

ANNA SIP, MARIA KRASOWSKA, MICHAŁ WIĘCKOWICZ,
WŁODZIMIERZ GRAJEK

METODY SKRININGU BAKTERIOCYNOGENNYCH BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ

Streszczenie

W pracy omówiono metody poszukiwania bakterii fermentacji mlekowej zdolnych do syntezy bakteriocyn. Przedstawiono trzy tradycyjne procedury skriningowe. Opisano także sposoby identyfikacji LAB oraz detekcji wytwarzanych przez nie bakteriocyn. Zwrócono uwagę na złożony (wielopłaszczyznowy) charakter tradycyjnych procedur skriningowych i wyjaśniono przyczyny niskiej ich efektywności. Omówiono ponadto rolę analizy metagenomowej oraz fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* w pracach skriningowych. Podkreślono, że techniki te mogą być stosowane we wstępnych etapach skriningu do typowania środowisk bogatych w bakteriocynogenne LAB, zwiększając tym samym prawdopodobieństwo pozyskania ze środowiska naturalnego drobnoustrojów zdolnych do syntezy aktywnych bakteriocyn. W końcowej części pracy dokonano porównania tradycyjnych i nowoczesnych procedur skriningowych.

Słowa kluczowe: bakteriocyny, skrining, bakterie fermentacji mlekowej, metody oznaczania bakteriocyn

Wprowadzenie

W ostatnich latach duże zainteresowanie wzbudza możliwość przedłużania trwałości żywności za pomocą związków wytwarzanych przez drobnoustroje [44]. Do ich grona należą m.in. bakteriocyny. Substancje te mają szereg atrakcyjnych, z praktycznego punktu widzenia, właściwości [21]. Są pozbawionymi smaku, zapachu i barwy związkami białkowymi o masie cząsteczkowej od kilku do kilkudziesięciu tysięcy Da, które łatwo dyfundują w struktury produktów żywnościowych. W odróżnieniu od wielu chemicznych konserwantów żywności są one całkowicie bezpieczne dla organizmu człowieka [9].

Najważniejszą cechą bakteriocyn jest ich aktywność biologiczna. Bakteriocyny są zdolne do selektywnego oddziaływania na stan mikrobiologiczny wielu środowisk. Za

Dr inż. A. Sip, dr inż. M. Krasowska, mgr M. Więckowicz, prof. dr hab. W. Grajek, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań

ich pośrednictwem bakteriocynogenne bakterie (tj. bakterie zdolne do syntezy bakteriocyn) oddziałują na inne mikroorganizmy zasiedlające wspólny ekosystem, osłabiając je (działanie bakteriostatyczne) lub niszcząc (działanie bakteriobójcze lub grzybobójcze). Bakteriocyny najczęściej tworzą pory w błonach komórkowych bakterii i w konsekwencji tego prowadzą do rozproszenia potencjału transmembranowego oraz indukują wypływ jonów K^+ , ATP i aminokwasów. Większość bakteriocyn wykazuje wąski zakres aktywności i działa jedynie na drobnoustroje blisko spokrewnione ze swoimi producentami. Jednak zakres antagonistycznej aktywności niektórych bakteriocyn obejmuje również drobnoustroje niespokrewnione, w tym wiele grup mikroorganizmów patogennych oraz powodujących psucie się żywności. Większość bakteriocyn jest stabilna w szerokim zakresie pH oraz odznacza się wysoką termoopornością. Drobnoustroje bakteriocynogenne są odporne na toksyczne działanie wytwarzanych przez siebie bakteriocyn. Geny struktury bakteriocyn są zlokalizowane w plazmidach lub w chromosomach. Geny te mogą być przenoszone na drodze koniugacji lub za pośrednictwem bakteriofagów do innych bakterii [29]. Najważniejsze właściwości bakteriocyn przedstawiono w tab. 1.

Bakteriocyny mogą być wytwarzane przez wiele grup bakterii. W technologii żywności najważniejszymi ich producentami są jednak bakterie fermentacji mlekowej (LAB; ang. *lactic acid bacteria*) [30]. Bakterie te bowiem powszechnie występują w wielu produktach żywnościowych i większość z nich ma status GRAS (zaliczana jest do organizmów bezpiecznych). Wiele LAB jest ponadto wykorzystywanych przemysłowo do otrzymywania żywności fermentowanej. Jej bezpieczeństwo mikrobiologiczne mogą wyraźnie poprawić bakteriocynogenne LAB. Dlatego też m.in. w laboratoriach na całym świecie prowadzone są intensywne prace mające na celu pozyskanie tych wartościowych bakterii [40].

Wykrywanie bakteriocynogennych drobnoustrojów

Szczegółowa identyfikacja mikroorganizmów zdolnych do syntezy bakteriocyn, które naturalnie występują w złożonych ekosystemach, takich jak np. żywność, jest niezwykle ważna z uwagi na możliwość poznania interakcji zachodzących pomiędzy różnymi grupami drobnoustrojów. Poznanie tych interakcji może przyczynić się do opracowania efektywnych, a zarazem naturalnych metod zabezpieczania żywności przed rozwojem niepożądanych mikroorganizmów i w konsekwencji korzystnie wpłynąć na zdrowie jej potencjalnych konsumentów. Zmiana składu mikrobiologicznego żywności, będąca skutkiem działania bakteriocyn, może wpływać także na jej skład chemiczny, właściwości sensoryczne i funkcjonalne. Dlatego też celowe jest prowadzenie szczegółowych badań nad sukcesją bakteriocynogennych drobnoustrojów w żywności. Powiązanie bowiem zmian cech jakościowych żywności ze zmianami jej składu mikrobiologicznego może pozwolić na kontrolowane oddziaływanie na szereg ważnych jej właściwości [21].

Tabela 1

Właściwości bakteriocyn.
Properties of bacteriocins.

Struktura chemiczna Chemical structure	Proste białka / Simple proteins Kompleksy białkowo-węglowodanowe Protein-carbohydrate complexes Kompleksy białkowo-lipidowe Protein-lipid complexes Kompleksy białkowo-węglowodanowo-lipidowe Protein-carbohydrate-lipid complexes
Masa cząsteczkowa Molecular mass	Od kilku do kilkudziesięciu tysięcy Da, najczęściej poniżej $5 \cdot 10^3$ Da From a few to a dozen kDa, usually under $5 \cdot 10^3$ Da
Wrażliwość na działanie enzymów Sensitivity to enzymes	Wszystkie bakteriocyny są wrażliwe na działanie enzymów proteolitycznych (pepsyny, trypsyny i pronazy), a bakteriocyny o złożonej budowie również na działanie enzymów amylolytycznych lub/i lipolitycznych / All bacteriocins are sensitive to proteolytic enzymes (pepsin, trypsin, and pronase) and in the case of bacteriocins with a complex structure, also, to amylolytic and/or lipolytic enzymes
Wrażliwość na działanie temperatury Sensitivity to temperature	Bakteriocyny są związkami termostabilnymi; większość bakteriocyn wytrzymuje 15 – 30 min ogrzewanie w temp. 100 °C; wyjątek stanowią bakteriocyny LAB klasy III (bakteriocyny o masie cząsteczkowej $>30 \cdot 10^3$ Da), które ulegają inaktywacji już w temp. 60 – 80 °C Bacteriocins are heat-stable compounds; most of the bacteriocins endure the heating at 100 °C for 15 – 30 min; exception are class III LAB bacteriocins (bacteriocins with molecular mass $>30 \cdot 10^3$ Da), which are inactivated already at 60 – 80 °C
Wrażliwość na odczyn środowiska (pH) Sensitivity to pH	Większość bakteriocyn jest stabilna w środowisku o pH od 2,0 do 8,0 / Most of the bacteriocins are stable at a pH range from 2.0 to 8.0
Zakres aktywności Range of activity	Wąski do szerokiego / Narrow to wide
Działanie Action	Bakteriobójcze / Bactericidal Bakteriostatyczne / Bacteriostatic Grzybobójcze – niektóre bakteriocyny Fungicidal – some bacteriocins
Mechanizm działania Mechanism of action	Porcja membrany cytoplazmatycznej Cytoplasmatic membrane poration Liza komórek / Cell lysis Inhibicja biosyntezy DNA, RNA i białka Inhibition of DNA, RNA and protein biosynthesis

Źródło: opracowanie własne / Source: the authors' own study

W chwili obecnej istnieje wiele metod analizy składu ilościowego i jakościowego złożonych ekosystemów. Metody te można podzielić na tradycyjne (konwencjonalne) i nowoczesne. Metody tradycyjne wiążą się z koniecznością prowadzenia hodowli mikroorganizmów wyizolowanych ze środowiska i polegają na oznaczaniu ich cech fenotypowych oraz aktywności biologicznej produktów ich metabolizmu. Metody nowoczesne bazują natomiast na technikach biologii molekularnej i koncentrują się na oznaczaniu cech genotypowych mikroorganizmów, podczas których wstępna hodowla drobnoustrojów nie jest obligatoryjna [51].

Tradycyjne metody skriningu bakteriocynogennych bakterii fermentacji mlekowej

Efektywność skriningu bakterii fermentacji mlekowej wytwarzających aktywne bakteriocyny zależy w dużej mierze od wyboru źródła ich izolacji [39] i waha się od około 1 % [22, 39] do 10 % [39].

Badacze zajmujący się poszukiwaniem bakterii syntetyzujących bakteriocyny podkreślają, że najbogatszym ich źródłem są produkty fermentowane wytwarzane metodami tradycyjnymi [3, 22, 52]. Produkty te często powstają w warunkach o niskim standardzie higienicznym, czemu w naturalny sposób towarzyszy obecność większej liczby bakterii współzawodniczących z niepożądaną mikroflorą poprzez m.in. biosyntezę bakteriocyn [22].

Pierwszym etapem każdej procedury skriningowej prowadzonej w tradycyjny sposób jest pozyskanie pojedynczych kolonii na pożywkach agarowych. Etap ten jest poprzedzony wykonaniem rozcieńczeń badanego materiału. Do izolacji bakterii fermentacji mlekowej wykorzystuje się najczęściej agar M17 [22] i/lub agar MRS [3, 13, 17, 52]. Wymienione podłoża charakteryzują się jednak ograniczoną selektywnością względem LAB i dlatego umożliwiają one wzrost także przedstawicieli innych rodzajów bakterii. W celu pozyskania do dalszych etapów badań jedynie LAB niezbędne jest dokonanie wstępnej identyfikacji kultur mikroorganizmów otrzymanych na podłożach agarowych. Wstępna identyfikacja LAB sprowadza się zwykle do oznaczania ich właściwości fenotypowych. Przed przystąpieniem do takiej analizy z podłoża agarowych wybiera się losowo po kilka kolonii o zbliżonej lub dominującej morfologii i sprawdza się ich czystość poprzez posiew redukcyjny na podłożu zestalonym [3, 17, 20] i/lub inokulację pożywki płynnej, a następnie obserwacje mikroskopowe. Charakterystyki fenotypowej pozyskanych monokultur dokonuje się poprzez określenie m.in. morfologii ich komórek, ruchliwości, zdolności do wytwarzania katalazy, wzrostu w różnych wartościach temperatury oraz fermentacji węglowodanów [17]. Jedynie monokultury spełniające kryteria wstępnej identyfikacji rodzajowej zabezpiecza się i wykorzystuje do dalszych badań. Obecnie coraz częściej wstępnej selekcji mikroorganizmów (wyhodowanych na podłożach selektywnych) dokonuje się także za pomocą technik biologii molekularnej, które stają się rutynowym narzędziem pracy mikrobio-

logów. W przypadku prac mających na celu wytypowanie z populacji badanych mikroorganizmów jedynie LAB, po izolacji DNA przeprowadza się reakcje PCR ze starterami komplementarnymi dla sekwencji charakterystycznych dla poszczególnych grup (rodzajów i/lub gatunków) LAB.

Szybszą i bardziej ekonomiczną procedurą skringową mającą na celu pozyskanie bakteriocynogennych drobnoustrojów jest procedura, według której najpierw bada się aktywność antagonistyczną pojedynczych izolatów względem wybranych drobnoustrojów i dopiero po niej dokonuje się wstępnej identyfikacji mikroorganizmów uznanych za aktywne [13, 22]. Niektórzy autorzy proponują jeszcze jedną alternatywną procedurę skringową. Zakłada ona możliwość badania aktywności antagonistycznej całej populacji mikroorganizmów wyhodowanej na płytkach Petriego i widocznej w postaci kolonii. Taki sposób postępowania jest najprostszy, gdyż eliminuje konieczność pozyskiwania monokultur wszystkich mikroorganizmów (niekoniecznie aktywnych) i pozwala na relatywnie szybkie uzyskanie informacji o zdolności badanych kultur (kolonii) do działania przeciwdrobnoustrojowego. Dalszym szczegółowym badaniom poddawane są więc jedynie mikroorganizmy o potwierdzonej aktywności antagonistycznej (tab. 2).

Do wstępnej oceny aktywności antagonistycznej pozyskanych monokultur lub bezpośrednio wszystkich kolonii mikroorganizmów otrzymanych na podłożach agarowych najczęściej wykorzystuje się tanie i nieskomplikowane metody dyfuzyjne [28, 39]. Polegają one na zjawisku równomiernej, koncentrycznej dyfuzji substancji przeciwdrobnoustrojowych w środowisku żelowym, czemu towarzyszy tworzenie stref ograniczenia lub zahamowania wzrostu wrażliwych szczepów testowych [28, 50]. Aktywność metodami dyfuzyjnymi może być oznaczana w dwojaki sposób, tj. z zastosowaniem testów bezpośrednich lub testów opóźnionych [8, 28].

W testach bezpośrednich kultury potencjalnych producentów substancji antagonistycznych hoduje się na miękkich podłożach agarowych (0,75 – 1,5 % agaru) jednocześnie ze szczepem testowym [8, 28]. Natomiast w testach opóźnionych badane kultury najpierw posiewa się na powierzchni podłoża agarowych i dopiero po uzyskaniu pojedynczych kolonii zalewa się podłożem agarowym z wprowadzonym do niego szczepem testowym [28]. Po inkubacji dokonuje się pomiaru wielkości stref inhibicji wzrostu szczepu testowego powstałych wokół kolonii badanych mikroorganizmów.

Precyzja i dokładność metod dyfuzyjnych zależy od szeregu różnych czynników [28, 56], m.in. od charakteru produkowanej substancji przeciwdrobnoustrojowej [14] i składu podłoża testowych [8, 27, 28].

Wstępne testy aktywności antagonistycznej rzadziej przeprowadza się z wykorzystaniem pożywek płynnych [28]. Uzasadnia się to m.in. tym, że bakterie fermentacji mlekowej wytwarzają większą ilość bakteriocyn i innych substancji przeciwdrobnoustrojowych na podłożach stałych [50]. Z drugiej jednak strony stosowanie pożywek

płynnych eliminuje problemy związane z zaburzeniami dyfuzji aktywnych metabolitów LAB w podłożu agarowym, pozwalając tym samym na uzyskiwanie bardziej obiektywnych wyników [7, 16, 41].

Tabela 2

Tradycyjne metody skringu bakteriocynogennych LAB.
Conventional methods to screen bacteriocinogenic LAB.

Procedura I / Procedure I	Procedura II / Procedure II	Procedura III / Procedure III
Wybór źródła izolacji / Selecting the source of isolation		
Posiew rozcieńczonego materiału izolacyjnego na podłoże agarowe Plating the diluted material on agar media		
Otrzymanie pojedynczych kolonii / Obtaining single colonies		
Wyprowadzenie monokultur / Acquiring monocultures		Ocena aktywności antagoni- stycznej wszystkich kolonii wrosłych na płytkach Petriego Assay of antagonistic activity of all colonies obtained on Petri dishes
Wstępna identyfikacja wybranych monokultur Preliminary identification of the selected monocultures	Ocena antagonistycznych wła- ściwości wytypowanych mon- okultur w stosunku do wybra- nych wskaźników Assay of antagonistic properties of marked out monocultures in relation to the selected test strains	Wyprowadzenie monokultur aktywnych bakterii Acquiring monocultures of active bacteria
Ocena antagonistycznych właściwości bakterii zidentyfi- kowanych jako LAB w stosun- ku do wybranych wskaźników Assay of antagonistic properties of bacteria identified as LAB in relation to the selected test strains	Wstępna identyfikacja aktywnych monokultur Preliminary identification of active monocultures	Wstępna identyfikacja aktywnych monokultur Preliminary identification of active monocultures
Hodowla aktywnych LAB na podłożu płynnym / Culturing active LAB in the liquid medium		
Otrzymanie ekstraktów aktywnych bakteriocyn / Obtaining active extracts of bacteriocins		
Potwierdzenie obecności bakteriocyn w ekstraktach aktywnych Confirming the presence of bacteriocins in active extracts		
Oznaczanie aktywności bakteriocyn / Assay of bacteriocin activity		

Źródło: opracowanie własne / Source: the authors' own study

Drobnoustroje, które we wstępnych badaniach antagonizmu wykazały pozytywne wyniki, poddaje się dalszym szczegółowym testom. Testy te mają na celu ustalenie, jakie metabolity są odpowiedzialne za wykrytą aktywność. Niezależnie od metody analitycznej wybranej do dalszych badań, w celu dokonania identyfikacji aktywnych metabolitów LAB, zwykle pozakomórkowych, niezbędne jest założenie hodowli wgłębnych. Pobierane w trakcie nich próby odwirowuje się, a otrzymane supernatanty traktuje się jako surowe ekstrakty egzogennych substancji przeciwdrobnoustrojowych [28].

Bakterie fermentacji mlekowej mogą być zdolne do syntezy wielu substancji przeciwdrobnoustrojowych. Często wraz z bakteriocynami wytwarzają one duże ilości kwasów organicznych (np. mlekowego, octowego) oraz innych związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, np. H_2O_2 [38]. Antagonistyczne działanie kwasów organicznych w pożywkach hodowlanych można ograniczyć już w momencie ich sporządzenia, poprzez 10-krotną redukcję ilości dodawanych do nich cukrów [31], co bezpośrednio ogranicza ilość syntezowanych kwasów lub też poprzez zwiększenie dodatku do nich składników buforujących [38]. Częściej jednak neutralizuje się surowe ekstrakty substancji przeciwdrobnoustrojowych, doprowadzając ich kwasowość do pH 6,0 – 7,0 [3, 17, 52]. Nadtlenek wodoru usuwa się natomiast z pozyskanych ekstraktów poprzez dodatek do nich katalazy [3]. Można też nie dopuścić do biosyntezy tego związku, prowadząc hodowlę potencjalnych producentów bakteriocyn w warunkach beztlenowych [13, 33, 47]. Supernatanty płynów hodowlanych bakterii fermentacji mlekowej poddane wyżej wymienionym zabiegom, oraz często również dodatkowo łagodnej obróbce termicznej w celu inaktywacji proteaz, w literaturze są nazywane ekstraktami aktywnymi bakteriocyn, preparatami nieoczyszczonych bakteriocyn bądź surowymi preparatami bakteriocyn.

Bakteriocyny, jako substancje białkowe, rozkładane są przez enzymy proteolityczne. Stąd też uznaną metodą potwierdzenia chemicznego charakteru tych związków jest inkubacja ekstraktów aktywnych bakteriocyn z takimi enzymami, jak: proteinaza K, trypsyna, α -chymotrypsyna, [3, 20, 52], pepsyna, papaina [20, 52] czy też pronaza E [52]. W ramach potwierdzania bakteriocynowej natury substancji obecnych w tzw. ekstraktach aktywnych przeprowadza się także testy wrażliwości „bakteriocyn” na działanie temperatury, pH i detergentów.

Pomiary aktywności bakteriocyn obecnych w pozyskanych ekstraktach sprawiają wiele trudności. Często ich rezultaty są uzależnione od wybranej metody analitycznej. Nie istnieje bowiem żadna standardowa metoda, która pozwala na ocenę z taką samą dokładnością aktywności wszystkich zróżnicowanych pod względem struktury bakteriocyn [16].

Za odpowiednią metodę do wstępnych badań aktywności surowych częściowo scharakteryzowanych preparatów bakteriocyn uznaje się metodę krytycznych rozcień-

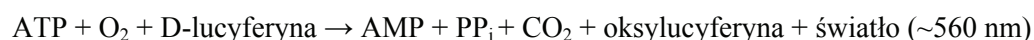
czeń [28]. Metoda ta polega na sporządzaniu szeregu 2- lub 10-krotnych rozcieńczeń badanych ekstraktów i oznaczaniu ich aktywności, najczęściej metodą dyfuzyjną [16, 28]. Wyniki oznaczeń podaje się w arbitralnych jednostkach aktywności (AU) na mililitr, definiowanych jako odwrotność największego rozcieńczenia badanego ekstraktu bakteriocynty, które w widoczny sposób ograniczyło lub zahamowało wzrost szczepu testowego [28, 34, 38]. Planując wykonanie oznaczeń aktywności bakteriocynty tą właśnie metodą należy pamiętać, że wartość AU jest uzależniona od warunków biosyntezy bakteriocynty, takich jak pH, temperatura czy skład pożywki hodowlanej [4, 29].

Metody dyfuzyjne wykazują także szereg wad, spośród których największą jest niska czułość. Drobnoustroje często są zdolne do syntezy bakteriocynty, ale z uwagi na niski próg detekcji metod dyfuzyjnych nie są kwalifikowane do dalszych badań. Wyniki oznaczeń aktywności bakteriocynty metodami dyfuzyjnymi są ponadto uzależnione od wyboru drobnoustroju wskaźnikowego. W związku z tym, że bakteriocynty odznaczają się dużą specyficznością działania, stosowanie różnych szczepów testowych w poszczególnych laboratoriach, a więc szczepów o potencjalnie zróżnicowanej wrażliwości na działanie bakteriocynty, utrudnia dokonywanie porównań międzylaboratoryjnych, a co tym samym uniemożliwia weryfikację otrzymywanych wyników [4, 29].

Do niedostatków oznaczeń aktywności bakteriocynty dokonywanych z wykorzystaniem metod dyfuzyjnych należy zaliczyć również możliwość braku korelacji pomiędzy wielkością stref hamowania wzrostu szczepów testowych a stężeniem oznaczanej bakteriocynty [16] oraz zależność uzyskiwanych wyników od subiektywnej oceny ich wykonawcy [16, 42]. Ostatnią z wymienionych niedogodności można jednak wyeliminować poprzez stosowanie do pomiaru średnic stref inhibicji zautomatyzowanych systemów analizy obrazu [41].

Pracochłonne i często mało dokładne procedury bezpośredniego określania aktywności bakteriocynty metodami dyfuzyjnymi można zastąpić szybkimi, pośrednimi metodami pomiaru aktywności bakteriocynty (tab. 3). Metody te uwzględniają zwykle mechanizm działania bakteriocynty. Mogą zatem wykorzystywać fakt, że większość bakteriocynty uszkadza błony komórkowe drobnoustrojów [12, 25, 34, 37]. W związku z tym poprzez pomiar np. stężenia enzymów wypływających z komórek szczepów testowych poddanych działaniu bakteriocynty [12], stężenia jonów potasu czy ATP [1, 37] możliwa jest detekcja bakteriocynty i oznaczenie ich aktywności.

W celu określenia aktywności bakteriocynty można oznaczać nie tylko ilość ATP uwalnianego z komórek, ale także stopień hydrolizy ATP w ich wnętrzu [1, 16]. Przyпуска się, że hydroliza ATP we wnętrzu komórek jest następstwem tworzenia przez bakteriocynty por w ich błonie komórkowej i wypływu przez nie jonów fosforanowych, co prowadzi do przesunięcia równowagi reakcji hydrolizy ATP [32]:



T a b e l a 3

Metody oznaczania aktywności bakteriocyn.
Methods to assay the activity of bacteriocins.

Metody oznaczania aktywności bakteriocyn Methods to assay the activity of bacteriocins	Działanie bakteriocyn będące podstawą oznaczenia Bacteriocin action being the basis for assaying	Oznaczana wielkość Parameter assayed	Materiał i stosowane odczynniki Materials and chemicals applied	Potrzebny sprzęt Equipment required
BEZPOŚREDNIE / DIRECT				
Dyfuzyjne Diffusive	hamowanie lub ograniczanie wzrostu bakterii inhibiting or limiting the growth of bacteria	strefa inhibicji wzrostu szepców testowych na podłożu agarowym test strain growth inhibition zone on the medium	podłoża agarowe, bakterie wskaźnikowe agar media, test bacteria	plytki Petriego, inkubator Petri dishes; incubator
POŚREDNIE / INDIRECT				
Turbidymetryczne Turbidimetric	liza komórek bakterii lub ograniczanie szybkości ich wzrostu bacterial cell lysis or limiting the rate of their growth	gęstość optyczna hodowli poddanych działaniu bakteriocyn optical density of cultures exposed to bacteriocins	podłoża płynne, bakterie wskaźnikowe liquid media, test bacteria	spektrofotometr spectrophotometer
Konduktometryczne Conductometric	ograniczenie szybkości wzrostu bakterii inhibiting the growth rate of bacteria	przewodność hodowli drobnoustrojów poddanych działaniu bakteriocyn conductance of culture of microorganisms exposed to bacteriocins	podłoża płynne, bakterie wskaźnikowe liquid media test bacteria	konduktometr conductometer
Enzymatyczne Enzymatic	permeabilizacja błony komórkowej bakterii bacterial cell membrane permeabilization	absorbancja (aktywność enzymów wewnątrzkomórkowych) absorbance (activity of intracellular enzymes)	substrat reakcji enzymatycznej, bakterie wskaźnikowe substrate for enzymatic reaction, test bacteria	spektrofotometr spectrophotometer

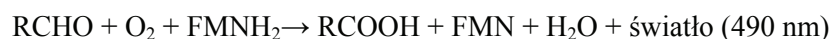
cd. Tab. 3

Fluorescencyjne Fluorescent	przerwanie integralności błon komórkowych bakterii disrupting the integrity of bacterial cell membrane	fluorescencja fluorescence	fluorochromy wiążące się ze składnikami wewnątrzkomórkowo- wymy lub utrzymujące się jedynie w komórkach nie-uszkodzonych bakterii wskaźnikowych fluorochromes binding to intracellular components or remaining only in the intact cells of the test bacteria	fluorymetr lub cytometr przepływowo- fluorometer or flow cytometer
Immunoenzymatyczne Immunoenzymatic	immunogenność immunogenicity	absorbancja (aktywność związku skoniugowanego z wtórnym przeciwciałem) absorbance (activity of a marker conjugated with the secondary antibody)	zestaw ELISA dla bakteriocyn ELISA kit for bacteriocins	spektrofotometr spectrophotometer
Bioluminescencyjne Bioluminescent	przerwanie integralności błon komórkowych bakterii disrupting the integrity of bacterial cell membrane	natężenie światła emitowanego przez bakterie wskaźnikowe intensity of light emitted by test bacteria	lucyferyna i lucyferaza, bakterie wskaźnikowe luciferin and luciferase, test bacteria	luminometr luminometer
Zmodyfikowane metody bioluminescencyjne Modified bioluminescent methods	przerwanie integralności błon komórkowych bakterii disrupting the integrity of bacterial cell membrane	natężenie światła emitowanego przez bakterie wskaźnikowe intensity of light emitted by the test bacteria	bakterie wskaźnikowe transformowane plazmidem - nośnikiem genu lucyferazy i lucyferyny lub promotora danej bakteriocyny test bacteria transformed with the plasmid: a carrier of genes of luciferase and luciferine or a promoter of the relevant bacteriocin	luminometr luminometer

Źródło: opracowanie własne / Source: the authors' own study

Pomiarów stopnia hydrolizy ATP dokonuje się za pomocą luminometru [1], w obecności kompleksu lucyferyny i lucyferazy pochodzącej z komórek eukariotycznych. Wyniki takich pomiarów w przypadku wielu bakteriocyn są jednak słabo skorelowane z wynikami bezpośrednich pomiarów aktywności tych związków [41].

W ostatnich latach do detekcji bakteriocyn zaadaptowano także metody bioluminescencyjne, wykorzystujące do monitorowania żywotności komórek lucyferazę bakteryjną, kodowaną przez geny *luxA* i *luxB*. W komórkach bakteryjnych enzym ten katalizuje reakcję utleniania długołańcuchowego aldehydu i FMNH₂ do kwasu tłuszczowego i mononukleotydu flawinowego [24, 48], czemu towarzyszy emisja niebieskozielonego światła [24]:



W związku z tym, że reakcja ta zachodzi dzięki redukcyjnym zdolnościom FMNH₂, jej przebieg jest uzależniony od aktywności metabolicznej bakterii [53]. Ustalono, że w wyniku działania bakteriocyn następuje zmniejszenie intensywności emisji światła przez bakterie [48]. Na tej podstawie możliwe jest zatem dokonywanie oznaczeń aktywności bakteriocyn.

Najbardziej udoskonaloną formą metod bioluminescencyjnych, wykorzystywanych do oznaczeń bakteriocyn, jest metoda bazująca na stosowaniu szczepów testowych, z wklonowanymi plazmidami zawierającymi stabilną sekwencję genów *luxA::B* – kodujących lucyferazę [48, 53, 55], a nawet sekwencję *luxCDE* – genu odpowiedzialnego za regenerację długołańcuchowego aldehydu – substratu lucyferazy. Stosowanie takich konstruktów eliminuje konieczność wykorzystywania do detekcji bakteriocyn jakichkolwiek dodatkowych substratów [53]. Transdukcja sygnałna bakteriocyny sprzężona z wytwarzaniem lucyferazy pozwala bowiem na szybkie i proste wykrywanie w roztworze konkretnych bakteriocyn, których promotor zawarty jest obok genu kodującego lucyferazę w plazmidzie wprowadzonym do szczepu testowego [55].

Niektórzy autorzy proponują także wykorzystanie do oznaczania aktywności bakteriocyn metod powszechnie stosowanych do badania ciągłości błon komórkowych drobnoustrojów. W literaturze opisano próby wykorzystania do tego celu fluorochromów, np. berberyny fluoryzującej w momencie wiązania się z biomolekułami wewnątrzkomórkowymi, np. DNA [12] czy diocjanu karboksylfluoresceiny (cFDA), utrzymującego się jedynie wewnątrz komórek nieuszkodzonych [6]. Na podstawie zmian natężenia fluorescencji mierzonej za pomocą fluorymetru lub cytometru przepływowego dokonuje się oznaczeń aktywności lub ilości bakteriocyn [6].

Niektóre bakteriocyny powodują jednak lizę komórek. Fakt ten może być także wykorzystywany do detekcji tych związków. O lizie komórek bakterii wrażliwych na działanie bakteriocyn może świadczyć, np. postępujące w czasie zmniejszanie się gęstości optycznej płynu hodowlanego [34] lub ograniczenie szybkości wzrostu szczepu testowego inkubowanego z dodatkiem ekstraktów bakteriocyn lub wytwarzających je

bakterii [26]. Do pomiaru wyżej wspomnianych wielkości wykorzystuje się proste metody turbidymetryczne. Zmiany kinetyki wzrostu szczepów testowych rejestrować można również metodami konduktometrycznymi, czyli mierząc przewodność elektryczną pożywek hodowlanych drobnoustrojów poddanych działaniu bakteriocyn [19].

Do szybkiego wykrywania i/lub oznaczania aktywności bakteriocyn mogą być także wykorzystywane inne bardziej specyficzne metody. Wśród nich wymienić należy spektrometrię masową [46] i immunoenzymatyczną metodę ELISA [5, 10]. Poważną wadą ostatniej z wymienionych grup metod, poza wysokim kosztem, jest jednak kompleksowanie przez przeciwciała także zdegradowanych i przez to nieaktywnych bakteriocyn oraz związków o zbliżonej do nich strukturze. Prowadzi to często do znacznego przeszacowania aktywności bakteriocyn w badanych próbach [10].

Nowoczesne metody skringingu bakteriocynogennych bakterii fermentacji mlekowej

W analizie mikrobiologicznej żywności i pracach skringingowych coraz częściej wykorzystuje się metody molekularne [43, 45]. Rozwój współczesnej biologii molekularnej i rozszerzająca się wiedza na temat genomów poszczególnych bakterii fermentacji mlekowej oraz innych drobnoustrojów występujących w żywności przyczyniły się do stworzenia badaczom nowych możliwości. Dzięki technikom biologii molekularnej możliwe stało się prowadzenie badań mikrobiologicznych bez konieczności izolacji drobnoustrojów oraz precyzyjne analizowanie ich potencjału genetycznego.

Stosując techniki biologii molekularnej już w chwili obecnej możliwe jest dokonanie szybkiej identyfikacji drobnoustrojów na poziomie rodzaju, a nawet gatunku oraz określanie ich zasobów genetycznych (oznaczanie obecności genów kodujących daną cechę) [43]. W celu określenia potencjału genetycznego LAB w aspekcie ich zdolności do syntezy bakteriocyn niezbędne jest przeprowadzenie badań nad obecnością sekwencji genów wybranych bakteriocyn, tj. prowadzenie analizy egzonów genów kodujących badane bakteriocyny. Badania takie mogą być wykonywane bezpośrednio *in situ* z zastosowaniem technik hybrydacyjnych lub po izolacji kwasów nukleinowych z komórek z użyciem technik PCR (tab. 4).

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH)

Metoda fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, czyli tzw. metoda FISH, pozwala na szybkie wykrywanie nawet pojedynczych komórek badanych drobnoustrojów w ich naturalnym środowisku, dzięki hybrydyzacji sondy oligonukleotydowej z fragmentem ich genomu bądź transkryptomu [36]. W metodzie FISH wykorzystuje się sondy molekularne, zwykle o długości od 15 do 30 nukleotydów, znakowane bezpośrednio cząsteczką fluorochromu na jednym bądź z obu końców. Do najczęściej stosowanych znaczników fluorescencyjnych należą pochodne fluoresceiny (np. FITC), pochodne rodaminy (np. TRITC), Texas Red oraz barwniki karbocyjaninowe (np. Cy3 i Cy5).

Sondy można także znakować pośrednio poprzez wiązanie cząsteczki reporterowej (np. digoksygenina) ze znakowanymi fluorescencyjne specyficznymi przeciwciałami [36].

Tabela 4

Nowoczesne metody skriningu bakteriocynogennych LAB.
Novel methods to screen bacteriocinogenic LAB.

Procedura I / Procedure I	Procedura II / Procedure II
Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> (FISH) Fluorescent hybridisation <i>in situ</i> (FISH)	Analiza metagenomowa na podstawie reakcji PCR Metagenomic analysis based on PCR reactions
Wybór przedmiotu badań / Selecting the research material	
Pobranie prób i wymycie znajdujących się w nich drobnoustrojów Collecting samples and washing away microorganisms present in them	
Permeabilizacja komórek mikroorganizmów występujących w badanym środowisku Permeabilization of microbial cells present in the studied habitat	Izolacja meta-DNA całej populacji mikroorganizmów występujących w badanym środowisku Isolation of meta-DNA from the whole population of microorganisms present in the studied habitat
Hybrydyzacja ze znakowanymi fluorescencyjnie sondami specyficznymi dla wybranych grup LAB oraz z sondami specyficznymi dla genów badanych (różnych) bakteriocyn Hybridization with fluorescent probes specific for the selected LAB groups and with probes specific for genes of the studied (different) bacteriocins	PCR z pojedynczymi starterami lub zestawami uniwersalnych starterów dla wybranych grup LAB oraz ze starterami zaprojektowanymi dla genów badanych (różnych) bakteriocyn PCR with single starters or with kits of universal starters for the selected LAB groups as well as with starters designed for genes of the studied (different) bacteriocins
Detekcja sygnału fluorescencyjnego Detecting fluorescent signal	Rozdział elektroforetyczny produktów PCR Electroforetic separation of PCR products
Stwierdzenie obecności określonych grup bakteriocynogennych LAB w obrębie badanej populacji Verifying the presence of the definite groups of bacteriocinogenic LAB within the studied population	
Wytypowanie do dalszych badań środowisk bogatych w LAB będących potencjalnymi producentami bakteriocyn / Marking out habitats rich in LAB that are potential bacteriocin producers, for further studies	
Wyprowadzenie monokultur LAB, w genomie których wykryto geny badanych bakteriocyn czyli LAB będących potencjalnymi producentami bakteriocyn / Obtaining LAB monocultures with genes of the relevant bacteriocins detected within their genome, i. e. LAB that are potential bacteriocin producers	
Badanie ekspresji genów bakteriocyn metodami hodowlanymi Studying the of expression of bacteriocin genes with the use of culturing methods	
Potwierdzenie zdolności pozyskanych kultur LAB do biosyntezy bakteriocyn Confirming the ability of LAB cultures acquired to biosynthesize bacteriocins	

Źródło: opracowanie własne / Source: the authors' own study

Dzięki wykorzystywaniu odpowiednio dobranych i wyznakowanych fluorescencyjnie sond możliwa jest bezpośrednia detekcja badanych mikroorganizmów i/lub określonych ich genów przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego bądź cytometru przepływowego. W toku jednej analizy możliwe jest ponadto stosowanie kilku różnobarwnych fluorochromów, co pozwala na dokonanie równoczesnej detekcji wybranej cechy genetycznej u kilku grup (rodzajów lub gatunków) mikroorganizmów.

Specyficzność hybrydyzacji jest uzależniona od sekwencji stosowanej sondy [11]. Sekwencją docelową hybrydyzacji w badaniach nad potencjałem bakteriocynogennym LAB jest sekwencja kodująca propeptyd bakteriocyny. Standardowe postępowanie w tego typu analizach obejmuje wstępne przygotowanie i permeabilizację badanych komórek, hybrydyzację, wymywanie nadmiaru niezwiązanej sondy oraz detekcję sygnału.

Molekularna identyfikacja techniką FISH mikroorganizmów bakteriocynogennych może być prowadzona równocześnie z analizą filogenetyczną sekwencji rDNA, głównie genu kodującego 16S rRNA, czyli cząsteczki, która wchodzi w skład małej podjednostki rybosomu prokariotycznego. Gen ten występuje u wszystkich organizmów prokariotycznych, a stopień zróżnicowania jego sekwencji jest wprost proporcjonalny do dystansu filogenetycznego między badanymi mikroorganizmami. Obecnie w bazach danych zgromadzono kilkadziesiąt tysięcy wpisów sekwencji tego genu, co umożliwia precyzyjne zidentyfikowanie wielu gatunków mikroorganizmów. W toku jednej analizy można stosować wiele różnokolorowych sond molekularnych, co pozwala na uwidocznienie i identyfikację kilku grup mikroorganizmów równocześnie [2].

Technika FISH może z być z powodzeniem stosowana do wstępnych prac skryningowych i wykrywania w obrębie mikroflory produktów spożywczych bakterii zdolnych do syntezy bakteriocyn. W analizach takich można wykorzystywać jednocześnie znakowane fluorescencyjnie sondy molekularne specyficzne dla wybranych grup lub rodzajów bakterii fermentacji mlekowej oraz sondy specyficzne dla genów bakteriocyn. Zaprojektowanie sondy specyficznej dla genów kodujących bakteriocyny wiąże się z koniecznością wykonania analizy komputerowej sekwencji wszystkich znanych bakteriocyn o konkretnej aktywności. Przykładowo, listeriobójcze bakteriocyny klasy IIa zawierają w swej strukturze charakterystyczny motyw aminokwasowy Tyr-Gly-Asn-Gly-Val, który przekłada się na podobieństwo w sekwencji genów tych bakteriocyn [18]. W celu zaprojektowania i przygotowania sondy do wykrywania bakteriocyn listeriobójczych niezbędne jest wyszukanie sekwencji genów poszczególnych bakteriocyn klasy IIa w internetowych bazach danych, takich jak GenBank, wyodrębnienie sekwencji kodujących w obrębie badanych genów, porównanie ich pod względem długości i przygotowanie tzw. „*alignment*” – sekwencji kodujących genów w celu uzyskania informacji o charakterze motywów zachowawczych. Po tak przeprowadzonych analizach możliwe jest zaprojektowanie sond molekularnych i dokonanie optymalizacji warunków hybrydyzacji *in situ*. Ważne jest jednak, aby zarówno sondy dla

genów bakteriocyn, jak i uniwersalne sondy dla wybranych grup bakterii fermentacji mlekowej miały zbliżoną temperaturę topnienia (T_m). Jedynie wtedy możliwe jest prowadzenie jednoczesnej hybrydyzacji wykrywającej sekwencje genów bakteriocyn i hybrydyzacji wskazującej na obecność poszukiwanych grup LAB. W rezultacie metoda FISH pozwala na wykrycie w obrębie badanej populacji mikroorganizmów bakterii fermentacji mlekowej będących potencjalnymi producentami bakteriocyn. Może być ona również przydatna do typowania środowisk bogatych w bakteriocynogenne LAB, które będą przedmiotem dalszego skringu.

Metoda FISH nie jest wolna od wad. Po pierwsze, w przypadku stosowania sond zdegenerowanych, tj. sond o częściowo losowej sekwencji, a tym samym o niższym stopniu podobieństwa w stosunku do sekwencji docelowych (szukanych) istnieje potrzeba obniżenia temperatury hybrydyzacji sondy, co może skutkować obniżeniem specyficzności hybrydyzacji. Nie wszystkie komórki bakteryjne ulegają ponadto permeabilizacji przeprowadzanej według powszechnie stosowanych protokołów. Co więcej, wykorzystanie sondy w przypadku cząsteczki 16S rRNA, znakowanej na jednym końcu, ogranicza wykorzystanie techniki FISH wyłącznie do identyfikacji bakterii o małej liczbie rybosomów. Dodatkowe trudności może wywoływać także konieczność dostosowywania warunków hybrydyzacji dla szczepów nowoodkrytych. Czynnikiem wpływającym na efektywność hybrydyzacji jest również struktura rybosomu. W przypadku rybosomów o zwartej strukturze, zdarza się, że zdolność sondy molekularnej do hybrydyzacji obniża się, a to w efekcie powoduje wyniki fałszywie negatywne [54].

Analiza metagenomowa wykorzystująca techniki PCR

Do szybkiej oceny zasobów genetycznych mikroflory żywności może być także stosowana analiza metagenomowa. Polega ona na izolacji meta-DNA z całej populacji mikroorganizmów zasiedlających dane środowisko, a następnie na jego ocenie pod względem obecności wybranych genów, bez konieczności prowadzenia wcześniejszych hodowli [15, 49]. Analiza metagenomowa pozwala na szybkie wytypowanie środowisk, w których badany gen występuje w dużej liczbie kopii, co z kolei zwiększa szansę na wyizolowanie z nich mikroorganizmów będących nośnikami tego genu.

Poszukiwanie bakteriocynogennych LAB na podstawie analizy meta-DNA umożliwia wskazanie najlepszych źródeł bakterii zawierających geny poszukiwanych bakteriocyn. Dzięki analizie metagenomowej możliwe jest ponadto wykrycie w danym środowisku bakteriocynogennych LAB, dla których jak dotąd nie opracowano podłoży i metod hodowli (ang. *unculturable microorganisms*).

Do wykrywania w meta-DNA genów bakteriocyn wykorzystuje się zwykle techniki PCR i startery znanych, opisanych w literaturze sekwencji bakteriocyn lub startery zdegenerowane, zaprojektowane na podstawie analizy podobieństw sekwencji genów mających ulec amplifikacji. Startery takie zawierają w swej strukturze nukleotydy losowo

wprowadzone podczas syntezy [45]. Najczęściej w reakcjach PCR wykorzystuje się jedną parę starterów. Amplifikacji ulega wtedy pojedynczy fragment nici DNA (gen jednej bakteriocyny). W celu wykrycia w następstwie pojedynczej reakcji PCR genów wielu bakteriocyn można wykorzystywać także zestawy starterów zaprojektowanych dla genów kodujących różne bakteriocyny [35]. W przypadku analizy PCR – Multiplex, startery do reakcji PCR mogą być zaprojektowane w taki sposób, by umożliwić amplifikację genów wszystkich dotychczas poznanych bakteriocyn. Dzięki temu na podstawie analizy obrazu elektroforetycznego produktów PCR można następnie wnioskować o obecności genów różnych bakteriocyn w obrębie badanej populacji drobnoustrojów.

Z uwagi na to, że analiza metagenomowa obejmuje DNA wyizolowane z całej populacji mikroorganizmów danego środowiska, a więc podlegają jej zarówno bakterie hodowalne w warunkach laboratoryjnych, drobnoustroje, dla których nie opracowano jeszcze metod hodowlanych, jak również bakterie martwe, w jej wyniku można uzyskać kompleksowe informacje na temat występowania potencjalnych producentów bakteriocyn w żywności. Informacje te mogą być pomocne w pracach skringowych, a także powinny ułatwić badania nad rolą jaką w żywności spełniają drobnoustroje, dla których jak dotąd nie opracowano podłoży hodowlanych, czyli drobnoustroje, których nie udało się jeszcze wyizolować metodami tradycyjnymi.

Podsumowanie

Metody molekularne są podstawą nowoczesnych procedur skringowych. Pozwalają na szybkie i precyzyjne typowanie środowisk będących źródłem potencjalnych producentów bakteriocyn bez potrzeby przeprowadzania ich hodowli. Stosowanie ich zwiększa zatem szansę na wyizolowanie z danego środowiska drobnoustrojów zdolnych do syntezy aktywnych bakteriocyn. Dzięki technikom molekularnym możliwe jest również ograniczenie nakładów pracy związanych z tradycyjnymi procedurami izolacyjnymi. Procedury te zakładają bowiem intuicyjny wybór źródła izolacji. Popełnianie błędów na tym etapie badań jest najczęściej przyczyną niskiej efektywności prac skringowych prowadzonych w tradycyjny sposób.

Stosowanie technik molekularnych podczas początkowych etapów skringu pozwala także na jakościową ocenę struktury populacji mikroorganizmów danego środowiska. Metody molekularne mogą zatem służyć do szybkiej wstępnej detekcji określonych grup drobnoustrojów oraz typowania tych, które zawierają poszukiwane geny. Uzupelnienie tradycyjnych procedur poszukiwania bakteriocynogennych LAB o metody molekularne może dostarczyć też wielu informacji o charakterze poznawczym. Dzięki nim możliwa jest detekcja nowych drobnoustrojów oraz badanie roli jaką spełniają one w ekosystemach. Wielu drobnoustrojów nie można bowiem nadal pozyskać ze środowiska naturalnego z uwagi na brak odpowiednich metod hodowlanych. Metody molekularne mogą być więc dobrym uzupełnieniem tradycyjnych procedur skringowych. Nie są one

jednak pozbawione wad. Do najważniejszych należy zaliczyć błędy generowane przez technikę PCR oraz niską detekcję mikroorganizmów słabo reprezentowanych w danej populacji. Istnieje również prawdopodobieństwo uzyskiwania wyników błędnie dodatnich w rezultacie uwzględnienia obecności mikroorganizmów martwych, których fragmenty DNA uległy amplifikacji techniką PCR [23]. Najważniejsze informacje dotyczące tradycyjnych i nowoczesnych metod skriningu bakteriocynogennych LAB w syntetyczny sposób przedstawiono w tab. 5.

Tabela 5

Porównanie tradycyjnych i nowoczesnych metod skriningu bakteriocynogennych LAB.
Comparing the conventional and novel methods to screen bacteriocinogenic LAB.

Wyszczególnienie Specification	Metody tradycyjne Conventional methods	Metody nowoczesne Novel methods
Wybór źródła izolacji Selecting the source of isolation	losowy random	potwierdzony wynikami badań molekularnych verified by the results of molecular research
Rozcieńczenie badanego materiału Diluting the investigated material	niezbędne indispensable	niekonieczne unnecessary
Najważniejszy etap skriningu The most important stage of the screening	pozyskanie czystych kultur LAB i ich hodowla acquiring pure cultures of LAB and culturing them	przeprowadzenie reakcji PCR i/lub badań metodą FISH conducting PCR reaction and/or FISH assay
Podstawa skriningu (główne metody stosowane podczas skriningu) Screening Basis (major methods used while screening)	metody hodowlane culturing methods	metody molekularne molecular methods
Stosowane narzędzia Tools applied	zwykle jedynie pożywki płynne i agarowe oraz drobnoustroje wskaźnikowe / usually only liquid and agar media as well as test microorganisms	sondy molekularne i/lub startery do reakcji PCR molecular probes and/or PCR starters
Podstawowe metody detekcji bakteriocyn / Basic methods of detecting bacteriocins	testy aktywności tests of activity	analiza sekwencji genów bakteriocyn bacteriocin gen sequence analysis
Rodzaj badanych drobnoustrojów Type of studied microorganisms	drobnoustroje hodowlalne culturable microorganisms	drobnoustroje zarówno hodowlalne jak i niehodowlalne both the culturable and non-culturable microorganisms
Pozyskanie monokultur we wstępnym etapie badań Acquiring monocultures at the preliminary stage of research	konieczne necessary	nieobligatoryjne non-obligatory

c.d. Tab. 5

Cel pierwszych etapów skryningu Aim of the first screening stages	pozyskanie monokultur acquiring monocultures	wytypowanie środowisk bogatych w LAB będące potencjalnymi producentami bakteriocyn marking out habitats rich in LAB that are potential bacteriocin producers
Możliwość jednoczesnej identyfikacji LAB i określenia ich potencjału bakteriocynowego Possibility of simultaneously identifying LAB and determining their bacteriocinogenic potential	nie istnieje does not exist	istnieje exists
Czułość i specyficzność metody Sensitivity and specificity of the method	niska low	wysoka high
Pracochłonność i czasochłonność metody Labour and time consumption of the method	duża high	mała low
Koszty Costs	relatywnie niskie relatively low	wysokie high
Efekt skryningu Effect of screening	pozyskanie LAB zdolnych do syntezy aktywnych bakteriocyn acquiring LAB able to synthesize active bacteriocins	pozyskanie LAB zdolnych do syntezy aktywnych bakteriocyn, wykazanie obecności w danym środowisku niehodowalnych bakteriocynogennych LAB, pozyskanie bakteriocynogennych LAB niezdolnych do syntezy aktywnych bakteriocyn czyli takich, w których genomie występują nie ulegające ekspresji geny bakteriocyn acquiring LAB able to synthesize active bacteriocins, verifying the presence of non-culturable bacteriocinogenic LAB in the relevant habitat, acquiring bacteriocinogenic LAB not capable of active bacteriocin synthesis, i.e. bacteria with genomes containing bacteriocin genes that do not undergo expression

Źródło: opracowanie własne / Source: the authors' own study

Reasumując, należy stwierdzić, że techniki biologii molekularnej pozwalają na skrócenie procedur skринingowych oraz gwarantują szybkie uzyskanie informacji o składzie jakościowym badanej populacji mikroorganizmów i jej potencjale genetycznym bez konieczności prowadzenia wstępnych izolacji i związanych z nimi hodowli. Hodowle przeprowadza się w dalszych etapach skринingu w celu ustalenia korelacji pomiędzy występowaniem wykrytych genów a cechami fenotypowymi (aktywnością) bakterii, które te geny mają.

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

Literatura

- [1] Abee T., Klaenhammer T.R., Letellier L.: Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 1006-1013.
- [2] Amann R., Fuchs, B.M., Behrens S.: The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001, **12**, 231-236.
- [3] Ben Belgacem Z., Ferchichi M., Prévost H., Dousset X., Manai M.: Screening for anti-listerial bacteriocin-producing lactic acid bacteria from "Gueddid" a traditionally Tunisian fermented meat. *Meat Sci.*, 2008, **78**, 513-521.
- [4] Bouksaim M., Fliss I., Meghrou J., Simard R. E., Lacroix C.: Immunodot detection of nisin Z in milk and whey using enhanced chemiluminescence. *J. Appl. Microbiol.*, 1998, **84**, 176-184.
- [5] Bouksaim M., Lacroix C., Audet P., Simard R.E.: Effects of mixed starter composition on nisin Z production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL 719 during production and ripening of Gouda cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **59**, 141-156.
- [6] Budde B.B., Rasch M.: A comparative study on the use of flow cytometry and colony forming units for assesment of the antibacterial effect of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, **63**, 65-72.
- [7] Cabo M.L., Murado M.A., González M.P., Pastoriza L.: A method for bacteriocin quantification. *J. Appl. Microbiol.*, 1999, **87**, 907-914.
- [8] Chen H., Hoover D.G.: Bacteriocins and their food applications. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 2003, **2**, 82-100.
- [9] Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., Chkindas M.L.: Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, **71**, 1-20.
- [10] Daoudi L., Turcotte C., Lacroix C., Fliss I.: Production and characterization of anti-nisin Z monoclonal antibodies: suitability for distinguishing active from inactive forms trough a competitive enzyme immunoassay. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **56**, 114-119.
- [11] De Boer E., Beumer R.R.: Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **50**, 119-130.
- [12] De la Fuente-Salcido N., Salcedo-Hernández R., Alanís-Guzmán Ma. G., Bideshi D.K., Barboza-Corona J.E.: A new rapid fluorogenic method for measuring bacteriocin activity. *J. Microbiol. Methods*, 2007, **70**, 196-199.

- [13] De Martinis E.C.P., Públio M.R.P., Santarosa P.R., Freitas F.Z.: Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. *Brazilian J. Microbiol.*, 2001, **32**, 32-37.
- [14] De Vos W.M., Mulders J.W.M., Siezen R.J., Hugenholtz J., Kuipers O.P.: Properties of nisin Z and distribution of its gene, *nisZ*, in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 213-218.
- [15] Deja-Sikora E., Sikora M., Golebiewski M., Tretyn A.: Metagenomic libraries as sources of genes useful for biotechnology. *Biotechnol.*, 2007, **4**, 125-139.
- [16] Delgado A., Brito D., Fevereiro P., Tenreiro R., Peres C.: Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions. *J. Microbiol. Methods*, 2005, **62**, 121-124.
- [17] Dewan S., Tamang J.P.: Dominant lactic acid bacteria and their technological properties isolated from the Himalayan ethnic fermented milk products. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2007, **92**, 343-352.
- [18] Eijsink V. G. H., Skeie M., Middelhoven P. H., Brurberg M. B., Nes I. F.: Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**, 3275-3281.
- [19] Font de Valdez G., Lorca G., Taranto M.P.: Conductimetric method for evaluating inhibition of *Listeria monocytogenes*. In: *Food Microbiology Protocols* - ed. by Spencer J. F. T. i Ragout de Spencer A.L., Humana Press, 2001, 55-59.
- [20] Franz C.M.A., Du Toit M., von Holy A., Schillinger U., Holzapfel W.H.: Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables. *J. Basic Microbiol.*, 1997, **37**, 187-196.
- [21] Galvez A., Abriouel H., Lopez R.L., Omar N.B.: Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, **12**, 51-70.
- [22] Ghrairi T., Manai M., Berjeaud J.M., Frère J.: Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a traditional Tunisian cheese. *J. Appl. Microbiol.*, 2004, **97**, 621-628.
- [23] Giraffa G., Neviani E.: DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **67**, 19-34.
- [24] Hastings J., Baldwin T., Nicoli M.: Bacterial luciferase: assay, purification and properties. *Methods Enzymol.*, 1978, **57**, 135-152.
- [25] Hécharid Y., Sahl H.G.: Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from gram-positive bacteria. *Biochimie*, 2002, **84**, 545-557.
- [26] Holck A., Axelsson L., Schillinger U.: Divergicin 750, a novel bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* 750. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1996, **136**, 163-168.
- [27] Hoover D.G., Dishert K.J., Hermes M.A.: Antagonistic effect of *Pediococcus* spp. against *Listeria monocytogenes*. *Food Biotechnol.*, 1989, **3**, 183 - 196.
- [28] Hoover D.G., Harlander S.K.: Screening methods for detecting bacteriocin activity. In: *Bacteriocins of lactic acid bacteria* - ed. by Hoover D.G., Steenson L.R., Food Science and Technology, Academic Press, 1993, pp. 23-39.
- [29] Jack R.W., Tagg J.R., Ray B.: Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, 1995, **59**, 171-200.
- [30] Klaenhammer T.R.: Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1993, **12**, 39-86.
- [31] Kraszewska J., Wzorek W., Sztando E., Raczyńska-Cabaj A.: Aktywność antagonistyczna bakterii fermentacji mlekowej z gatunku *Lactobacillus plantarum*. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 2005, **4**, 39-52.
- [32] McElroy W., DeLuca M.: Firefly luminescence. In: *Chemi- and bioluminescence* - ed. by Burr J., Marcell Dekker, New York, 1985, pp. 387-399.
- [33] Messi P., Bondi M., Sabia C., Battini R., Manicardi G.: Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, **64**, 193-198.


- [34] Morgan S., Ross R.P., Hill C.: Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococcins A, B and M. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61**, 2995-3001.
- [35] Moschetti G., Blaiotta G., Villani F., Copolla S.: Nisin-producing organisms during traditional "Fior di latte" cheese-making monitored by multiplex-PCR and PFGE analyses. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, **63**, 109-116.
- [36] Moter A., Goebel U.B.: Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods*, 2000, **41**, 85-112.
- [37] Mugochoi T., Nandakumar M.P., Zvauya R., Mattiasson B.: Bioassay for the rapid detection of bacteriocins in fermentation broth. *Biotech. Lett.*, 2001, **23**, 1243-1247.
- [38] Muriana P.M., Luchansky J.B.: Biochemical methods for purification of bacteriocins. In: *Bacteriocins of lactic acid bacteria* - ed. by Hoover D.G., Steenson L.R., Food Science and Technology, Academic Press, 1993, pp. 41-61.
- [39] Ohmomo S., Nitisingprasart S., Hiranpradit S.: How to screen favorable lactic acid bacteria strain, from the case of bacteriocin producing strain and silage fermentation starter strain. The world of indigenous fermented foods for technology development and food safety. 1-6. Kasetsart University, Bangkok, August, 2003. Proceeding CD-ROM
- [40] O'Sullivan R., Ross R.P., Hill C.: Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 2002, **84**, 593-604.
- [41] Papagianni M., Avramidis N., Filioussis G., Dasiou D., Ambrosiadis I.: Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assessing the factor "indicator microorganism". *Microb. Cell Factories*, 2006, **5**, 30-44.
- [42] Parente E., Hill C.: Characterisation of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 1992, **55**, 497-502.
- [43] Poeta P., Costa D., Rojo-Bezares B., Zarazaga M., Klibi N., Rodrigues J., Torres C.: Detection of antimicrobial activities and bacteriocin structural genes in faecal *enterococci* of wild animals. *Microbiol Res.*, 2007, **162**, 257-263.
- [44] Robertson A., Tirado C., Lobstein T., Jeremini M., Knai C., Jensen H.J., Ferro-Luzzi A., James W.P.T.: *Food and health in Europe: a new basis for action*. WHO Regional Publications, European Series, 2004, vol. **96**, Geneva.
- [45] Rodriguez J.M., Cintas L.M., Casaus P., Suarez A., Hernandez P.E.: PCR detection of the lactocin S structural gene in bacteriocin-producing *Lactobacilli* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61**, 2802-2805.
- [46] Rose N.L., Sporns P., McMullen L.M.: Detection of bacteriocins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 2238-2242.
- [47] Sabia C., Messi P., de Niederhäusern S., Manicardi G., Bondi M.: Study of two bacteriocins produced by *Enterococcus casseliflavus* and *Ent. faecalis*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2004, **38**, 99-105.
- [48] Simon L., Fremaux C., Cenatiempo Y., Berjeaud J.-M.: Luminescent method for the detection of antibacterial activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **57**, 757-763.
- [49] Streit W.R., Schmitz R.A.: Metagenomics – the key to the uncultured microbes. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2004, **7**, 492-498.
- [50] Strus M.: Nowa metoda oceny antagonistycznego działania bakterii kwasu mlekowego (LAB) na wybrane, chorobotwórcze bakterie wskaźnikowe. *Med. Dośw. Microbiol.*, 1998, **50**, 123-130.
- [51] Temmerman R., Huys G., Swings J.: Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends Food Sci. Technol.*, 2004, **15**, 348-359.
- [52] Todorov S.D., Dicks L.M.T.: Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. Comparison of the bacteriocins. *Process Biochem.*, 2006, **41**, 11-19.

- [53] Vesterlund S., Palta J., Lauková A., Karp M., Ouwehand A.C.: Rapid screening method for the detection of antimicrobial substances. *J. Microbiol. Methods*, 2004, **57**, 23-31.
- [54] Wagner M., Horn M., Daims H.: Fluorescence *in situ* hybridization for the identification and characterization of prokaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2003, **6**, 302-309.
- [55] Wahlström G., Saris P.E.J.: A nisin bioassay based on bioluminescence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 3742-3745.
- [56] Wolf C.E., Gibbons W.R.: Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. *J. Appl. Bacteriol.*, 1996, **80**, 453-457.

METHODS TO SCREEN BACTERIOCIINOGENIC LACTIC ACID BACTERIA

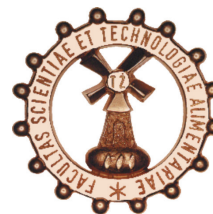
S u m m a r y

In this paper, some screening methods to detect LAB able to synthesize bacteriocins were discussed. Three conventional screening procedures were presented. Furthermore, the methods to identify LAB and to detect bacteriocins produce by LAB were described. The complex (multipronged) character of conventional screening procedures was emphasized and the reasons for their low effectiveness were explained. In addition, the role of both the metagenomic analysis and the fluorescent hybridization *in situ* in screening procedures was detailed. It was emphasized that those techniques might be applied at initial screening stages to determine habitats rich in bacteriocinogenic LAB, thereby increasing the probability of isolating the bacteriocin-producing microorganisms from natural systems. In the final part of the paper, the conventional and novel screening procedures were compared.

Key words: bacteriocins, screening, lactic acid bacteria, methods to assay bacteriocins 



POLSKIE TOWARZYSTWO
TECHNOLOGÓW ŻYWNOŚCI
ODDZIAŁ MAŁOPOLSKI



**POLSKIE TOWARZYSTWO
TECHNOLOGÓW ŻYWNOŚCI
ODDZIAŁ MAŁOPOLSKI**

**WYDZIAŁ
TECHNOLOGII ŻYWNOŚCI
UNIwersYTETU ROLNICZEGO
IM. HUGONA KOŁŁATAJA
W KRAKOWIE**

KOMITET NAUK O ŻYWNOŚCI PAN

**zapraszają na
IX Konferencję Naukową
z cyklu
„Żywność XXI wieku”**

ŻYWNOŚĆ WZBOGACONA I NUTRACEUTYKI

Kraków, 18-19 czerwca 2009

Kontakt:

Dr inż. Anna Korus, e-mail: akorus@ar.krakow.pl

Dr hab. inż. Piotr Gębczyński, e-mail: rrgebczy@cyf-kr.edu.pl