

ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ BAKTERII Z RODZAJU *LACTOBACILLUS* POCHODZĄCYCH Z ŻYWNOŚCI, JAKO KRYTERIUM STAWIANE PROBIOTYKOM

Anna Rzepkowska, Dorota Zielińska, Danuta Kołożyn-Krajewska
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. Powszechne i niewłaściwe stosowanie antybiotyków wśród ludzi i zwierząt oraz niestosowanie okresów karencji spowodowało zwiększenie liczby mikroorganizmów patogennych opornych na działanie leków. Mimo że bakterie mlekowe posiadają status GRAS, a proces fermentacji jest znany i stosowany od setek lat, pojawiły się doniesienia, że LAB mogą być rezerwuarem genów antybiotykooporności i są w stanie przenosić je na patogeny. Szczepy potencjalnie probiotyczne obligatoryjnie muszą zostać przebadane pod kątem mechanizmów antybiotykooporności. Wśród lekooporności wyróżnia się oporność wrodzoną oraz nabytą, przy czym ryzyko wiąże się z możliwością transferu oporności do innych mikroorganizmów. Największą łatwością transferu u *Lactobacillus* cechują się geny oporności na tetracyklinę, chloramfenikol i erytromycynę. Znamienne jest to, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* są w stanie wytworzyć więcej niż jeden mechanizm oporności na antybiotyki. Ocena bezpieczeństwa staje się zatem istotnym kryterium w badaniach szczepów o cechach probiotycznych z punktu widzenia zastosowania jako kultur startowych w żywności.

Słowa kluczowe: antybiotykooporność, bakterie fermentacji mlekowej, bezpieczeństwo, *Lactobacillus*, probiotyki

WSTĘP

Ponad 50 lat temu antybiotyki zostały wprowadzone do leczenia infekcji bakteryjnych. Od tego czasu w sposób drastyczny narasta antybiotykooporność wśród patogennych bakterii, co stanowi obecnie problem światowy. Powodem tego stanu jest powszechne i niewłaściwe stosowanie antybiotyków wśród ludzi i zwierząt oraz nieprzestrzeganie

Adres do korespondencji – Corresponding author: Anna Rzepkowska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa, e-mail: anna_rzepkowska@sggw.pl

okresów karencji [Rodak 2011, WHO 2014]. Leki są od wielu lat stosowane w zwalczaniu chorób zakaźnych ludzi i zwierząt. Występowanie i rozpowszechnianie się oporności antybiotykowej jest efektem działania powiązanych ze sobą wielu czynników, w tym działań ludzkich. Uważa się, że łańcuch żywnościowy stanowi jedną z dróg transmisji antybiotykooporności od zwierząt do człowieka [Ammor i in. 2008, Truszczyński i Pejsak 2013]. Przed erą antybiotykową oporność na antybiotyki występowała rzadko [Hughes i Datta 1983], z kolei krótko po wprowadzeniu nowego związku przeciwbakteryjnego obserwowano pojawianie się zwiększonej oporności bakteryjnej na te związki [WHO 2014].

Ogromną rolę w szerzeniu się antybiotykooporności odgrywa wspomniane już powszechne stosowanie antybiotyków wśród zwierząt oraz ich pozostałości, które zanieczyszczają produkty pochodzenia zwierzęcego, takie jak: mięso, mleko, ryby i jaja. Antybiotykooporne szczepy izoluje się także z pasz dla zwierząt oraz ich odchodów. W konsekwencji notuje się obniżenie efektywności antybiotykoterapii. Naukowcy obawiają się, że w przyszłości drobnoustroje patogenne mogą uodpornić się na wszystkie znane antybiotyki [Mathur i Singh 2005]. Mathara i inni [2008] zauważyli, że w krajach, gdzie antybiotykoterapia zwierząt nie jest tak powszechnie stosowana (np. w Kenii), izolowane z tradycyjnego fermentowanego mleka Maasai szczepy nie wykazywały obecności genów oporności nabytej na antybiotyki mogących przenosić się na patogeny.

Szacuje się, że około 1/4 całej produkcji żywności polega na procesach fermentacyjnych z udziałem LAB [FAO/WHO 2001]. W ostatnich latach naukowcy donoszą o tym, że bakterie stosowane jako kultury startowe w produkcji żywności mogą posiadać geny oporności na antybiotyki [Hummel 2007], co więcej, mogą stanowić swoiste rezerwuary genów i przekazywać je bakteriom chorobotwórczym [Schjørring i Krogfelt 2011]. Coraz większy problem stanowią gram-dodatnie bakterie, a wśród nich szczepy z rodzaju *Lactobacillus*, odporne na działanie antybiotyków. Wiedza na temat antybiotykooporności LAB jest wciąż ograniczona, prawdopodobnie z powodu dużej liczby gatunków bakterii występujących w tej grupie, a także różnic w rodzajach ich oporności. Celem opracowania jest przegląd i analiza badań nad antybiotykoopornością szczepów bakterii kwasu mlekowego, izolowanych z żywności, oraz mechanizmami przenoszenia i rozpowszechniania oporności w środowisku.

BAKTERIE FERMENTACJI MLEKOWEJ

Bakterie fermentacji mlekowej to grupa mikroorganizmów prowadzących fermentację beztlenową, której głównym produktem jest kwas mlekowy. Cechą tych bakterii jest zróżnicowanie morfologiczne i niejednorodność. Zgodnie z Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [2009], drobnoustroje mlekowe są usystematyzowane w rzędzie *Lactobacillales*, a wśród rodzajów wyróżnia się *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* i inne. Niektórzy naukowcy do LAB zaliczają również *Bifidobacterium*, lecz są one filogenetycznie odległe od bakterii fermentacji mlekowej.

Bakterie kwasu mlekowego LAB (ang. lactic acid bacteria) mają długą historię bezpiecznego stosowania. Żywność zawierająca LAB, w tym różne gatunki *Lactobacillus*

i *Lactococcus*, była i jest spożywana codziennie, ponieważ fermentacja to jedna z najstarszych metod utrwalania żywności. Również szczepy probiotyczne należące do „grupy *Lactobacillus acidophilus*” są bezpiecznie stosowane od ponad 80 lat [Salminen i in. 1998]. Jednak jak podają eksperci FAO/WHO [2002], zanim szczep zostanie zastosowany w technologii produkcji żywności należy ocenić bezpieczeństwo jego stosowania. LAB występują naturalnie na roślinach, błonach śluzowych człowieka i zwierząt oraz zasiedlają ich przewód pokarmowy. Można je również znaleźć w mleku i fermentowanych produktach mlecznych, owocowo-warzywnych, napojach alkoholowych, pieczywie, mięsie, wędlinach oraz w żywności i preparatach probiotycznych [Libudzisz 2008, Sokołowska i in. 2011].

LAB to nieruchliwe, nieurzęsione pałeczki, laseczki i ziarniaki, zróżnicowane wielkością komórek, o dodatnim barwieniu Grama, względnie beztlenowce, niewytwarzające przetrwalników, katalazo-ujemne. Wielkość genomu bakterii mlekowych wynosi od 1,8 do 3,3 Mbp. W jego skład wchodzi nie więcej niż 56% par guaninacytozyna. Geny zawarte w małym genomie odzwierciedlają ich przystosowanie do bogatego w składniki odżywcze środowiska przez szeroki wachlarz genów transporterów, które są potrzebne do efektywnego pobierania węgla i azotu. Potrafią syntetyzować dysmutazę ponadtlenkową, która usuwa reaktywne formy tlenu. Nie zawierają enzymów cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego, a energię uzyskują na drodze fosforylacji substratowej. Wszystkie gatunki bakterii mlekowych charakteryzują się dużymi wymaganiami pokarmowymi. Nie są zdolne do syntezy wielu metabolitów, co jest spowodowane przystosowaniem do wzrostu w mleku lub w środowisku bogatym w substancje odżywcze i czynniki wzrostowe. Ze względu na duże zapotrzebowania pokarmowe najczęściej znajduje się je w środowiskach bogatych w węglowodany, aminokwasy i pochodne nukleotydów, jednak potrafią przystosować się do trudnych warunków środowiskowych, np. poprzez regulację wewnątrzkomórkowego pH [Axelsson 2004, Gajewska i Błaszczuk 2012].

Fermentacja mlekowa jest procesem przemiany węglowodanów do metabolitów, wśród których dominuje kwas mlekowy. Bakterie mlekowe produkują, zależnie od gatunku, od 0,6 do 3% kwasu mlekowego. Ze względu na szlaki przemian cukrów, klasyfikuje się je jako homofermentatywne lub heterofermentatywne. Poza kwasem mlekowym, innymi produktami końcowymi fermentacji mogą być: kwas octowy, aldehyd octowy, dwutlenek węgla, etanol oraz diacetyl. Fermentacja mlekowa, w zależności od gatunku, zachodzi w temperaturze od 26 do 42°C, przy optimum dla rodzaju *Lactobacillus* w granicach 35–37°C [Libudzisz 2008].

Pałeczki mlekowe z rodzaju *Lactobacillus* należą do najliczniejszych i najbardziej zróżnicowanych gatunkowo bakterii kwasu mlekowego. Występują w środowiskach o małym stężeniu tlenu i bogatym składzie chemicznym, gdzie łatwo zachodzą procesy fermentacji. Są zdolne do wytwarzania aktywnych substancji, np. H₂O₂, lantibiotyków, bakteriocyn, które działają hamująco na wzrostu wielu mikroorganizmów chorobotwórczych [Strus 2006]. Dobrze tolerują środowisko kwaśne, gdyż potrafią regulować wewnątrzkomórkowe pH. Niektóre szczepy *Lactobacillus* wykazują właściwości probiotyczne i odgrywają ogromną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu przewodu pokarmowego człowieka. Zainteresowanie bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* rośnie głównie z powodów biotechnologicznych i medycznych, czego wyrazem są poszukiwania nowych szczepów.

Doskonałym naturalnym źródłem bakterii kwasu mlekowego, a szczególnie pałeczek z rodzaju *Lactobacillus* jest żywność fermentowana. Liczne badania mikroflory przewodu pokarmowego dorosłego człowieka wskazują, że bakterie pochodzące z żywności spontanicznie fermentowanej mogą zasiedlać jelito grube, a co za tym idzie odgrywać istotną rolę w jego prawidłowym funkcjonowaniu. Dlatego obecnie, oprócz izolacji pałeczek mlekowych z przewodu pokarmowego ludzi, mikroorganizmów probiotycznych poszukuje się wśród mikroflory naturalnie fermentowanych produktów roślinnych i zwierzęcych.

WYMAGANIA STAWIANE BAKTERIOM PROBIOTYCZNYM

Zgodnie z definicją FAO/WHO [2002], probiotyki to „żywe drobnoustroje, które podane w odpowiedniej liczbie wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza”. W 2002 roku Grupa Ekspertów FAO/WHO opracowała przewodnik pt. „Probiotyki w żywności. Właściwości zdrowotne i żywieniowe oraz wytyczne do ich oceny” [2002], zgodnie z którym po identyfikacji za pomocą metod fenotypowych i genotypowych (z wykorzystaniem nowoczesnych technik biologii molekularnej) oraz po charakterystyce funkcjonalności, należy dokonać oceny bezpieczeństwa badanych szczepów. Cechy probiotyczne są szeregowane.

Bakterie kwasu mlekowego posiadają status GRAS (ang. Generally Recognized as Safe), co określa je jako „ogólnie uznane za bezpieczne”. Jednak, mimo że technologia fermentacji mlekowej, znana i powszechna jest już od czasów starożytnych, istnieje obawa co do bezpieczeństwa szczepów, które mogą wykazywać antybiotykooporność lub inne oportunistyczne właściwości dotyczące zjadliwości oraz produkować szkodliwe dla zdrowia człowieka metabolity. W związku z tym FAO/WHO [2002] zaleca przeprowadzenie testów bezpieczeństwa u bakterii potencjalnie probiotycznych stosowanych w żywności: (1) określenie schematów oporności antybiotykowej, (2) określenie wybranych procesów metabolicznych, (3) ocena działań niepożądanych podczas badań klinicznych, (4) nadzór epidemiologiczny nad zdarzeniami niepożądanymi u konsumentów, (5) możliwość wytwarzania toksyn, (6) określenie aktywności hemolitycznych.

Ostatecznym potwierdzeniem braku infekcyjności szczepów są badania na zwierzętach immunodefektywnych, czyli z niedoborami odporności [FAO/WHO 2002].

Z reguły uważa się, że bakterie rodzaju *Lactobacillus*, spożywane z żywnością, są bezpieczne dla człowieka. Jednak pojawiły się doniesienia o czterech typach niepożądanych działań: zakażenia układowe, szkodliwa działalność metaboliczna, nadmierna stymulacja układu odpornościowego czy transfer genów. Należy jednak zauważyć, że zaobserwowane objawy dotyczyły głównie zakażeń układowych, występowały niezwykle rzadko (kilka udokumentowanych przypadków) i u osób przewlekle chorych, o znacznie obniżonej odporności lub z uszkodzoną śluzówką jelita [Kolożyn-Krajewska i in. 2011].

W związku z tym, że szczepy bakterii kwasu mlekowego stosowane są jako kultury startowe oraz probiotyki, muszą być szczegółowo badane pod względem oporności na antybiotyki oraz pod kątem produkowania szkodliwych metabolitów [Mathur i Singh 2005]. Jak podkreśla Grupa Ekspertów FAO/WHO, oprócz prawidłowo zaplanowanych

badan klinicznych u ludzi, należy wziąć pod uwagę takie czynniki jak: standaryzacja warunków eksperymentu, indywidualny zespół mikroorganizmów człowieka, wielkość grupy badawczej oraz optymalną dawkę zastosowanego probiotyku. Konwencjonalne metody szacowania ryzyka bezpieczeństwa są niewystarczające [Nowak i in. 2010].

Te szczepy bakterii probiotycznych, których nazwy gatunkowe zawiera lista QPS (ang. Qualified Presumption of Safety) ustanowiona przez EFSA [2012], mają wysoki status bezpieczeństwa. Jednakże określenie oporności antybiotykowej *per se* nie jest gwarancją bezpieczeństwa, ponieważ ryzyko wiąże się z możliwością transferu genów oporności.

ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ IZOLOWANYCH Z ŻYWNOŚCI

Bakterie fermentacji mlekowej są mistrzami adaptacji. Jest to związane z relatywnie małym genomem zawierającym wiele genów (od 1600 do 3000), które w zależności od potrzeb mogą tracić lub pozyskiwać [Horvath i in. 2009, van Reenen i Dicks 2011]. Określenie obecności i sposobów przenoszenia oporności u bakterii jest kluczowe dla kontroli i zapobiegania antybiotykooporności. Wyróżnia się dwa typy oporności: wrodzoną (ang. intrinsic) i nabytą (ang. acquired). Oporność wrodzona jest cechą naturalną szczepu lub gatunku i nie stanowi ryzyka w przenoszeniu cech oporności na inne bakterie. Oporność na aminoglikozydowe antybiotyki, jak np. gentamycyna, wśród bakterii z rodzaju *Lactobacillus* uważana jest za oporność wrodzoną, ze względu na brak transportu elektonowego za pośrednictwem cytochromu, który jest odpowiedzialny za wchłanianie leku [Monteagudo-Mera i in. 2012]. Jedną z najlepiej poznanych oporności u *Lactobacillus* jest oporność na wankomycynę, którą również klasyfikuje się jako wrodzoną, ponieważ wiąże się z obecnością D-Ala-D-mleczanu w peptydoglikanie ściany komórkowej bakterii zamiast dipeptydu D-Ala-D-Ala, który stanowi cel antybiotyku [Coppola i in. 2005, Gueimonde i in. 2013].

Oporność nabyta powstaje natomiast u organizmów, które początkowo są wrażliwe na antybiotyki, a następnie stają się odporne w wyniku zmian w ich genomie, na skutek mutacji spontanicznej lub przez nabycie od innych bakterii opornych genu lub zespołu genów determinujących oporność [Mathur i Singh 2005]. Oporność nabyta może być przenoszona horyzontalnie między bakteriami poprzez mechanizmy transformacji, koniugacji lub transdukcji. Wertykalne przenoszenie genów oznacza dziedziczenie ich przez potomstwo. Wkład poszczególnych mechanizmów transferu w przenoszenie antybiotykooporności przez bakterie nie do końca jest poznany, jednak uważa się, że koniugacja jest kluczowym mechanizmem. Po pierwsze większość genów oporności zlokalizowanych jest na elementach mobilnych DNA takich jak plazmidy, transpozony i integrony. Po drugie koniugacja pozwala na przenoszenie genów pomiędzy różnymi gatunkami bakterii, podczas gdy transdukcja i transformacja dotyczą relacji na poziomie jednego szczepu bakterii [van Reenen i Dicks 2011].

Na plazmidach znajdują się geny odpowiedzialne za wiele cech bakterii, m.in.: metabolizm węglowodanów, produkcję bakteriocyn i egzopolisacharydów, a także geny odpowiedzialne za oporność na antybiotyki. Plazmid pAM β 1, kodujący oporność na

antybiotyki grupy MLS – makrolidy, linkozamidy, streptograminy, został zidentyfikowany u *Enterococcus faecalis* i potwierdzono możliwość jego transferu do innych bakterii z rodzajów *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* i *Bacillus* [Macrina i Archer 1993]. Z kolei kodujący oporność na chloramfenikol i erytromycynę plazmid pRE25 został zidentyfikowany u *Enterococcus faecalis* RE25 i udowodniono możliwość jego transferu m.in. do *Listeria innocua* [Mathur i Singh 2005].

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* są z reguły wrażliwe na antybiotyki z grupy β -laktamów oraz odporne na cefalosporyny, a także, jak już wspomniano, na wankomycynę. *Lactobacillus* wykazują wrażliwość na niskie stężenia wielu inhibitorów syntezy białek, takich jak chloramfenikol, makrolidy, tetracyklina, linkozamidy, ale są odporne na aminoglikozydy [Gueimonde i in. 2013]. Oporność LAB na kanamycynę, streptomycynę czy wankomycynę jest często opornością wrodzoną lub może być wynikiem mutacji. Również w wyniku mutacji może pojawić się oporność na erytromycynę i tetracyklinę. Na przykład stwierdzono, że oporność na erytromycynę komercyjnego szczepu *B. bifidum* Yakult YIT 400 powstała na skutek mutacji w regionie 23S rRNA zlokalizowanym na chromosomie i z tego powodu ryzyko transferu jest minimalne [Sato i Iino 2010]. Florez i inni [2007] zidentyfikowali pojedynczą mutację w rejonie 23S rRNA u *Lb. rhamnosus* powodującą zmniejszenie powinowactwa do erytromycyny i antybiotyków z grupy makrolidów. Z kolei Huys i inni [2006] zidentyfikowali gen kodujący oporność na tetracyklinę *tet(S)* na plazmidowym DNA szczepu *Lb. plantarum*, o właściwościach potencjalnie probiotycznych. Stwierdzono także, że bakterie mlekowe są w stanie wykształcić więcej niż jeden mechanizm oporności na dany antybiotyk. Udowodniono, że wyizolowany z sera Sola szczep *Lb. sakei* RitS 9 ma dwa różne mechanizmy oporności na tetracyklinę: *tet(M)* – białko kodowane rybosomalnie, zlokalizowane na transpozonach oraz *tet(L)* – zlokalizowany na plazmidzie gen odpowiedzialny za uruchomienie pompy wyrzutowej (ang. efflux pump) [Ammor i in. 2008]. Z kolei van Hoek i inni [2008] stwierdzili obecność trzech mechanizmów oporności na tetracyklinę u bakterii z gatunku *Lb. johnsonii*. Geny kodujące oporność na chloramfenikol zostały zidentyfikowane u *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. reuteri* i *Lb. plantarum*. Geny kodujące oporność na tetracyklinę, erytromycynę i wankomycynę znaleziono u *Lactococcus lactis*, enterokoków oraz u szczepów z rodzaju *Lactobacillus* izolowanych z fermentowanego mleka i mięsa. Produkty te nie są poddawane obróbce cieplnej przed konsumpcją, przez co stanowią doskonałe źródło antybiotykoopornych szczepów [Mathur i Singh 2005, Rodak 2011]. Najczęściej spotykanymi genami oporności u rodzaju *Lactobacillus* są geny oporności na tetracyklinę. Do tej pory zidentyfikowano 11 różnych genów oporności na ten antybiotyk [Gueimonde i in. 2013]. Geny kodujące oporność na erytromycynę, odpowiedzialne także za oporność na makrolidy, linkosamidy i streptograminy *erm(B)*, *erm(C)* i *erm(T)*, również zostały zidentyfikowane u *Lactobacillus* [Mayrhofer i in. 2010].

Dotychczas udokumentowano antybiotykooporność szczepów z rodzaju *Lactobacillus*, izolowanych z wina, sera, mleka i produktów mlecznych, fermentowanych warzyw np. kukurydzy, oliwek oraz owoców poddawanych fermentacji, a także z fermentowanych kiełbas czy innych produktów mięsnych surowo dojrzewających. W tabeli 1 przedstawiono dane o antybiotykoopornych bakteriach rodzaju *Lactobacillus* wyizolowanych z żywności.

Tabela 1. Oporność na antybiotyki bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wyizolowanych z żywności
Table 1. Antibiotic resistance to bacteria of the *Lactobacillus* genus isolated from food

Rodzaj żywności Type of food	Mikroorganizm Microorganism	Oporność na antybiotyk Antibiotic resistance	Źródło Reference
Jogurt Yoghurt	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	NM, PB	Sozzi i Smiley 1980
Fermentowane mleko Maasai Fermented Maasai milk	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. fermentum</i>	KN, ST, CF KN, ST, CF ST, CF	Mathara i in. 2008
Mleko Milk	<i>Lb. rhamnosus</i> 173 <i>Lb. rhamnosus</i> 123 <i>Lb. rhamnosus</i> 161	ST	Bujňáková i Kmet' 2012
Fermentowane mleko Kule naoto Fermented Kule naoto milk	<i>Lb. johnsonii</i> BFE 6128 <i>Lb. plantarum</i> BFE 5092	ST, GM, CF	Vizoso Pinto i in. 2006
Fermentowane mleko Kwerionik Fermented Kwerionik milk	<i>Lb. plantarum</i> BFE 5759	ST, GM, CF	
Pikle z mango Mango pickles	<i>Lb. casei</i> LA1	PN, AM, ST, GM, TR, CF	Kumar i Ghosh 2012
Pikle czosnkowe Garlic pickles	<i>Lb. helveticus</i> LA2	PN, AM, ST, GM, TR, CF	
Wino – Wine	<i>Lb. plantarum</i> C709 <i>Lb. plantarum</i> E14	GM, KN TR	Rojo-Bezares i in. 2006
Kielbasa fermentowana Fermented dry sausage	<i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. curvatus</i>	TR	Gevers i in. 2003
Mięso wieprzowe surowe Raw pork meat	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. brevis</i>	CH	Vidal i Collins- -Thompson 1987
Mięso drobiowe Raw poultry	<i>Lb. reuteri</i> G4	CH	Lin i in. 1996

AM – ampicylina/ampicillin; CF – cyprofloksacyna/ciprofloxacin; CH – chloramfenikol/chloramphenicol; CL – klindamycyna/clindamycin; GM – gentamycyna/gentamicin; KN – kanamycyna/kanamycin; NM – neomycyna/neomycin; PB – polimyksyna B/polymyxin B; ST – streptomycyna/streptomycin; TR – tetracyklina/tetracycline.

Istnieje wiele parametrów ilustrujących relacje pomiędzy antybiotykiem a drobnoustrojem. Najczęściej stosowany i zalecany przez SCAN (Scientific Committee on Animal Nutrition) [2001] oraz EFSA [2008] jest wskaźnik MIC (ang. Minimum Inhibitory Concentration), czyli „minimalne stężenie hamujące”. Jest to najmniejsze stężenie środka bakteriobójczego, hamujące wzrost komórek mikroorganizmów w podłożu stałym bądź płynnym wyrażane w mg·L⁻¹. Zgodnie z wytycznymi EFSA [2008], stosuje się następujące oznaczenia badanych szczepów:

- Szczep wrażliwy – Susceptible (S), mikroorganizm definiuje się jako wrażliwy, jeśli jest hamowany na poziomie odcięcia (ang. breakpoint level) danego antybiotyku ($S \leq X$) w zdefiniowanym teście fenotypowania, gdzie X oznacza stężenie antybiotyku w $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,
- Szczep oporny – Resistant (R), mikroorganizm definiuje się jako oporny, jeśli nie jest hamowany na poziomie odcięcia (ang. breakpoint level) danego antybiotyku ($R > X$) w zdefiniowanym teście fenotypowania, gdzie X oznacza stężenie antybiotyku w $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

W tabeli 2 przedstawiono wartości MIC dla wybranych gatunków z rodzaju *Lactobacillus*, powyżej których klasyfikuje się szczepy jako odporne na dany antybiotyk.

Tabela 2. Wartości odcięcia MIC dla wybranych gatunków *Lactobacillus*

Table 2. MIC breakpoints of selected *Lactobacillus* species

Gatunek <i>Lactobacillus</i> Species <i>Lactobacillus</i>	Rodzaj antybiotyku – Type of antibiotic – MIC [$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$]								
	AM	VA	GM	KN	ST	ER	CL	TR	CH
<i>Lb. helveticus</i>	1	2	16	16	16	1	1	4	4
<i>Lb. acidophilus</i>	1	2	16	16	16	1	1	4	4
<i>Lb. delbrueckii</i>	1	2	16	16	16	1	1	4	4
<i>Lb. reuteri</i>	2	*	8	16	64	1	1	16	4
<i>Lb. fermentum</i>	1	*	16	32	64	1	1	8	4
<i>Lb. plantarum</i>	2	*	16	64	*	1	1	32	8
<i>Lb. rhamnosus</i>	4	*	16	64	32	1	1	8	4
<i>Lb. paracasei</i>	2	*	32	64	*	1	1	4	4

AM – ampicylina/ampicillin; CH – chloramfenikol/chloramphenicol; CL – klindamycyna/clindamycin; ER – erytromycyna/erythromycin; GM – gentamycyna/gentamicin; KN – kanamycyna/kanamycin; ST – streptomycyna/streptomycin; TR – tetracyklina/tetracycline; VA – wankomycyna/vancomycin; *niewymagane/not required.

Źródło: [EFSA 2008].

Wprowadzono również dodatkowe mierniki, tj. MBC (minimalne stężenie bakterio-bójcze), w którym liczba żywych komórek bakterii zdolnych do wytwarzania kolonii zmniejsza się do 0. Ponadto wyróżnia się wskaźniki MIC 50 i MIC 90, gdzie określa się stężenia antybiotyku hamujące odpowiednio wzrost 50 i 90% komórek populacji badanych szczepów, oraz MAC, czyli minimalne stężenie antybiotyku indukujące zmiany morfologiczne komórek bakterii [Rodak 2011].

Wrażliwość na antybiotyki określa się różnymi metodami, najbardziej powszechnie stosowane są techniki rozcieńczeń z użyciem pożywek płynnych, półpłynnych i agarowych, a także metody dyfuzyjne. W celu wykonania szybkiego skriningu i oznaczenia antybiotykooporności szczepów zaleca się stosowanie E-testów (ang. Epsilonometer test), czyli metody gradientowo-dyfuzyjnej [Del Piano i in. 2006]. Zasada metody polega na ustaleniu najmniejszego stężenia antybiotyku, hamującego wzrost mikroorganizmów. Testy te działają w oparciu o MIC i cechują się niskim progiem wykrywalności. Pozwalają na potwierdzenie lekooporności bakterii w krótkim czasie (wyniki uzyskuje się już po 24 godzinach).

PODSUMOWANIE

Według WHO [2014], problem antybiotykooporności wśród bakterii może stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego. Bakterie naturalnie obecne w żywności lub celowo dodawane do żywności, takie jak probiotyki, mogą stanowić swoisty rezerwuuar i źródło czynników antybiotykoopornych. Szczególnie żywność fermentowana, taka jak produkty mleczne czy produkty mięsne surowo dojrzewające, niepoddawane obróbce cieplnej, zawierają bardzo dużą liczbę bakterii, w tym bakterii kwasu mlekowego. Te mikroorganizmy (LAB) posiadają nadzwyczaj duże zdolności adaptacyjne i wytwarzają wiele mechanizmów oporności. Jednym z najbardziej niebezpiecznych jest transfer genów oporności zlokalizowanych na elementach ruchomych DNA przez koniugację do innych bakterii. Wiąże się to z ryzykiem dynamicznego rozwoju oporności na antybiotyki mikroorganizmów obecnych w ludzkim przewodzie pokarmowym. W związku z tym szczepy stosowane jako kultury startowe czy probiotyki muszą być badane pod względem oporności na antybiotyki, a szczególnie zdolności do transferu tych genów.

LITERATURA

- Ammor M.S., Flórez A.B., van Hoek A., de los Reyes-Gavilán C., Aarts H., Margolles A., Mayo B., 2008. Molecular Characterization of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14, 6–15.
- Axelsson L., 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. W: *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*. M. Dekker (red.), 19–85.
- Boone D., Garrity G., Castenholz R., Brenner D., Krieg N., Staley J., 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes*. Springer, 1–1450.
- Bujňáková D., Kmet' V., 2012. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Folia Microbiol.* 57, 263–267.
- Coppola R., Succi M., Tremonte P., Reale A., Salzano G., Sorrentino E., 2005. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait* 85, 193–204.
- Del Piano M., Morelli L., Strozzi G., Allesina S., Barba M., Deidda F., Lorenzini P., Ballare M., Montino F., Orsello M., Sartori M., Garelo E., Carmagnola S., Pagliarulo M., Capurso L., 2006. Probiotics: from research to consumer. *Digest. Liver Dis.* 31, 248–255.
- EFSA, 2008. Technical guidance. Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J.* 732, 1–15.
- European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General, 2001. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of microorganisms. Resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance, 1–21.
- FAO/WHO Consultations and Workshops, 2001. Safety assessment of foods derived from genetically modified microorganisms. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology, 1–29.
- FAO/WHO, 2002. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation, 1–53.
- Flórez A.B., Delgado S., Mayo B., 2005. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Can. J. Microbiol.* 51, 51–58.

- Gajewska J., Błaszczyk M., 2012. Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). Post. Mikrobiol. 51(1), 55–65.
- Gevers D., Masco L., Baert L., Huys G., Debevere J., Swings J., 2003. Prevalence and Diversity of Tetracycline Resistant Lactic Acid Bacteria and their *tet* Genes Along the Process Line of Fermented Dry Sausages. System. Appl. Microbiol. 26, 277–283.
- Gueimonde M., Sánchez B., de los Reyes-Gavilán C.G., Margolles A., 2013. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. Front. Microbiol. 4, 1–6.
- Horvath P., Coûté-Monvoisin A., Romero D.A., Boyaval P., Fremaux C., Barrangou R., 2009. Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. Int. J. Food Microbiol. 131, 62–70.
- Hughes V.M., Datta N., 1983. Conjugative plasmids in bacteria of the “pre-antibiotic” era. Nature 302, 725–726.
- Hummel A., Hertel C., Holzapfel W.H., Franz C.M., 2007. Antibiotic Resistances of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 73(3), 730–739.
- Huys G., D’Haene K., Collard J., Swings J., 2004. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. Appl. Environ. Microbiol. 70(3), 1555–1562.
- Kolożyn-Krajewska D., Dolatowski Z.J., Zielińska D., 2011. Risk assessment of probiotic use particularly in meat products – a review. Fleischwirtschaft International 26, 61–68.
- Kumar M., Ghosh M., Ganguli A., 2012. Mitogenic response and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from indigenously pickled vegetables and fermented beverages. World J. Microbiol. Biotechnol. 28, 703–711.
- Libudzisz Z., 2008. Bakterie fermentacji mlekowej. W: Mikrobiologia techniczna. Tom 2. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności. Wyd. PWN, Warszawa, 25–58.
- Lin C.F., Fung Z.F., Wu C.L., Chung T.C., 1996. Molecular characterization of a plasmid borne (pTC82) chloramphenicol resistance determinant (cat-Tc) from *Lactobacillus reuteri* G4. Plasmid 36, 116–124.
- Macrina F.L., Archer G.L., 1993. Conjugation and broad host range plasmids in streptococci and staphylococci. W: Bacterial Conjugation. Plenum press. Clewell, D.B. (red.), 313–368.
- Mathara J.M., Schillinger U., Guigas C., Franz C., Kutima P.M., Mbugua S.K., Shin H.K., Holzapfel W.H., 2008. Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maa-sai fermented milk products in Kenya. Int. J. Food Microbiol. 126, 57–64.
- Mathur S., Singh R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. Int. J. Food Microbiol. 105, 281–295.
- Mayrhofer S., van Hoeck A.H., Mair C., Huys G., Arts H.J., Kneifel W., 2010. Antibiotic susceptibility of members of *Lactobacillus acidophilus* group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants. Int. J. Food Microbiol. 144, 81–87.
- Monteagudo-Mera A., Rodríguez-Aparicio L., Rúa J., Martínez-Blanco H., Navasa N., García-Armesto M.R., Ferrero M.A., 2012. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. J. Funct. Foods 4, 531–541.
- Nowak A., Ślizewska K., Libudzisz Z., Socha J., 2010. Probiotyki – efekty zdrowotne. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość 71(4), 2–36.
- Rodak E., 2011. Antybiotykooporność bakterii kwasu mlekowego. Bromat. Chem. Toksykol. 44(2), 204–211.

- Rojo-Bezares B., Sáenz Y., Poeta P., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C., 2006. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 234–240.
- Salminen S., von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., de Vos W.M., Fondén R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S.E., Mttila-Sandholm T., 1998. Demonstration of safety of probiotics – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 93–106.
- Sato T., Iino T., 2010. Genetic analyses of the antibiotic resistance of *Bifidobacterium bifidum* strain Yakult YIT 4007. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 254–258.
- Schjørring S., Krogfelt, K.A., 2011. Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. *Int. J. Microbiol.*, 1–10.
- Sokołowska B., Chotkiewicz M., Niezgodą J., Dekowska A., 2011. Ocena zanieczyszczenia mikrobiologicznego świeżych, niepasteryzowanych, wyciskanych soków owocowych i warzywnych dostępnych w handlu. *ZPPNR* 569, 219–228.
- Sozzi T., Smiley M.B., 1980. Antibiotic resistances of yoghurt starter cultures *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 862–865.
- Strus M., 2006. Rodzaj *Lactobacillus*. W: Mikrobiologia. P. Heczko (red.). Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 151.
- Truszczyński M., Pejsak Z., 2013. Źródła i drogi szerzenia się antybiotykooporności bakterii. *Med. Weter.* 69(4), 203–207.
- Vidal C.A., Collins-Thompson D., 1987. Resistance and sensitivity of meat lactic acid bacteria to antibiotics. *J. Food Prot.* 50, 737–740.
- van Hoek A.H.A.M., Mayrhofer S., Domig K.J., Flóres A.B., Ammor M.S., Mayo B., Aarts H.J.M., 2008. Mosaic tetracycline resistance genes and their flanking regions in *Bifidobacterium thermophilum* and *Lactobacillus johnsonii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 248–252.
- van Reenen C.A., Dicks L.M., 2011. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Arch. Microbiol.* 193, 157–168.
- Vizoso Pinto M., Franz C., Schillinger U., Holzapfel W., 2006. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 205–214.
- WHO, 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 1–256.

ANTIBIOTIC RESISTANCE TO BACTERIA OF *LACTOBACILLUS* GENUS ISOLATED FROM FOOD, AS A CRITERION FOR PROBIOTIC

Summary. The widespread and inappropriate use of antibiotics in human and animal and is not applicable grace periods resulted in an increase in the number of pathogenic microorganisms resistant to drugs. Potentially probiotic strains obligatorily have to be tested for antibiotic resistance mechanisms. Although lactic acid bacteria have GRAS status (Generally Recognized as Safe) and the fermentation process is known and used for hundreds of years, it has been found that lactic acid bacteria may be a reservoir of antibiotic resistance genes and they are able to transfer them on pathogenic microorganisms. There are two types of resistance: intrinsic and acquired. Intrinsic resistance is a feature of the natural strain or species and do not pose a risk in the transfer characteristics of resistance to other

bacteria. While acquired resistance arises in organisms which are initially sensitive to the antibiotic, and are then resistant as a result of changes in their genome as a result of spontaneous mutations or by acquiring from other bacteria resistant gene or genes determining the resistance. Acquired resistance can be transferred horizontally between bacteria, through the mechanisms of transformation, conjugation or transduction. Vertical gene transfer is the inheritance of the offspring. The contribution of the various transfer mechanisms of antibiotic resistance in bacteria transmission is not fully understood, but it is believed that the conjugation is a key mechanism. Firstly, most of the resistance genes are located on mobile DNA elements such as plasmids, transposons and integrons. Secondly conjugation allows transfer of genes between different species of bacteria, while the transduction and transformation of the relationship at the level of one strain. The tetracycline, chloramphenicol and erythromycin resistance gene are the most often and easily transferable genes in *Lactobacillus*. Resistance to the aminoglycoside antibiotics such as gentamicin, of bacteria of the genus *Lactobacillus* is considered innate resistance, due to lack of transport. One of the best known *Lactobacillus* resistance is vancomycin resistance, which is also classified as intrinsic. It is significant that the bacteria of the genus *Lactobacillus* are able to produce more than one mechanism of antibiotic resistance.

According to the WHO the problem of antibiotic resistance among bacteria may pose a risk to public health. Safety assessment is important criterion in strains with probiotic characteristics, from the point of view of use as food starter cultures.

Key words: antibiotic resistance, lactic acid bacteria, safety, *Lactobacillus*, probiotics