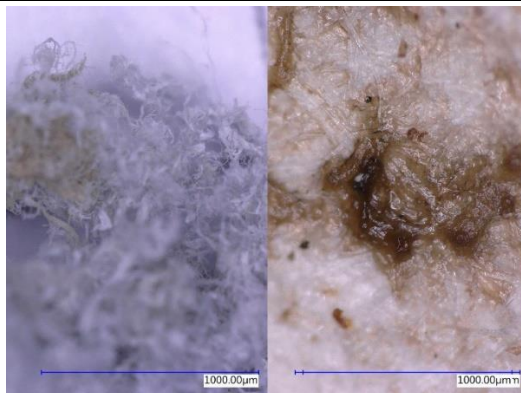
³ dorota.gendaszewska@lit.lukasiewicz.gov.pl, Centrum Materiałów Obuwniczych, Barwionych i Spożywczych, Łódzki Instytut Technologiczny, Sieć Badawcza Łukasiewicz www.lit.lukasiewicz.gov.pl.

biokatalizatorów. Przegląd ten ma przybliżyć wpływ zmiany warunków środowiska na dimorfizm i biosyntezę proteaz zewnątrzkomórkowych przez drożdże *Y. lipolytica*. Enzymy proteolityczne stanowią największą grupę enzymów spośród dostępnych i wykorzystywanych przemysłowo biokatalizatorów. Dotychczas komercyjnie stosowane są proteazy bakteryjne; szczególnie uzyskane w wyniku hodowli bakterii z rodzaju *Bacillus*. Z drugiej strony alkaliczna proteaza produkowana przez szczepy drożdży z rodzaju *Yarrowia* jest jednym z lepiej poznanych enzymów wyizolowanych z gatunku *Y. lipolytica*. Ponadto szczepy z gatunku *Y. lipolytica* mogą rosnąć na odpadowych źródłach węgla, co może wpłynąć na ekonomię wytwarzania enzymów proteolitycznych.

2. Wykorzystanie drożdży *Y. lipolytica* w przemyśle

Y. lipolytica to drożdże, które są intensywnie badane lub wykorzystywane do wielu procesów technologicznych w ostatnich 30 latach. Te niekonwencjonalne i wybitnie tlenowe mikroorganizmy produkują wiele ważnych związków chemicznych [2]. Badania w zakresie genomiki, transkryptomiki i proteomiki ujawniły fizjologię i genetykę, sekrecję, dimorfizm oraz biogenezę peroksysomów i kompleksu mitochondrialnego. Wraz z początkiem XXI wieku określono całą sekwencję sześciu chromosomów drożdży z gatunku *Y. lipolytica* [3]. Poznane zostały szlaki metaboliczne cukrów, lipidów czy ścieżki biodegradacji kesonobiotyków przez ww. drożdże. Dotychczas szczep ten izolowano zarówno ze środowisk bogatych w substancje hydrofobowe, np.: z gleby skażonej węglowodorami czy ścieków przemysłowych. Równie cennym źródłem izolatów drożdży z rodzaju *Yarrowia* okazała się żywność. Szczególnie często drożdże te znajdują się w serach pleśniowych, sosie sojowym oraz sałatkach z dodatkiem owoców morza. Szerokie rozpowszechnienie w odmiennych środowiskach, przełożyło się na możliwość asymilacji różnych źródeł węgla. Drożdże z rodzaju *Yarrowia* szczególnie preferują wykorzystywanie substratów hydrofobowych jako źródeł węgla (kwasy tłuszczowe, trójglicerydy, estry i węglowodory), ale również mogą zużywać hydrofilowe źródła węgla (glukoza, glicerol, fruktoza, kwasy organiczne i alkohol). Posiadanie niezwykle rozbudowanego aparatu enzymatycznego, pozwoliło na szerokie zastosowanie drożdży z rodzaju *Yarrowia* w przemyśle. W porównaniu do innych szczepów wykorzystywanych przemysłowo, drożdże z gatunku *Y. lipolytica* charakteryzuje maksymalna zdolność do namnażania biomasy w temperaturach niższych niż 34°C [4], co jest bardzo ważne podczas prowadzenia procesów na skalę przemysłową. Przyrost biomasy i produkcja pożądaných metabolitów w niskich temperaturach ułatwia prowadzenie procesów biotechnologicznych z udziałem drożdży, a jednocześnie wpływa na ekonomię procesu.

Jedną z ważniejszych cech jakie posiadają szczepy z rodzaju *Yarrowia* jest zdolność do syntezy wielu enzymów, w tym pozakomórkowych (tab. 1). Proteazy zewnątrzkomórkowe E.C.3.4 i lipazy E.C.3.1.1.3 produkowane przez drożdże z rodzaju *Yarrowia* mogą być wykorzystywane chociażby w poprawie jakości dojrzewających serów niskotłuszczowych [5], do procesów bioremediacji czy produkcji biosurfaktantów [6]. Uczestniczą one również w procesie przekształcania odpadów białkowych (rys. 1) celem odzyskania biopolimerów, szczególnie keratyny i kolagenu [7, 8].



Rysunek 1. Strużyny garbarskie, strona lewa: surowe strużyny garbarskie, strona prawa: strużyny garbarskie osadzone na sączku po procesie degradacji z użyciem *Y. lipolytica* IPS21 (powiększenie x1000) [opracowanie własne, badania własne]

Drożdże te syntetyzują również acylotransferazę diacyloglicerolową typ 1 i typ 2, które są konieczne do przyłączenia do diacyloglicerolu jeszcze jednej cząsteczki acyloCoA w ostatnim etapie syntezy trójglicerydów. Ekspresja tych białek pozwala na produkcję lipidów przez szczepy drożdży z gatunku *Y. lipolytica*. Produkty tej syntezy wykorzystywane mogą być w produkcji biopaliw, czy też olejów wzbogaconych w niezbędne kwasy tłuszczowe, do zastosowań w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym [9]. W wyniku konwersji rycynooleinianu metylu drożdże z rodzaju *Yarrowia* syntetyzują też γ -dekalakton, który jest wykorzystywany w przemyśle żywnościowym do aromatyzowania produktów celem nadania im zapachu masła, kokosu, truskawki, maliny, śmietany, mango, brzoskwini, moreli czy orzecha [4]. W ostatnich kilku latach najbardziej popularnym przemysłowym zastosowaniem tego gatunku drożdży wydaje się być produkcja biomasy wykorzystywanej jako białko jednokomórkowe (ang. *Single Cell Protein*, SCP) [10] np.: na cele paszowe. Procesy technologiczne w wyniku których uzyskuje się cenne produkty z udziałem szczepów *Yarrowia* mają status GRAS (ang. *Generally Recognized as Safe*) nadany przez Amerykańską Agencję Rządową Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) [2]. Oznacza to, że uzyskane substancje są bezpieczne dla ludzi i zwierząt w warunkach ich zamierzonego użycia.

Tabela 1. Substraty, enzymy i produkty wytwarzane z udziałem *Y. lipolytica* i ich potencjalne zastosowanie przemysłowe

Substrat	Enzym	Produkt	Zastosowanie	Źródło
glukoza, fruktoza	karboksylaza acetylo-CoA E.C. 6.4.1.2 i acyl-CoA:diacyloglicerolacylotransferaza E.C. 2.3.1.20	lipidy	produkcja biodiesel	11
glukoza	desaturaza delta-6 E.C. 1.14.19.3, elongaza C18/20 E.C. 2.3.1, desaturaza delta -5 E.C. 1.14.19.44 i desaturaza delta-17 E.C. 1.3.1.	wielonienasycone kwasy tłuszczowe	alternatywne źródło kwasów omega 3-6-9 dla ludzi	12
glicerol odpadowy z dodatkiem frakcji glicerynowej	zewnątrzkomórkowa i wewnątrzkomórkowa lipaza E.C. 3.1.1.3	lipazy, kwas cytrynowy	alternatywne źródło kwasu cytrynowego, przemysł spożywczy, detergenty	13

alkany, kwasy tłuszczowe	lipazy/esterazy E.C. 3.1.1.3 rodzina enzymów cytochromu P450 E.C. 1.6.2.4, peroksyosomalne oksydazy acylo-CoA E.C. 3.1.2.27	wolne kwasy tłuszczowe, produkcja acetylo-CoA, steroidy, γ-laktony	bioremediacja kesonobietyków, produkcja związków aromatycznych, biotransformacja steroidów	14
surowy glicerol	syntetaza sukcyliny-CoA E.C. 6.2.1.4 (SCS), dehydrogenaza bursztynianowa E.C. 1.3.5.1 (SDH)	kwas bursztynowy	przemysł spożywczy, przemysł farmaceutyczny, chemia	15
glicerol	reduktaza erytrozy EC:1.1.1.21	erytrol	przemysł spożywczy	16
ścieki z przemysłu rybnego	zewnątrzkomórkowa i wewnątrzkomórkowa lipaza E.C. 3.1.1.3, dehydrogenazy E.C. 1.1.1.1, zewnątrzkomórkowe proteazy E.C 3.4.	odbarwione ścieki, wykorzystane ksenobiotyki jako źródło węgla	biologiczne oczyszczalnie ścieków, biodegradacja kesonobietyków	17

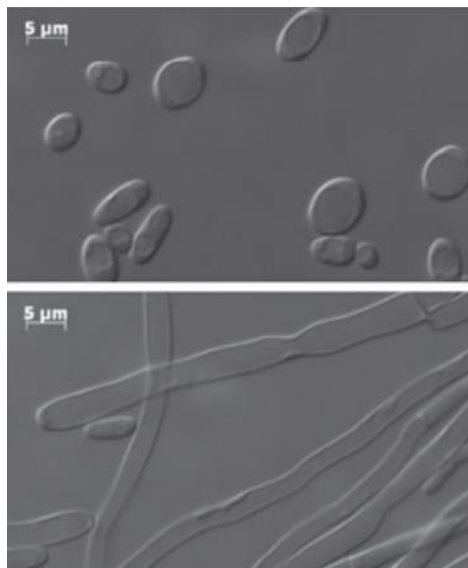
Źródło: opracowanie własne na podstawie [11-17].

Biotechnologia stanowi jeden z najdynamiczniej rozwijających się obszarów badań naukowych w Unii Europejskiej. Branża ta została uznana w ostatnich latach za jedną z najbardziej innowacyjnych dziedzin gospodarki. Komercjalizacja wyników badań z zakresu biotechnologii, w tym z użyciem drożdży z rodzaju *Yarrowia*, wymaga ciągle znaczących inwestycji kapitałowych, głębokiej wiedzy i znajomości rynku. Nadal największym wyzwaniem w szerszym rozwoju nowych metod i zastąpieniu nimi konwencjonalnych procesów chemicznych jest pokonanie bariery związanej z wysokim kosztem substratów węglowych stosowanych do procesów. Z tego względu głównym zadaniem naukowców jest prowadzenie prac mających na celu zintensyfikowanie odzysku węgla bądź innych pierwiastków przez mikroorganizmy z odpadów. Potencjał drożdży z rodzaju *Yarrowia* do produkcji szerokiej gamy enzymów koniecznych do biokonwersji uzależniony jest od wielu czynników. Na wzrost drożdży z gatunku *Y. lipolytica* i wydzielanie metabolitów mają wpływ między innymi: struktura i dostępność składników organicznych, ich jednorodność i obecność minerałów, pH wyjściowe i procesowe podłoża wzrostowego, temperatura inkubacji, ilość inokulum oraz intensywność natlenienia [13]. Parametry te muszą być zoptymalizowane pod kątem wydajności oraz ekonomii procesu.

3. Wpływ czynników środowiskowych na rozwój i morfologię drożdży *Y. lipolytica*

Drożdże *Y. lipolytica* są organizmami dymorficznymi, które mają zdolność do wzrostu w odmiennych formach morfologicznych (drożdżowa, strzępkowa) w zależności od warunków środowiskowych (rys. 2). Dzikie szczepy drożdży *Y. lipolytica* charakteryzuje bardzo zróżnicowany wzrost i wygląd kolonii, mogą one być matowe czy lśniące, gładkie lub poszarpane. Ich zmienność jest związana nie tylko z podłożem, ale również z genetycznym fenotypem. Izolaty środowiskowe są bardzo niestabilne, czego nie obserwuje się dla szczepów laboratoryjnych. Ta cecha pozwala penetrować rodzajowi *Yarrowia* do środowisk o labilnych lub utrudnionych warunkach do rozwoju. Zrozumienie w jaki sposób systemy fizjologiczne pośredniczą w możliwości rozwoju pojedynczych komórek mikroorganizmów, a ostatecznie w dynamice wzrostu populacji, ma kluczowe znaczenie

dla kontrolowania procesów przemysłowych [18]. Tak duże zróżnicowanie morfologiczne, wywołuje zmiany reologiczne, wpływa na transport ciepła i zmienia współczynnik wnikania masy, co bezpośrednio przekłada się na przebieg procesów w bioreaktorach. Stąd konieczne jest monitorowanie i kontrolowanie morfologii podczas hodowli z użyciem drożdży z rodzaju *Yarrowia* [19]. Forma strzępkowa w procesach biotechnologicznych zazwyczaj jest niepożądana.

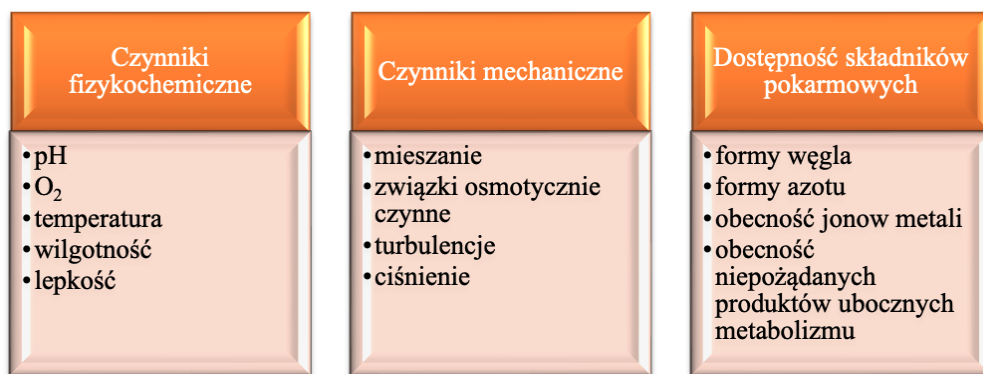


Rysunek 2. Morfologia drożdży z rodzaju *Yarrowia*: na górze – hodowla na podłożu YNB (ang. *Yeast nitrogen base*), na dole – hodowla na podłożu z dodatkiem surowicy [20]

W literaturze przedmiotu wspomina się o wpływie na dimorfizm w dwóch aspektach: a) potencjalnych czynników zewnętrznych powodujących zmianę w morfologii b) warunków fizykochemicznych zastosowanych w bioreaktorze.

Czynniki wpływające na zmianę morfologii mają różnoraki charakter (schemat 1). Są to zmiany fizykochemiczne, mechaniczne czy zmiany wynikające z dostępności składników pokarmowych.

Do czynników fizykochemicznych najbardziej wpływających na dimorfizm drożdży *Yarrowia* zalicza się zmianę pH, zmianę w zawartości tlenu rozpuszczonego w wodzie czy zmiany temperatury. Do czynników mechanicznych, które są najmniej poznane należą ciśnienie i mieszanie. Do czynników związanych z asymilacją wybranych składników pokarmowych kwalifikuje się reakcję na różne formy azotu, węgla oraz stężenie jonów metali [21]. Dotychczas, w wykazie literaturowym omówiono szeroko wpływ zmiany pH na morfologię kolonii drożdży z gatunku *Y. lipolytica* [22-24].



Schemat 1. Czynniki wpływające na zmianę morfologii u drożdży z rodzaju *Yarrowia*, opracowanie własne na podstawie [24]

Formy strzępkowe zdecydowanie częściej obserwuje się w środowisku obojętnym (pH 7) bądź zbliżonym do takiego. Jednakże, pojawiają się również doniesienia o produkcji mycelium w niskim pH, równym 4,5 [23]. Kontrolowaną zmianę pH można uzyskać poprzez stosowanie różnego rodzaju buforów. W przypadku drożdży z rodzaju *Yarrowia* nie tylko wartość pH wpływa na pojawienie się form nitkowatych, ale również odmiana buforu. Ruiz Herrera i Sentandreu (2002) stosując to samo źródło węgla, warunki w bioreaktorze i pH równe 7 uzyskali inny procent form nitkowatych w ogólnej badanej populacji drożdży z rodzaju *Yarrowia*, utrzymujący się na poziomie 87% w buforze fosforanowym, a 98% w buforze cytrynianowym [25].

Równie ważnym parametrem wpływającym na zmianę formy z owalnej na strzępkową u drożdży gatunku *Y. lipolytica* jest ilość tlenu rozpuszczonego w wodzie [26-28]. Czynnikiem ten w zasadzie na równi z pH, uważany jest za kluczowy w rozwoju tych grzybów. Drożdże z rodzaju *Yarrowia* w obecności dużej ilości tlenu mogą prowadzić bardziej efektywne oddychanie tlenowe. Ograniczona dostępność tego składnika w podłożu determinuje zmianę morfologii, wydłużenie włókien w kierunku formy strzępkowej. Dimorfizm uzależniony ściśle od ilości tlenu rozpuszczonego w wodzie nie zależy od źródeł węgla [29].

Stres temperaturowy ma zdecydowanie mniejszy wpływ na morfologię niżeli wcześniej wspomniane czynniki [30]. Badania prowadzone w ściśle laboratoryjnych warunkach wykazały, że w czasie szoku cieplnego na początku i w trakcie hodowli, mogą pojawiać się formy strzępkowe, natomiast nie są one dominujące [28,31]. Ponadto w warunkach przemysłowych parametr ten jest zdecydowanie łatwiejszy do kontroli, niżeli zmiany pH pożywki czy przenikanie rozpuszczonego tlenu w coraz to gęstszej hodowli.

Szczepy z rodzaju *Yarrowia* tolerują dobrze duże stężenie chlorku sodu, nawet do 9% NaCl, w pożywce hodowlanej [32, 33]. W odpowiedzi na stres solny (podwyższone stężenie soli w środowisku wzrostu) drożdże z gatunku *Y. lipolytica* rozwinęły różne mechanizmy adaptacyjne. Jednym z nich jest akumulacja glicerolu. Obserwowane są też zmiany kształtu i wielkości komórek. Drożdże z rodzaju *Yarrowia* w odpowiedzi na stres solny produkują zwiększone ilości wewnątrzkomórkowych aminokwasów, szczególnie proliny [34].

Zmiany w morfologii i wzroście, w odpowiedzi na bezpośrednie działanie ciśnienia i w zależności od szybkości pracy łopatek w bioreaktorze, są stosunkowo mało poznane. Zazwyczaj pojawienie się form strzępkowych spowodowane jest pośrednim działaniem

ciśnienia czy mieszania [33]. Zwiększona lub zmniejszona ilość ruchów łopatek przekłada się bezpośrednio na zmniejszenie ilości tlenu w pożywce. Nieliczne opisane badania wskazują, że nadmierna prędkość łopatek może wpływać na uszkodzenie komórek [21], ale nie udowodniono, jak siły ścinania przekładają się na zmianę morfologii i wzrost form nitkowatych. Z kolei zwiększone ciśnienie może powodować stres oksydacyjny w komórkach, co przekłada się na pojawienie się większej (o 25%) ilości form strzępkowych w hodowli [35].

Ostatnią grupą czynników, które mogą determinować zmianę wyglądu komórek drożdży z rodzaju *Yarrowia* są składniki pokarmowe, a w zasadzie ich dostępność dla mikroorganizmów. Najbardziej przebadanym związkiem, którego obecność w podłożu, gwarantuje uzyskanie form strzępkowych jest N-acetyloglukozamina. Przystawanie tego związku powoduje, że w ścianie komórkowej drożdży obecne są zwiększone ilości aminocukrów i zmniejszone ilości białka. Zmniejszona ilość białka w ścianie komórkowej może być przyczyną zmiany formy z drożdżowej w strzępkową [18]. Przez długi czas uważano, również, że substraty hydrofobowe, w tym oliwa z oliwek, n-alkany czy olej rycynowy [36] mogą modulować zmianę form morfologicznych komórki drożdżowej, jednakże mechanizmy tego zjawiska nie zostały do dziś poznane. Z kolei nadmiar węgla w stosunku do azotu (C/N), nazywany potocznie „głodem azotowym” powoduje niemal zawsze pojawienie się form strzępkowych. To zjawisko nie jest pożądane podczas produkcji lipidów w komórkach drożdży. Celem wyeliminowania tego zjawiska, z pomocą danych transkryptomicznych, zidentyfikowano szereg genów odpowiedzialnych za reakcje stresowe. Ustalono, że delecja genu *MHY1* zapobiega tworzeniu się strzępek, niezależnie od stosowanych warunków stresowych [37] czy źródeł azotu [38]. Obecność nadmiernej ilości β -karotenu, intermediatów metabolizmu w komórkach drożdży, również powoduje obecność zwiększonej ilości strzępek, co zaburza dalszą produkcję tego pożądanego przemysłowo związku. Delecja genów *CLA4* i *MHY1* pozwala uzyskać duże ilości β -karotenu i zachować owalny kształt komórek podnosząc wydajność procesu o 139% [39]. Zmiana źródła azotu też może wpływać na zmianę formy, ale proces ten możliwy jest już do wyeliminowania na etapie ustalania optymalnych warunków hodowli [21].

Badania wpływu jonów metali na dimorfizm drożdży z rodzaju *Yarrowia* są również udokumentowane [40-42]. Początkowo sądzono, że zarówno nadmiar, jak i brak jonów magnezu Mg^{2+} , żelaza Fe^{3+} i wapnia Ca^{2+} wpływają na dimorfizm [40]. Badania te jednak, były mało szczegółowe, a wpływu jonów wapnia nie obserwowano w innej pracy [41]. Szczegółowe prace prowadzone w kontrolowanych bioreaktorach, potwierdziły możliwość akumulacji dużych ilości żelaza w komórkach drożdży, a uzyskane dane wskazały, że w połączeniu ze zmianą pH środowiska, jony żelaza są przełącznikiem morfogenetycznym [42].

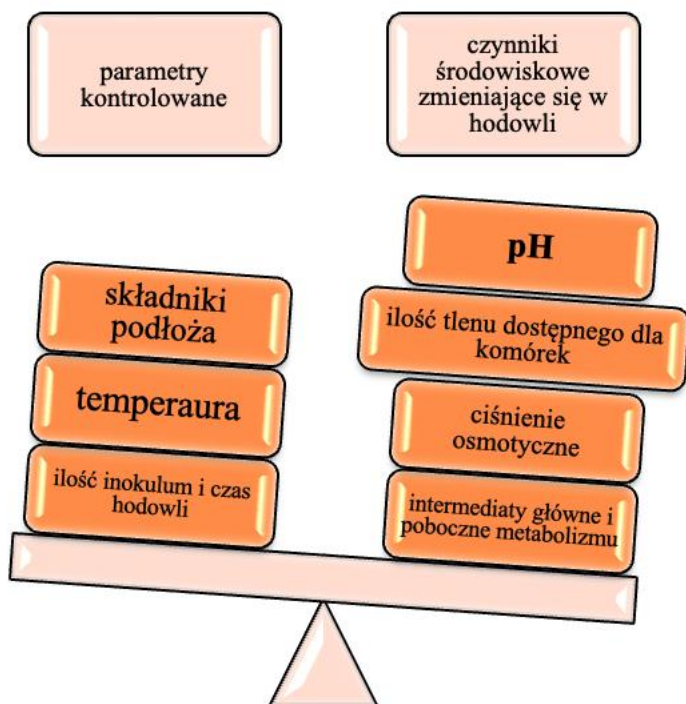
Największym wyzwaniem, które stoi przed naukowcami w odniesieniu do zjawiska dimorfizmu drożdży *Yarrowia*, będzie opracowanie metody pozwalającej na dokładną charakterystykę i ujednoczenie procedur związanych z takimi badaniami. Dotychczas do oceny morfologii i dimorfizmu drożdży *Yarrowia* stosowane były, między innymi: mikroskopia optyczna, manualne zliczanie komórek, automatyczna mikroskopia, elektronowa mikroskopia, metody dyfrakcyjne bądź cytometria przepływowa [18-42]. Rozwiązaniem takich problemów może być zastosowanie dwuzakresowego spektrometru MIR/NIR z systemem mikroskopii w podczerwieni z wytrząsarką. System ten stanowi szerokie rozwiązanie pozwalające na monitoring procesów syntezy i bio-/degradacji

w krótkim (kilkuminutowym) czasie od chwili poboru próbki, dla rozmiarów cząstek od 6,25 mikrometrów wzwyż. Idealnie nadaje się do pomiaru próbek niejednorodnych. System taki dostarcza wysokiej jakości obrazy, przy niskim koszcie analizy i zwiększonym bezpieczeństwie pracy. Ważne parametry monitorowania i kontroli procesu biologicznego czy syntezy chemicznej mogą być dostępne niemal natychmiast. Wykorzystanie takiej aparatury do oceny zmian morfologii planowane jest w ramach badań własnych związanych ze szczepem drożdży *Y. lipolytica* IPS21 prowadzonych w Łukasiewicz – Łódzkim Instytucie Technologicznym.

4. Wpływ czynników środowiskowych na zdolność drożdży *Y. lipolytica* do produkcji zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych

Syntetyczny przegląd na temat wpływu różnych czynników na produkcję kwasu cytrynowego, biosurfaktantów, γ dekalaktonu czy lipidów opisano szeroko w wielu publikacjach [19, 21, 43-46].

W polskiej literaturze przedmiotu brakuje uporządkowanych informacji na temat wpływu czynników środowiskowych (schemat 2) i warunków wzrostu na potencjał drożdży *Y. lipolytica* do produkcji zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych. Z tego powodu omówiony zostanie aktualny stan wiedzy dotyczący wpływu parametrów hodowlanych na ekspresję zewnątrzkomórkowych proteaz. Przedmiot tych badań jest o tyle ważny, iż światowa produkcja enzymów proteolitycznych w roku 2021 warta była ponad 5 miliardów dolarów, z wyraźną tendencją wzrostu.



Schemat 2. Czynniki środowiskowe i parametry hodowli wpływające na potencjał produkcji proteaz przez drożdże z rodzaju *Yarrowia*, opracowanie własne na podstawie [47]

Proteazy uważane są za jedną z najważniejszych grup enzymów produkowanych komercyjnie i przemysłowo. Mają zastosowanie w różnych sektorach: w biotechnologii jako dodatki do żywności, związki farmaceutyczne i kosmetyczne oraz są wykorzystywane jako detergenty [47]. Poniżej scharakteryzowane zostaną najważniejsze czynniki i warunki wzrostu mające wpływ na ekspresję i ilość wydzielanych przez *Y. lipolytica* proteaz pozakomórkowych.

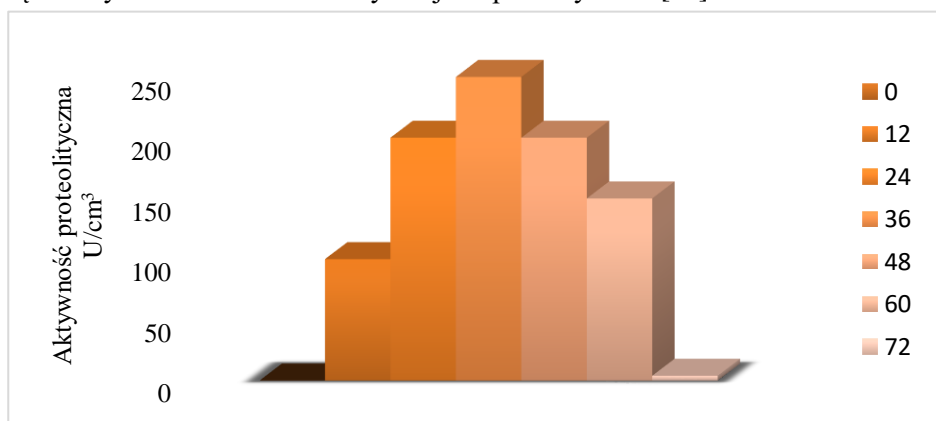
4.1. Wpływ pH i temperatury na biosyntezę proteaz

Ze wszystkich czynników środowiskowych i zmian w hodowli spowodowanych procesami metabolicznymi podczas biosyntezy proteaz największe znaczenie ma odczyn środowiska. Jest to główny parametr determinujący ilość wydzielanych enzymów na zewnątrz komórki. Drożdże z rodzaju *Y. lipolytica* wykazują ekspresję zarówno zewnątrzkomórkowych proteaz alkalicznych, jak i zewnątrzkomórkowych proteaz kwaśnych, nieliczne szczepy wydzielają do środowiska proteazy obojętne [48]. Sekrecja do podłoża zewnątrzkomórkowych proteaz kwaśnych i proteaz zasadowych związana jest z innymi mechanizmami regulacyjnymi. Uwalnianie enzymów kwaśnych nie jest kontrolowane. Aktywacja proteaz kwaśnych (gen *AXPI*) zachodzi już poza komórką poprzez autokatalityczne odcięcie pro peptydu w niskim pH środowiska. Z kolei uwalnianie proteaz zasadowych ściśle związane jest z obecnością odpowiednich białek, jako induktorów w podłożu hodowlanym. Wyniki dużej ilości badań pozwoliły ustalić sekwencję genu *XPR2* kodującego zasadową proteazę oraz poszczególne etapy dojrzewania i sekrecji tego białka. Gen *XPR2* koduje 454 aminokwasowy (55kDa) pre-proenzym. Na N-końcu białko to zawiera sekwencję sygnałną (22 aminokwasy), kolejno odcinek dziewięciu dipeptydów X-Ala, X-Pro, które zostają odcięte przez dipeptydyloaminopeptydazę. Dalej białko to zawiera pro region (124 aminokwasy), z jednym miejscem N-glikozylowanym. Wzdłuż pro regionu znajdują się dwa aminokwasy Lys-Arg, które są potencjalnymi substratami do cięcia dla dipeptydyloaminopeptydazy – kodowanej przez gen *XPR6*. Jednakże tylko drugi dipeptyd (Lys156 Arg157) ulega przecięciu, zwalniając dojrzałe białko [49].

Proteazy alkaliczne mogą pełnić też rolę źródła węgla i azotu dla szczepów z rodzaju *Yarrowia*, kiedy w środowisku wyczerpane zostaną pozostałe składniki odżywcze [50]. Charakter reakcji chemicznej, którą katalizują proteazy czy peptydazy sprawia, że aktywność tych enzymów musi być ściśle kontrolowana, w celu uniknięcia nadmiernej i niebezpiecznej hydrolizy białek potrzebnych komórce do prawidłowego funkcjonowania w etapie wydzielania ich z komórki. Enzymy proteolityczne wydzielane są z komórki w pH 7-9, niezależnie od obecnych w podłożu źródeł węgla. Jednakże najwyższą aktywność enzymów obserwuje się przy pH równym 8 [51]. Lopez-Flores i wsp. (2016) wskazali możliwość produkcji proteaz zasadowych przez drożdże *Yarrowia* w pH 5-9, ale najwyższą aktywność enzymu uzyskano w pH ponad 7 [52]. W innych badaniach opisano wzrost aktywności proteazy wraz ze spadkiem pH w hodowli. W tym przypadku do podłoża wydzielana była zewnątrzkomórkowa proteaza kwaśna [53]. Drożdże z rodzaju *Yarrowia* w zależności od warunków hodowli poza proteazami mogą wydzielać do podłoża produkty uboczne metabolizmu, które wpływają na zmianę pH i mogą doprowadzić do zaburzeń procesu oraz spowodować uszkodzenie zewnątrzkomórkowych białek, szczególnie w przypadku pozyskiwania białek rekombinowanych [54]. Ważnym zagadnieniem opisanym stosunkowo niedawno jest potrzeba delekcji genów wewnątrzkomórkowych proteaz u biorecy genów pozyskanych z *Yarrowia*. W innym przypadku

wydzielanie proteaz do podłoża będzie zależne od pH charakterystycznego dla biorcy [55]. Szczepy z gatunku *Y. lipolytica* posiadają szereg proteaz wewnątrzkomórkowych, ale ekspresja tych enzymów nie jest zależna od zmian pH środowiska. Związane jest to z utrzymaniem wewnątrzkomórkowego pH przez mikroorganizmy w obrębie pH 6,8, niezależnie od osiągniętych wartości w medium hodowlanym [49]. Wartość pH w medium hodowlanym nie tylko determinuje możliwość wydzielania enzymów na zewnątrz komórki, ale wpływa też na sposób działania wydzielanych białek. W pH 8 pozakomórkowe proteazy zasadowe wykazują aktywność esterazową, a w pH 9 kazeinolityczną wobec substratów zawierających argininę, lizynę lub tyrozynę [56].

Aktywność enzymatyczna i ilość białek wydzielanych z komórki ściśle związana jest też z optimum temperatury wyznaczonej dla danej grupy mikroorganizmów. Wzrost temperatury zwiększa szybkość reakcji enzymatycznych, szczególnie tych wykorzystywanych do procesów budowy biomasy mikroorganizmów. Ponieważ enzymy to substancje białkowe, wzrost temperatury powyżej temperatury optymalnej dla jego działania powoduje stopniową denaturację i zanik zdolności katalitycznych. Większość enzymów zewnątrzkomórkowych wydzielana jest w fazie stacjonarnego wzrostu, co powiązane jest z koniecznością uzyskania odpowiedniej ilości biomasy. Dla zewnątrzkomórkowych proteaz alkalicznych produkowanych przez szczepy z rodzaju *Yarrowia* zakres temperaturowy mieści się w granicy 25–45°C. Poniżej i powyżej tych wartości aktywność enzymów maleje i ich stężenie również się zmniejsza. Z kolei powyżej temperatury 60°C większość enzymów ulega nieodwracalnej denaturacji [55]. Stabilność enzymów mieści się również w zakresie 25–45°C [47]. Lotfi i wsp. (2015) opisali temperaturę 30°C jako optymalną dla produkcji alkalicznych proteaz zasadowych na podłożach zawierających różne źródła węgla [57]. Maksymalną aktywność enzymu obserwowano w 72 h. Z kolei w pracy López Flores i wsp. (2016) wykazali maksymalną produkcję już w 36 h (wykres 1). Skrócenie czasu budowania biomasy i wydzielania produktów na zewnątrz komórki związane było z zastosowaniem wyższej temperatury 45°C [52].



Wykres 1. Aktywność proteolityczna uzyskana przez szczep *Y. lipolytica* w warunkach podłoża stałego w temp 45°C w czasie 0-72 h, opracowanie własne na podstawie [52]

Podsumowując, biosynteza zewnątrzkomórkowych proteaz przez drożdże z gatunku *Y. lipolytica* ściśle powiązana jest z temperaturą w jakiej prowadzona jest proces. Wskazano również, że parametr ten jest istotny do uzyskania wysokich ilości produktów zewnątrzkomórkowych, ale przy równoczesnej kontroli odczynu środowiska. Wszelkie opisane

prace, nad uzyskaniem wysokich ilości proteaz w supernatantach hodowlanych wskazują, że konieczna jest wieloczynnikowa optymalizacja warunków na etapie wzrostu mikroorganizmów, biosyntezy enzymów, jak i ich wydzielania z komórki [19, 21, 43-52].

4.2. Wpływ innych czynników na biosyntezę proteaz

Procesy biosyntezy wybranych produktów sensu stricto uzależnione są również od dostępności i rodzaju składników pokarmowych obecnych w środowisku. W trakcie procesu przemysłowego ilości i rodzaj składników pokarmowych wielokrotnie może ulegać kierunkowej bądź spontanicznej transformacji. Mikroorganizmy, w tym drożdże z rodzaju *Yarrowia* wykształciły szereg wewnątrzkomórkowych procesów biochemicznych, zwanych sygnałami, pochodzących z zewnątrz komórki lub z jej wnętrza, w odpowiedzi na zmiany w środowisku.

Obszerne badania związane z systemem represji i indukcji katabolicznej i ich roli w przyswajaniu węgla lub azotu opisane były w literaturze dla drożdży metylotroficznych czy *Saccharomyces cerevisiae* [58, 59]. Nieliczne badania zostały przeprowadzone dla drożdży z rodzaju *Yarrowia*.

Potrzeba skrócenia czasu procesu i możliwość użycia źródeł odpadowych do wzrostu i produkcji pożądanych związków to główne cele biotechnologii procesowej. Zatem konieczne wydaje się poznanie indywidualnych związków przyczynowo skutkowych na poziomie komórkowym. Wiedza ta pozwoli na wzrost wydajności działań inżynierskich. U drożdży z rodzaju *Yarrowia* niska ilość azotu (N) w podłożu powoduje przesunięcie metabolizmu tlenowego w kierunku akumulacji lipidów i produkcji kwasu cytrynowego, natomiast wysoka ilość azotu N w podłożu przekłada się na wzrost biomasy [60], co jednocześnie powoduje zwiększoną biosyntezę enzymów. Goncharov i wsp. (2010), opisali wpływ różnych źródeł azotu na syntezę enzymów proteolitycznych dla szczepu drożdży *Y. lipolytica* 2061. Przetestowano między innymi; żelatynę, kazeinę, białko krowie i hemoglobinę. Okazało się, że w podłożu z kazeiną biosynteza enzymów proteolitycznych była najwyższa [61]. Wy tłumaczono to zjawiskiem występowania miceli. Udowodniono, że w roztworach wodnych kazeina w może bowiem występować w formach miceli. Te z kolei mają domeny hydrofobowe zwrócone do wnętrza, a hydrofilowe w kierunku rozpuszczalnika. Wpływa to bezpośrednio na łatwe wiązanie wody czy enzymów. Z kolei Akpınar i inni (2011) prowadzili badania na podłożach zawierających odłuszczone mleko, glutaminę i glukozę. Dodatek do podłoża glukozy czy glutaminy wpływał negatywnie na całokształt metabolicznych przemian szczepu z rodzaju *Yarrowia*, co przekładało się na zmniejszenie syntezy enzymów proteolitycznych [51]. Podobne dane opisane zostały przez Ogrydziak i wsp. (2003). Udowodnili oni, że niektóre dodatkowe źródła węgla i azotu w podłożu mogą hamować procesy wydzielania proteaz oraz rybonukleaz z komórki drożdży z rodzaju *Yarrowia* [62]. Cesar Soares Sales i wsp. (2022) wykazali z kolei, iż podczas biotransformacji politereftalanu etylenu, zmiana ilości i rodzaju składników pokarmowych wpływała na ekspresję proteaz. Badania prowadzono na podłożach trzyskładnikowych YPD (ang. 1% yeast extract, 2% peptone and 2% dextrose) oraz YTD (ang. 1% yeast extract, 2% tryptone and 2% dextrose). Wykazano, że maksymalną ekspresją proteaz uzyskano dopiero po 80 h. W przypadku podłoży dwuskładnikowych YP (ang. 1% yeast extract, 2% peptone) i YT (ang. 1% yeast extract, 2% tryptone) maksymalną aktywność proteolityczną obserwowano już po 20 h. Jednakże, potem następował spadek ilości wydzielanych z komórki enzymów. Zróżni-

cowanie tych wyników wskazuje jak duże ma znaczenie źródło węgla na przebieg procesu formowania i wydzielania enzymów proteolitycznych z komórki [63].

Wieczorek i inni opublikowali w 2021 pracę wskazującą, że dodatek odpadowych strużyn garbarskich do modyfikowanego podłoża YPG składającego się z 1,5% (w/o) ekstraktu drożdżowego i 0,5% (w/o) chlorku sodu, powoduje wzrost stężenia biomasy (tab. 2) i wzrost pH w podłożu powyżej 9, u szczepu z rodziny Dipodascaceae. Szczep ten zidentyfikowanego jako *Y. lipolytica*. Te badania wskazały, na możliwość degradacji odpadowych strużyn garbarskich (1%) [7] i były wstępem do badań nad produkcją aminokwasów lub proteaz na źródłach opadowych z udziałem szczepu z gatunku *Y. lipolytica* IPS21.

Tabela. 2. Wpływ składu podłoża hodowlanego na stężenie biomasy drożdży z rodziny *Dipodascaceae* (*Y. lipolytica* IPS21)

Wariant	24 h	48 h
	Stężenie biomasy [g _{s.m.} /dm ³]	
Podłoże hodowlane z pożywką YPG i drożdżami	1,45 ±0,07	1,78 ±0,09
Podłoże hodowlane z pożywką YPG i strużynami garbarskimi 0,1% i drożdżami	1,65 ±0,08	2,08 ±0,10
Podłoże hodowlane z pożywką YPG i strużynami garbarskimi 1% i drożdżami	1,71 ±0,08	2,20 ±0,10

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [7].

Lopez i wsp. (2016), badając kinetykę procesu namnażania lipaz przy zastosowaniu różnych warunków ciśnienia na etapie wzrostu biomasy i etapie produkcji enzymów (od 1 do 5 barów) zaobserwowali również wpływ zmian ciśnienia na kinetykę biosyntezy proteaz. Wysokie ciśnienie na etapie wzrostu komórek wpływało na obniżenie ekspresji w całym okresie produkcji, natomiast zastosowanie niskiego ciśnienia 1 bar na początku i poniesienie go do 5 barów na etapie wydzielania produktów do podłoża, wpłynęło na intensyfikację procesów biosyntezy proteaz. Prawdopodobnie wysokie ciśnienie ułatwiło wydzielanie produktów do środowiska, poprzez wpływ na błony komórkowe drożdży [53]. Przerwanie błon komórkowych celem zwiększenia przepuszczalności i indukcji promotorów enzymów proteolitycznych można uzyskać również poprzez wprowadzenie dodatkowych związków chemicznych np.: detergentów bądź NaOH. Innym sposobem jest podniesienie temperatury w celu przyśpieszenia autolizy komórek, co może powodować wzrost ilości pożądaných produktów w środowisku [64].

5. Podsumowanie

Zastosowanie zewnątrzkomórkowych proteaz jako katalizatorów stanowi atrakcyjną i przyjazną dla środowiska alternatywę dla syntez z użyciem tradycyjnych substancji chemicznych. Stale rosnące zapotrzebowanie na te enzymy sprawia, że badania rozwijają się w kierunku poszukiwania nowych mikroorganizmów wytwarzających proteazy, ulepszania właściwości istniejących już biokatalizatorów do konkretnych znanych zastosowań przemysłowych oraz wytwarzania enzymów dostosowanych do zupełnie nowych reakcji.

W niniejszej pracy opisano możliwość produkcji zasadowych i kwaśnych proteaz przez niekonwencjonalne drożdże z gatunku *Y. lipolytica*. Nieskomplikowana struktura komórki drożdży czy krótki czas generacji są kolejnymi zaletami promującymi szczepu

Yarrowia jako producentów enzymów proteolitycznych. Przybliżono wpływ czynników środowiskowych na zmiany morfologiczne komórek drożdży z rodzaju *Yarrowia* oraz wskazano najważniejsze czynniki, które determinują możliwość biosyntezy dużej ilości zewnątrzkomórkowych enzymów. Ogromny potencjał wykorzystania proteaz w różnych branżach i opisane prace w tym zakresie, wskazują na potrzebę rozszerzenia podstawowych badań w kierunku stosowania odpadowych źródeł węgla, celem poprawy ekonomii procesu i zwiększenia skali produkcji tych enzymów.

Podziękowania

Praca ta została wykonana jako część projektu: *Określenie mechanizmów odpowiedzi komórek drożdży Yarrowia lipolytica IPS21 w środowisku wodnym w obecności strużyn garbarskich (SG)* finansowanego przez NCN w ramach inicjatywy MINIATURA 6 EDYCJA Nr DEC-2022/06/X/NZ9/00660, 02/BCS/12/10/1/2/2034.

Literatura

1. Mendez-Vilas A., *Microorganisms in Industry and Environment*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Proceedings of the III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2009) Lisbon, Portugal, 2011, s. 291-348.
2. Krzyczkowska J., Fabiszewska A.U., *Yarrowia lipolytica – niekonwencjonalne drożdże w biotechnologii*, Postępy Mikrobiologii, numer 15 tom 1, 2015, s. 33-43.
3. Fickers P., Benetti P.H., Waché Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.M., *Hydrophobic substrate utilisation by the yeast Y. lipolytica, and its potential applications*, FEMS Yeast Research, numer 5 tom 6-7, 2005, s. 527-543.
4. Gonçalves F.A.G., Colen G., Takahashi J.A., *Yarrowia lipolytica and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry*, The Scientific World Journal, tom 2014, 2014.
5. Pokora M., Niedbalska J., Szołtysik M., *Wpływ enzymów drożdży Yarrowia lipolytica na wybrane cechy jakościowe dojrzewających serów niskotłuszczowych*, ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość, numer 5 tom 72, 2010, s. 146-158.
6. Madzak C., Gaillardin C., and Beckerich J.M., *Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast Y. lipolytica: a review*, Journal of Biotechnology, numer 1-2 tom 109, 2004, s. 63-81.
7. Wieczorek D., Lasoń-Rydel M., Gendaszewska D., *Wpływ obecności strużyn garbarskich na wzrost drożdży z rodziny Dipodascaceae*, Technologia i Jakość Wyrobów, tom 66, 2021, s. 170-184.
8. Gendaszewska D., Wieczorek D., *Opady garbarskie jako surowce wtórne*, [w:] Janiszewska M. (red.), *Ochrona środowiska – nowe rozwiązania i perspektywy na przyszłość*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., 2022, s. 18-37.
9. Friedlander J., Tsakraklides V., Kamineni A., *Engineering of a high lipid producing Y. lipolytica strain*, Biotechnology for Biofuels, numer 9 tom 77, 2016, s. 2-12.
10. Yang R., Zheng, H., Peng H., Zhang S., Gang L., *Two-Stage Fermentation Enhanced Single-Cell Protein Production by Y. lipolytica from Food Waste*, Bioresource Technology, tom 361, 2022.
11. Qiao K., Imam Abidi S.H., Liu H., Zhang H., Chakraborty S., Watson N., Kumaran Ajikumar P., Stephanopoulos G., *Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast Yarrowia lipolytica*, Metabolic Engineering, tom 29, 2015, s. 56-65.
12. Xue Z., Sharpe P.L., Hong S.P., Yadav N.S., Xie D., Short D.R., Damude H.G., Rupert R.A., Seip J.E., Wang J., Pollak D.W., Bostick M.W., Bosak M.D., Macool D.J., Hollerbach D.H., Zhang H., Arcilla D.M., Bledsoe S.A., Croker K., McCord E.F., Tyreus B.D., Jackson E.N., Zhu Q., *Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of Yarrowia lipolytica*, Nature Biotechnology, numer 8 tom 31, 2013, s. 734-740.

13. Rywińska A., Juszczak P., Kancelista A., Biesiadecka A., Robak M., Niedbalska J., *Produkcja lipaz i kwasu cytrynowego z glicerolu odpadowego przez drożdże Y. lipolytica*, Inżynieria i Aparatura Chemiczna, numer 3 tom 4, 2009, s.105-106.
14. Fickers P., Benetti, P.H., Waché Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.M., *Hydrophobic substrate utilisation by the yeast Yarrowia lipolytica, and its potential applications*, FEMS Yeast Research, tom 5, 2005, s. 527-543.
15. Yuzbashev T.V., Yuzbasheva E.Y., Laptev I.A., Sobolevskaya T.I., Vybornaya T.V., Larina A.S., Gvilava I.T., Antonova S.V., Sineoky S.P., *Is it possible to produce succinic acid at a low pH?*, Bioengineered Bugs, numer 2 tom 2, 2011, s. 115-119.
16. Dobrowolski J.T., Biegalska A., Mirończuk A., *Characterization of erythrose reductase from Yarrowia lipolytica and its influence on erythritol synthesis*, Microbial Cell Factories, tom 16, 2017, s.118.
17. Hamimed S., Barkaoui T., Trabelsi I. Landoulsi A., Chatti A., *High-performance biological treatment of tuna wash processing wastewater using Y. lipolytica*, Environmental Science and Pollution Research, tom 28, 2021, s. 1545-1554.
18. Barth G., Gaillardin C., *Physiology and genetics of the dimorphic fungus Y. lipolytica*, FEMS Microbiology Reviews, tom 19, 1997, s. 219-237.
19. Coelho M.A.Z., Amaral P.F.F., Belo I., *Yarrowia lipolytica: an industrial workhorse*, [w:] Mendez Vilas A. (red.), *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, Formatex, Badajoz, 2010, s. 930-944.
20. Nicaud J.M., *Y. lipolytica*, Yeast, tom 29, 2012, s. 409-418.
21. Timoumi A., Guillouet S.E., Molina-Jouve C., Fillaudeau L., Gorret N., *Impacts of environmental conditions on product formation and morphology of Y. lipolytica*, Applied Microbiology and Biotechnology, numer 9 tom 102, 2018, s. 3831-3848.
22. Bouchedja D.N., Danthine S., Kar T., Fickers P., Sassi H., Boudjellal A., Blecker Ch., Delvigne F. *pH level has a strong impact on population dynamics of the yeast Y. lipolytica and oil micro-droplets in multiphasic bioreactor*, FEMS Microbiology Letters, numer 6 tom 365, 2018, s. 1-10.
23. Timoumi A., Cleret M., Bideaux C., Guillouet S. E., Allouche Y., Molina-Jouve C., Fillaudeau L., Gorret N., *Dynamic behavior of Yarrowia lipolytica in response to pH perturbations: dependence of the stress response on the culture mode*, Applied Microbiology and Biotechnology, numer 1 tom 101, 2017, s. 351-366.
24. Celińska E., *“Fight-flight-or-freeze” – how Y. lipolytica responds to stress at molecular level?*, Applied Microbiology and Biotechnology, tom 106, 2022, s. 3369-3395.
25. Ruiz-Herrera J., Sentandreu R., *Different effectors of dimorphism in Y. lipolytica*, Archives Microbiology, tom 178, 2022, s. 477-483.
26. Timoumi A., Bideaux C., Guillouet S.E., Allouche Y., Molina-Jouve C., Fillaudeau L., Gorret N., *Influence of oxygen availability on the metabolism and morphology of Y. lipolytica: insights into the impact of glucose levels on dimorphism*, Applied Microbiology and Biotechnology, tom 101, 2017, s. 7317-7333.
27. Belo I., Braga A., Mesquita D., Amaral L., Ferreira E., *Comparison of aroma production from castor oil by Y. lipolytica in airlift and STR bioreactors*, Journal of Biotechnology, tom 208, 2017, s. 208.
28. Biriukova E.N., Medentsev A.G., Arinbasarova A.I., Akimenko V.K., *Respiratory activity of yeast Y. lipolytica under oxidative stress and heat shock*, Mikrobiologiya, Numer 4 tom 77, 2008, s. 448-452.
29. Bellou S., Makri A., Triantaphyllidou I.E., Papanikolaou S., Aggelis G., *Morphological and metabolic shifts of Yarrowia lipolytica induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment*, Microbiology SGM, tom 160, 2014, s. 807-817.
30. Biriukova E.N., Medentsev A.G., Arinbasarova A.I. Akimenko V.K., *Adaptation of the yeast Y. lipolytica to heat shock*, Mikrobiologiya, numer 2 tom 76, 2007, s. 184-190.

31. Kawasse F.M., Amaral P.F., Rocha-Leao M.H.M., Amaral A.L., Ferreira E.C., Coelho M.A.Z., *Morphological analysis of Yarrowia lipolytica under stress conditions through image processing*, Bioprocess and Biosystems Engineering, tom 25, 2003, s. 371-375.
32. Hackenschmidt S., Bracharz F.R., Rolf D., Thürmer A., Bruder S., Kabisch J., *Characterization of three Yarrowia lipolytica strains in respect to different cultivation temperatures and metabolite secretion*, 2019.
33. Ibrahim D., Weloosamy H., Lim S.H., *Effect of agitation speed on the morphology of Aspergillus niger HFD5A-1 hyphae and its pectinase production in submerged fermentation*, World Journal of Biological Chemistry, tom 6, 2015, s. 265-271.
34. Andreishcheva E.N., Isakova E.P., Sidorov N.N., Abramova N.B., Ushakova N.A., Shaposhnikov G.L., Soares M.I., Zvyagilskaya R.A., *Adaptation to salt stress in a salt-tolerant strain of the yeast Yarrowia lipolytica*, Biochemistry, numer 9 tom 64, 1999, s. 1061-1067.
35. Lopes M., *Characterization of non-conventional yeasts under hyperbaric conditions: cellular response to oxidative stress*, Doctoral dissertation, University of Minho, Portugal, 2013.
36. Braga A., Mesquita D.P., Amaral A.L., Ferreira E.C., Belo I., *Quantitative image analysis as a tool for Yarrowia lipolytica dimorphic growth evaluation in different culture media*, Journal of Biotechnology, tom 217, 2016, s. 22-30.
37. Konzock O., Norbeck J., *Deletion of MHY1 abolishes hyphae formation in Y. lipolytica without negative effects on stress tolerance*, Public Library of Science One, numer 4 tom 15, 2020, s.1-11.
38. Konzock O., Zaghen S., Fu J., Kerkhoven E.J., *Urea is a drop-in nitrogen source alternative to ammonium sulphate in Y. lipolytica*, iScience, numer 12 tom 25, 2022, s. 1-16.
39. Mengmeng L., Zhang J., Ye J., Qi Q., Hou J., *Morphological and Metabolic Engineering of Yarrowia lipolytica to Increase β -Carotene Production*, ACS Synthetic Biology, numer 12 tom 10, 2021, s. 3551-3560.
40. Ota Y., Oikawa S., Morimoto Y., Minoda Y., *Nutritional factors causing mycelial development of Saccharomycopsis lipolytica*, Agricultural and Biological Chemistry, tom 48, 1984, s. 1933-1939.
41. Zinjarde S.S., Pant A., Deshpande M.V., *Dimorphic transition in Y. lipolytica isolated from oil-polluted sea water*, Mycology Research, tom 102, 1998, s. 553-558.
42. Cogo A.J.D., Façanha A.R., Teixeira L.R.S., Souza S.B., Rocha J.G., *Plasma membrane H⁺ pump at a crossroads of acidic and iron stresses in yeast-to-hypha transition*, Metallomics, numer 12 tom 12, 2020, s. 2174-2185.
43. Liu H.H., Ji X.J., Huang H., *Biotechnological applications of Y. lipolytica: past, present and future*, Biotechnology Advances, tom 33, 2015, s. 1522-1546.
44. Lopes M., Gomes A.S., Silva C.M., Belo I., *Microbial lipids and added value metabolites production by Yarrowia lipolytica from pork lard*, Journal of Biotechnology, tom 265, 2017, s. 76-85.
45. Marcinkiewicz M., Juszczyk P., Rywińska A., Rymanowicz W., *Wpływ warunków hodowli drożdży Yarrowia lipolytica na wydajność syntezy erytrytolu z glicerolu*, Nauki Inżynierskie i Techniczne, numer 6 tom 3, 2012, s.90-98.
46. Krzyśko-Łupicka T., Kręcidło M., Kręcidło Ł., *Stymulacja rozkładu substancji ropopochodnych w skażonej glebie z wykorzystaniem nadtlenu wodoru i szczepionki Y. lipolytica A 101*, Inżynieria Ekologiczna, tom 49, 2016, s. 56-65.
47. Bessadok B., Masari M., Brück T., Sadok S., *Characterization of the Crude Alkaline Extracellular Protease of Yarrowia lipolytica YITun15*, Journal of FisheriesSciences.com, numer 4 tom 11, 2017, s. 019-024.
48. Ogrzydziak D.M., Nicaud J.M., *Characterization of Yarrowia lipolytica XPR2 multi-copy strains over-producing alkaline extracellular protease - a system for rapidly increasing secretory pathway cargo loads*, FEMS Yeast Research, tom 12, 2012, s. 938-948.

49. Niedbalska J., Szołtysik M., Dąbrowska A., Chrzanowska J., *Drożdże Yarrowia lipolytica i ich uzdolnienia do syntezy enzymów hydrolitycznych*, Acta Sci. Pol., Biotechnologia, numer 4 tom 11, 2012, s. 25-38.
50. Ogrzydziak D.M., *Yeast Extracellular Proteases*, Critical Review in Biotechnology, numer 1 tom 13, 1993, s 1-55.
51. Akpınar O., Uçar F., Yalçın H.T., *Screening and regulation of alkaline extracellular protease and ribonuclease production of Yarrowia lipolytica strains isolated and identified from different cheeses in Turkey*, Annals Of Microbiology, tom 61, 2011, s. 907-915.
52. Lopez-Flores A.R., Luna-Urban C., Buenrostro-Figueroa J.J., Hernandez-Martinez S., Huerta-Ochoa S., Escalona-Buendia H., Aguilar-Gonzalez C.N., Prado-Barragan L.A., *Effect of pH, temperature and protein and carbohydrates source in protease production by Yarrowia lipolytica in solid culture*, Revista Mexicana de Ingeniería Química, numer 1 tom 15, 2016, s. 57-67.
53. Lopes M., Gomes N., Mota M., Belo I., *Y. lipolytica Growth Under Increased Air Pressure: Influence on Enzyme Production*, Applied Biochemistry and Biotechnology, tom 159, 2009, s. 46-53.
54. Vandermies M., Fickers P., *Bioreactor-Scale Strategies for the Production of Recombinant Protein in the Yeast Yarrowia lipolytica*, Microorganisms, numer 2 tom 7, 2019, s. 1-23.
55. Cui W., Wang Q., Zhang F., Zhang S.C., Chi Z.M., Madzak C., *Direct conversion of inulin into single cell protein by the engineered Yarrowia lipolytica carrying inulinase gene*, Process Biochemistry, tom 46, 2011, s. 1442-1448.
56. Czajgucka A., Chrzanowska J., Juszczak P., Szołtysik M., Połomska X., Wojtatowicz M., *Wzrost drożdży w modelowym serze i ich wpływ na degradację białek i tłuszczów*, ACTA SCIENTIARUM POLONORUM Biotechnologia, numer 1-2, tom 5, s 95-103.
57. Lotfi M., Beheshti Maal K., Nayeri H., *Evaluation of alkaline protease production and optimization of culture medium by Yarrowia lipolytica*, Biological Journal of Microorganism, numer 14, tom 4, 2015, s. 61-70.
58. Piecuch A., Obłąk E., *Mechanizmy odporności na stres środowiskowy*, Postępy Higieny, Medycyny Doświadczalnej, numer 67, 2013, s. 238-254.
59. Grabek-Lejko D., Sibirny V., Sibirny A., *Regulacja ekspresji genów w komórkach drożdży metylotroficznych*, Postępy Biochemii, numer 59 tom 1, 2013, s. 95-106.
60. Morin N., Cescut J., Beopoulos A., Lelandais G., Le Berre V., Uribealrea J.L., Nicaud J.M., *Transcriptomic analyses during the transition from biomass production to lipid accumulation in the oleaginous yeast Yarrowia lipolytica*, PLoS One, numer 11 tom 6, 2012.
61. Hapeta P., Kerkhoven E.J., Lazar Z., *Nitrogen as the major factor influencing gene expression in Yarrowia lipolytica*, Biotechnology Reports, tom 27, 2020, s. 1-10.
62. Goncharov A.M., Gavriljuk V.G., Matseljukh E.V., Vinnikov A.I., *Cultural parameters effect of biosynthesis of proteolytic enzyme complexes from Y. lipolytica*, Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Medicine, tom 1, 2010, s. 50-54.
63. Ogrzydziak D.M., *Regulation of Yarrowia lipolytica extracellular ribonuclease and alkaline protease production*, [w:] Wolf K., Breunig K., Barth G. (red.), *Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology*, 1st edn. Springer, Heidelberg, 2003.
64. Sales J.C.S., de Castro A.M., Ribeiro B.D., Coelho M.A.Z., *Post-Consumer Poly(ethylene terephthalate) (PET) Depolymerization by Yarrowia lipolytica: A Comparison between Hydrolysis Using Cell-Free Enzymatic Extracts and Microbial Submerged Cultivation*, Molecules, tom 27, 2022, s 1-17.

Wpływ czynników środowiskowych na dimorfizm drożdży *Yarrowia lipolytica* i biosyntezę proteaz zewnątrzkomórkowych

Streszczenie

W pracy przedstawiono wpływ czynników środowiskowych na zmiany morfologii i zdolność wydzielania proteaz przez drożdże *Y. lipolytica*. Proteazy zaliczane są do największej grupy enzymów przemysłowych; zajmują ponad 50% rynku sprzedaży tych surowców. Produkcja proteaz jest oparta głównie na przemyśle biotechnologicznym oraz na ekstrakcji z materiału zwierzęcego i roślinnego. Stosowanie enzymów, jako katalizatorów jest bardzo pożądane. W porównaniu do odpowiedników chemicznych, reakcje prowadzone z udziałem tych bioreagentów mogą być prowadzone w łagodnych warunkach reakcji, wykorzystują tanie ko-substraty (np. tlen) i wykazują wyjątkową selektywność oraz dobrą wydajność. Niestety ich wykorzystywanie bywa ograniczone przez niestabilność i wysoki koszt produkcji. W związku z tym muszą być prowadzone badania podstawowe, które pozwoliłyby na pokonanie tych barier i produkcję tańszych i stabilnych biokatalizatorów.

Słowa kluczowe: *Y. lipolytica*, proteazy, czynniki środowiskowe, dimorfizm

The influence of environmental factors on dimorphism and extracellular proteases biosynthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*

Abstract

The paper presents the influence of environmental factors on changes in morphology and the ability to secrete proteases by yeast *Y. lipolytica*. Proteases belong to the largest group of industrial enzymes; occupy over 50% of the sales market for these raw materials. The production of proteases is mainly based on the biotechnology industry and extraction from animal and plant material. The use of enzymes as catalysts is highly desirable. Compared to their chemical counterparts, the reactions carried out with these bioreagents, can be carried out under mild reaction conditions, use cheap co-substrates (e.g. oxygen) and show exceptional selectivity and good yield. Unfortunately, their use is sometimes limited by instability and high cost of production. Therefore, basic research is needed to overcome these barriers and produce cheaper and stable biocatalysts.

Keywords: *Y. lipolytica*, proteases, environmental factors, dimorphism

Celuloza bakteryjna – zastosowanie w medycynie oraz perspektywy na przyszłość

1. Wprowadzenie

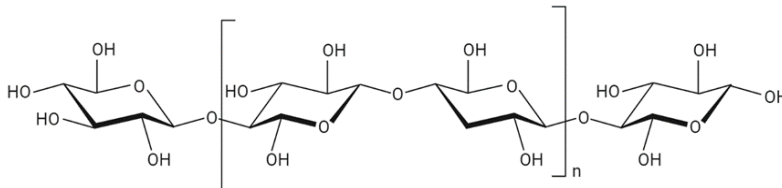
Celuloza jest jednym z najważniejszych i najpowszechniej występujących naturalnych biopolimerów na świecie. Jest to liniowy homopolisacharyd składający się z powtarzających się monomerów β -D-glukozy połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Dzięki wiązaniom wodorowym oraz siłom Van der Waalsa cząsteczki celulozy układają się w nanowłókna, które następnie tworzą mikrofibryle. Taka budowa zapewnia znaczną wytrzymałość mechaniczną oraz stabilność, przez co celuloza jest nanomateriałem chętnie wykorzystywanym w przemyśle [1].

Celuloza jest syntetyzowana przez różne organizmy. Głównymi jej producentami są rośliny, ale istotną rolę w jej pozyskiwaniu pełnią także glony, grzyby oraz bakterie. Ze względu na wzrost zapotrzebowania na ten surowiec, coraz więcej ośrodków naukowych interesuje się alternatywnymi metodami jego syntezy, głównie na drodze mikrobiologicznej. W związku z tym, w artykule uwagę skupiono na celulozie bakteryjnej. Unikalne właściwości fizykochemiczne tego nanomateriału pozwalają na jego wszechstronne zastosowanie w przemyśle biomedycznym i farmaceutycznym [2].

Celuloza bakteryjna ze względu na brak toksyczności, całkowitą biodegradowalność oraz biokompatybilność jest wykorzystywana np. jako materiał opatrunkowy, sztuczna skóra lub rusztowanie w inżynierii tkankowej [1, 3].

2. Charakterystyka celulozy bakteryjnej

Pierwsze doniesienia na temat celulozy produkowanej przez bakterie datowane są na 1886 rok, a ich autorem jest A.J. Brown. Podczas procesu fermentacji octowej, zaobserwował on rozwój galaretowatej półprzezroczystej membrany na powierzchni pożywki płynnej. Charakteryzowała się ona strukturą chemiczną tożsamą do tej znajdującej się w celulozie roślinnej [4, 5]. Jej producentem był drobnoustrój *Komagataeibacter xylinus* [6].



Rysunek 1. Struktura cząsteczki celulozy bakteryjnej [opracowanie własne]

¹ mrtapietrzak@gmail.com, studentka biotechnologii mikrobiologicznej I roku II stopnia, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, www.uni.lodz.pl/.

² k.prochon@gmail.com, studentka biotechnologii mikrobiologicznej I roku II stopnia, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, www.uni.lodz.pl/.

³ anialisowska567@gmail.com, studentka biotechnologii mikrobiologicznej I roku II stopnia, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, www.uni.lodz.pl/.

⁴ natalia.wronska@biol.uni.lodz.pl, adiunkt, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, www.uni.lodz.pl/.

Podstawowa struktura mikrofibryli celulozy bakteryjnej składa się z łańcuchów β -1,4-glukanu o wzorze cząsteczkowym: $(C_6H_{10}O_5)_n$, które połączone są ze sobą licznymi wiązaniami wodorowymi i siłami Van der Waalsa. Łańcuchy β -1,4-glukanu układają się w nanowłókna, które asocjują do struktur zwanych wstęgami. Są one tysiąc razy cieńsze niż włókna celulozy roślinnej, ich średnica nie przekracza 100 nm. W warunkach laboratoryjnych, włókna celulozy agregują i tworzą uwodnioną galaretowatą membranę. Zapewniają one wytrzymałość na rozciąganie, wysoki stopień adsorpcji wody. Sieć 3D, która powstaje po ułożeniu wstęg celulozowych, zawiera puste przestrzenie pomiędzy włóknami, które odpowiadają za porowatą strukturę tego biopolimeru. W cząsteczce biocelulozy obecna jest znaczna ilość grup hydroksylowych, które umożliwiają dość łatwą modyfikację tego polisacharydu poprzez przyłączanie innych nanocząstek. Dzięki temu można uzyskać materiały o wybranych przez siebie cechach [7].

Celuloza bakteryjna, pod względem budowy chemicznej, jest podobna do celulozy roślinnej, jednak jej właściwości chemiczne i fizyczne są różne. Celuloza bakteryjna jest pozbawiona lignin, pektyn, hemiceluloz oraz innych związków biogennych, które są składnikami ściany komórkowej roślin. Dzięki temu, nie wymaga wysokoenergetycznej i agresywnej, pod względem stosowanych odczynników, procedury oczyszczania, która jest konieczna w przypadku celulozy produkowanej przez rośliny [1]. Ponadto, celuloza bakteryjna charakteryzuje się także wyższym stopniem polimeryzacji i krystaliczności, w porównaniu do celulozy roślinnej. Właściwości te wpływają na jej elastyczność oraz wytrzymałość mechaniczną.

Tabela 1. Porównanie celulozy bakteryjnej i celulozy roślinnej [8, 9]

Cecha	Celuloza bakteryjna	Celuloza roślinna
Producent	<i>Acetobacter, Gluconobacter, Sarcina, Komagataeibacter, Rhizobium, Agrobacterium</i>	Bawełna, drewno, włókna łykowe, włókna nasienne, włókna liści, włókna owoców, włókna łądyg,
Wytrzymałość na rozciąganie	750-1080 MPa	200-300 MPa
Czystość	Wysoka	Niska (obecność lignin, pektyn, hemiceluloz)
Długość włókna	85-225 nm	20-100 nm
Stopień krystalizacji	84-89%	40-60%
Porowatość	Wysoka	Niska
Rozmiar porów	10 do 300 nm	1 do 100 nm
Ciągliwość	Wysoka	Niska
Hydrofilowość	Wysoka	Umiarkowana
Stabilność	Wysoka	Wysoka

Wyniki badań naukowych sugerują, że wytwarzanie celulozy przez *K. xylinus* może być mechanizmem obronnym przed szkodliwymi czynnikami środowiska (promieniowanie UV, niska wilgotność) [3, 10]. Bakterie, dzięki celulozie tworzą tzw. biofilm, który jest zabezpieczeniem przed czynnikami zewnętrznymi. Do syntezy celulozy zdolnych jest kilka gatunków bakterii. Należą one głównie do rodzajów *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Komagataeibacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* oraz *Sarcina* [7]. Najwydajniejszymi producentami celulozy są bakterie *Komagataeibacter xylinus*. Są to Gram-ujemne, niepatogenne pałeczki tlenowe zdolne do metabolizowania szerokiego zakresu źródeł węgla. W ciągu 1 sekundy pojedyncza komórka *K. xylinus* jest w stanie spolimeryzować

200000 cząsteczek glukozy do łańcuchów β -1,4-glukanu, które następnie asocjują do postaci nanowłókien.

Biosynteza celulozy bakteryjnej jest szeregiem złożonych procesów metabolicznych, w które zaangażowanych jest wiele specyficznych enzymów i białek regulatorowych. Proces ten składa się z kilku etapów, są to: fosforylacja glukozy, izomeryzacja glukozo-6-fosforanu, przekształcenie glukozo-1-fosforanu do urydynodifosforanu glukozy (UDP-glukozy) i synteza celulozy [1].

3. Zastosowanie celulozy bakteryjnej w medycynie

3.1. Opatrunki i leczenie trudno gojących się ran

Skóra odgrywa istotną rolę w życiu człowieka, ponieważ jej głównym zadaniem jest ochrona organizmu przed czynnikami zewnętrznymi oraz kontrolowanie temperatury ciała. Stanowi ona barierę pomiędzy środowiskiem zewnętrznym, a wewnętrznym, dlatego tak ważne jest utrzymywanie jej prawidłowej struktury i leczenie wszelkich jej urazów. Proces gojenia się ran obejmuje kilka etapów: hemostazę, stan zapalny oraz proliferację i przebudowę tkanki ziarninowej. Skutecznemu i szybkiemu gojeniu się ran sprzyja wilgotne środowisko i tworzenie izolacji termicznej. Dlatego też celuloza bakteryjna stanowi doskonały materiał, który może być stosowany jako opatrunek na rany. Opatrunki z celulozy bakteryjnej są cenione również ze względu na nietoksyczność, nieprzywieranie oraz niepowodowanie alergii. Fu i wsp. (2013) prowadzili badania na zwierzętach, które dowiodły, że opatrunki na bazie celulozy bakteryjnej mogą zmniejszać proces zapalny oraz przyspieszać regenerację tkanek, co powoduje szybsze gojenie się ran [1, 11].

Opatrunki z celulozy bakteryjnej nie wykazują aktywności przeciwdrobnoustrojowych, dlatego też bardzo często łączy się je z innymi związkami np. nanocząstkami srebra. Wspomniane nanocząstki wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe oraz mogą powodować uwalnianie reaktywnych form tlenu i w konsekwencji niszczyć komórki bakterii. Ponadto, kompozyty impregnowane nanocząstkami srebra są przezroczyste, co ułatwia wizualizację procesu gojenia się rany [7, 12].

Jedną z nowszych strategii udoskonalenia opatrunku z celulozy bakteryjnej jest włączenie mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs, ang. *Mesenchymal Stem Cells*) do macierzy polisacharydu. MSCs mogą różnicować się w co najmniej dwa typy komórek, włączając w to komórki kości, mięśni, chrząstki czy tłuszczu. MSCs posiadają dużą zdolność do samoodnowy, zachowując przy tym multipotencję. Te cechy przyczyniają się do poprawy procesu gojenia, dlatego oczekuje się, że dodanie MSCs do celulozy bakteryjnej wykaże wysoki potencjał regeneracyjny [13].

Do kompozytów celulozowych można także wprowadzać czujniki oraz materiały uwalnijące leki. Tego typu materiały mają potencjał do monitorowania procesu gojenia się ran u hospitalizowanych pacjentów. Zastosowanie takich kompozytów ułatwiłoby opiekę medyczną nad pacjentami z rozległymi oparzeniami ciała [13]. Meneguini i in. (2020) prowadzili badania nad potencjalnym wykorzystaniem celulozy bakteryjnej jako nośnika w systemach dostarczania leków dojelitowych, leków drażniących błonę śluzową żołądka oraz preparatów ulegających inaktywacji w kontakcie z sokiem żołądkowym [14]. Innymi lekami, które również mogą być włączone do celulozy bakteryjnej są leki przeciwzapalne takie, jak ibuprofen oraz leki przeciwdrobnoustrojowe np. antybiotyki [15].

Hydrożele są doskonałymi opatrunkami stosowanymi w leczeniu oparzeń. Gupta i in. (2020) przygotowali hydrożele z celulozy bakteryjnej połączonej z nanosrebrem, które

cechowwały się aktywnością przeciwbakteryjną i działaniem przeciwutleniającym. Dzięki tym właściwościom preparat mógłby znaleźć potencjalne zastosowanie w leczeniu przewlekłych ran [16].

3.2. Leczenie oparzeń

Oparzenia skóry mogą skutkować rozległymi urazami skórnymi. Klasyfikowane są według trzech stopni, w zależności od głębokości i rozległości rany. Proces gojenia tkanek poparzonych składa się z regeneracji naskórka oraz naprawy skóry właściwej. Opatrunki z celulozy bakteryjnej wykazują cechy, które są pożądane w przypadku takich ran, tj. wysoka zdolność zatrzymywania wody, sprężystość, wytrzymałość mechaniczna oraz biokompatybilność. Wilgotne środowisko wokół rany oraz pochłanianie wydzielin z ran będzie znacznie przyspieszało proces gojenia. Ponadto, utrzymywanie wysokiej wilgotności umożliwi praktycznie bezbolesną wymianę opatrunku. Dlatego też, stosowanie celulozy bakteryjnej w produkcji materiałów opatrunkowych jest bardzo korzystnym rozwiązaniem. Celuloza bakteryjna, w postaci maski, jest również stosowana w leczeniu rozległych oparzeń twarzy. Udowodniono, że zastosowanie takiego opatrunku przyspiesza zasklepienie się rany [17].

3.3. Medycyna implantacyjna

Celuloza bakteryjna jest obiecującym przedmiotem badań medycyny implantacyjnej, ponieważ może być przekształcana w różne formy, takie jak błony, matryce, czy hydrożele. Dlatego też znalazła zastosowanie w produkcji implantów dentystrycznych, implantów nerwowych i implantów cewki moczowej. Celuloza bakteryjna, dzięki dobrej wytrzymałości mechanicznej i wysokiej chłonności, znalazła także zastosowanie w leczeniu kanałowym w stomatologii [7].

Celuloza bakteryjna stosowana jest także w implantach okołocewkowych. Cewka moczowa składa się z dwóch warstw: górnej i dolnej. Dolna warstwa zbudowana jest z fibroblastów i komórek mięśniowych, co zapewnia elastyczność, a górna z nabłonka wielowarstwowego, dzięki czemu pełni funkcję bariery ochronnej. Celuloza bakteryjna okazała się skutecznym materiałem w regeneracji cewki moczowej, ponieważ jej gęste usieciowane i właściwości mechaniczne są zbliżone do tkanki natywnej tego narządu. Lima i in. (2017) badali zastosowanie membrany celulozowej jako ochronnej bariery cewki moczowej u samic szczura. Zaobserwowali, że błona celulozy była dobrze zintegrowana ze ścianą cewki moczowej, co przyspieszało proces przebudowy tkanki. Warstwa celulozy bakteryjnej zapobiegała rozkładowi substancji toksycznych w moczu i wspomagała wzrost komórek nabłonkowych. Wyniki przeprowadzonych badań wskazały na możliwość zastosowania celulozy bakteryjnej w rekonstrukcji ubytków cewki moczowej [7, 18].

4. Perspektywy na przyszłość

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat badania nad celulozą bakteryjną koncentrowały się głównie na optymalizacji warunków hodowli bakterii, takich jak proporcje składników pożywki hodowlanej, dobór źródła węgla, pH, temperatura oraz na wpływie innych dodatków do hodowli np. witamin. Ponadto, badane były różne metody hodowli organizmów, które syntetyzują omawiany polisacharyd (hodowla statyczna, mieszana, bioreaktory). Obecnie, badania prowadzone są w kierunku ulepszania szczepów bakterii na drodze inżynierii genetycznej, poprawie funkcjonalności celulozy bakteryjnej czy mani-

pulowaniu szlakiem biosyntezy celulozy. Dzięki tym działaniom, poszerza się potencjalny zakres zastosowań celulozy w medycynie i innych dziedzinach [19].

Biodruk 3D w medycynie jest aktualnie przedmiotem intensywnych badań naukowych. Wzbudza on nadzieję na zrewolucjonizowanie współczesnej implantologii i protetyki. Materiały przeznaczone do biodruku 3D muszą spełniać określone kryteria, takie jak biokompatybilność i brak cytotoksyczności. Ponadto, w przypadku zastosowania druku 3D w leczeniu ran istnieją dodatkowe wymagania, w których drukowana struktura musi utrzymać swój kształt w wilgotnym środowisku i zapewnić proliferację komórek [20]. Drukowanie 3D z użyciem celulozy bakteryjnej umożliwia uzyskanie precyzyjnego kształtu, struktury i dostosowanie materiału do konkretnych wymagań. Opatrunki wykonane na bazie celulozowego druku 3D mogą mieć cenne właściwości, takie jak zdolność do zwilżania rany, regulacja wilgotności, ochrona przed wtórnym zakażeniem czy przyspieszenie procesu gojenia [19].

Wzrasta zainteresowanie wykorzystaniem celulozy bakteryjnej w chirurgii ocznej przy produkcji syntetycznych rogówek. Połączenie tego materiału z polialkoholem winylowym (PVA) jest innowacyjnym podejściem do tworzenia sztucznej rogówki, co zmniejszyłoby problem poszukiwania dawców narządów rogówki. Kompozyt celulozy bakteryjnej i PVA nie wykazywał działania toksycznego w stosunku do linii komórkowych zrębu rogówki, sugerując obiecujące perspektywy wykorzystania tego kompozytu w leczeniu narządu wzroku [15].

5. Podsumowanie

Celuloza bakteryjna, syntetyzowana głównie przez bakterie *Komagataeibacter xylinus*, dzięki swoim unikalnym właściwościom, może być stosowana jako opatrunki chirurgiczne, biomateriały do regeneracji tkanek, implanty czy materiały hemostatyczne. Jej zastosowanie w medycynie i w inżynierii tkankowej, może przyczynić się do opracowania rewolucyjnych metod w zakresie terapii leczenia oparzeń, regeneracji tkanek i rozwoju zaawansowanych technologii medycznych. Jednak wiele badań nad celulozą bakteryjną znajduje się na wczesnym etapie, a preparaty produkowane są głównie na skalę laboratoryjną. Dlatego też konieczne są dalsze badania, które umożliwiłyby zastosowanie celulozy bakteryjnej w znacznie szerszym zakresie.

Literatura

1. Lupaşcu R.E., Ghica M.V., Dinu-Pirvu C-E., Popa L., Velescu B.Ş., Arsene A.L., *An overview regarding microbial aspects of production and applications of bacterial cellulose*, Materials, 15.2, 2022, 676.
2. Faeza E., Siti M.T., Norliza A.R., *Overview of bacterial cellulose production and application*, Agriculture and Agricultural Science Procedia, 2, 2014, s. 113-119.
3. Zhong C., *Industrial-scale production and applications of bacterial cellulose*, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8, 2020, 605374.
4. Brown A.J., *XLIII.-On an acetic ferment which forms cellulose*, Journal of the Chemical Society, Transactions, 49, 1886, s. 432-439.
5. Brown A.J., *XIX.-The chemical action of pure cultivations of bacterium aceti*, Journal of the Chemical Society, Transactions, 49, 1886, s. 172-187.
6. Ullah H., Wahid F., Santos H.A., Khan T., *Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites*, Carbohydrate polymers, 150, 2016, s. 330-352.

7. Choi S.M., Rao K.M., Zo S.M., Shin E.J., Han S.S., *Bacterial cellulose and its applications*, *Polymers*, 14.6, 2022, 1080.
8. de Amorim J.D.P., de Souza K.C., Duarte C.R., da Silva Duarte I., de Assis Sales Ribeiro F., Silva G.S., de Farias P.M.A., Stingl A., Costa A.F.S., Vinhas G.M., Sarubbo L.A., *Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review*, *Environmental Chemistry Letters*, 18, 2022, s. 851-869.
9. Naomi R., Bt Hj Idrus R., Fauzi M.B., *Plant- vs. Bacterial-derived cellulose for wound healing: A review*, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17.18, 2020, 6803.
10. Gregory D.A., Tripathi L., Fricker A.T.R., Asare1 E., Orlando I., Raghavendran V., Roy I., *Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications*, *Materials Science and Engineering*, 145, 2021, 100623.
11. Fu L., Zhang J., Yang G., *Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair*, *Carbohydrate polymers*, 92.2, 2013, s. 1432-1442.
12. Moradpoor H., Mohammadi H., Safaei M., Mozaffari H. R., Sharifi R., Gorji P., Sulong A.B., Muhamad N., Ebadi M., *Recent advances on bacterial cellulose-based wound management: promises and challenges*, *International Journal of Polymer Science*, 2022, 2022, s. 1-24.
13. Portela R., Leal C.R., Almeida P.L., Sobral R.G., *Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications*, *Microbial biotechnology*, 12.4, 2019, s. 586-610.
14. Meneguín A.B., da Silva Barud H., Sábio R.M., de Sousa P.Z., Manieri K.F., de Freitas L.A.P., Pacheco G., Alonso J.D., Chorilli M., *Spray-dried bacterial cellulose nanofibers: A new generation of pharmaceutical excipient intended for intestinal drug delivery*, *Carbohydrate polymers*, 249, 2020, 116838.
15. Swingler S., Gupta A., Gibson H., Kowalczyk M., Heaselgrave W., Radecka I., *Recent advances and applications of bacterial cellulose in biomedicine*, *Polymers*, 13.3, 2021, s. 412.
16. Gupta A., Briffa S.M., Swingler S., Gibson H., Kannappan V., Adamus G., Kowalczyk M., Martin C., Radecka I., *Synthesis of silver nanoparticles using curcumin-cyclodextrins loaded into bacterial cellulose-based hydrogels for wound dressing applications*, *Biomacromolecules*, 21.5, 2020, s. 1802-1811.
17. Gorgieva S., Trček J., *Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications*, *Nanomaterials*, 9.10, 2019, s. 1352-1367.
18. Lima S.V.C., Machado M.R., Pinto F.C.M., Lira M.M.D.M., de Albuquerque A.V., Lustosa E.S., da Silva J.G.M., Campos O., *A new material to prevent urethral damage after implantation of artificial devices: An experimental study*, *International Brazilian Journal of Urology*, 43, 2017, s. 335-344.
19. Buldum G., Mantalaris A., *Systematic understanding of recent developments in bacterial cellulose biosynthesis at genetic, bioprocess and product levels*, *International Journal of Molecular Sciences*, 22.13, 2021, 7192.
20. Leppiniemi J., Lahtinen P., Pajanan A., Mahlberg R., Metsä-Kortelainen S., Pinomaa T., Pajari H., Vikholm-Lundin I., Pursula P., Hytönen V.P., *3D-printable bioactivated nanocellulose-alginate hydrogels*, *ACS applied materials & interfaces*, 9.26, 2017, 21959-21970.

Celuloza bakteryjna – zastosowanie w medycynie oraz perspektywy na przyszłość

Streszczenie

Celuloza bakteryjna jest biopolimerem efektywnie wytwarzanym przez niepatogenne bakterie z rodzaju *Komagateibacter* sp., zwłaszcza gatunek *Komagateibacter xylinus*, w procesie fermentacji cukrów. Celuloza bakteryjna podobnie jak celuloza pochodzenia roślinnego jest nierozgałęzionym polimerem reszt β -D-glukozy, połączonych wiązaniami 1,4- β -glikozydowymi. Charakteryzuje się wysokim stopniem polimeryzacji, bardzo dużą czystością, elastycznością oraz dużym stopniem krystaliczności. Różnice w budowie, dotyczące

specyficznej nanostruktury polisacharydu, dają większy wachlarz zastosowań tego biomateriału w porównaniu z celulozą roślinną. Dzięki swoim właściwościom jest z powodzeniem wykorzystywana w przemyśle biomedycznym, spożywczym, papierniczym i włókienniczym. Obecnie dużą uwagę skupia się na zastosowaniu celulozy bakteryjnej jako opatrunków nowej generacji przyspieszających proces gojenia ran i wspomagających regenerację tkanek. Atutami celulozowych materiałów biomedycznych są dobre właściwości mechaniczne, biokompatybilność, biodegradowalność oraz niska toksyczność. Ponadto, omawiany polisacharyd ma zdolność do utrzymywania wilgotnego środowiska rany, co pozwala na niski stopień przylegania do tkanek, doskonałą izolację termiczną oraz nie hamuje wymiany gazowej. Celuloza bakteryjna jest również biopolimerem, dającym obiecujące perspektywy dla rozwoju medycyny regeneracyjnej oraz inżynierii tkankowej.

Niniejsza praca przeglądowa opisuje właściwości celulozy bakteryjnej, jej wykorzystanie w przemyśle biomedycznym oraz zwraca uwagę na dalsze perspektywy tego biopolimeru w medycynie.

Słowa kluczowe: celuloza bakteryjna, zastosowania biomedyczne, *Komagataeibacter xylinus*, biomateriał, inżynieria tkankowa

Bacterial cellulose - application in medicine and prospects for the future

Abstract

Bacterial cellulose is a bionanomaterial belonging to the natural polymers. It is produced by non-pathogenic bacteria of the genus *Komagataibacter* sp., especially the species *Komagataibacter xylinus*, through the fermentation of sugars. Cellulose is composed of linear homopolysaccharides linked by 1,4- β -glycosidic bonds to β -D-glucose units. It is characterized by a high degree of polymerization, high purity, flexibility, and a high degree of crystallinity. Differences in structure, particularly the specific nanostructure of the polysaccharide, provide a broader range of applications for this biomaterial compared to plant cellulose. Thanks to its properties, bacterial cellulose is successfully used in the biomedical, food, paper, and textile industries. Currently, significant attention is focused on the application of bacterial cellulose as a next-generation wound dressing that accelerates the wound healing process and supports tissue regeneration. The advantages of cellulose-based biomedical materials include good mechanical properties, biocompatibility, biodegradability, and low toxicity. Moreover, this polysaccharide has the ability to maintain a moist wound environment, allowing for minimal tissue adherence, excellent thermal insulation, and unhindered gas exchange. Bacterial cellulose is a polymer that holds promising prospects for the development of regenerative medicine and tissue engineering. This review describes the properties of bacterial cellulose, its utilization in the biomedical industry, and draws attention to the further prospects of this biopolymer in medicine.

Keywords: bacterial cellulose, biomedical applications, *Komagataeibacter xylinus*, biomaterial, tissue engineering

Mykoremediacja – przykład remediacji gleby skażonej radioizotopami

1. Wprowadzenie

Globalna, postępująca degradacja środowiska jest skutkiem intensywnej industrializacji i urbanizacji. Zanieczyszczenie gleby, wody i powietrza ma negatywny wpływ na zdrowie ludzi i funkcjonowanie ekosystemów. Dlatego niezbędne jest opracowanie metod usuwania szkodliwych substancji ze środowiska. Doskonałą alternatywą dla tradycyjnych technik rekultywacji jest bioremediacja, czyli wykorzystanie potencjału organizmów do transformacji, degradacji i eliminacji zanieczyszczeń. Jest to metoda efektywna, przyjazna dla środowiska i tańsza niż metody konwencjonalne. W bioremediacji stosuje się różne organizmy i materiały pochodzenia biologicznego, w tym grzyby, które pełnią istotne funkcje w ekosystemach i wykazują właściwości sprzyjające ich wykorzystaniu w procesie degradacji i usuwania zanieczyszczeń. Szczególną rolę pełnią one w remediacji środowiska skażonego radioizotopami. Izotopy promieniotwórcze należą do jednych z bardziej niebezpiecznych substancji, a ich obecność w środowisku jest głównie skutkiem testów broni nuklearnej i awarii reaktorów jądrowych.

W niniejszym rozdziale omówiona zostanie mykoremediacja, jako metoda wykorzystania grzybów do remediacji gleby skażonej radioizotopami. Przedstawione zostaną założenia tej metody i wybrane mechanizmy, dzięki którym grzyby wpływają na mobilność i biodostępność substancji radioaktywnych, przez co niwelują ryzyko ich toksycznego oddziaływania w środowisku.

2. Mykoremediacja jako metoda usuwania zanieczyszczeń ze środowiska

Mykoremediacja jest rodzajem bioremediacji, w której do usuwania lub degradacji szkodliwych substancji stosuje się grzyby lub produkty ich metabolizmu. Zastosowanie grzybów daje obiecujące rezultaty, ponieważ organizmy te posiadają specyficzne cechy, ułatwiające im funkcjonowanie w skażonym środowisku. Istnieje kilka sposobów, w jaki grzyby mogą wpływać na fizykochemiczny charakter i zawartość zanieczyszczeń w glebie.

2.1. Potencjał grzybów do bioremediacji

Grzyby powszechnie występują w glebie i pełnią w niej szereg ważnych funkcji [1]. Uczestniczą one w rozkładzie materii organicznej, przekształcając ją w biomasę, ditlenek węgla i kwasy organiczne. Biorą także udział w obiegu substancji odżywczych, poprawiają stosunki wodne i aktywność enzymatyczną w glebie. Organizmy te odpowiadają za kształtowanie struktury gleby i modyfikację nisz ekologicznych dla innych organizmów, regulując tym samym dynamikę procesów fizjologicznych w środowisku glebowym. Poza tym wpływają one na występowanie chorób, szkodników i wzrost innych organizmów. Przykładem są grzyby mikoryzowe, które poprawiają wzrost roślin poprzez zwiększenie pobierania składników odżywczych i ochronę przed patogenami.

¹ m.asztemborska@uw.edu.pl, Pracownia Izotopowa, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski.

Grzyby posiadają właściwości, dzięki którym mogą być z powodzeniem stosowane do bioremediacji skażonych środowisk. Należą do nich: adaptacja ekologiczna, cechy morfologiczne, właściwości ściany komórkowej i plastyczność metaboliczna [2].

Organizmy te charakteryzują się bardzo dobrą adaptacją ekologiczną [3]. Kolonizują one praktycznie wszystkie rodzaje siedlisk, od lądowych po wodne, występują w ciemnych i wilgotnych lasach, na gorących i suchych pustyniach, łąkach, bagnach, w osadach morskich itp. Wiele gatunków wykazuje odporność na bardzo ekstremalne warunki tj. temperatura, ciśnienie, zasolenie czy promieniowanie, dlatego można je znaleźć w takich miejscach jak kominy wulkaniczne, gorące źródła, kopalnie czy tereny skażone w wyniku katastrof nuklearnych. W takich niszach ekologicznych grzyby często wykazują zdolność do wydajnej biodegradacji zanieczyszczeń [4]. Gatunki wyizolowane ze środowiska o ekstremalnych warunkach mogą być zastosowane do bioremediacji zanieczyszczeń m.in. metale ciężkie, radionuklidy i toksyczne związki chemiczne, ponieważ ich mechanizmy fizjologiczne wspomagają przemianę i degradację tych zanieczyszczeń.

Właściwościom bioremediacyjnym grzybów sprzyjają również ich cechy morfologiczne. Grzyby charakteryzują się różnorodną morfologią, od postaci jednokomórkowych, takich jak drożdże, po formy wielokomórkowe, takie jak grzyby nitkowate. Dużą rolę przypisuje się wegetatywnej strukturze grzybów nitkowatych – grzybni. Jest to porowata sieć wielu wydłużonych komórek (tzw. strzępek), o średnicy od 1 do 30 mikronów i długości od kilku mikronów do kilku metrów, przenikająca materię w celu pozyskania substancji odżywczych [5]. Między innymi dzięki swojej morfologii, grzybnie mogą wiązać efektywnie różne substancje toksyczne [6, 7], co w połączeniu z dużą powierzchnią zajmowaną przez grzybnie w glebie (nawet kilku hektarów) potwierdza ich potencjalną przydatność w procesie bioremediacji.

Kolejnym czynnikiem determinującym potencjał bioremediacyjny grzybów jest budowa ściany komórkowej. W odróżnieniu od celulozowej ściany komórkowej roślin, ściana komórek grzybowych jest zbudowana głównie z glukanów (w tym najczęściej beta-glukanów) i glikoprotein, zawiera też chitynę i chitozan [8]. Dwa ostatnie wymienione związki, dzięki licznym grupom obdarzonym ładunkiem, odpowiadają w największym stopniu za biosorpcję zanieczyszczeń. W procesie biosorpcji i bioakumulacji udział biorą grupy funkcyjne takie jak grupy hydroksylowe, fosforanowe czy aminowe [9]. Zanieczyszczenia znajdujące się w środowisku w pierwszej kolejności wchodzi w interakcję z powierzchnią komórkową organizmu, a polimerowa struktura ściany komórkowej grzybów i jej skład biomolekularny sprzyjają usuwaniu licznych substancji ze skażonej gleby [2].

Grzyby mogą wykorzystywać jako źródło węgla i energii zróżnicowane związki, takie jak sacharydy, alkohole, kwasy organiczne, kwasy tłuszczowe, aminy, węglowodory alifatyczne i węglowodory aromatyczne. Są również w stanie wykorzystywać związki siarki, zarówno nieorganiczne, takie jak siarczany, siarczyny i tiosiarczany, oraz organiczne, takie jak glutation i metionina [5]. To właśnie ta plastyczność metaboliczna umożliwia grzybom wykorzystanie zanieczyszczeń jako źródła węgla i innych pierwiastków, jednocześnie substancje szkodliwe ulegają degradacji i detoksykacji.

Omówione cechy grzybów powodują, że zainteresowanie wykorzystaniem ich potencjału w bioremediacji jest uzasadnione, a lista gatunków, które wykazują predyspozycje do degradacji i usuwania zanieczyszczeń jest bardzo długa. Przykłady gatunków stosowanych w procesie mykoremediacji zebrano w tabeli 1.

Tabela 1. Przykłady grzybów stosowanych w procesie mykoremediacji z podziałem na rodzaj zanieczyszczeń

Metale ciężkie	Węglowodory poliaromatyczne, farmaceutyki	Pestycydy, insektycydy, herbicydy
<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Agaricus bitorquis</i> <i>Penicillium simplicissimum</i> <i>Penicillium janthinellum</i> <i>Trichoderma asperellum</i> <i>Pleurotus floridaus</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pleurotus eryngii</i>	<i>Cunninghamella elegans</i> <i>Myceliophthora thermophila</i> <i>Pleurotus eryngii</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Phanerochaete laevis</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Trametes versicolor</i>	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Ceriporia lacerata</i> <i>Cunninghamella elegans</i> <i>Lentinula edodes</i> <i>Lecanicillium saksenae</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Penicillium brevicompactum</i> <i>Penicillium decaturense</i> <i>Trametes versicolor</i>

Źródło: opracowanie własne na podstawie [2].

2.2. Mechanizmy mykoremediacji

Proces mykoremediacji odbywa się z wykorzystaniem różnych mechanizmów, które zależą od gatunku grzyba oraz właściwości chemicznych zanieczyszczenia. Jednym z mechanizmów jest biotransformacja, w czasie której grzyby, poprzez reakcje takie jak utlenianie, hydroliza, demetylacja, deaminacja itp. zmieniają charakter chemiczny substancji, ograniczając ich biodostępność i toksyczność [2]. Grzyby wykorzystują różne procesy enzymatyczne i nieenzymatyczne do neutralizacji toksycznych związków, głównie zanieczyszczeń organicznych, takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne czy pestycydy [10-12]. Zbliżonym do biotransformacji mechanizmem jest biomineralizacja, w wyniku której następuje przekształcenie zanieczyszczeń, takich jak m.in. metale ciężkie i radionuklidy w związki nieorganiczne lub formy mineralne. Polega to np. na wytrącaniu metali i pierwiastków, w tym radionuklidów, w postaci ich nierozpuszczalnych soli (węglanów, siarczków, fosforanów lub szczawianów) [13]. Zanieczyszczenia mogą być unieruchamiane poprzez wytrącanie w postaci amorficznej lub krystalicznej, co ogranicza ich biodostępność i ułatwia usunięcie ze środowiska. Istnieją też inne metody oddziaływania grzybów na jony metali: grzyby wytwarzają chelatory jonów, takie jak kwasy organiczne, które zwiększają ich biodostępność [14], oraz białka, które silnie wiążą jony metali [15].

Ważną rolę w wielu procesach transformacji chemicznej zanieczyszczeń z wykorzystaniem grzybów pełnią enzymy, w większości związane z procesem degradacji ligniny [1, 16, 17]. Najważniejsze z nich to enzymy zewnątrzkomórkowe, lakazy i peroksydazy oraz enzymy wewnątrzkomórkowe – monoooksygenazy cytochromu P450.

Grzyby wykorzystywane są również jako źródło enzymów degradacyjnych, które można wyizolować i wykorzystać do usuwania zanieczyszczeń w innych układach [17]. Możliwe jest też zwiększenie skali procesów mykoremediacji w bioreaktorach, obejmujące zarówno hodowlę grzybów, jak i produkcję enzymów [18].

Kolejnym ważnym mechanizmem mykoremediacji jest biosorpcja, którą definiuje się jako proces pobierania i usuwania substancji szkodliwych przez materiał biologiczny z zanieczyszczonego środowiska, najczęściej wodnego [19, 20]. Proces ten biosorpcji polega na przyłączaniu molekuł lub jonów metali i związaniu ich w określonych miejscach materiału sorbującego na drodze adsorpcji fizycznej i/lub chemicznej (wymiana jonowa, kompleksowanie, chelatacja, mikroprecypitacja) i zachodzi głównie na powierzchni komórki [21]. W przypadku grzybów, proces ten opiera się głównie na wykorzystaniu

zdolności ściany komórkowej do koncentracji szkodliwych zanieczyszczeń. Czynnikiem wpływającym na efektywność biosorpcji są pH, stężenie substancji i ilość biosorbenta, skład ściany komórkowej (obecność składników takich jak chityny i glukany, oraz grup funkcyjnych, takich jak grupy aminowe, karboksylowe, tiolowe i fosforanowe), czas kontaktu i temperatura. Biomasa grzybów może być wykorzystana do biosorpcji na wiele sposobów: w postaci żywej lub martwej, w stanie wolnym lub unieruchomiona na matrycy, poddana obróbce wstępnej lub bez obróbki.

Inny mechanizm procesu mykoremediacji to bioakumulacja. W przeciwieństwie do biosorpcji, która jest zazwyczaj procesem pasywnym, bioakumulacja jest procesem bardziej złożonym, opierającym się na aktywnym transporcie metabolicznym. Polega na przedostawaniu się związków do wnętrza komórki, gdzie są one gromadzone i, w niektórych przypadkach metabolizowane [21]. Proces ten rozpoczyna się od biosorpcji, po czym zanieczyszczenia są transportowane do komórek, głównie poprzez energochłonne systemy transportu aktywnego. Po zakumulowaniu przez organizm maksymalnej możliwej ilości substancji toksycznych, może być on usunięty ze skażonego środowiska (bioekstrakcja). Efektywność procesu zależy od takich czynników jak odporność gatunku na dany ksenobiotyk, jego zdolność do akumulacji relatywnie wysokich stężeń danego jonu lub związku, najlepiej w nadziemnych partiach, oraz ilość tworzonej biomasy. Bioakumulacja jako metoda mykoremediacji może być stosowana zarówno do gleb [22, 23], jak i próbek wodnych [24-26].

Omówione powyżej mechanizmy mykoremediacji związane są z bezpośrednim oddziaływaniem grzybów z zanieczyszczeniami. Istnieje inny mechanizm angażujący grzyby w procesie bioremediacji – mikoryza. Jest to symbiotyczny związek między grzybami i roślinami, dzięki któremu grzyby, organizmy heterotroficzne, pozyskują związki organiczne, wytwarzane przez rośliny w procesie fotosyntezy, a rośliny zaopatrywane są przez strzępki grzyba w związki mineralne [27]. Dwa najpopularniejsze rodzaje mikoryzy to endomikoryza (mikoryza arbuskularna; grzybnia wnika do środka korzenia roślin) i ektomikoryza (strzępki grzybni oplatają korzenie roślin). Mikoryza poprawia efektywność pobierania składników mineralnych w glebach, sprzyja wzrostowi i rozwojowi roślin, kształtuje strukturę gleby [28, 29]. Symbioza grzybów z roślinami wpływa też na reakcje roślin na stres, także ten związany z obecności substancji szkodliwych [30, 31]. Grzyby regulują poprzez mikoryzę biodostępność i bioakumulację zanieczyszczeń przez rośliny, co bezpośrednio przekłada się na oddziaływanie tych substancji z roślinami i efektywność fitoremediacji [29, 32].

Grzyby mają potencjał metaboliczny i morfologiczny do zastosowania w remediacji skażonego środowiska. Znajdują zastosowanie w mykoremediacji różnych zanieczyszczeń, szczególnie rolę pełnią w remediacji środowisk skażonych substancjami radioaktywnymi.

3. Mykoremediacja radioizotopów

3.1. Radioizotopy w środowisku

Odkrycie na początku XX wieku promieniotwórczości naturalnej, a potem promieniotwórczości sztucznej i reakcji rozszczepienia jądra atomowego, spowodowało gwałtowne zainteresowanie możliwością zastosowania zarówno samego promieniowania jonizującego, jak i emitujących go izotopów promieniotwórczych. Są one stosowane w nauce, medycynie, przemyśle, ale największe konsekwencje dla środowiska przyniosły wojskowe programy nuklearne oraz energetyka atomowa [33, 34]. W wyniku licznych prób broni

jądrowej w środowisku pojawiły się znaczące ilości produktów rozszczepienia, głównie izotopy strontu (^{90}Sr). Z kolei awarie elektrowni atomowych, takie jak w Czarnobylu i Fukushima skutkują skażeniem środowiska izotopami cezu (^{134}Cs , ^{137}Cs). Inne antropogeniczne źródła radioizotopów to kopalnie i zakłady przetwórstwa uranu, wydobywanie fosforanów, wydobywanie i spalanie paliw kopalnych. Najważniejsze izotopy promieniotwórcze w środowisku zebrano w tabeli 2.

Tabela 2. Przykłady radioizotopów najczęściej spotykanych w środowisku

Radioizotop	Czas półtrwania
^{238}U	$4,5 \times 10^9$ lat
^{239}Pu	$2,4 \times 10^4$ lat
^{240}Pu	$6,6 \times 10^5$ lat
^{237}Np	$2,1 \times 10^6$ lat
^{241}Np	432 lata
^{90}Sr	29 lat
^{135}Cs	2,3 mln lat
^{137}Cs	30 lat
^{129}I	$1,6 \times 10^7$ lat
^{60}Co	5,3 lat
^{58}Ni	$7,6 \times 10^4$ lat
^{242}Th	$1,4 \times 10^{10}$ lat
^{226}Ra	$1,6 \times 10^4$ lat
^{210}Po	$2,8 \times 10^{-1}$ lat

Źródło: opracowanie własne na podstawie [33, 34].

Obecność radioizotopów w środowisku niesie ze sobą realne zagrożenie dla funkcjonowania ekosystemów oraz zdrowia i życia ludzi. Promieniowanie jonizujące powoduje w komórkach jonizację i wzbudzenie atomów i cząsteczek, w konsekwencji następuje szereg reakcji chemicznych, wytworzenie wolnych rodników, uszkodzenie molekuł istotnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, w tym materiału genetycznego [35]. Koniecznością jest opracowanie wydajnych technologii zapewniających skuteczne oczyszczanie skażonych radioizotopowo wód, gleby czy ścieków.

3.2. Biotransformacja radioizotopów

Mikroorganizmy glebowe mogą zmieniać formę chemiczną różnych związków poprzez ich mineralizację, strącanie czy transformację w inne związki chemiczne, zmieniając tym samym ich toksyczność, mobilność i biodostępność. W przypadku radioizotopów najczęściej spotykanym mechanizmem jest biomineralizacja. Tlenki, fosforany, siarczki i szczawiany są najczęściej wytrącanymi biominerałami [36], radionuklidy mogą być też wytrącane w wyniku alkalizacji na powierzchni komórki w postaci węglanów i wodorotlenków [37].

Jednym z pierwiastków, posiadającym radioaktywne izotopy, ulegającym biomineralizacji z wykorzystaniem grzybów jest uran. Do tworzenia minerałów fosforanowych szczepy drożdży *Kluyveromyces lactis*, *Pichia acacia*, *Cryptococcus podzolicus*, *Cryptococcus filicatus*, *Candida sake* i *Candida argentea* wykorzystują organiczne źródło fosforu (takie jak 2-fosforan glicerolu lub kwas fitynowy) i w obecności rozpuszczalnych form uranu tworzą minerały: meta-ankoleit ($\text{K}_2(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$), czernikowit ($\text{H}_2(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 8(\text{H}_2\text{O})$), besetyt ($\text{Fe}(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 8(\text{H}_2\text{O})$) i uramfit ($(\text{NH}_4)(\text{UO}_2)(\text{PO}_4) \cdot 3(\text{H}_2\text{O})$) [38]. Podobne formy mineralne tworzone są w wyniku biomineralizacji

uranu przez *Aspergillus niger* i *Paecilomyces javanicus* [39]. Badania biomineralizacji uranu przez *Saccharomyces cerevisiae* wykazały, że na rodzaj powstających osadów wpływa istotnie pH. Podczas interakcji między komórkami a uranem dochodzi do uwalniania jonów fosforanowych i amonowych. W warunkach kwasowych tworzony jest na powierzchni komórek przez jony uranylowe i fosforanowe czernikowit, w warunkach alkalicznych jony uranylowe, fosforanowe i amonowe tworzą uramfit [40].

Grzyby mogą powodować również rozpuszczenie związków uranu. Dla gatunków grzybów: *P. simplicissimum*, *B. caledonica*, *S. himantioides*, *R. rubescens* i *H. ericae* wykazano, że są one odporne na wysoki poziom tlenu uranu, posiadają zdolność rozpuszczania tego związku oraz akumulowania uranu w grzybni [41]. Ponadto niektóre grzyby *Serpula himantioides* powodowały wtórną biomineralizację uranu i wytwarzały dobrze skryształizowane minerały, czerenkowit i uramfit.

Innym przykładem radioizotopu, który może ulegać biomineralizacji, głównie za sprawą jonów węglanowych, jest stront. Grzyby *Pestalotiopsis sp.* i *Myrothecium gramineum*, wyizolowane z gleby wapiennej, powodowały biomineralizację jonów strontu poprzez wytrącanie w postaci węglanu strontu (stroncjanitu, SrCO_3) lub olekminkitu [$\text{Sr}(\text{Sr},\text{Ca})(\text{CO}_3)_2$] [42]. Eksperymenty z płynnymi pożywkami wykazały, że *M. gramineum* posiada zdolność wytrącania jonów strontu z blisko 50% wydajnością. Podobne wyniki otrzymano dla następujących gatunków grzybów *Fusarium grainis*, *Phoma herbarum* i *Mucor hiemalis*. Pod ich wpływem także tworzy się węglanu strontu (SrCO_3). W przypadku *F. grainis* około 61% strontu ulega wytrąceniu w tej postaci. W obecności chemicznie podobnego do strontu wapnia, pod wpływem *F. grainis*, *M. hiemalis* i *P. herbarum* powstawać może węglan wapnia z wbudowanymi jonami strontu i węglan strontu z wbudowanymi w strukturę jonami wapnia – olekminkit [43].

3.3. Biosorpcja radioizotopów

Wiązanie radioizotopów przez żywą lub martwą biomasę grzybową może być wydajnym procesem prowadzącym do ich usuwania ze skażonego środowiska.

Biosorpcja jest procesem złożonym i zależnym od wielu czynników. Wykazano, że *Rhizopus arrhizus* pobiera uran z roztworów, a mechanizm biosorpcji składa się z kilku etapów: wiązanie koordynacyjne i adsorpcja jonów uranu w ścianie komórkowej, zachodzące jednocześnie i szybko, a następnie wytrącanie wodorotlenku uranylu, które zachodzi z mniejszą szybkością [44]. Biosorpcję uranu z roztworów wodnych badano też z wykorzystaniem biomasy grzyba *Pleurotus ostreatus* [45]. Wyniki wykazały, że maksymalna pojemność biosorpcyjna uranu przez *P. ostreatus* wynosi około $20 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ przy pH 4,0, co wskazuje, że badana biomasa może być wykorzystana jako potencjalny biosorbent do eliminacji uranu lub innych radionuklidów z roztworów wodnych. Szczegółowe badania wykazały, że w biosorpcji uranu biorą udział zarówno grupy karboksylowe, aminowe, jak i hydroksylowe, oraz, że jest to złożony proces, obejmujący kilka mechanizmów fizycznej adsorpcji, chemisorpcji i wymiany jonowej. W innych badaniach do usuwania uranu na drodze sorpcji wykorzystano biomasę *Lentinus concinnus* (natywną i związaną z kwasem 2,5-diaminobenzenosulfonowym) [46]. Stwierdzono, że maksymalna zdolność adsorpcji jonów uranu wynosi odpowiednio dla masy natywnej i związanej, 119 i $539 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ przy pH 6,0. Adsorpcję uranu przypisano głównie grupom aminowym, karboksylowym i siarczanowym [46].

Przykładem innego pierwiastka, którego radioizotopy ulegającym biosorpcji jest tor. Wykazano, że skutecznymi biosorbentami toru są grzybnie *Rhizopus arrhizus* i *Aspergillus niger* [47]. Wydajność biosorpcji toru przez *A. niger* zmniejsza się w obecności innych nieorganicznych substancji, podczas gdy jego biosorpcja przez *R. arrhizus* pozostaje względnie niezmienną. W przypadku toru, podobnie, jak innych radioizotopów, ważnym parametrem decydującym o wydajności sorpcji jest pH. Wykazano, że pobieranie toru przez *A. fumigatus* zależy istotnie od pH w zakresie od 2,0 do 6,0, a maksymalną sorpcję zaobserwowano przy pH 4,0 [48]. Zauważono również, że biosorpcja zachodzi stosunkowo szybko, stan równowagi układ osiąga w ciągu 2 godzin. Maksymalna pojemność sorpcyjna biomasy *A. fumigatus* wyniosła $370 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Zastosowanie wodorowęglanu sodu umożliwiło desorpcję toru z blisko 100% skutecznością i nie naruszało powierzchni biomasy, dzięki czemu możliwe jest wielokrotne zastosowanie raz przygotowanego biosorbenta.

Biosorpcja została też zastosowana do usuwania radioizotopów kobaltu (^{60}Co) i cezu (^{137}Cs) przy użyciu biomasy *Alternaria alternata*, *Fusarium verticillioides* i *Aspergillus pulverulents* [49]. Najbardziej wydajnym (około 60%) w pobieraniu radioizotopów okazał się *A. alternata*. Ponadto wykazano wysoką zawartość melaniny w ścianie komórkowej u grzybów mających kontakt z radioizotopami, co wskazuje na udział tego barwnika w procesie biosorpcji.

Ze względu na możliwość stosowania biosorbentów w warunkach wysokiej ekspozycji na promieniowanie jonizujące, sprawdzono potencjał *Saccharomyces cerevisiae* w usuwaniu strontu oraz wpływ napromieniowania na wydajność biosorpcji [50]. Wykazano, że wstępna ekspozycja *S. cerevisia* na promieniowanie jonizujące powoduje wzrost odporności tego organizmu na to promieniowanie i zwiększa jego zdolność do biosorpcji strontu.

Najnowsze badania możliwości wykorzystania biomasy grzybowej jako biosorbenta radioizotopów skupiają się na możliwości immobilizacji biomasy i jej modyfikacji. Przykładem jest zastosowanie montmorylonitu (zielonej glinki) oraz jego kompleksów z biomasą *Acremonium* sp. i *Aphanocladium* sp. do sorpcji izotopów Co i Sr [57]. Wykazano, że w przypadku kobaltu, kompleksy minerału z biomasą są wydajniejszym sorbentem niż sam minerał. Nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic w usuwaniu strontu, co tłumaczyć należy jego większym promieniem jonowym, utrudniającym sorpcję. Dodatek biomasy do montmorylonitu powodował, że sorbent pozostawał w zawieszynie wystarczająco długo, sprzyjając optymalnej sorpcji. W innych badaniach, wykorzystano do biosorpcji strontu unieruchomiony w magnetycznych mikrosferach chitozanu biosorbent *Saccharomyces cerevisiae*, otrzymując maksymalną pojemność sorpcji 82 mg/g [58]. Kolejnym ciekawym sorbentem jest biomasa *Mucor hiemalis* połączona z alginianem wapnia, której pojemność sorpcyjna dla strontu wynosi $140 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ [59]. Sorbent ten charakteryzuje dodatkowo wysoka selektywność wobec strontu.

Przykłady innych grzybowych biosorbentów radioizotopów zebrano w tabeli 3.

Tabela 3. Przykłady grzybów stosowanych jako biosorbenty radionuklidów.

Gatunek	Izotop / pierwiastek	Warunki biosorpcji	Pojemność sorpcyjna lub wydajność biosorpcji	Lit.
<i>Aspergillus niger</i>	⁶⁰ Co ¹⁵²⁺¹⁵⁴ Eu	T = 297 K pH = 6,0	76,4 mg·g ⁻¹ 135 mg·g ⁻¹	[51]
<i>Penicillium piscarium</i>	Uran	pH = 3,5 pH = 5,5	93,2-97,5% 38-92%	[52]
<i>Candida guilliermondii</i> <i>Rhodotorula calyptogenae</i>	⁶⁰ Co	10-20 µg/g Co; t = 1h	99,7% 98,3%	[53]
<i>Fusarium sp.</i>	Cez	pH = 7,0, 30°C, t = 3-4 dni	84%	[54]
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	Cez	pH = 7	0,473 mmol·g ⁻¹	[55]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Stront	---	9-38%	[56]

3.4. Bioakumulacja radioizotopów przez grzyby

Grzyby są przydatne w rekultywacji zanieczyszczonych gruntów, ponieważ wykazują dużą efektywność akumulowania radionuklidów [60-62] i odporność na promieniowanie jonizujące. Akumulują one izotopy emitujące wszystkie rodzaje promieniowania – α , β i γ , a lista gatunków zbadanych pod kątem ich przydatności do bioakumulacji radionuklidów jest bardzo długa (tab. 4).

Poziom bioakumulacji izotopu w grzybach zależy od gatunku, właściwości radioizotopu (jego formy chemicznej) oraz jego stężenia w glebie. Bardzo ważnym parametrem jest charakterystyka fizykochemiczna gleby. Mobilność i biodostępność izotopów zależy od stopnia rozdrobnienia gleby, jej uwodnienia i pH, zawartości materii organicznej [72, 73]. Zawartości radioizotopów w grzybach są bardzo różne. Najniższe wartości są na poziomie kilku Bq·kg⁻¹ suchej masy i nie przekraczają poziomu naturalnego tła. Najwyższe wartości sięgają tysięcy kBq·kg⁻¹ suchej masy i stanowią już poważne zagrożenie dla środowiska.

Tabela 4. Przykłady grzybów akumulujących radioizotopy pochodzenia antropogenicznego (w zestawieniu podano przykłady izotopów emitujących promieniowanie α , β i γ)

Izotop	Przykłady	Aktywność [Bq·kg ⁻¹]	Literatura
²³⁸ Pu ²³⁹⁺²⁴⁰ Pu (α)	<i>Armillaria mellea</i> , <i>Boletus edulis</i> , <i>Lactifluus vellereus</i> , <i>Macrolepiota procera</i> , <i>Xerocomus badius</i> , <i>Agaricus campestris</i> , <i>Amanita muscaria</i> , <i>A. ponderosa</i> , <i>Hebeloma cylindrosporum</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Omphalotus olearius</i> , <i>Rhizopogon roseolus</i> , <i>Russula cessans</i> , <i>Suillus bovinus</i> , <i>Terfezia arenaria</i> , <i>T. boudieri</i> , <i>Tricholoma terreum</i>	0,0001-44	[63-65]
⁹⁰ Sr (β)	<i>Boletus edulis</i> , <i>Imperator rhodopurpureus</i> , <i>Lentinula edodes</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Inonotus</i> , <i>Lyophyllum shimeji</i> , <i>Pholiota nameko</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Imleria Badia</i> , <i>Macrolepiota procera</i> , <i>Cortinarius caperatus</i> , <i>Sarcodon squamosus</i> , <i>Suillus grevillei</i> , <i>Xerocomellus chrysenteron</i> , <i>Xerocomus subtomentosus</i>	0,004-13000	[66-68]
¹³⁷ Cs (γ)	<i>Amanita muscaria</i> , <i>Amanita rubescens</i> , <i>Boletus subtomentosus</i> , <i>Boletus badius</i> , <i>Boletus calopus</i> , <i>Boletus chrysenteron</i> , <i>Cortinarius saturninus</i> , <i>Hygrophorus Russula</i> , <i>Lactarius corrugis</i> , <i>Laccaria Amethystine</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Paxillus involutus</i> , <i>Entoloma sarcopus</i> , <i>Russula nigricans</i> , <i>Sarcodon aspratus</i> , <i>Suillus granulatus</i> , <i>Tricholoma</i> , <i>Pessandatum</i> , <i>Suillus granulatus</i>	0,1-90 000	[63, 69-71]

Różnorodność w przebiegu i wydajności bioakumulacji radioizotopów ilustrują doskonale badania aktywności izotopu ^{137}Cs w próbkach gleby (do głębokości 10 cm) i owocnikach różnych gatunków grzybów (*Lactarius vietus*, *Paxillus involutus*, *Sarcodon imbricatus*, *Lactarius vellereus*, *Lactarius necator* i *Xerocomus subtomentosus*), pobranych na terenie lasu iglastego w Ukrainie [74]. Najwyższą aktywność wykazano w górnych warstwach profilu glebowego, a aktywności mierzone dla grzybów, były zwykle wyższe w owocnikach w porównaniu z grzybnią (ze stosunkami w zakresie od 0,1 do 66). Porównanie zdolności poszczególnych gatunków do bioakumulowania izotopów możliwe jest na podstawie współczynnika akumulacji (ang. *Transfer Factor*, TF). Jest on wyznaczany jako stosunek zawartości radioizotopu w grzybie do zawartości tego izotopu w podłożu; obie wartości w przeliczeniu na suchą masę. Im wyższa wartość TF, tym bardziej wydajna bioakumulacja radionuklidu. Wyznaczone współczynniki akumulacji przyjmują różne wartości, najczęściej poniżej 1, ale są też takie gatunki, dla których TF jest znacznie wyższy (>20) [60]. Gatunki, które wykazują wysoki poziom bioakumulacji radioizotopów sprawdzą się w procesie remediacji gleby skażonej substancjami radioaktywnymi (mykoekstrakcja).

3.5. Mikoryza

Grzyby w środowisku nie tylko bioakumulują radioizotopy, ale wpływają też na ich biodostępność dla roślin, co może być przydatne w procesie fitoremediacji. Odbyna się to poprzez omówione powyżej procesy biomineralizacji i biosorpcji, oraz dzięki symbiozie grzybów z roślinami, czyli mikoryzie. W literaturze opisano zmiany akumulacji różnych radioizotopów w wyniku mikoryzy, wybrane przykłady przedstawiono w tabeli 5. Wpływ grzybów mikoryzowych na akumulację radionuklidów w tkankach roślin nie jest jednoznaczny i zależy od bardzo wielu czynników, przede wszystkim od właściwości chemicznych danego izotopu, gatunku rośliny i pozostającego z nią w symbiozie grzyba [75].

Tabela 5. Przykłady wpływu mikoryzy na bioakumulację radioizotopów przez rośliny

Radioizotop	Grzyb	Roślina	Efekt	Literatura
^{238}U	<i>Glomus intraradices</i>	Koniczyna podziemna (<i>Trifolium subterraneum</i>)	Ograniczenie pobierania U	[76]
^{238}U ^{232}Th	<i>Funneliformis mosseae</i>	Babka lancetowata (<i>Plantago lanceolata</i>)	Wzrost akumulacji ^{238}U ^{232}Th w pędach	[77]
	<i>Acaulospora longula</i>		Wzrost zawartości ^{232}Th w korzeniach	
Cs	<i>Glomus mosseae</i>	Mietlica pospolita (<i>Agrostis tenuis</i>)	Ograniczenie pobierania Cs	[78]
^{137}Cs ^{90}Sr	<i>Glomus mosseae</i> <i>Glomus intraradices</i>	Trawa (<i>Paspalum notatum</i>) Sorgo (<i>Sorghum halpense</i>) Proso (<i>Panicum virginatum</i>)	Wzrost akumulacji ^{137}Cs i ^{90}Sr	[79]
^{137}Cs	<i>Rhizopogon roseolus</i>	Sosna nadmorska (<i>Pinus pinaster</i>)	Wzrost akumulacji ^{137}Cs w igłach	[80]
^{85}Sr			Brak efektu	
^{95m}Tc			Obniżenie zawartości ^{95m}Tc w igłach	

Przykładem są badania bioakumulacji radionuklidów cezu w roślinach pobranych na terenach leśnych: paproci, borówce czarnej, malinie, jeżynie i koniczynie, które wyka-

zały, że poziom aktywności radioizotopu zależy od gatunku (najwyższy stwierdzono dla paproci, a najniższy dla jeżyny i koniczyny) i od właściwości gleby [81]. Różnił się on dla jednego gatunku rośliny nawet o dwa rzędy wielkości, zależnie od miejsca pobierania próbek. Jednocześnie istotne różnice wykazano w zagęszczeniu strzępek grzybów mikoryzowych. W miejscach, skąd pochodziły rośliny o najwyższym poziomie bioakumulacji cezu, zawartość grzybni też była najwyższa. Potwierdza to, że transport cezu odbywa się za pośrednictwem grzybów mikoryzowych.

Potencjalne zastosowanie mikoryzy jako środka wspomagającego fitoremediację gleb skażonych radiocezem sprawdzono w innym doświadczeniu, w ramach którego zbadano pobieranie ^{137}Cs przez ogórka, życię trwałą i słonecznika, po zaszczepieniu komercyjnym produktem mikoryzy arbuskularnej [82]. W badaniach zastosowano glebę gliniastą i piaszczystą. W przypadku ogórka i życicy wpływ inokulacji na pobieranie ^{137}Cs był niespójny. Największe efekty zaobserwowano dla słonecznika. Zarówno biomasa roślinna, jak i pobieranie ^{137}Cs istotnie wzrosły; całkowita aktywność radioizotopu w słoneczniku na glebach gliniastych i piaszczystych była odpowiednio 2,4 i 3,2 razy większa w przypadku roślinach zaszczepionych.

Omówione przykłady dotyczyły badań prowadzonych w warunkach laboratoryjnych. Ważne jest by sprawdzić, czy obserwowane zależności występują też na terenach skażonych radioizotopowo. Przykładem są badania polowe przeprowadzone na terenie położonym 70 km na południowy zachód od Czarnobyla w Ukrainie [83]. Zastosowano *in situ* grzyby mikoryzowe (*Glomus mosseae*) do inokulacji roślin uprawnych: jęczmienia, ogórka, życicy trwałej i słonecznika. Nie zaobserwowano zwiększenia pobierania radionuklidów przez badane rośliny ani ich biomasy. Całkowita ilość ^{137}Cs pobrana przez rośliny rosnące na glebie szczepionej była równa ilościom dla roślin uprawianych na glebie nieszczepionej, a różnice w zawartości ^{137}Cs wynikały jedynie z różnic w jego zawartości w glebie.

Wpływ mikoryzy na bioakumulację innego izotopu, ^{85}Sr , sprawdzono dla pomidora (*S. lycopersicum*) inokulowanego mieszaniną grzybów mikoryzowych: *Rhizoglomus irregulare*, *Funneliformis mosseae* i *Funneliformis caledonium* [84]. Uzyskane wyniki wykazały istotny związek między inokulacją roślin a rozmieszczeniem ^{85}Sr w ich tkankach: obecność grzybów mikoryzowych powodowała większą akumulację radioizotopu w korzeniach, ale ograniczała jego translokację z systemu korzeniowego do części nadziemnych badanych roślin.

W innym doświadczeniu przeprowadzono porównanie roli czterech różnych kultur arbuskularnych grzybów mikoryzowych (*Rhizopogon irregularis*, *Acaulospora longula*, *Scutellospora calospora* i *Funneliformis mosseae*) w bioakumulacji radioizotopów uranu (^{238}U) i toru (^{232}Th) przez babkę lancetowatą (*Plantago lanceolata*) z gleby zebranej z terenu opuszczonej kopalni uranu [79]. Wykazano, że inokulacja nie ma istotnego wpływu na biomase roślin, ale wpływa, w sposób zależny od gatunku grzyba, na akumulację izotopów. Obecność w podłożu *A. longula* skutkowała zwiększoną zawartością toru w korzeniach, a *F. mosseae* zwiększał zawartość tego izotopu w częściach nadziemnych roślin. W przypadku uranu, zaobserwowano obniżenie jego akumulacji w korzeniach przez *F. mosseae*. W podobnych badaniach akumulacji radioizotopów przez ten sam gatunek rośliny zastosowano również inne grzyby mikoryzowe, *Septoglomus constrictum* i *Paraglomus laccatum*, nie wykazując ich wpływu na pobieranie radionuklidów [85].

Otrzymanie układu grzyb-roślina, w którym mikoryza będzie wydajnie zwieszała bioakumulację radioizotopów i ułatwiała ich usuwanie na drodze fitoremediacji, wymaga bardzo dokładnych badań i precyzyjnego dobrania stosowanych gatunków.

4. Podsumowanie

Mykoremediacja jest bez wątpienia metodą, którą można z powodzeniem zastosować do remediacji gleb skażonych izotopami. Grzyby mogą powodować strącenie radionuklidów w postaci nierozpuszczalnych soli (biomineralizacja) lub wiązać izotopy w swojej biomacie (biosorpcja). Ogranicza to mobilność i biodostępność radionuklidów oraz ułatwia ich usunięcie ze skażonej gleby. Hodowanie na terenach skażonych grzybów mających zdolność do bioakumulowania wysokich zawartości radioizotopów umożliwi rekultywację gleb na drodze mykoekstrakcji. Odpowiednie dobranie i zastosowanie w środowisku układu symbiotycznego grzyb-roślina (mikoryzy) zwiększy wydajność procesu bioremediacji metodą fitoekstrakcji.

Dokładne zrozumienie wszystkich możliwych mechanizmów wzajemnego oddziaływania grzybów, gleby, roślin i radioizotopów da możliwość takiego zoptymalizowania warunków prowadzenia procesu, aby mykoremediacja była rzeczywiście tania, ekologiczna i, co najważniejsze, skuteczna.

Literatura

1. Frac M., Hannula S.E., Belka M., Jędrzycka M., *Fungal biodiversity and their role in soil health*, *Frontiers in Microbiology*, 707, 2018.
2. Shourie A., Vijayalakshmi U., *Fungal diversity and its role in mycoremediation*, *Geomicrobiol Journal*, 39(3–5), 2022, s. 426-444.
3. Selbmann L., Egidi E., Isola D., Onofri S., Zucconi L., Hoog S., Chinaglia S., Testa L., Tosi S., Balestrazzi A., Lantieri A., Compagno r., Tigini V., Varese G., *Biodiversity, evolution and adaptation of fungi in extreme environments*, *Plant Biosystems*, 147(1), 2013, s. 237-246.
4. Tkavc R., Matrosova V.Y., Grichenko O.E., Gostincar C., Volpe R.P., Klimenkova P., Gaidamakova E.K., Zhou C.E., Stewart B.J., Lyman M.G., Malfatti S.A., Rubinfeld B., Courtot M., Singh J., Dalgard C.L., Hamilton T., Frey K.G., Gunde-Cimerman N., Dugan L., Daly M.J., *Prospects for Fungal Bioremediation of Acidic Radioactive Waste Sites: Characterization and Genome Sequence of Rhodotorula taiwanensis MD1149*, *Frontiers in Microbiology*, 8, 2018, s. 2528.
5. Walker G.M., White N.A., *Introduction to Fungal Physiology*, *Fungi*, 2017, s. 1-5.
6. Mohamadhasani F., Rahimi M., *Growth response and mycoremediation of heavy metals by fungus Pleurotus sp.*, *Scientific Reports*, 12(1), 2022, s. 1-6.
7. Hidayat E., Khaekhum S., Yonemura S., Mitoma Y., Harada H., *Biosorption of Eriochrome Black T Using Exserohilum rostratum NMS1.5 Mycelia Biomass*, *Multidisciplinary Scientific Journal*, 5(4), 2022, s. 427-434.
8. Kang X., Kirui A., Muszyński A., Widanage M.C.D., Chen A., Azadi P., Wang P., Mentink-Vigier F., Wang T., *Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR*, *Nature Communications*, 2747, 2018, s. 1-12.
9. Modi M., Subramanian S., *Sorption of Radionuclides*, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 34(1), 2015, s. 122-130.
10. Fungal K., Petrignet J., Komorowicz M., Janiszewska-Latterini D., Przybylska-Balcerek A., Stuper-Szablewska K., *Fungal Biotransformation of Hazardous Organic Compounds in Wood Waste*, *Molecules*, 28(12), 2023, s. 4823.
11. Akash S., Sivaprakash B., Rajamohan N., Selvankumar T., *Biotransformation as a tool for remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted environment – review on toxicity and treatment technologies*, *Environmental Pollution*, 318, 2023, s. 120923.
12. Liu X., Zhou Z.Y., Cui J.L., Wang M.L., Wang J.H., *Biotransformation ability of endophytic fungi: from species evolution to industrial applications*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 2021, s. 7095-7113.

13. Gadd G.M., *Fungal biomineralization*, Current Biology, 31, 2021, s. 1549-1567.
14. Li T., Hu Y., Zhang B., *Biomineralization induced by Colletotrichum acutatum: A potential strategy for cultural relic bioprotection*, Frontiers in Microbiology, 9(AUG), 2018.
15. Liu F., Shah S., Michael G., Correspondence G., Singh Shah D., Gadd G.M., *Role of Protein in Fungal Biomineralization of Copper Carbonate Nanoparticles*, Current Biology, 31, 2021, s. 358-368.
16. Novotny C., Svobodova K., Erbanova P., Cajthaml T., Kasinath A., Lang E., Sasek V., *Ligninolytic fungi in bioremediation: Extracellular enzyme production and degradation rate*, Soil Biology and Biochemistry, 36(10), 2004, s. 1545-1551.
17. Kűes U., *Fungal enzymes for environmental management*, Current Opinion in Biotechnology, 33, 2015, s. 268-278.
18. Contato A.G., Oliveira T., Aranha G.M., Neiverth de Freitas E., Vici A.C., Nogueira K.M., Coutinho de Lucas R., Almeida Scarcella A.S., Buckeridge M.S., Silva R.N., Polizeli T.M., *Prospection of Fungal Lignocellulolytic Enzymes Produced from Jatoba (Hymenaea courbaril) and Tamarind (Tamarindus indica) Seeds: Scaling for Bioreactor and Saccharification Profile of Sugarcane Bagasse*, Microorganisms 9, 2021, s. 533.
19. Legorreta-Castañeda A.J., Lucho-Constantino C.A., Beltrán-Hernández R.I., C. Coronel-Olivares, Vázquez-Rodríguez G.A., *Biosorption of Water Pollutants by Fungal Pellets*, Water, 12(4), 2020, s. 1155.
20. Silva A., Delerue-Matos C., Figueiredo S.A., Freitas O.M., *The Use of Algae and Fungi for Removal of Pharmaceuticals by Bioremediation and Biosorption Processes: A Review*, Water, 11(8), 2019, s.1555.
21. Bibbins-Martínez M., Juárez-Hernández J., López-Domínguez J.Y., Nava-Galicia S.B., Martínez-Tozcano L.J., Juárez-Atonal R., Cortés-Espinosa D., Díaz-Godínez G., *Potential application of fungal biosorption and/or bioaccumulation for the bioremediation of wastewater contamination: A review*, Journal of Environmental Biology, 44, 2023, s. 135-145.
22. Cecchi G., Roccotiello E., Di Piazza S., Riggi A., Mariotti M. G., Zotti M., *Assessment of Ni accumulation capability by fungi for a possible approach to remove metals from soils and waters*, Journal of Environmental Science and Health, 52(3), 2017, s. 166-170.
23. Chen M., Wang L., Hou J., Yang S., Zheng X., Chen L., Li X., *Mycoextraction: Rapid Cadmium Removal by Macrofungi-Based Technology from Alkaline Soil*, Minerals, 8(12), 2018, s.589.
24. Asztemborska M., Jakubiak M., Rykaczewska M., Bembenek M., Stęborowski R., Bystrzejska-Piotrowska G., *Mycoextraction of radiolabeled cesium and strontium by Pleurotus eryngii mycelia in the presence of alumina nanoparticles: Sorption and accumulation studies*, Journal of Environmental Radioactivity, 164, 2016, s. 190-196.
25. Jakubiak M., Giska I., Asztemborska M., Bystrzejska-Piotrowska G., *Bioaccumulation and biosorption of inorganic nanoparticles: Factors affecting the efficiency of nanoparticle mycoextraction by liquid-grown mycelia of Pleurotus eryngii and Trametes versicolor*, Mycological Progress, 13(3), 2014, s. 525-532.
26. Fazli M. M., Soleimani N., Mehrasbi M., Darabian S., Mohammadi J., Ramazani A., *Highly cadmium tolerant fungi: Their tolerance and removal potential*, Journal of Environmental Health Science and Engineering, 13(1), 2015.
27. Heijden M.G.A., Martin F.M., Selosse M.A., Sanders I.R., *Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future*, New Phytologist, 205, 2015, s. 1406-1423.
28. Yang S., Ortas I., *Impact of mycorrhiza on plant nutrition and food security*, Journal of Plant Nutrition, 46(13), 2023, s. 3247-3272.
29. Karami A., Shamsuddin Z., *Phytoremediation of heavy metals with several efficiency enhancer methods*, African Journal of Biotechnology, 9(25), 2010, s. 3689-3698.

30. Ahammed G. J., Shamsy R., Liu A., Chen S., *Arbuscular mycorrhizal fungi-induced tolerance to chromium stress in plants*, Environmental Pollution, 327, 2023, s. 121597.
31. Zheng J., Xie X., Li C., Wang H., Yu Y., Huang B., *Regulation mechanism of plant response to heavy metal stress mediated by endophytic fungi*, International Journal of Phytoremediation, 2023, doi: 10.1080/15226514.2023.2176466.
32. Herath B.M., Bamunuarachchige C., Stephenson S.L., Elgorban A.M., Asad S., Kumla J., Suwannarach N., Karunaratna S.C., Yapa P.N., *Soil Heavy Metal Absorption Potential of Azolla pinnata and Lemna gibba with Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Rice (Oryza sativa L.) Farming*, Sustainability, 15(5), 2023, s. 4320.
33. Cheema H.A., *A Review on Bioremediation-An Emerging Technology for Treatment of Radionuclide Waste*, Journal of Modern Agriculture and Biotechnology, 2(1), 2023.
34. Williamson A.J., Binet M., Sergeant C., *Radionuclide biogeochemistry: from bioremediation toward the treatment of aqueous radioactive effluents*, Critical Reviews in Biotechnology, 2023, doi: 10.1080/07388551.2023.2194505.
35. Zdrojewicz Z., Szlagor A., Wielogórska M., Nowakowska D., Nowakowski J., *Wpływ promieniowania jonizującego na organizm człowieka*, Family Medicine & Primary Care Review, 18(2), 2016, s. 174-179.
36. Gadd G.M., Pan X., *Biomining, bioremediation and biorecovery of toxic metals and radionuclides*, Geomicrobiology Journal, 33(3–4), 2016, s. 175-178.
37. Newsome L., Morris K., Lloyd J.R., *Uranium Biominerals Precipitated by an Environmental Isolate of Serratia under Anaerobic Conditions*, PLoS ONE, 10(7), 2015.
38. Liang X., Csetenyi L., Gadd G.M., *Uranium bioprecipitation mediated by yeasts utilizing organic phosphorus substrates*, Applied Microbiology and Biotechnology, 100(11), 2016, s. 5141-5151.
39. Liang X., Hillier S., Pendrowski H., Gray N., Ceci A., Gadd G.M., *Uranium phosphate biomineralization by fungi*, Environmental Microbiology, 17(6), 2015, s. 2064-2075.
40. Zheng X.Y., Shen Y.H., Wang X.Y., Wang T.S., *Effect of pH on uranium(VI) biosorption and biomineralization by Saccharomyces cerevisiae*, Chemosphere, 203, 2018, s. 109-116.
41. Fomina M., Charnock J.M., Hillier S., Alvarez R., Gadd G.M., *Fungal transformations of uranium oxides*, Environmental Microbiology, 9(7), 2007, s. 1696-1710.
42. Li Q., Csetenyi L., Paton G.I., Gadd G.M., *CaCO₃ and SrCO₃ bioprecipitation by fungi isolated from calcareous soil*, Environmental Microbiology, 17(8), 2015, s. 3082-3097.
43. Zhao J., Csetenyi L., Gadd G.M., *Fungal-induced CaCO₃ and SrCO₃ precipitation: a potential strategy for bioprotection of concrete*, Science of The Total Environment, 816, 2022, s. 151501.
44. Tsezos M., Volesky B., *The mechanism of uranium biosorption by Rhizopus arrhizus*, Biotechnology and Bioengineering, 24(2), 1982, s. 385-401.
45. Zhao C., Liu J., Tu H., Li F., Li X., Yang J., Liao J., Yang Y., Liu N., Sun Q., *Characteristics of uranium biosorption from aqueous solutions on fungus Pleurotus ostreatus*, Environmental Science and Pollution Research, 23(24), 2016, s. 24846-24856.
46. Celikbıcak O., Bayramoglu G., Acikgoz-Erkaya I., Arica M.Y., *Aggrandizement of uranium (VI) removal performance of Lentinus concinnus biomass by attachment of 2,5-diaminobenzenesulfonic acid ligand*, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 328(3), 2021, s. 1085-1098.
47. White C., Gadd G.M., *Biosorption of Radionuclides by Fungal Biomass*, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 49(4), 1990, s. 331-343.
48. Bhainsa K.C., D'Souza S.F., *Thorium biosorption by Aspergillus fumigatus, a filamentous fungal biomass*, Journal of Hazardous Materials, 165(1–3), 2009, s. 670-676.
49. Mahmoud Y.A.G., *Uptake of Radionuclides by Some Fungi*, Mycobiology, 32(3), 2004, s. 110.
50. Qiu L., Feng J., Dai Y., and Chang S., *Biosorption of the strontium ion by irradiated Saccharomyces cerevisiae under culture conditions*, Journal of Environmental Radioactivity, 172, 2017, s. 52-62.

51. Song W., Liang J., Wen T., Wang X., Hu J. Hayat T., Alsaedi A., *Accumulation of Co(II) and Eu(III) by the mycelia of Aspergillus niger isolated from radionuclide-contaminated soils*, Chemical Engineering Journal, 304, 2016, s. 186-193.
52. Coelho E., Reis T.A., Cotrim M., Rizzutto M., Correa B., *Bioremediation of water contaminated with uranium using Penicillium piscarium*, Biotechnology Progress, 36(5), 2020.
53. Li C.C., Chung H.P., Wen H.W., Chang C.T., Wang Y.T., Chou F.I., *The radiation resistance and cobalt biosorption activity of yeast strains isolated from the Lanyu low-level radioactive waste repository in Taiwan*, Journal of Environmental Radioactivity, 146, 2015, s. 80-87.
54. Zhang L., Wang W., Zhang Z., Xie Y., Gu M., Zhu J., Tang Q., Wang B., Song S., Huang W., *Isolation and Identification of Filamentous Fungi F54 and Its Biosorption and Enrichment Characteristics of Cesium*, Atomic Energy Science and Technology, 40(3), 2018, s. 175.
55. Sayyadi S., Ahmady-Asbchin S., Kamali K., *Biosorption of Cd(II) and Cs(I) from aqueous solution by live and dead cells of Saccharomyces carlsbergensis PTCC 5051*, Environmental Technology, 39(4), 2018, s. 450-456.
56. Qiu L., Feng J., Dai Y., Chang S., *Biosorption of strontium ions from simulated high-level liquid waste by living Saccharomyces cerevisiae*, Environmental Science and Pollution Research, 25(17), 2018, s. 17194-17206.
57. Montesa M.L., Olivelli M.S., Fernandez Morantes C., Barraquec F., Taylord M.A., Curutchet G., Torres Sanchez R.M., *Biomass-clay complexes for Sr²⁺ and Co²⁺ removal: New insights on sorption and separation properties of the sorbents*, Journal of Dispersion Science and Technology, 2022, doi.org/10.1080/01932691.2022.2063886.
58. Yin Y., Wang J., Yang X., Li W., *Removal of Strontium Ions by Immobilized Saccharomyces Cerevisiae in Magnetic Chitosan Microspheres*, Nuclear Engineering and Technology, 49(1), 2017, s. 172-177.
59. Naeimi S., Faghihian H., *Application of Novel Adsorbent Prepared by Mucor hiemalis Biomass Impregnated with Calcium Alginate for Removal of Sr²⁺ from Aqueous Solutions*, Journal of Polymers and the Environment, 27, 2019, s. 1572-1583.
60. Duff M.C., Ramsey M.L., *Accumulation of radiocesium by mushrooms in the environment: a literature review*, Journal of Environmental Radioactivity, 99(6), 2008, s. 912-932.
61. Kalac P.K., *A review of edible mushroom radioactivity*, Food Chemistry, 75(1), 2001, s. 29-35.
62. Ronda O., Grządka E., Ostolska I., Orzeł J., Cieślík B.M., *Accumulation of radioisotopes and heavy metals in selected species of mushrooms*, Food Chemistry, 367, 2022, s. 130670.
63. Baeza A., Guillén J., Mietelski J.W., *Uptake of alpha and beta emitters by mushrooms collected and cultured in Spain*, Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry, 261(2), 2004, s. 375-380.
64. Mietelski J.W., Baeza A.S., Guillen J., Buzinny M., Tsigankov., Gaca P., Jasińska M., Tomankiewicz E., *Plutonium and other alpha emitters in mushrooms from Poland, Spain and Ukraine*, Applied Radiation and Isotopes, 56(5), 2002, s. 717-729.
65. Yamamoto M., Shiraiishi K., Los I.P., Kamarikov I.Y., Buzinny M.G., *Alpha-emitting radionuclide contents in food samples as related to the Chernobyl accident*, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Letters, 201(6), 1995, s. 459-468.
66. Saniewski M., Zalewska T., Krasińska G., Szyłke N., Wang Y., Falandysz J., *⁹⁰Sr in King Bolete Boletus edulis and certain other mushrooms consumed in Europe and China*, Science of The Total Environment, 543, 2016, s. 287-294.
67. Mietelski J.W., LaRosa J., Ghods A., *⁹⁰Sr and ²³⁹⁺²⁴⁰Pu²³⁸Pu²⁴¹Am in some samples of mushrooms and forest soil from Poland*, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Articles, 170(1), 1993, s. 243-258.

68. Mietelski J.W., Jasińska M., Kubica B., Kozak K., Macharski P., *Radioactive contamination of Polish mushrooms*, Science of The Total Environment, 157(C), 1994, s. 217-226.
69. Heinrich G., *Distribution of radiocesium in the different parts of mushrooms*, Journal of Environmental Radioactivity, 18(3), 1993, s. 229-245.
70. Toal M.E., Copplestone D., Johnson M.S., Jackson D., Jones S.R., *Quantifying ¹³⁷Cs aggregated transfer coefficients in a semi-natural woodland ecosystem adjacent to a nuclear reprocessing facility*, Journal of Environmental Radioactivity, 63(1), 2002, s. 85-103.
71. Yoshida S., Muramatsu Y., Ogawa M., *Radiocesium concentrations in mushrooms collected in Japan*, Journal of Environmental Radioactivity, 22(2), 1994, s. 141-154.
72. Horváth M., Heltai G., Várhegyi A., Mbokazi L., *A Study on the Possible Relationship between Physico-Chemical Properties of the Covering Soil and the Mobility of Radionuclides and Potentially Toxic Elements in a Recultivated Spoil Bank*, Minerals, 12(12), 2022, s. 1534.
73. Tombeur F., Cornu S., Bourlès D., Duvivier A., Pupier J., Aster T., Brossard M., Evrard O., *Retention of ¹⁰Be, ¹³⁷Cs and ²¹⁰Pb_{xs} in soils: Impact of physico-chemical characteristics*, Geoderma, 367, 2020, s. 114242.
74. Vinichuk M.M., Johanson K.J., *Accumulation of ¹³⁷Cs by fungal mycelium in forest ecosystems of Ukraine*, Journal of Environmental Radioactivity, 64(1), 2003, s. 27-43.
75. Davies H.S., Cox F., Robinson C.H., Pittman J.K., *Radioactivity and the environment: Technical approaches to understand the role of arbuscular mycorrhizal plants in radionuclide bioaccumulation*, Frontiers in Plant Science, 6(JULY), 2015, s. 152856.
76. Rufyikiri G., Huysmans L., Wannijn J., Van Hees M., Leyval C., Jakobsen I., *Arbuscular mycorrhizal fungi can decrease the uptake of uranium by subterranean clover grown at high levels of uranium in soil*, Environmental Pollution, 130(3), 2004, s. 427-436.
77. Rosas-Moreno J., Pittman J.K., Robinson C.H., *Specific arbuscular mycorrhizal fungal-plant interactions determine radionuclide and metal transfer into Plantago lanceolata*, Plants People Planet, 3(5), 2021, s. 667-678.
78. Berreck M., Haselwandter K., *Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis upon uptake of cesium and other cations by plants*, Mycorrhiza, 10(6), 2001, s. 275-280.
79. Entry J.A., Watrud L.S., Reeves M., *Accumulation of ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr from contaminated soil by three grass species inoculated with mycorrhizal fungi*, Environmental Pollution, 104(3), 1999, s. 449-457.
80. Ladeyn I., Plassard C., Staunton S., *Mycorrhizal association of maritime pine, Pinus pinaster, with Rhizopogon roseolus has contrasting effects on the uptake from soil and root-to-shoot transfer of ¹³⁷Cs, ⁸⁵Sr and ^{95m}Tc*, Journal of Environmental Radioactivity, 99(5), 2008, s. 853-863.
81. Drissner J., Bürmann W., Enslin F., Heider R., Klemm E., Miller R., Schick G., Zibold G., *Availability of caesium radionuclides to plants – classification of soils and role of mycorrhiza*, Journal of Environmental Radioactivity, 41(1), 1998, s. 19-32.
82. Vinichuk M., Martensson A., Ericsson T., Rosen K., *Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on ¹³⁷Cs uptake by plants grown on different soils*, Journal of Environmental Radioactivity, 115, 2013, s. 151-156.
83. Vinichuk M., Mårtensson A., and Rosén K., *Inoculation with arbuscular mycorrhizae does not improve ¹³⁷Cs uptake in crops grown in the Chernobyl region*, Journal of Environmental Radioactivity, 126, 2013, s. 14-19.
84. Dulanska S., Gomola I., Gubisova M., Ondreichova K., Panik J., Matel L., Hornik M., *Uptake and distribution of radiostrontium in tomato treated with arbuscular mycorrhizal fungi*, Radiation Protection Dosimetry, 198(9-11), 2022, s. 720-725.
85. Rosas-Moreno J., Walker C., Duffy k., Kruger C., Kruger M., Robinson C.H., Pittman J.K., *Isolation and identification of arbuscular mycorrhizal fungi from an abandoned uranium mine and their role in soil-to-plant transfer of radionuclides and metals*, Science of the Total Environment, 876, 2023, s. 162781.

Mykoremediacja – przykład remediacji gleby skażonej radioizotopami

Streszczenie

Testy głowic nuklearnych i awarie reaktorów jądrowych to główne źródła emisji substancji promieniotwórczych do środowiska. Radionuklidy, najczęściej w postaci opadu radioaktywnego, osiadają na roślinach, w zbiornikach wodnych i glebie, wchodzą w obieg materii w łańcuchach troficznych, gdzie stanowią poważne zagrożenie ekotoksykologiczne. Konieczne jest opracowanie metod, które w sposób wydajny i ekologiczny, a jednocześnie ekonomiczny, umożliwią rekultywację skażonego substancjami radioaktywnymi środowiska. Jedną z możliwości jest wykorzystanie różnych organizmów do biotransformacji lub usuwania (na drodze biosorpcji lub bioakumulacji) zanieczyszczeń ze środowiska glebowego. Grupą organizmów, pełniących istotne funkcje w ekosystemach lądowych, która wykazuje dużą zdolność adsorpcji i akumulacji radionuklidów są grzyby.

W rozdziale przedstawiono rolę grzybów w remediacji środowiska glebowego, skażonego izotopami promieniotwórczymi (mykoremediacja). Omówiono m.in.: (i) biotransformację radionuklidów w glebie przez grzyby, (ii) biosorbpcję przez grzyby substancji radioaktywnych, (iii) wykorzystanie różnych gatunków grzybów do bioakumulacji radionuklidów oraz (ii) mikoryzę i jej wpływ na tempo akumulacji izotopów w roślinach. Grzyby są istotną częścią mikrobioty glebowej, a ich wszechstronność pod względem właściwości ekologicznych i metabolicznych powoduje, że mykoremediacja może być skuteczną metodą usuwania zanieczyszczeń, także radioaktywnych.

Słowa kluczowe: radioizotopy, mykoremediacja, biomineralizacja, biosorpcja, mikoryza

Mycoremediation - the role of fungi in the remediation of the soil contaminated with radioisotopes

Abstract

Tests of nuclear warheads and accidents of nuclear reactors are the main sources of emission of radioactive substances into the environment. A radionuclides, most often in the form of radioactive fallout, settle on plants, water reservoirs and soil, enter the circulation of matter in trophic chains, where they pose a serious ecotoxicological threat. It is necessary to develop methods that will enable the reclamation of the environment contaminated with radioactive substances in an efficient, ecological and at the same time economical way. One of the possibilities is the use of various organisms for biotransformation or removal (through biosorption or bioaccumulation) of pollutants from the soil environment. Fungi are a group of organisms that perform important functions in terrestrial ecosystems and show a high capacity for adsorption and accumulation of radionuclides.

The chapter presents the role of fungi in the remediation of the soil environment contaminated with radioactive isotopes (mycoremediation). Discussion includes: (i) biotransformation of radionuclides in the soil by fungi, (ii) biosorption of radioactive substances by fungi, (iii) the use of various species of fungi for the bioaccumulation of radionuclides, and (iv) mycorrhiza and its impact on the rate of isotope accumulation in plants. Fungi are an important part of the soil microbiota, and their versatility in terms of ecological and metabolic properties makes mycoremediation an effective method of removing pollutants, including radioactive ones.

Keywords: radioisotopes, mycoremediation, biomineralization, biosorption, mycorrhiza

Funkcje bakteryjnych białek z rodziny IgaA

1. Wprowadzenie

Białko IgaA (ang. *intracellular growth attenuator*) zostało pierwotnie zidentyfikowane u *Salmonella* i nazwane ze względu na wewnątrzkomórkowe hamowanie wzrostu [1]. Białka z rodziny IgaA są białkami błonowymi, które odbierając sygnały z otoczenia – regulują i ograniczają reakcję systemu Rcs (ang. *Regulator of Capsule Synthesis*) poprzez oddziaływanie z RcsD [2-4]. Większość badań nad tą rodziną białek przeprowadzono przy użyciu *Salmonella enterica serovar Typhimurium* [5]. W badaniach zaobserwowano mutacje punktowe w genie *igaA*, które umożliwiły bakteriom posiadającym *igaA* wzrost w komórkach fibroblastów [2, 6]. Później wykazano, że gen ten reguluje produkcję polisacharydu otoczkowego i patogenezę [5].

Gen *igaA* znajduje się w centromerze 75 *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, pomiędzy genami *yrfE* i *yrfG*. Koduje on białko błony wewnętrznej o długości 710 aminokwasów (rys. 1), które, zgodnie z przewidywaniami, posiada pięć domen transmembranowych [6, 7].

Gen *igaA* wykazuje homologię z genem *yrfF* w *Escherichia coli* oraz genem *umoB* w *Proteus mirabilis* [6, 7]. *yrfF* jest podstawowym regulatorem syntezy otoczki bakteryjnej w *E. coli* [7]. Jest to białko błony wewnętrznej niezbędne dla żywotności bakterii [8].

Białka z rodziny IgaA/UmoB, zostały opisane u wysoce ruchliwej bakterii *Proteus mirabilis* przez grupę Hughesa w 1998 roku [2]. Mutacja genu *umoB* powoduje obniżenie ekspresji operonu głównego regulatora wici *flhDC* [2, 4, 10].

W przypadku *Serratia sp.* ATCC 39006 białko IgaA odgrywa rolę w regulacji odporności CRISPR na DNA plazmidowe i bakteriofagowe. Natomiast w *Serratia marcescens* białko z rodziny IgaA – GumB – reguluje wiele różnych fenotypów, w tym patogenezę mikroorganizmów, biosyntezę wtórnych metabolitów przeciwdrobnoustrojowych, produkcję pozakomórkowych polisacharydów oraz wydzielanie cytolizyny *shlA* [2]. GumB jest funkcjonalnie konserwowany z innymi białkami z rodziny IgaA, ponieważ defekty mutantów *gumB* mogą być uzupełniane przez ortologi *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *S. enterica* [11].

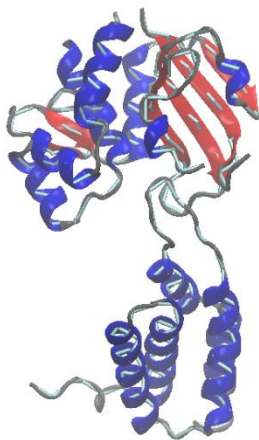
Białka z rodziny IgaA niewątpliwie odgrywają istotną rolę w fizjologii i patogenezie bakterii. Sprawia to, że mogą one stanowić potencjalny cel dla nowoczesnych metod terapeutycznych. Ważne jest więc pełne poznanie molekularnych mechanizmów działania omawianej rodziny. Stąd celem niniejszej pracy jest podsumowanie aktualnej wiedzy na temat funkcji bakteryjnych białek z rodziny IgaA.

¹ weronikabrudz@o2.pl; Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, Instytut Biologii, Studenckie Koło Naukowe „Mikroby”, www.ujk.edu.pl.

² olaomelaniuk@interia.pl; Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, Instytut Biologii, Studenckie Koło Naukowe „Mikroby”, www.ujk.edu.pl.

³ wanesasasal@tlen.pl; Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, Instytut Biologii, Studenckie Koło Naukowe „Mikroby”, www.ujk.edu.pl.

⁴ gniazdodawid@gmail.com; Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, Instytut Biologii, Studenckie Koło Naukowe „Mikroby”, www.ujk.edu.pl.



Rysunek 1. Struktura białka IgaA, opracowanie własne na podstawie [8], przy użyciu [9]

2. Funkcje białek IgaA

W tabeli 1 zostały zebrane funkcje białek IgaA, które zostały szczegółowo opisane w dalszych częściach niniejszego rozdziału.

Tabela 1. Funkcje pełnione przez białka IgaA i jego ortologi

Funkcja	Referencje
IgaA wpływa na ruchliwość i zdolność do wzrostu rozpełzłego	[2, 6, 12]
<i>umoB</i> negatywnie reguluje gen <i>disA</i> w <i>S. marcescens</i>	[13]
IgaA reguluje odporność opartą na CRISPR na DNA plazmidu i faga (w <i>Serratia sp ATCC 39006</i>)	[2]
<i>GumB</i> reguluje wiele fenotypów, w tym patogenezę drobnoustrojów, biosyntezę wtórnych metabolitów przeciwdrobnoustrojowych, pozakomórkowe polisacharydy i cytolizyna <i>shlA</i> (w <i>Serratia marcescens</i>)	[2]
IgaA/UmoB wpływają na kontrolę metabolitów wtórnych związanych z konkurencją i tworzenie biofilmu w <i>S. enterica</i>	[4]
IgaA jest regulatorem wzrostu wewnątrzkomórkowego (w <i>Salmonella enterica</i>)	[4]
IgaA reguluje wytwarzanie polisacharydu otoczkowego i patogenezę w <i>S. enterica</i>	[4]
Geny <i>igaA</i> i <i>yrjF</i> są niezbędne do wzrostu bakterii <i>Salmonella</i> i <i>E. coli</i>	[4]
IgaA przyczynia się do wirulencji, działając wyłącznie jako negatywny regulator po kolonizacji gospodarza	[14]
IgaA sprzyja ekspresji całego regulonu <i>PhoP-PhoQ</i>	[15]
IgaA jest białkiem otoczki serowaru <i>Typhimurium</i>	[16]
IgaA reguluje aktywację systemu Rcs poprzez <i>RcsF</i> w warunkach stresowych w wielu bakteriach Gram-ujemnych takich jak: <i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. enterica</i>	[1, 3, 4, 15-19]
<i>GumB</i> wraz z systemem Rcs odgrywa ważną rolę w interakcjach gospodarz-patogen w infekcjach oczu, przyczyniając się do tworzenia pęcherzyków	[11, 21]
<i>GumB</i> wraz z systemem Rcs reguluje system TSS5, który uczestniczy w wirulencji	[21]
IgaA wpływa na regulację przekaźnika fosforowego <i>RcsC/RcsD/RcsB</i> (układ RcsCDB)	[1, 19]
<i>GumB</i> (ortolog IgaA) hamuje aktywację systemu Rcs – tak że mutanty <i>S. marcescens</i> mają nadaktywną sygnalizację Rcs	[2]
IgaA zapobiega aktywacji systemu Rcs we wczesnych stadiach infekcji <i>Salmonella enterica</i>	[5]
IgaA zapobiega nadmiernej aktywacji układu regulacyjnego <i>RcsC-YojN-RcsB</i>	[14, 15]
IgaA ulega indukcji do syntezy kwasu kolanowego, natomiast ulega represji dla genów wirulencji, wici, fimbrii i SP-1/SP-2 w <i>Salmonella enterica</i> poprzez regulację systemu Rcs	[6]

2.1. Oddziaływanie z systemem Rcs

Wewnątrzkomórkowy inhibitor wzrostu A (IgaA), wchodzi w skład zewnętrznej błony komórkowej (OM), która u bakterii Gram-ujemnych jest asymetryczną dwuwarstwą z lipopolisacharydem (LPS) i fosfolipidami. LPS jest glikolipidem, który składa się z trzech domen: lipidu A, rdzenia i antygeny O. Ze względu na znaczenie integralności OM i funkcji bariery dla przetrwania, bakterie Gram-ujemne wypracowały szlaki reakcji na stres otoczki, w celu monitorowania oraz odpowiedzi na środowiskowe czynniki stresogenne. Jednym z takich szlaków jest Rcs, który składa się z regulatora odpowiedzi RcsB, kinazy histydynowej RcsC oraz białka fosforeaktywnego RcsD, który jest silnie aktywowana przez stres OM [13, 18].

Rcs jest jednym z najbardziej złożonych szlaków transdukcji sygnału u bakterii, obejmującym co najmniej siedem białek (trzy wchodzące w skład systemu RcsCDB oraz dodatkowe tj. RcsF) w czterech różnych przedziałach komórkowych. Białko błony wewnętrznej (IM) – RcsC – jest hybrydową kinazą histydynową, która autofosforyluje i przekazuje fosforan przez białko fosfotransferazy IM RcsD do cytoplazmatycznego regulatora odpowiedzi wiążącego DNA RcsB. RcsB, samodzielnie lub w połączeniu z innymi regulatorami, takimi jak RcsA, BglJ lub GadE reguluje ekspresję genów docelowych [14].

Rcs kontroluje również ekspresję egzopolisacharydów kapsułki, które są eksportowane na powierzchnię komórki i pomagają stabilizować OM. Warte uwagi jest to, że aktywacja systemu RcsCDB nie zaburza homeostazy otoczki, a przebudowa OM może zachodzić bez narażania jej podstawowych funkcji. IgaA zapobiega nadmiernej aktywacji układu regulacyjnego *RcsCDB*, który uczestniczy w syntezie egzopolisacharydów wchodzących w skład otoczki m.in. w regulacji ekspresji genu *ugd*, który koduje dehydrogenazę UDP-glukozy, która syntetyzuje kwas UDP-glukuronowy, będący półproduktem potrzebnym do syntezy 4-arabinozy, wchodzącej w skład części lipid A lipopolisacharydu [13, 14, 21].

Fosforegulacja Rsc jest jednym z głównych systemów sygnalizacyjnych, który pozytywnie wpływa na syntezę kwasu kolanowego, który – jako związek powierzchniowo czynny – ma za zadanie ułatwiać wzrost rozpełzły. Udowodniono, że nadmiar tego kwasu przyczynia się do zahamowania zdolności do wzrostu rozpełzłego, dlatego mutanty IgaA w wyniku braku regulacji szlaku syntezy kwasu kolanowego tracą zdolność do rojenia. Natomiast Rcs negatywnie wpływa na wirulencję i ruchliwość bakterii. Do badań nad Rsc wykorzystano spontanicznie wyizolowanego mutantu IgaA (T191P), który w głównej mierze jest aktywowany przez dany system sygnalizacyjny [6].

System sygnalizacyjny Rsc u *Salmonella enterica serovar Typhimurium* pełni rolę regulatora ograniczającego wzrost bakterii wewnątrz fibroblastów i jest hamowany przez białko IgaA. Zapobiega to jego nadmiernej aktywacji we wczesnych stadiach infekcji. Dodatkowo system ten aktywuje również geny wirulencji wymagane w późniejszych stadiach [6, 7, 15].

Spontaniczne mutacje składające się z delecji prowadzących do zmniejszonej produkcji RcsC lub RcsD prowadzą do zahamowania ekspresji *igaA*. Ważne cechy *serotypu Typhimurium*, takie jak jego potencjał wirulencji, zależą od precyzyjnego przystosowania aktywności systemu RcsCDB w celu regulacji szerokiej gamy genów, które reagują na stymulację. Uzyskane dane wykazują, że dany system pozytywnie wpływa na regulację genów istotnych dla wzrostu *Salmonelli* w makrofagach oraz na regulator SPI-2.

Natomiast w przypadku silnej aktywacji, Rsc całkowicie hamuje ścieżki wirulencji SPI-1/SPI-2, wici i biogenezy fimbrii [7, 15, 17].

System sygnalizacji Rsc jest charakterystyczny dla bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Po raz pierwszy został opisany u *E. coli* (gdzie został pierwotnie opisany jako regulator polisacharydu otoczkowego *E. coli*), a jego główną rolą była pozytywna regulacja kwasu kolanowego lub syntezy polisacharydu otoczkowego [1]. Aktualne dane dowodzą, że system ten reguluje geny związane z utrzymaniem integralności ściany komórkowej, ruchliwość, wirulencję, podział komórek i regulację czynnika sigma σS [1, 6, 23].

Sygnały pochodzące ze środowiska zewnętrznego, aktywują hybrydową kinazę RcsC, która prowadzi do autofosforylacji konserwowanej reszty His, natomiast sama RcsC jest negatywnie regulowana przez białko IgaA [1], [6], [23].

Na podstawie analizy genetycznej, a także badań interakcji zaproponowano, że RcsF, które jest lipoproteiną błony komórkowej wyczuwającą większość sygnałów indukujących Rcs sięga przez peryplazmę, aby oddziaływać z IgaA, prowadząc to białko do złagodzenia hamowania fosforoprzekaźnika, włączając Rcs. W przypadku braku stresu RcsF jest zamykany z IgaA poprzez interakcję z białkami błony komórkowej, w celu złagodzenia hamowania RcsC. W pierwszym etapie fosforan przenoszony jest na resztę Asp w samej RcsC, a następnie na resztę His w RcsD, a w końcowym etapie na RcsB (regulator odpowiedzi). Fosforylowana lub aktywna forma RcsB (RcsB~P), aby mogła połączyć się z ramką RcsAB w regionie promotora, łączy się z niestabilnym białkiem RcsA. Jednak niektóre geny nie wymagają do regulacji białka RcsA [1, 3, 6, 14].

Czynnikami regulującymi Rcs są: stres osmotyczny, wzrost w obecności cynku i glukozy przy obniżonej temperaturze, stres błonowy oraz wzrost na stałym podłożu. Dodatkowo, fosforan acetylu aktywuje syntezę polisacharydu otoczkowego, za pośrednictwem RcsB niezależnie od RscC [1, 3, 6, 14].

Mutację punktową w *igaA*, pierwszy raz zaobserwowano u mutantów *S. enterica*, wykazujących zdolność do namnażania się w komórkach fibroblastów – dany mutant wykazywał słaby wzrost w makrofagach. IgaA koduje białko błony wewnętrznej, podobne do *umoB* w *Proteus mirabilis* i *yrfF* w *E. coli*. Bakterie *Salmonella* posiadające mutacje w obrębie *igaA*, charakteryzują się mniejszą ruchliwością i są śluzowate. Tłumienie letalności zaobserwowano w przypadku mutacji w obrębie *rscB*, *rscC* lub *rscD*, co może świadczyć, że IgaA wycisza system sygnalizacji Rcs u *S. enterica* i *E. coli*. Główną rolą IgaA w wirulencji jest zapobieganie aktywacji systemu RcsCDB we wczesnych etapach infekcji. Dodatkowo Rcs jest konieczny również do aktywacji innych genów odpowiedzialnych za wirulencję w późniejszych stadiach infekcji. Mutacje aktywujące Rsc są uznawane za mutacje obniżające zjadliwość u *S. enterica* [6].

2.2. Ortologi IgaA

2.2.1. UmoB

Metabolity wtórne są ważnymi czynnikami regulującymi interakcję pomiędzy mikroorganizmami. *S. marcestens* charakteryzuje się wytwarzaniem szerokiej gamy aktywnych metabolitów wtórnych. Mutacja *gumB* z rodziny UmoB/IgaA u *S. marcestens*, doprowadziła do utraty ważnych metabolitów serratomolidu i prodigiozyny. Powstałe mutanty *gumB* o fenotypie odmiennym niż szczep typu dzikiego charakteryzowały się ograniczoną zdolnością rojenia i ruchu, zwiększoną produkcją polisacharydów wchodzących skład

otoczki oraz zmian w tworzeniu biofilmu. Efektom fenotypowym odpowiadają zmiany w transkrypcji *flhD*, *wecA* i *fimA*. Porównując z innymi białkami należącymi do rodziny UmoB/IgaA, *gumB* nie jest znaczący dla wzrostu u *S. marcestens*. Stella wraz z zespołem wykazali, że *yrfF* z *E. coli*, *igaA* z *S. enterica* i niezidentyfikowany odpowiednik *kumO* z *Klebsiella pneumoniae*, uzupełniają defekty metabolitów wtórnych powstałych w wyniku utworzenia mutantu *gumB*. Sugeruje to, że białka należące do rodziny UmoB/IgaA wpływają na tworzenie biofilmu i konkurencję pomiędzy bakteriami, poprzez sterowanie produkcją metabolitów wtórnych [4].

2.2.2. GumB

Jak wspomniano wcześniej ortologiem IgaA jest białko GumB. Jest ono niezbędne do wywołania pęcherzyków w ludzkich komórkach nabłonka rogówki, które powstają w wyniku ekspresji toksyn tworzących pory, wydzielanych przez system sekrecji typu V (TSSV), który jest regulowany przez Rcs. Wykazano, że GumB i *shlBA* (rodzina cytolizyn, które ulegają sekrecji przez TSSV) znajdują się w obwodzie regulacyjnym poprzez system fosforylacji odpowiedzi na stres Rcs, wymagany do tworzenia pęcherzyków i patogenezы w bezkręgowym modelu infekcji i proliferacji w fagocytarnej linii komórkowej. Badanie przeprowadzone w 2019 roku przez Brothers i in. przedstawia GumB jako regulator interakcji *S. marcestens* gospodarz-patogen i demonstuje wspólny mechanizm zależny od systemu wydzielania typu V, za pomocą którego bakterie wywołują zmiany morfologiczne powierzchni na komórkach ssaków. Ten mechanizm systemu wydzielania typu V prawdopodobnie przyczynia się do uszkodzenia przez bakterie warstwy nabłonka rogówki i umożliwia dostęp do głębszych części tkanki, które są bardziej podatne na infekcję [21].

Rola systemu odpowiedzi na stres Rcs została zbadana u *Serratia marcestens* z mutacją w genie *gumB*, będącej izolatem klinicznego zapalenia rogówki. GumB, będący odpowiednikiem IgaA, odpowiada za inhibicję systemu Rcs, mutanty posiadają nadaktywną sygnalizację Rcs. Uzyskane wyniki pokazują, że około 15% wszystkich genów w mutancie $\Delta gumB$ *S. marcestens* uległo 2-krotnej lub większej zmianie ekspresji w przeciwieństwie do typu dzikiego. Dodatkowe badania wykazały, że GumB znacząco wpływa na regulację ekspresji genów u *S. marcestens*, wpływając tym samym na cytotoksyczność bakterii i produkcję adhezyn powierzchniowych. GumB będące białkiem z rodziny IgaA, ma znaczący wpływ na transkryptom *S. marcestens*, co przekłada się na cytotoksyczność bakterii oraz kontrolowanie wirulencji, biosyntezy cytolizyny *ShlA* i tworzenie biofilmu. Dodatkowo *gumB* hamując aktywność systemu Rcs, powoduje, że mutanty *S. marscescens* charakteryzują się nadaktywną sygnalizacją systemu Rcs [2].

3. Podsumowanie

IgaA jest rodziną białek, wchodzących w skład ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Są one niezbędne w regulacji ekspresji genetycznej. Regulacja ekspresji genetycznej jest procesem kluczowym dla przystosowania się bakterii do zmieniających się warunków środowiska zewnętrznego. Funkcje tą mogą pełnić dzięki możliwości wchodzenia w interakcje z systemem Rcs. Poprzez modulację aktywności systemu Rcs białka IgaA regulują ruchliwość, zdolność do wzrostu rozpełzłego, wirulencję oraz syntezę kwasu kolanowego. Z uwagi na fakt istotnej roli białek z rodziny IgaA w regulacji fizjologii i patogenezы bakterii, mogą stanowić one cel nowoczesnych metod terapeutycznych. Pomimo postępów w zrozumieniu ich funkcji, wciąż pozostaje wiele niewiadomych, co stanowi podstawę do kontynuacji badań w tej dziedzinie.

Literatura

1. Wall E.A., Majdalani N., Gottesman S., *IgaA negatively regulates the Rcs Phosphorelay via contact with the RcsD Phosphotransfer Protein*, Plos Genetics, 2020, s. 1-28.
2. Stella N.A., Romanowski E.G., Brothers K.M., Calvario R.C., Shanks R.M.Q., *IgaA Protein, GumB, Has a Global Impact on the Transcriptome and Surface Proteome of Serratia marcescens*, Infection and Immunity, 2022, s. 1-19.
3. Dekoninck K., Létoquart J., Laguri C., Demange P., Bevernaegie R., Simorre J.P., Dehu O., Iorga B.I., Elias B., Cho S.H., *Jean-Francois Collet J.F., Defining the function of OmpA in the Rcs stress response*, ELife, 28, 9, 2020, s. 1-23.
4. Allen M.D., Christie M., Jones P., Porebski B.T., Roome B., Freund S.M.V., Buckle A.M., Bycroft M., Christ D., *Short Communication Solution structure of a soluble fragment derived from a membrane protein by shotgun proteolysis*, Protein Engineering, Design & Selection, 28, 10, 2015, s. 445-450.
5. Stella N.A., Brothers K.M., Callaghan J.D., Passerini A.M., Sigindere C., Hill P.J., Liu X., Wozniak D.J., Shanks R.M.Q., *An IgaA/UmoB Family Protein from Serratia marcescens Regulates Motility, Capsular Polysaccharide Biosynthesis, and Secondary Metabolite Production*, Applied and Environmental Microbiology, 84, 6, 2018, s. 1-14.
6. García-Calderón C.B., Casadesús J., Ramos-Morales F., *Regulation of igaA and the Rcs System by the MviA Response Regulator in Salmonella enterica*, Journal of Bacteriology, 191, 8, 2009, s. 2743-2752.
7. Wang Q., Zhao Y., McClelland M., Harshey R.M., *The RcsCDB Signaling System and Swarming Motility in Salmonella enterica Serovar Typhimurium: Dual Regulation of Flagellar and SPI-2 Virulence Genes*, Journal of Bacteriology, 189, 23, 2007, s. 8447-8457.
8. Tyne D.V., Ciolino J.B., Wang J., Durand M.L., Gilmore M.S., *Novel Phagocytosis-Resistant Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Escherichia coli From Keratitis*, JAMA Ophthalmology, 134, 11, 2017, s. 1306-1309.
9. Humphrey W., Dalke A., Schulten K., *VMD – Visual Molecular Dynamics*, Journal of Molecular Graphics, 14, 1996, s. 33-38.
10. Dufour A., Furness R.B., Hughes C., *Novel genes that upregulate the Proteus mirabilis flhDC master operon controlling flagellar biogenesis and swarming*, Molecular Biology, 29, 3, 1998, s. 741-751.
11. Romanowski E.G., Stella N.A., Romanowski J.E., Yates K.A., Dhaliwal D.K., St Leger A.J., Shanks R.M.Q., *The Rcs Stress Response System Regulator GumB Modulates Serratia marcescens – Induced Inflammation and Bacterial Proliferation in a Rabbit Keratitis Model and Cytotoxicity In Vitro*, Infection and Immunity, 89, 8, 2021, s. 1-14.
12. Morgenstein R.M., Rather P.N., *Role of the Umo Proteins and the Rcs Phosphorelay in the Swarming Motility of the Wild Type and an O-Antigen (waaL) mutant of Proteus mirabilis*, Journal of Bacteriology, 194, 3, 2012, s. 669-676.
13. Szostek B.A., Rather P.N., *Regulation of the Swarming Inhibitor disA in Proteus mirabilis*, Journal of Bacteriology, 195, 14, 2013, s. 3237-3243.
14. Domínguez-Bernal G., Pucciarelli M.G., Ramos-Morales F., García-Quintanilla M., Cano D.A., Casadesús J. Portillo F.G., *Repression of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay by the IgaA protein is a requisite for Salmonella virulence*, Molecular Microbiology, 53, 5, 2004, s. 1437-1449.
15. Tierrez A., Garci F.G., *The Salmonella Membrane Protein IgaA Modulates the Activity of the RcsC-YojN-RcsB and PhoP-PhoQ Regulons*, Journal of Bacteriology, 186, 22, 2004, s. 7481-7489.
16. Mariscotti J.F., Garci F.G., *Genome Expression Analyses Revealing the Modulation of the Salmonella Rcs Regulon by the Attenuator IgaA*, Journal of Bacteriology, 191, 6, 2009, s. 1855-1867.

17. Cho S.H., Szewczyk J., Pesavento C., Zietek M., Banzhaf M., Roszczenko P., Asmar A., Laloux G., Hov A.K., Leverrier P., Henst C., Vertommen D., Typas A., Collet J.F., *Detecting Envelope Stress by Monitoring β -Barrel assembly*, A Cell Press journal, 159, 7, 2014, s. 1652-1664.
18. Mariscotti J.F., Garci F., *Instability of the Salmonella RcsCDB signalling system in the absence of the attenuator IgaA*, Microbiology Society, 154, 2008, s. 1372-1383.
19. Hussein N.A., Cho S.H., Laloux G., Siam R., Collet J.F., *Distinct domains of Escherichia coli IgaA connect envelope stress sensing and down- regulation of the Rcs phosphorelay across subcellular compartments*, PLoS Genetics, 14, 5, 2018, s. 1-17.
20. Pucciarelli M.G., Rodríguez L., Portillo F.G., *A Disulfide Bond in the Membrane Protein IgaA Is Essential for Repression of the RcsCDB System*, Frontiers in Microbiology, 8, 2017, s. 1-10.
21. Brothers K.M., Callaghan J.D., Stella N.A., Bachinsky J.M., Al Higaylan M., Lehner K.L., Franks J.M., Lathrop K.L., Collins E., Schmitt D.M., Horzempa J., Shanks R.M.Q., *Blowing epithelial cell bubbles with GumB : ShlA-family pore-forming toxins induce blebbing and rapid cellular death in corneal epithelial cells*, PLoS Pathogens, 15, 6, 2019, s. 1-31.
22. Mouslim C., Groisman E.A., *Control of the Salmonella ugd gene by three two-component regulatory systems*, Molecular Microbiology, 47, 2, 2003, s. 335-344.
23. Majdalani N., Gottesman S., *THE RCS PHOSPHORELAY: A Complex Signal Transduction System*, Annu. Rev. Microbiol., 59, 1, 2005, s. 379-405.

Funkcje bakteryjnych białek z rodziny IgaA

Streszczenie

Bakterie, żeby przetrwać, muszą odpowiadać na zmiany w otaczającym je środowisku. Jednym z elementów umożliwiającym im odpowiednie reagowanie na otaczające je warunki są białka regulujące działanie systemów regulatorowych. Jednymi z takich białek są białka z rodziny IgaA, które są białkami błony zewnętrznej. Pełnią one rozmaite funkcje regulacyjne w komórce bakteryjnej. Przyczyniają się one np. do regulacji zdolności do wzrostu rozpełzłego, odpowiedzi na stres komórkowy, regulacji wirulencji. Funkcje te mogą pełnić dzięki wchodzeniu w interakcje z systemem Rsc. Białka IgaA nie są jeszcze dobrze scharakteryzowane i w literaturze przedmiotu brakuje pracy przeglądowej na ich temat. Artykuł ma na celu przedstawienie dotychczasowych informacji na temat rodziny białek IgaA i jej ortologów oraz opisanie ich oddziaływania z systemem Rsc. Słowa kluczowe: IgaA, umoB, GumB, Rsc

Bacterial function of IgaA family proteins

Abstract

Bacteria need to respond to changes in their surrounding environment in order to survive. One of the elements that enable them to respond appropriately to the conditions around them are proteins that regulate regulatory systems. One of such proteins are the IgaA family proteins, which are the outer membrane proteins. They have various regulatory functions in the bacterial cell. They contribute, for example, to the regulation of swarming ability, the response to cellular stress and the regulation of virulence. They can perform these functions by interacting with the Rsc system. IgaA proteins are not yet well characterised and there is a lack of review papers on them in the literature. This article aims to provide information to date on the IgaA family of proteins and its orthologues and to describe their interactions with the Rsc system.

Keywords: IgaA, umoB, GumB, Rsc

Ocena zdolności szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od zwierząt do tworzenia biofilmu

1. Wprowadzenie

Definicja biofilmu według IUPAC (ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) brzmi następująco: *Biofilm to agregacja mikroorganizmów, takich jak bakterie, w której komórki są osadzone w wytworzonej przez siebie macierzy pozakomórkowych substancji polimerowych (EPS) i przylegają do siebie i/lub do powierzchni* [1]. Zatem biofilm bakteryjny to złożone, syntroficzne konsorcjum mikroorganizmów, utrzymywane razem przez produkowane przez te komórki polimery, składające się głównie z polisacharydów, wydzielanych białek i pozakomórkowego DNA. Ten zbiorowy, wielokomórkowy układ jest zazwyczaj tymczasowy, ale znacznie zwiększa przeżycie drobnoustrojów w danym środowisku. Wzrastający biofilm wykazuje zmienny fenotyp, ekspresję genów i produkcję białek [2].

Większość bakterii występuje w środowisku bytowania w formie biofilmu, ponieważ struktura ta chroni komórki przed wpływem czynników zewnętrznych. Dzięki temu mikroorganizmy są odporne na działanie m.in. środków przeciwdrobnoustrojowych, promieniowania czy elementów układu odpornościowego gospodarza [3].

Biofilm może stanowić pojedyncza warstwa komórek, ale też może to być system wielowarstwowy widoczny nawet gołym okiem. Analizy strukturalne wykazały, że w niektórych przypadkach wewnątrz biofilmów powstają unikalne twory w kształcie filarów lub grzybów, jednak głównym czynnikiem wpływającym na architekturę tego konsorcjum są warunki środowiskowe. Wewnątrz biofilmu przebiegają skomplikowane sieci kanałów, które zapewniają ciągły dostęp wody i niezbędnych składników odżywczych, nawet w najgłębszych obszarach [4, 5].

Biofilm powstaje kiedy pojedyncza komórka adhezuje do powierzchni biotycznej, bądź abiotycznej i dzieląc się tworzy jego pierwszą warstwę. Adhezja do powierzchni jest etapem odwracalnym, a komórka w formie planktonicznej zdolna jest do dalszego przemieszczania się. Przyłgnięcie do jakiegoś obszaru i rozpoczęcie podziałów, kiedy zaczyna dochodzić do syntezy cząsteczek sygnałowych i komunikacji pomiędzy komórkami na zasadzie przekaźnictwa chemicznego (QS, ang. *quorum sensing*), to moment kiedy biofilm formuje się nieodwracalnie. W następnym kroku tworzy się struktura przestrzenna, zawierająca komórki upakowane w skupiska i kanały transportowe oraz bogatą macierz międzykomórkową. Tak utworzony biofilm funkcjonuje jak złożony organizm, komuni-

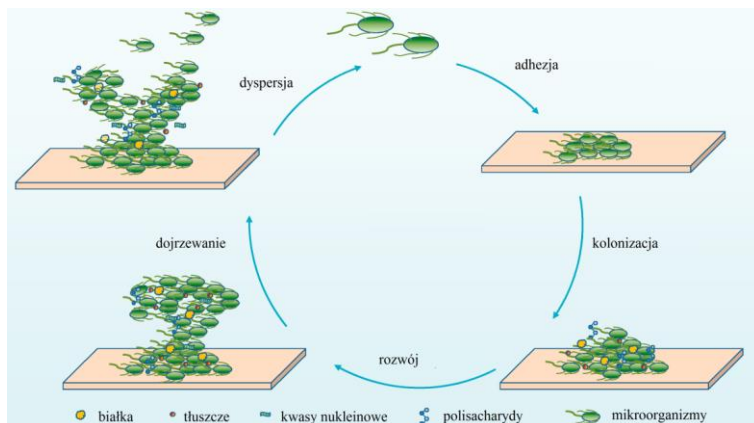
¹ s. andrzejczak-grzadko@wnb.uz.zgora.pl, Katedra Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski, www.uz.zgora.pl.

² 104938@stud.uz.zgora.pl, Koło Naukowe Biotechnologów UZ, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski, www.uz.zgora.pl.

³ 103132@stud.uz.zgora.pl, Koło Naukowe Biotechnologów UZ, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski, www.uz.zgora.pl.

⁴ 104931@stud.uz.zgora.pl, Koło Naukowe Biotechnologów UZ, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski, www.uz.zgora.pl.

kując się, regulując ekspresję genów i produkcję potrzebnych związków. W ostatnim etapie funkcjonowania biofilmu obserwuje się odrywanie pojedynczych komórek i ich dyspersję w celu tworzenia nowego konsorcjum na kolejnych powierzchniach (rys. 1) [6, 7].



Rysunek 1. Etapy formowania biofilmu, opracowanie własne na podstawie [6]

Dla wielu bakterii patogennych zdolność do formowania biofilmu jest głównym czynnikiem wirulencji, dlatego też zakażenia często związane są z obecnością tej struktury [2].

2. Biofilm *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (gronkowiec złocisty) jest jednym z najbardziej niesławnych i rozpowszechnionych patogenów bakteryjnych. Powoduje on trudną do oszacowania liczbę nieskomplikowanych infekcji skóry. Ponadto prawdopodobnie setki tysięcy do milionów poważniejszych, inwazyjnych infekcji rocznie na całym świecie. Jest wiodącym czynnikiem etiologicznym zapalenia płuc i innych infekcji dróg oddechowych, układu krążenia, a także bakteriemii u ludzi [8, 9]. Zakażenia *S. aureus* są także powszechne u drobiu i noszą nazwę stafylokokoz [10-13]. Objawy różnią się w zależności od miejsca zakażenia. Najczęściej infekcje dotyczą kości, pochewki ścięgien i stawów, zwłaszcza stawów piszczelowo-strzałkowych. Zakażenia gronkowcowe występują rzadziej na skórze drobiu, wątrobie, sercu czy płucach [14-17]. Przyczyną nagłych zgonów niosek może być gronkowcowa posocznica [18]. Patogeneza zakażeń gronkowcem złocistym u drobiu nie jest jednak dobrze poznana. Stafylokokozą jest zwykle chorobą przewlekłą, słabo reagującą na leczenie przeciwbakteryjne i immunizację [19].

W przeciwieństwie do wielu innych patogenów bakteryjnych, które często wykorzystują tylko jedną strategię do wywoływania choroby, *S. aureus* wytwarza zdumiewający zestaw czynników wirulencji. Obejmują one bogaty zestaw toksyn i czynników unikania odporności oraz szeroki wachlarz czynników białkowych i niebiałkowych, które umożliwiają kolonizację żywiciela podczas infekcji [8]. Na zdolność *S. aureus* do wywoływania przewlekłych infekcji zwrócono uwagę kiedy okazało się, że zakażenia gronkowcowe są niezwykle odporne w leczeniu terapeutycznym. Wyjaśnieniem tego zjawiska była zdolność gronkowców do tworzenia biofilmu, również na wszczepionych sztucznych zastawkach serca, cewnikach i protezach stawów [20].

Zakażenia związane z biofilmem wiążą się ze zwiększoną zachorowalnością i śmiertelnością. Infekcje gronkowcowe stanowią ogólnoswiatowy problem w hodowli kurcząt

i indyków, powodując straty ekonomiczne z powodu zmniejszonego przyrostu masy ciała i zmniejszonej produkcji jaj [15]. Jak się jednak okazuje, oprócz tego, że gronkowiec złocisty stanowi poważne zagrożenie w hodowli drobiu, nawet połowa typowych i atypowych szczepów *S. aureus* wytwarza enterotoksyny, które mogą powodować zatrucia pokarmowe u ludzi. Zatrucia takie mogą wystąpić z powodu zanieczyszczenia szczepami *S. aureus* wytwarzającymi enterotoksyny przetwarzanych tusz drobiowych [21-25]. W związku z tym lepsze zrozumienie rozwoju biofilmów gronkowcowych na poziomie molekularnym jest niezbędne do opracowania nowych strategii leczenia zakażeń związanych z biofilmami i zmniejszenia znacznych obciążeń powodowanych przez ten patogen. Celem tej pracy była ocena zdolności izolatów *S. aureus* pochodzących od drobiu do tworzenia biofilmu.

3. Materiały i metody

3.1. Szczepy bakteryjne

Materiałem do badań były szczepy *S. aureus* pozyskane z wymazów pobieranych od drobiu, pochodzącego z różnych hodowli na terenie województwa lubuskiego. Wymazy pobierane były z płuc, tchawicy, wątroby, stawów oraz z mózgu. Miejscem poboru było weterynaryjne laboratorium mikrobiologiczne INVAC Polska w Otyniu. Wymazy pobierane były jednorazową, jałową wymazówką bawełnianą. Bezpośrednio po pobraniu, materiał posiewano na podłoże mikrobiologiczne Columbia agar z 5% krwi baraniej (GrasoBiotech, Polska). Płytki inkubowano w warunkach tlenowych w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po tym czasie kolonie poddawano ocenie fenotypowej pod kątem kształtu, koloru, powierzchni i konsystencji kolonii oraz pod kątem obecności strefy całkowitej hemolizy (β -hemolizy) wokół kolonii. Izolaty o morfologii kolonii charakterystycznej dla gronkowca złocistego poddawane były identyfikacji do gatunku metodą MALDI-TOF w laboratorium INVAC Deutschland. Spis szczepów wykorzystanych w badaniach prezentuje tabela 1.

Tabela 1. Izolaty wykorzystane w badaniach

Nr	Szczep	Miejsce izolacji	Nr	Szczep	Miejsce izolacji
1	286-2	stawy	17	111-1	stawy
2	275-1	mózg	18	290-2	płuca
3	247-7	tchawica	19	121-6	stawy
4	232-1	tchawica	20	074-3	stawy
5	239-3	stawy	21	289-5	płuca
6	226-2	stawy	22	124-4	stawy
7	273-4	wątroba	23	035-1	tchawica
8	091-3	stawy	24	269-1	stawy
9	243-7	tchawica	25	126-10	stawy
10	232-1	tchawica	26	015-2	stawy
11	072-2	stawy	27	211-2	tchawica
12	227-4	stawy	28	160-4	tchawica
13	006-2	płuca	29	001-3	stawy
14	266-2	stawy	30	288-2	tchawica
15	033-3	tchawica	31	029-4	tchawica
16	073-6	tchawica	32	222-1	tchawica

3.2. Ocena zdolności izolatów *S. aureus* do tworzenia biofilmu

Do oceny zdolności do tworzenia biofilmu zastosowano metodę z roztworem fioletu krystalicznego opracowaną na podstawie literatury [26]. Badane szczepy hodowano w płynnym podłożu BHI (ang. *Brain Heart Infusion*) przez 24 godz. w temp. 37°C. Bogaty skład podłoża zapewniał optymalne warunki do namnażania się bakterii. Z 24-godzinnej hodowli sporządzono zawiesinę o gęstości 1 MF, a następnie 1 ml zawiesiny każdego z badanych szczepów nakładano w trzech powtórzeniach na polistyrenową płytkę titracyjną i inkubowano 24 godz. w 37°C. Po inkubacji z każdego dołka odciążono hodowlę, następnie każdy dołek przepłukano trzykrotnie 0,9% roztworem NaCl, w celu usunięcia niezadherowanych komórek. Płytkę suszono w 37°C przez 10 min. W kolejnym etapie do każdego z dołków dodano 1 ml roztworu fioletu krystalicznego, który barwi zarówno komórki bakteryjne, jak i zewnątrzkomórkową macierz i inkubowano 10 min. w temperaturze pokojowej. Następnie odciążono barwnik, dołki ponownie trzykrotnie przepłukano 0,9% NaCl i suszono w 37°C przez 10 min. W ostatnim kroku do dołków naniesiono 1 ml 30% roztworu kwasu octowego i wytrząsano z prędkością 200 obrotów na minutę przez 10 min. Powstałą zawiesinę przenoszono do kuwet spektrofotometrycznych. Pomiar absorbancji przeprowadzono dla długości fali $\lambda = 570$ nm.

4. Wyniki

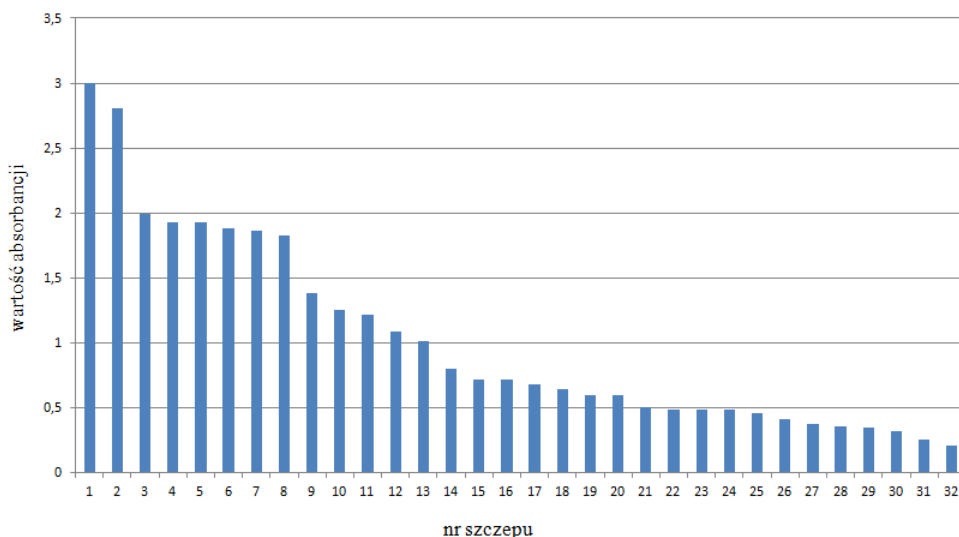
W badaniu wykorzystano 32 izolaty *S. aureus* pozyskane od drobiu. W ocenie ich zdolności do formowania biofilmu wykorzystano pomiar absorbancji i skalę gdzie:

- OD <1 świadczy o słabej zdolności;
- OD 1-2 o zdolności umiarkowanej;
- OD 2-3 o silnej zdolności;
- OD >3 o bardzo silnej zdolności do tworzenia biofilmu.

Wyniki pomiarów absorbancji przedstawiono w tabeli 2 i na rysunku 2.

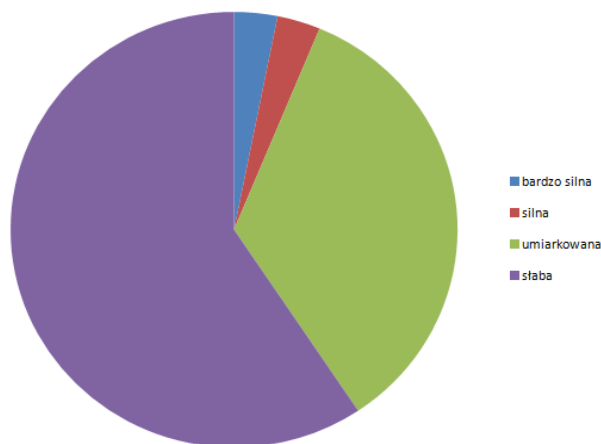
Tabela 2. Wartości mierzonej absorbancji dla badanych szczepów *S. aureus*

Nr	Szczep	Wartość OD	Nr	Szczep	Wartość OD
1	286-2	3,0016	17	111-1	0,6756
2	275-1	2,8034	18	290-2	0,643
3	247-7	1,9968	19	121-6	0,5998
4	232-1	1,9307	20	074-3	0,5966
5	239-3	1,9244	21	289-5	0,507
6	226-2	1,8836	22	124-4	0,4872
7	273-4	1,8616	23	035-1	0,4852
8	091-3	1,828	24	269-1	0,4807
9	243-7	1,3803	25	126-10	0,4615
10	232-1	1,2539	26	015-2	0,4086
11	072-2	1,2157	27	211-2	0,3701
12	227-4	1,0898	28	160-4	0,3557
13	006-2	1,0108	29	001-3	0,3471
14	266-2	0,8029	30	288-2	0,316
15	033-3	0,7149	31	029-4	0,2508
16	073-6	0,7136	32	222-1	0,2082



Rysunek 2. Rozkład wartości absorbancji dla badanych szczepów *S. aureus*

Wśród badanych szczepów większość wykazała słabą i umiarkowaną zdolność do tworzenia biofilmu. Było to odpowiednio 19 (59,4%) i 11 (34,4%) izolatów. Tylko jeden szczep (3,1%) wykazał się silną i jeden (3,1%) bardzo silną zdolnością do tworzenia biofilmu. Rozkład zdolności do tworzenia biofilmu badanych szczepów prezentuje rysunek 3.



Rysunek 3. Rozkład zdolności badanych szczepów do tworzenia biofilmu

5. Dyskusja

Biofilm bakteryjny powstaje w celu ochrony komórek przed czynnikami zewnętrznymi, nadając tym samym konsorcjum takiej oporności jakiej nie mają pojedyncze mikroorganizmy. Główną rolą tworzenia biofilmu podczas infekcji jest ochrona bakterii przed atakami fagocytów [27]. Tworzenie przestrzennej struktury biofilmu jest procesem złożonym. W odniesieniu do biofilmów gronkowcowych dotychczas główny nacisk w badaniach kładziono na fazy adhezji i kolonizacji (akumulacji), w których pośredniczą

różne rodzaje adhezyn. Jest to grupa białek eksponowanych na powierzchni, określanych zbiorczo jako MSCRAMM (składniki powierzchni drobnoustrojów rozpoznające cząsteczki matrycy adhezyjnej, ang. *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) [28]. Są to główne determinanty odpowiedzialne za początkową adhezję komórek do powierzchni biotycznych i abiotycznych. Faza kolonizacji natomiast zależna jest od adhezyn polisacharydowych, które promują interakcje adhezyjne między komórkami bakteryjnymi [29]. Chociaż opisano wiele potencjalnych polisacharydów, istnieje zgoda wśród naukowców co do tego, że głównym wyznacznikiem fazy kolonizacji tworzenia biofilmu gronkowcowego jest polisacharydowa adhezyna międzykomórkowa (PIA, ang. *Polysaccharide Intercellular Adhesin*) której produkcja zależy od genów zlokalizowanych w operonie *icaADBC*. Badania wykazały, że PIA składa się z polimerycznej N-acetyloglukozaminy i z tego powodu określa się ją również jako PNAG, ang. *Poly-N-AcetylGlucosamine*) [30, 31]. U gronkowców zostały zidentyfikowane również niektóre białka zaangażowane w tworzenie biofilmu, w tym białko związane z biofilmem (Bap), które jest kodowane przez gen *bap* [29]. Cucarella i in. (2001) wykazali, że Bap jest nie tylko zaangażowany w pierwotny etap przyłączania się komórek *S. aureus* do powierzchni, ale wraz z PIA bierze udział w agregacji komórek, a tym samym w dojrzewaniu biofilmu [32]. Operon *ica* został po raz pierwszy zidentyfikowany u *S. epidermidis*, obecny jest jednak również u *S. aureus* i wydaje się pełnić tę samą funkcję [33]. Prawdopodobnie większość szczepów *S. aureus* zawiera cały operon *ica* [34, 35]. Pojawiają się jednak doniesienia wskazujące, że istnieją zależne od szczepu różnice w odniesieniu do ogólnej zdolności do tworzenia biofilmu *in vitro* [33, 35-37]. Operon *ica* podlega zmianom fazowym u *S. epidermidis*, a jego ekspresja zarówno u *S. epidermidis*, jak i *S. aureus* podlega również regulacji środowiskowej [38]. Najważniejsze w tej sytuacji wydaje się doniesienie McKenney i in. (1999) wskazujące na to, że produkcja PNAG u *S. aureus* jest zwiększona podczas wzrostu *in vivo* [39]. Ponadto jak stwierdzili Crampton i in. (2001) wzrost beztlenowy indukuje ekspresję operonu *ica* i produkcję PIA zarówno u *S. epidermidis*, jak i *S. aureus* [40].

Wśród analizowanych w tym badaniu izolatów *S. aureus* pochodzenia zwierzęcego stwierdzono w większości przypadków słabą, bądź umiarkowaną zdolność do tworzenia biofilmu *in vitro*. Tylko dwa szczepy miały silną i bardzo silną zdolność do tworzenia tej struktury. Jest to o tyle zaskakujący wynik, że wszystkie szczepy izolowane były od drobiu jako czynnik etiologiczny w infekcji. Rezultat taki wskazywać może albo na odmienny mechanizm zakażenia albo też potwierdza dane literaturowe, że w warunkach *in vitro* izolaty nie promują powstawania biofilmu, jako prawdopodobnie zbędnego w warunkach hodowlanych. Dane literaturowe potwierdzają, że zdolność do tworzenia biofilmu wśród szczepów *S. aureus* izolowanych od drobiu jest różna, jednak wiele wskazuje, że na zdolność tę faktycznie wpływają warunki hodowli i czynniki zewnętrzne. Wśród tych czynników wyróżnić można między innymi rodzaj powierzchni przylegania (metal, plastik itp.), dostępność glukozy czy składników mineralnych [41-46].

6. Podsumowanie

Gronkowiec złocisty to jeden z najistotniejszych patogenów ludzi i zwierząt. Bakterie te znane są z produkcji licznych czynników wirulencji, również tworzenia biofilmu. Otrzymane w toku badań wyniki nie potwierdzają tej zdolności. Wskazywać mogą na inne podłoże zjadliwości tych izolatów i dlatego wymagają dalszej analizy, np. oceny

molekularnej operonu *ica* oraz innych czynników wirulencji. W związku z małą ilością piśmiennictwa wyjaśniającego różnice w poziomie zdolności poszczególnych szczepów gronkowca złocistego izolowanych od drobiu do tworzenia biofilmu, a także podłoża molekularnego tego zjawiska, dalsze badania w tym kierunku są wskazane. Szczególnie te wyjaśniające jak warunki środowiskowe promują kształtowanie się struktury biofilmu.

Literatura

1. Vert M., Doi Y., Hellwich K.H., Hess M, Hodge P., Kubisa P., Rinaudo M., Schué F., *Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)*, Pure and Applied Chemistry, 84, 2012, s. 377-410.
2. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P., *Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases*, Nature Reviews. Microbiology, 2, 2004, s. 95-108.
3. López D., Vlamakis H., Kolter R., *Biofilms*, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2, 2010, s. 1-11.
4. Donlan R.M., *Biofilms: Microbial Life on Surfaces*, Emerging Infectious Diseases, 8(9), 2002, s. 881-890.
5. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R., *Biofilm formation as microbial development*, Annual Review of Microbiology, 54, 2000, s. 49-79.
6. Yin W., Wang Y., Liu L., He J., *Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments*, International Journal of Molecular Sciences, 20, 2019, s. 3423.
7. Watnick P., Kolter R., *Biofilm, city of microbes*, Journal of Bacteriology, 182, 2000, s. 2675-2679.
8. Rasigade J. P., Dumitrescu O., Lina G., *New epidemiology of Staphylococcus aureus infections*, Clinical Microbiology and Infection, 20, 2014, s. 587-588.
9. Tong S.Y., Davis J.S., Eichenberger E., Fowler V.G. Jr, *Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management*, Clinical Microbiology Review, 28, 2015, s. 603-661.
10. Anderson J.C., *Staphylococcus*, [w:] Gyles C.L. Thoen C.O. (red.), *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 1st ed. Iowa State University Press, Ames, 1986. s. 14-20.
11. Scanlan C.M., Hargis B.M., *A bacteriologic study of scabby-hip lesions from broiler chickens in Texas*, Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1, 1989, s. 170-3.
12. Wang C.T., Lee Y.C., Fuh T.H., *Artificial infection of chicks with Staphylococcus aureus*, Journal of the Chinese Society of Veterinary Science, 3, 1977, s. 1-6.
13. Cheville N.F., Tappe J., Ackermann M., Jensen A., *Acute fibrinopurulent blepharitis and conjunctivitis associated with Staphylococcus hyicus, Escherichia coli, and Streptococcus sp. in chickens and turkeys*, Veterinary Pathology, 25, 1988, s. 369-375.
14. Frazier M.N., Parizek W.J., Garner E., *Gangrenous dermatitis of chickens*, Avian Diseases, 8, 1964, s. 269-273.
15. Bergmann V., Köhler B., Vogel K., *Staphylococcus aureus infection of fowls on industrialized poultry units. I. Types of infection*, Archiv für experimentelle Veterinärmedizin, 34, 1980, s. 891-903.
16. Arp L.H., Robinson I.M., Jensen A.E., *Pathology of liver granulomas in turkeys*, Veterinary Pathology, 20, 1983, s. 80-89.
17. Linares J.A., Wigle W.L., *Staphylococcus aureus pneumonia in turkey poults with gross lesions resembling aspergillosis*, Avian Diseases, 45, 2001, s. 1068-1072.
18. Bickford A.A., Rosenwald A.S., *Staphylococcal infections in chickens*, Poultry Diseases, July, 1975, s. 285-287.
19. Chen D.W., Gan M.H., Liu R.P., *Studies on staphylococcosis in chickens. III. Properties and pathogenicity of Staphylococcus aureus*, Chinese Journal of Veterinary Medicine, 10, 1984, s. 6-8.

20. Naber C.K., *Staphylococcus aureus bacteremia: epidemiology, pathophysiology, and management strategies*. *Clinical Infectious Diseases*, 15, 2009, s. 231-7.
21. Evans J.B., Ananaba G.A., Pate C.A., Bergdoll M.S. *Enterotoxin production by atypical Staphylococcus aureus from poultry*, *Journal of Applied Bacteriology*, 54, 1983, s. 257-261.
22. Gibbs P.A., Patterson J.T., Harvey J., *Biochemical characteristics and enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus strains isolated from poultry*, *Journal of Applied Bacteriology*, 44, 1978, s. 57-74.
23. Adams B.W., Mead G.C., *Incidence and properties of Staphylococcus aureus associated with turkeys during processing and further-processing operations*, *Journal of Hygiene*, 91, 1983, s. 479-490.
24. Notermans S., Dufrenne J., van Leeuwen W.J. *Contamination of broiler chickens by Staphylococcus aureus during processing; incidence and origin*, *Journal of Applied Bacteriology*, 52, 1982, s. 275-280.
25. Thompson J.K., Patterson J.T. *Staphylococcus aureus from a site of contamination in a broiler processing plant*, *Records of Agricultural Research*, 31, 1983, s. 45-53.
26. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H., *Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices*, *Journal of Clinical Microbiology*, 22, 1985, s. 996-1006.
27. Thurlow L.R., Hanke M.L., Fritz T., Angle A., Aldrich A., Williams S.H., Engebretsen I.L., Bayles K.W., Horswill A.R., Kielian T., *Staphylococcus aureus biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo*, *Journal of Immunology*, 186, 2011, s. 6585-6596.
28. Patti J.M., Allen B.L., McGavin M.J., Hook M., *MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues*, *Annual Review of Microbiology*, 48, 1994, s. 585-617.
29. Götz F., *Staphylococcus and biofilms*, *Molecular Microbiology*, 43, 2002, s. 1367-1378.
30. Heilmann C., Schweitzer O., Gerke C., Vanittanakom N., Mack D., Götz F., *Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis*, *Molecular Microbiology*, 20, 1996, s. 1083-1091.
31. Maira-Litran T., Kropec A., Abeygunawardana C., Joyce J., Mark III G., Goldmann D.A., Pier G.B. *Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide*, *Infection and Immunity*, 70, 2002, s. 4433-4440.
32. Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa I., Penadés J.R., *Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation*, *Journal of Bacteriology*, 183, 2001, s.2888-96.
33. Cramton S.E., Gerke C., Schnell N.F., Nichols W.W., Götz F., *The intercellular adhesion (ica) locus is present in Staphylococcus aureus and is required for biofilm formation*, *Infection and Immunity*, 67, 1999, s. 5427-5433.
34. Fowler V.G., Fey Jr. P.D., Reller L.B., Chamis A.L., Corey G.R., Rupp M.E., *The intercellular adhesin locus ica is present in clinical isolates of Staphylococcus aureus from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints*, *Medical Microbiology and Immunology*, 189, 2001, s. 127-131.
35. Rohde H., Knobloch J.K., Horstkotte M.A., Mack D., *Correlation of biofilm expression types of Staphylococcus epidermidis with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of icaADBC genotype-independent factors*, *Medical Microbiology and Immunology*, 190, 2001, s. 105-112.
36. Arciola C.R., Baldassarri L., Montanaro L., *Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections*, *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2001, s. 2151-2156.
37. Beenken K.E., Blevins J.S., Smeltzer M.S., *Mutation of sarA in Staphylococcus aureus limits biofilm formation*. *Infection and Immunity*, 71, 2003, s. 4206-4211.

38. Ziebuhr W., Krimmer V., Rachid S., Lössner I., Götz F., Hacker J., *A novel mechanism of phase variation of virulence in Staphylococcus epidermidis: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256*, Molecular Microbiology, 32, 1999, s. 345-356.
39. McKenney D.A., Pouliot K.L., Wang Y., Murthy V., Ulrich M., Doring G., Lee J.C., Goldmann D.A., Pier G.B., *Broadly protective vaccine for Staphylococcus aureus based on an in vivo-expressed antigen*, Science, 284, 1999, s. 1523-1527.
40. Cramton S.E., Ulrich M., Götz F., Döring G., *Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis*, Infection and Immunity, 69, 2001, s. 4079-4085.
41. Rodrigues L.B., Dos Santos L.R., Tagliari V.Z., Rizzo N.N., Trenhago G., de Oliveira A.P., Goetz F., do Nascimento V.P., *Quantification of biofilm production on polystyrene by Listeria, Escherichia coli and Staphylococcus aureus isolated from a poultry slaughterhouse*, Brazilian Journal of Microbiology, 41, 2010, s. 1082-5.
42. Jerônimo H.M.A., Queiroga R.C.R., Costa A.C.V., Barbosa I.M., Conceição M.L., Souza L., *Adhesion and biofilm formation by Staphylococcus aureus from food processing plants as affected by growth medium, surface type and incubation temperature*, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 48, 2012, s. 737-745.
43. Lancette G.A., Bennett R.W., *Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins*, [w:] Downes F.P., Ito K. (red.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4 ed., American Public Health Association, Washington 2001, s. 387-403
44. Ferreira A.A., Tette P.A.S., Mendonça R.C.S., Soares A. de S., Carvalho M.M.D., *Detection of exopolysaccharide production and biofilm-related genes in Staphylococcus spp. isolated from a poultry processing plant*, Food Science and Technology, 34, 2014, s. 710-716.
45. Pinto J.B., Rossatto F.C.P., Martins P.D. Frazzon A.P.G., *Genetic relationships and virulence factors in Staphylococcus aureus isolated from raw poultry in South Brazil*, Annals of Microbiology, 65, 2015, s. 1933-1940.
46. Erfan A.M., Marouf Sh., *Biofilm-Producing Staphylococcus aureus Screening in Poultry Farms and Abattoirs*, Journal of Animal and Veterinary Advances, 14, 2015, s. 308-314.

Ocena zdolności szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od zwierząt do tworzenia biofilmu

Streszczenie

Większość bakterii występuje w środowisku bytowania w formie biofilmu, czyli wielowarstwowej struktury, w skład której wchodzi populacja drobnoustrojów oraz wytwarzana przez nie heterogenna macierz zewnątrzkomórkowa. Struktura biofilmu chroni drobnoustroje przed wpływem czynników zewnętrznych. Dzięki temu mikroorganizmy te są odporne na działanie m.in. środków przeciwdrobnoustrojowych czy elementów układu odpornościowego gospodarza. Dla wielu bakterii patogennych zdolność do formowania biofilmu jest głównym czynnikiem wirulencji. *Staphylococcus aureus* to patogen o szerokim wachlarzu czynników wirulencji, odpowiedzialny za infekcje o różnych lokalizacjach. Celem pracy była ocena zdolności izolatów *S. aureus* pochodzenia zwierzęcego do tworzenia biofilmu. W badaniu wykorzystano 32 szczepy wyizolowane od drobiu jako czynnik etiologiczny infekcji. Do oceny zdolności do tworzenia biofilmu wykorzystano metodę z roztworem fioletu krystalicznego na polistyrenowej płytce titracyjnej. Pomiaru absorbancji dokonywano dla długości fali $\lambda = 570$ nm. W ocenie zdolności do formowania biofilmu wykorzystano skalę gdzie: OD < 1 świadczy o słabej zdolności, OD < 2 o zdolności umiarkowanej, OD < 3 o silnej zdolności, OD > 3 o bardzo silnej zdolności do tworzenia biofilmu. Wśród analizowanych szczepów 19 wykazało się słabą zdolnością formowania biofilmu, 11 szczepów tworzyło biofilm umiarkowanie, natomiast 1 izolat wykazał się silną zdolnością i 1 bardzo silną zdolnością do tworzenia biofilmu. Szczepy *S. aureus*, pomimo że były przyczyną infekcji zwierząt, od których były wyizolowane, charakteryzują się w większości słabą lub umiarkowaną zdolnością do formowania biofilmu. Wskazuje to na inne podłoże zjadliwości tych izolatów i wymaga ich dalszej analizy.

Słowa kluczowe: *Staphylococcus aureus*, biofilm

Evaluation of the biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from animals

Abstract

Most bacteria are found in their habitat in the form of a biofilm, a multilayered structure comprising the microbial population and the heterogeneous extracellular matrix they produce. The biofilm structure protects the microorganisms from external influences. This makes the microorganisms resistant to antimicrobial agents or elements of the host immune system. For many pathogenic bacteria, the ability to form a biofilm is a major virulence factor. *Staphylococcus aureus* is a pathogen with a wide range of virulence factors, responsible for infections of various locations. The aim of this study was to evaluate the biofilm-forming ability of *S. aureus* isolates of animal origin. The study used 32 strains isolated from poultry as the aetiological agent in the infection. The method with a crystal violet solution on a polystyrene titer plate was used to evaluate the biofilm-forming ability. Absorbance was measured at a wavelength of $\lambda = 570$ nm. A scale was used to assess biofilm-forming ability where: OD < 1 indicates weak ability, OD < 2 moderate ability, OD < 3 strong ability, OD > 3 very strong biofilm-forming ability. Among the strains analysed, 19 showed weak biofilm-forming ability, 11 strains formed biofilm moderately, while 1 isolate showed strong ability and 1 very strong biofilm-forming ability. *S. aureus* strains, despite being the cause of infection in the animals from which they were isolated, are mostly characterised by a weak to moderate biofilm-forming ability. This indicates a different basis for the virulence of these isolates and warrants further analysis.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, biofilm

Bakterie *Bacillus subtilis* w produkcji zwierzęcej – definicja, schemat działania, celowość stosowania, zalecenia, korzyści

1. Wstęp

Zastosowanie drobnoustrojów w produkcji zwierzęcej przyczynia się do utrzymania optymalnej równowagi mikrobiologicznej w przewodzie pokarmowym zwierząt. Tym samym, stosowanie drobnoustrojów probiotycznych w żywieniu zwierząt może przeciwdziałać chorobom układu pokarmowego poprzez konkurencję z mikroorganizmami patogennymi o miejsce i pożywienie w przewodzie pokarmowym. Dzięki temu pobudzane jest lepsze trawienie i wchłanianie składników odżywczych, co pozytywnie wpływa na wzrost i wyniki produkcyjne zwierząt. Dodatkowo, działanie to pomaga w zapobieganiu infekcjom, a także ogranicza ilość stosowanych antybiotyków w produkcji zwierzęcej. W ten sposób, zastosowanie probiotyków w produkcji zwierzęcej może przyczynić się do poprawy zdrowia i wyników produkcyjnych zwierząt, a także ograniczenia stosowania antybiotyków, co stanowi istotne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt [1].

Celem pracy było przedstawienie bakterii *Bacillus subtilis*, jej działania i zastosowania w produkcji zwierzęcej. Przedstawiony został problem dysbakterioz u zwierząt gospodarskich i możliwość zastosowania postbiotyku, z wykorzystaniem *Bacillus subtilis*, w celu redukcji dysfunkcji przewodu pokarmowego np. biegunek i poprawy stanu zdrowia jelit trzody chlewnej.

2. Charakterystyka *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis to gram-dodatnia, beztlenowa pałeczka należąca do rodzaju *Bacillus* z rodziny *Bacillaceae*. Bakteria ta charakteryzuje się szerokim zasięgiem występowania m.in.: w glebie, w wodzie, w powietrzu oraz w żywności. Jest to bakteria termotolerancyjna i zdolna do przetrwania w trudnych warunkach, takich jak wysoka temperatura, susza oraz niskie pH.

Bacillus subtilis jest zdolny do produkcji szerokiej gamy enzymów, w tym proteaz, amylaz, celulaz i lipaz, co czyni go atrakcyjnym mikroorganizmem do produkcji enzymów przemysłowych. Wykazuje również zdolność do tworzenia biofilmów, które są skupiskami mikroorganizmów otoczonymi matrycą związków organicznych. Biofilmy *Bacillus subtilis* są wykorzystywane w bioremediacji, czyli procesie usuwania zanieczyszczeń z powietrza, wody i gleby przeprowadzanego przez mikroorganizmy.

Bacillus subtilis jest również stosowany jako modelowy organizm do badań podstawowych procesów biologicznych, takich jak replikacja DNA, transkrypcja genów i translacja białek. Ze względu na swoją prostotę i łatwość hodowli, *Bacillus subtilis* jest szeroko wykorzystywany w badaniach genetycznych i biotechnologicznych [2].

Ponadto, pałeczka *Bacillus*, posiada doskonałe właściwości fizjologiczne i wysoce adaptacyjny metabolizm, co sprawia, że jest łatwa do hodowli przy zastosowaniu tanich

¹ 121483@student.upwr.edu.pl

substratów. *B. subtilis* rośnie szybko, a cykl fermentacyjny jest krótki i wynosi zwykle około 48 h, podczas gdy cykl fermentacyjny *Saccharomyces cerevisiae* wynosi około 180 h. W odróżnieniu od *Escherichia coli*, *B. subtilis* posiada błonę jednokomórkową, co ułatwia wydzielanie białek, upraszcza dalsze przetwarzanie i zmniejsza koszty procesu. Wreszcie, gatunek ten jest ogólnie uznawany za bezpieczny (GRAS) [3].

3. Potencjał probiotyczny *Bacillus subtilis*

Produkcja substancji o aktywności przeciwbakteryjnej wobec patogenów jest kolejnym mechanizmem, poprzez który *Bacillus* spp. działają jako probiotyki. *Bacillus* spp. produkują dużą liczbę substancji przeciwdrobnoustrojowych, do których zalicza się bakteriocyny (subtilisyna, nizyna, subtilozyna) oraz antybiotyki (surfaktyna, ituryna, bacytracyna, bacylzylna). Surfaktyna jest biosurfaktantem wytwarzanym głównie przez różne szczepy *B. subtilis*. Charakteryzuje się wysoką aktywnością przeciwgrzybiczą wobec *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp. i *Fusarium verticillioides*, a także aktywnością przeciwbakteryjną wobec *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Legionella* spp.

Z dżdżownicy kalifornijskiej *Eisenia fetida*, wyizolowano i scharakteryzowano szczep *B. subtilis* 87Y, posiadający właściwości probiotyczne, które mogą być wykorzystane do przekształcenia odpadów stałych (na przykład śruty rzepakowej) w wysokiej jakości wzbogaconą paszę dla zwierząt. Badając proces fermentacji *B. subtilis* 87Y przy użyciu śruty rzepakowej nadkażonej deoksyniwalenolem, zearalenonem oraz aflatoksynami B1, jak i B2 wykazano znaczną redukcję tych mykotoksyn poprzez fermentację *B. subtilis* 87Y. Potwierdzono również, iż szczep ten ma zdolność promowania wzrostu probiotycznych bakterii *L. lactis*, jak i jednoczesnego hamowania patogenów takich jak *S. aureus* oraz *Salmonella* spp. [4]

4. Problemy w hodowli trzody chlewnej

Straty wśród odsadzonych prosiąt z powodu biegunek związane są przede wszystkim z wydłużeniem czasu tuczu zwierząt oraz różnicowaniem wagowym równowiekowych grup świń. Przyjmuje się, że 3 dni biegunki w okresie około odsadzeniowym prowadzą do wydłużenia czasu tuczu świń o około 10-30 dni. Spowodowane jest to dysfunkcją przewodu pokarmowego, która bezpośrednio wpływa na spadek spożycia paszy, zaburzenie odżywiania jelit, złe odżywienie błony śluzowej, a to w konsekwencji prowadzi do wchłaniania toksyn, stanów zapalnych, słabego wchłaniania składników pokarmowych oraz biegunki. Spadek spożycia paszy po odsadzeniu powoduje atrofię kosmków jelitowych, spowodowaną niewystarczającą podażą składników odżywczych w świetle jelita [5].

Endotoksyna (lipopolisacharyd, LPS) bakterii Gram-ujemnych stanowi ważny czynnik zapalenia. Stymuluje ona komórki zapalne, w tym płytki krwi, do produkcji mediatorów zapalnych. Niekontrolowany rozwój reakcji zapalnych może doprowadzić do zaburzenia homeostazy organizmu [6].

Wiadomo jednak, że kilka czynników (np. stres cieplny, mykotoksyny, patogeny, zmiana pokarmu, odsadzanie) zwiększa przepuszczalność jelit, pozwalając tym samym na wyciek endotoksyn. Czynnikiem pogłębiającym ryzyko zatrucia endotoksynami również będą terapie antybiotykowe, które zmniejszają inhibicję kompetencyjną z innymi czynnikami bakteryjnymi i zmniejszają różnorodność mikroflory jelitowej, zapewniając możliwość rozwoju drobnoustrojów chorobotwórczych w jelicie.

Swoisty mikrobiom obecny w jelicie odpowiada m.in. za rozkład soli kwasów żółciowych, które są niezbędnym elementem trawienia tłuszczów. Zaburzenia wchłaniania tłuszczów uniemożliwiają też prawidłowe wchłanianie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Dotyczy to głównie witamin A i D. Kolejnym objawem dysbakteriozy jelit może być niedokrwistość megaloblastyczna spowodowana niedoborem witaminy B₁₂, którą bakterie również wykorzystują w procesie namnażania komórek.

W Polsce, według badań z 2015 roku, w chlewniach, w których stwierdzono biegunkę u tuczników, w 25% przypadków za ich przyczynę uznano *Brachyspira hyodysenteriae*. Bakteria ta jest przenoszona przez świnie – nosicieli (także lochy rodzące), które wydalają ją wraz z kałem przez dłuższy czas.

Badanie laboratoryjne metodą PCR, przeprowadzone w 144 fermach, na 6355 próbkach kału pobranego od tuczników i warchlaków wykazało, że materiał genetyczny *B. hyodysenteriae* i *B. pilosicoli* był obecny w co najmniej jednej badanej próbce pochodzącej z 21,5% i 28,5% ferm [7].

Hiszpanie przeprowadzili badania w chlewni, w stadzie podstawowym 1400 loch, w którym był problem z biegunkami, po około 30 dniach od wprowadzenia na sektor tuczu. U 20% osobników stwierdzono obecność *Lawsonia intracellularis*. W próbkach znajdowały się również krętki *Brachyspira* spp. Po zastosowaniu szczepienia na kolejnych grupach wykazano istotne różnice we wskaźnikach produkcji.

Z praktycznego punktu widzenia, najlepszym momentem na podjęcie działań, długotrwałych w skutkach, modyfikujących skład mikroflory, obniżających pH żołądka i zabezpieczających zdrowie jelit jest pierwszy etap życia zwierzęcia, jak również etap ciąży u loch.

Biegunka noworodków występuje najczęściej od 2 do 6-7 dnia życia i może dotyczyć 80-90% prosiąt na chlewni. Choroba występuje u loszek, z częstością przekraczającą 50%, występuje również u loch wieloródek z częstością 30-35% [8].

Szczepy niepatogenne *E. coli* wchodzi w skład mikroflory jelitowej jelit grubych (nie stwierdza się ich w jelitach cienkich u zdrowych zwierząt). Do zakażenia szczepami patogennymi dochodzi *per os*, na skutek kontaktu z kałem biegunkowym chorych prosiąt. Czynniki zwiększającymi podatność na zakażenie są złe warunki higieniczne czy zbyt niska temperatura.

Patogenne szczepy szybko zasiedlają jelita cienkie (posiadają fimbrie, umożliwiające im przyleganie do powierzchni enterocytów), namnażając się intensywnie zwiększają koncentrację enterotoksyn powodując zaburzenia w funkcjonowaniu jelit. Powodują m.in. biegunkę sekrecyjną, prowadzącą do odwodnienia i zaburzeń elektrolitowych (hipokaliemii).

5. Narastająca antybiotykooporność

Od 2006 do 2016 roku oporność patogenów bakteryjnych wywołujących kolibakteriozę prosiąt narastała następująco na: enrofloksacynę, od 14,5 do 89,3% badanych szczepów; na flumechinę, od 49,1 do 92,9%; na florfenikol, od 9,8 do 64,3%; na tiamfenikol, od 50 do 92%; na cefquinom, od 3,8 do 44%. Wzrastająca oporność była również obserwowana w przypadku gentamycyny (od 63,6 do 85,7%); apramycyny (od 61,8 do 82,1%); trimetoprimu – sulfometoksazolu (od 75 do 89,3%); tetracykliny (od 97 do 100%); erytromycyny (od 92,4 do 100%).

Wyeliminowanie antybiotyków poprzez wprowadzenie prewencji, zgodnie z koncepcją One-health, jest niezwykle ważne dla zdrowia zwierząt i ludzi [5]. Do prewencji

zalicza się dezynfekcja pomieszczeń inwentarskich oraz obuwia do poruszania się na fermie, pilowanie obsługi zwierząt aby czyścili obuwie i zmieniali odzież oraz nie przechodzili bez potrzeby pomiędzy działami czy też wprowadzenie dodatków paszowych takich jak zakwaszacze, probiotyki, prebiotyki czy innego rodzaju immunomodulatory.

6. Postbiotyki – dla zdrowia zwierząt

Postbiotyki to klasa związków bioaktywnych wytwarzanych m.in. przez pożyteczne bakterie czy grzyby podczas fermentacji. Obejmują one nieżywotne produkty bakteryjne i metaboliczne produkty uboczne, takie jak kwasy organiczne, bakteriocyny i białka powierzchniowe komórek. Chociaż ich potencjalne korzyści zdrowotne są znane od pewnego czasu, ostatnie badania wywołały zwiększone zainteresowanie wykorzystaniem postbiotyków jako suplementu lub składnika produktów spożywczych. Wykazano, że postbiotyki mają wiele korzystnych efektów na zdrowie zwierząt, w tym poprawę zdrowia jelit, wzmocnienie odporności, zmniejszenie stresu i lepszą jakość mięsa [9].

W przeciwieństwie do żywych bakterii, postbiotyki są stabilne i nie wymagają przechowywania w warunkach chłodniczych, co ułatwia ich włączenie do różnych produktów. Ponadto, postbiotyki są ogólnie dobrze tolerowane, z niskim ryzykiem wywołania działań niepożądanych.

Badania wykazały, że postbiotyki wykazują szereg korzyści zdrowotnych, szczególnie dla funkcjonowania jelit oraz funkcji immunologicznych. Badania wykazały, że postbiotyki mogą poprawić skład mikrobioty jelitowej, zmniejszyć stan zapalny i wzmocnić funkcje odpornościowe. Mogą one również mieć potencjał w leczeniu niektórych schorzeń, takich jak nieswoiste zapalenie jelit, alergie i infekcje [10].

Wykorzystanie postbiotyków jako suplementu lub składnika produktów spożywczych jest obiecującym obszarem badań, który może zaoferować nowe podejście do poprawy zdrowia i zapobiegania chorobom. Postbiotyki okazały się obiecujące w poprawie aspektów żywienia zwierząt. W produkcji zwierzęcej, stosowanie postbiotyków zyskuje na znaczeniu jako alternatywa dla antybiotyków w celu poprawy wydajności wzrostu, poprawy zdrowia jelit i zmniejszenia ryzyka chorób [11].

Wykazano, że postbiotyki promują zdrowie jelit poprzez poprawę składu mikrobioty jelitowej i zmniejszenie ilości bakterii patogennych w jelitach. To z kolei może prowadzić do lepszego trawienia i wchłaniania składników odżywczych, a także zwiększonej odporności na choroby. Postbiotyki mogą również pomóc w zmniejszeniu stanu zapalnego w jelitach, co może być korzystne dla zwierząt ze stanami zapalnymi, takimi jak zapalenie jelita grubego [4].

Oprócz promowania zdrowia jelit postbiotyki pochodzące z *Bacillus subtilis* wzmocniają funkcje odpornościowe u zwierząt. Badania wykazały, że suplementacja postbiotykami może zwiększyć produkcję przeciwciał i poprawić ogólną odpowiedź immunologiczną, co może być szczególnie ważne dla młodych lub zestresowanych zwierząt.

Mechanizmy, dzięki którym postbiotyki wywierają swoje korzystne działanie są wieloczynnikowe i mogą obejmować bezpośrednią aktywność przeciwbakteryjną, modulację funkcji immunologicznej gospodarza oraz poprawę integralności bariery jelitowej. Ponadto, postbiotyki mogą pomóc w zapobieganiu pojawieniu się bakterii opornych na antybiotyki poprzez zmniejszenie potrzeby stosowania antybiotyków w produkcji trzody chlewnej [11].

7. Zastosowanie postbiotyków w hodowli trzody chlewnej

W przypadku trzody chlewnej postbiotyki wywierają swoje działanie poprzez modulację mikrobioty jelitowej, która odgrywa kluczową rolę w trawieniu, wchłanianiu i metabolizmie składników odżywczych. Postbiotyki mogą promować wzrost korzystnych bakterii, takich jak *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, jednocześnie hamując wzrost szkodliwych bakterii, takich jak *Salmonella* i *Escherichia coli*. Może to prowadzić do stabilizacji i zróżnicowania mikrobioty jelitowej, co wiąże się z poprawą zdrowia jelit, zmniejszeniem stanu zapalnego i wzmocnieniem funkcji odpornościowych.

Postbiotyki mogą również bezpośrednio wpływać na układ odpornościowy świni poprzez stymulację produkcji cytokin, chemokin i immunoglobulin. Mogą one zwiększać aktywność komórek odpornościowych, takich jak makrofagi, naturalne komórki zabójcze i komórki T, które odgrywają kluczową rolę w obronie organizmu przed patogenami. W efekcie może to prowadzić do poprawy odporności na infekcje i zmniejszenie zależności od antybiotyków [4].

Postbiotyki już wykazały potencjał w ograniczaniu stosowania antybiotyków w hodowli zwierząt i poprawie dobrostanu zwierząt. Wykazano, że *B. subtilis* hamuje wzrost patogennych bakterii Gram-ujemnych w żywieniu drobiu. Zarówno szczepy *B. subtilis* 87Y, jak i *L. lactis* hamowały wzrost *S. enteritidis* i *S. typhimurium*. Efekt działania bakterii probiotycznych był podobny, niezależnie od szczepu czy gatunku *Salmonella*. *B. subtilis* 87Y wykazywał największą aktywność hamującą (~40% zahamowanie wzrostu); natomiast *L. lactis* ATCC 49032 i ATCC 11454 wykazywały niższą aktywność hamującą (~20% zahamowanie wzrostu). Połączenie *Lactobacillus* spp. i *B. subtilis* miało wyższy efekt hamujący wobec *E. coli* niż sam *Lactobacillus* spp. [12].

W tabeli 1 przedstawiono wyniki wpływu postbiotyku (poferment *Bacillus* sp.) na wyniki odchowu prosiąt. Badania własne z wykorzystaniem postbiotyku (CellProTex BioDose) produkowanego przez *Bacillus subtilis* przeprowadzono na 90 lochach prośnych ze średnią ilością 16 prosiąt w miocie. Po odsadzeniu prosięta podzielone na dwie grupy otrzymywały postbiotyk w wodzie pitnej przez 14 dni w ilości 50 ml/1000 l wody. Zastosowanie postbiotyku zwiększyło średni dobowy przyrost masy ciała o 63 gramy na dzień, poprawiło wykorzystanie paszy przez zwierzęta o 270 g, pozwoliło obniżyć śmiertelność do poziomu 0,5% oraz znacząco zredukowało nekrozę uszu u prosiąt, która to jest powszechnym problemem w współczesnej hodowli świń.

Tabela 1. Wpływ postbiotyku (poferment *Bacillus* sp.) na wyniki odchowu prosiąt

	Kontrola	Postbiotyk
Średni przyrost dobowy, g/dzień	433	496
Wykorzystanie paszy, kg/kg	1,83	1,56
Śmiertelność, %	3,33	0,50
Liczba prosiąt z nekrozą uszu, szt.	530	6

Źródło: badania własne, BioDose Sp. z o.o. Sp. k.

Tabela 2 przedstawia wyniki badań z wykorzystaniem postbiotyku produkowanego przez *Bacillus subtilis* (CellProTex BioDose Sp. z o.o. Sp. k.) przeprowadzone na grupie 200 prosiąt w wieku 26-82 dni życia. Prosięta podzielono na cztery grupy doświadczalne z uwzględnieniem grupy kontrolnej. We wszystkich grupach podawano standardowe mieszanki dla prosiąt w okresie odchowu. W grupach doświadczalnych podawano do wody

pitnej różne dawki postbiotyku, odpowiednio 25, 50 i 75 mL/1000 L wody. Odsetek prosiąt z biegunką wyliczony jako iloczyn liczby prosiąt i intensywności biegunek w skali 1-5. Tabela poniżej ukazuje iż wraz ze wzrostem dawki poprawiają się wyniki produkcyjne. Średni dobowy przyrost masy ciała prosiąt wzrósł o 27 gram a pobranie paszy wzrosło o 40 gram.

Tabela 2. Wpływ różnej dawki postbiotyku (CellProTex) na wyniki produkcyjne oraz frekwencję występowania biegunek

Grupa	Średni przyrost dobowy, g/dzień	Pobranie paszy, g/dzień	WWP*	Odsetek prosiąt z biegunkami, %
Kontrola	455	870	1,91	7,94
Kontrola + CellProTex (25)	474	892	1,89	3,53
Kontrola + CellProTex (50)	484	905	1,87	1,95
Kontrola + CellProTex (75)	482	910	1,89	2,01

*współczynnik wykorzystania paszy – kg/kg, Źródło: badania własne, BioDose Sp. z o.o. Sp. k.

Ponadto, postbiotyki mogą regulować reakcję stresową świń poprzez modulację osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA). Mogą one zmniejszyć produkcję hormonów stresu, takich jak kortyzol i zwiększyć produkcję cytokin przeciwzapalnych, takich, jak iL-10. Może to prowadzić do poprawy dobrostanu i zmniejszenia częstości występowania zaburzeń związanych ze stresem, takich jak biegunka i choroby układu oddechowego [15].

Wreszcie, postbiotyki mogą poprawić jakość mięsa poprzez poprawę pH, zdolności zatrzymywania wody i kruchości mięsa. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, takie jak octowy, propionowy i masłowy, mogą obniżyć pH mięsa i poprawić jego kolor, podczas gdy bakteriocyny mogą hamować wzrost bakterii powodujących psucie się mięsa i przedłużyć jego trwałość.

8. Podsumowanie

Pomimo obiecujących wyników, konieczne są dalsze badania, aby w pełni zrozumieć potencjał postbiotyków *Bacillus subtilis* jako alternatywy dla antybiotyków w hodowli trzody chlewnej. Optymalne dawkowanie, czas i konkretne szczepy bakterii mogą wpływać na ich skuteczność w ograniczaniu stosowania antybiotyków przy jednoczesnej poprawie wzrostu, zdrowia i dobrostanu świń [13].

Podsumowując, postbiotyki stanowią obiecującą alternatywę dla antybiotyków i innych stymulatorów wzrostu w produkcji trzody chlewnej. Mogą one poprawić zdrowie, dobrostan i wydajność świń poprzez modulację mikrobioty jelitowej, wzmocnienie układu odpornościowego, zmniejszenie stresu i poprawę jakości mięsa. Dalsze badania są potrzebne, aby w pełni zrozumieć mechanizmy działania postbiotyków i zoptymalizować ich wykorzystanie w hodowli trzody chlewnej [14].

Literatura

1. Piórkowska M., *Wpływ substancji pro-, pre- i synbiotycznych na zdrowie, pomiary morfometryczne przewodu pokarmowego oraz wyniki badań mikrobiologicznych treści jelita norek*, Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego, t. 16, nr 3, 2020, s. 9-24.
2. Pietraszek P., Walczak P., *Charakterystyka i możliwości zastosowania bakterii z rodzaju Bacillus wyizolowanych z gleby*, 37 Polish Journal of Agronomy, 16, 2014, s. 37-44.

3. Schallmeyer M., Singh A., Ward O.P., *Developments in the use of Bacillus species for industrial production*, Canad. J. Microbiol., 50, 2004, s. 1-17.
4. Szmigiel I., Suchodolski J., Łukaszewicz M., Krasowska A., *The influence of Bacillus subtilis 87Y isolated from Eisenia fetida on the growth of pathogenic and probiotic microorganisms*, Biomass Conv. Bioref., 11, 2021, s. 601-608.
5. Luppi A., *How to handle Swine Colibacillosis in the field? What kind of resistance do we have to expect?*, 24th IPVS Congress and 8th ESPHM, Dublin, Ireland, 2016, s. 50-63.
6. Raetz C.R., Whitfield C., *Lipopolysaccharide endotoxins*, Annu Rev Biochem, 71, 2002, s. 635-700.
7. Proceedings, 13th European Symposium of Porcine Health Management. Budapest, May, 2022, s. 11-13.
8. Ackerman M., Guedes R., Rutllant J., Labarta C., Vraeghe T., Labarta J., *Biegunka u nowonarodzonych prosiąt: przyczyny i główne czynniki*, https://www.3trzy3.pl/artyku%C5%82y/biegunka-u-nowonarodzonych-prosi%C4%85t-przyczyny-i-g%C5%82owne-czynniki_4154/ [data dostępu: 14.12.2020].
9. Humam A.M., Loh T.C., Foo H.L., Izuddin W.I., Awad E.A., Idrus Z., *Dietary supplementation of Postbiotics mitigates adverse impacts of heat stress on antioxidant enzyme activity, Total antioxidant, lipid peroxidation, physiological stress indicators, lipid profile and meat quality in broilers*, Animals (Basel), 10(6), 2020, s. 982-1003.
10. Zhong Y., Wang S., Di H., Den Z., Liu J., Wang H., *Gut health benefit and application of postbiotics in animal production*, J Animal Sci Biotechnol, 13, 38, 2022.
11. Zamojska D., Nowak A., Nowak I., Macierzyńska-Piotrowska E., *Probiotics and Postbiotics as Substitutes of Antibiotics in Farm Animals: A Review*, Animals, 11, 2021, s. 3431.
12. Szmigiel I., *Biotransformacja śruty rzepakowej z wykorzystaniem Bacillus subtilis*, Rozprawa doktorska, Uniwersytet Wrocławski, 2014.
13. Manassi C.F., de Souza S.S., de Souza G.H., Sartor S., Gonçalves Lima C.M., Miotto M., De Dea J.L., Rezzadori K., Pimentel T.C., de Paiva G.L., Esmerino E., Kasnowski Holanda Duarte M.C., Marsico E.T., Verruck S., *Functional meat products: Trends in pro-, pre-, syn-, para- and post-biotic use*, Food Research International, Volume 154, 2022, s. 111035.
14. Chang S.Y., Belal S.A., Kang D.R., Il Choi, Y., Kim Y.H., Choe H.S., Heo J.Y., Shim K.S., *Influence of Probiotics-Friendly Pig Production on Meat Quality and Physico-chemical Characteristics*, Korean J Food Sci Anim Resour, 38 (2), 2008, s. 403-416.
15. Smith S.M., Vale W.W., *The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress*, Dialogues Clin Neurosci, Volume, 8(4), 2006, s. 383-395.

Bakterie *Bacillus subtilis* w produkcji zwierzęcej – definicja, schemat działania, celowość stosowania, zalecenia, korzyści

Streszczenie

Na rynku dodatków paszowych pojawiły się postbiotyki, które dzięki nastawieniu klientów na zakup mięsa z produkcji bezantybiotykowej stają się coraz bardziej popularne. Wykazują one wiele zalet takich jak modulacja mikroflory jelitowej, regeneracja wątroby czy ogólnie polepszenie wyników produkcyjnych. W prezentowanej przez autora pracy omówiono zagadnienia związane z wpływem postbiotyków na zdrowie zwierząt. Omówiono bakterię *Bacillus subtilis* oraz jej potencjał probiotyczny, narastającą antybiotykooporność bakterii oraz możliwość wykorzystania postbiotyków w produkcji trzody chlewnej. Postbiotyki jednocześnie hamując wzrost szkodliwych bakterii, takich jak *Salmonella* spp. i *Escherichia coli* mogą prowadzić do bardziej stabilnej i zróżnicowanej mikroflory jelitowej, co wiąże się z poprawą zdrowia jelit, zmniejszeniem stanu zapalnego i wzmocnieniem funkcji odpornościowych. Zgodnie z obecną wiedzą prezentowaną w niniejszym artykule wnioskuje się, że postbiotyki są nowym interesującym produktem, który może podwyższyć parametry zdrowotne świń pomagając w walce z biegunkami czy nekrozą uszu oraz poprawiają wyniki produkcyjne takie jak przyrosty masy ciała czy wykorzystanie paszy.

Słowa kluczowe: *Bacillus subtilis*, postbiotyki, dysbakterioza, trzoda chlewna

Bacillus subtilis bacteria in livestock production – definition, scheme of action, purpose of use, recommendations, benefits

Abstract

Postbiotics have appeared on the feed additive market and are becoming increasingly popular, thanks to the customer focus on purchasing meat from antibiotic-free production. They show many advantages such as modulation of intestinal microflora, liver regeneration and general improvement of production performance. The paper presented by the author discusses issues related to the effects of postbiotics on animal health. The bacterium *Bacillus subtilis* and its probiotic potential, the increasing antibiotic resistance of bacteria and the possibility of using postbiotics in pig production were discussed. Postbiotics while inhibiting the growth of harmful bacteria such as *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* can lead to a more stable and diverse intestinal microbiota, which is associated with improved intestinal health, reduced inflammation and enhanced immune function. According to the current knowledge presented in this article, it is concluded that postbiotics are an interesting new product that can increase health parameters in pigs by helping to combat diarrhea or ear necrosis, and improve production performance such as weight gain and feed utilization.

Keywords: *Bacillus subtilis*, postbiotics, dysbacteriosis, livestock production

Mykotoksyny w paszach dla drobiu

1. Wprowadzenie

Polska jest liderem w produkcji mięsa drobiowego na skalę europejską. Według Krajowej Izby Producentów Drobiu i Pasz w 2021 r. uzyskano 2 mln 500 tys. ton mięsa drobiowego [1]. Tak wielka produkcja mięsa drobiowego wpływa na zwiększenie hodowli drobiu w Polsce. Z informacji jakie podaje Główny Urząd Statystyczny (GUS) wynika, iż w 2020 r. poddano ubojowi ponad 1,3 mld drobiu ogółem, z czego 1,2 mld stanowiły brojłery i kury [2]. Hodowla i idąca za tym produkcja mięsa drobiowego przekłada się na przemysł paszowy (produkcja pasz zbożowych w 2019 roku wyniosła około 19,7 mln ton w Polsce) [3].

Pasze dla drobiu w dużej mierze oparte są na zbożach. W 2021 roku w naszym kraju zebrano 24,8 mln ton zbóż podstawowych. Niespełna połowa z nich stanowiła: pszenica – 12,1 mln ton, pszenżyto – 5,5 mln ton. Z kolei kukurydzy na ziarno zebrano 7,5 mln ton [4]. Kolejnym komponentem wchodzącym w skład pasz jest soja (śruta), którą jak podaje Instytut Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej importuje się rocznie w ilościach 2283,1 tys. ton (dane z 2016 roku) [5].

Zarówno zboża, jak i rośliny oleiste (m.in. rzepak, słonecznik) wykorzystywane do produkcji pasz, są narażone na skażenie mykotoksynami. Do skażenia może dochodzić podczas przechowywania (grzyby magazynowe), jak i przez cały okres wzrostu rośliny. Można je rozpoznać po zmianie zabarwienia ziarna, które pokrywa biała lub różowa grzybnia, dodatkowo jego powierzchnia marszczy się. Dodatkowym parametrem wskazującym na porażenie zbóż jest liczba MTZ (masa 1000 ziaren), która jest wtedy zaniżona [6].

Mykotoksyny wytwarzane są przez grzyby strzępkowe jako ich drugorzędowe metabolity [7]. Aktualnie poznanych zostało około 400 różnych mykotoksyn [8]. Niniejsza praca skupi się na siedmiu z nich: ochratoksynie A (OTA), zearalenonie (ZEA), fumonizynach (B1 i B2), aflatoksynach a także trichotecenach tj.: deoksynivalenolu (DON) [7], toksynach T 2 i HT 2. Wymienione mykotoksyny (oprócz aflatoksyn, toksyny T-2 i HT-2, których limity zostały określone w innych Ustawach) ujęto w Dzienniku Urzędowym UE (Zalecenie Komisji z dnia 17 sierpnia 2006 roku), które określa ich górne granice wartości orientacyjnych w materiałach i mieszankach paszowych [9].

2. Czynniki sprzyjające wytwarzaniu mykotoksyn

W zbożach wykorzystywanych do produkcji pasz ilość grzybów nie powinna przekraczać 10⁴ jtk/g. Ich wzrost determinuje wilgotność, temperatura, dostępność substancji odżywczych, zawartość tlenu w środowisku oraz pH podłoża [10]. Grzyb do wytwarzania mykotoksyn nie potrzebuje optymalnych warunków, które zapewniają mu wzrost. W przypadku fuzariozy syntezie sprzyja duża ilość opadów oraz wysoka temperatura,

¹ natalia.roslonowska1@interia.pl, Studenckie Koło Naukowe Żywienia Zwierząt, Katedra Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu.

² martyna.wilk@upwr.edu.pl, Katedra Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, www.upwr.edu.pl.

dodatkowo nadwrażliwość ziarna przypadająca na okres od kwietnia do osiągnięcia dojrzałości woskowej przez ziarno [6]. W latach deszczowych zanieczyszczenie mykotoksynami w zbożach jest wyższe niż ma to miejsce w porach suchych [11]. Przyczyną może być zbyt wysoka wilgotność zboża przy jego zbiorze. Z kolei w okresie suszy syntezie mykotoksyn może sprzyjać magazynowanie surowca w nieodpowiednich warunkach wilgotnościowych i temperaturowych [12].

3. Wybrane zabiegi agrotechniczne – działania prewencyjne

Duże znaczenie w wytwarzaniu mykotoksyn, przede wszystkim przez grzyby z rodzaju *Fusarium* ma odpowiednie zmianowanie, co wynika z ich obecności w glebie. Uprawianie monokultur sprzyja ich koncentracji w ziemi [13]. Zastosowanie przedplonu z roślin strączkowych redukuje potrzebę nawożenia azotowego, będącego profilaktyką w redukcji fuzariozy. Wynika to z dostarczenia łatwiej dostępnych składników odżywczych dla roślin następczych. Jako alternatywę można zastosować rośliny okopowe np. ziemniaki lub buraki cukrowe jednakże ze względu na liczne ograniczenia stosuje się je w mniejszym stopniu [14].

Kolejnym czynnikiem pozwalającym na zmniejszenie ryzyka jest wybranie odpowiedniej odmiany zboża, charakteryzującej się mniej zbitym kłosem [6]. Dostępne są również do zasiewu hybrydy bardziej odporne na szkodliwe metabolity wtórne grzybów strzępkowych np. pszenica SU HYMALAYA_A [15]. Listę rekomendowanych odmian zbóż (i nie tylko) można znaleźć na stronie COBORU (Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych).

Na porażenie ziaren wpływ ma także odpowiednie nawożenie – w celu ograniczenia wystąpienia grzybów z rodzaju *Fusarium* należy zastosować optymalną dawkę azotu (jej nadmiar sprzyja ich rozwojowi). Badania wykazały najlepszy efekt przy zastosowaniu nawozu w postaci 50% saletry amonowej i 50% mocznika jako całkowitej dawki azotu [16].

Odpowiedni termin siewu pozwala uchronić ziarna przed nałożeniem się czasu uwalniania zarodników grzybów pleśniowych z ich kiełkowaniem lub kwitnieniem – w przypadku kukurydzy (jest to okres, w którym ziarna są najbardziej podatne na infekcję) [17]. Rekomendowane jest opóźnienie siewu, które tłumaczy się mniejszą ilością resztek poźniwnych przedplonu w glebie sprzyjających rozwojowi grzybów pleśniowych [16].

By przeciwdziałać porażeniom fuzaryjnym można zmniejszyć gęstość siewu, powodując w ten sposób obniżenie wilgotności łanu i tym samym zmniejszając zakres rozprzestrzeniania się grzybów [16].

System uprawy roli ma wpływ na zawartość różnych rodzajów mykotoksyn w ziarnie. Zastosowanie przedplonu i uprawy płużnej zmniejsza zawartość DON w zbożach, kukurydzy i burakach cukrowych [16]. Odpowiednie gospodarowanie glebą poprzez wczesną podorywkę i głęboką orkę sprzyja zmniejszeniu ilości przetrwalników grzybów, które zostają zniszczone [18].

4. Ochratoksyna A

W paszach dla drobiu szczególne znaczenie ma OTA, na którą ptaki są szczególnie wrażliwe [7]. OTA produkowana jest przez *Aspergillus ochraceus* i *Aspergillus alutaceus* oraz *Penicillium verrucosum*. Jej dopuszczalna zawartość wg zaleceń UE z 2006 roku (przy wilgotności 12%) wynosi dla pasz gospodarskich i produktów ubocznych (w tym

zboż) 0,25 mg/kg a w mieszankach uzupełniających i pełnoporcjowych dla drobiu 0,10 mg/kg [19]. Grzyby wytwarzające OTA są często spotykane w zbożach w naszej szerokości geograficznej. Powstaje m.in. podczas nieodpowiedniego magazynowania surowca do produkcji pasz. Miejsca zawilgocone o złej cyrkulacji powietrza, a także dużych wahaniami temperatury powietrza sprzyjają jej wzrostowi. Według Richtera i in. [20] bezpieczna wilgotność dla jęczmienia ozimego wynosi 14%, nie powodująca przez badany okres (16 tygodni) powstawania tej mykotoksyny [20].

Ochratoksyna A wywołuje mykotoksykozę, która może doprowadzić do uszkodzenia układu limfatycznego a także wątroby i nerek. Ponadto powoduje obniżenie dziennych przyrostów masy ciała, redukuje masę i liczbę produkowanych jaj, zmniejsza spożycie wody. Dodatkowo u indyków może powodować rezygnację ze spożywania paszy [21]. Przy wysokim zanieczyszczeniu paszy OTA można zaobserwować zwiększoną liczbę upadków. Najbardziej narażone są kaczki, których LD50 jest niższe niż w innych gatunków [22]. Należy też dodać, iż OTA wykazuje działanie: genotoksyczne, embrio i teratogenne a także sprzyja tworzeniu się nowotworów. Zwierzęta mają obniżoną odporność organizmu – działa immunosupresyjnie. Zakłada się że jej toksyczne działanie wynika z blokowania syntezy transportującego RNA, co skutkuje wstrzymaniem produkcji białek. Dodatkowo przypuszcza się iż może zaburzać prawidłowe działanie gospodarki węglowodanowej a nawet uszkadzać materiał genetyczny (DNA) [23].

5. Aflatoksyny

W importowanych surowcach tj. zboża, soja i śruty roślin oleistych możemy znaleźć niewystępującą naturalnie w naszym klimacie aflatoksynę [24]. Maksymalna zawartość aflatoksyny B1 w materiale paszowym wynosi 0,02 mg/kg (ppm) przy wilgotności paszy 12% [25]. Produkowana jest przez grzyby z gatunku *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*, które powodują u drobiu poważne schorzenia [26]. Wyróżnia się sześć różnych metabolitów: B1, B2, G1, G2, M1 i M2 produkowanych przez *A. flavus*. Grzyb występuje zarówno w glebie, jak i magazynach [24]. Wysoka wilgotność (88-95%) i temperatura na poziomie 25-27°C sprzyjają wydzielaniu toksyny [26].

Aflatoksyny są najlepiej przebadaną grupą mykotoksyn, ze względu na ich toksyczny charakter. Małe stężenie w paszy może przyczynić się do zgonu zwierzęcia. Jest także najbardziej kancerogenna spośród wszystkich omówionych mykotoksyn [27]. U drobiu powoduje dysfunkcje i uszkodzenia organów tj. nerki, wątroba, a także żołądek i jelita. Dodatkowo występują u nich problemy z kośćmi powodując problemy z poruszaniem się [22]. Ponadto jest mutagenna i teratogenna – może wywołać potworkowość płodów. Wszystkie wymienione dolegliwości mogą wpłynąć na obniżenie FCR (współczynnik wykorzystania paszy) i tym samym pogorszenie wyników produkcyjnych. Przeprowadzone w latach 70. XX wieku badania wykazały, iż podawanie indykom paszy skażonej aflatoksyną B1 na poziomie 1 mg/kg przez okres 12 tygodni powoduje upadek wszystkich sztuk. Z kolei skarmianie kurcząt paszą zawierającą 2,5 krotnie większą ilość tej toksyny zmniejszyło ich przyrosty o 5-10% (brak informacji o czasie podawania skażonej paszy) [24, s. 33]. Najmniejszą odporność na działanie aflatoksyny wykazują kaczki [22]. Dawka śmiertelna wynosi dla nich 0,335 mg/kg masy ciała [24, s. 32].

6. Zearalenon

ZEA w znaczącej większości jest metabolitem wtórnym grzyba – *Fusarium graminearum* [24, s. 47]. Należy do niesteroidowych mykoestrogenów syntetyzowanych szlakiem poliketydu. Wykazuje znacznie większe działanie estrogenne niż jego naturalny odpowiednik. Może występować pod zamaskowaną lub zmodyfikowaną formą. Produkują je mikroorganizmy w ramach reakcji obronnej przed szkodliwymi substancjami. Problemem jest ich niewykrywalność, ponieważ konwencjonalne procedury analityczne zawodzą [28].

ZEA może powodować choroby zbóż w trakcie ich wzrostu, ale też w trakcie składowania, jeżeli wilgotność przekroczy 22% [27, s. 164]. Występuje w różnych rodzajach zbożach wykorzystywanych do produkcji pasz [28, s. 53]. W zaleceniach Komisji przedstawionych w Dz.U. UE 2006 (229/9) nie podano wartości dopuszczalnej w mieszance paszowej dla drobiu. Jednakże znana jest wartość dopuszczalna dla materiałów paszowych złożonych ze zboża oraz produktów zbożowych i wynosi ona: 2 mg/kg. Z kolei dla produktów ubocznych z kukurydzy jest wyższa – 3 mg/kg przy wilgotności 12% [9]. Według badań przeprowadzonych w 2009 roku ZEA znajdowała się w prawie połowie próbek zbóż (49%) oraz we wszystkich próbkach kukurydzy i mieszankach pasz [19, s. 45]. Ze względu na termostabilność jej zawartość nie ulega zmniejszeniu mimo stosowania różnego rodzaju procesów w trakcie produkcji paszy. Podawanie kaczkom 10 mg/kg tej mykotoksyny spowodowało mniejsze przyrosty, z kolei 40 mg/kg u kur nieśnych wywołało spadek nieśności. W przypadku gęsi nie zaobserwowano zmian [24, s. 52]. Inne badania z kolei nie wykazały żadnego wpływu ZEA przy dawce 300 mg/kg na organizm ptaków [29]. Najnowsze badania pokazują, iż ZEA wpływa na wzmocnienie odruchów behawioralnych oraz na zabarwienie koralu i wisiora u piskląt indyjskich. Zwierzęta odznaczały się także większym rozmiarem [28, s. 54]. Nie ma jednak wystarczających badań na temat odkładania się ZEA w narządach ptaków przy dłuższym czasie karmienia ich skażoną paszą.

7. Fumonizyny

Kolejną grupą mykotoksyn są fumonizyny syntetyzowane przez grzyby z rodzaju *Fusarium* tj.: *Fusarium verticillioides*, *Fusarium moniliforme* i *Fusarium proliferatum* [24, s. 64]. Wyróżnia się kilkanaście analogów, spośród których najczęściej spotykane są B1 i B2 [24, s. 63]. Wytwarzają je także inne grzyby – *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* produkuje pierwszą z nich, a drugą *Aspergillus niger* [30]. Wg różnych źródeł literaturowych ww. mykotoksyna występuje głównie przy uprawie kukurydzy oraz w produktach z niej zrobionych.

Obserwacje dotyczące wpływu fumonizyny na organizm żywy opisano na trzodzie chlewnej i koniach [20, s. 42]. W przypadku drobiu wiadomo natomiast, że dopiero duże jej ilości wpływają negatywnie na organizm ptaka. U gatunków tj. kaczki, indyki i kurczęta brojlerzy odnotowano zmiany patologiczne w wątrobie. Badania *in vivo* na 1-dniowych pisklętach udowodniły negatywne działanie fumonizyny w ilościach 100-400 mg/kg powodując obniżone przyrosty masy ciała. U indyków z kolei poziom 300 mg/kg spowodował dodatkowo zmniejszenie pobrania paszy, które mogło wynikać z obniżonego apetytu [22]. Inne badania na jednodniowych kurczętach brojlerach wykazały, iż podanie paszy z fumonizyną B1 >100 mg/kg [3] zwiększało masę żołądka gruczołowego i mięśniowego, wywoływało biegunkę o kleistej konsystencji, a także powodowało

zanik grasicy i krzywicę [30, s. 676]. Dla mieszanek paszowych przeznaczonych do skarmiania drobiu wartość dopuszczalna fumonizyny (B1+B2) wynosi 20 mg/kg. W przypadku materiału przeznaczonego na pasze w postaci kukurydzy i produktów z niej wartość ta jest 3-krotnie wyższa – 60 mg/kg [19].

8. Trichoteceny

Największą grupą mykotoksyn są trichoteceny [31], które dzieli się na grupy: gr. A – toksyna T-2 i HT-2 (wyróżnia się także diacetoksyscirpenol i neosolaniol), gr. B – DON (oraz jego pochodne tj. niwalenol i fuzaryna X), [16, s. 30] gr. C – erukaryny, rorydyny i satratoksyny oraz gr. D (trichoteceny dwuepoksydowe tj. krotecyne) [32]. Toksyny te produkowane są przez wiele szczepów grzybów z rodzaju *Fusarium*: *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. poae*, *F. culmorum*, *F. moniliforme* i *F. avenaceum* oraz *F. sporotrichioides* [19, s. 46]. Najczęściej opisywanymi grupami w literaturze są gr. A i B, które zostaną omówione w niniejszej pracy. Tak jak w przypadku większości grzybów pleśniowych wilgotność powyżej 20% sprzyja wzrostowi zawartości tych toksyn. Z kolei temperatura optymalna mieści się w zakresie 8-25°C [33]. Z badań przeprowadzonych w 2009 roku na terenie Polski wynika, iż DON występuje w większości przebadanych próbek zbóż (80% z nich) oraz we wszystkich próbach kukurydzy i mieszankach (100%). W przypadku toksyny T-2 i HT-2 wyniki były przybliżone i wynosiły kolejno: w zbożu 23% i 30%, w kukurydzy 88% i 92% oraz w mieszankach paszowych 75% i 83% [19, s. 45]. Przedstawione wartości jasno pokazują częstą obecność wymienionych substancji toksycznych w surowcach przeznaczonych na pasze. Zalecenia UE podają dopuszczalną wartość w mieszankach paszowych (w tym dla brojlerów) na poziomie 5 mg/kg. Dla pasz gospodarskich i produktów ubocznych wynoszą kolejno: zboża 8 mg/kg, kukurydza – 12 mg/kg. W 2013 r. weszły w życie nowe zalecenia UE w sprawie toksyny T-2 i HT-2 w zbożach i produktach zbożowych. Poziom wskaźnikowy wyznaczono dla sumy obu mykotoksyn: w przypadku mieszanek paszowych wynosi 250 µg/kg, w produktach zbożowych 500 µg/kg (za wyjątkiem mielonego owsa – 2000 µg/kg) [34].

Chorobotwórcze działanie toksyny T-2 i HT-2 wynika z budowy – budowy pierścienia 12,13-epoksydowego. Hamuje on syntezę materiału genetycznego i białek, a także uniemożliwia działanie mitochondrialnego układu transportu elektronów [31, s. 13,18]. Największą toksyczność wykazuje toksyna T-2, która w krótkim czasie zostaje wchłonięta przez organizm [31, s. 18]. Wywołuje u drobiu zmiany chorobowe w jamie dzioba, a także zmniejsza spożycie paszy co przekłada się na gorsze przyrosty dobowe. U kur nieśnych powoduje spadek nieśności [31, s. 19]. W wielu publikacjach opisywane były zapalenia skóry wynikające ze spożycia skażonej paszy. Są również toksyczne względem roślin (fitotoksyczne), które mogą posłużyć do skarmiania zwierząt. DON uważany jest za genotoksyczny, ponieważ powoduje aberracje chromosomowe oraz opóźnienia w podziale komórek [24, s. 14]. Ponadto powoduje problemy związane z układem pokarmowym: wywołuje wymioty [35], biegunkę i stany zapalne jelita cienkiego [16, s. 30]. Wywołuje obniżenie reakcji obronnych organizmu (immunotoksyczne) i anemię [24, s. 9 i 60]. Udowodniono, iż DON zostaje usunięty wraz z odchodami zwierzęcia i nie występuje w produktach zwierzęcych z nich pozyskanych [16, s. 32]. Jednakże są doniesienia o zdolności akumulacji w tkankach, która przekłada się na późniejsze wystąpienie ww. objawów. Zwierzęta monogastryczne są bardziej narażone na infekcję grzybami *Fusarium*, ponieważ nie mają odpowiedniej flory bakteryjnej. Przeżuwacze posiadają

mikroflorę, która przekształca i unieczynnia toksyczne działanie mykotoksyny [16, s. 31]. Trichoteceny wywołują szereg poważnych zaburzeń w organizmie zwierząt, dlatego należy dalej pogłębiać wiedzę na temat ich mechanizmu działania i stale monitorować ich poziom w surowcach przeznaczonych do produkcji pasz.

9. Biologiczne metody eliminacji mykotoksyn

W ostatnich latach wynaleziono nowe metody częściowej eliminacji mykotoksyn poprzez zastosowanie metod biologicznych. Wykorzystywane są w tym celu bakterie fermentacji mlekowej (LAB) tj.: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* i *Bifidobacterium longum*, które obniżają mutagenność środowiska [36]. Wytwarzane przez LAB związki hamują wzrost grzybów z rodzaju: *Aspergillus*, *Penicillium* a także *Fusarium*. Istnieje wiele mechanizmów (nie wszystkie zostały dotąd poznane) unieczynnienia metabolitów wtórnych grzybów strzępkowych: wytwarzane przez bakterie kwasy organiczne obniżają pH a także hamują wchłanianie aminokwasów powodując ograniczony wzrost niektórych gatunków grzybów [37]. Ostatnio przeprowadzono badania na ziarnach pszenicy ozimej, którą zaszczepiono grzybem *F. culmorum*. W okresie wegetacji zboża stosowano zawiesinę z bakterii *Sphingomonas*, które poprzez swoje działanie obniżyły zawartość DON w badanym ziarnie [38]. Użycie bakterii z tego rodzaju przeciwko grzybom takim jak *Fusarium* jest porównywalne z zastosowaniem fungicydów triazolowych [39, s. 42]. W przypadku badań na kurczętach wykazano, iż bakteria *Lactobacillus rhamnosus* w przewodzie pokarmowym tych zwierząt ogranicza adsorpcję aflatoksyny B1 [7, s. 19]. Drożdże tj. *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* również mają zdolność unieszkodliwiania tej toksyny, a także OTA [27, s. 172]. Badania przeprowadzone na drożdżach *Geotrichum candidum* wykazały, iż ograniczają wzrost niektórych grzybów z rodzaju *Fusarium* [40]. Jeden ze składników ściany komórkowej drożdży *S. cerevisiae* o nazwie mannan zmniejsza poziom ZEA i fumonizyny B1 oraz w nieznacznym stopniu DON. Ponadto drożdże te podane kurczętom w paszy zmniejszają ilość aflatoksyny B1. Za wiązanie mykotoksyn odpowiadają zawarte w drożdżach B-glukany, mannoproteiny i glukomany [41]. Na rynku dostępny jest preparat pod nazwą MYCOSORB A+ który w swoim składzie zawiera drożdże, wykazujące zdolność adsorpcji mykotoksyn [42].

10. Fizyczne metody eliminacji mykotoksyn

Z metod fizycznych wyróżnia się: sortowanie polegające na oddzieleniu zdrowego ziarna od zanieczyszczonego, czyszczenie, obłuskiwanie [13, s. 114], a także suszenie [43]. Aby wyeliminować (w ponad 95%) fumonizyny i ZEA w surowcach skrobiowych (pozyskanych z przemysłu gorzelniczego) stosuje się obróbkę baro-termiczną w parniku Henze'go. Tą metodą można ograniczyć również DON do poziomu od 77 do 97% [44]. Istnieje wiele sposobów wykorzystujących zjawiska fizyczne, mających na celu redukcję toksyn wytwarzanych przez grzyby w ziarnach zbóż, jednakże nie przeprowadzono zbyt wielu badań w tym temacie bądź nie znalazły one zastosowania w przemyśle paszowym.

11. Chemiczne metody eliminacji mykotoksyn

Znanym sposobem pośredniego zapobiegania wystąpieniu grzybów pleśniowych na polu są środki ochrony roślin (ŚOR). Dużym problemem, z którym borykają się rolnicy uprawiający ziemię w systemie bezpłużnym są grzyby z rodzaju *Fusarium* [45]. Zastosowanie mieszaniny herbicydów (mezotrionu z nikosulfuronem) w uprawie kukurydzy

(odmiana DKC 3420) przyczyniło się do zwiększenia plonu i eliminacji obecności mykotoksyn [45, s. 28-29]. Niezbędna jest ochrona pola przed zachwaszczeniem, które może przyczynić się do przenoszenia niebezpiecznych grzybów (w tym pleśniowych). W przypadku grzybów z rodzaju *Fusarium* stosowane są często różnego rodzaju fungicydy. Powszechnie używane są substancje z grupy triazoli, które obniżają zawartość mykotoksyn o 50-80% poprzez utrudnioną biosyntezę ergosterolu produkujących je grzybów. Drugą grupą związków używanych do zmniejszenia porażen ziaren są strobiluryny – hamują mitochondrialny transport elektronów. Ich działanie jest najskuteczniejsze przy zastosowaniu w odpowiednim terminie - w pierwszej fazie kwitnienia zbóż. Połączenie różnego rodzaju środków ochrony roślin może obniżyć zawartość DON (w ziarniakach) o 50-70%. Przeprowadzone badania wykazują największą skuteczność oprysków fungicydów przy zastosowaniu 3-krotnym (w porównaniu z pojedynczym) [16, s. 78-79]. Stosowanie fungicydu chroni ziarna przed fuzariozą kilka dni [46].

Z kolei inne źródła podają, iż użycie fungicydów przyczynia się do zwiększenia ilości mykotoksyn na skutek stresu [12]. Innym środkiem ochrony roślin, który w pewnym stopniu przyczynia się do zmniejszenia porażen roślin jest insektycyd. Żerujące owady mogą spowodować częściowe zniszczenie zboża, które będzie bardziej podatne na choroby lub je zainfekować.

W celu usunięcia mykotoksyn z organizmu można przeprowadzić detoksykację poprzez zastosowanie sorbentów tj. glinokrzemiany, zeolit, bentonit bądź polimery (polimer poliwinylu). Metoda ta nie jest jednak efektywna w przypadku OTA [20, s. 68]. Jednakże z badań przeprowadzonych na drobiu wynika, iż podanie preparatu opartego na glinokrzemianie (Mycofin® / Sorbix®) zmniejsza jej toksyczne działanie [43]. Badanie przeprowadzone w 1997 roku na trzodzie chlewnej wykazało pozytywny wpływ preparatów mineralnych na ich organizm. Bentonit sodowy zniwelował negatywne działanie aflatoksyny w postaci obniżonych przyrostów u świń, z kolei życie kaolinu wyrównało je tylko w połowie (47%) [47]. Przeprowadzono również badania na węglu aktywowanym, zwanym także aktywnym węglem drzewnym. Jego właściwości zależą m.in. od wielkości i powierzchni porów. Skutecznie adsorbuje mykotoksyny tj.: DON, zearalenon, aflatoksyny B1, a także fumonizyny B1 i OTA [48]. Z badań przeprowadzonych *in vivo* wynika, iż aby uzyskać korzystne działanie węgla aktywowanego należy zastosować go na poziomie 2% [49]. W przypadku ZEA skuteczną jest cholestyramina [50]. Zastosowanie 1% kwasu propionowego powoduje spadek porażen OTA o ponad połowę w śrucie jęczmienia ozimego (o 65%), z kolei użycie wodorotlenku sodu 3,5% redukuje w 100% ochratoksynę A [20, s. 70]. Glinokrzemian absorbuje aflatoksyny, które później zostają wydalone z organizmu zwierzęcia w postaci odchodów [51]. Ten porowaty materiał zbudowany z kryształków krzemionowych pochłania toksynę dzięki różnicy potencjału elektrycznego oraz poprzez transport jonowymienny i polaryzację cząsteczek mykotoksyn. Ważną właściwością jest stabilność wiązania przy zmiennym pH (podczas przechodzenia przez układ pokarmowy ptaka). Taką zdolnością charakteryzuje się bentonit i sepiolit połączone z montmorylonitem. Skuteczność pierwszego związku na OTA wyniosła 45% a dla drugiego jedynie 18%. W przypadku fumonizyny B1 działanie obu związków było na niskim poziomie: 26% bentonit-montmorilonit i 14% sepiolit z dodatkiem montmorilonitu. W doświadczeniu użyto 1 kg/t wymienionych komponentów [52].

Wadą zastosowania większości ww. sorbentów jest wiązanie przez nie również korzystnych substancji zawartych w paszy tj. makro i mikroelementów oraz witamin [13].

12. Podsumowanie

Na powstawanie mykotoksyn mają wpływ zarówno warunki wzrostu rośliny, jak i jej magazynowania (ziaren). By zmniejszyć porażenie surowca należy przeprowadzać działania prewencyjne w postaci zabiegów agrotechnicznych tj. zmianowania, nawożenia lub użyć odmiany/hybrydy, która cechuje się zwiększoną odpornością na porażenia grzybami. Ważnym aspektem jest termin siewu, który zbyt późno przeprowadzony może doprowadzić do nałożenia się momentu kiełkowania zbóż (lub kwitnienia kukurydzy) z uwalnianiem zarodników przez grzyby pleśniowe.

W celu detoksykacji paszy stosuje się trzy rodzaje metod:

- fizyczne: sortowanie, obłuskiwanie, suszenie i czyszczenie ziarna;
- biologiczne: bakterie fermentacji mlekowej, bakterie z rodzaju *Sphingomonas*, drożdże;
- chemiczne: środki ochrony roślin (głównie pośrednie działanie), adsorbenty (glino-krzemiany, zeolit, bentonit, kaolin, węgiel drzewny i aktywny), 1% kwas propionowy, 3,5% wodorotlenek sodu.

Ze względu na brak skutecznego środka na wszystkie mykotoksyny należy dostosować metodę do porażenia – rodzaju grzyba, który produkuje dany metabolit wtórny. Objawy mykotoksykozy są specyficzne i inne dla każdego jej rodzaju. Dla drobiu najbardziej niebezpieczne są aflatoksyny i OTA mogące doprowadzić do upadku zwierzęcia. Trichoteceny są mniej toksyczne, ze względu na ich krótki czas przebywania w organizmie ptaka. Jednakże badania wykazały, iż posiadają zdolność odkładania się w tkankach, dlatego też nie należy ich lekceważyć. Z kolei fumonizyny (B1 i B2) są niebezpieczne dopiero przy dużym ich stężeniu. Działanie ZEA opiera się głównie na estrogenie, który wpływa na układ rozrodczy np. obniżając nieśność u kur.

Skażona mykotoksynami pasza wywołuje szereg dolegliwości u drobiu nią skarmianą, dlatego też należy stale poszerzać badania na temat sposobu jej detoksykacji i wpływu na organizmy żywe.

Literatura

1. <https://kipdip.org.pl/pl/news/rekordowa-produkcja-pisklat-brojlerow-> [data dostępu: 06.04.2023].
2. Informacje statystyczne, *Zwierzęta gospodarskie w 2021r.*, GUS, <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/rolnictwo-lesnictwo/produkcja-zwierzecz-zwierzeta-gospodarskie/zwierzeta-gospodarskie-w-2021-roku,6,22.html> [data dostępu: 06.04.2023].
3. Dzwonkowski W. (red.), *Rynek pasz - stan i perspektywy*, Rocznik, nr. 41, 2019, s. 3., <https://docplayer.pl/129128330-Rynek-pasz-stan-i-perspektywy-a-n-a-l-i-z-y-r-y-n-k-o-w-e-wrzesien-2010-issn-instytut-ekonomiki-rolnictwa-panstwowy-instytut-badawczy.html> [data dostępu: 06.04.2023].
4. Informacje statystyczne, *Produkcja upraw rolnych i ogrodnich w 2021r.*, GUS, <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/rolnictwo-lesnictwo/uprawy-rolne-i-ogrodnicze/produkcja-upraw-rolnych-i-ogrodnich-w-2021-roku,9,20.html> [data dostępu: 06.04.2023].
5. Dane statystyczne, Instytut Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej – PIB, <https://www.google.com/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0CAIQw7AJahcKEwjI5aqj2bGAAXUAAAAAHQAAAAAQAg&url=https%3A%2F%2Fwww.sejm.gov.pl%2Fsejm8.nsf%2FInterpelacjaTresc.xsp%3Fkey%3D29FD1D05&psig=AOvVaw0avYSC4PF-9vHkjG1FITST&ust=1690642764529729&opi=89978449> [data dostępu: 06.04.2023].

6. Podolska G., *Ziarno zatrute mikotoksynami*, <https://www.agropolska.pl/uprawa/zboza/ziarno-zatrute-mikotoksynami,282.html> [data dostępu: 06.04.2023].
7. Dankowiakowska A., *Mykotoksyny w paszach dla drobiu*, *Polskie Drobiarstwo*, nr. 11, 2019, s. 17.
8. Panasiuk Ł., Piątkowska M., Pietruszka K., Jedziniak P., Posyniak A., *Modyfikowane mykotoksyny – ukryte zagrożenia poza urzędową kontrolą*, *Życie weterynaryjne*, t. 93, nr. 8, 2018, s. 543.
9. Zalecenie Komisji z dnia 17 sierpnia 2006 r. w sprawie obecności deoksynivalenolu, zearalenonu, ochratoksyny A, T-2 i HT-2 oraz fumonizyn w produktach przeznaczonych do żywienia zwierząt (Dz. Urz. UE L 229/7 z 17.08..2006 r.), <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006H0576&from=PT> [data dostępu: 06.04.2023].
10. Kwiatek K., Kukier E., *Zanieczyszczenia mikrobiologiczne pasz*, *Medycyna weterynaryjna*, t. 64, nr. 1, 2008, s. 25.
11. Kukier E., Kwiatek K., Goldsztejn M., Grenda T., *Mikroflora pasz*, *Życie Weterynaryjne*, t. 90, nr.1, 2015, s. 52-53 <https://www.vetpol.org.pl/dmdocuments/ZW-01-2015-10.pdf> [data dostępu: 06.04.2023].
12. Kowalska G., Kowalski R., *Kontrola obecności mykotoksyn w produktach rolniczych i żywności. Cz. I. Praca przeglądowa*, *Agronomy Science*, t. 75, nr. 3, 2020, s. 20 i 22.
13. Barabaszw W., Pikulicka A., *Mykotoksyny – zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Część 2. Mykotoksyny zamaskowane - powstawanie, występowanie w żywności i paszach, metody identyfikacji i eliminacji mykotoksyn, prawodawstwo dotyczące mykotoksyn*, *Journal of Health Study and Medicine*, nr. 3, 2017, s. 112-113 i 116.
14. Korbas M., Horoszkiewicz-Janka J. (red.), *Zapobieganie powstawaniu mikotoksyn - rośliny rolnicze*, <https://www.gov.pl/documents/912055/913531/Ekspertyza-doradca.pdf/dec39cc1-90d3-f3aa-ba64-c4bc827b4b05> [data dostępu: 06.04.2023].
15. <https://www.saaten-union.pl/pszenica/pszenica-ozima-hybrydowa/hymalaya/> [data dostępu: 28.07.2023].
16. Weber R., Kita W., *Zagrożenia i sposoby ograniczenia chorób fuzaryjnych i mikotoksyn w zbożach i kukurydzy*, *Monografie i Rozprawy Naukowe, IUNG–PIB Puławy*, nr. 43, 2014, s. 52.
17. Ogórek R., *Znaczenie mykotoksyn w produkcji rolniczej*, https://www.researchgate.net/profile/Rafal-Ogorek/publication/319480971_Znaczenie_mikotoksyn_w_produkcji_rolniczej/links/59ae47eda6fdcce55a465364/Znaczenie-mikotoksyn-w-produkcji-rolniczej.pdf, s. 5. [data dostępu: 28.07.2023].
18. Podolska G., *Czynniki wpływające na zanieczyszczenie zbóż mykotoksynami*, *Wiś Jutra*, nr. 2, 2013, str. 32.
19. Jerocha H., Lipca A. (red.), *Pasze i dodatki paszowe*, *Wydawnictwo Rolnicze i Leśne*, Warszawa 2012, s. 47-48.
20. Baranowski A., Richter W.I.F., Grzybowski G., *Wybrane mykotoksyny występujące w paszach gospodarskich*, *Prace i Materiały Zootechniczne. Monografie i Rozprawy*, *Zeszyt 4*, 2003, s. 63-64.
21. *Mycotoxin Compendium*, *Biomin*, 2019, s. 64.
22. Gumowski M., Konkol D., Korczyński M., *Mykotoksyny w paszach*, *Hodowca Drobiu*, nr 8, 2021, s. 34.
23. Wilczek-Jagiełło A., *Zatrucia mykotoksynami – przebieg kliniczny, zmiany w narządach wewnętrznych*, *Hodowca Drobiu*, nr. 9, 2020, s. 26.
24. Chelkowski J., *Mikotoksyny grzyby toksynotwórcze i mikotoksykozy*, <http://www.cropnet.pl/dbases/mycotoxins.pdf>, s. 29. [data dostępu: 06.04.2023].

25. Rozporządzenie Komisji (UE) z dnia 26 lutego 2010 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych w odniesieniu do aflatoksyn (Dz. Urz. UE L 50/8 z 26.02.2010 r.), <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0165&from=EL>, [data dostępu: 06.04.2023].
26. Zielińska K.J., Fabiszewska A.U., Wróbel B., *Występowanie aflatoksyn w paszach I metody ich dekontaminacji*, Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, t. 58, nr. 4, 2013, s. 254.
27. Wróbel B., *Zagrożenia zwierząt i ludzi toksynami grzybów pleśniowych zwartych w paszach i żywności*, Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie, t. 14, zeszyt 3, 2014, s. 163.
28. Gajęcka M., Gajęcki M., *Zearalenon u drobiu*, Polskie Drobiarstwo, nr. 8, 2020, s. 52.
29. Selwet M., *Negatywne aspekty występowania wybranych mykotoksyn w paszach*, Wiadomości Zootechniczne, t. 48, nr. 1, 2010, s. 11.
30. Gliński Z., *Mikotoksykoza fumonizynowa zwierząt i człowieka*, Życie weterynaryjne, t. 94, nr 10, 2019, s. 674, <https://www.vetpol.org.pl/dmdocuments/ZW-10-2019-01.pdf> [data dostępu: 06.04.2023].
31. Błajet-Kosicka A., *Zastosowanie techniki LC-MS/MS w oznaczaniu wybranych mykotoksyn fuzaryjnych*, https://pbc.gda.pl/Content/36931/phd_błajet_kosicka_anna.pdf, s. 13 [data dostępu: 06.04.2023].
32. Kurcek A., *Mykotoksyny*, e-biotechnologia.pl, <http://www.e-biotechnologia.pl/artykuly/mikotoksyny/> [data dostępu: 06.04.2023].
33. https://www.wrp.pl/wp-content/uploads/2022/12/WRP_186_okN.pdf, s. 10 [data dostępu: 06.04.2023].
34. Zalecenie Komisji z dnia 27 marca 2013 r. w sprawie obecności toksyn T-2 i HT-2 w zbożach i produktach zbożowych (Dz. Urz. UE L 91/12 z 03.04.2013 r.), <https://sip.lex.pl/akty-prawne/dzienniki-UE/zalecenie-2013-165-ue-w-sprawie-obecnosci-toksyn-t-2-i-ht-2-w-zbozach-i-68304620> [data dostępu: 06.04.2023].
35. Barabasz W., Pikulicka A., *Mykotoksyny – zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Część I. Mykotoksyny – charakterystyka, występowanie, toksyczność dla organizmów*, Journal of Health Study and Medicine, nr. 3, 2017, s. 89.
36. Piotrowska M., *Wykorzystanie mikroorganizmów do usuwania mikotoksyn z żywności i paszy*, Postępy Mikrobiologii, t. 51, nr. 2, 2012, s. 114.
37. Pietras M., Barowicz T., *Mikotoksyny w paszy. Biologiczne metody dekontaminacji*, <http://www.portalhodowcy.pl/czasopisma/hodowca-trzody-chlewnej/hodowca-trzody-chlewnej-archiwum/92-hodowca-trzody-chlewnej-7-8-2014/508-mikotoksyny-w-paszy-biologiczne-metody-dekontaminacji> [data dostępu: 06.04.2023].
38. Wachowska U., Kucharska K., Pluskota W., Czaplicki S., Stuper-Szablewska K., *Bacteria Associated with Winter Wheat Degrade Fusarium Mycotoxins and Triazole Fungicide Residues*, <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiUyM76Yv-AhVsmYsKHVc9BXcQFnoECAsQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.mdpi.com%2F2073-4395%2F10%2F11%2F1673&usq=AOvVaw2qllE7Yn-FI2SctZoNQ3xv> (alternatywny link: <https://doi.org/10.3390/agronomy10111673>) [data dostępu: 06.04.2023].
39. Różewicz M., *Problematyka porażenia grzybami Fusarium w uprawach zbóż oraz związane z tym występowanie w ziarnie mikotoksyn i ich szkodliwość dla zwierząt*, Wiadomości Zootechniczne, t. 59, cz. 1-2, 2021, s. 42, 44.
40. Piegza M., Stempniewicz R., *Ocena antagonizmu drożdży Geotrichum Candidum w stosunku do toksynotwórczych grzybów rodzaju Fusarium*, ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia Jakość. Suplement, tom 9, nr. 3, 2002, s. 146.
41. Bzducha-Wróbel A., Błażej S., *Przeciwtoksyczne i przeciwdrobnoustrojowe właściwości składników ścianny komórkowej drożdży*, Medycyna Weterynaryjna, t. 64, nr 4, 2011, s. 245.

42. <https://ampol-merol.pl/produkty/31/mycosorb-a> [data dostępu: 06.04.2023].
43. Kapturowska A.U., Zielińska K.J., Stecka K., Kupryś M.P., *Ocena skażenia pasz ochratozyną A i metody ich dekontaminacji*, Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, tom 55, nr 3, 2010, s. 159.
44. Kłosowski G., Błajet-Kosicka A., Mikulski D., Grajewski J., *Ocena możliwości redukcji stężenia mikotoksyn w procesie produkcji etanolu z ziarna kukurydzy technologią BUS i klasyczną*, ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość., nr. 2, 2011, s. 89.
45. Gołębiowska H., Płaskowska E., *Wpływ ochrony herbicydowej w bezplużnej uprawie kukurydzy na nasilenie fuzariozy kolb i zgorzeli łodyg oraz parametry jakościowe ziarna w zależności od odmiany*, Bibliotheca Fragmenta Agronomica / Polskie Towarzystwo Nauk Agrotechnicznych, t. 34, nr. 4, 2017, s. 17.
[https://pta.up.poznan.pl/pdf/2017/FA%2034\(4\)%202017%20Golebiowska.pdf](https://pta.up.poznan.pl/pdf/2017/FA%2034(4)%202017%20Golebiowska.pdf) [data dostępu: 06.04.2023].
46. Jaśkiewicz B., *Zapobieganie fuzariozom w okresie kłoszenia. Dostępne środki*, <https://www.wrp.pl/zapobieganie-fuzariozom-w-okresie-kloszenia-dostepne-srodki/> [data dostępu: 06.04.2023].
47. Lindemann M.D., Blodgett D.J., Harper A.F., Kornegay E.T., Doerr J.A., *Appraisal of the value of selected clays and minerals in diets with and without aflatoxin-contaminated maize fed to young pigs*, <http://www.jafs.com.pl/pdf-69562-7511?filename=Appraisal%20of%20the%20value%20of.pdf>, s.1 [data dostępu: 06.04.2023].
48. Devreese M., Backer P.De., Croubels S., *Different methods to counteract mycotoxin production and its impact on animal health*, Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, vol 82, 2013, s. 184. <https://pdfs.semanticscholar.org/379f/b1fc08e7f939c285f30122aefea5a73c4f6c.pdf> [data dostępu: 01.08.2023].
49. Patil R.D., Sharma R., Asrani R.K., *Mycotoxicosis and its control in poultry: A review*, Journal of Poultry Science and Technology, 2(1), 2014, s. 5.
https://www.researchgate.net/publication/275248255_Mycotoxicosis_and_its_control_in_poultry_A_review/link/5ac86e9eaca272abdc5e9cbe/download [data dostępu: 01.08.2023].
50. Bodarski R., Krzywiecki S., Preś J., *Zagrożenie mikotoksynami grzybów polowych w żywieniu zwierząt*, Przegląd hodowlany, nr 11, 2002, s. 24. <http://ph.ptz.icm.edu.pl/wp-content/uploads/2017/12/22-25-8.pdf> [data dostępu: 06.04.2023].
51. Korol W., *Dodatki paszowe w żywieniu drobiu*, PAN - Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego, 1994, s. 54.
52. Wartecki T.J., *Mykotoksyny w paszach dla drobiu – skutki oddziaływania oraz najnowsze metody zapobiegania*, Polskie Drobiarstwo, nr. 12, 2010, s. 32 i 34.

Mykotoksyny w paszach dla drobiu

Streszczenie

Ze względu na skalę krajowej produkcji mięsa drobiowego i jaj konsumpcyjnych niezbędna jest analiza pasz przeznaczonych do ich skarmiania. Na wielkość skażenia mykotoksynami wpływają zarówno warunki magazynowania ziarna, jak i cały okres wzrostu rośliny. W celu ograniczenia rozwoju grzybów toksynotwórczych niezbędne są odpowiednie zabiegi agrotechniczne, wybór odpornej odmiany oraz kontrolowane warunki składowania zboża. Celem niniejszej pracy było omówienie najbardziej powszechnych mykotoksyn występujących w zbożach przeznaczonych do produkcji pasz dla drobiu. Metabolity wtórne grzybów posiadają zalecane dopuszczalne ilości w paszach. W trakcie wzrostu rośliny stosuje się opryski fungicydami, których skuteczność jest różna i zależy od momentu ich zastosowania. Jako prewencję stosuje się również sortowanie uszkodzonych zbóż, które są bardziej narażone na atak grzybów. Pomocne w ochronie pasz mogą być również konserwanty. Współcześnie stosuje się sorbenty i detoksykanty, które zmniejszają szkodliwość mykotoksyn. W chwili obecnej nie wynaleziono metody, która w 100% likwidowałaby mykotoksyny, dlatego tak ważne jest pogłębianie tematu ich eliminacji zarówno z surowca, jak i samej paszy.

Słowa kluczowe: mykotoksyny, pasze, drób, detoksykacja

Mycotoxins in poultry feed

Abstract

Due to the scale of domestic production of poultry meat and table eggs, it is essential to analyze the feed intended for feeding them. The amount of mycotoxin contamination is influenced by both grain storage conditions and the entire growth period of the plant. In order to reduce the development of toxigenic fungi, appropriate agrotechnical treatments, the selection of a resistant variety and controlled grain storage conditions are necessary. The purpose of this paper was to discuss the most common mycotoxins found in cereals for poultry feed. Secondary metabolites of fungi have recommended permissible amounts in feed. During the growth of the plant, fungicide sprays are used, the effectiveness of which varies and depends on the timing of their application. Sorting of damaged grain, which is more vulnerable to fungal attack, is also used as a preventive measure. Preservatives can also be helpful in protecting feedstuffs. Today, sorbents and detoxifiers are used to reduce the harmfulness of mycotoxins. At present, no method has been invented that would eliminate mycotoxins in 100%, so it is important to further the topic of their elimination from both raw material and feed itself.

Keywords: mycotoxins, feed, poultry, detoxification

Próba identyfikacji wybranych izolatów bakterii z ekranów dotykowych automatów do odbierania paczek

1. Wprowadzenie

Bakterie są organizmami występującymi powszechnie między innymi w powietrzu, wodzie i glebie, ale również w organizmach roślin oraz zwierząt, często przyczyniając się do rozwoju różnorodnych chorób u swoich gospodarzy. W społeczeństwie panuje stosunkowo mała świadomość na temat łatwości ich rozprzestrzeniania, co może prowadzić do złudnego poczucia bezpieczeństwa, zwłaszcza w przypadku mikroorganizmów patogennych. Nawet pomimo niedawnych wydarzeń związanych z pandemią COVID-19, wciąż obserwuje się u ludzi występowanie niewystarczającej świadomości dotyczącej prawidłowego mycia dłoni i konieczności ich dezynfekcji oraz odkażania przedmiotów codziennego użytku, na przykład telefonów komórkowych. Tymczasem 80% infekcji wywołanych przez bakterie wynika z kontaktu z dłońmi osoby zakażonej lub przedmiotami wcześniej przez nią używanymi [1]. Jak pokazują niedawno przeprowadzone badania, interwencje promujące mycie rąk mydłem zmniejszyły zachorowalność na infekcje dróg oddechowych o około 17% [2], co wskazuje na konieczność ciągłego podnoszenia w społeczeństwie świadomości dotyczącej utrzymywania prawidłowej higieny ciała. Z kolei stosowanie dostępnych na rynku środków do dezynfekcji, takich jak chusteczki nawilżane o działaniu antibakteryjnym, może znacząco zmniejszyć obecność mikroorganizmów na urządzeniach codziennego użytku [3]. Jednak transmisji mikroorganizmów, w tym patogenów, na skórę człowieka i wykorzystywane przez niego przedmioty nie da się całkowicie wyeliminować, a rozprzestrzenianie się ich pomiędzy ludźmi może skutkować poważnymi konsekwencjami zdrowotnymi. Jak pokazują przeprowadzone z wykorzystaniem ekranów telefonów komórkowych badania, aż 92,9% telefonów biorących w nich udział ochotników było skażone bakteriami, a wśród nich zidentyfikowano również takie o działaniu chorobotwórczym dla człowieka [4].

Szczególne zagrożenie mogą stanowić obiekty i sprzęty, które są systematycznie użytkowane przez dużą liczbę osób, nawet niemających ze sobą bezpośredniego kontaktu. Przykładem takich urządzeń są automaty do odbierania paczek, które ze względu na wygodę i funkcjonalność, stają się w ostatnich latach coraz popularniejszą formą przeka-

¹ gos.marianna@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów Eza, Wydział Biologii i Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

² olga.fidecka@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów Eza, Wydział Biologii i Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

³ aleksandra.gumowska3@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów Eza, Wydział Biologii i Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

⁴ dominika.jankowska124@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów Eza, Wydział Biologii i Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

⁵ joanna_banasiewicz@sggw.edu.pl, Katedra Biochemii i Mikrobiologii, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

zywania przesyłek. Według badań Kantar Public S.A. z kwietnia 2021 roku na reprezentatywnej grupie internautów (N = 1000), 89% badanych wybrało jako formę dostawy Paczkomaty® firmy InPost, które zapoczątkowały rozwój tego typu urządzeń i przyczyniły się do rozpowszechnienia ich występowania. Dodatkowo, według przeprowadzonych wtedy badań, 70% ankietowanych zadeklarowało wybór Paczkomatu® również jako formy wysyłania przesyłek. Idąc tym tropem, obecnie coraz więcej firm kurierskich decyduje się na korzystanie z podobnych rozwiązań dotyczących sposobu odbierania i nadawania paczek przez swoich klientów [5]. Ekran dotykowy, które stanowią integralną część tych urządzeń, mogą przyczyniać się do bezpośredniej transmisji mikroorganizmów pomiędzy użytkującymi je osobami, ale również mogą być zasiedlane przez drobno-ustroje powszechnie znajdujące się w środowisku.

Automaty do odbierania i nadawania paczek znajdują się zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz budynków, a panujące tam parametry środowiskowe cechują się między innymi odmienną temperaturą otoczenia, wilgotnością powietrza, poziomem promieniowania słonecznego czy ruchami powietrza, przyczyniając się do występowania tam populacji mikroorganizmów o różnej tolerancji na działanie danego czynnika. Jedną z powszechnie występujących w środowisku grup bakterii tlenowych, wykazującą przystosowanie do zarówno skrajnie niskiej, jak i bardzo wysokiej temperatury otoczenia, jest rodzaj *Bacillus*, który zawdzięcza tę zdolność głównie możliwości wytwarzania form przetrwalnikowych w postaci endospor. Przykładowo, jedno z prowadzonych badań wykazało zdolność tych mikroorganizmów do wzrostu w temperaturze wynoszącej odpowiednio 10, 15, 20, 25, 30 i 37°C, przy czym optymalny wzrost analizowanego rodzaju był obserwowany podczas hodowli komórek w temperaturze 15°C [6]. Jak wspomniano, żywotność bakterii w stanie wolnym warunkuje też poziom promieniowania słonecznego, na które składa się promieniowanie widzialne, podczerwone odczuwane jako ciepło, oraz niewidzialne promieniowanie ultrafioletowe (UV). Co ciekawe, wykazano, że za działanie bakterio-bójcze w stosunku po pewnych szczepów może odpowiadać przede wszystkim widmo światła widzialnego, a nie ultrafioletowego, które to zwykle kojarzy się właśnie z procesami sterylizacji sprzętów czy powierzchni użytkowych [7].

Celem prezentowanych badań była próba identyfikacji i klasyfikacji taksonomicznej wybranych izolatów bakteryjnych pochodzących z wymazów pobranych z ekranów dotykowych automatów do odbierania paczek.

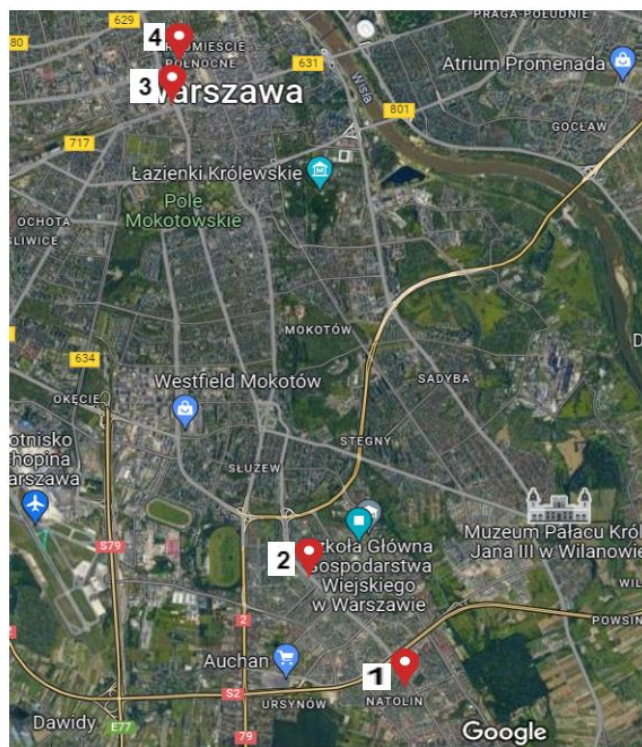
2. Materiały i metody

2.1. Pobranie materiału do badań

Materiał badawczy został pobrany 7 listopada 2022 roku poprzez wykonanie wymazów z ekranów dotykowych automatów do odbierania paczek i naniesienie ich na podłoże agarowe Luria-Bertani (LB Broth with agar, Sigma-Aldrich). Wymazy zostały pobrane z czterech lokalizacji znajdujących się na terenie Warszawy, z dzielnic: Ursynów, Natolin i Śródmieście. Próby zostały uzyskane w dwóch powtórzeniach, a lokalizacje automatów dobrano tak, aby znajdowały się one zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz budynków. Szczegółowe dane dotyczące miejsc poboru prób przedstawiono w tabeli 1 oraz na rysunku 1.

Tabela 1. Charakterystyka miejsc poboru badanych prób

Nr próby	Dzielnica Warszawy	Lokalizacja	Temperatura
1	Natolin	wewnątrz budynku	pomieszczenie z oknami ok. 18°C
2	Ursynów	wewnątrz budynku	pomieszczenie bez okien ok. 15°C
3	Śródmieście	na zewnątrz budynku, w miejscu zatłoczonym	11°C
4	Śródmieście	na zewnątrz budynku, w miejscu rzadziej uczęszczanym	11°C



Rysunek 1. Lokalizacje, z których pobrano próby (opracowanie własne na podstawie <https://www.google.pl/maps/>): 1. Natolin, 2. Ursynów, 3. Śródmieście, 4. Śródmieście

2.2. Izolacja bakterii

Posiewy powierzchniowe na podłożu agarowym LB inkubowano 48 h w warunkach tlenowych, w temperaturze 28°C. Po okresie inkubacji wykonano posiewy redukcyjne na podłożu agarowe LB w celu uzyskania czystych kultur bakterii. Do podłoża dodano również cykloheksymid w stężeniu 50 µg/ml o działaniu grzybobójczym. Tak przygotowane próby pozostawiono do inkubacji na 72 h, w warunkach tlenowych, w temperaturze 28°C. W wyniku przeprowadzonych posiewów uzyskano 35 izolatów bakteryjnych, które następnie poddano dalszym analizom.

2.3. Obserwacje mikroskopowe

Bakterie wyhodowane na podłożu z dodatkiem cykloheksymidu poddawano barwieniu metodą Grama w celu wstępnego określenia cech morfologicznych komórek, takich jak kształt i wielkość. Dokonano obserwacji preparatów z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego, a uzyskane obrazy mikroskopowe udokumentowano fotograficznie.

2.4. Testy biochemiczne

Z wykorzystaniem uzyskanych izolatów bakteryjnych wykonano testy na katalazę i oksydazę. Test na katalazę przeprowadzono na szkiełku podstawowym z danym izolatem bakteryjnym, dodając 3% nadtlenu wodoru. Pozytywny wynik dawały próby, w których wydzielały się pęcherzyki gazu. W teście na obecność enzymu oksydazy cytochromowej C pozytywny wynik obserwowano w postaci fioletowej zmiany zabarwienia kolonii pod wpływem dodania płynnego odczynnika oksydazy cytochromowej C (Oxidase Reagent, bioMérieux® SA), według wskazań producenta.

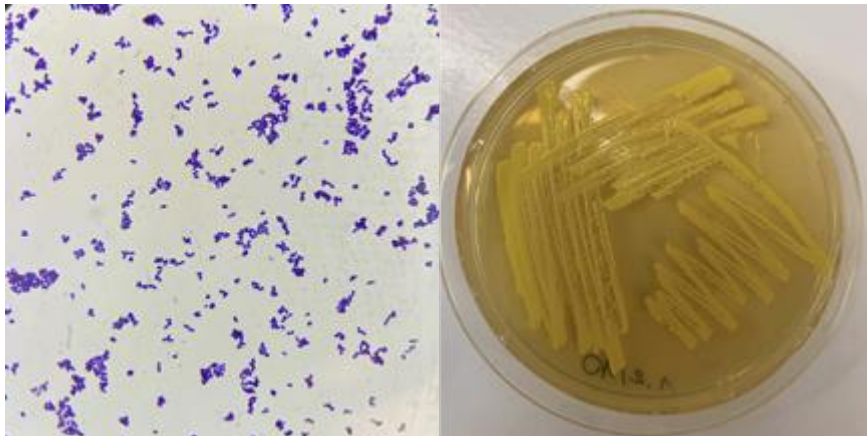
2.5. Techniki biologii molekularnej

Wyzolowano genomowy DNA ze wszystkich uzyskanych izolatów przy zastosowaniu gotowego zestawu do izolacji DNA z bakterii Genomic Mini AX Bacteria (A&A Biotechnology), a następnie otrzymane produkty poddano łańcuchowej reakcji polimerazy, PCR (ang. *polymerase chain reaction*) z wykorzystaniem polimerazy DreamTag (Thermo Fisher Scientific). Metoda ta miała na celu powielenie fragmentu genu 16S rRNA do dalszej analizy. Zastosowano uniwersalne startery 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCT CAG 3') oraz 1492R (5' TACCTTGTTACGACTT 3'), w warunkach zgodnych z danymi literaturowymi [8]. Otrzymane fragmenty DNA zwizualizowano za pomocą elektroforezy na 1% żelu agarozowym, produkty PCR o oczekiwanej wielkości wycięto z żelu, a następnie oczyszczono za pomocą zestawu E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (Omega Biotek) i poddano sekwencjonowaniu z wykorzystaniem ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems) przy użyciu odczynników BigDye v3.1 na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Otrzymane wyniki porównano z danymi dostępnymi w bazie danych NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*) dzięki zastosowaniu narzędzia BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*).

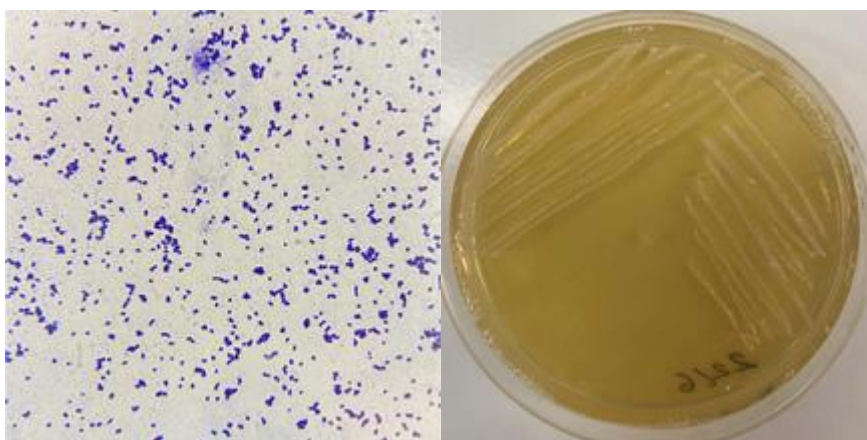
3. Wyniki

3.1. Wyniki obserwacji makroskopowych i mikroskopowych

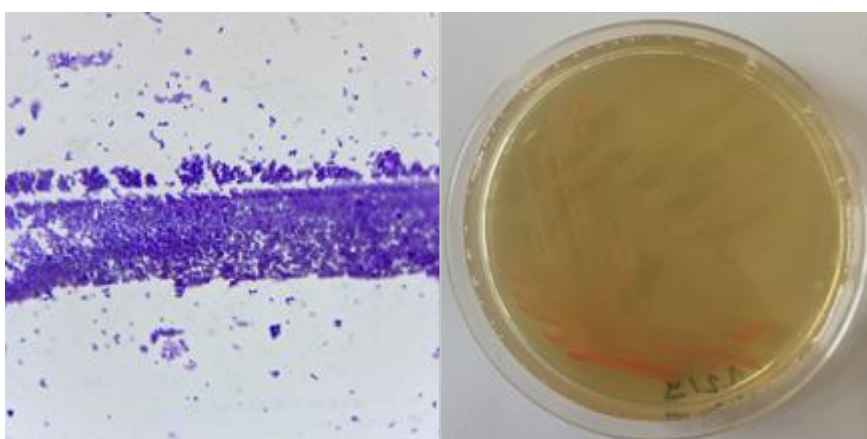
Obserwacje makroskopowe hodowli oraz mikroskopowe komórek mikroorganizmów, które wyizolowano na podłożu agarowym LB z dodatkiem cykloheksymidu, pozwoliły na wstępne rozpoznanie przypuszczalnych rodzajów otrzymanych izolatów oraz morfologii tych drobnoustrojów, do których należały zarówno ziarniaki, pałeczki, jak i ziarniaki o wydłużonym kształcie. Następnie wykonano barwienie metodą Grama, które pozwoliło na ustalenie tego, iż wszystkie z 35 izolatów należało do bakterii Gram+. Na rysunkach 2-8 pokazano obrazy spod mikroskopu świetlnego przykładowych izolatów, które uzyskano po wykonaniu barwienia, a także zdjęcia z wykonanych posiewów czystych izolatów na podłożu agarowe LB.



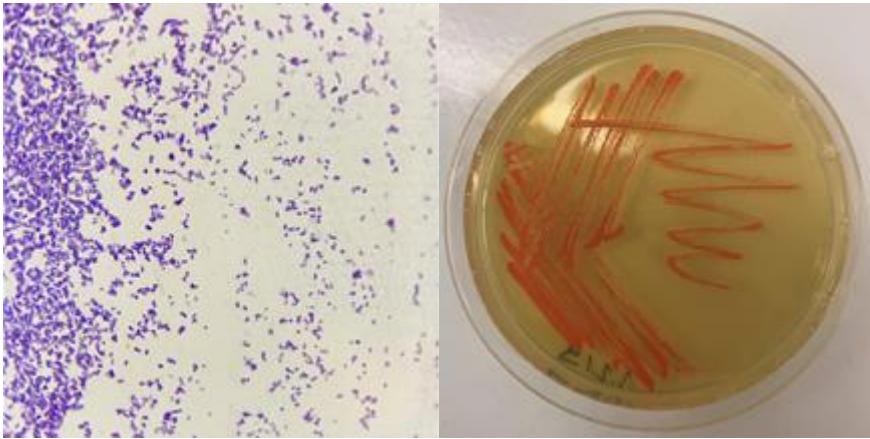
Rysunek 2. Ziarniaki Gram+, zdjęcie komórek i hodowli po 72 h inkubacji (fot. własne)



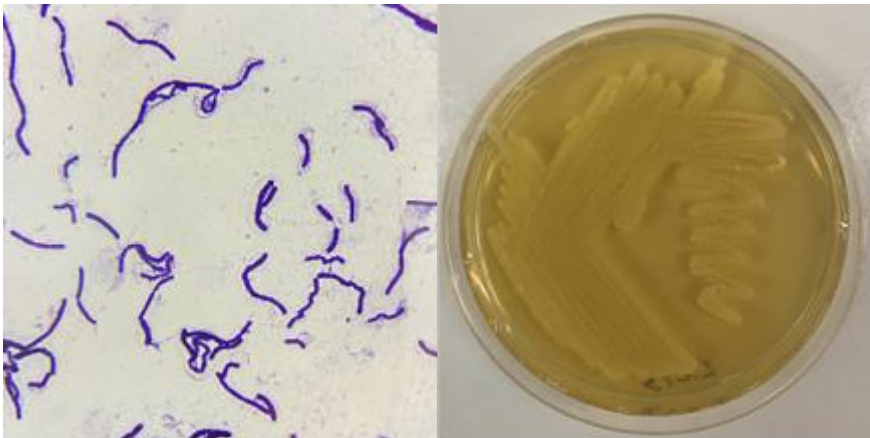
Rysunek 3. Ziarniaki Gram+, zdjęcie komórek i hodowli po 72 h inkubacji (fot. własne)



Rysunek 4. Ziarniaki Gram+, zdjęcie komórek i hodowli po 72 h inkubacji (fot. własne)



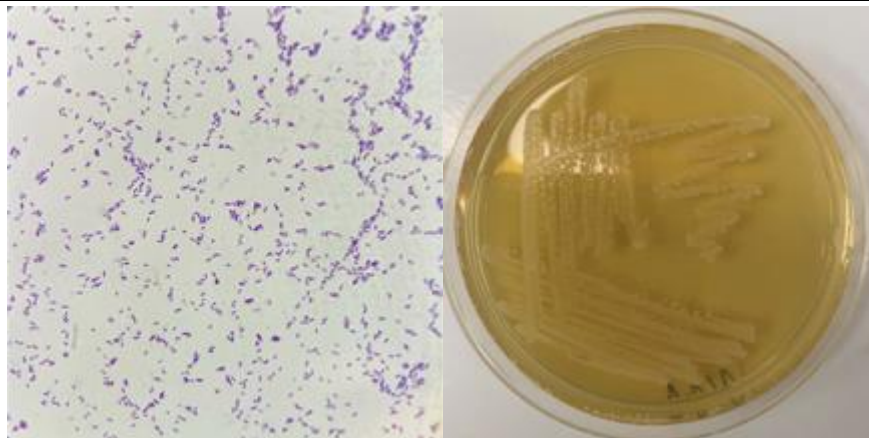
Rysunek 5. Pałeczki Gram+, zdjęcie komórek i hodowli po trzech tygodniach inkubacji (fot. własne)



Rysunek 6. Pałeczki Gram+, zdjęcie komórek i hodowli po 72 h inkubacji (fot. własne)



Rysunek 7. Pałeczki Gram+, zdjęcie komórek i hodowli po 72 h inkubacji (fot. własne)



Rysunek 8. Pałeczki Gram+, zdjęcie komórek i hodowli po 72 h inkubacji (fot. własne)

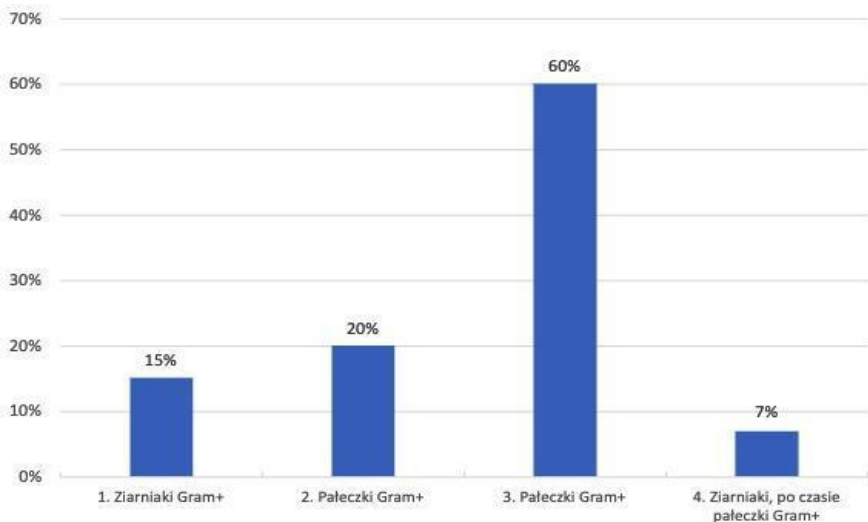
3.2. Wyniki testów biochemicznych

W tabeli 2 przedstawiono wyniki wstępnego różnicowania badanych izolatów po oczyszczeniu, barwieniu metodą Grama i przeprowadzeniu testów na katalazę i oksydazę. Wszystkie izolaty bakterii dawały pozytywny wynik w teście na katalazę i tylko jeden miał wynik pozytywny po zastosowaniu testu na obecność enzymu oksydazy cytochromowej C, pozostałe dawały wynik negatywny. W czwartym punkcie tabeli przedstawiono grupę bakterii, w przypadku której po wykonaniu pierwszego preparatu z hodowli poddanej 74-godzinnej inkubacji i wybarwieniu go metodą Grama oraz obserwacji mikroskopowej, zaobserwowano kształt wydłużonych ziarniaków, a następnie, po powtórzeniu tych samych czynności w odstępie trzech tygodni, zauważono, że bakterie te miały już kształt pałeczek.

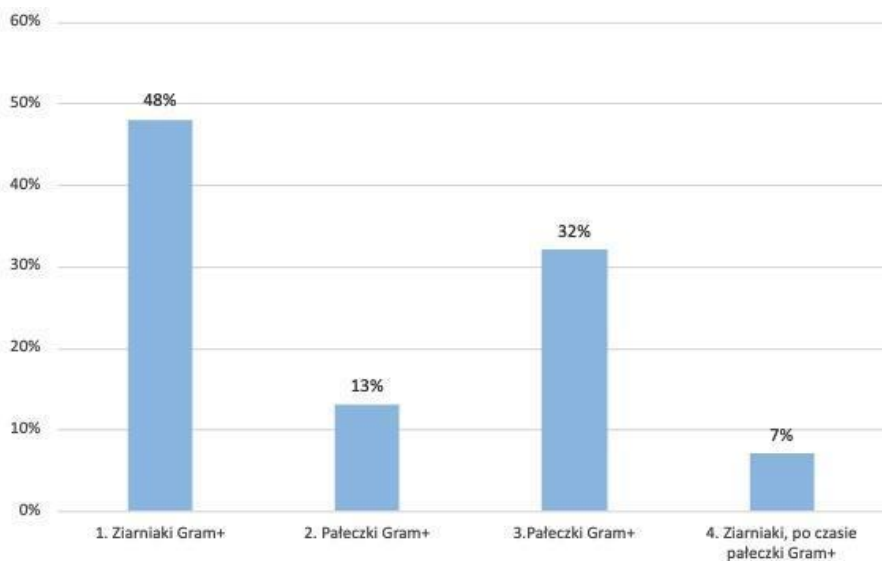
Tabela 2. Wyniki wstępnego różnicowania uzyskanych izolatów bakteryjnych

Lp.	Kształt	Wynik barwienia metodą Grama	Test na katalazę	Test na oksydazę	Liczba podłoży zawierających izolat	Procentowy udział
1	Ziarniaki	Gram+	+	-	10	28,50%
2	Pałeczki	Gram+	+	-	5	14%
3	Pałeczki	Gram+	+	+	18	51,50%
4	Ziarniaki, po czasie pałeczki	Gram+	+	-	2	6%

Na rysunkach 9 i 10 przedstawiono wyniki ukazujące zawartość procentową poszczególnych izolatów bakterii w badanych próbach. Rysunki przedstawiają wyniki zebrane odpowiednio na zewnątrz i w środku budynków. Jak można zaobserwować poniżej, w próbach pobranych z automatów znajdujących się na zewnątrz budynków znajdowało się najwięcej pałeczek Gram+. Natomiast w próbach uzyskanych z automatów znajdujących się w środku budynków najliczniej występującą grupą były Gram+ ziarniaki.



Rysunek 9. Wyniki wstępnego różnicowania bakterii pobranych z ekranów automatów do paczek znajdujących się na zewnątrz budynków



Rysunek 10. Wyniki wstępnego różnicowania bakterii pobranych z ekranów automatów do paczek znajdujących się wewnątrz budynków

3.3. Analiza wyników sekwencjonowania

Wyniki sekwencjonowania genu 16S rRNA wszystkich analizowanych izolatów bakterii pozwoliły na wstępne przyporządkowanie większości pałeczek Gram+ i ziarniaków Gram+ do poszczególnych, znanych rodzajów mikroorganizmów. W tabeli 3 ukazano podobieństwo badanych izolatów do przedstawicieli poszczególnych rodzajów, których sekwencje zostały zdeponowane w bazie NCBI.

Tabela 3. Wyniki sekwencjonowania genu 16S rRNA wybranych izolatów, ukazujące ich podobieństwo do przedstawicieli poszczególnych rodzajów, których sekwencje zostały zdeponowane w bazie NCBI

Nr izolatu	Starter	Przedstawiciel rodzaju 1	Przedstawiciel rodzaju 2	Przedstawiciel rodzaju 3
4.2/2	27f	<i>Glutamicibacter</i> sp. 99,64%	Bacterium strain FvB1 99,64%	<i>Arthrobacter</i> sp. 99,64%
1.1/11	27f	<i>Bacillus</i> sp. 100%		
3.2/4	27f	<i>Bacillus</i> sp. 100%		
1.2/8	27f	<i>Curtobacterium</i> sp. 100%		
2.2/4	27f	<i>Kocuria</i> sp. 99,34%		
1.1/5	27f	<i>Microbacterium</i> sp. 100%		
4.1/4	27f	<i>Staphylococcus</i> sp. 100%		
2.2/4	27f	<i>Bacillus</i> sp. 99,71%	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. 99,57%	
4.1/11	27f	<i>Bacillus</i> sp. 100%		
4.2/9	27f	<i>Bacillus</i> sp. 100%		
2.1/1	27f	Uncultured bacterium 99,84%	<i>Achromobacter</i> sp. 99,52%	<i>Alcaligenaceae</i> bacterium 98,89%
2.2/6	27f	<i>Psychrobacter</i> sp. 99,67%	<i>Halomonas</i> sp. 99,17%	
3.2/3	27f	<i>Staphylococcus</i> sp. 100%		
1.2/9	27f	<i>Arthrobacter</i> sp. 100%		

4. Dyskusja

Przeprowadzono próbę określenia stopnia zróżnicowania mikroorganizmów znajdujących się na ekranach dotykowych automatów do odbierania paczek. Głównym celem badań była wstępna identyfikacja wybranych izolatów bakterii i ich klasyfikacja do znanych jednostek taksonomicznych. Próby zebrano z automatów znajdujących się w Warszawie w listopadzie 2022 roku, zarówno z urządzeń zlokalizowanych na zewnątrz budynków, jak i w pomieszczeniach.

Wyniki badań wykazały obecność różnych rodzajów bakterii na ekranach automatów do odbierania paczek. Największą grupę stanowiły bakterie z rodzaju *Bacillus*. Wykrycie tych mikroorganizmów sugeruje możliwość występowania czynników środowiskowych, które szczególnie sprzyjają ich namnażaniu się. W trakcie badań zidentyfikowano także Gram+ pałeczki oraz ziarniaki, choć w mniejszej liczbie. W badaniu odnotowano również obecność przedstawicieli bakterii z rodzaju *Arthrobacter*.

Bacillus jest jednym z najliczniej występujących rodzajów bakterii na ekranach dotykowych automatów. Obecność przedstawicieli tego rodzaju może wynikać z ich zdolności do tworzenia przetrwalników, co pozwala im przetrwać w trudnych warunkach środowiskowych, jakimi cechują się powierzchnie badanych urządzeń [9]. Ponadto, szerokie występowanie *Bacillus* spp. w środowisku naturalnym, takim jak gleba i woda, sugeruje możliwość przeniesienia tych mikroorganizmów na ekrany przez kontakt z zanieczyszczonymi powierzchniami lub powietrzem. Obecność niektórych patogennych przedstawicieli *Bacillus* spp. na ekranach automatów może stanowić potencjalne zagrożenie dla użytkowników, zwłaszcza dla osób o osłabionej odporności [9, 10]. *Bacillus cereus* jest przykładem bakterii z rodzaju *Bacillus* o właściwościach patogennych. *B. cereus* może wywołać dwa różne rodzaje zakażeń u ludzi: zatrucia pokarmowe i infekcje oportunistyczne. Zatrucie pokarmowe występuje po spożyciu żywności zanieczyszczonej toksynami wydzielanymi przez te bakterie. Infekcje oportunistyczne z kolei mogą wystąpić u osób o osłabionym układzie odpornościowym, które są bardziej podatne na infekcje bakteryjne [11]. Ekran automatów do odbierania paczek mogą stanowić potencjalne źródło zakażenia, ponieważ są one często dotykane przez wiele osób i mogą gromadzić różne drobno-

ustroje, w tym bakterie. W przypadku obecności na ekranie dotykowym bakterii patogennych i przeniesienia ich na ręce kolejnych użytkowników, w dalszej kolejności mogą trafić one także do ust, nosa lub innych części ciała, powodując zakażenia ogólnoustrojowe i rozprzestrzenianie się wywoływanych przez nie chorób [12].

Pałeczki Gram+ i ziarniaki Gram+ również zostały zidentyfikowane na ekranach automatów. Te mikroorganizmy są charakterystyczne dla różnych środowisk, takich jak gleba, woda czy skóra człowieka. Ich obecność na ekranach może wynikać z kontaktu z zanieczyszczonymi rękami użytkowników, powietrzem lub innymi powierzchniami, z którymi miały styczność. W przypadku pałeczek Gram+ i ziarniaków Gram+, istnieje potencjalne ryzyko zdrowotne związane z ich obecnością na ekranach automatów, szczególnie dla osób, które mają kontakt bezpośredni z tymi powierzchniami. Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* stanowiły niewielki procent izolatów uzyskanych ze wszystkich badanych prób, co może być wynikiem tego, iż niesprzyjające warunki środowiskowe ograniczały wzrost tych bakterii na powierzchni ekranów. Rodzaj ten stanowi naturalny element mikrobioty skóry ludzi, a przykładem powszechnie występującego tam gatunku jest chociażby *Staphylococcus aureus*. W pewnych okolicznościach, dzięki zdolności do tworzenia biofilmu, może on jednak stanowić czynnik chorobotwórczy, powodujący infekcje między innymi oczu [13].

Arthrobacter, będący rodzajem bakterii glebowych, również został zidentyfikowany na ekranach dotykowych automatów. Jego obecność może wynikać z kontaktu z ziemią lub cząstkami powietrza przenoszącymi mikroorganizmy z otoczenia. W przypadku niektórych izolatów *Arthrobacter*, istnieje potencjalne ryzyko patogenności dla ludzi, głównie w przypadku osłabionej odpowiedzi immunologicznej organizmu [14, 15].

Porównanie składu populacji mikroorganizmów znajdujących się na automatach umieszczonych na zewnątrz budynków z tymi uzyskanymi z urządzeń zlokalizowanych w zamkniętych pomieszczeniach, wykazało istotne różnice. W próbkach zebranych z automatów umieszczonych w pomieszczeniach zamkniętych stwierdzono mniejszą liczbę mikroorganizmów, w porównaniu do próbek zebranych z automatów stojących na zewnątrz budynków. Wynik ten nie stanowi zaskoczenia, ponieważ zamknięte pomieszczenia mogą być bardziej kontrolowane pod względem czystości i ilości mikroorganizmów w powietrzu. Dodatkowo, mniejsza ekspozycja na zewnętrzne czynniki środowiskowe, takie jak pył, gleba czy zanieczyszczenia powietrza, może wpływać na niższe zróżnicowanie mikrobioty na ekranach automatów w pomieszczeniach zamkniętych. Natomiast na ekranach automatów znajdujących się na zewnątrz budynków stwierdzono większą liczbę mikroorganizmów. Istnieje wiele czynników, które mogą wpływać na to zjawisko. Przede wszystkim, automaty na zewnątrz są chętniej użytkowane, co może prowadzić do większej liczby mikroorganizmów przenoszonych przez bezpośredni kontakt oraz, co za tym idzie, do większego ich zróżnicowania. Ponadto, otoczenie zewnętrzne, takie jak gleba, roślinność i powietrze, może dostarczać dodatkowych źródeł mikroorganizmów, które mogą osiedlać się na ekranach automatów.

Kolejne etapy badań powinny obejmować ponowne pobranie prób z wybranych ekranów automatów do odbierania paczek w kilku powtórzeniach w okresie letnim. Porównanie wyników dla prób zebranych w różnych porach roku pozwoli na ocenę sezonowych zmian w składzie mikrobioty obecnej na ekranach automatów. Ponadto, proponuje się przeprowadzenie sekwencjonowania genu *gyrB* (ang. *DNA gyrase subunit B*) dla izolatów zaklasyfikowanych do rodzaju *Bacillus*, co umożliwi bardziej precyzyjne

zidentyfikowanie tych bakterii na poziomie gatunkowym. Sekwencjonowanie genów jest jedną z najnowocześniejszych metod pozwalających na dokładną analizę i porównanie materiału genetycznego różnych organizmów.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że ekrany automatów do odbierania paczek są środowiskiem, w którym występuje duża różnorodność bakterii. Jest to zgodne z wynikami wcześniejszych badań, które wykazały obecność wielu gatunków mikroorganizmów na powierzchniach dotykowych różnych wykorzystywanych powszechnie przez ludzi urządzeń elektronicznych [4].

5. Wnioski

Przeprowadzone badania dostarczają wstępnych informacji na temat różnorodności mikroorganizmów obecnych na ekranach dotykowych automatów do odbierania paczek. Stwierdzono, że większa liczba bardziej zróżnicowanych mikroorganizmów pokrywa ekrany automatów znajdujących się na zewnątrz budynków, w porównaniu do tych umieszczonych w zamkniętych pomieszczeniach. To sugeruje, że otoczenie zewnętrzne może wpływać na obecność i rozmieszczenie mikroorganizmów.

Pobrany do badań materiał wykazywał duże zróżnicowanie mikrobiologiczne. Wśród uzyskanych izolatów stwierdzono obecność patogenów oportunistycznych o udowodnionym negatywnym wpływie na zdrowie człowieka, co potwierdza, że ekrany dotykowe automatów do odbierania paczek mogą przyczyniać się do rozprzestrzeniania chorób bakteryjnych wśród ludzi. Jednakże otrzymane wyniki powinny być poddane dalszej analizie w celu zaklasyfikowania badanych izolatów do konkretnych gatunków.

Powyższe badania pokazują rolę podnoszenia świadomości odnośnie higieny i dezynfekcji dłoni w celu ograniczania rozprzestrzeniania bakterii, w tym patogenów, pomiędzy ludźmi.

Podziękowania

Praca jest efektem badań przeprowadzonych w ramach projektu grantowego SGGW dla Kół Naukowych pt. „Ocena stopnia zróżnicowania bakterii znajdujących się na ekranach dotykowych automatów do odbierania paczek”, 2023.

Podziękowania dla dr Hanny Rekosz-Burlagi zaangażowanej w badania nad otrzymanymi izolatami.

Literatura

1. Al-Ghamdi A.K., Abdelmalek S.M.A., Ashshi A.M., Faidah H., Shukri H., Jiman-Fatani A.A., *Bacterial contamination of computer keyboards and mice, elevator buttons and shopping cards*, Afr. J. Microbiol. Res., 5, 2011, s. 3998-4003.
2. Ross I., Bick S., Ayieko P., Dreibelbis R., Wolf J., Freeman F.C., *Effectiveness of handwashing with soap for preventing acute respiratory infections in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis*, www.thelancet.com, 401(20), 2023, s. 1681-1690.
3. Koscova J., Hurnikova Z., Pisl J., *Degree of Bacterial Contamination of Mobile Phone and Computer Keyboard Surfaces and Efficacy of Disinfection with Chlorhexidine Digluconate and Triclosan to Its Reduction Int*, J. Environ. Res. Public Health, 15(10), 2018, s. 2238.
4. Martina P.F., Martinez M., Centeno C.K., Von Specht M., Ferreras J., *Dangerous passengers: Multidrug-resistant bacteria on hands and mobile phones*, J. Prev. Med. Hyg., 60(4), 2019, s. 293-299.
5. Duszczyk M., *Coraz więcej chętnych na paczki z automatów*, Rzeczpospolita, 2022.

- Shen L., Zang X., Sun K., Chen H., Che X., Sun Y., Wang G., Zhang S., Chen G., *Complete genome sequencing of Bacillus sp. TK-2, analysis of its cold evolution adaptability*, Sci Rep, 11, 2021, s. 4836.
- Fujioka R.S., Hashimoto H.H., Siwak E.B., Young R.H.F., *Effect of Sunlight on Survival of Indicator Bacteria in Seawater*, Applied and Environmental Microbiology, 41, 1981, s. 690-696.
- Schumann P., Busse H.J., *Arthrobacter: A Practical Guide*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 67.
- Meadow J.F., Altrichter A.E., Green J.L., *Mobile phones carry the personal microbiome of their owners*, PeerJ, 2, 2014, 2.
- Dolińska M., Berthold A., *Charakterystyka temperatury wzrostu Bacillus cereus pochodzących z różnych środowisk*, Medycyna Wet., 64 (8), 2008, s. 1016-1018.
- Mackiw E., Kowalska J., Stasiak M., Kucharek K., *Aktualne zagrożenia mikrobiologiczne bakterie z grupy Bacillus cereus*, 2019.
- Tagoe D.N., Gyande V.K., Ansah E.O., *Bacterial Contamination of Mobile Phones, When Your Mobile Phone Could Transmit More Than Just a Call*, 2011.
- Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E., *The Prokaryote*, Advances in Microbiology, 3, 2006, s. 988-1004.
- Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E., Thompson F., *The Prokaryotes: Actinobacteria*, 2014.
- Schumann P., Busse H.J., *Arthrobacter: A Practical Guide*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 67, 2009.
- Xiaoxue L., Dongmei Z., Xi Ch., Jinfeng Z., Huiwen H., Lihui W., *Isolation and characterization of Bacillus altitudinis JSCX-1 as a new potential biocontrol agent against Phytophthora sojae in soybean*, Plant and Soil, 2017.

Próba identyfikacji wybranych izolatów bakterii z ekranów dotykowych automatów do odbierania paczek

Streszczenie

Badania miały na celu określenie zróżnicowania bakterii znajdujących się na ekranach automatów do odbierania paczek, stanowiących zyskujący na popularności środek przekazywania przesyłek. Wybrano cztery miejsca w Warszawie, różniące się między sobą parametrami środowiskowymi, z których pobrano łącznie osiem prób, po dwie z każdej lokalizacji. Dokonano wstępnej identyfikacji wyhodowanych bakterii przy pomocy podstawowych technik mikrobiologicznych, biochemicznych i biologii molekularnej. Wszystkie zidentyfikowane gatunki należały do bakterii Gram+, a znaczną większość stanowił rodzaj *Bacillus*, którego niektóre gatunki są patogenne dla ludzi, co może stanowić potencjalne zagrożenie zdrowotne. Dalsze kroki prowadzonych badań skupią się na szczegółowych analizach dostarczających informacji o gatunkach, do których przynależą otrzymane izolaty oraz rozszerzeniu zakresu pobieranych prób.

Słowa kluczowe: *Bacillus*, bakteria, automat, 16S rRNA

An attempt to identify selected bacterial isolates from the touch screen of parcel pick-up machines

Abstract

The research was aimed at determining the diversity of bacteria found on the screens of parcel pick-up machines, which are an increasingly popular means of sending parcels. Four sites in Warsaw were selected, differing in environmental parameters, from which a total of eight samples were collected, two from each location. Initial identification of the cultured bacteria was made using basic microbiological, biochemical and molecular biology techniques. All identified strains belonged to Gram+ bacteria, and the vast majority were of the genus *Bacillus*, some species of which are pathogenic to humans, that may pose a potential health risk. Further steps of the conducted research will focus on detailed analysis providing information about the species to which the isolated strains belong and extending the range of samples taken.

Keywords: *Bacillus*, bacteria, parcel locker, 16S rRNA

Wprowadzenie do analizy genomów bakteryjnych: kontrola jakości, składanie i adnotacja funkcjonalna

1. Wprowadzenie

Proces sekwencjonowania DNA polega na poznaniu kodu genetycznego zapisanego w cząsteczce kwasu nukleinowego [1]. Wprowadzenie do rutynowego wykorzystanie technologii sekwencjonowanie Sangera, opracowanej przez Fredericka Sangera i jego zespół w latach 70., pozwoliło na pełniejsze poznanie molekularnych mechanizmów wielu zjawisk biologicznych. Sekwencjonowanie Sangera, w swojej aktualnej wersji, opiera się na tzw. metodzie terminacji łańcucha poprzez nukleotydy dideoksynukleotydowe (ddNTP) oznaczone fluorescencyjnie. Ich zastosowanie prowadzi do powstania fragmentów DNA o różnej długości, które następnie są analizowane z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej i detektora fluorescencji [2].

Sekwencjonowanie Sangera znalazło szerokie zastosowanie w wielu aspektach biologii molekularnej, jednak rozwój technologii masowego, równoległego sekwencjonowania następnej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*, NGS) stanowiło rewolucję w tej materii. Technologia NGS pozwala na równoległe sekwencjonowanie wielu fragmentów DNA, umożliwiając analizę wielu genów jednocześnie, a także całych genomów lub metagenomów. Sekwencjonowanie Sangera określa się dziś terminem sekwencjonowania I generacji, natomiast technologię NGS dzieli się na dwie generacje: generację II, opartą o odczyt krótkich fragmentów, tutaj szczególne zastosowanie znajdują kolejne wersje platformy Illumina; oraz generację III, opartą o odczyt długich fragmentów – technologia PacBio (Pacific Biosystem) oraz sekwencjonowanie nanoporowe [1, 3, 4].

Swoje zastosowanie technika NGS znalazła również w mikrobiologii, gdzie wykorzystywana jest jako narzędzie do badań podstawowych, diagnostycznych, epidemiologicznych oraz badań nad wirulencją. W przypadku badań epidemiologicznych, NGS pozwala na analizę pochodzenia i rozprzestrzeniania się patogenów. Poprzez sekwencjonowanie genomów mikroorganizmów, można ustalić związki filogenetyczne między różnymi izolatami, identyfikować klastry zakażeń oraz śledzić szlaki transmisji mikroorganizmów. Dzięki możliwości sekwencjonowania wielu próbek, NGS wykorzystywany

¹ dawid.gmitter@ujk.edu.pl, Zakład Mikrobiologii, Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, www.ujk.edu.pl.

² weronikabrudz@o2.pl, Studencie Koło Naukowe Biotechnologów Mikroby, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, <https://cnk.ujk.edu.pl/nauka/>.

³ olaomelaniuk@interia.pl, Studencie Koło Naukowe Biotechnologów Mikroby, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, <https://cnk.ujk.edu.pl/nauka/>.

⁴ annakowalik123@gmail.com, Studencie Koło Naukowe Biotechnologów Mikroby, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, <https://cnk.ujk.edu.pl/nauka/>.

⁵ julia.jurkiewicz22@gmail.com, Studencie Koło Naukowe Biotechnologów Mikroby, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, <https://cnk.ujk.edu.pl/nauka/>.

jest również w biotechnologii w celu poszukiwania genów kodujących białka o potencjale komercyjnym [5, 6].

Analiza danych NGS wymaga zastosowania narzędzi komputerowych. Dziedzina nauki zajmująca się gromadzeniem i analizą danych z sekwencjonowania oraz projektowaniem odpowiednich ku temu programów, określa się terminem „bioinformatyka”. Łączy ona w sobie aspekty biologii, statystyki, informatyki i matematyki, aby umożliwić interpretację ogromnych ilości danych sekwencjonowania DNA, RNA i białek [7].

Coraz łatwiejszy dostęp do sekwencji genomów bakteryjnych, pochodzących zarówno z badań własnych, jak i publicznych baz danych, sprawia, że kolejne grupy badawcze sięgają po te dane. Wzrasta również zainteresowanie tym problemem wśród studentów takich kierunków, jak biologia lub biotechnologia. Grupy te często posiadają duże doświadczenie z zakresu genetyki oraz genetyki drobnoustrojów, oraz w pewnym stopniu z bioinformatyki, natomiast często brakuje im wiedzy z zakresu zastosowania programów opartych o tekstowe komendy. Niewątpliwie pierwsze kroki w tej dziedzinie mogą być trudne.

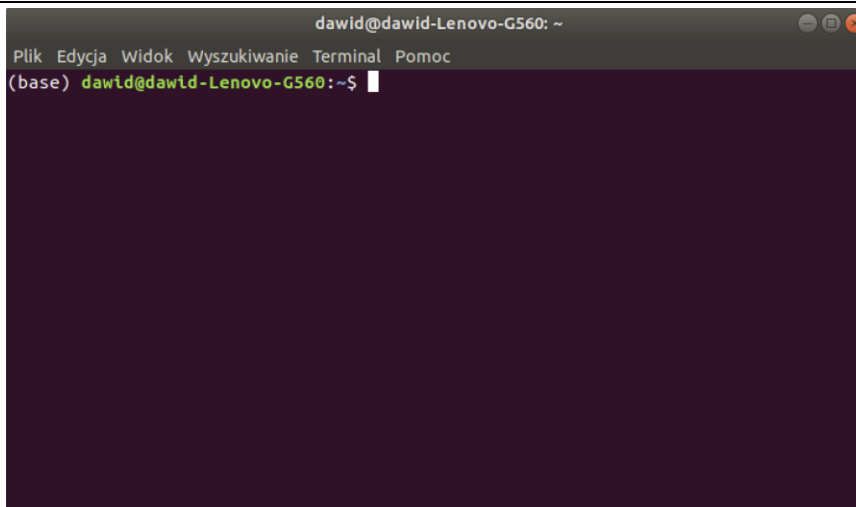
Celem pracy jest przedstawienie i omówienie podstawowych narzędzi bioinformatycznych, pozwalających na wstępną analizę sekwencji genomów bakteryjnych. Skupiono się na etapie oceny jakościowej surowych odczytów, procesie asemlacji *de novo* oraz adnotacji funkcjonalnej. W ramach pracy zaprezentowane zostaną kroki pozwalające na przygotowanie sekwencji pochodzących z sekwencjonowania metodą krótkich odczytów sparowanych (*paired reads*) otrzymanych z wykorzystaniem technologii Illumina, ponieważ technologia ta jest często wybierana w celu uzyskania sekwencji genomów bakteryjnych. Praca pozwoli osobom bez doświadczenia z zakresu bioinformatyki i/lub analizy genomów na rozpoczęcie badań z ich wykorzystaniem.

2. Przygotowanie środowiska pracy

Prezentowane w niniejszej pracy programy komputerowe oparte są o proste komendy tekstowe, wprowadzane poprzez Terminal (rys. 1). Programy są na licencji *open source* co oznacza, że są dostępne do pobrania bez opłat. Linki do stron internetowych omawianych programów przedstawiono w tabeli 1. Ich użytkowanie możliwe jest na komputerach z systemem operacyjnym Linux lub macOS. Użytkownikom komputerów osobistych z systemem Windows rekomendujemy wykorzystanie systemu operacyjnego Linux w dystrybucji Ubuntu. System ten może zostać w prosty sposób zainstalowany na dowolnym komputerze, zarówno jako główny system, jak i wspólnie z systemem Windows [8].

Tabela 1. Lista omawianych programów wraz z adresami stron dostępu. Dostęp: 09.06.2023

Program	Dostęp na platformie GitHub	Dostęp jako pakiet Conda
FASTQC	https://github.com/s-andrews/FastQC	https://anaconda.org/bioconda/fastqc
Trimmomatic	https://github.com/usadellab/Trimmomatic	https://anaconda.org/bioconda/trimmomatic
SPAdes	https://github.com/ablab/spades	https://anaconda.org/bioconda/spades
Prokka	https://github.com/tseemann/prokka	https://anaconda.org/bioconda/prokka
Pozostałe programy		
Mauve	https://darlinglab.org/mauve/mauve.html	
RAST	https://rast.nmpdr.org/	



Rysunek 1. Okno programu Terminal na przykładzie komputera z systemem operacyjnym Linux w dystrybucji Ubuntu

W przypadku pracy z systemem macOS, instalacja i użytkowanie programów odbywają się w sposób analogiczny do systemu Linux, również poprzez Terminal komputera.

W pierwszym kroku, w ramach przygotowania środowiska pracy z prezentowanymi programami, polecamy instalację środowiska Conda. Jest to system zarządzania pakietami typu *open source* i system zarządzania środowiskiem, który działa w systemach Windows, Linux i macOS. Conda szybko instaluje, uruchamia i aktualizuje pakiety oraz ich zależności (programy wspierające działanie programu docelowego). Zastosowanie Conda pozwala na uniknięcie problemów związanych z instalacją wielu programów bioinformatycznych (jak np. niezgodności wersji zależności), zapewniając jednocześnie stabilną pracę. Proces instalacji i optymalizacji Conda jest prosty i został przez nas wcześniej opisany [9].

Przygotowując się do pracy z programami opartymi o komendy tekstowe, należy zrozumieć sposób zapisu komend. Komendy, pozwalające na uruchomienie odpowiedniego programu oraz dostosowanie opcji, wymagają podania: 1) nazwy programu, co najczęściej jest informacją dla komputera, aby odwołał się do pliku zawierającego kod, w oparciu o który program działa; oraz 2) opcji (flagi), czyli sposobu zdefiniowania argumentów, w postaci danych wejściowych i wyjściowych, parametrów lub trybów pracy dla polecenia. Flaga prezentowana jest za pomocą znaku `-` oraz odpowiedniej litery (zwykle pierwsza litera słowa przypisanego jako opcja) i/lub znaków `--` oraz pełnej nazwy opcji.

Przykładem może być opcja **help** pozwalająca na dostęp do listy pozostałych opcji Conda: **conda -h** lub **conda --help**. Na poniższej rycinie przedstawiono pozostałe argumenty polecenia Conda.

```
positional arguments:
  command
  clean                Remove unused packages and caches.
  compare              Compare packages between conda environments.
  config               Modify configuration values in .condarc. This is modeled
                      after the git config command. Writes to the user .condarc
                      file (/home/dawid/.condarc) by default.
  create               Create a new conda environment from a list of specified
                      packages.
  info                 Display information about current conda install.
  init                 Initialize conda for shell interaction.
  install              Installs a list of packages into a specified conda
                      environment.
  list                 List linked packages in a conda environment.
  package              Low-level conda package utility. (EXPERIMENTAL)
  remove               Remove a list of packages from a specified conda environment.
  rename               Renames an existing environment
  run                  Run an executable in a conda environment.
  search               Search for packages and display associated information. The
                      input is a MatchSpec, a query language for conda packages.
                      See examples below.
  uninstall            Alias for conda remove.
  update               Updates conda packages to the latest compatible version.
  upgrade              Alias for conda update.
  notices              Retrieves latest channel notifications.
```

Rysunek 2. Opcje programu Conda

3. Analiza jakości surowych odczytów

Uzyskane w wyniku sekwencjonowania surowe odczyty dostępne są w postaci pliku zapisanego w formacie FASTQ. Plik taki zawiera cztery linie dla każdego odczytu:

1. Linia nagłówkowa (*header line*): zaczyna się od znaku „@” i zawiera unikalny identyfikator odczytu lub sekwencji. Może również zawierać dodatkowe informacje, takie jak numer lane'u (ścieżki), ID próbki itp.
2. Sekwencja (*sequence line*): linia zawierająca właściwą sekwencję DNA, zazwyczaj w formie litery jednoznacznie kodującej jeden z nukleotydów (A, T, C, G).
3. Linia „,+” (*separator line*): linia rozdzielająca sekwencję od linii jakości. Często zawiera informacje dodatkowe, ale jest to opcjonalne i nie jest używane przez niektóre oprogramowanie analizujące.
4. Jakość (*quality line*): linia reprezentująca jakość baz w odpowiadającej sekwencji. Składa się z zestawu znaków ASCII, gdzie każdy znak odpowiada jakości (*quality score*, Q) przypisanej do danej pozycji sekwencji [10]. Wartość Q mówi o tym, z jakim prawdopodobieństwem uzyskano poprawną sekwencję. Przykładowo, Q = 30 oznacza dokładność odczytu nukleotydu na poziomie 99,9%.

Wartość Q określa się na podstawie następującego wzoru:

$$Q = -10 \times \log_{10} P$$

Gdzie P oznacza prawdopodobieństwo błędu.

Przykład zapisu informacji w pliku FASTQ przedstawiono poniżej.

```
Nagłówek @ST-E00243:618:HYFC3CCXY:1:1101:18507:1977 1:N:0:ATTACTCG+ACGTCCTG
Sekwencja DNA GAGGGGAGAATAAGCGTAGCTTTTCTGTCTTCTGGAACGATTGTGAATGCCGGAAGATTGGTCAACT
Separator +
Jakość odczytu AAFF<AFFJ7A7FA<-F7FAJJAJ--F----7<-77<--<-F-<FJ<A----<FJ----<<FFJ----<7F---
```

Rysunek 3. Zapis sekwencji DNA w formacie FASTQ

Pierwszym krokiem po uzyskaniu surowych odczytów jest analiza ich jakości. Narzędziem polecanym w tym celu jest program FASTQC (Fast Quality Control). FASTQC jest programem *open source*. Istnieje możliwość instalacji programu jako pakietu Conda, poprzez jedną z poniższych komend:

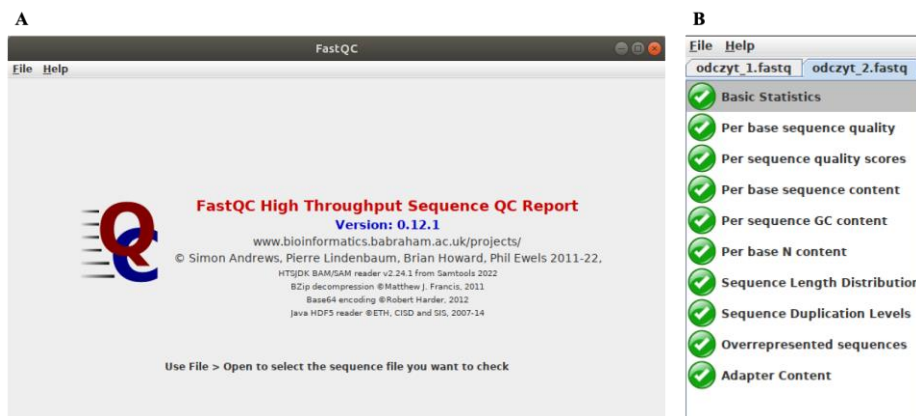
```
conda install -c bioconda fastqc
```

```
conda install -c "bioconda/label/broken" fastqc
```

```
conda install -c "bioconda/label/cf201901" fastqc
```

Program pozwala na ocenę jakościową surowych odczytów i wskazanie sekwencji niedoskonałych technicznie. Program generuje raporty w formacie HTML, które zawierają liczne wykresy, tabele i opisy wyników pozwalające użytkownikowi na ich interpretację.

Po zainstalowaniu programu FASTQC, jego uruchomienie polega na wpisaniu do Terminalu polecenia **fastqc**, które uruchomi dodatkowe okno programu. Okno to pozwala na wybranie za pomocą opcji File/Open plików zawierających sparowane odczyty. Po wybraniu plików pojawi się pasek postępu analizy, a po jej zakończeniu okno prezentujące wyniki (rys. 4).



Rysunek 4. Program FASTQC: (A) okno pozwalające na wybór plików z surowymi odczytami uruchomione za pomocą polecenia **fastqc**; (B) okno dostępu do wyników analizy

Program Trimmomatic stosowany jest w celu poprawienia jakości danych sekwencjonowania poprzez eliminację niskiej jakości odczytów, usunięcie adapterów i innych niepożądanych fragmentów [11]. Proces ten nazywamy trymowaniem (ang. *trimming*). Program Trimmomatic dostępny jest jako pakiet Conda, a jego instalacja opiera się na jednej z poniższych komend:

```
conda install -c bioconda trimmomatic
```

```
conda install -c "bioconda/label/broken" trimmomatic
```

```
conda install -c "bioconda/label/cf201901" trimmomatic
```

Wśród istotnych opcji Trimmomatic, wymaganych do stworzenia komendy, należy wymienić opcje: PE/SE, które wskazują, czy użytkownik pracuje z odczytami spar-

wanymi (PE) czy pojedynczymi (SE) oraz opcję -phred33/-phred64, która wskazuje na typ tabeli ASCII wykorzystany w pliku FASTQ. Dla najnowszych platform Illumina będzie to zwykle -phred33. Następnie należy wskazać lokalizację plików FASTQ oraz pliki wyjścia, w postaci plików zawierających odczyty, które „przetrzywały” proces trybowania (*paired*) oraz zawierający niesparowane odczyty (*unpaired*). W kolejnych krokach należy podać dodatkowo parametry procesu trybowania. Istotne jest wskazanie pliku zawierającego sekwencje adapterów (poprzez opcję ILLUMINACLIP), co pozwoli na ich usunięcie. Poniżej przedstawiono przykładową komendę programu Trimmomatic, działającego jako pakiet Conda:

```
trimmomatic PE -phred33 /ścieżka/dostępu/odczyt_1.fastq.gz  
/ścieżka/dostępu/odczyt_1.fastq.gz /ouput/trim_paired_odczyt_1.fastq.gz  
/ouput/trim_unpaired_odczyt_1.fastq.gz  
/ouput/trim_paired_odczyt_2.fastq.gz  
/ouput/trim_unpaired_odczyt_2.fastq.gz ILLUMINACLIP:adapter.fasta
```

4. Składanie (asemblacja) *de novo*

Plik w formacie FASTQ zawiera w sobie miliony odczytów o określonej dla danej technologii NGS długości, wraz z informacją o jakości każdego odczytu. Dlatego też w dalszym kroku należy przeprowadzić proces składania, inaczej asemblacji, odczytów do postaci genomu, najczęściej reprezentowanego w postaci tzw. kontigów (ang. *contig*) lub skafoldów (ang. *scaffold*). Kontigi oraz skafoldy to nieprzerwane sekwencje DNA składające się na genom. Programy wykonujące składanie genomów nazywane są asemblerami. Najczęściej wykorzystuje się proces asemblacji *de novo*, który nie wymaga sekwencji referencyjnej [3, 12].

We wczesnych latach rozwoju technologii składania genomów, programy dokonywały nakładania na siebie identycznych fragmentów (ang. *overlap*), w ten sposób uzyskując gotowe sekwencje. Aktualnie wykorzystuje się metodę, w której odczyty dzielone są na krótkie fragmenty zwane k-merami i tworzone są grafy de Bruijn’a [12, 13].

W niniejszej pracy skupiono się na zaprezentowaniu procesu składania genomu uzyskanego z wykorzystaniem NGS w technologii krótkich, sparowanych odczytów. Jednym z najczęściej wykorzystywanych asemblerów *de novo* jest program SPAdes [12, 14]. Program dostępny jest jako pakiet Conda, a instalacja programu odbywa się z wykorzystaniem jednej z poniższych komend:

```
conda install -c bioconda spades  
conda install -c "bioconda/label/cf201901" spades
```

Program SPAdes przygotowany został do składania małych genomów, takich jak genomy bakteryjne lub wirusowe, dlatego nie poleca się stosowanie programu w celu asemblacji genomów eukariotycznych. Program wykorzystuje algorytm oparty o k-mery oraz grafy de Bruijn’a. Użytkownik ma możliwość optymalizacji długości k-merów, co odbywa się poprzez flagę **-k**. Dobór długości k-merów zależy od pokrycia uzyskanych sekwencji. Pokrycie można w łatwy sposób określić na podstawie danych pochodzących z sekwenatora Illumina wykorzystując równanie Landera-Watermana [15]:

$$a=(NL)/G,$$

gdzie:

a – oznacza średnią głębokość pokrycia

N – liczbę odczytów

L – długość każdego odczytów

G – spodziewaną długość składanego genomu.

Wykorzystanie programu SPAdes polega na odwołaniu się poprzez Terminal komputera do pliku *spades.py*, znajdującego się w folderze *bin*. Odbywa się to poprzez komendę **spades.py**. W kolejnych etapach komendy możliwa jest optymalizacja długości k-merów oraz wymagane jest podanie ścieżki dostępu do plików FASTQ, w których zapisane są surowe odczyty. W trakcie procesu składania genomów poleca się również zastosowanie opcji **--careful**, która minimalizuje ilość błędów w kontigach. Lokalizację folderu, w którym zapisane zostaną złożony genom określa się za pomocą flagi **-o**, podając ścieżkę dostępu. Natomiast dostępu do plików FASTQ udziela się za pomocą flag **-1** oraz **-2**, w przypadku odczytów sparowanych. W wyniku procesu składania *de novo* wygenerowany zostanie plik multiFASTA (plik w formacie .fasta), zawierający uzyskane kontigi, który poddać można dalszym analizom. Przykładowa komenda dla programu SPAdes została przedstawiona poniżej:

```
spades.py -k 21,33,55,77,99,127 --careful -1
/ścieżka/dostępu/odczyt_1.fastq.gz -2 /ścieżka/dostępu/odczyt_2.fastq.gz -
o /ścieżka/dostępu/folder_wyniki
```

Co istotne, funkcje programu SPAdes nie ograniczają się jedynie do składanie sekwencji genomowych. Program umożliwia również m.in. analizę danych metagenomicznych, identyfikację plazmidów oraz składanie *de novo* odczytów pochodzących z sekwencjonowania RNA, RNA-Seq (rys. 5). Opcje te czynią program SPAdes uniwersalnym narzędziem bioinformatycznym.

```
Usage: spades.py [options] -o <output_dir>

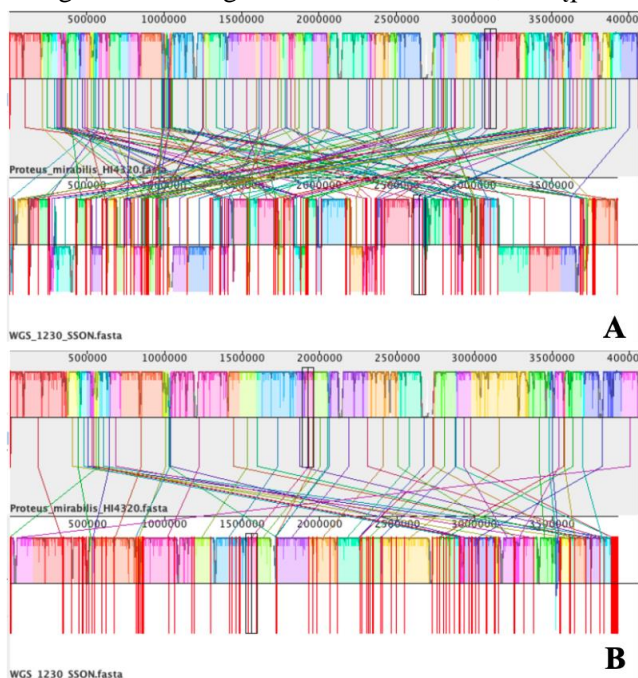
Basic options:
  -o <output_dir>          directory to store all the resulting files (required)
  --isolate                this flag is highly recommended for high-coverage isolate and multi-cell data
  --sc                    this flag is required for MDA (single-cell) data
  --meta                   this flag is required for metagenomic sample data
  --bio                    this flag is required for biosyntheticSPAdes mode
  --rna                    this flag is required for RNA-Seq data
  --plasmid                runs plasmidSPAdes pipeline for plasmid detection
  --iontorrent             this flag is required for IonTorrent data
  --test                   runs SPAdes on toy dataset
  -h, --help               prints this usage message
  -v, --version            prints version
```

Rysunek 5. Opcje programu SPAdes

5. Organizacja kontigów

W wielu przypadkach przed przystąpieniem do dalszych analiz porównawczych uzyskanych genomów, warto dokonać reorganizacji kontigów uzyskanych w procesie asemblacji *de novo*. Proces ten pozwala na organizację kolejności kontigów względem referencyjnej sekwencji kompletnego genomu. Pozwala to na uzyskanie dokładniejszych wyników kolejnych analiz. W celu reorganizacji kontigów polecane jest wykorzystanie opcji Muve Contig Mover (MCM) [16], zaimplementowanej w program Mauve [17]. Rysunek 6 prezentuje porównanie organizacji kontigów względem sekwencji referen-

cyjnej przed (A) oraz po (B) przeprowadzeniu procesu reorganizacji. Pionowe, krzyżujące się, linie wskazują na odmienną lokalizację fragmentów genomu. Program Mauve pozwala również na porównanie struktury genomów, co umożliwi wnioskowanie na temat zróżnicowania badanych genomów [18]. Dla programu Mauve, w przeciwieństwie do wyżej wymienionych, przygotowano interfejs graficzny, więc jego zastosowanie nie wymaga komend tekstowych. Program dostępny jest do instalacji na komputerach z systemem Windows, Linux i macOS. Instalacja i użytkowanie programu Mauve są bardzo proste i intuicyjne. Szczegółowa instrukcja została zaprezentowana na stronie internetowej, z której możliwe jest również pobranie plików instalacyjnych (<https://darlinglab.org/mauve/user-guide/introduction.html>, dostęp: 09.06.2023 r.).



Rysunek 6. Porównanie struktury genomu *Proteus mirabilis* 1230_SSON względem genomu referencyjnego *P. mirabilis* HI4320 przed (A) oraz po (B) przeprowadzeniu procesu reorganizacji. Widoczne linie łączą homologiczne fragmenty genomów, które oznaczone są dodatkowo kolorami. Sekwencje dostępne są w bazach danych NCBI (HI4320: NC_010554 oraz 1230_SSON: NZ_JVXV01000000)

6. Adnotacja funkcjonalna

Po uzyskaniu złożonej sekwencji genomu, kolejnym krokiem jest jego adnotacja funkcjonalna. Termin ten oznacza identyfikację regionów kodujących białka, jak również innych funkcjonalnych elementów genomu (np. sekwencji tRNA), oraz przypisanie im funkcji [3]. W niniejszej pracy przedstawimy dwa narzędzia pozwalające na adnotację genomów bakteryjnych, z czego jedno z nich to narzędzia dostępne *on-line*. Pozwoli to na pełniejsze poznanie badanego genomu.

Pierwszym z prezentowanych programów jest oparty o komendy tekstowe program Prokka [19]. Jest to kolejne narzędzie *open source*, dostępne również jako pakiet Conda. Instalacja Prokka odbywa się poprzez jedną z poniższych komend:


```
conda install -c bioconda prokka
```

```
conda install -c "bioconda/label/cf201901" prokka
```

Program Prokka opiera adnotację o inne narzędzie, takie jak Prodigal, RNAmmaer, Aragom, SignalP oraz Infernal. Twórcy programu przewidują, że jako pliki wejścia wykorzystane będą w większości przypadków sekwencje genomowe w postaci kontigów lub skafoldów. Co ważne, narzędzie Prokka oferuje liczne opcje optymalizacji procesu, min. użytkownik ma możliwość zdefiniowania informacji taksonomicznych adnotowanego genomu, doprecyzowanie kodu genetycznego, a także wyłączenie części z funkcji (np. wyłączenie adnotacji rRNA lub tRNA) (rys. 7) [19].

```
Name:
  Prokka 1.14.6 by Torsten Seemann <torsten.seemann@gmail.com>
Synopsis:
  rapid bacterial genome annotation
Usage:
  prokka [options] <contigs.fasta>
General:
  --help           This help
  --version       Print version and exit
  --citation      Print citation for referencing Prokka
  --quiet        No screen output (default OFF)
  --debug        Debug mode: keep all temporary files (default OFF)
Setup:
  --dbdir [X]    Prokka database root folders (default '/home/dawid/mintconda3/db')
  --listdb      List all configured databases
  --setupdb     Index all installed databases
  --cleandb    Remove all database indices
  --depends     List all software dependencies
Outputs:
  --outdir [X]  Output folder [auto] (default '')
  --force      Force overwriting existing output folder (default OFF)
  --prefix [X] Filename output prefix [auto] (default '')
  --addgenes   Add 'gene' features for each 'CDS' feature (default OFF)
  --addmrna   Add 'mRNA' features for each 'CDS' feature (default OFF)
  --locustag [X] Locus tag prefix [auto] (default '')
  --increment [N] Locus tag counter increment (default '1')
  --gffver [N]  GFF version (default '3')
  --compliant Force Genbank/ENA/DDJB compliance: --addgenes --mincontiglen 200 --centre XXX (default OFF)
  --centre [X] Sequencing centre ID. (default '')
  --accver [N] Version to put in Genbank file (default '1')
Organism details:
  --genus [X]  Genus name (default 'Genus')
  --species [X] Species name (default 'species')
  --strain [X] Strain name (default 'strain')
  --plasmid [X] Plasmid name or identifier (default '')
```

Rysunek 7. Część opcji programu Prokka dostępne po uruchomieniu opcji **help**

Uruchomienie procesu adnotacji polega na przygotowaniu komendy rozpoczynającej się od polecenia **prokka**. Następnie możliwe jest podanie szeregu opcji, o których wspomniano powyżej. Obligatoryjne jest natomiast podanie ścieżki dostępu do adnotowanej sekwencji, a także do folderu, w którym zapisane zostaną pliki wyjścia. Ścieżka dostępu do pliki z sekwencją nie wymaga flagi, natomiast aby wskazać folder, w którym zebrane zostaną wyniki stosuje się flagę **--outdir**. Poniżej przedstawiono przykładową komendę, dla sekwencji bakterii *Echerichia coli* szczep X:

```
prokka --kingdom Bacteria --gcode 11 --genus Echerichia --species coli --
strain X ścieżka/dostępu/E_coli_X.fasta
```

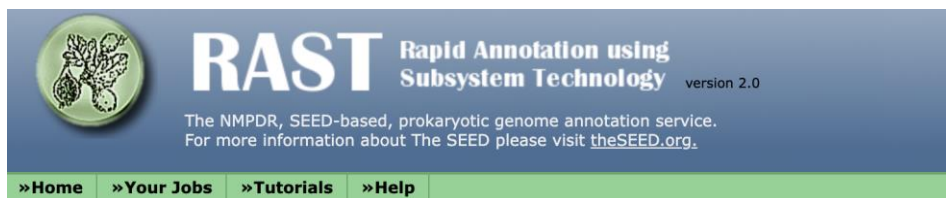
Zaletą stosowania programu Prokka jest duża liczba plików wyjścia generowanych podczas analizy, co pozwala na ich szerokie zastosowanie. Przykładowo pliki w formacie GFF3 generowane przez program Prokka mogą być wykorzystane w celu analizy pan-genomu bakteryjnego [9].

W celu rozszerzenia procesu adnotacji za pomocą Prokka polecamy wykorzystanie programu *on-line* RAST (**Rapid Annotations using Subsystems Technology**) [20]. Istotną zaletą programu RAST jest fakt, że zidentyfikowane geny są następnie grupowane w podsystemy, czyli zespoły genów o podobnych funkcjach. Po zakończeniu procesu adnotacji, generowany jest wykres kołowy prezentujący procentowy udział podsystemów w ramach adnotowanych genów. W wielu publikacjach uzyskany wykres prezentowany

jest w celu podstawowej charakteryzacji i porównania sekwencji. Dodatkowo użytkownik ma możliwość kategoryzowania wyników zebranych w interaktywnej tabeli podsystemów, co pozwala na skupieniu się na konkretnych funkcjach analizowanego genomu. Tabela oferuje również, poprzez załączone hiperłącza, dostęp do bazy danych zawierającej szczegóły dotyczące funkcji białek.

Użytkownik uzyskuje również dostęp m.in. do szeregu narzędzi pozwalających na analizę porównawczą genomów oraz konkretnych regionów genomów (wraz z wizualizacją), opcję wyszukiwania sekwencji nukleotydowych oraz aminokwasowych za pomocą algorytmu BLAST i wiele więcej. Dodatkowo RAST pozwala na przedstawienie podstawowej charakterystyki analizowanych sekwencji (np. wielkość genomu, procent par zasad CG). Warto wspomnieć, że dzięki analizie RAST użytkownik ma dostęp do dwóch statystyk, N50 oraz L50, które są wykorzystywane w celu określenia jakości procesu składania genomów *de novo*.

Wybór sekwencji w celu adnotacji odbywa się poprzez funkcję Your Jobs/Upload New Job (rys. 8.). Po jej wyborze użytkownik przeniesiony zostanie do nowej karty, gdzie uzyska możliwość wgrania sekwencji.



Rysunek 8. Pasek funkcji programu RAST

W następnej kolejności możliwe będzie podanie informacji taksonomicznych dotyczących analizowanego genomu oraz optymalizacja procesu adnotacji. Polecamy stosowanie opcji Classic RAST w wersji FIGfam Release70 (rys. 9). Czas oczekiwania na zakończenie procesu adnotacji zależy od globalnego obciążenia serwerów RAST.

Please consider the following options for the RAST annotation pipeline:

RAST Annotation Settings:	
Choose RAST annotation scheme	<input type="radio"/> Classic RAST
Select gene caller	<input type="radio"/> RAST
Select FIGfam version for this run	<input type="radio"/> Release70
Automatically fix errors?	<input checked="" type="checkbox"/> Yes
Fix frameshifts?	<input type="checkbox"/> Yes
Build metabolic model?	<input type="checkbox"/> Yes
Backfill gaps?	<input checked="" type="checkbox"/> Yes
Turn on debug?	<input type="checkbox"/> Yes
Set verbose level	<input type="text" value="0"/>
Disable replication	<input type="checkbox"/> Yes
<input type="button" value="Finish the upload"/>	

Choose "RASTik" for the current modular customizable production RAST pipeline, or "Classic RAST" for the old pipeline.

Please select which type of gene calling you would like RAST to perform. Note that using GLIMMER-3 will disable automatic error fixing, frameshift correction and the backfilling of gaps.

Choose the version of FIGfams to be used to process this genome.

The automatic annotation process may run into problems, such as gene candidates overlapping RNAs, or genes embedded inside other genes. To automatically resolve these problems (even if that requires deleting some gene candidates), please check this box.

If you wish for the pipeline to fix frameshifts, check this option. Otherwise frameshifts will not be corrected.

If you wish RAST to build a metabolic model for this genome, check this option.

If you wish for the pipeline to blast large gaps for missing genes, check this option.

If you wish debug statements to be printed for this job, check this box.

Set this to the verbosity level of choice for error messages.

Even if this job is identical to a previous job, run it from scratch.

Rysunek 9. Okno pozwalające na optymalizację procesu adnotacji funkcjonalnej RAST

7. Podsumowanie

Analiza danych pochodzących z sekwencjonowania genomów bakteryjnych wymaga znajomości wielu narzędzi bioinformatycznych opartych o komendy tekstowe. Z tego względu osoby nieposiadające wcześniejszego doświadczenia w tej dziedzinie mogą napotkać trudności w opanowaniu tych narzędzi. W niniejszej pracy zaprezentowane zostały instrukcje pozwalające na przygotowanie, instalację i wykorzystanie programów wykorzystywanych w procesie oceny jakości, składania i adnotacji funkcjonalnej genomów bakteryjnych, na przykładzie wybranych programów, które są często wykorzysty-

wane w tego typu analizach. Przedstawione zostały przykładowe komendy wymagane do przeprowadzenia analiz oraz wyjaśniono w jaki sposób zostały one stworzone. Warto zaznaczyć, że pula dostępnych programów nie ogranicza się do wymienionych. Wierzymy jednak, że niniejszy przegląd ułatwi rozpoczęcie pracy z sekwencjami genomów bakteryjnych oraz pozwoli na szybsze opanowanie kolejnych narzędzi.

Podziękowania

Praca powstała w ramach realizacji projektu Narodowego Centrum Nauki: 2019/33/N/NZ6/02406 (D.G.).

Literatura

1. Hodkinson B.P., Grice E.A., *Next-Generation Sequencing: A Review of Technologies and Tools for Wound Microbiome Research*, *Advances in wound care* (New Rochelle), 4, 2015, s. 50-58.
2. Heather J.M., Chain B., *The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA*, *Genomics*, 107, 2016, s. 1-8.
3. Edwards D.J., Holt K.E., *Beginner's guide to comparative bacterial genome analysis using next-generation sequence data*, *Microbial Informatics and Experimentation*, 3:2, 2013, s. 1-9.
4. Buermans H.P.J., den Dunnen J.T., *Next generation sequencing technology: Advances and applications*, *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease*, 1842, 2014, s. 1932-1941.
5. Deurenberg R.H., Bathoorn E., Chlebowicz M.A., Couto N., Ferdous M., Carcia-Cobos S., Kooistra-Smid A.M.D., Raangs E.C., Rosema S., Veloo A.C.M., Zhou K., Friedrich A.W., Rossesn J.W.A., *Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention*, *Journal of Biotechnology*, 243, 2017, s. 16-24.
6. Kobras C.M., Fenton A.K., Sheppard S.K., *Next-generation microbiology: from comparative genomics to gene function*, *Genome Biology*, 22, 2021, s. 1-16.
7. Luscombe N.M., Greenbaum D., Gerstein M., *What is bioinformatics? An introduction and overview*, *Yearbook of Medical Informatics*, 1, 2001, s. 83-99.
8. Lloyd J.P.B., *Ubuntu on Windows for computational biology*, protocols.io, 2018, <https://doi.org/dx.doi.org/10.17504/protocols.io.sfuebnw>.
9. Gmiter D., Nawrot S., Pacak I., Zegadło K., Kaca W., *Towards a better understanding of the bacterial pan-genome*, *Acta Universitatis Lodzianensis Folia Biologica et Oecologica*, 17, 2021, s. 84-96.
10. Cock P.J.A., Fields C.J., Goto N., Heuer M.L., Rice P.M., *The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants*, *Nucleic Acids Research*, 38, 2009, s. 1767-1771.
11. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B., *Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data*, *Bioinformatics*, 30, 2014, s. 2114-2120.
12. Segerman B., *The Most Frequently Used Sequencing Technologies and Assembly Methods in Different Time Segments of the Bacterial Surveillance and RefSeq Genome Databases*, *Frontiers in Cellular Infections and Microbiology*, 10, 2020, s. 1-7.
13. Compeau P.E.C., Tesler G., Pevzner P.A., *How to apply de Bruijn graphs to genome assembly*, *Nature Biotechnology*, 9, 2011, s. 987-991.
14. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A., *SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing*, *Journal of Computational Biology*, 19, 2012, s. 455-477.

15. Wendl M.C, Barbazuk W.B., *Extension of Lander-Waterman theory for sequencing filtered DNA libraries*, BMC Bioinformatics, 6, 2005, s. 1-12.
16. Rissman A.I., Mau B., Biehl B.S., Darling A.E., Glasner J.D., Pern N.T., *Reordering contigs of draft genomes using the Mauve Aligner*, Bioinformatics, 25, 2009, s. 2071-2073.
17. Darling A.C.E., Mau B., Blattner F.R., Perna N.T., *Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence with Rearrangements*, Genome Research, 14, 2004, s. 1394-1403.
18. Darling A.E., Mau B., Perna N.T., *ProgressiveMauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss, and rearrangement*, PLoS One, 5, 2010, s. 1-17.
19. Seemann T., *Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation*, Bioinformatics, 30, 2014, s. 2068-2069.
20. Aziz R.K., Bartels D., Best A., DeJongh M., Disz T., Edwards R.A., Formsma K., Gerdes S., Blass E.M., Kubal M., Meyer F., Olsen G.J., Olson R., Osterman A.L., Overbeek R.A., KcNeil L.K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch G.D., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O., *The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology*, BMC Genomics, 9, 2008, s. 1-15.

Wprowadzenie do analizy genomów bakteryjnych: kontrola jakości, składanie i adnotacja funkcjonalna

Streszczenie

Sekwencjonowanie następnej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*, NGS) stało się narzędziem powszechnie stosowanym w mikrobiologii. Analiza sekwencji genomów bakteryjnych pozwala na zrozumienie ich zmienności i ewolucji, a także molekularnych mechanizmów wirulencji i lekooporności. Z tego też względu NGS wykorzystywane może być zarówno w badaniach naukowych, jak i diagnostyce medycznej. Prowadzi to do wzrostu zainteresowania NGS w wielu laboratoriach mikrobiologicznych oraz wśród studentów takich kierunków jak biologia i biotechnologia. Analiza danych NGS wymaga doświadczenia bioinformatycznego, w szczególności znajomości programów opartych o komendy tekstowe. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie i omówienie podstawowych narzędzi bioinformatycznych pozwalających na wstępną analizę sekwencji genomów bakteryjnych. Przedstawione zostały instrukcje pozwalające na instalację omawianych programów oraz ich wykorzystanie (sposób przygotowania komend tekstowych). Skupiono się na procesie analizy jakości surowych odczytów NGS, procesie składania genomów oraz ich adnotacji funkcjonalnej. Wierzmy, że niniejszy przegląd ułatwi rozpoczęcie pracy z sekwencjami genomów bakteryjnych.

Słowa kluczowe: sekwencjonowanie następnej generacji, analiza jakości, składanie genomów, adnotacja funkcjonalna, genomy bakteryjne

Introduction to bacterial genome analysis: quality control, assembly, and functional annotation

Abstract

Next Generation Sequencing (NGS) has become a tool widely used in microbiology. Analysis of bacterial genome sequences allows understanding their variability and evolution, as well as the molecular mechanisms of virulence and drug resistance. Therefore, NGS can be used in both scientific research and medical diagnostics. This is leading to increased interest in NGS in many microbiology laboratories and among students in fields such as biology and biotechnology. Analyzing NGS data requires bioinformatics experience, particularly familiarity with text command-based programs. The purpose of this paper is to present and discuss basic bioinformatics tools that allow preliminary analysis of bacterial genome sequences. Instructions for installing the discussed programs and their use (how to prepare text commands) are presented. The focus is on the process of analyzing the quality of raw NGS reads, the process of assembling genomes and their functional annotation. We believe that this review will make it easier to start working with bacterial genome sequences.

Keywords: next generation sequencing, quality control, genome assembly, functional annotation, bacterial genomes

Indeks Autorów

Andrzejczak-Grządko S.	158	Miśkiewicz K.	111
Asztemborska M.	135	Nowicka J.	27
Banasiewicz J.	188	Omelaniuk A.	151, 200
Banaszczyk A.	27	Pajączkowska M.	27
Bielawski K.P.	19	Pietrzak M.	128
Bigus E.	158	Piórkowska K.	81
Brudz W.	151, 200	Platek A.M.	168
Czarnecka-Skwarek A.	90	Prochoń K.	128
Czoska P.	19	Rosłonowska N.	176
Fidecka O.	188	Rożek A.	90
Gendaszewska D.	111	Rybicka M.	19
Głońska R.	19	Rył B.	7
Gmiter D.	200	Rząd-Kosidło S.	41
Gniazdo D.	151	Sasal W.	151
Gos M.	188	Tetfejer K.	90
Gumowska A.	188	Wernecki M.	59
Guz-Regner K.	59, 100	Wieczorek D.	111
Jankowska D.	188	Wiench R.	27
Jurkiewicz J.	200	Wilk M.	176
Kowalik A.	200	Witarski W.	81
Kryniecka N.	100	Wrońska N.	128
Kuropka P.	27	Zadworna R.	158
Lindecka J.	158	Zygmunt K.	81
Lisowska A.	128		