

*Dziękuję mojemu Promotorowi Profesorowi  
dr hab. inż. Sławomirowi Milewskiemu  
za pomoc merytoryczną podczas prowadzenia badań  
oraz nieocenione wskazówki udzielane  
podczas redagowania pracy doktorskiej.  
Chciałabym szczególnie podziękować  
dr inż. Piotrowi Szwedzie za ogromną pomoc  
i wsparcie w realizacji niniejszej pracy.  
Jestem również ogromnie wdzięczna za  
cierpliwość i wiarę mojemu ukochanemu Tomaszowi  
oraz Rodzinie,  
Chciałabym również serdecznie podziękować  
Profesorowi Randy'emu Worobo  
za możliwość odbycia stażu w jego grupie  
badawczej i zdobycia ogromnego doświadczenia.*

## SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów.....	6
Streszczenie .....	7
Abstract.....	9
Cel i zakres pracy.....	11
Wstęp teoretyczny.....	13
1. Gronkowce jako organizmy patogenne .....	15
1.1. Czynniki patogenności gronkowców.....	16
1.2. Chemoterapeutyki stosowane w leczeniu infekcji powodowanych przez gronkowce .....	17
1.3. Oporność gronkowców na antybiotyki .....	18
1.4. Potencjalne alternatywne sposoby leczenia infekcji pochodzenia gronkowcowego .....	23
1.4.1. Nowe potencjalne chemoterapeutyki przeciwgronkowcowe.....	25
1.4.2. Alternatywne sposoby terapii.....	25
1.4.3. Strategie wspomagające .....	26
2. Bakteriocyny .....	27
2.1. Klasyfikacja bakteriocyn.....	28
2.2 Sposób działania bakteriocyn .....	31
2.2.1. Mechanizmy działania kilku wybranych bakteriocyn .....	33
2.3. Organizacja genów kodujących bakteriocynę .....	35
2.4. Oporność szczepów producenckich na produkowane przez nie bakteriocyny.....	36
2.5. Zastosowanie bakteriocyn .....	36
2.6. Przykłady bakteriocyn o aktywności gronkowcobójczej.....	42
Materiały.....	47
1. Szczepy bakteryjne.....	47
1.1. Szczepy wzorcowe (muzealne) .....	47
1.2. Izolaty kliniczne i weterynaryjne .....	47
2. Podłoża.....	48
2.1. Podłoża płynne.....	48
2.2. Podłoża stałe .....	49
3. Odczynniki.....	49
4. Sprzęt laboratoryjny .....	50

4.1. Aparatura .....	50
4.2. Materiały jednorazowego użytku .....	50
Metody.....	52
1. Hodowle bakteryjne.....	52
2. Przygotowanie inokulum .....	52
3. Wyznaczanie parametru MIC (minimalne stężenie powodujące zahamowanie wzrostu) .....	52
4. Elektroforeza agarozowa .....	53
5. Identyfikacja szczepów produkujących bakteriocyny - badania przesiewowe .....	53
5.1. Identyfikacja szczepów produkujących bakteriocyny.....	53
5.2. Test podatności produkowanego związku bakteriobójczego na działanie proteaz .....	55
5.3. Określenie spektrum aktywności bakteriocyny .....	55
5.4. Optymalizacja warunków produkcji bakteriocyny .....	56
5.5. Określenie wrażliwości bakteriocyny na temperaturę .....	58
5.6. Procedura izolacji bakteriocyny .....	58
5.6.1. Frakcjonowane wysalanie z zastosowaniem siarczanu amonu.....	58
5.6.2. Chromatografia kolumnowa oddziaływań hydrofobowych .....	58
5.6.3. Zagęszczanie frakcji etanolu .....	60
5.6.4. Oczyszczanie przy wykorzystaniu chromatografii wysokociśnieniowej w układzie faz odwróconych RP-HPLC.....	60
5.7. Sprawdzenie wpływu składników fazy ruchomej na aktywność bakteriobójczą preparatu białkowego poddawanego oczyszczaniu .....	61
5.8. Oczyszczanie przy wykorzystaniu chromatografii rozmiarów wykluczających w systemie FPLC .....	62
5.9. Analiza elektroforetyczna i detekcja aktywności bakteriobójczej peptydu z zastosowaniem Tricine SDS-PAGE .....	63
5.9.1. Przygotowanie żelu Tricine SDS-PAGE składającego się z trzech warstw .....	63
5.9.2. Procedura.....	64
5.9.3. Bufory do przeprowadzenia elektroforezy .....	65
5.9.4. Procedura przygotowania żelu Tricine SDS-PAGE do identyfikacji obecności bakteriocyny manifestującej się poprzez strefę przejaśnienia lub zahamowania wzrostu .....	66

5.10. Elektroblotting oraz sekwencjonowanie N-końca bakteriocy (degradacja Edmana).....	67
5.10.1. Bufory i roztwory wykorzystywane w technice Western Blotting .....	67
5.10.2. Przebieg elektroblottingu .....	68
5.10.3. Sekwencjonowanie N-końca peptydu .....	69
5.11. Charakterystyka peptydu z zastosowaniem spektrometrii mas (MALDI TOF) .....	69
5.12. Identyfikacja szczepu produkcyjnego poprzez sekwencjonowanie podjednostki 16S rRNA .....	70
5.12.1. Przygotowanie próbki do sekwencjonowania .....	70
5.13. Izolacja genomowego DNA <i>S. xylosus</i> .....	71
5.14. Sekwencjonowanie genomu szczepu produkcyjnego <i>S. xylosus</i> połączone z próbą poznania sekwencji genu kodującej bakteriocy .....	71
Wyniki i dyskusja.....	72
1. Badania przesiewowe ukierunkowane na identyfikację szczepów produkujących substancję o działaniu przeciwbakteryjnym, w tym bakteriocy .....	73
1.1. Identyfikacja szczepów produkujących substancje o działaniu przeciwbakteryjnym, w tym bakteriocy .....	73
1.2. Identyfikacja szczepów produkujących substancje przeciwbakteryjne o strukturze peptydowej i białkowej.....	75
2. Sprawdzenie wrażliwości produkcji bakteriocy w podłożu płynnym .....	77
3. Określenie kinetyki wzrostu szczepu M2B i produkcji bakteriocy przez komórki tego szczepu.....	79
4. Określenie spektrum aktywności bakteriocy.....	79
5. Optymalizacja warunków produkcji bakteriocy .....	81
6. Określenie termostabilności bakteriocy .....	81
7. Oczyszczanie bakteriocy.....	82
7.1. Frakcjonowanie wysalanie.....	85
7.2. Oczyszczanie bakteriocy z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC).....	85
7.3. Oczyszczanie bakteriocy z zastosowaniem HPLC.....	91
7.4. Oczyszczanie bakteriocy z zastosowaniem FPLC .....	100
8. Badania mające na celu poznanie struktury peptydu .....	102

8.1. Określenie przybliżonej masy peptydu z zastosowaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym Tricine SDS-PAGE .....	102
8.2. Sekwencjonowanie N-końca bakteriocyny metodą Edmana .....	106
8.3. Charakterystyka strukturalna peptydu z wykorzystaniem spektrometrii mas.....	108
9. Próba identyfikacji genu kodującego bakteriocynę.....	115
Podsumowanie i wnioski ogólne .....	117
Załącznik nr 1 .....	122
Literatura .....	123
Dorobek naukowy .....	136

## WYKAZ SKRÓTÓW

ACN	acetonitryl
APS	nadsiarczan amonu ang. <i>ammonium persulfate</i>
ATCC	amerykańska kolekcja kultur komórkowych, ang. <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	podłoże płynne Brain-Heart Infusion
CAA	podłoże płynne Casamino Acid
CFU	jednostka tworząca kolonię, ang. <i>colony-forming unit</i>
CH	podłoże stałe Mannitol Salt Agar (Chapman)
CLSI	instytut ds. Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych, ang. <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CV	objętość martwa kolumny chromatograficznej
FPLC	szybka biała chromatografia cieczowa ang. <i>fast protein liquid chromatography</i>
HIC	chromatografia oddziaływań hydrofobowych ang. <i>hydrophobic interaction chromatography</i>
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa ang. <i>high-performance liquid chromatography</i>
LA	podłoże stałe Luria-Bertani Agar
LB	podłoże płynne Luria Bertani Broth
MHA	podłoże stałe Mueller-Hinton Agar
MHB	podłoże płynne Mueller-Hinton Broth
MHB2	podłoże płynne Muller Hinton Broth 2 (Cation Adjusted Muller Hinton Broth)
MIC	minimalne stężenie hamujące wzrost, ang. <i>minimal inhibitory concentration</i>
MIC <sub>90</sub>	minimalne stężenie hamujące wzrost w 90% w stosunku do kontroli hodowli
OD <sub>600</sub>	gęstość optyczna mierzona przy długości fali $\lambda = 600$ nm, ang. <i>optical density</i>
PCM	polska kolekcja mikroorganizmów ang. <i>Polish Collection of Microorganisms</i>
PBS	bufor fosforanowy, ang. <i>potassiun buffer saline</i>
RP-HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych ang. <i>reversed phase high-performance liquid chromatography</i>
soft agar	podłoże ze zmniejszoną ilością agaro 0,75%
PES	polieterosulfon
PVDF	polifluorek winylidenu
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina
TFA	kwas trifluoroctowy
TSA	podłoże stałe Tryptic Soy Agar
TSB	podłoże płynne Tryptic Soy Broth

## STRESZCZENIE

Celem badań prowadzonych w ramach realizacji niniejszej pracy była identyfikacja szczepów bakterii z rodzaju *Staphylococcus* produkujących substancje o działaniu przeciwbakteryjnym, w tym szczególnie bakteriocynty. W trakcie badań przesiewowych, których przedmiotem było 206 szczepów z kolekcji Katedry Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej z gatunków *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* oraz *Staphylococcus xylosus* zidentyfikowano 6 szczepów produkujących substancje o działaniu przeciwbakteryjnym, w tym 3 o przypuszczalnej strukturze peptydowej. Dokonano identyfikacji jednej przypuszczanej bakteriocynty o aktywności gronkowcobójczej, produkowanej przez szczep *Staphylococcus xylosus* M2B. Zoptymalizowano warunki produkcji tej substancji, wytwarzanej najefektywniej w późnej logarytmicznej i wczesnej stacjonarnej fazie wzrostu komórek szczepu produkcyjnego, w pożywce Tryptic Soy Broth, w temperaturze 37 °C, w objętości hodowli 100 mL. Przeprowadzono wstępną charakterystykę jej właściwości biologicznych. Substancja wykazuje aktywność względem szczepów *Staphylococcus* spp. pozyskanych od bydła chorego na mastitis, jest także aktywna względem powszechnie występujących patogenów żywności takich, jak *Listeria monocytogenes* czy *Micrococcus luteus*. Peptyd charakteryzuje się wysoką termostabilnością, m.in. zachowuje aktywność biologiczną po 15 minutach inkubacji w temp. 90°C.

Opracowano metodę wstępnej izolacji peptydu z zastosowaniem frakcjonowanego wysalania, chromatografii oddziaływań hydrofobowych i chromatografii rozmiarów wykluczających. Podczas przeprowadzania ostatniego z wymienionych etapów, substancja traci aktywność przeciwbakteryjną. Podobne zjawisko zaobserwowano podczas separacji z zastosowaniem HPLC.

Uzyskano szereg informacji o strukturze badanej substancji, wykorzystując w tym celu preparat izolowany w wyniku elektroforezy. Badana substancja jest peptydem składającym się z jednego łańcucha polipeptydowego. W strukturze brak mostków disiarczkowych. Peptyd ma charakter silnie hydrofobowy, co wskazuje na dominujący udział w strukturze aminokwasów alifatycznych. Masa cząsteczkowa badanej substancji wynosi 4,461 kDa, a sekwencję aminokwasową N-końca określono

jako Asn-Ile-Pro-Gln-Leu-Thr-Gln-Thr-Leu-Val. Wyniki analizy MS/MS oraz utrata aktywności podczas chromatografii rozmiarów wykluczających wskazują na możliwość występowania w strukturze badanej substancji elementów niebiałkowych, takich jak: podstawnik(i) cukrowy(e) oraz małowcząsteczkowy ligand, np. jon metalu. Brak sekwencji nukleotydowej mogącej kodować N-końcowy fragment peptydowy badanej substancji w genomie *S. xylosus* M2B wskazuje na nierybosomalny charakter biosyntezy tego peptydu.



## ABSTRACT

The aim of this study was to identify bacterial strains from the *Staphylococcus* species that produce substances exhibiting antibacterial properties (especially bacteriocins). As a result of the screening studies, six strains were identified as producers, and three of the produced compounds were considered peptidic antimicrobials. The studies have been performed on 206 strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus xylosus* species, from the collection of the Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry at Gdansk University of Technology. Among the three putative peptide antimicrobials, the one potential bacteriocin with antistaphylococcal activity was identified, produced by the *Staphylococcus xylosus* M2B strain. The conditions of the bacteriocin production were optimized (Tryptic Soy Broth medium, 37 °C 100 mL). The late log phase and the early stationary phase were identified as the ones with the highest level of bacteriocin production. The initial characterization of the biological activity of the potential bacteriocin revealed that the compound was active against the *Staphylococcus* spp. strains isolated from the bovine suffering from mastitis, and against the common food pathogens such as *Listeria monocytogenes* or *Micrococcus luteus*. The peptide is highly thermostable - it sustains its antimicrobial activity after 15 minute incubation at 90°C.

The initial purification of the peptide includes the fractionated salting out, the hydrophobic interaction chromatography and the size exclusion chromatography. During the last step of the purification, the compound tend to lose its antibacterial activity. A similar observation was made concerning the HPLC separation.

A number of structural information were obtained from the samples from the electrophoresis bacteriocin isolation. The studied compound is a single chain polypeptide without any disulfide bonds in its structure. The peptide is probably strongly hydrophobic, which implies the dominating presence of the aliphatic amino acids in the structure. The peptides mass is 4.461 kDa and the N-terminal amino acid sequence was determined as Asn-Ile-Pro-Gln-Leu-Thr-Gln-Thr-Leu-Val. The MS/MS analysis and the fact that the peptide loses its antimicrobial activity after the size exclusion chromatography suggest, that it may contain additional non-protein residues such as a carbohydrate side chains or a small-molecule ligands e.g. metal ions. The lack

of the nucleotide sequence coding the N-terminal peptide fragment of the studied compound in the *S. xylosus* M2B genome, suggests that the peptide is a product of nonribosomal biosynthesis.

## CEL I ZAKRES PRACY

Celem prowadzonych badań była identyfikacja szczepów bakterii z rodzaju *Staphylococcus* (izolaty kliniczne i odzwierzęce) zdolnych do wytwarzania bakteriocyn o aktywności przeciwgronkowcowej, optymalizacja warunków produkcji i oczyszczania bakteriocyny o najbardziej pożądanym właściwościach i uzyskanie danych strukturalnych dotyczących tej substancji.

Zakres prowadzonych badań:

- a) przebadanie znajdującej się w Katedrze Technologii Leków i Biochemii kolekcji izolatów bakterii z rodzaju *Staphylococcus* pod kątem produkcji bakteriocyny. Szczepy (n=206) były izolowane od bydła chorego na mastitis (n=158) (Jakubczak *et al.* 2007; Kot *et al.* 2012) oraz od pacjentów leczonych klinicznie (n=48). Osiemnaście szczepów pochodzenia szpitalnego zostało dostarczone przez Laboratorium Mikrobiologiczne przy Szpitalu Wojewódzkim w Koszalinie (Polska). Trzydzieści szczepów pochodzenia szpitalnego otrzymano z Katedry Mikrobiologii Klinicznej przy Szpitalu Centralnym w Växjö w (Szwecja) (Sjölund and Kahlmeter 2008). Wszystkie szczepy izolowane od pacjentów zostały sklasyfikowane jako *S. aureus* (n=48), natomiast szczepy odzwierzęce należały do trzech gatunków: *S. aureus* (n=120), *S. epidermidis* (n=16) oraz *S. xylosus* (n=22);
- b) oznaczanie właściwości zidentyfikowanej bakteriocyny o aktywności gronkowcobójczej produkowanej przez szczep *S. xylosus* (oznaczony jako M2B);
- c) badania mające na celu identyfikację gatunku produkcyjnego;
- d) optymalizacja warunków produkcji bakteriocyny (czas, podłoże, temperatura);
- e) określenie spektrum aktywności bakteriocyny;

f) określenie termostabilności bakteriocyny;

g) oczyszczanie peptydu (chromatografia oddziaływań hydrofobowych, RP-HPLC, FPLC);

h) ustalenie sekwencji N-terminalnej peptydu;

i) przeszukanie baz danych sekwencji aminokwasowych peptydów w celu poszukania analogów do produkowanego peptydu.

## WSTĘP TEORETYCZNY

Odkrycie antybiotyków uważane jest za jedno z największych osiągnięć naukowych XX wieku. Dzięki wprowadzeniu tych leków do powszechnego użytku wiele chorób dotychczas nieuleczalnych stało się możliwych do wyleczenia. Niestety, częste i nieadekwatne do zapotrzebowania używanie antybiotyków o szerokim spektrum działania doprowadziło do wykształcenia się wśród wielu rodzajów bakterii zjawiska lekooporności. Zjawisko to polega na tym, że powszechnie używane w terapii antybiotyki przestają być skuteczne w zwalczaniu infekcji pochodzenia bakteryjnego, ponieważ organizmy je powodujące wykształciły bardzo skuteczne mechanizmy obronne. Tak szybko, jak nowe antybiotyki są odkrywane, mikroorganizmy rozwijają nowe, nieznane dotychczas metody "unikania" ich działania. Korzystanie z jakiegokolwiek antybiotyku zawsze promuje przetrwanie w danej niszy środowiskowej drobnoustrojów opornych na jego działanie - eliminuje komórki wrażliwe, co ułatwia przeżycie komórek opornych. Tak więc, do wystąpienia zjawiska lekooporności wymagane są zasadniczo dwa składniki: czynnik bakteriobójczy oraz mikroorganizmy posiadające geny, czyniące je niewrażliwymi na działanie tego czynnika. Samo zjawisko kształtuje się bardzo szybko, natomiast rozwiązanie problemu jego występowania jest bardzo praco- i czasochłonne. Można ten cel osiągnąć na kilka sposobów: śledzenie zjawiska lekooporności pomiędzy wieloma gatunkami bakterii (kreśli obraz skali zjawiska), izolowanie hospitalizowanych pacjentów zarażonych szczepami lekoopornymi (ogranicza ryzyko transferu genów oporności na inne szczepy bakterii) oraz poszukiwanie nowych terapeutycznych rozwiązań (znalezienie alternatywy dla antybiotyków pozwoli na szybsze i bezpieczniejsze leczenie infekcji, które już wystąpiły) (Levy and Marshall 2004). Doniesienia o penicylinoopornych szczepach *S. aureus* pojawiły się bardzo szybko po wprowadzeniu penicyliny do powszechnego użytku, bo już około roku 1940. Należy jednocześnie pamiętać, iż tempo odkrywania nowych antybiotyków nie jest już tak duże jak w początkowych latach stosowania antybiotykoterapii (Allen *et al.* 2014). W 2004 roku Amerykańskie Stowarzyszenie Chorób Zakaźnych (The Infectious Disease Society of America (IDSA)) doniosło, że większość (ponad 70%) bakterii powodujących śmiertelne infekcje wykazywało oporność na przynajmniej jeden z powszechnie stosowanych

antybiotyków (Hassan *et al.* 2012). Dodatkowym problemem jest umieszczenie determinant genowych odpowiedzialnych za lekooporność na ruchomych elementach genowych takich, jak bakteriofagi, plazmidy czy transpozony. Takie umiejscowienie genów pozwala na ich transfer nie tylko w obrębie gatunku, ale także pomiędzy gatunkami (Weigel *et al.* 2003). Obecnie jednym z większych problemów instytucji zdrowia publicznego oraz organizacji odpowiedzialnych za kontrolę jakości pożywienia wydają się być oporne na antybiotyki bakterie z rodzaju *Staphylococcus*.

## 1. Gronkowce jako organizmy patogenne

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, zwane potocznie gronkowcami, należą do grupy Gram dodatnich ziarniaków, które wstępują w skupiskach przypominających grona. Są one fakultatywnymi beztlenowcami, które jako główne źródło energii oraz węgla wykorzystują różne węglowodany. Mimo, że bakterie te są względnie beztlenowcami, większość gatunków preferuje bytowanie w warunkach tlenowych. Znaczna ich część jest nieszkodliwa, stanowią składnik naturalnej flory fizjologicznej skóry oraz błon śluzowych człowieka oraz innych organizmów (20-50% zdrowych ludzi jest nosicielami *S. aureus*) (World Health Organization 2014). Część z tych mikroorganizmów może jednak powodować poważne choroby ludzi i zwierząt.

Choroby powodowane przez gronkowce mogą powstawać w dwojaki sposób:

a) mogą być wywoływane przez toksyny będące produktami metabolizmu bakterii (intoksykacje). Do takiego typu zakażenia nie jest konieczne występowanie żywych bakterii - może powstać wskutek spożycia toksyn wyprodukowanych wcześniej przez mikroorganizm np. zatrucia enterotoksynami produkowanymi przez gronkowce (enterotoksyna A; staphylococcal enterotoxin A – SEA), która jest odpowiedzialna za wystąpienie ponad 75% przypadków gronkowcowych zatruc pokarmowych (Hennekinne, De Buyser and Dragacci 2012);

b) mogą powstawać w skutek działania żywych bakterii (toksoinfekcje). Jest to w pewnym stopniu połączenie intoksykacji i infekcji, ponieważ niekorzystne oddziaływanie na zainfekowany organizm zachodzi w drodze działania żywych mikroorganizmów (np. kolonizacja), ale też w skutek produkowania przez komórki patogenne toksyn.

Zakażenia pochodzenia gronkowcowego mogą mieć charakter lokalny, jak i ogólnoustrojowy. Zakażeniami lokalnymi są takie, które związane są z uszkodzeniami skóry oraz tkanek miękkich, np. zakażenia ran, zakażenia skóry, zapalenie tkanki łącznej, ropnie. Natomiast infekcje głębokie to takie, jak np. zapalenie mięśni, zapalenie osierdzia, wsierdzia, zapalenia stawów, septyczne zapalenie płuc. Do infekcji dochodzi wskutek przerwania ciągłości bariery, którą stanowi błona śluzowa lub skóra: otwiera to gronkowcom dostęp do przylegających tkanek oraz do krwioobiegu (Christensen and Brüggemann 2014). Umieszczone w ciele obiekty, będące skutkiem interwencji chirurgicznej, jak np. cewniki, siatki polipropylenowe oraz różnego rodzaju implanty stosowane w ortopedii, mogą również stać się źródłem infekcji o podłożu gronkowcowym. Po umieszczeniu takich implantów w ciele pacjenta zostają one pokryte bardzo szybko przez składniki surowicy takie, jak np. fibrynogen. Są to idealne warunki sprzyjające w pierwszej fazie adhezji gronkowców a następnie kolonizacji przez te bakterie (Lowy 1998). Jeden ze szczególnie patogennych gronkowców, *Staphylococcus aureus*, powoduje infekcje o zasięgu lokalnym, które w późniejszych stadiach rozwoju mogą prowadzić do zakażeń ogólnoustrojowych, takich jak bakteremia czy posocznica, zarówno u dorosłych, jak i u dzieci. Dopiero kiedy wystąpi wiele czynników, które ułatwią inwazję i kolonizację tkanek gospodarza, niegroźna infekcja może zmienić się w infekcję stanowiącą zagrożenie dla zdrowia i życia. Dodatkowo bakterie te są także powodem wielu zatruc pokarmowych.

Fatalne w skutkach choroby dotyczą nie tylko ludzi (choroby układu oddechowego, choroby układu moczowego, zatrucia pokarmowe, zapalenie płuc, posocznice, infekcje skórne, infekcje pooperacyjne), ale także zwierząt. Choroby zwierząt powodują bardzo duże straty ekonomiczne. Przykładowo mastitis, zapalenie gruczołu mlekowego u bydła, powoduje niezdolność bydła do produkcji mleka, które

jest kluczowym źródłem pożywienia dla znacznej części światowej populacji (De Vliegher *et al.* 2012). Gronkowce są również odpowiedzialne za bakteriologiczne zanieczyszczenia żywności.

### 1.1. Czynniki patogenności gronkowców

Jedną z przyczyn szczególnej patogenności gronkowców jest posiadanie/wytwarzanie przez nie wielu tzw. czynników wirulencji. Czynniki wirulencji jest to zespół cech, które ułatwiają inwazję organizmu gospodarza, jego kolonizację oraz unikanie odpowiedzi jego systemu odpornościowego. Poszczególne gatunki, a nawet szczepy bakterii należące do jednego rodzaju, różnią się pod względem ilości i rodzajów czynników wirulencji, które są w stanie wytwarzać, co znajduje swoje odzwierciedlenie w zdolnościach do wywołania infekcji. Występowanie jednego rodzaju czynników wirulencji nie wyklucza istnienia jakiegokolwiek innego. Bez wątplenia najbardziej chorobotwórczy ze wszystkich gronkowców jest gatunek *S. aureus*, czyli gronkowiec złocisty.

Czynniki wirulencji wytwarzane przez gronkowce można podzielić na kilka podgrup:

- 1) toksyny np.  $\alpha$ -toksyny (cytolityczne toksyny tworzące pory w błonie komórkowej),  $\beta$ -toksyny (np. sfingomielinaza wykazująca aktywność cytotoksyczną);
- 2) czynniki wirulencji powiązane z adhezją do komórek nosiciela np. białka A i B wiążące fibronektyny (adhezja do fibrynogenu), adhezyny wiążące kolagen (adhezja do kolagenu typu I i IV);
- 3) enzymy i inne białka np. koagulaza (wiąże i aktywuje protrombinę), proteaza V8 (proteaza serynowa), lipazy oraz hialuronidazy, które rozkładają składniki tkanek miękkich i ułatwiają infekcję;



- 4) czynniki wirulencji umożliwiające uniknięcie wrodzonej odporności immunologicznej organizmu powiązane z migracją leukocytów i aktywnością fagocytów np.  $\gamma$ -toksyna (powiązana z lizą neutrofilii);
  - 5) czynniki wirulencji umożliwiające uniknięcie wrodzonej odporności immunologicznej organizmu powiązane z inaktywacją układu białek dopełniacza np. stafylokinaza (aktywacja plazminogenu), zewnątrzkomórkowe białko wiążące fibrynogen (wiąże fibrynogen; hamuje aktywność konwertazy C3 i C5; wiąże białko C3);
  - 6) czynniki wirulencji umożliwiające uniknięcie wrodzonej odporności immunologicznej organizmu powiązane z immunoglobulinami i opsonizacją np. białko A (wiąże domenę Fc immunoglobuliny - szczepy posiadające białko A są mniej wydajnie fagocytowane);
  - 7) czynniki wirulencji umożliwiające uniknięcie wrodzonej odporności immunologicznej organizmu powiązane z białkami o aktywności bakteriobójczej np. sensor białek bakteriobójczych (wiąże i zaburza aktywność białek bakteriobójczych);
- Jest to tylko część mechanizmów, które zostały wykształcone przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus* w celu lepszej i wydajniejszej inwazji do tkanek organizmu nosiciela (Lowy 1998; Zecconi and Scali 2013).

## **1.2. Chemoterapeutyki stosowane w leczeniu infekcji powodowanych przez gronkowce**

Leczenie infekcji powodowanych przez szczepy gronkowca nie wykazujące oporności na powszechnie stosowane antybiotyki jest relatywnie proste. Obecnie dostępnych jest wiele antybiotyków, które są skuteczne w leczeniu tego typu infekcji. W przypadku szczepów wrażliwych na działanie penicyliny (mniej niż 5% szczepów) stosuje się antybiotyki  $\beta$ -laktamowe nieodporne na działanie  $\beta$ -laktamaz, takie jak np. amoksycylina. Szczepy wykazujące specyficzną oporność na penicylinę w wyniku posiadania  $\beta$ -laktamazy można zwalczać antybiotykami  $\beta$ -laktamowymi, takimi jak kloksacylina, metycylina i cefalosporyny drugiej i trzeciej generacji lub kombinacjami

$\beta$ -laktamów z inhibitorami  $\beta$ -laktamazy (kwas klawulanowy). Jeśli odpowiedzialny za infekcję szczep wykazuje oporność na wyżej wymienione antybiotyki lub osoba, zainfekowana przez gronkowca jest uczulona na nie można stosować antybiotyki należące do innych grup chemicznych np. cefalosporyny, aminoglikozydy, fluorochinolony, linkozamidy, makrolidy, tetracykliny i glikopeptydy (Kurlenda and Grinholc 2012; Lowy FD 2013; Bradley 2014). Jak widać w leczeniu szczepów gronkowca, które są wrażliwe na działanie antybiotyków dostępnych jest wiele możliwości. Jeśli szczep powodujący infekcje charakteryzuje się opornością na metycylinę (MRSA) lekiem z wyboru jest glikopeptyd wankomycyna. Jednak już w roku 1998 pojawiły się doniesienia na temat występowania szczepów opornych na wankomycynę (VRSA) lub o zdecydowanie obniżonej wrażliwości (VISA) na działanie tego leku (Hiramatsu *et al.* 1997).

W przypadku wystąpienia szczepów chorobotwórczych gronkowca, które wykazują obniżoną wrażliwość na działanie wankomycyny (MIC>1 mg/mL) stosuje się nowe leki, które wykazują się wysoką skutecznością w leczeniu infekcji powodowanych przez szczepy MRSA np. daptomycynę czy linezolid. Dodatkowo prowadzi się wiele badań mających na celu zidentyfikowanie nowych antybiotyków, które będą skuteczniejsze w zwalczaniu infekcji niż antybiotyki starsze, które stają się nieskuteczne z powodu zjawiska lekooporności (Bassetti and Righi 2016).

### **1.3. Oporność gronkowców na antybiotyki**

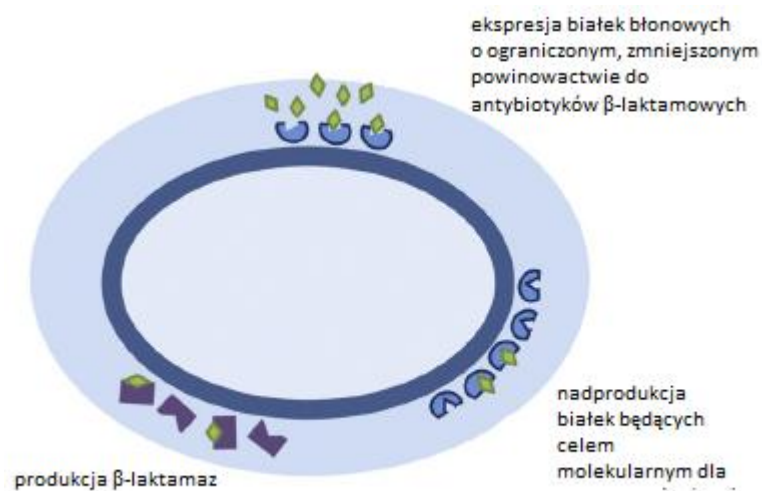
Oporność bakterii na stosowane antybiotyki może pojawić się w dwojaki sposób: poprzez pojawiające się spontanicznie mutacje oraz przez pozyskanie ruchomych elementów genetycznych na drodze horyzontalnego transferu genów. Zmiany mogą prowadzić do: zmiany celów molekularnych dla antybiotyku, wystąpieniu ekspresji genów, które inaktywują lek, system poboru leku z otoczenia oraz usuwania leku z komórki może zostać zmieniony na korzyść bakterii (utrata wrażliwości mikroorganizmu).

Mechanizmy oporności możemy podzielić na specyficzne oraz wielolekowe:

a) specyficzne - polegają na wykształceniu konkretnego mechanizmu przeciwdziałającego w specyficzny sposób działaniu antybiotyku lub grupie antybiotyków. Do tej grupy zaliczyć można bardzo rozpowszechniony wśród gronkowców mechanizm oporności na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe. Oporność na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe związane jest z produkcją przez szczepy niewrażliwe enzymu zwanego  $\beta$ -laktamazą. Enzym ten jest kodowany przez gen o nazwie *blaZ*, który jest regulowany przez dwa dodatkowe geny - represor *blaI* oraz anty represor *blaR1*. W obecności antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, białko blaR1 ulega autolizie. W wyniku tego procesu staje się ono proteazą, która wycina białko blaI. W efekcie następuje odblokowanie transkrypcji genu *blaZ* (Zhang *et al.* 2001). Dodatkowo, w przypadku szczepów MRSA występuje jeszcze jeden mechanizm, który warunkuje oporność tych szczepów na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe. Sama oporność na metycylinę nie jest warunkowana przez produkcję  $\beta$ -laktamaz lecz przez ekspresję niespotykanego wcześniej białka PBP 2a (Penicillin Binding Protein - białko błonowe, do którego wiążą się antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, kodowane przez geny na gronkowcowej kasecie chromosomalnej SCCmec). Białko to wykazuje niskie powinowactwo do antybiotyków należących do grupy  $\beta$ -laktamów. Zastępuje ono wszystkie inne białka z grupy PBP (cztery różne białka błonowe, wszystkie wykazują powinowactwo do antybiotyków  $\beta$ -laktamowych), umożliwiając bakteriom przetrwanie w środowisku, w którym znajduje się antybiotyk (Tenover 2006).

Występowanie wśród gronkowców oporności na metycylinę oraz inne antybiotyki  $\beta$ -laktamowe jest związane z występowaniem w ich chromosomie kasety genowej *mec* (SCCmec). Gronkowcowa kasetka chromosomalna SCCmec zintegrowana jest z chromosomem bakteryjnym. Mechanizm jej integracji (w przypadku nabycia jej przez bakterię z ruchomym elementem genetycznym np. plazmidem czy transpozonom) nie jest do końca zrozumiany. Kompleks genów wchodzących w skład kasety zawiera kompleks genów *mec* oraz rekombinazę *ccr*, która umożliwia wycinanie i specyficzną integrację kasety z chromosomem bakteryjnym. W kompleks genów *mec* wchodzi następujące geny: gen strukturalny *mecA*, zestaw genów regulatorowych

*mecR1* i *mecI* oraz ewentualne sekwencje insercyjne. Gen *mecA* warunkuje oporność gronkowców na metycylinę oraz antybiotyki  $\beta$ -laktamowe (produkcja zmodyfikowanego białka PBP). Oznacza to, że jeśli szczep MSSA pozyska na drodze transferu genów taką kasetę genetyczną nabędzie cech MRSA. Dodatkowo kasetę chromosomalną jest miejscem na chromosomie, w które bardzo "chętnie" wbudowywane są różne inne geny warunkujące oporność na różne antybiotyki pozyskiwane przez bakterię na drodze horyzontalnego transferu genów (Hiramatsu *et al.* 2001; Szweda *et al.* 2012; Peacock and Paterson 2015).



Rys. 1

Powszechnie występujące mechanizmy oporności gronkowców na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe (Tang, Apisarnthanarak and Hsu 2014)

b) wielolekowa - polega na wytworzeniu mechanizmu przeciwdziałania działaniu antybiotyków bez różnicowania na rodzaj stosowanego leku. Do tej grupy zaliczyć można m. in. nadekspresję genów kodujących białka błonowe określane jako pompy odpowiedzialne za wielolekooporność (MDR - Multidrug Resistance). Rolą opisywanych pomp jest usuwanie z komórek wszelkich szkodliwych produktów metabolizmu oraz substancji wpływających niekorzystnie na jej funkcjonowanie. Dotyczy to także substancji które zostały pobrane z otoczenia. Są one usuwane na zewnątrz na drodze transportu aktywnego. Różne rodzaj pomp mogą charakteryzować się większą lub mniejszą specyficznością w doborze substratów. Pompy opisywane jako MDR usuwają

na zewnątrz komórki wiele rodzajów cząsteczek na raz, dlatego przypisywana jest im odpowiedzialność za oporność wielolekową (mogą jednocześnie usuwać z komórek wiele rodzajów leków różniących się budową chemiczną). Geny kodujące pompy MDR mogą znajdować się zarówno na chromosomach, jak i na ruchomych elementach genetycznych takich, jak plazmidy. Umożliwia to nabywanie ich na drodze transferu genów przez inne mikroorganizmy (Floyd *et al.* 2010). Pompy posiadane przez gronkowce można podzielić na pięć głównych grup: MF (major facilitator), SMR (small multidrug resistance), MATE (multidrug and toxic compound extrusion), RND (resistance-nodulation-cell division) i ABC (ATP-binding protein). Białka należące do rodzin MF, SMR, RND, jako źródło energii do aktywnego transportu wykorzystują gradient protonów, białka MATE wykorzystują do transportu gradient stężenia jonów  $\text{Na}^+$ , natomiast białka ABC wykorzystują energię pochodzącą z hydrolizy ATP (Pidcock 2006). Mechanizm działania pomp nie jest do końca zrozumiały. Uważa się, że ich nadekspresja i zwiększone działanie jest odpowiedzią na stres środowiskowy spowodowany obecnością w otoczeniu mikroorganizmu szkodliwych dla komórek związków chemicznych, np. antybiotyków. Dodatkowo obecność w otoczeniu różnych niekorzystnych dla bakterii czynników powoduje ekspresję różnych rodzajów pomp. Obecność tego typu mechanizmu pozwala gronkowcom na przetrwanie przez dłuższy okres w warunkach zwiększonego stężenia antybiotyku, co skutkuje wydłużeniem czasu ekspozycji mikroorganizmu na lek i daje czas na wytworzenie specyficznego mechanizmu oporności na dany antybiotyk (Costa *et al.* 2013; Jang 2016).

Szczególnie niebezpieczne są szczepy określane jako MRSA (Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*) - charakteryzujące się opornością na metycylinę (Lowy FD 2013). Choroby powodowane przez szczepy MRSA mogą być powiązane zarówno z instytucjami zdrowia publicznego (HA MRSA - health care associated), jak i środowiskami poza szpitalnymi (CA MRSA - community acquired) (Lowy 2007). Zjawisko lekooporności w początkowych latach jego występowania było ściśle związane ze środowiskami szpitalnymi. Obecnie zjawisko to nie jest już związane ściśle z instytucjami zdrowia publicznego. Jego występowanie jest prawie równie często spotykane poza środowiskami szpitalnymi (Levy and Marshall 2004). Ponad 21% infekcji związanych ze środowiskami szpitalnymi jest powodowane przez szczepy

lekooporne bakterii. W 2011 roku było to ponad 2 miliony infekcji z czego 23 000 były śmiertelne (Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC). Występowanie infekcji powodowanych przez szczepy lekooporne powoduje wydłużenie pobytu takiego pacjenta w szpitalu o średnio 6,4-12,7 dnia. Szczepy MRSA zostały zidentyfikowane w latach 2009-2010 przez NHSN (National Healthcare Safety Network, USA) jako patogen najczęściej wykazujący lekooporność. Według raportu CDC (Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC) szczepy MRSA powodują rocznie w USA 80461 przypadków infekcji (infekcje poważne np. układu krwionośnego, zapalenie płuc), z czego 11 285 przypadków kończy się śmiercią. W raporcie pojawiają się również doniesienia o występowaniu szczepów *S. aureus* opornych na wankomycynę (poniżej 5 przypadków rocznie). Dane te nie uwzględniają częstości występowania nie inwazyjnych infekcji np. skórnych, których występowanie jest znacznie częstsze niż infekcji poważnych, lecz ich śmiertelność jest stosunkowo niewielka (Thabit, Crandon and Nicolau 2015).

Szczepy MRSA są bardzo często klasyfikowane też jako wielolekooporne (MDR - multidrug resistant) na podstawie włączenia w sekwencję SCCmec wielu innych determinant oporności na antybiotyki należących do różnych grup chemicznych. Jest to bardzo ważne miejsce, które jest zaangażowane w łączenie ruchomych elementów genetycznych takich, jak plazmidy, transpozony i inne sekwencje insercyjne (Szweda *et al.* 2012). *S. epidermidis* jest bogatym rezerwuarem genów oporności dla bardziej patogennego rodzaju gronkowca, jakim jest *S. aureus* (Levy and Marshall 2004). Dodatkowym poważnym problemem związanym z leczeniem infekcji pochodzenia gronkowcowego jest zdolność tych bakterii do wytwarzania biofilmu. Biofilm jest to wspólna struktura komórek bakteryjnych zamkniętych w matrycy biopolimerowej wytworzonej przez te komórki przyczepionej do żywej tkanki. Mikroorganizmy żyjące w formie biofilmu są mniej wrażliwe na antybiotyki przede wszystkim z powodu zmian szybkości wzrostu i opóźnienia penetracji czynników przeciwbakteryjnych w strukturze biofilmu. Oporność na antybiotyki bakterii rosnących w formie biofilmu prowadzi do wielu niepowodzeń w tradycyjnej antybiotykoterapii i nawrotów zakażeń (Stewart and William Costerton 2001).

Obserwowane obecnie natężenie trudnych do leczenia infekcji powodowanych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus* i przede wszystkim szybki rozwój mechanizmów oporności na antybiotyki przez bakterie tego rodzaju wymaga szybkiego znalezienia stosunkowo niedrogiej, wydajnej oraz skutecznej w działaniu metody walki z tymi mikroorganizmami. Metoda ta musi nadawać się do stosowania zarówno w medycynie, jak i weterynarii (Allen *et al.* 2014). W literaturze znaleźć można wiele przykładów proponowanych rozwiązań. Pomimo ich dużej różnorodności, większość z nich ma ze sobą kilka cech wspólnych: nie mogą generować lekooporności, muszą być stosunkowo tanie oraz łatwe w pozyskaniu.

#### **1.4. Potencjalne alternatywne sposoby leczenia infekcji pochodzenia gronkowcowego**

Coraz niestety powszechniejsze występowanie szczepów gronkowców opornych na działanie znanych klas antybiotyków stanowi silny impuls do poszukiwania alternatywnych sposobów leczenia infekcji gronkowcowych. Kierunki tych poszukiwań obejmują zarówno nowe potencjalne chemoterapeutyki, szczególnie takie wobec których jest mało prawdopodobne wystąpienie oporności, jak i terapie alternatywne. W ramach pierwszego z tych podejść poszukuje się głównie substancji, dla których cel molekularny zlokalizowany jest w ścianie lub w błonie komórkowej i który w związku z tym nie musi wnikać do wnętrza komórki bakteryjnej. Takie położenie celu molekularnego eliminuje prawdopodobieństwo oporności wielolekowej spowodowanej aktywnością białek błonowych działających jako pompy wyrzucające ksenobiotyki, które są główną przyczyną oporności szczepów MRSA. Wydaje się, że nadal duże możliwości w tym zakresie dotyczą substancji pochodzenia naturalnego (Kurlenda and Grinholc 2012; Szweda *et al.* 2012; O'Connell *et al.* 2013; Allen *et al.* 2014). Aktualnie w literaturze można znaleźć wiele stosunkowo nowych, alternatywnych podejść do rozwiązania problemu infekcji pochodzenia bakteryjnego, w tym gronkowcowego, powodowanych w znacznej części przez szczepy charakteryzujące się lekoopornością.

#### 1.4.1. Nowe potencjalne chemoterapeutyki przeciwgronkowcowe:

a) związki pochodzenia bakteryjnego np. bakteriocyny

Stafylocyny – bakteriocyny produkowane przez bakterie *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* wykazujące aktywność względem bakterii z gatunku *Staphylococcus aureus*, np. aureocyna A53, lizostafyna;

b) związki pochodzenia roślinnego

Związki należące do różnych grup chemicznych produkowane przez rośliny, wykazujące aktywność względem bakterii.

Do powszechnie produkowanych przez rośliny związków gronkowcobójczych zalicza się:

alkaloidy - substancje organiczne o charakterze zasadowym, zawierające azot. Produkowane są tylko przez niektóre rodzaje roślin (Manosalva *et al.* 2016);

glikozydy - połączenia cukrów ze związkami nie cukrowymi (Shahzadi and Shah 2015);

flawonoidy - grupa organicznych związków chemicznych, spełniających w roślinie funkcję barwników, przeciwutleniaczy i naturalnych insektycydów oraz fungicydów (Singh and Sharma 2016)

antocyjany - glikozydy, rozpuszczalne w wodzie czerwone, niebieskie lub fioletowe barwniki

olejki eteryczne - mieszaniny dużej ilości składników, przy czym jeden z nich jest zwykle składnikiem głównym (Sagdic *et al.* 2013);

garbniki - bezazotowe substancje rozpuszczalne w wodzie i alkoholu;

saponiny - zbudowane podobnie do glikozydów, mające jednocześnie zdolność pienienia się w roztworach oraz emulgowania tłuszczów (Lee *et al.* 2015)

c) związki pochodzenia zwierzęcego, w tym kationowe peptydy antybakteryjne (cationic antimicrobial peptides – CAMP's) np. histatyny, defensyny, trombocydyny, renelaksyna. Są to dodatnio naładowane (od +2 do +7) cząsteczki o właściwościach bakteriobójczych, które naturalnie bronią skóry i nabłonków przed infekcjami bakteryjnymi, wytwarzane przez różne gatunki zwierząt, w tym szczególnie gady i płazy



#### 1.4.2. Alternatywne sposoby terapii:

a) chemoterapia kombinowana - terapia taka polega na zastosowaniu kilku chemoterapeutyków jednocześnie. Takie podejście minimalizuje prawdopodobieństwo oporności specyficznej, może jednak stanowić czynnik selekcyjny sprzyjający oporności wielolekowej (Hemaiswarya, Kruthiventi and Doble 2008).

b) zapobieganie powstawaniu biofilmu - strategia polega na zapobieganiu adhezji gronkowców do komórek nosiciela lub do powierzchni materiałów syntetycznych użytych różnych rodzajach implantów i cewników np. produkcja mniej hydrofobowych materiałów pokrytych warstewką antybiotyku lub antyseptyku;

c) zastosowanie bakteriofagów - jedna z najbardziej obiecujących alternatywnych metod leczenia infekcji bakteryjnych i grzybiczych. Bakteriofagi i mykofagi selektywnie atakują i inaktywują tylko patogeny docelowe, w tym przypadku szczepy MRSA i MSSA (Sulakvelidze, Alavidze and Morris 2001; Matsuzaki *et al.* 2003);

d) terapia fotodynamiczna - terapia polegająca na zastosowaniu związków chemicznych – fotosensybilizatorów. Fotosensybilizatory kumulują się w specyficznie wybranych tkankach lub komórkach. Ich aktywacja następuje przy użyciu światła o odpowiedniej długości fali. Prowadzi to do wytworzenia tlenu singletowego i wolnych rodników, które są odpowiedzialne za efekt toksyczny względem specyficznych komórek. W zależności od rodzaju użytego fotosensybilizatora, eliminacja bakterii może polegać na zniszczeniu ściany komórkowej, inaktywacji kluczowych enzymów lub zniszczeniu materiału genetycznego bakterii (Romanova *et al.* 2003);

e) nanocząstki metali - syntezowane na drodze chemicznej redukcji soli metali (złoto/srebro/ aluminium/tytan) z czynnikiem redukującym. W zależności od warunków prowadzenia reakcji (pH, temperatura, stężenie czynnika redukującego) charakterystyka nanocząstek metali może ulegać zmianie. Dodatkowo wybór rodzaju czynnika redukującego jest bardzo ważny w przypadku stosowania nanocząstek jako

potencjalnego leku, ponieważ pośredniczy on pomiędzy nanocząsteczkami a celem molekularnym. W trakcie prowadzenia badań pojawia się niestety kilka problemów, które nie zostały do tej pory jeszcze rozwiązane: zawiesiny nanomateriałów nie są homogeniczne, dodatkowo nanocząsteczki wykazują znaczne tendencje do agregacji, nie jest również znany mechanizm metabolizmu i akumulacji nanocząstek w organizmach (Zazo, Colino and Lanao 2016). Mechanizm działania nanocząstek metali na poszczególne bakterie nie jest jeszcze do końca poznany, jednak wiele prowadzonych badań pokazuje, że są one aktywne nawet względem lekoopornych mikroorganizmów (Hajipour *et al.* 2012);

f) bakterie drapieżne (bakterie, które żerują na innych mikroorganizmach, w tym innych gatunkach bakterii) - wiele gatunków drapieżnych bakterii zostało zidentyfikowane, ale szczególnie ciekawe wydają się bakterie z rodzaju *Bdellovibrio*. "Polują" one na wiele bakterii Gram ujemnych w celu pozyskania składników odżywczych oraz energii. Badania pokazują, że mogą być one skuteczne w zwalczaniu infekcji, w których zastosowanie antybiotyków jest niewystarczające np. są skuteczne w eliminowaniu biofilmu. Zastosowanie tej formy terapii jest jednak ciągle dalekie od wprowadzenia do użytku (Dwidar, Monnappa and Mitchell 2012);

#### 1.4.3. Strategie wspomagające

a) szczepionki przeciwgronkowcowe. Jak dotychczas nie udało się opracować skutecznych szczepionek przeciwgronkowcowych, ani typu klasycznego, ani podjednostkowych, chociaż znane i stosowane są np., szczepionki przeciwko meningokokom, czy pneumokokom. Problemem przy konstrukcji takich szczepionek jest ich dokładne ukierunkowanie. Stosowane związki nie mogą negatywnie wpływać na naturalną mikroflorę organizmu człowieka. Wcześniej do konstrukcji potencjalnych antygronkowcowych szczepionek podjednostkowych wykorzystywano antygenowe fragmenty ściany komórkowej gronkowców, aktualnie trwają prace nad wykorzystaniem do tego celu konkretnych czynników wirulencji takich, jak: adhezyny, toksyny czy inwazyjny (Otto 2008);

b) probiotyki i prebiotyki. Stosowanie bakterii (lub mieszanek bakterii) korzystnie wpływających na funkcjonowanie organizmu w celu uniknięcia infekcji bakteriami patogennymi lub odbudowy mikroflory zniszczonej przez infekcję w celu jej zwalczania np. transfer mikroorganizmów pochodzących z kału w celu leczenia infekcji *Clostridium difficile* u ludzi (Borody, Paramsothy and Agrawal 2013).

## 2. Bakteriocyny

Bakteriocyny są to peptydy lub małe białka syntezowane przez rybosomy, wykazujące aktywność bakteriobójczą lub bakteriostatyczną, wytwarzane przez bakterie w celu zwalczania innych bakterii, które mogą należeć do tego samego lub pokrewnego gatunku (Cotter, Hill and Ross 2005). Bakteriocyny są bardzo różnicowaną grupą polipeptydów. Różnią się pomiędzy sobą stabilnością termiczną, masą molekularną, mechanizmem działania, mechanizmem sekrecji pozakomórkowej czy nawet sposobem ochrony organizmu produkującego przed destrukcyjnym działaniem bakteriocyny (Hammami *et al.* 2013). Wielkość bakteriocyn waha się w zakresie od 20 do 60 reszt aminokwasowych, ale zdarzają się również cząsteczki większe. Bakteriocyny, w większości przypadków, mają charakter kationowy, hydrofobowy lub mieszany kationowo-hydrofobowy. Po raz pierwszy peptydy te zostały zidentyfikowane w przypadku Gram ujemnych bakterii (kolicyny produkowane przez *Escherichia coli*), a do roku 2010 zidentyfikowano i scharakteryzowano około 200 tego rodzaju substancji (BACTIBASE) (Hammami *et al.* 2010). Znaczenie środowiskowe bakteriocyn nie jest do końca jasne. Dzieje się tak z powodu dużej różnorodności i stopnia złożoności tych białek/peptydów oraz warunków laboratoryjnych, w jakich prowadzi się badania (idealne warunki powodują maksymalną ekspresję genu, bez udziału naturalnego środowiska zewnętrznego oraz czynników regulujących ekspresję). Jako główne cele produkowania bakteriocyn przez komórki podaje się komunikację pomiędzy komórkami (udział w mechanizmie tzw. *quorum sensing*), obrona przed innymi bakteriami oraz ułatwienie horyzontalnego transferu genów. Należy pamiętać, że żadna z funkcji nie wyklucza występowania innej (Snyder and Worobo 2014).

Mimo, iż bakteriocyny są produkowane przez mikroorganizmy w celu zwalczania innych mikroorganizmów (składnik definicji klasycznych antybiotyków), antybiotykami nie są. Od klasycznych antybiotyków różni je kilka cech. Jedną z głównych różnic jest miejsce syntezy. Bakteriocyny są syntezowane na rybosomach, natomiast antybiotyki są produktem tzw. metabolizmu wtórnego. Zasadniczo bakteriocyny i antybiotyki różnią się również zakresem aktywności: bakteriocyny są aktywne względem wąskiego spektrum mikroorganizmów, natomiast antybiotyki wykazują mniej lub bardziej szeroki zakres aktywności. Należy również wspomnieć, że ze względu na wysoką specyficzną działanie, bakteriocyny nie powinny powodować efektów ubocznych, co jest częstym zjawiskiem w przypadku antybiotyków (znanych jest wiele efektów niepożądanych wynikających ze stosowania antybiotykoterapii np. negatywny wpływ na składniki naturalnej flory organizmu człowieka i zwierząt). Oba typy substancji różnią się też sposobem działania oraz sposobem indukowania oporności atakowanej komórki. Cele molekularne bakteriocyn zlokalizowane są w błonie lub ścianie komórkowej i nie mają charakteru enzymatycznego, właściwego dla większości antybiotyków (Cleveland *et al.* 2001).

## **2. 1. Klasyfikacja bakteriocyn**

Klasyfikacja bakteriocyn opiera się głównie na ich budowie (początkowa charakterystyka i grupowanie związków oparte było na ich właściwościach fizycznych; dopiero później klasyfikację tę rozszerzono o informacje genetyczne) (Hammami *et al.* 2013). Z powodu wielkiej różnorodności, ustalenie jednej spójnej klasyfikacji jest bardzo trudne. Zasadniczo bakteriocyny dzieli się na trzy lub cztery grupy.

Pierwotny podział zaproponowany przez Klaenhammera (Klaenhammer 1988, 1993) zakładał istnienie 4 grup głównych:

klasa I - lantybiotyki - małe peptydy, o masie molekularnej poniżej 5 kDa, zawierające niespotykane reszty aminokwasowe, takie jak lantonina czy  $\beta$ -metylolantonina. Do tej grupy należą na przykład nizyna i laktacyna 481;

klasa II - niezmodyfikowane peptydy - małe (<10kDa) termostabilne peptydy nie zawierające lantoniny, grupa zawiera podgrupy:

Ila - bakteriocyny wykazujące aktywność względem *Listeria monocytogenes*, np. pediocyna PA-1, sakacyna P;

IIb - dwułańcuchowe bakteriocyny (wymagają obecności obu łańcuchów do aktywności) np. laktacyna F;

IIc - aktywowane tiolem, wymagające do aktywności obecności zredukowanej reszty cysteiny np. laktokokcyna B;

klasa III - bakteriocyny duże (masa molekularna powyżej 30 kDa), wrażliwe na działanie temperatury peptydy. Do tej grupy należy m.in. helwetycyna J.

klasa IV - bakteriocyny złożone - zbudowane z białka oraz dodatkowych fragmentów niebiałkowych (np. lipidów lub węglowodanów). Do tej grupy zalicza się m.in. plantarynycynę S.

Proponowana przez Klaenhammera pierwotna klasyfikacja została zmodyfikowana przez Cottera (Cotter, Hill and Ross 2005).

klasa 1 - bakteriocyny zawierające lantoninę tzw. lantybiotyki. Grupa ta zawiera w sobie zarówno bakteriocyny zbudowane z jednego peptydu, jak i bakteriocyny dwupeptydowe. Wyszczególnia się aż do 11 podklas w zależności od budowy bakteriocyny np. jednoniciowe - nizyna, mersacydyna, dwuniciowe - laktacyna 3147, cytolizyna;

klasa 2 - bakteriocyny nie zawierające lantoniny - heterogeniczna klasa małych peptydów:

Ila - podobne do pediocyny,

IIb - dwupeptydowe,

IIc - cykliczne,

IId - pojedyncze, liniowe peptydy nie podobne do pediocyny.

klasa 3 - bakteriolizyny - bakteriocyny należące do tej klasy charakteryzowały się dużą masą molekularną, wrażliwością na działanie temperatury oraz zdolnością do hydrolizy mureiny m. in. lizostafyna.

Cotter (Cotter, Hill and Ross 2005) w zaproponowanej klasyfikacji pominął istnienie pozostałych grup bakteriocyn, ponieważ żaden z ich przedstawicieli nie został zidentyfikowany (przypuszczana wcześniej struktura bakteriocyn nie została potwierdzona w ciągu badań lub na drodze reorganizacji grup - wyłonienia nowych i w związku z tym zmiany klasyfikacji bakteriocyn - bakteriocyny trafiały do innych grup).

Ostatecznie w roku 2006 została została przez Henga i Tagga (Heng and Tagg 2006) zaproponowana obowiązująca do teraz klasyfikacja bakteriocyn uwzględniająca zarówno klasyfikację pierwotną Klaenhammera (Klaenhammer 1988, 1993) oraz zaproponowaną następnie przez Cottera (Cotter, Hill and Ross 2005).

Zgodnie z tą klasyfikacją bakteriocyny dzieli się na 4 główne grupy:

klasa I - lantybiotyki (podgrupy: liniowe, globularne, złożone),

klasa II - peptydy niezmodyfikowane (podgrupy: pediocyno-podobne, zróżnicowane, wieloskładnikowe)

klasa III - duże białka (podgrupy: bakteriolityczne, nie powodujące lizy)

klasa IV - peptydy cykliczne (brak podgrup).

Tabela 1.

Stosowana obecnie klasyfikacja bakteriocyn (Heng and Tagg 2006)

Klasa	Krótki opis
Klasa I	lantybiotyki
IA	liniowe, sztywne
IB	kuliste, elastyczne
IC	złożone
Klasa II	peptydy niezmodyfikowane
IIa	pediocyno-podobne
IIb	zróżnicowane
IIc	wieloskładnikowe
Klasa III	duże białka
IIIa	bakteriolityczne
IIIb	nie powodujące lizy
Klasa IV	cykliczne

## 2.2. Sposób działania bakteriocyn

Zasadniczo, sposób działania bakteriocyn ogranicza się do szeroko pojętej permeabilizacji błony komórkowej i powodowania wycieku substancji strukturalnych istotnych dla funkcjonowania komórki lub uniemożliwienie komórce wytworzenia otoczki komórkowej (błony/ściany komórkowej). Dane literaturowe pokazują jednak dużą różnorodność mechanizmów działania bakteriocyn. Szczegółowy mechanizm działania na komórkę wrażliwą zależy w dużej mierze od pierwszorzędowej struktury peptydu. Udowodniono również, że niektóre bakteriocyny nie posługują się tylko jednym sposobem działania. Punktem wyjścia dla działania bakteriocyny jest oddziaływanie ze specyficzną dla nich cząsteczką znajdującą się na powierzchni komórki wrażliwej, która będzie działała jak receptor. Takim receptorem mogą być elementy błony lub ściany komórkowej.

Określenie spektrum działania bakteriocyny ma bezpośredni związek z mechanizmem jej działania. Jeśli bakteriocyna jako cel molekularny wykorzystuje element szeroko rozpowszechniony u danej grupy mikroorganizmów, wykazuje ona szerokie spektrum działania. Jeśli jednak receptor jest bardzo specyficzny i ograniczony do jednej bardzo wąskiej grupy mikroorganizmów, zakres aktywności bakteriocyny jest bardzo wąski - działa ona bardzo wybiórczo, charakteryzuje się wysoką specyficznością. Większość bakteriocyn produkowanych przez bakterie Gram dodatnie do aktywności wymaga związania z powszechnie występującym na powierzchni bakterii Gram dodatnich lipidem II. Doskonałym przykładem takiej bakteriocyny jest nizyna. Wykazuje ona aktywność względem szerokiej grupy mikroorganizmów Gram dodatnich m. in. wielu bakterii kwasu mlekowego, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, itp. Jest ona jednak całkowicie nieaktywna względem bakterii Gram ujemnych (po zastosowaniu dodatkowych środków wykazuje ona pewną aktywność względem bakterii tej grupy). Bakterie Gram ujemne produkują natomiast bakteriocyny charakteryzujące się wysoką specyficznością. Jako receptor wykorzystują elementy składowe otoczki bakteryjnej bardzo słabo rozpowszechnione w obrębie jednego gatunku. Często są to substancje występujące tylko w obrębie konkretnego szczepu, bardzo dla niego charakterystyczne. Takie peptydy charakteryzują się bardzo wąskim zakresem działania (Riley and Chavan 2007)

Prowadzone obecnie badania pokazują również inny mechanizm działania bakteriocyn, który nie wymaga od peptydu wiązania się ze specyficznym receptorem znajdującym się na powierzchni komórki bakteryjnej. Czasem wystarczy tylko obecność bakteriocyny w pobliżu komórki wrażliwej. Aktywność bakteriobójcza jest uruchamiana przez oddziaływanie elektrostatyczne pomiędzy komórką a peptydem (Snyder and Worobo 2014).



### 2.2.1. Mechanizmy działania wybranych bakteriocyn (Rys. 2)

#### a) nizyna (policykliczny peptyd)

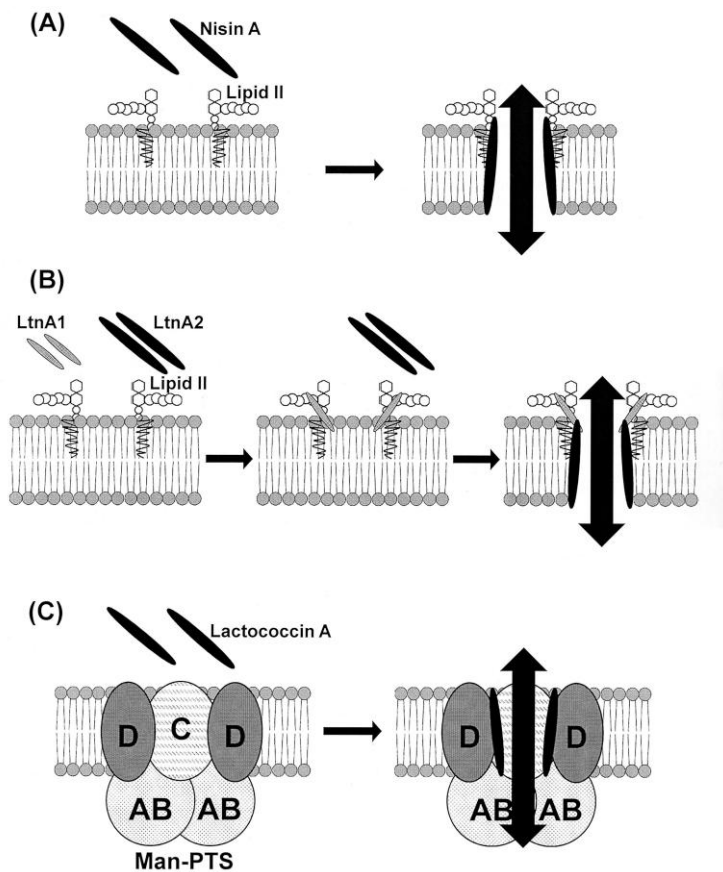
Nizyna wiąże się z lipidem II (prekursor ściany komórkowej, zlokalizowany w błonie komórkowej). Pierwszym efektem bezpośrednim jest uniemożliwienie przeprowadzania procesu syntezy ściany komórkowej (N-terminalny koniec nizyny wykazuje wysokie powinowactwo do pirofosforanu lipidu II (Asaduzzaman and Sonomoto 2009). Ponadto cząsteczki nizyny uczestniczą w formowaniu w błonie komórkowej bakterii porów, co skutkuje wypływem substancji strukturalnych znajdujących się wewnątrz (jony, ATP, metabolity itp.).

#### b) laktocyna 3147 (lantybiotyk składający się z dwóch łańcuchów peptydowych; oba są wymagane do aktywności)

Bakteriocyna ta składa się z dwóch łańcuchów peptydowych (LtnA1 oraz LtnA2). Oddziałują one ze sobą synergistycznie w celu wywołania pożądanego efektu. Pierwsza z nici (LtnA1) oddziałuje specyficznie z lipidem II. Powstały kompleks jest rozpoznawany przez drugą podjednostkę wchodzącą w skład bakteriocyny - LtnA2. Połączone ze sobą nici tworzą trzyczęściowy kompleks, który tworzy pory w błonie komórkowej (Nishie, Nagao and Sonomoto 2012).

#### c) laktokokcyna A (laktococcin A), pediocyna PA-1/AcH (pediocin PA-1/AcH)

Bakteriocyny te do aktywności wykorzystują elementy systemu wychwyty mannozy i glukozy w bakteriach. Celem działania jest zewnątrzkomórkowa pętla zlokalizowanej w błonie komórkowej fosfotransferazy mannozy (man-PTS). Związanie bakteriocyny z białkiem transportowym wywołuje powstawanie porów w błonie komórkowej oraz wyciek strukturalnych substancji zawartych w komórce (Diep *et al.* 2007; Hammami *et al.* 2013).



Rys. 2.

Schematy mechanizmów działania opisanych powyżej przykładowych bakteriocyn (Nishie, Nagao and Sonomoto 2012)

### 2.3. Organizacja genów kodujących bakteriocyny

Geny kodujące bakteriocyny znajdują się w tzw. klastrach genowych. Oznacza to, że wiele genów kodujących bakteriocynę oraz elementy biorące udział w kształtowaniu dojrzałego peptydu znajdują się w bliskiej odległości, ale pod kontrolą wielu promotorów. Właśnie dlatego używanie nazwy operon względem takiej konstrukcji genowej nie jest technicznie poprawne (Snyder and Worobo 2014). Geny kodujące bakteriocyny mogą znajdować się zarówno na chromosomie np. geny kodujące sakacynę P i mersacydynę (Hühne *et al.* 1996; Altena *et al.* 2000), jak również na elementach ruchomych, takich jak plazmidy czy transpozony, np. geny kodujące pediocynę PA1 oraz nizynę (Bukhtiyarova, Yang and Ray 1994; And and Hoover 2003).

Do biosyntezy bakteriocyny potrzebny jest zestaw przynajmniej czterech genów (które mogą, ale nie muszą być zlokalizowane na tej samej jednostce transkrypcyjnej): gen strukturalny kodujący peptyd, gen kodujący białko odpowiadające za ochronę organizmu produkcyjnego przed destrukcyjnym działaniem produkowanej przez niego bakteriocyny; gen, który koduje związany z błoną komórkową transporter typu ABC; oraz białka pomocnicze, które odpowiadają za wydzielenie bakteriocyny na zewnątrz komórki produkcyjnej (Nissen-Meyer and Nes 1997; Bali *et al.* 2014). Ostateczny wygląd całego klastra jest zależny od budowy dojrzałej bakteriocyny oraz rodzaju regulacji i sposobu jej wydzielenia.



Rys. 3

Schemat przedstawiający organizację genetyczną przykładowego klastra genetycznego kodującego pediocynę (Snyder and Worobo 2014)

*papA* - gen strukturalny

*papB* - gen kodujący białko odpowiedzialne za ochronę organizmu produkcyjnego

*papC* - peptydaza

*papD* - transporter

Umieszczenie wszystkich genów dotyczących bakteriocyny umożliwia rozpoczęcie produkcji bakteriocyny tylko pod wpływem konkretnych warunków, w sytuacji kiedy obecność peptydu/białka jest przydatna dla komórki produkcyjnej. W środowisku naturalnym bakteriocyny są wydzielane tylko na bardzo niskim poziomie oraz podczas późnej fazy wzrostu organizmu produkcyjnego. Produkcja i wydzielenie bakteriocyny zachodzą pod wpływem obecności w bliskiej odległości innych mikroorganizmów. Dowodzi to, że podstawowym mechanizmem regulacji ekspresji genów bakteriocyn są mechanizmy odpowiedzialne za komunikowanie się bakterii (tzn. *quorum sensing*). Sygnałem do startu produkcji jest albo obecność samej bakteriocyny, albo jej peptydowego analogu. Indukcja produkcji odbywa się poprzez szlaki transdukcji sygnału.

## **2.4. Oporność szczepów produkcyjnych na produkowane przez nie bakteriocyny**

Szczepy produkujące bakteriocyny są dobrze chronione przed aktywnością produkowanych przez nie peptydów. Elementy systemu odpornościowego odpowiedzialne za ochronę przed produkowanymi bakteriocynami są przeważnie usytuowane w tych samych klastrach genowych (Nissen-Meyer *et al.* 2009).

Dokładny mechanizm oporności nie jest dokładnie poznany dla wszystkich bakteriocyn. W przypadku większości szczepów produkcyjnych, mechanizm ten polega na produkcji małego białka lub peptydu. Te białka są albo przyłączone do powierzchni błony komórkowej lub są w niej zakotwiczone. Ich rola polega na blokowaniu włączania się bakteriocyny w strukturę membrany lub zabezpieczeniu receptora dokującego przypisanego bakteriocynie, osłaniając go przed bakteriocyną (Bastos, Coelho and Santos 2015). Opisano kilka typów mechanizmów: 1) polegający na produkcji specjalnej cząsteczki (białko, które może wiązać się z receptorami bakteriocyny, chroniąc komórkę przed śmiercią lub istniejąca metaloproteaza wytwarzana przez niektóre bakterie w celu degradacji bakteriocyny); 2) bazujący na tworzeniu specjalnych wielo-składnikowych transporterów typu ABC, usuwających cząsteczki bakteriocyny, które dostały się do wnętrza komórki, 3) produkowanie bakteriocyny, która rozpoznaje specyficzne struktury, których nie posiada organizm produkcyjny lub posiada je, ale w lekko zmodyfikowanej formie np. lizostafyna. Niektóre organizmy mają tylko jeden z wymienionych mechanizmów odpowiedzialnych za oporność np. w przypadku Pep5., natomiast inne mogą posiadać oba, np. organizm produkujący nizynę (Deegan *et al.* 2006; Bastos, Coelho and Santos 2015).

## **2.5. Zastosowanie bakteriocyn**

Zwiększone zainteresowanie bakteriocynami wynika z potencjalnie wielu możliwości ich praktycznego wykorzystania. Docelowo wyróżnia się kilka potencjalnych obszarów, w których mogą one znaleźć zastosowanie. Pierwsze z nich to szeroko pojęty przemysł żywnościowy: zapobieganie psuciu się produktów żywieniowych

(biokonserwanty), przedłużenie trwałości produktów żywnościowych oraz zastosowanie jako bioaktywne komponenty w opakowaniach do żywności. Drugi obszar, którego dotyczą prowadzone badania to szeroko pojęta medycyna oraz weterynaria (zastąpienie antybiotyków lub zmniejszenie ich dawki poprzez zastosowanie terapii kombinowanych, biokonserwanty do żywności podawanej zwierzętom hodowlanym np. w paszach).

Podstawową zaletą bakteriocyn jest fakt, że są to substancje przeciwbakteryjne pochodzenia naturalnego - produkty metabolizmu drobnoustrojów, w wielu przypadkach bakterii uczestniczących w procesach fermentacyjnych wykorzystywanych od wieków do konserwowania produktów żywnościowych - na przykład bakterii fermentacji mlekowej.

W celu przedłużenia trwałości produktów spożywczych stosuje się różnego rodzaju konserwanty (np. azotyny), których zadaniem jest zapobieganie wzrostowi mikroorganizmów powodujących psucie się żywności. Niestety większość konserwantów produkowana jest na drodze syntezy chemicznej i ich dłuższe spożywanie może mieć szkodliwy wpływ na organizm konsumenta. Dodatkowo, stosowanie antybiotyków w przemyśle żywnościowym jest zabronione. Ciekawą alternatywą dla konserwantów chemicznych wydają się być biokonserwanty (biokonserwacja polega na przedłużeniu trwałości oraz polepszaniu bezpieczeństwa żywności poprzez wykorzystanie mikroorganizmów i/lub ich metabolitów (Ross, Morgan and Hill 2002). Do tej grupy zaliczyć można bakteriocyny. Substancje te są uznawane za bezpieczne, ponieważ organizmy, które je produkują (w większości bakterie kwasu mlekowego, posiadające status GRAS - *Generally Recognised As Safe*) (Generally Recognized as Safe (GRAS)) są od wieków wykorzystywane w procesach fermentacyjnych, których celem jest otrzymanie i utrwalanie produktów takich, jak ser, jogurt, kiszonki warzyw czy fermentowane produkty mięsne (np. kiełbasa portugalska). Dzięki obecności bakterii produkujących bakteriocyny (np. różne bakterie kwasu mlekowego) w produktach fermentowanych zatrzymany zostaje rozwój bakterii powodujących psucie się żywności. Ponadto obecność tych bakterii wpływa także na poprawę walorów smakowych oraz zapachowych produktów. Dodatkową zaletą jest

to, że bakteriocyny dzięki swojej wrażliwości na działanie enzymów proteolitycznych, są trawione na wstępnym etapie przyjmowania pokarmu i trafiają do układu pokarmowego w formie krótkich nieaktywnych peptydów (Cleveland *et al.* 2001). W przeciwieństwie do antybiotyków czy syntetycznych konserwantów, nie mają więc one żadnego wpływu na naturalną florę organizmu człowieka.

Bakteriocyny w przemyśle żywnościowym mogą być stosowane w dwóch formach: jako czysty peptyd (po wyizolowaniu i oczyszczeniu z hodowli szczepu produkcyjnego oraz oczyszczeniu) oraz w formie szczepu, który daną bakteriocynę produkuje (Zorn and Czermak 2014). Jako że geny kodujące bakteriocyny (lub geny im towarzyszące np. kodujące białka odpowiadające za niewrażliwość szczepu produkcyjnego na działanie peptydu) często są umieszczone na ruchomych elementach genetycznych, takich jak np. plazmidy, sugeruje się używanie jednak bakteriocyn w czystej postaci, w formie dodatku do żywności, niż w postaci kultur starterowych, w celu uniknięcia nabycia cech oporności przez inne szczepy bakteryjne (Rossi *et al.* 2014; Yang *et al.* 2014).

Klasycznym przykładem bakteriocyny powszechnie stosowanej w przemyśle żywnościowym jest nizyna. Była ona pierwszą odkrytą bakteriocyną produkowaną przez bakterie kwasu mlekowego (Rogers 1928). Nizyna jest produkowana przez szczepy bakteryjne należące do rodzaju *Lactococcus lactis*. Bakteriocyna ta wykazuje się dużą aktywnością antagonistyczną względem bakterii Gram dodatnich m. in. z rodzajów *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* (w szczególności tych, które wytwarzają spory - *Clostridium*, *Bacillus*), natomiast bardzo słabą aktywność lub jej całkowity brak względem bakterii gram ujemnych, grzybów oraz drożdży. W przypadku mikroorganizmów wytwarzających spory odnotowano nawet większą aktywność względem nich niż względem komórek wegetatywnych. Cząsteczka nizyny składa się z 34 reszt aminokwasowych, a jej masa cząsteczkowa wynosi 3,510 kDa. Cząsteczka nizyny wykazuje charakter kwasowy i dlatego posiada największą stabilność termiczną w takich właśnie warunkach (Delves-Broughton 1990).

Sposób działania nizyny sprowadza się do rozproszenia potencjału błonowego, co skutkuje wyciekami strukturalnych składników komórkowych (np. ATP), lub w poważniejszych przypadkach lizą komórki.

Badania toksykologiczne pokazują, że nizyna jest bardzo szybko rozkładana w żołądku przez znajdujące się tam enzymy trawienne. Dodatkowo niemożliwe jest wykrycie obecności nizyny w ślinie ludzi spożywających preparaty i produkty zawierające ten enzym już po 10 minutach od momentu spożycia (Claypool *et al.* 1966). Nie stwierdzono również możliwości uczulania ludzi przez nizynę. Dodatkowo wiele przeprowadzonych badań nie potwierdziło możliwości pojawienia się zjawiska tzw. oporności krzyżowej (oporność krzyżowa jest to obniżenie wrażliwości na działanie jednego czynnika terapeutycznego w wyniku ekspozycji na działanie czynnika wykazującego podobny mechanizm działania np. obniżenie wrażliwości patogenów ludzi w wyniku spożywania mięsa zwierząt hodowlanych profilaktycznie poddawanego antybiotykoterapii w celu zapobiegania infekcjom bakteryjnym), co mogłoby w znaczący sposób wpłynąć na terapeutyczne stosowanie tego peptydu (Delves-Broughton 1990). Niezaprzeczalną zaletą tej bakteriocyny jest również fakt, że szczepy produkujące ją, są obecne od wieków w produktach mlecznych i nie powodowały żadnych szkód wśród ludzi i zwierząt. Z powodu wyżej wymienionych zalet w roku 1969 dopuszczono nizynę do powszechnego stosowania jako biokonserwant do żywności (stosowana w ponad 50 krajach). Nizyna bardzo dobrze nadaje się do zastosowania w produktach spożywczych, które ze względu na swoją naturę nie mogą być w pełni sterylizowane w procesie produkcyjnym) (Delves-Broughton *et al.* 1996)

Poniżej podano kilka przykładów produktów, w których skutecznie hamuje się rozwój szkodliwej lub nawet patogennej flory poprzez użycie nizyny:

- sery - zapobieganie rozwojowi bakterii beztlenowych z rodzaju *Clostridium*, których spory są często obecne w surowcach wykorzystywanych w produkcji serów; ponadto spory *Clostridium* spp. wykazują znaczną odporność na działanie wysokiej temperatury. Udowodniono między innymi wysoką skuteczność zapobiegania przez nizynę wzrostowi *C. botulinum* w serkach topionych.

- desery mleczne - przedłużenie czasu przechowywania deserów mlecznych (takie produkty nie mogą być w pełni sterylizowane, jedynie pasteryzowane, ze względu na zanik walorów smakowych i odżywczych); dodatek nizyny pozwala na dłuższy czas przechowywania bez ryzyka rozwoju flory patogenicznej.
- mleko - w krajach o umiarkowanym klimacie stosowanie nizyny w mleku jest zabronione (brak problemów z przechowywaniem mleka pasteryzowanego), w krajach o klimacie cieplejszym dodatek nizyny do mleka pozwala na jego dłuższe przechowywanie.
- konserwowe produkty żywnościowe, tzw. „żywność puszkowana” - obniżenie temperatury obróbki cieplnej przed zapuszkowaniem pożywienia, przedłużenie czasu przechowywania pożywienia puszkowanego w rejonach o podwyższonej temperaturze otoczenia (rejon o cieplejszym klimacie). Zapobieganie rozwojowi bakterii z rodzaju *Clostridium* oraz *Bacillus* (zależne od wartości pH pożywienia puszkowanego).
- napoje alkoholowe - nizyna może powstrzymać wzrost niepożądanych mikroorganizmów w piwie, nie wpływając przy tym na wzrost i fermentację mikroorganizmów pożytecznych
- pasteryzowane produkty jajeczne - produkty jajeczne (całe jajka, białka, żółtka) są poddawane obróbce termicznej w celu zniszczenia bakterii z rodzaju *Salmonella*. Obróbka jest jednak niewystarczająca, żeby pozbyć się sporów oraz niektórych bakterii Gram dodatnich oraz gram ujemnych.

Do tej pory do powszechnego użytku w przemyśle spożywczym dopuszczono tylko dwie bakteriocyny: nizynę (Nisin) pod nazwą komercyjną Nisaplin® (Danisco, Copenhagen, Denmark) oraz pediocynę PA-1 (Pediocin PA-1) pod nazwą komercyjną ALTA™ (Kerry Bioscience, Carrigaline, Co. Cork, Ireland).

Prowadzone ostatnio badania wykazują dużą aktywność bakteriocyn względem wielu patogenów wywołujących choroby ludzi i zwierząt (warunki *in vitro*). Może to świadczyć o dużych możliwościach aplikacyjnych bakteriocyn w medycynie i weterynarii. Naukowcy starają się dowiedzieć, że substancje te są dobrą alternatywą dla stosowanych obecnie antybiotyków. Dodatkowo duży nacisk kładzie się też na niewielką możliwość indukowania zjawiska lekooporności przez bakteriocyny.



Obecnie prowadzi się badania nad terapeutycznym zastosowaniem bakteriocyn do leczenia:

a) zapalenia płuc - obecnie jest to bardzo częsta przyczyna śmierci zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się. Główną przyczyną tej choroby jest *Streptococcus pneumoniae*, jednak wśród innych mikroorganizmów ją powodujących można wymienić m. in. *S. aureus*, *P. aeruginosa*. Do tej pory, na podstawie badań *in vitro*, znaleziono kilka bakteriocyn, które wykazują wysoką aktywność względem trzech wymienionych powyżej szczepów bakteryjnych np. subtylozyna A, mutacyjna 1140 oraz saliwarycyna D - zapalenie ucha środkowego - powszechna choroba małych dzieci powodowana przez *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecium*. Peptyd o nazwie ST4SA produkowany przez *Enterococcus mundtii* charakteryzuje się większą aktywnością względem wymienionym wyżej szczepom bakteryjnym niż stosowany w przypadku infekcji antybiotyk.

b) infekcje skóry oraz tkanek miękkich - powodowane m. in. przez *Propionobacterium acnes*, *S. aureus* czy *S. epidermidis*. Badania prowadzone na szczurach z uszkodzeniami skóry pokazały wysoką aktywność żelu zawierającego galiderminę względem *P. acnes* oraz *S. aureus*.

c) infekcje jamy ustnej - bakteriocyny wykazują również wysoką aktywność względem bakterii wywołujących różnorodne infekcje w jamie ustnej. Za zakażenia jamy ustnej odpowiadają nie tylko bakterie, ale również drożdżaki z rodzaju *Candida*.

d) infekcje żołądka i jelit - bakteriocyny wykazują bardzo wysoką aktywność względem mikroorganizmów odpowiedzialnych za infekcje żołądka i jelit u ludzi (mniej i bardziej poważne). Głównymi mikroorganizmami odpowiedzialnymi za ten rodzaj zachorowań są: *L. monocytogenes*, bakterie z rodzaju *Salmonella* oraz *Clostridium difficile*. Po przeprowadzeniu badań *in vitro* udało się znaleźć kilka bakteriocyn wykazujących obiecujące właściwości mogące znaleźć zastosowanie w leczeniu infekcji powodowanych przez wspomniane wcześniej rodzaje bakterii. Mikrobisporycyna oraz turycyna CD wykazują wysoką

aktywność względem bakterii z rodzaju *Clostridium*, dodatkowo mikrobisporycyna hamuje też wzrost *L. monocytognens*.

e) leczenie wrzodów żołądka oraz stanów zapalnych żołądka i dwunastnicy - w warunkach laboratoryjnych udało się wykazać wrażliwość bakterii gram ujemnej *Helicobacter pylori* (odpowiedzialna za wiele chorób układu pokarmowego) na działanie nizyny. po podaniu razem z nizyną środków chelatujących ta wrażliwość jeszcze dodatkowo wzrasta (Balckbum, Projan, 1994).

f) nizyna wykazuje też wysoki potencjał w leczeniu zapalenia gruczołu mlekowego u bydła (mastitis). Nizyna wykazuje silne właściwości bakteriobójcze względem patogenów wywołujących mastitis (*Staphylococcus*, *Streptococcus*) (Szweda *et al.* 2014a).

Sama aktywność przeciwbakteryjna nie wystarcza, aby związek został lekiem. Przed przedstawionymi związkami jeszcze daleka droga, aby mogły być stosowane do leczenia infekcji bakteryjnych u ludzi. Niemniej jednak przedstawione wyniki są obiecujące i mogą sugerować przyszłe zastosowanie bakteriocyn w praktyce klinicznej.

## **2.6. Przykłady bakteriocyn o aktywności gronkowcobójczej**

Obecnie w największej bazie danych opisanych i wstępnie scharakteryzowanych bakteriocyn (BACTIBASE database wersja 2, czerwiec 2009; (Hammami *et al.* 2007, 2010)) znaleźć można 177 (44% więcej niż w wersji poprzedniej) tych substancji, z czego aż 156 jest produkowanych przez bakterie Gram dodatnie (do tej grupy należą bakteriocyny produkowane przez bakterie kwasu mlekowego, które produkują 113 różnych bakteriocyn). Po przeszukaniu bazy danych znaleziono 13 bakteriocyn produkowanych przez bakterie należące do rodzaju *Staphylococcus*.

Przykładowe bakteriocyny produkowane przez gronkowce:

#### 1) Aureocyna A53

Aureocyna A53 jest bakteriocyną produkowaną przez szczep *S. aureus* A53 wyizolowany z mleka. Jest peptydem/białkiem składającym się z 51 reszt aminokwasowych, o wyraźnym kationowym charakterze (wypadkowy ładunek +8). Masa tej bakteriocyny to 6,0125 kDa. Cechą charakterystyczną dla aureocyny A53 jest jej wysoka termostabilność oraz niska wrażliwość na działanie enzymów proteolitycznych (niewrażliwa na działanie trypsyny pomimo obecności miejsca rozpoznania dla tego enzymu) (Netz, 2002). Aureocyna została sklasyfikowana jako nietypowa bakteriocyna klasy II na podstawie takich cech, jak aktywność względem bakterii z rodzaju *Listeria*, obecność niemodyfikowanych posttranslacyjnie reszt aminokwasowych oraz wielkości porównywalnej do bakteriocyn należących do tej klasy (około 6 kDa, 51 reszt aminokwasowych). Dodatkowo za zakwalifikowaniem aureocyny do klasy II przemawia jej silny kationowy charakter. Aureocyna posiada jednak kilka cech wyraźnie odróżniających ją od bakteriocyn klasy II. Peptyd ten nie posiada sekwencji liderowej, co jest charakterystyczne dla bakteriocyn klasy II. Dodatkowo geny warunkujące oporność oraz biorące udział w regulacji biosyntezy aureocyny A53 nie są zlokalizowane w pobliżu genu strukturalnego kodującego tą bakteriocynę (Netz, Bastos and Sahl 2002).

Sposób działania tej bakteriocyny polega na indukowaniu rozpadu komórek bakteryjnych. Aureocyna A53 rozprasza potencjał błonowy, powodując rozpad otoczki bakteryjnej. Dodatkowo jednocześnie powoduje zahamowanie biosyntezy DNA, polisacharydów i białek. Uogólniony mechanizm działania aureocyny polega na ogólnym niszczeniu błony komórkowej (jako całości), a nie wytwarzaniu w niej porów (tak, jak w przypadku niektórych innych bakteriocyn).

## 2) Epidermina (lantybiotyki)

Bakteriocyna produkowana przez *S. epidermidis* wykazująca wysoką aktywność względem bakterii Gram dodatnich, takich jak paciorkowce czy gronkowce. Masa tego peptydu to 2,32 kDa. W składzie zawiera aminokwasy charakterystyczne dla lantybiotyków: lantoinę i metylolantoinę. Powstaje początkowo w formie prepeptydu zawierającego 52 reszt aminokwasowych. W procesie obróbki posttranslacyjnej powstaje finalnie peptyd o długości 21 reszt aminokwasowych. Geny kodujące tę bakteriocynę są obecne na plazmidzie o wielkości 54kb, który znaleźć można u organizmów produkcyjnych (Schnell *et al.* 1988). Działanie bakteriocyny polega na depolaryzacji błony komórki poprzez tworzenie porów (Götz *et al.* 2014).

Sekwencja aminokwasowa epiderminy:

IASKFICTPGCAKTGSFNSYCC (Schnell *et al.* 1988)

## 3) Gallidermina (lantybiotyki)

Bakteriocyna produkowana przez *Staphylococcus gallinarum* wykazująca aktywność względem bakterii gram dodatnich takich, jak *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. faecalis*, *M. luteus* czy *P. aeruginosa*. Sposób działania polega na rozproszeniu potencjału błonowego komórki, co poprzedzone jest wytworzeniem w niej porów. Masa tego peptydu to 2320,05 Da. Gallidermina różni się od Epiderminy tylko jedną resztą aminokwasową: w pozycji 6 zamiast leucyny znajdziemy izoleucynę (Götz *et al.* 2014)

Sekwencja aminokwasowa galliderminy:

IASKFLCTPGCAKTGSFNSYCC (Kellner *et al.* 1988)

## 4) Pep 5 (lantybiotyki):

Bakteriocyna produkowana przez *S. epidermidis*. Wykazuje wysoką aktywność względem bakterii Gram dodatnich, głównie z rodzaju *Staphylococcus*. Wielkość tego

peptydu to 3,61 kDa. Jest to peptyd silnie kationowy (ładunek wypadkowy +8). Aktywność antybakteryjna polega na rozpraszaniu potencjału błonowego (tylko w przypadku jego obecności) oraz zastopowaniu procesów biosyntezy.

Sekwencja aminokwasowa Pep5:

TAGPAIRASVKQCQKTLKATRLFTVSCCKGKNGCK

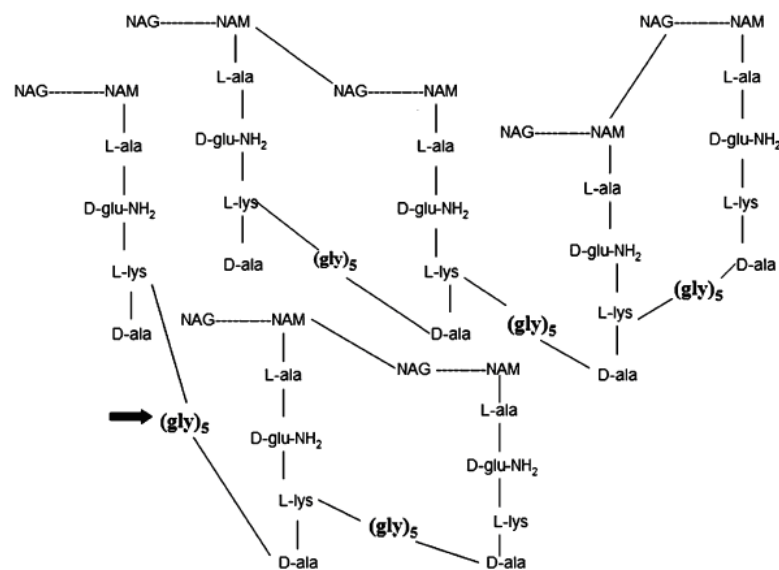
## 5) lizostafyna

Do bakteriocyn zalicza się także hydrolazę peptydoglikanu - lizostafynę (bakteriocyna klasy III (Bastos, Coutinho and Coelho 2010))

Lizostafyna jest enzymem pierwotnie wykrytym u *Staphylococcus simulans saprofiticus* (Schindler and Schuhradt 1964). Jest to metaloproteaza, która zawiera w strukturze atom cynku. Lizostafynę cechuje wysoka specyficzność działania. Rozpoznaje ona charakterystyczne dla ściany komórkowej *S. aureus* pentaglicylowe mostki sieciujące w peptydoglikanie. Bakterie należące do innych gatunków (zarówno Gram ujemne, jak i Gram dodatnie) nie są wrażliwe na działanie tego enzymu. Natywny enzym występuje w formie preproteiny, która zawiera sekwencję sygnałową zbudowaną z 33 reszt aminokwasowych, propeptydu zbudowanego z 211 reszt aminokwasowych, z których 195 jest zebranych w 15 powtórzeń tandemowych złożonych z 13 reszt aminokwasowych, i dojrzałego enzymu zbudowanego z 246 reszt aminokwasowych (27kDa) (Heinrich *et al.* 1987). N-terminalny peptyd (peptyd sygnałowy), po odcięciu od reszty enzymu, nie bierze udziału w rozkładzie peptydoglikanu gronkowców. Optymalne warunki działania lizostafiny to pH 7,5, temp około 40°C. W warunkach fizjologicznych (pH ~ 7) enzym obdarzony jest ładunkiem dodatnim, co umożliwia wiązanie go do ujemnie naładowanych składników peptydoglikanu. Początkowo nazwa lizostafyna dotyczyła kompleksu trzech białek: muramidazy, glukazamidazy oraz glicyloglicylowej endopeptydazy. Obecnie termin lizostafyna dotyczy tylko glicyloglicylowej endopeptydazy. Dokładny mechanizm działania enzymu polega na hydrolizie wiązania peptydowego pomiędzy trzecią

i czwartą resztą glicyny w pentaglicynowych mostkach międzypeptydowych (Szweda, Kotłowski and Kur 2005).

Na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej opracowano kilka heterologicznych układów umożliwiających wydajną produkcję lizostafiny oraz ustalono metodykę jej oczyszczania z zastosowaniem chromatografii metalopowinowactwa. Ostatnio opracowano wydajną i ekonomiczną metodę produkcji lizostafiny z zastosowaniem bioreaktora stacjonarnego (Szweda *et al.* 2014a).



Rys. 4.

Schemat struktury peptydoglikanu gronkowców ze wskazanym miejscem działania lizostafiny. → endopeptydaza. Endopeptydaza powoduje solubilizację pentaglicynowych mostków. NAG – N-acetyloglukozamina, NAM – N-acetylo kwas muraminowy, ala – alanina, lys – lizyna, glu – glutamina, (Gly)5 – pentaglicyna (Kumar 2008).

## **MATERIAŁY**

### **1. Szczepy bakteryjne**

#### **1.1. Szczepy wzorcowe (muzealne)**

*Escherichia coli* K-12

*Listeria monocytogenes* ATCC 10425

*Pseudomonasaeruginosa* ATCC 27853

*Staphylococcus aureus* PCM2051

*Staphylococcus aureus* ATCC 29213

*Staphylococcus aureus* ATCC 6530

*Staphylococcus epidermidis* PCM2118

*Micrococcusluteus* ATCC 10240

#### **1.2. Izolaty kliniczne i weterynaryjne**

Izolaty z rodzaju *Staphylococcus* znajdujące się w kolekcji Katedry Technologii Leków i Biochemii (n=206).

Szczepy (n=206) były izolowane od bydła chorego na mastitis (n=158) oraz od pacjentów leczonych klinicznie (n=48). Szczepy gronkowca izolowane od bydła chorego na mastitis znajdowały się już w kolekcji Katedry (n=120), pozostałe zostały udostępnione przez Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach (n=38) (Jakubczak *et al.* 2007; Kot *et al.* 2012). Osiemnaście szczepów pochodzenia szpitalnego zostało dostarczonych przez Laboratorium Mikrobiologiczne przy Szpitalu Wojewódzkim w Koszalinie (Polska). Trzydzieści szczepów pochodzenia szpitalnego otrzymano z Katedry Mikrobiologii Klinicznej przy Szpitalu Centralnym w Växjö (Szwecja) (Sjölund and Kahlmeter 2008). Wszystkie szczepy izolowane od pacjentów zostały sklasyfikowane jako *S. aureus* (n=48), natomiast szczepy odzwierzęce należały do trzech gatunków: *S. aureus* (n=120), *S. epidermidis* (n=16) oraz *S. xylosus* (n=22).

Dokładny spis szczepów zamieszczono w załączniku nr 1.

## **2. Podłoża**

Stosowano podłoża komercyjne. Każde z podłoży przed użyciem poddawano sterylizacji w autoklawie w temperaturze (121°C, 1,5 atm. nadciśnienia, 20 min.). Po ochłodzeniu podłoża dodawano do niego w sposób jałowy odpowiednie antybiotyki i składniki dodatkowe (jeśli były wymagane). Jeśli podłoże wymagało specjalnego sposobu przygotowania, postępowano według instrukcji dostarczonej przez producenta.

### **2.1. Podłoża płynne**

Brain - Heart Infusion(BD) - BHI - ekstrakt z 250 g serca wołowego (5g/L), wyciąg z 200 g mózgu cielęcego (12,5 g/L), wodorofosforan disodowy (2,5 g/L), D(+)-glukoza (2 g/L), pepton (10g/L), chlorek sodu (5g/L)

Casamino Acids(BD) - CAA - mieszanina aminokwasów i małych peptydów powstałych w procesie kwasowej hydrolizy kazeiny

Luria Bertani Broth (SIGMA ALDRICH) - LB - pepton K (10 g/L), ekstrakt drożdżowy (5 g/L), NaCl (10 g/L)

MuellerHinton Broth (SIGMA ALDRICH) - MHB - kwaśny hydrolizat kazeiny (17,5 g/L), ekstrakt wołowy (3 g/L), skrobia rozpuszczalna (1,5 g/L)

Muller Hinton Broth 2 (Cation Adjusted Muller Hinton Broth) (SIGMA ALDRICH) - MHB 2 -kwaśny hydrolizat kazeiny (17,5 g/L), ekstrakt wołowy 3 g/L, skrobia rozpuszczalna (1,5g/L)

Tryptone Soya Broth (SIGMA ALDRICH) - TSB - enzymatyczny hydrolizat kazeiny (17,0), papainowy hydrolizat z soi (3,0 g/L), dekstroza (2,5 g/L), chlorek sodu (5 g/L), fosforan dipotasowy (2,5 g/L)



## 2.2. Podłoża stałe

LuriaBertani Agar (SIGMA ALDRICH) - LA (skład jak LB, dodatkowo 15 g/L agaru)

Mannitol Salt Agar (Chapman) (BTL) - CH - ekstrakt z tkanki zwierzęcej (5,0 g/L), enzymatyczny hydrolizat kazeiny (5,0 g/L), ekstrakt wołowy (1,0 g/L), chlorek sodu (75 g/L), D-Mannitol (10,0 g/L), czerwień fenolowa (0,026 g/L), agar (15 g/L)

MuellerHinton Agar (SIGMA ALDRICH) - MHA (skład jak MHB, dodatkowo 15 g/L agaru)

TryptoneSoya Agar (SIGMA ALDRICH) - TSA (skład jak TSB, dodatkowo 15 g/L agaru lub 7,5 g/L agaru w zależności od przeznaczenia)

## 3. Odczynniki

acetonitryl (SIGMA ALDRICH)

agar mikrobiologiczny (BTL, Zakład enzymów i Peptydów)

agaroz (Proma)

bromek etydy (SIGMA ALDRICH)

etanol (POCH - obecnieAvantor Performance Materials Poland S.A.)

fosforan sodowy I zas. (POCH - obecnieAvantor Performance Materials Poland S.A.)

fosforan sodowy II zas. (POCH - obecnieAvantor Performance Materials Poland S.A.)

kwatryfluoroocetowy (TFA) (SIGMA ALDRICH)

PBS (phosphate buffered saline) (SIGMA ALDRICH)

siarczan amonu (POCH - obecnieAvantor Performance Materials Poland S.A.)

Zestawy:

PCR Master MIX (A&A Biotechnology)- komercyjnie dostępna mieszanina składników do reakcji PCR

DNA Genomic Mini (A&A Biotechnology) - komercyjnie dostępny zestaw do izolacji genomowego DNA

DNA Plasmid Mini (A&A Biotechnology) - komercyjnie dostępny zestaw do izolacji plazmidowego DNA

Wzorce markerów wielkości:

- a) GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas) - zakres od 250 bp do 10,000 bp
- b) Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder (Thermo Scientific) MW 1,7 kDa; 4,6 kDa; 10 kDa; 17 kDa; 26 kDa; 42 kDa
- c) Unstained Polypeptide SDS-PAGE Standards MW 1,4 kDa; 3,4 kDa; 6,5 kDa; 14,4 kDa; 16,9 kDa; 26,6 kDa

## **4. Sprzęt laboratoryjny**

### **4.1. Aparatura**

- a) aparat do elektroforezy agarozowej, DNA Gdańsk
- b) aparat do elektroforezy białkowej, DNA Gdańsk
- c) czytnik mikroplamki Victor<sup>3</sup>V, PerkinElmer
- d) komora laminarna, Heal Force
- e) zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej Agilent 1200 series sprzężony z detektorem z matrycą fotodiodową (DAD)
- f) MALDI MS-ABI Sciex 5800 TOF/TOF system with LC-MLDI, MDS Analytical Technologies
- g) pH-metr, Elmetron
- h) pipety automatyczne, Eppendorf, HTL
- i) spektrofotometr, ThermoSpectronic, Genesys 20
- j) waga analityczna, Zakłady Mechaniki Precyzyjnej, Gdańsk
- k) waga laboratoryjna, Radwag
- l) wirówka laboratoryjna, Sigma, Eppendorf
- m) wytrząsarka mikrobiologiczna, Indos

### **4.2. Materiały jednorazowego użytku**

- a) filtry membranowe do sterylizacji PES, średnica porów 0,2 µm, Cronus

- b) mikro płytki z tworzywa sztucznego, sterylne, 96-dołkowe, Medlab
- c) płytki Petriego, sterylne, Metlab
- d) probówki typu falcon 15 mL, Falcon
- e) probówki typu falcon 50 mL, Falcon.

## **METODY**

### **1. Hodowle bakteryjne**

Hodowlę bakterii w podłożach płynnych prowadzono z wytrząsaniem (37°C, 24h, 170 rpm)

Hodowlę na podłożach stałych prowadzono w inkubatorze stacjonarnym (37°C, 24h).

### **2. Przygotowanie inokulum**

Inokulum potrzebne do testów (np. wyznaczenie parametru MIC oraz wykonywanie posiewów powierzchniowych) wykonywano w buforze PBS (Phosphate Buffered Saline; pH 7,4; SIGMA), z kultur bakteryjnych inkubowanych wcześniej przez okres 24h, w zależności od potrzeb na podłożu stałym lub płynnym. Przygotowywano zawiesinę komórek o gęstości optycznej  $OD_{600}=0,132$ , co odpowiada w przybliżeniu  $10^7$  CFU/mL.

### **3. Wyznaczanie parametru MIC (minimalne stężenie powodujące zahamowanie wzrostu)**

Aktywność przeciwbakteryjną oznaczano przy pomocy wyznaczenia najmniejszego stężenia związku hamującego wzrost szczepu wrażliwego (MIC, minimal inhibitory concentration) metodą podwójnych seryjnych rozcieńczeń zgodnie ze wskazaniami Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI norma nr M07-A9). Wyznaczano parametr MIC<sub>90</sub> tzn. stężenia związku hamującego wzrost szczepu wrażliwego w 90% w stosunku do hodowli kontrolnej, prowadzonej w podłożu nie zawierającym substancji hamujących wzrost bakterii.

#### **4. Elektroforeza agarozowa DNA**

Separację elektroforetyczną fragmentów DNA prowadzono w 1 - 2% żelach agarozowych (zależnie od wielkości rozdzielanych fragmentów DNA - plazmidowe DNA rozdzielano w żelu 1%, produkty PCR w żelu 2%) z dodatkiem bromku etydyny (1 µg/mL) w buforze TAE (2,0 M Tris (pH 8,3), 1,0 M kwasu octowego, 0,05 M EDTA; stężony 50x). Separacje prowadzono w buforze 1x stężonym, przy napięciu 10V/cm żelu. Wyniki rozdziału elektroforetycznego analizowano w świetle lampy UV (długość fali 312 nm).

marker DNA – GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas) - zakres od 250 bp do 10,000 bp

Przykładowe parametry prowadzenia procesu

$U = 100 \text{ V (const)}$

$t = 30 \text{ min}$

#### **5. Identyfikacja szczepów produkujących bakteriocyny - badania przesiewowe**

##### **5.1. Identyfikacja szczepów produkujących substancje o aktywności bakteriobójczej**

Badania przesiewowe prowadzono dwiema metodami:

###### **a) metoda powierzchniowa<sup>1</sup>**

Komórki szczepów referencyjnych (potencjalnie wrażliwych na działanie bakteriocyny) posiewano powierzchniowo na całą powierzchnię pożywki TSA (1,5% agaru) w płytce Petriego. Do posiewu wykorzystywano zawiesinę o gęstości optycznej  $OD_{600}=0,132$ . Na podłoże, na którym znajdował się już posiany szczep wrażliwy wysiewano potencjalne szczepy produkcyjne w postaci kreski przy wykorzystaniu jałowej wykałaczki. Tak przygotowane płytki inkubowano w 37°C przez 24h. Produkcję substancji o aktywności gronkowcobójczej identyfikowano jako obecność strefy

przejaśnienia (zahamowanie wzrostu szczepu wrażliwego) wokół szczepu wysianego w postaci kreski.

b) metoda zalewowa<sup>1</sup>

Komórki szczepu potencjalnie produkcyjnego wysiewano punktowo (przy wykorzystaniu jałowych wykałaczek lub igieł) na podłoże stałe TSA w płytce Petriego. Następnie płytki inkubowano przez 24 h w temp. 37°C. W kolejnym etapie przygotowywano warstwę podłoża TSA o dwukrotnie mniejszym stężeniu agaru (0,75% agaru – tzw. 'soft agar'). W tak przygotowane podłoże zaszczepiano komórkami bakterii szczepu wrażliwego (końcowe stężenie - 0,001% obj.; 10 µL hodowli nocnej na każde 10mL podłoża). Następnie zawiesiny mieszano dokładnie, starając się nie spienić podłoża. Tak przygotowaną mieszaniną zalewano płytkę, na której wcześniej wyhodowano szczep potencjalnie produkujący bakteriocynę (po okresie inkubacji w inkubatorze stacjonarnym). Płytki inkubowano w 37°C przez kolejne 24h. Produkcję substancji o aktywności gronkowcobójczej identyfikowano jako strefę zahamowania wzrostu szczepu wrażliwego wokół kolonii szczepu produkcyjnego.

---

<sup>1</sup>w przypadku metody zalewowej możliwe jest również sprawdzenie produkcji bakteriocyny po okresie dłuższym niż 24h (przyjmuje się, że szczep wrażliwy może rosnąć tylko przez 24 h). W przypadku metody powierzchniowej produkcja bakteriocyny i wzrost szczepu produkcyjnego odbywają się w tym samym czasie. W przypadku metody zalewowej możliwe jest inkubowanie płytki z zaszczepionym szczepem potencjalnie produkującym bakteriocynę przez okres dłuższy niż 24 h (np. 48h, 72h). Dopiero po okresie inkubacji następuje zalanie płytki podłożem ze szczepem wrażliwym. Inkubacja ze szczepem wrażliwym prowadzona jest przez okres 24 h.

<sup>2</sup>) jako szczepy potencjalnie wrażliwe wykorzystywano szczepy komercyjnie dostępne: *S. aureus* PCM 2051, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC6530, *S. epidermidis* PCM2118, *L. monocytogenes* ATCC10425, *M. luteus* ATCC10240 oraz izolaty z kolekcji Katedry o różnych typach lekooporności (według wykonanych wcześniej antybiogramów (Szweda *et al.* 2014b)). Jako potencjalne szczepy produkcyjne wykorzystano wszystkie szczepy znajdujące się w kolekcji Katedry.

We wstępnym etapie prowadzenia badań uznano, że metoda zalewowa jest bardziej odpowiednia, gdyż pozwala obserwować zmiany wydajności produkcji bakteriocynty przez kolonie szczepu produkcyjnego w czasie. Dzięki tej właściwości możliwe było sprawdzenie, czy bakteriocynta nie była produkowana po czasie dłuższym niż 24h (obserwacji dokonywano po czasie 24 h, 48 h, oraz 72 h inkubacji szczepu produkcyjnego w temp. 37°C).

## **5.2. Test podatności produkowanego związku bakteriobójczego na działanie proteaz**

Test wykonywano wg procedury opisanej w literaturze (Lee, Churey and Worobo 2008). Zastosowano następujące enzymy: Proteinaza K (20 mg/mL), Pronaza E (20 mg/mL) oraz Chymotrypsyna  $\alpha$  (25 mg/mL). W promieniu spodziewanej strefy zahamowania wzrostu szczepu wrażliwego wokół szczepu produkcyjnego<sup>2</sup> na powierzchni płytki wykonanej wg metodyki opisanej w p. 5.1a umieszczano 2 $\mu$ L roztworu enzymu, a następnie płytkę inkubowano przez 24h w temperaturze 37°C, po czym poddawano ocenie wizualnej. Pojawienie się zjawiska lokalnego cofnięcia strefy przejaśnienia (strefy zahamowania wzrostu) w miejscu, gdzie naniesiono roztwór enzymu proteolitycznego (tzw. 'half moon zone'- strefa półksiężyca), interpretowano jako przesłankę wskazującą na peptydowy (białkowy) charakter produkowanego związku bakteriobójczego.

## **5.3. Określenie spektrum aktywności bakteriocynty**

Określenie aktywności bakteriocynty względem wszystkich szczepów bakterii z rodzaju *Staphylococcus* znajdujących się w kolekcji Katedry oraz wymienionych wcześniej szczepów dostępnych komercyjnie ('Materiały 1') przeprowadzono

---

<sup>2</sup> Oszacowania przewidywanego zasięgu strefy zahamowania wzrostu dokonywano na podstawie wyników badań przesiewowych przeprowadzonych wg metodyki opisanej w rozdziale 'Materiały i Metody 5.1. a)'.

z wykorzystaniem metody zalewowej ('Metody 5.1. b)'). Szczep produkcyjny inkubowano przez 24 h w temp. 37°C. Płytkę po okresie inkubacji zalewano warstwą podłoża zawierającą kolejne szczepy z kolekcji. Następnie płytki inkubowano przez 24h w temp. 37°C, po czym sprawdzano obecność i rozmiar strefy zahamowania wzrostu wokół szczepu produkcyjnego<sup>3</sup>.

#### **5.4. Optymalizacja warunków produkcji bakteriocyny**

W celu ustalenia optymalnych warunków wytwarzania bakteriocyn w podłożu płynnym przez komórki zidentyfikowanych szczepów produkcyjnych przeprowadzano optymalizację tego procesu.

##### **a) optymalizacja składu podłoża**

-komórki wyselekcjonowanych szczepów wytwarzających substancje bakteriobójcze o strukturze peptydowej hodowano w podłożach płynnych: Luria Bertani Broth, Mueller-Hinton Broth, Trypticase Soy Broth, Brain-Heart Infusion, Casamino Acid przez 24 h oraz 48 h w 37°C z wytrząsaniem (170 rpm)  
-po zakończeniu hodowli komórki odwirowywano (12 000 tys. obrotów/min., 4°C, 20 minut) i sprawdzano aktywność bakteriobójczą płynu pohodowlanego względem szczepu wrażliwego. Sprawdzenie aktywności wykonywano za pomocą zmodyfikowanej metody zalewowej (z wykorzystaniem studzienek o średnicy około 1 cm wykonanych w agarze) (Schillinger and Lücke 1989). W studzienkach umieszczano płyn pohodowlany w ilości 300-400µL, a następnie suszono w komorze laminarnej do całkowitego odparowania zawartości studzienki (częściowo odparowywany płyn wniknął do agaru). Płytkę zalewano podłożem TSA (0,75% agaru) z zaszczepionym szczepem wrażliwym.

---

<sup>3</sup>Jako szczepów produkcyjnych używano szczepów, w przypadku których wykazano zdolność produkcji substancji bakteriobójczych o strukturze peptydowej (aktywność + pozytywny wynik testu podatności na proteazy). ('Metody 5.1. oraz 5.2.').



Tak wykonane płytki inkubowano przez okres 24h w temp. 37°C. Pojawienie się strefy zahamowania wzrostu wokół studzienki interpretowano jako dowód aktywności przeciwbakteryjnej składnika (składników) badanego płynu pohodowlanego.

b) optymalizacja warunków temperaturowych hodowli szczepu produkcyjnego

Hodowlę zidentyfikowanego szczepu produkcyjnego prowadzono w podłożu TSB w temp. 30°C, 35°C oraz 37°C przez 24 h, pobierano próbki zawiesiny, odwirowywano a następnie sprawdzano aktywności supernatantu względem szczepu wrażliwego ('Metody 5.4. a)'). Miarą aktywności uzyskanego płynu pohodowlanego była wielkość (średnica) strefy zahamowania wzrostu.

c) optymalizacja skali produkcji bakteriocydu

Szczep produkcyjny hodowano w podłożu TSB (wybrane do dalszych testów na podstawie wyników otrzymanych w etapie doboru optymalnego podłoża użytego do produkcji peptydu - 'Metody 5.4. a)') w trzech różnych objętościach: 0,01 L, 0,1 L oraz 1 L. Warunki inkubacji (37°C, 24 h, wytrząsanie 170 rpm). Po okresie inkubacji, hodowlę wirowano (4500 rpm, 4°C, 20 min). Otrzymany płyn pohodowlany wykorzystano do testu aktywności z zastosowaniem metody zalewowej z zastosowaniem studzienek w agarze ('Materiały i metody 5.4 a)'). Płytki po przygotowaniu inkubowano w temp. 37°C przez okres 24 h. Zaobserwowane strefy zahamowania wzrostu zmierzono oraz porównano ze sobą ich średnice.

d) wyznaczanie krzywej produkcji bakteriocydu z zastosowaniem zmodyfikowanej metody zalewowej (z wykorzystaniem studzienek w agarze) ('Metody 5.4.a)').

Komórki szczepu produkcyjnego hodowano w podłożu TSB (37°C, 72h, 170 rpm). Pobierano próbki hodowli - 1 mL, po 0h, 3h, 6 h, 9h, 12h, 24h, 48h i 72h od momentu jej rozpoczęcia i dokonywano pomiaru OD<sub>600</sub>. Równolegle dokonywano

pomiaru aktywności przeciwbakteryjnej płynu pohodowlanego wg metody opisanej w p. 'Metody 5.4 a)'.  
'

### **5.5. Określanie wrażliwości bakteriocydu na temperaturę**

Próbki płynów pohodowlanych zebranych z 24 h hodowli bakterii produkujących peptyd (inkubacja w 37°C, wirowanie 4500 rpm, 4°C, 20 min) ogrzewano w temperaturze 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C oraz 90°C przez 10 minut. Aktywność bakteriobójczą roztworów po inkubacji sprawdzano zmodyfikowaną metodą zalewową przy wykorzystaniu studzienek wykonanych w agarze ('Metody 5.4. a)').

### **5.6. Procedura izolacji bakteriocydu**

Substancje bakteriobójcze o budowie peptydowej (lub białkowej) wytwarzane przez wyselekcjonowane szczepy produkcyjne izolowano z zastosowaniem trój etapowej procedury, na którą składały się: wysalanie, chromatografia oddziaływań hydrofobowych i wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych (RP-HPLC).

Komórki produkcyjne hodowano w podłożu TSB w temperaturze 37°C przez 24h z wytrząsaniem (170 rpm) w objętości całkowitej 1L. Zawiesinę pohodowlaną odwirowywano (4500 rpm, 4°C, 20 min). Sprawdzano aktywność przeciwbakteryjną płynu pohodowlanego ('Metody 5.4.a)'), a następnie płyn pohodowlany poddawano trój etapowej procedurze izolacji substancji czynnej.

#### **5.6.1. Frakcjonowanie wysalanie z zastosowaniem siarczanu amonu**

Upřednio przygotowany nasycony roztwór siarczanu amonu (1L) dodawano kroplami do płynu pohodowlanego (1L) używając rozdzielacza umieszczonego w dużej

zlewce (3L) z ciągłym mieszaniem. Po dodaniu całej ilości roztworu siarczanu amonu, mieszanie kontynuowano przez 1h.

- a) uzyskaną mieszaninę wirowano (10 000 x g, 4°C, 15 min) w celu oddzielenia osadu od cieczy.
- b) po wirowaniu do pozostałego supernatantu dodawano kolejną porcję nasyconego roztworu siarczanu amonu. Następnie powtarzano etap mieszania i wirowania.
- c) osady otrzymane w wyniku frakcjonowanego wysalania rozpuszczano w buforze PBS o objętości 2 mL w celu sprawdzenia obecności oraz aktywności substancji antybakteryjnej.

#### 5.6.2. Chromatografia kolumnowa oddziaływań hydrofobowych

W drugim etapie procedury izolacyjnej zastosowano chromatografię oddziaływań hydrofobowych, na złożu Octyl Sepharose CL-4B (GE Healthcare).

Złoże chromatograficzne OctylSepharoseCL-4B (20cm<sup>3</sup>) przepłukiwano wodą dejonizowaną (4 x 100 mL), zawieszano w 100 mL buforu wiążącego (0,05 M bufor fosforanowy; 1,7 M (NH)<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>; pH 7,0) i tak otrzymaną zawiesinę używano do wypełnienia kolumny (o objętości 53 mL, szerokości 1,5 cm oraz wysokości 30 cm (SIGMA)). Złoże upakowane w kolumnie przepłukiwano następnie ponownie buforem wiążącym (500 mL). Po naniesieniu próbki, otrzymanej przez rozpuszczenie osadu po wysalaniu (2 mL) lub bezpośrednio supernatantu powstałego po wirowaniu hodowli bakteryjnej (całość płynu pochodowlanego 500-1000 mL) kolumnę ponownie przepłukiwano buforem wiążącym (200mL).

Następnie przeprowadzano elucję białek i peptydów z kolumny roztworami o objętości 25 mL, o malejącym stężeniu siarczanu amonu w buforze fosforanowym 0,05M pH 7,0 (stosowane stężenia: 1,7 M; 1,5 M; 1 M; 0,8 M; 0,5 M; 0 M). Zbierano frakcje o objętości 25 mL.

W drugiej fazie przeprowadzano elucję roztworami etanol/0,05M bufor fosforanowy, pH 7,0 (stężenia etanolu (v/v): 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%). Zbierano frakcje o objętości 25 mL.

Na każdym etapie oczyszczania sprawdzano aktywność przeciwbakteryjną frakcji eluatów z kolumny, z zastosowaniem metody zalewowej (z wykorzystaniem studzienek) ('Metody 5.4a'). Jako szczep wrażliwy stosowano *L. monocytogenes* ATCC 10425 oraz *S. xylosus* (30c1).

### 5.6.3. Zagęszczanie frakcji eluatu

Eluaty wykazujące aktywność przeciwbakteryjną zebrane z kolumny ze złożem Octyl Sepharose CL-4B poddawano zagęszczaniu z zastosowaniem wyparki obrotowej (25°C, 100rpm). Proces prowadzono do całkowitego odparowania etanolu z próbki. Po zagęszczeniu sprawdzano aktywność mikrobiologiczną próbki względem szczepów wrażliwych *L. monocytogenes* ATCC 7644 oraz *S. xylosus* (oznaczony jako 30c1).

### 5.6.4. Oczyszczanie przy wykorzystaniu chromatografii wysokociśnieniowej w układzie faz odwróconych - RP-HPLC

Zagęszczone aktywne frakcje poddano oczyszczaniu z zastosowaniem chromatografii wysokociśnieniowej w układzie faz odwróconych. Wykorzystano kolumny Phenomenex Jupiter 5u C5 300 Å, Phenomenex Jupiter 5u C18 300 Å oraz Phenomenex Jupiter Proteo 4µm 90Å.

Pierwotny układ faz:

Faza ruchoma A: 99,99% woda, 0,01% TFA

Faza ruchoma B: 99,99% acetonitryl, 0,01% TFA

Parametry prowadzenia procesu oczyszczania:

Gradient: od 95A:5B do 100B w czasie 30 minut, 100B przez 2 minuty, 100B do 95A:5B przez 2 minuty, 95A:5B przez 6 minut po czasie oczyszczania

Prędkość przepływu czego: 1mL/min

Temperatura: temperatura otoczenia, około 20°C

Detekcja: UV przy długościach fal 216 nm i 280 nm

Przygotowanie próbek oraz przebieg separacji:

- 1) próbki o objętości 2,0 mL poddawano filtracji z wykorzystaniem filtra PES o średnicy 13 mm i porowatości 0,22 µm w temperaturze pokojowej;
- 2) włączenie systemu HPLC i zrównoważenie kolumny z zastosowaniem fazy ruchomej 95A:5B przez 30 minut. (sygnał absorbancji powinien być płaski);
- 3) rozpoczęcie procedury oczyszczania próbki z gradientem – wg metodyki podanej powyżej;
- 4) wypełnienie kolumny (zawieszenie złoża) buforem do przechowywania charakterystycznym dla danej kolumny.

#### **5.7. Sprawdzenie wpływu składników fazy ruchomej na aktywność bakteriobójczą preparatu białkowego poddawanego oczyszczaniu**

Z powodu problemów z otrzymaniem homogennego, aktywnego biologicznie preparatu bakteriocynty po oczyszczaniu zastosowaniem metody HPLC przeprowadzono testy mające na celu określenie ewentualnego, negatywnego wpływu poszczególnych składników fazy ruchomej na stabilność i aktywność biologiczną izolowanej substancji bakteriobójczej.

Test przeprowadzono mieszając aktywną frakcję otrzymaną po oczyszczaniu bakteriocynty z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofobowych z poszczególnymi składnikami faz ruchomych wykorzystywanych w HPLC. Do testu aktywności przygotowano następujące próbki:

- a) frakcja aktywna + acetonitryl (do końcowego stężenia 20%)
- b) frakcja aktywna + acetonitryl (do końcowego stężenia 50%)

- c) frakcja aktywna + acetonitryl (do końcowego stężenia 20%) + TFA (0,01%)
- d) frakcja aktywna + acetonitryl (do końcowego stężenia 20%) + TFA (0,001%)
- e) frakcja aktywna + acetonitryl (do końcowego stężenia 50%) + TFA (0,01%)
- f) frakcja aktywna + acetonitryl (do końcowego stężenia 50%) + TFA (0,001%)

Mieszaniny przygotowywano poprzez mieszanie ze sobą frakcji otrzymanej po HIC z różnymi roztworami przedstawiającymi składniki fazy ruchomej np. mieszanina 'aktywna frakcja + acetonitryl 50%' powstała poprzez zmieszanie ze sobą frakcji aktywnej i acetonitrylu w stosunku 1:1. W przypadku mieszanin zawierających TFA konieczne było dodanie na końcu kwasu do stężenia końcowego 0,001% (v/v) lub 0,0001% (v/v). W podobny sposób przygotowano również pozostałe frakcje.

Każdą z próbek inkubowano w temperaturze 4°C, w temperaturze pokojowej oraz w 37°C. Aktywność bakteriobójczą preparatu sprawdzano po następujących czasach inkubacji: 0 s; 0,5 h; 1 h; 3h; 6 h; 24 h; 48 h; 72 h z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody zalewowej (wg 'Metody 5.4. a)'). Płytki inkubowano przez 24 h w temperaturze 37°C.

## **5.8. Oczyszczanie przy wykorzystaniu chromatografii rozmiarów wykluczających w systemie FPLC**

Zastosowana kolumna: Superdex Peptide 10/300 GL

Zastosowane układy oczyszczania peptydu:

- 1) faza ruchoma 0,05M bufor fosforanowy pH 7,0  
przepływ 1mL/min  
objętość próbki 250µL
- 2) faza ruchoma 60% (v/v) etanol w wodzie  
przepływ 1mL/min  
objętość próbki 250µL

Procedura:

- 1) próbkę (2,5 mL) filtrowano z wykorzystaniem filtra PES o średnicy 13 mm i średnicy porów 0,20 μm w temperaturze pokojowej
- 2) układ oraz pompę płukano wodą redestylowaną (dwie objętości martwej kolumny 2CV, przepływ 0,5 mL/min)
- 3) układ płukano buforem do elucji (2CV, 0,5 mL/min)
- 4) nanoszono próbkę o objętości 500 μL
- 5) elucja (2CV, przepływ 1 mL/min). Zbierano frakcje o objętości 1 mL.
- 6) po zakończonej procedurze oczyszczania pompy i układ płukano wodą redestylowaną (2CV, przepływ 0,5 mL/min)
- 6) kolumnę płukano, a następnie złożę wypełniono roztworem 20% etanolu w wodzie (2CV, przepływ 0,5 mL/min)

## **5.9. Analiza elektroforetyczna i detekcja aktywności bakteriobójczej peptydu z zastosowaniem Tricine SDS-PAGE**

Elektroforezę Tricine SDS-PAGE oraz określanie aktywności bakteriobójczej żelu wykonano z zastosowaniem metody zalewowej (Schägger and von Jagow 1987). Analizę przeprowadzono względem próbek płynu pochodzącego z hodowli zawierającego bakteriocynę poddaną frakcjonowaniu wysalaniu siarczanu amonu.

### 5.9.1. Przygotowanie żelu Tricine SDS-PAGE składającego się z trzech warstw

(1) Dolny żel

1,0 mL (1,3 g) - glicerol

5,5 mL - 30% roztwór akrylamidów (29:1)

3,3 mL - bufor do sporządzania żelu (skład podano poniżej)

1,2 mL - woda redestylowana

odgazowywanie przez 10-15 minut

50 μL - 10% roztwór nadsiarczanu amonu w wodzie (APS)

5 μL - TEMED

(2) Środkowy żel

3,0 mL - 30% roztwór akrylamidów (29:1)

3,0 mL - bufor do sporządzania żelu (skład podano poniżej)

3,0 mL - woda redestylowana

odgazowywanie przez 10-15 minut

50  $\mu$ L - 10% roztwór nadsiarczanu amonu w wodzie (APS)

5  $\mu$ L - TEMED

(3) Górny żel

1,2 mL - 30% roztwór akrylamidów (29:1)

3,0 mL - bufor do sporządzania żelu (skład poniżej)

4,8 mL - woda redestylowana

odgazowywanie przez 10-15 minut

75  $\mu$ L - 10% roztwór nadsiarczanu amonu w wodzie (APS)

7,5  $\mu$ L - TEMED

5.9.2. Procedura:

- a) przygotowanie wszystkich trzech roztworów (30% roztwór akrylamidów, bufor do sporządzania żelu, woda) prowadzono w 125 mL kolbach ssawkowych
- b) przed dodaniem APS i TEMED mieszaninę roztworu akrylamidów, wody oraz buforu do sporządzania żeli odgazowywano (przy wykorzystaniu pompki wodnej)
- c) po odgazowaniu mieszanin przeznaczonych do przygotowania żelu dolnego oraz środkowego dodawano do nich odpowiednią ilość nadsiarczanu amonu i TEMED - całość delikatnie mieszano
- d) przygotowane mieszaniny nakładano pomiędzy szyby (kolejno dolna warstwa i środkowa); niespolimeryzowany żel pokrywano warstwą 500  $\mu$ L n-butanolu (może być też woda destylowana)
- e) po spolimeryzowaniu żeli dolnego i środkowego, n-butanol usuwano poprzez wypłukanie wodą, po czym szyby wypełniano trzecią warstwą żelu (po dodaniu odpowiednich objętości APS i TEMED)



- f) szyby ze spolimeryzowanym żelem umieszczono w aparacie do elektroforezy
- g) komory anodową i katodową aparatu do elektroforezy wypełniano odpowiednimi buforami (składy buforów podano poniżej)
- h) warunki prowadzenia elektroforezy - 120 V; 90 min

### 5.9.3. Bufory do przeprowadzenia elektroforezy

1. Bufor do przygotowywania żelu (3 M TRIS, 0,3% SDS, pH 8,45)
  
2. Bufor katodowy (10x stężony) pH 8,23
  - 121,14 g - Tris (MW 121,14)(końcowe stężenie po rozcieńczeniu 0,1 M)
  - 179,17 g - Tricine (MW 179,17)(końcowe stężenie po rozcieńczeniu 0,1 M)
  - 10 g - SDS (lub 100 mL 10% SDS)
  - woda destylowana (MiliQ) do 1L
  
3. Bufor anodowy (10x stężony) pH 8,9
  - 242,2 g - Tris (końcowe stężenie po rozcieńczeniu 0,2 M)
  - stężony 12,1 M HCl do ustalenia pH (~27-28 mL)
  - woda destylowana (MiliQ) do 1L
  
4. Coomassie Brilliant Blue G-250
  - 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G-250
  - 10 mL woda destylowana (MiliQ)
  
5. Bufor do zawieszania próbek
  - 2x stężony
  - 5,4 mL - woda destylowana (MiliQ)
  - 0,5 mL - 3 M Tris-HCl, 0,3% SDS, pH 6,8 (bufor do sporządzania żelu)
  - 2,0 mL (2,4 g) - glicerol
  - 1,5 mL - 10% roztwór SDS w wodzie
  - 0,2 mL -  $\beta$ -merkaptoetanol

0,4 mL - 1% roztwór barwnika Coomassie Brilliant Blue G-250  
objętość końcowa 10 mL

5x stężony

1,2 mL - 3 M Tris-HCl, 0,3% SDS, pH 6,8 (bufor do sporządzania żelu)

4,0 mL (5,0 g) - glicerol

3,3 mL - 10% roztwór SDS w wodzie

0,5 mL -  $\beta$ -merkaptoetanol

1,0 mL - 1% roztwór barwnika Coomassie Brilliant Blue G-250 w wodzie  
objętość końcowa 10 mL

#### 5.9.4. Procedura przygotowania żelu Tricine SDS-PAGE do identyfikacji obecności bakteriocynty manifestującej się poprzez strefę przejaśnienia lub zahamowania wzrostu

- a) naniesienie na żel markera wielkości polipeptydu/białka oraz frakcji powstałych po oczyszczaniu siarczanem amonu wykazujących aktywność bakteriobójczą w różnych stężeniach (ważne jest wykonanie dokładnie dwóch identycznych kopii żelu)
- b) przeprowadzenie elektroforezy (120 V; 90 min)
- c) przepłukanie żeli roztworem metanolu oraz kwasu octowego w wodzie (50:10:40) przez 30 minut
- d) wybarwienie jednego z żeli przy wykorzystaniu 1% roztworu barwnika Coomassie Brilliant Blue w wodzie G-250 lub metody srebrowej (płukanie w buforze barwiącym, następnie w odbarwiającym 3x30 minut). Wybranie metody barwienia zależało od spodziewanej ilości (stężenia) peptydu/białka, które pojawi się na żelu. Barwienie Coomassie Brilliant Blue stosowano w przypadku ilości  $\sim 1 \mu\text{g}$  w prążku, natomiast metodę srebrową dla  $\sim 1 \text{ ng}$  białka w prążku. Do barwienia barwnikiem Coomassie Brilliant Blue wykorzystywano roztwór barwnika przygotowywany samodzielnie (1% roztwór barwnika Coomassie Brilliant Blue w wodzie). Do barwienia z zastosowaniem

metody srebrzej wykorzystywano komercyjnie dostępny kit ProteoSilver™ Silver Stain Kit (SIGMA).

e) przepłukanie drugiego z żeli 3x jałową destylowaną wodą redestylowaną w sterylnym pojemniku)

f) położenie żelu przepłukanego jałową wodą na płytce z podłożem stałym TSA i zalanie warstwą podłoża zawierającą szczep wrażliwy na działanie bakteriocydu

g) inkubacja płytki przez 24 h w 37°C.

h) porównanie obu kopii żelu w celu identyfikacji wybarwionego prążka odpowiadającego peptydowi wykazującego aktywność przeciwwgronkowcową (na wybarwionym żelu) odpowiadającego strefie zahamowania wzrostu na żelu zalanym podłożem

## **5.10. Elektroblotting oraz sekwencjonowanie N-końca peptydu (degradacja Edmana)**

Wstępnie oczyszczony peptyd (po etapie strącania siarczanem amonu) poddawano dalszemu oczyszczaniu metodą Tricine SDS-PAGE, według instrukcji przedstawionej powyżej. Za pomocą techniki Western blotting przeprowadzano transfer peptydów z żelu poliakrylamidowego na membranę poliwinylowo fluorową (*polivinylidene fluoride membrane* - PVDF+). Membrana zawierająca bakteriocydu po blottingu była wybarwiana z zastosowaniem 0,1% roztworu barwnika Coomassie Brilliant Blue (R-250), a następnie odbarwiana w celu uwidocznienia miejsca, gdzie znajduje się prążek odpowiadający bakteriocydu. Prążek odpowiadający peptydowi wycinano z membrany i przekazano do sekwencjonowania.

### **5.10.1. Bufory i roztwory wykorzystane w technice Western Blotting**

#### **1. Bufor do transferu**

10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3m M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 20% metanol

## 2. Bufor barwiący membranę

0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 w 1% kwasie octowym oraz 40% metanolu

## 3. Roztwór odbarwiający membranę

50% metanol w wodzie dejonizowanej

### 5.10.2. Przebieg elektroblottingu

a) przeprowadzenie elektroforezy Tricine SDS-PAGE (dwie identyczne kopie żelu)

b) przemycie jednego z żeli w buforze do transferu. Drugi żel barwiono i odbarwiano, jak w przypadku żelu po elektroforezie (typowy żel jest przygotowany w celu porównania wyników na żelu i membranie)

c) wycięcie membrany PVDF+ oraz dwóch cienkich fragmentów papieru filtracyjnego do wymiarów żelu. Namoczenie membrany oraz papieru w 100% metanolu przez okres 1-2 s, a następnie przeniesienie do pojemnika z wodą dejonizowaną na kilka minut.

d) namoczenie membrany PVDF+, dwóch grubych podkładek z włókna oraz dwóch fragmentów papieru filtracyjnego w buforze do transferu (skład powyżej) przez 15-30 minut

e) przygotowanie aparatu do transferu: umieszczenie jednostki chłodzącej oraz mieszadła wewnątrz aparatu, wypełnienie odpowiednim buforem oraz umieszczenie w nim wcześniej przygotowanej kanapki transferowej

f) przeprowadzenie elektroblottingu - 100 V, 350-400 mA, 4°C, 1 h

g) wybarwienie membrany zawierającej białko za pomocą roztworu barwnika Coomassie Brilliant Blue R-250

h) zidentyfikowanie prążka odpowiadającego bakteriocynie na membranie, wycięcie go i poddanie sekwencjonowaniu.

### 5.10.3. Sekwencjonowanie N-końca peptydu

Odpowiadający bakteriocynie prążek został wycięty z membrany po elektroblottingu i poddany sekwencjonowaniu. Badania wykonano metodą degradacji Edmana w Synthesis and Sequencing Facility, Johns Hopkins University School of Medicine (Baltimore, MD, USA).

### **5.11. Charakterystyka peptydu z zastosowaniem spektrometrii mas (MALDI TOF)**

Wszystkie prace wykonane w tym etapie badań zostały przeprowadzone w Laboratorium Spektrometrii Mas na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Do użytku udostępniono następujące urządzenia znajdujące się w laboratorium: SequenomMassARRAY™ Analyzer 4, MassARRAY™ Nanodispenser RS1000, MALDI-TOF/TOF 5800, QTRAP 6500 with SelexION, TripleTOF 5600+.

Mając na uwadze specyfikę dostarczonej próbki potrzebne było jej dodatkowe podczyszczenie. W tym celu zastosowane zostały kolumnienki typu Amicon®Ultra-0,5 Centrifugal Filter Devices 3K (Millipore) oraz Amicon®Ultra-0,5 Centrifugal Filter Devices 10K (Millipore).

Badania analityczne (MS oraz MS/MS) prowadzono z zastosowaniem MALDI MS-ABI Sciex 5800 TOF/TOF system with LC-MLDI, MDS Analytical Technologies.

Do badań z zastosowaniem MALDI-TOF wykorzystywano dwa rodzaje matryc:

- a) CHCA - kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy - matryca odpowiednia dla analizy peptydów,
- b) FA - kwas ferulowy - matryca dedykowana dla glikopeptydów.

## 5.12. Identyfikacja szczepu produkcyjnego poprzez sekwencjonowanie podjednostki 16S rRNA (Fredericks and Relman 1996)

W trakcie prowadzenia badań potwierdzono także przynależność gatunkową szczepu produkującego potencjalną bakteriocynę. W tym celu sekwencjonowano podjednostkę 16S rRNA

### 5.12.1. Przygotowanie próbki do sekwencjonowania

- a) hodowla szczepu, którego gatunek określano w podłożu płynnym TSB w warunkach optymalnych do jego wzrostu tzn. 24 h 37°C (szczep produkcyjny, szczep wrażliwy),
- b) izolacja DNA przy wykorzystaniu komercyjnie dostępnego kitu (Genomic Mini; A&A Biotechnology, Gdynia, Polska)
- c) powielenie fragmentu DNA kodującego podjednostkę 16S rRNA przy pomocy reakcji PCR
- d) sprawdzenie obecności produktów na żelu (wg 'Metody 3')

W reakcji PCR wykorzystano parę starterów:

r 5' CCCGGGATCCAAGCTTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'

f 5' CCGAATTCGTCGACAACACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'

(Weisburg *et al.* 1991)

Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR:

Denaturacja wstępna – 95°C przez 120 s

35 cykli składających się z następujących etapów:

Denaturacja 95°C przez 30 s

Przyłączanie starterów 66°C przez 60 s

Amplifikacja 72°C przez 90 s

Ogrzewanie końcowe 72°C przez 300 s

### **5.13. Izolacja genomowego DNA *S. xylosus***

- a) hodowla szczepu produkcyjnego w podłożu płynnym TSB w warunkach optymalnych do jego wzrostu tzn. 24 h 37°C,
- b) izolacja DNA przy wykorzystaniu komercyjnie dostępnego kitu, wg metodyki opisanej przez producenta (Genomic Mini; A&A Biotechnology, Gdynia, Polska)
- c) sprawdzenie obecności produktów na żelu (wg 'Metody 3')

### **5.14. Sekwencjonowanie genomu szczepu produkcyjnego *S. xylosus* połączone z próbą poznania sekwencji genu kodującego bakteriocynę**

Sekwencjonowanie genomowego DNA przez syntezę wykonano w firmie Genomed z zastosowaniem sekwenatora genomowego MiSeq (Illumina). Sekwencjonowania dokonano metodą Sanger z zastosowaniem znakowanych dideoxynukleotydów (metoda kontrolowanego przerywania replikacji enzymatycznej) (Slatko *et al.* 2001; Berg *et al.* 2002). Do analiz bioinformatycznych korzystano z oprogramowania UGene (Okonechnikov *et al.* 2012).

## WYNIKI I DYSKUSJA

Głównym celem badań prowadzonych w ramach realizacji tematu pracy było przeszukanie szczepów gronkowców znajdujących się w kolekcji Katedry Technologii Leków i Biochemii pochodzących z terenów wschodniej Polski (Podlasie) izolowanych od bydła zakażonego mastitis oraz z ran skórnych zarażonych gronkowcem (izolaty od pacjentów szpitalnych) ze szpitala w Koszalinie (Pomorze Zachodnie; Polska) oraz w Vaxjo (Szwecja) pod kątem ewentualnej produkcji bakteriocyn. Izolaty te należały do kilku gatunków: *S. aureus*, *S. epidermidis* oraz *S. xylosus*. Po przeanalizowaniu dostępnych źródeł literaturowych okazało się, że badania przesiewowe mające na celu znalezienie izolatów gronkowców charakteryzujących się produkcją bakteriocyn o ciekawych właściwościach nie były do tej pory prowadzone w Polsce na dużą skalę. Prowadzenie takich badań na nowym terenie geograficznym oferuje spore możliwości na znalezienie właśnie takich szczepów. Izolaty *Staphylococcus* pochodzące z tych regionów nie były nigdy wcześniej badane pod kątem produkcji bakteriocyn. Bakteriocyny, które do tej pory zostały zbadane i opisane w literaturze charakteryzują się wielką różnorodnością pod względem budowy, mechanizmu działania oraz spektrum aktywności (Snyder and Worobo 2014). Pozwalało to mieć nadzieję na znalezienie nowych, wcześniej nie poznanych bakteriocyn o obiecujących właściwościach. Głównym zadaniem projektu było znalezienie bakteriocyny o aktywności bakteriobójczej, która mogłaby być pomocna w zwalczaniu szczepów bakteryjnych, które są odporne na działanie powszechnie stosowanych chemoterapeutyków. Obecnie obserwujemy niepokojący wzrost rozprzestrzeniania się izolatów bakteryjnych niewrażliwych na standardowo wykorzystywane rodzaje terapii. Powodują one niebezpieczne infekcje ludzi i zwierząt. Dodatkowo powodują też duże straty ekonomiczne poprzez ich obecność również w produktach żywnościowych. Bakteriocyny dzięki swoim unikalnym właściwościom wydają się być odpowiednią bronią przeciwko tym ciężkim do zwalczania patogenom.



## **1. Badania przesiewowe ukierunkowane na identyfikację szczepów produkujących substancję o działaniu przeciwbakteryjnym, w tym bakteriocyny.**

Procedura przesiewowa polegała na sprawdzeniu możliwości produkcji związków wykazujących aktywność bakteriobójczą, a w szczególności gronkowcobójczą, przez szczepy *Staphylococcus spp.* znajdujące się w kolekcji KTLiB. Test przeprowadzono zgodnie z metodyką przedstawioną w rozdziale 'Metody 5.1.'. W trakcie tej procedury mierzono średnicę strefy zahamowania wzrostu szczepu wrażliwego wokół kolonii szczepu produkcyjnego. Ponadto przeprowadzono również testy mające na celu analizę wrażliwości zidentyfikowanych produkowanych związków o aktywności przeciwbakteryjnej na enzymy proteolityczne. Testy te mają na celu identyfikację związków przeciwbakteryjnych będących peptydami lub białkami. Testy przeprowadzono z wykorzystaniem metody opisanej w rozdziale 'Materiały i metody 5.2'. Jako wrażliwość produkowanego związku na działanie enzymów proteolitycznych rozumiano pojawienie się lokalnego cofnięcia strefy zahamowania wzrostu szczepu produkcyjnego.

### 1.1. Identyfikacja szczepów produkujących substancje o działaniu przeciwbakteryjnym

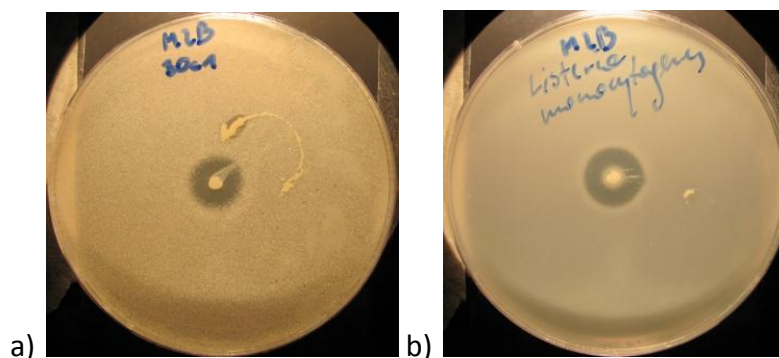
Na wstępnym etapie identyfikacji szczepów potencjalnie produkujących bakteriocyny zidentyfikowano 6 szczepów należących do rodzaju *Staphylococcus* (*S. xylosus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*) produkujących związki wykazujące właściwości bakteriobójcze. Dane dotyczące aktywności przeciwbakteryjnej tych szczepów zamieszczono w tabeli 2, natomiast na Rys. 5 przedstawiono przykładowy wynik eksperymentu obrazującego aktywność przeciwbakteryjną jednego ze zidentyfikowanych szczepów (Rys. 5) .

Tabela 2

Aktywność przeciwbakteryjna badanych szczepów gronkowców.

W tabeli zestawiono tylko szczepy, które wykazały aktywność względem zaproponowanych szczepów wrażliwych. Zestawienie wszystkich szczepów branych pod uwagę, jako producentki znajduje się w załączniku nr 1.

Średnica strefy zahamowania wzrostu [mm]		Szczep produkujący związek bakteriobójczy					
		30	31	32	30c1	M2B	K1
szczep wrażliwy	<i>S. aureus</i> PCM 2051	0	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	12	0	10	0	10	0
	<i>S. aureus</i> ATCC 6530	0	0	0	0	10	0
	<i>S. epidermidis</i> PCM 2118	0	0	0	0	0	0
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 10425	0	0	5	0	25	0
	<i>M. luteus</i> ATCC10240	13	0	0	0	15	0
	3	5	0	10	0	10	5
	11	0	0	5	0	20	10
	18	5	0	0	0	0	3
	27	0	0	0	0	0	20
	99	5	10	10	0	25	5
	83a	0	10	5	0	15	0
	30c1	0	0	0	0	25	0
	K10	0	0	0	20	0	5
sz6	0	0	0	5	0	0	



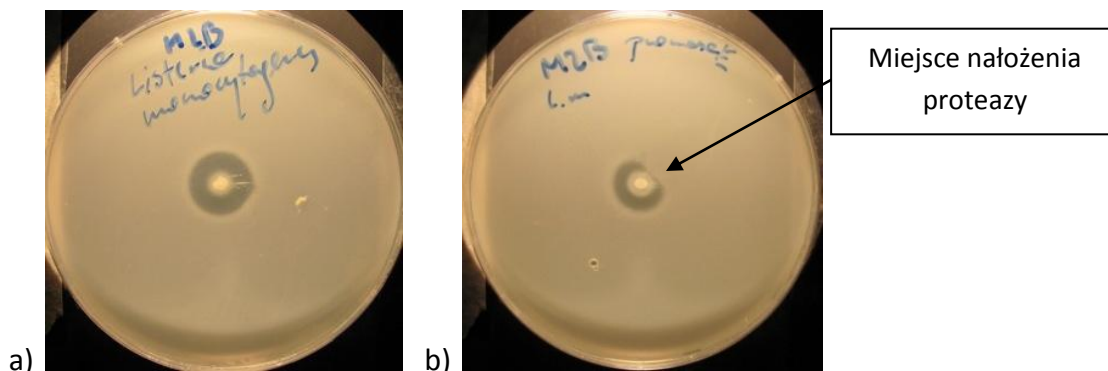
Rys. 5

Przykładowe strefy zahamowania wzrostu powodowane przez związek o aktywności przeciwbakteryjnej produkowany przez szczep M2B względem: a) 30c1 (*S. xylosus* z kolekcji KTLiB) oraz b) *L. monocytogenes* ATCC10425. Wyniki otrzymane przy zastosowaniu metody zalewowej.

### 1.2 Identyfikacja szczepów produkujących substancje przeciwbakteryjne o strukturze peptydowej lub białkowej

Bakteriocyny, jako białka lub peptydy wykazują wysoką wrażliwość względem enzymów proteolitycznych. Podstawowym testem potwierdzającym czy produkowany przez bakterię związek bakteriobójczy jest białkiem lub peptydem jest sprawdzenie jego wrażliwości na proteazy. Test polega na umieszczeniu w przewidywanej strefie zahamowania wzrostu szczepu wrażliwego powodowanej przez wyprodukowany przez szczep producencki związek porcji enzymu proteolitycznego. Jeśli produkowany związek jest peptydem/białkiem następuje lokalne cofnięcie strefy zahamowania wzrostu tzw. 'half moon zone', czyli tzw. strefa o kształcie półksiężyca. Pojawienie się tej strefy oznacza utratę aktywności produkowanej substancji przeciwbakteryjnej wskutek działania enzymu proteolitycznego.

Test podatności na działanie enzymów proteolitycznych zastosowany został wobec sześciu szczepów zidentyfikowanych w pierwszym etapie procedury przesiewowej. Przykładowy wynik uzyskany dla szczepu M2B przedstawiono na Rys. 6, natomiast zbiorcze zestawienie wyników w tabeli 3.



Rys. 6

Wpływ enzymów proteolitycznych na strefę zahamowania wzrostu (aktywności) bakteriocyny. Można zaobserwować tzw. „half moon zone” tzn. zahamowanie aktywności następuje tylko od strony gdzie na podłożu nałożono proteazę: a) strefa zahamowania wzrostu bez wpływu proteazy, b) lokalne cofnięcie strefy zahamowania wzrostu po nałożeniu proteazy.

Tabela 3

Wpływ enzymów proteolitycznych na produkowane związki o aktywności bakteriobójczej produkowanej przez zidentyfikowane szczepy produkcyjne (wpływ oznaczono w następujący sposób: '++' - znaczące lokalne cofnięcie strefy zahamowania wzrostu; '+' - niewielkie lokalne cofnięcie strefy zahamowania wzrostu; '0' - brak wpływu na strefę zahamowania wzrostu)

Zastosowany enzym	szczep produkcyjny					
	30	31	32	30c1	M2B	K1
proteinaza K	0	0	0	+	++	+
pronaza E	0	0	0	+	++	+
chymotrypsyna $\alpha$	0	0	0	+	++	+

Dla trzech szczepów produkcyjnych 30 (*S. aureus*), 31 (*S. aureus*), 32 (*S. aureus*) nie stwierdzono żadnej różnicy w wyglądzie stref zahamowanego wzrostu uzyskanych w obecności enzymów proteolitycznych, w porównaniu do stref uzyskanych w nieobecności tych enzymów. Natomiast w przypadku trzech pozostałych szczepów: M2B (*S. xylosus*), K1 (*S. aureus*) oraz 30c1 (*S. xylosus*) takie różnice zostały zaobserwowane. Prawdopodobnie związki antybakteryjne produkowane przez szczepy M2B, K1 oraz 30c1 są peptydami lub białkami, być może bakteriocynami, natomiast substancje wytwarzane przez szczepy 30, 31, 32 nie mają takiego charakteru.

Badania przesiewowe prowadzono z zastosowaniem wszystkich szczepów z rodzaju *Staphylococcus* znajdujących się w kolekcji KTLiB. Na wstępnym etapie

prorowadzonych badań jako szczepy potencjalnie produkujące bakteriocyny wykorzystano wszystkie 206 szczepów. Jako szczepy wrażliwe wykorzystano szczepy dostępne komercyjnie oraz kilka szczepów z kolekcji KTLiB charakteryzujące się różnymi typami lekooporności (na podstawie antybiogramu (Szweda *et al.* 2014b). Na wstępnym etapie badań ukierunkowanych na identyfikację szczepów produkujących związki o aktywności bakteriobójczej udało się znaleźć 6 szczepów (4 izolaty *S. aureus*, 2 izolaty *S. xylosus*) charakteryzujących się produkcją substancji przeciwbakteryjnej. Oznacza to, że około 3% całej kolekcji wykazuje zdolność produkcji związku o aktywności przeciwbakteryjnej. Kolejnym krokiem było wybranie spośród zidentyfikowanych szczepów, tych izolatów, które produkują związki o strukturze peptydowej. Dokonano tego w oparciu o wrażliwość peptydów i białek na działanie enzymów proteolitycznych. Testy wykazały, że tylko 3 szczepy spośród zidentyfikowanych wcześniej izolatów produkują związki przeciwbakteryjne o strukturze białek lub peptydów. Oznacza to, że około 1,5% szczepów znajdujących się w kolekcji produkuje związki o działaniu przeciwbakteryjnym, które mogą być potencjalnymi bakteriocynami. Jednocześnie oznacza to również, że połowa produkowanych przez izolaty z kolekcji KTLiB związków może być potencjalnie bakteriocynami.

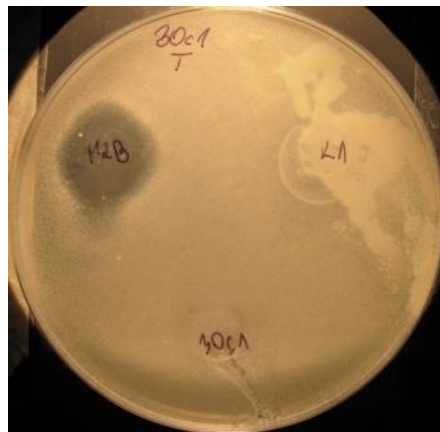
## **2. Sprawdzenie możliwości produkcji bakteriocyny w podłożu płynnym**

Następnym krokiem w prowadzonych badaniach było sprawdzenie możliwości wydajnej produkcji przypuszczalnych bakteriocyn w podłożu płynnym. Z punktu widzenia możliwości produkcji tych substancji w skali przemysłowej, ich wydajna produkcja i sekrecja do podłoża jest warunkiem absolutnie niezbędnym.

Możliwość wydajnej produkcji bakteriocyny do podłoża płynnego sprawdzano mierząc aktywność przeciwbakteryjną płynu pohodowlanego. Test polegał na hodowli szczepu producenckiego w różnych rodzajach komercyjnie dostępnych podłoży płynnych. Po hodowli szczepu producenckiego w warunkach optymalnych pobierano płyn pohodowlany, wirowano i testowano jego aktywność z zastosowaniem metody

'studzienkowej' (wg 'Metody 5.4 a)'). Jako miarę aktywności przyjęto średnicę strefy zahamowania wzrostu szczepu wrażliwego wokół studzienki.

Wynik oznaczania aktywności przedstawiony na Rys. 7 wyraźnie wskazuje, że tylko szczep oznaczony jako M2B charakteryzował się zdolnością wydajnej produkcji bakteriocyny do podłoża płynnego. Pozostałe szczepy, K1 oraz 30c1 nie wytwarzały bakteriocyny lub produkcja ta była na bardzo niskim poziomie.



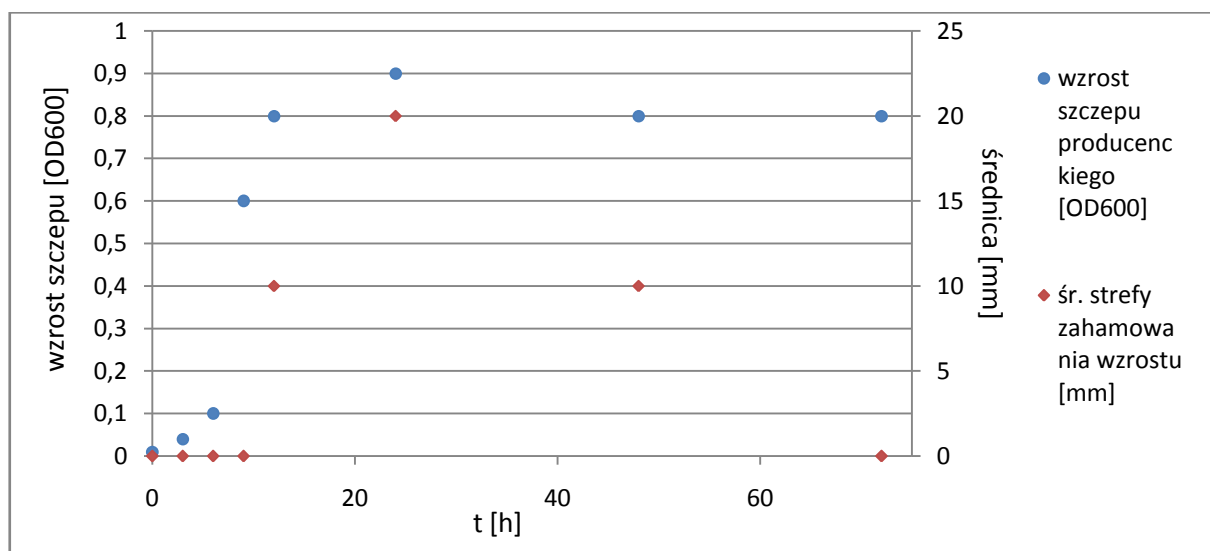
Rys. 7.  
Możliwość produkcji bakteriocyny do podłoża płynnego przez szczepy M2B, 30c1 i K1.

Na tym etapie prowadzonych badań można stwierdzić, iż spośród wszystkich analizowanych szczepów udało się zidentyfikować tylko jeden, który wydajnie produkuje prawdopodobną bakteriocynę (izolat oznaczony jako M2B, wyizolowany z gruczołu mlekowego bydła), u którego stwierdzono mastitis. Wynik ten stał się podstawą do podjęcia decyzji o ukierunkowaniu dalszych badań na substancję produkowaną przez szczep M2B.

### **3. Określenie kinetyki wzrostu szczepu M2B i produkcji bakteriocyny przez komórki tego szczepu.**

W celu ustalenia fazy wzrostu szczepu producenckiego, w którym bakteriocyna jest produkowana najwydajniej, wyznaczono zależność wydajności produkcji

bakteriocyny od fazy wzrostu szczepu produkcyjnego. Prowadzono hodowlę komórek M2B w podłożu płynnym, dokonując okresowego pomiaru gęstości zawiesiny komórek (pomiar absorpcji przy długości fali 600 nm) oraz aktywności przeciwbakteryjnej płynu pohodowlanego. Wynik tego eksperymentu przedstawiono na Rys. 8. Na podstawie tych badań ustalono, że produkcja substancji przeciwbakteryjnej odbywa się głównie w późnej fazie wzrostu logarytmicznego lub na początku fazy stacjonarnej, co jest charakterystyczne dla bakteriocyn produkowanych przez gronkowce (dos Santos Nascimento *et al.* 2004). Wynik ten dodatkowo potwierdza tezę, że substancja produkowana przez komórki M2B jest bakteriocyną.



Rys. 8.  
Kinetyka produkcji bakteriocyny przez komórki szczepu M2B

#### 4. Określenie spektrum aktywności bakteriocyny

Aktywność bakteriocyny wytwarzanej przez M2B sprawdzono względem 206 szczepów z rodzaju *Staphylococcus* pochodzących z kolekcji KTLiB, oraz 8 wzorcowych szczepów bakteryjnych: *E. coli* K-12, *L. monocytogenes* ATCC 10425, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* PCM 2051, *S. aureus* ATCC 29216, *S. aureus* ATCC 6530, *S. epidermidis* PCM 2118 oraz *M. luteus* ATCC 10240.

Tabela 4

Aktywność przeciwbakteryjna bakteriocyny produkowanej przez szczep *S. xylosus* M2B (pomiar aktywności prowadzony metodą zalewową)

Szczep wrażliwy	Strefa przejaśnienia [mm]
3	10
6	10
7	12
9	10
11	20
12	10
28	15
52	22
68	25
69	15
77	18
92	17
99	25
115	15
44s	10
83A	15
8J	15
30C1	25
197	5
247	15
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 10425	25
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	15
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	10
<i>S. aureus</i> ATCC 6530	10

Przypuszczalna bakteriocyna wytwarzana przez szczep M2B wykazała dość wąskie spektrum aktywności. Spośród 206 testowanych izolatów z rodzaju *Staphylococcus* z kolekcji KTLiB tylko 20 szczepów izolowanych od bydła chorego na mastitis (14 izolatów *S. aureus*, 1 izolat *S. epidermidis*, 5 izolatów *S. xylosus*) było wrażliwych na działanie bakteriocyny. Dodatkowo peptyd okazał się też aktywny względem szczepów muzealnych *L. monocytogenes*, *M. luteus* oraz *S. aureus*. Przypuszczalna bakteriocyna nie wykazała żadnej aktywności względem izolatów



klinicznych bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. Na podstawie otrzymanych wyników zdecydowano się na wykorzystanie dwóch szczepów 30c1 oraz *L. monocytogenes* ATCC 10425 w dalszych badaniach jako drobnoustrojów testowych, wrażliwych na działanie bakteriocyny wytwarzanej przez szczep M2B.

## **5. Optymalizacja warunków produkcji bakteriocyny**

Kolejnym krokiem było zoptymalizowanie parametrów produkcji bakteriocyny, w celu otrzymania jak najbardziej wydajnej jej ekspresji. Optymalizowano rodzaj podłoża, temperaturę inkubacji oraz objętość hodowli:

a) porównywano wydajność produkcji bakteriocyny w różnych komercyjnie dostępnych podłożach płynnych: Mueller Hinton Broth, Luria Bertani Broth, Brain Heart Infusion, Casamino Acid, Tryptic Soy Broth. Największą aktywność zaobserwowano w przypadku supernatantu pozyskanego przy wykorzystaniu podłoża Tryptic Soy Broth (TSB, SIGMA ALDRICH) i na tej podstawie podjęto decyzję o stosowaniu tego podłoża do dalszych badań.

b) z trzech badanych temperatur inkubacji (30°C, 35°C, 37°C) największą wydajność uzyskano dla 37°C.

c) przeanalizowano wydajność produkcji bakteriocyny w zależności od objętości stosowanego podłoża. Spośród trzech badanych objętości podłoża płynnego stosowanego do hodowli szczepu produkcyjnego (10 mL, 100 mL, 1000 mL) największą wydajność produkcji uzyskano dla objętości 100 mL.

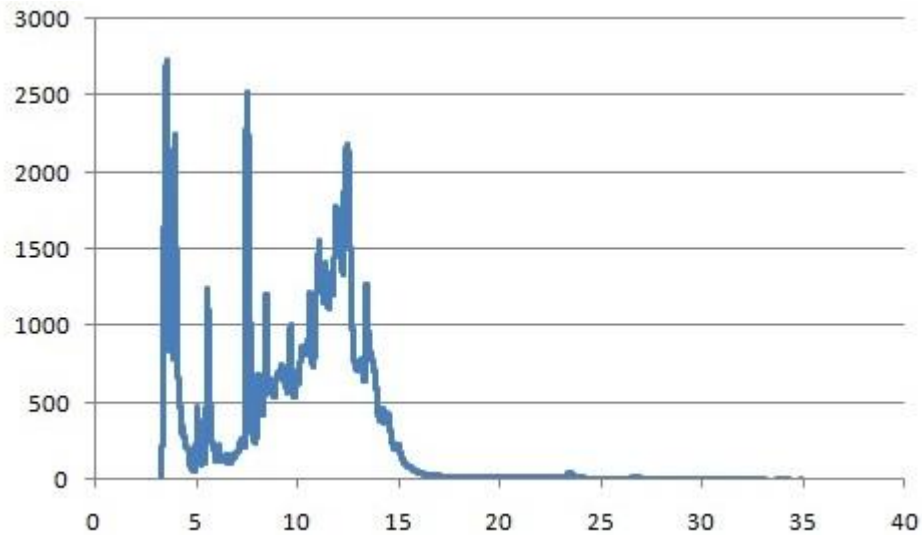
## **6. Określenie termostabilności bakteriocyny**

Określono termostabilność bakteriocyny produkowanej przez szczep M2B, obecnej w płynie pohodowlanym. Komórki hodowano w warunkach optymalnych.

Próbki zawiesiny hodowanej pobierano po 24h inkubacji i odwirowywano. Próbki płynu pohodowlanego inkubowano w różnych temperaturach (25°C, 50°C, 65°C, 80°C i 90°C) przez 15, 30, 60 min. i określano aktywność wobec szczepu testowego metodą opisaną w dziale 'Metody 5.4. a)'. Stwierdzono całkowitą termostabilność preparatu dla zakresu temperatur 25 - 80°C. Aktywność została także zachowana po 15 min inkubacji w temperaturze 90°C, natomiast po 30 min inkubacji w tej temperaturze obserwowano spadek aktywności (zmniejszenie strefy zahamowania wzrostu z 25 do 17 mm).

## **7. Oczyszczanie bakteriocyny**

Zidentyfikowana w trakcie badań bakteriocyna wchodziła w skład złożonej mieszaniny. Pierwszym etapem oczyszczania dużego peptydu lub małego białka może być frakcjonowanie wysalanie. Dlatego też postanowiono zacząć od tego etapu. Aktywną biologicznie frakcję otrzymaną po wysalaniu poddano analizie chromatograficznej z zastosowaniem HPLC. Wynik tej analizy przedstawiony na Rys. 9 wskazuje, że jest to nadal złożona mieszanina. Postanowiono wprowadzić dodatkowe podczyszczanie preparatu po etapie wysalania, a przed HPLC, wykorzystując w tym celu chromatografię kolumnową ze złożem do chromatografii oddziaływań hydrofobowych. Technika ta może znaleźć zastosowanie w przypadku bakteriocyn, ponieważ wykorzystuje ogólną cechę wielu z tych peptydów jaką jest hydrofobowość (Snyder and Worobo 2014). W literaturze proponuje się też zastosowanie chromatografii jonowymiennej z powodu określonego ładunku, jakim obdarzona jest większość bakteriocyn (Birri *et al.* 2010; Vijay Simha *et al.* 2012; Barbour, Philip and Muniandy 2013; Chang *et al.* 2013). Ostatnim krokiem w procedurze pozyskiwania czystego peptydu jest zwykle zastosowanie wysokosprawnych technik rozdzielczych. Przy oczyszczaniu bakteriocyn powszechnie stosuje się HPLC w układzie faz odwróconych (RP-HPLC) lub FPLC (Garsa *et al.* 2014).



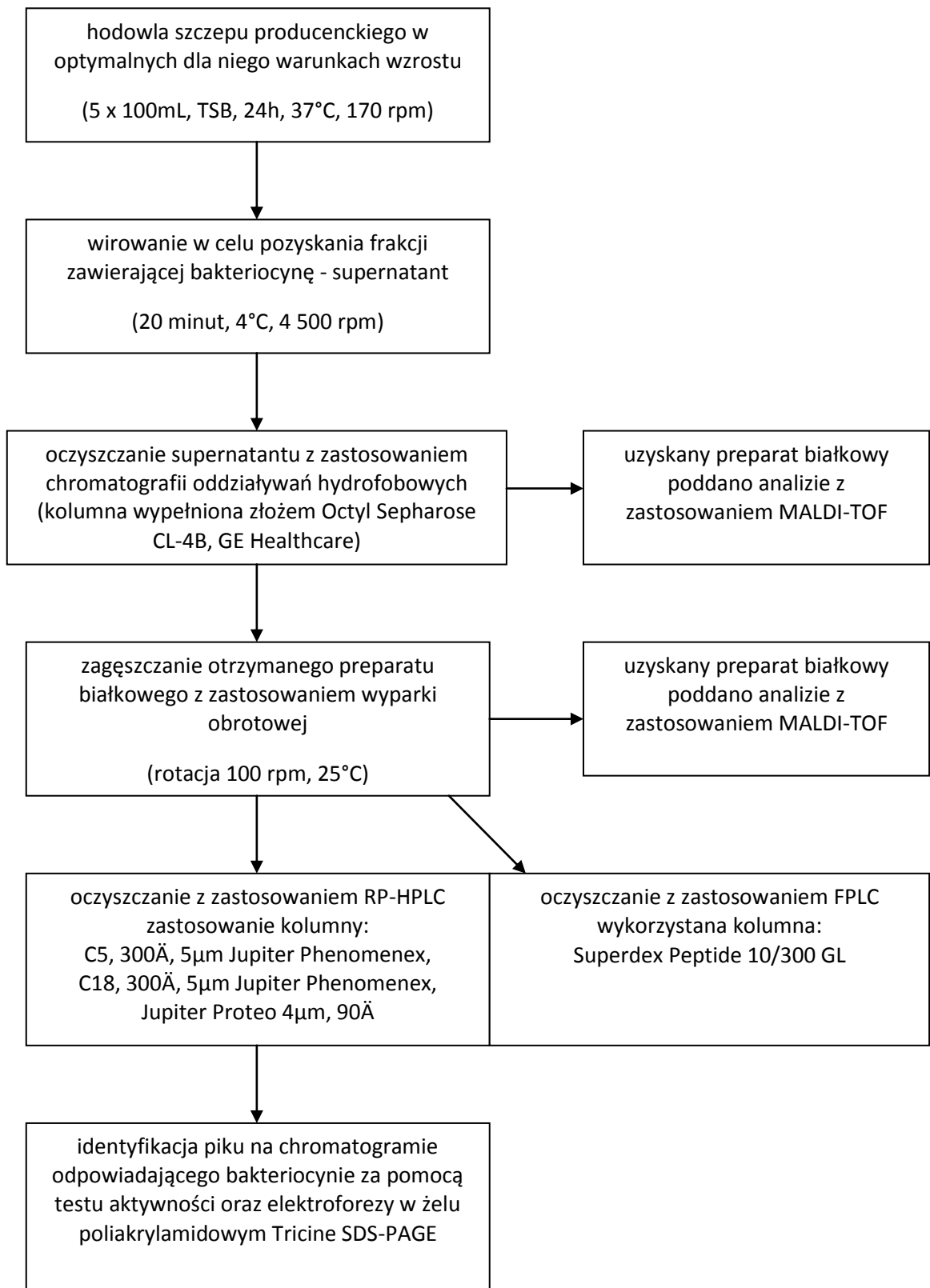
Rys. 9.

Chromatogram przedstawiający wynik analizy HPLC składu aktywnego biologicznie preparatu powstałego po strącaniu 20% roztworem siarczanu amonu. Zastosowany układ chromatograficzny: kolumna C5, 300Å, 5µm; układ faz ruchomych acetonitryl : woda (wg 'Metody 5.6.4.')

Po dokonaniu przeglądu literaturowego zdecydowano się na trzystopniową procedurę oczyszczania (procedura oczyszczania - schemat 1): strącanie siarczanem amonu, chromatografia oddziaływań hydrofobowych (HIC), wysokosprawnej chromatografii cieczowej z zastosowaniem układu faz odwróconych (RP-HPLC) lub szybkiej białkowej chromatografii cieczowej FPLC (System ÄKTA<sub>FPLC</sub>).

Schemat 1

Ideowy schemat produkcji, oczyszczania i analizy bakteriocyny.



### 7.1. Frakcjonowane wysalanie

Wysalanie białek oraz dużych peptydów siarczanem amonu jest prostym i skutecznym sposobem ich frakcjonowania. Strącanie peptydów z zastosowaniem siarczanu amonu prowadzono najpierw z zastosowaniem nasyconego roztworu tej soli, a następnie również z wykorzystaniem soli w formie sypkiej. Każdorazowo dodaną porcję soli, mieszano dokładnie do całkowitego rozpuszczenia soli w płynie pohodowlanym. Siarczan amonu dodawano kroplami przez 8-10 h do osiągnięcia pożądanego stężenia soli (np. 20%, 40%). Następnie mieszaninę pozostawiano mieszając na noc w celu całkowitego rozpuszczenia soli. Dnia następnego mieszaninę wirowano. Powstały osad rozpuszczano w buforze PBS. Podczas frakcjonowania białek z zastosowaniem siarczanu amonu sprawdzono aktywność bakteriobójczą preparatów otrzymanych po kolejnych etapach strącania. W przypadku osadu powstałego po strącaniu 40% siarczanem amonu zaobserwowano wyraźną strefę zahamowania wzrostu szczepu wrażliwego.

### 7.2. Oczyszczanie bakteriocyny z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC)

Preparat obecny we frakcji 40% po frakcjonowanym wysalaniu poddano dalszemu oczyszczaniu.

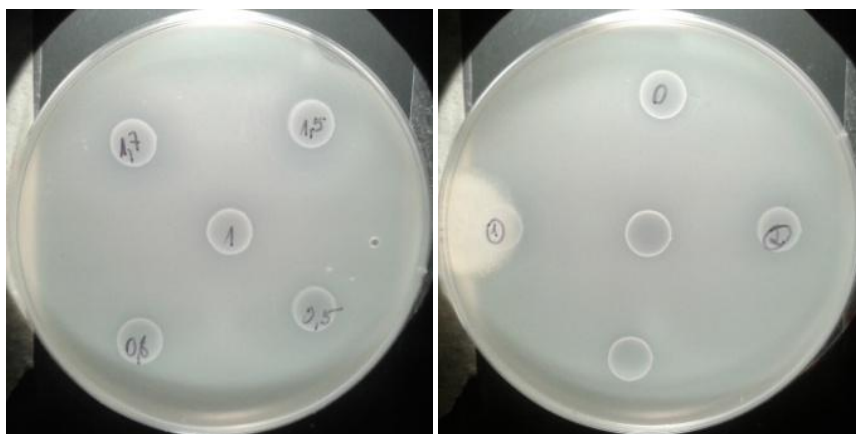
Zdecydowano się na zastosowanie chromatografii kolumnowej z wykorzystaniem złoża Octyl-Sepharose CL-4B. Jest to złożo stosowane do chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC - hydrophobic interaction chromatography). Na tym etapie rozdział oczyszczanych związków zachodzi na podstawie różnic w hydrofobowości rozdzielanych związków. Ten rodzaj chromatografii jest odpowiedni do oczyszczania bakteriocyn, ponieważ większość z nich wykazuje zdecydowanie hydrofobowy charakter (Snyder and Worobo 2014). Złożo to wykazuje ponadto kilka interesujących cech m.in. możliwość pracy w warunkach dużego stężenia soli (np. po strącaniu peptydu siarczanem amonu nie

jest konieczne stosowanie dializy), dodatkowo duża pojemność złoża umożliwia wstępne zagęszczenie oczyszczanego preparatu białkowego.

W procedurze oczyszczania zastosowano najpierw elucję malejącym stężeniem siarczanu amonu w buforze fosforanowym, następnie rosnącym stężeniem etanolu w buforze fosforanowym (zgodnie z rozdziałem 'Metody 5.6.2.').

Dzięki dużej pojemności złoża możliwe było nałożenie dużej ilości płynu pochodowlanego zawierającego oczyszczaną bakteriocynę (500mL - 1000mL). Całość białka uległa związaniu na złożu. Elucję prowadzono roztworami o objętości równej objętości martwej nałożonego złoża tzn. około 20-25 mL. Pozwoliło to na znaczne zagęszczenie próbki już na wczesnym etapie oczyszczania.

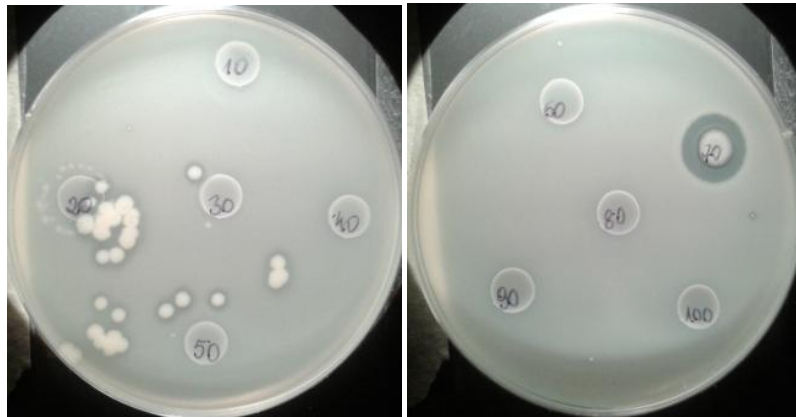
Białka i peptydy, które zostały wyeluowane na etapie płukania kolumny malejącym stężeniem siarczanu amonu w buforze fosforanowym nie wykazały właściwości bakteriobójczych (Rys. 10, Rys. 12). Na tym etapie oczyszczania elucji ulegają białka i peptydy zdecydowanie hydrofilowe. Dzieje się tak dzięki hydrofilowemu charakterowi roztworu siarczanu amonu w buforze fosforanowym.



Rys. 10

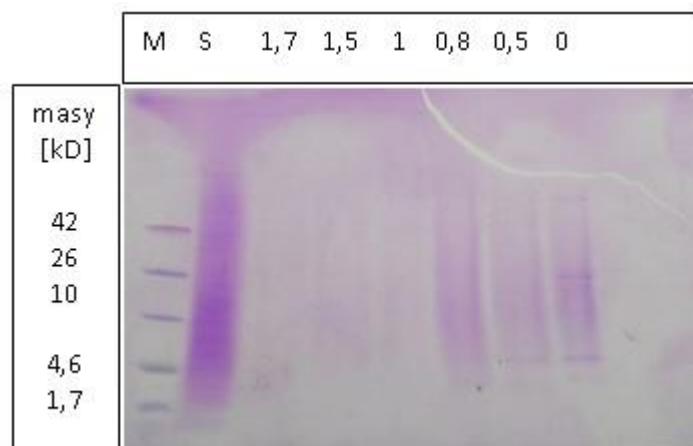
Aktywność bakteriobójcza poszczególnych frakcji wymytych z kolumny przy zastosowaniu roztworów siarczanu amonu w wodzie: 1,7 - 1,7 M  $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ ; 1,5 - 1,5M  $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ ; 1 - 1M  $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ ; 0,8 - 0,8M  $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ ; 0,5 - 0,5M  $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ ; 0 - 0M  $(\text{NH})_2\text{SO}_4$  (szczep wrażliwy - *L. monocytogenes*).

Bakteriocyna produkowana przez szczep M2B nie była eluowana z kolumny ze złożem Octyl-Sepharose CL-4B roztworami o malejącym stężeniu siarczanu amonu. Elucja ta nastąpiła dopiero przy zastosowaniu mieszaniny etanol/bufor fosforanowy jako czynnika elucyjnego (Rys. 11, Rys. 13). Na podstawie otrzymanego wyniku można wnioskować, że oczyszczana bakteriocyna ma silnie hydrofobowy charakter. Profil elucji z kolumny przedstawiono na Rys. 15.



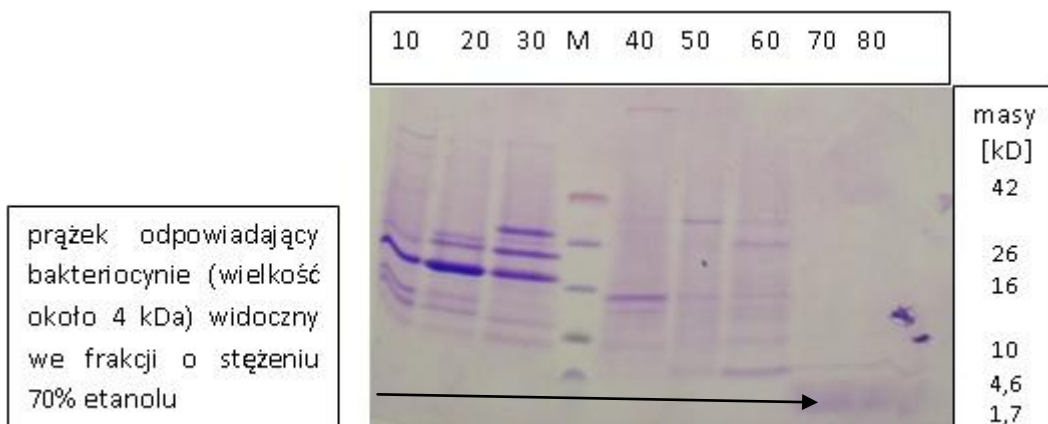
Rys. 11

Aktywność bakteriobójcza poszczególnych frakcji wymytych z kolumny HIC przy zastosowaniu mieszaniny etanol/woda : 10 - 10%; 20 - 20%; 30 - 30%; 40 - 40%; 50 - 50%; 60 - 60%; 70 - 70%; 80 - 80%; 90 - 90%; 100 - 100% (szczep wrażliwy *L. monocytogenes*).



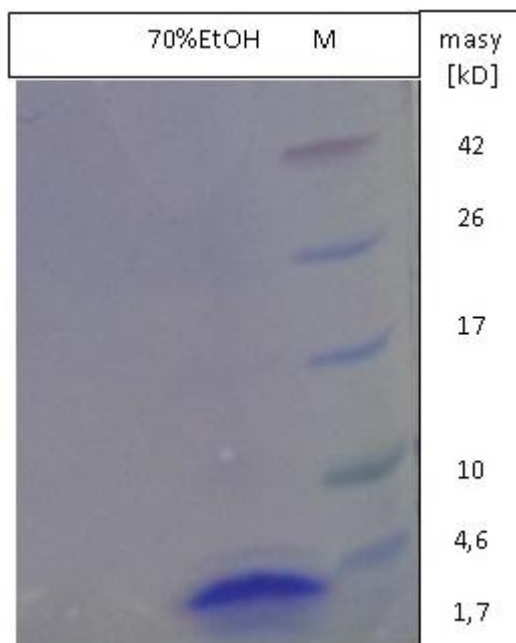
Rys. 12

Analiza elektroforetyczna poszczególnych frakcji powstałych po oczyszczeniu próbek z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofobowych M - marker (ThermoScientific Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder; MW kDa 1,7; 4,6; 10; 17; 26; 42), a) S (supernatant), kolejne stężenia siarczanu amonu użyte przy elucji z kolumny: 1,7 - 1,7 M; 1,5 - 1,5 M; 1 - 1 M; 0,8 - 0,8 M; 0,5 - 0,5 M; 0 - 0M,



Rys. 13

Analiza elektroforetyczna poszczególnych frakcji powstałych po oczyszczeniu próbki z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofobowych M - marker (Thermo Scientific Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder; MW kDa 1,7; 4,6; 10; 17; 26; 42), kolejne stężenia etanolu użyte przy elucji z kolumny: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%.



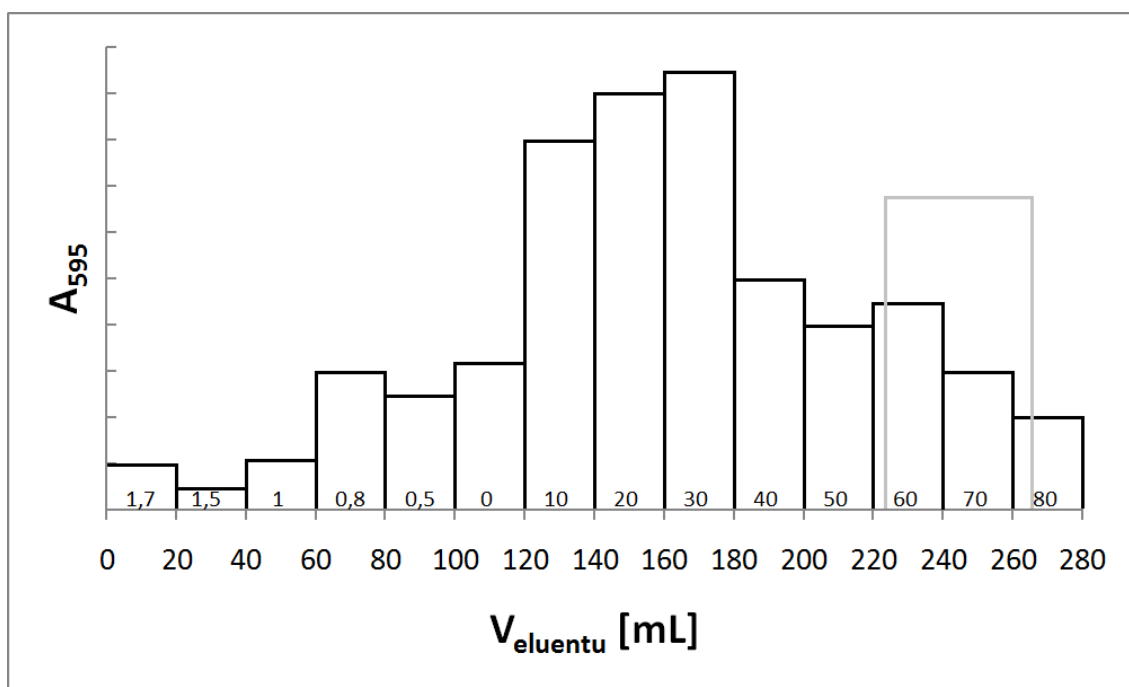
Rys. 14

Analiza elektroforetyczna składu frakcji wyeluowanej ze złoża Octyl Sepharose mieszaniną etanol/bufor fosforanowy, pH 7,0.70% (v/v)

M - marker (Thermo Scientific Spectra Multicolor Low Range Protein Lader; MW kDa 1,7; 4,6; 10; 17; 26; 42; 70%EtOH - frakcja, w której obecny jest peptyd



Intensywny prążek odpowiadający peptydowi o masie około 4 kDa widoczny na obrazie żelu na Rys. 14 został zidentyfikowany jako odpowiadający bakteriocyynie na podstawie wyników testu opartego na metodzie zalewowej ('Metody 5.9.'). Po zalaniu żelu warstwą agaru zawierającej szczep wrażliwy *L. monocytogenes* ATCC 10425 oraz *S. xylosus* oraz okresie inkubacji, na wysokości prążka pojawiła się strefa zahamowania wzrostu.



Rys. 15

Profil elucji peptydów po oczyszczaniu z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC). Szarą linią oznaczono aktywną frakcję (detekcji dokonano stosując metodę Bradforda) (Bradford 1976; Grintzalis, Georgiou and Schneider 2015).

W testach aktywności bakteriobójczej frakcji, w której znajduje się bakteriocyyna, aktywność pochodząca od etanolu można było pominąć, ponieważ etanol został całkowicie odparowany z zastosowaniem wyparki obrotowej. Sprawdzone także wpływ odparowywania etanolu na aktywność bakteriobójczą próbki. Zaobserwowano, że odparowanie rozpuszczalnika w warunkach panujących w wyparce nie wpływa w żaden sposób na aktywność preparatu (Rys. 16).



Rys. 16

Aktywność bakteriobójcza preparatu (100  $\mu$ l) po odparowaniu rozpuszczalnika w wyparce obrotowej. Szczep wrażliwy -*L. monocytogenes* ATCC10425

Dodatkowo niezbędne było potwierdzenie, że związek, któremu odpowiada zidentyfikowany prążek jest peptydem. Zdecydowano się na test z zastosowaniem Proteiny K. Po okresie trawienia próbki zawierającej bakteriocynę z enzymem proteolitycznym (1h, 50°C) nastąpił zanik aktywności bakteriobójczej (rys. 17). Wynik ten potwierdza, że substancja, której odpowiada zidentyfikowany prążek jest peptydem. Test aktywności przeprowadzono z zastosowaniem metodyki opisanej w rozdziale 'Metody 5.4.a)').



Rys. 17

Wyniki testu aktywności bakteriocyny 'p' - próbka po dodaniu 10  $\mu$ l proteiny K i inkubacji 1h w temp. 50°C, 'g' - próbka bez dodatku enzymu inkubowana 1h w temp. 50°C, 'b.g.' - kontrola - bakteriocyna bez dodatku enzymu oraz bez inkubacji. Do studzienek nakładano 100  $\mu$ l. Zastosowany szczep wrażliwy *L. monocytogenes* ATCC10425 ('l.m.')

Dodatkowo, równoległe do zaproponowanej powyżej procedury oczyszczania (frakcjonowanie wysalanie białka a następnie chromatografia oddziaływań hydrofobowych), prowadzono testy mające na celu skrócenie procedury oczyszczania czyniące ją szybszą i prostszą w przeprowadzeniu. W tym celu korzystano tylko z chromatografii oddziaływań hydrofobowych z zastosowaniem złoża Octyl-Sepharose CL-4B. Metoda ta nie tylko umożliwiła wstępne oczyszczenie peptydu, ale także jego zagęszczenie. W przypadku takiej uproszczonej procedury nie zaobserwowano widocznego pogorszenia jakości otrzymanego preparatu peptydowego.

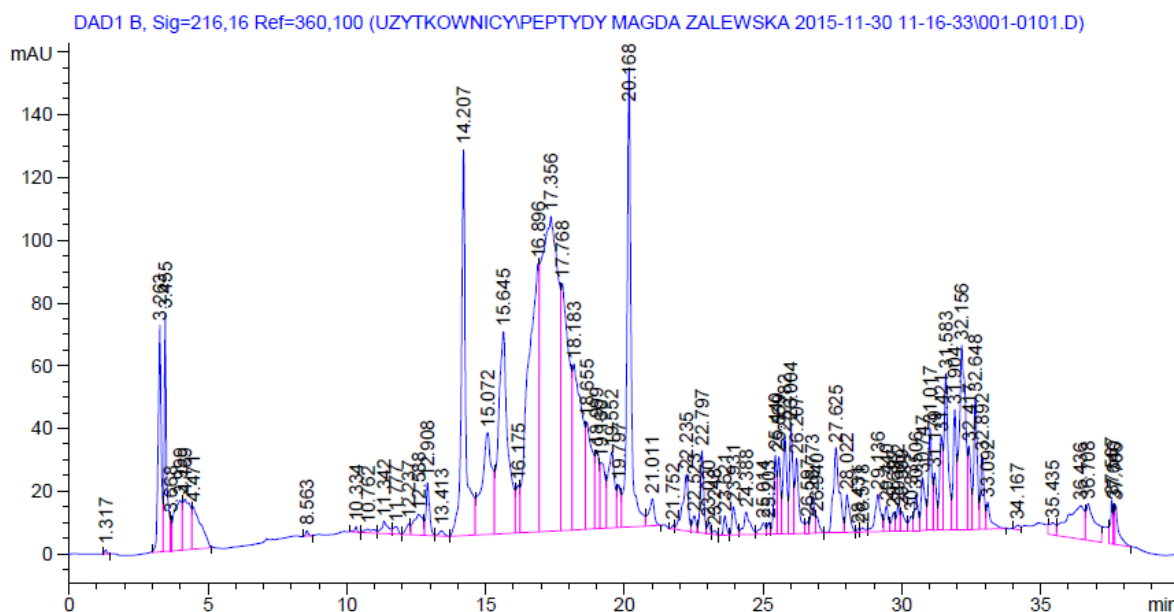
### 7.3. Oczyszczanie bakteriocyny z zastosowaniem HPLC

Kolejnym krokiem w procesie charakterystyki bakteriocyny była próba otrzymania homogenego, aktywnego biologicznie preparatu peptydowego z zastosowaniem wysokosprawnych technik chromatograficznych. HPLC w układzie faz odwróconych jest powszechnie stosowaną techniką w oczyszczaniu peptydów i białek. Separacja peptydu od bardzo podobnych do niego zanieczyszczeń (innych peptydów)

wymaga zastosowania technik wysokorozdzielczych. Standardowo stosowanym układem rozdzielczym jest układ faz odwróconych. Fazę ruchomą stanowi układ rozpuszczalników acetonitryl-woda. Zastosowanie acetonitrylu ma kilka zalet: wykazuje niską absorpcję przy długości fal, które wykorzystuje się do detekcji białek i peptydów UV (216 nm, 280 nm), posiada niską lepkość (powoduje niskie ciśnienie wsteczne w czasie rozdzielania), jest bardzo łatwy do usunięcia z próbek produktu finalnego (poprzez odparowanie). W przypadku wpływu acetonitrylu na stabilność lub aktywność biologiczną oczyszczanej substancji zamiennie stosuje się alkohole metylowy i etylowy. Faza ruchoma zwykle modyfikowana jest odczynnikami, które mają za zadanie doprowadzić pH fazy ruchomej do wartości około 2,5 (jest to pH, przy którym eliminowane jest nieselektywne oddziaływanie analizowanych związków chemicznych z wolnymi grupami na powierzchni sorbentu). W tym celu często stosuje się kwas trifluorooctowy (TFA), który jest łatwy do usunięcia z próbki przez odparowanie. Należy pamiętać jednak, że kwas trifluorooctowy absorbuje światło UV o różnej długości fali w zależności od stężenia, co może powodować problemy w interpretacji wyników (Choikhet, Glatz and Rozing 2003; Walls and Loughran 2011). Dlatego bezpieczne jest stosowanie detekcji oczyszczanego peptydu przy długości fali 216 nm. Do innych stosowanych modyfikatorów fazy ruchomej należą też: kwas fosforowy oraz kwas mrówkowy (Garcia 2005).

W trakcie badań zdecydowano się na zastosowanie techniki RP-HPLC z wykorzystaniem następujących rodzajów kolumn: C5, 300Å, 5µm Jupiter Phenomenex; C18, 300Å, 5µm Jupiter Phenomenex oraz Jupiter 4µm Proteo 90Å. Typową metodą oczyszczania białek i peptydów przy wykorzystaniu HPLC jest prowadzenie rozdzielania w warunkach niskiego pH (pH~2,5). Efekt ten próbowano osiągnąć poprzez dodanie kwasu trifluorooctowego do fazy ruchomej. Zastosowane kolumny dedykowane są do separacji peptydów, syntetycznych peptydów oraz nukleotydów. Zastosowany zestaw kolumn pozwala na oczyszczenie peptydu/białka w dużym zakresie wielkości. Kolumny 300Å z wypełnieniem C5 oraz C18 dedykowane są do dużych białek i polipeptydów o masie powyżej 10 000 Da, natomiast kolumna Proteo 90Å z wypełnieniem C12 dedykowana jest do separacji peptydów.

Oczyszczaniu z zastosowaniem HPLC poddawano w pierwszej kolejności preparat otrzymany bezpośrednio po oczyszczeniu z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofobowych. W drugiej kolejności oczyszczano również preparat po HIC zagęszczony poprzez odparowanie eluentu z wykorzystaniem wyparki obrotowej. Na Rys. 18 przedstawiono przykładowy chromatogram, otrzymany na tym etapie procedury oczyszczania.



Rys. 18

Chromatogram obrazujący efekt oczyszczania próbki z zastosowaniem kolumny C5, 300Å, 5µm w układzie faz ruchomych acetonitryl : woda (wg 'Metody 5.6.4')

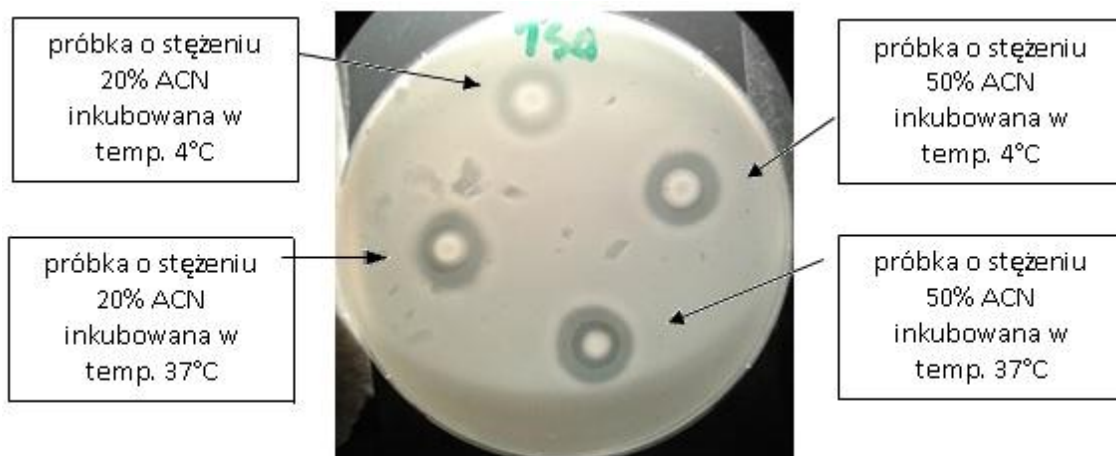
Po podjęciu próby oczyszczania preparatu z zastosowaniem kolumny C18 oraz C5 z fazą ruchomą składającą się z acetonitrylu i wody z dodatkiem TFA (rozdziół 'Metody 5.6.4.') nie otrzymano frakcji wykazującej aktywność przeciwbakteryjną. Identyfikacji sygnału odpowiadającego na chromatogramie bakteriocynie dokonywano dwiema metodami:

- a) detekcja aktywności przeciwbakteryjnej wszystkich frakcji odpowiadającym poszczególnym sygnałom na chromatogramie polegająca na zebraniu każdej z frakcji odpowiadających pikom i określenie aktywności z zastosowaniem zmodyfikowanej metody zalewowej opisanej w rozdziale 'Metody 5.4. a)'.

b) detekcja obecności peptydu w każdej z zebranych frakcji odpowiadających poszczególnym pikom z zastosowaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym Tricine SDS-PAGE ('Metody 5.9'). Do barwienia stosowano zarówno roztwór barwnika Coomassie Brilliant Blue R-250, jak i metodę srebrową.

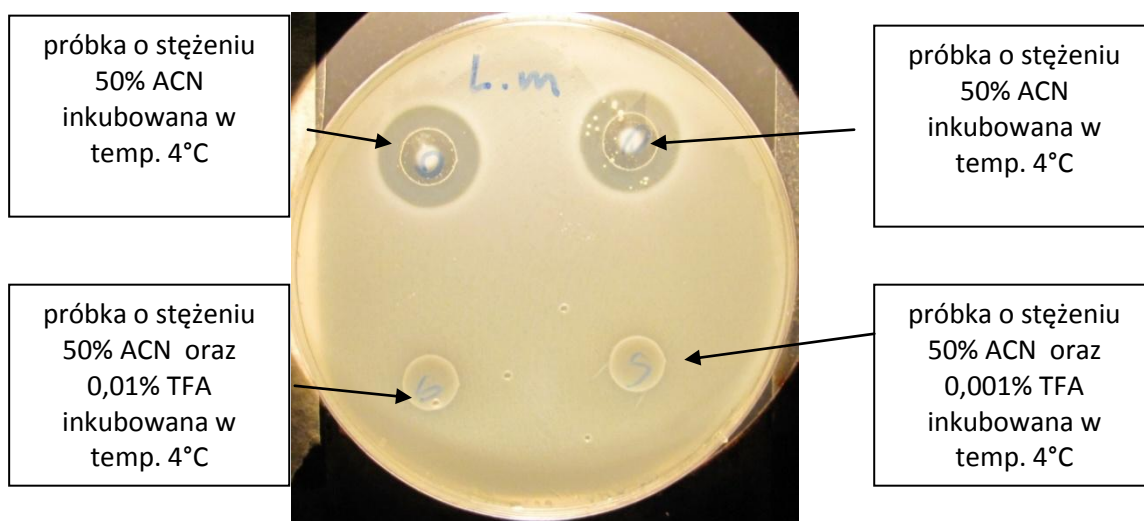
Test aktywności przeciwbakteryjnej przeprowadzono w pierwszej kolejności. Nie wykazał on jednak obecności substancji o działaniu przeciwbakteryjnym w żadnej z frakcji po oczyszczaniu z wykorzystaniem HPLC. Jako, że bakteriocyny nie są głównym produktem metabolizmu bakterii, jej końcowe stężenie nie jest duże (możliwość zbyt małego stężenia peptydu w końcowej frakcji, aby zobaczyć aktywność). Ze względu na to przeprowadzono również detekcję bakteriocyny z zastosowaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym Tricine SDS-PAGE z wykorzystaniem zarówno barwienia barwnikiem Coomassie Brilliant Blue R-250, jak i metodą srebrową. Ten test również nie wykazał obecności peptydu o masie około 4kDa w żadnej z frakcji otrzymanej po HPLC.

Postanowiono sprawdzić wpływ składników fazy ruchomej na aktywność preparatu (rozdział 'Metody 5.7.'). Na podstawie otrzymanych wyników okazało się, że acetonitryl nie ma wpływu na aktywność przeciwbakteryjną preparatu, natomiast TFA powoduje nieodwracalną utratę aktywności. Nawet znaczne zmniejszenie ilości dodawanego kwasu (0,01% TFA oraz 0,001% TFA) nie skutkowało zachowaniem aktywności (Rys. 19, Rys. 20)



Rys. 19

Aktywność bakteriobójcza frakcji, do których dodano tylko acetonitryl(ACN) w stężeniach 20% oraz 50% inkubowanych w 4°C oraz 37°C przez okres 72h.



Rys. 20

Porównanie aktywności bakteriobójczej frakcji, do których dodano acetonitryl (50%) oraz TFA w stężeniach 0,01% oraz 0,001% inkubowanych w 4°C natychmiast po dodaniu kwasu.

W trakcie próby optymalizacji oczyszczania bakteriocyny z zastosowaniem HPLC przeprowadzono szereg prób uzyskania preparatów homogennych biologicznie aktywnej bakteriocyny stosując modyfikacje warunków procesu na przykład:

- a) różne rodzaje kolumn;
- b) modyfikacja składników fazy ruchomej;
- c) zwiększanie stężenia peptydu w preparacie poddawanym oczyszczaniu poprzez odparowanie rozpuszczalnika ('Metody 5.6.3.')

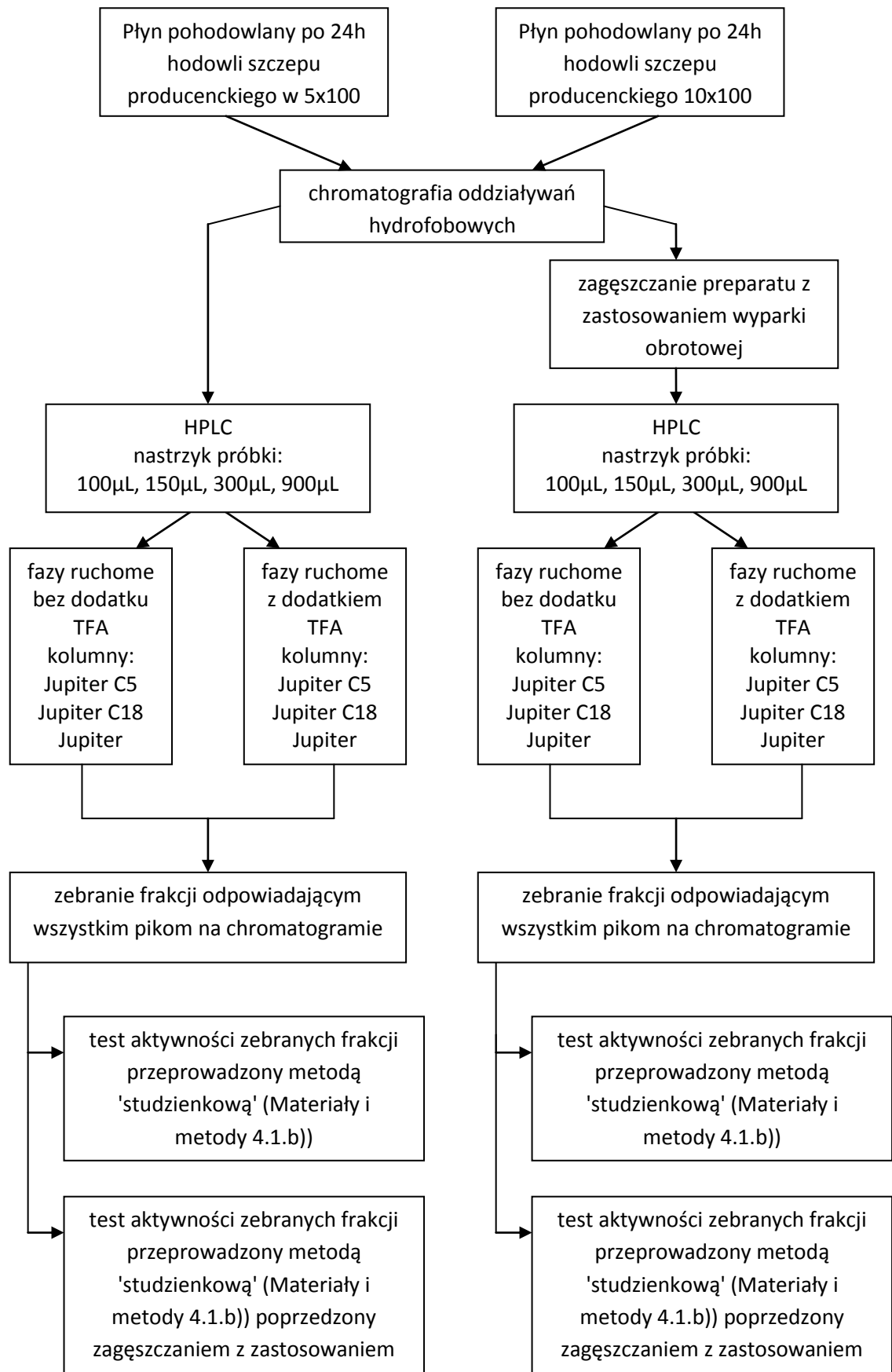
Dokładne zestawienie wprowadzanych modyfikacji zestawiono na schemacie 2.

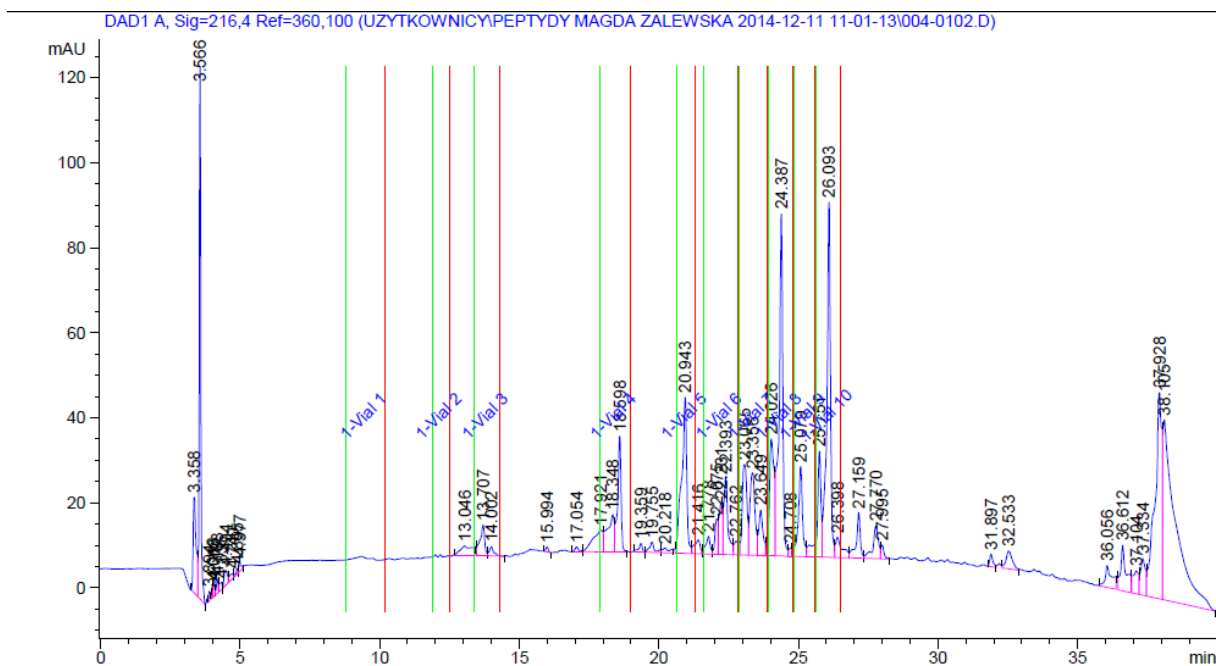
Do analizy wyników każdej z zaproponowanych modyfikacji stosowano dwie wymienione powyżej metody detekcji obecności i aktywności peptydu (test aktywności oraz Tricine SDS-PAGE). Nie znaleziono frakcji, w której znajdowałby się peptyd wielkości około 4 kDa. Z powodu spodziewanego niskiego stężenia końcowego bakteriocyny w preparacie dokonano również wybarwienia żeli z zastosowaniem metody srebrowej. Pozwala to na wykrycie peptydu o dużo mniejszym stężeniu w próbce poddanej rozdzielaniu w żelu elektroforetycznym (1 ng), niż barwienie barwnikiem Coomassie Brilliant Blue (1  $\mu$ g). Także w tym przypadku nie zidentyfikowano frakcji (piku na chromatogramie) odpowiadającego poszukiwanemu peptydowi.

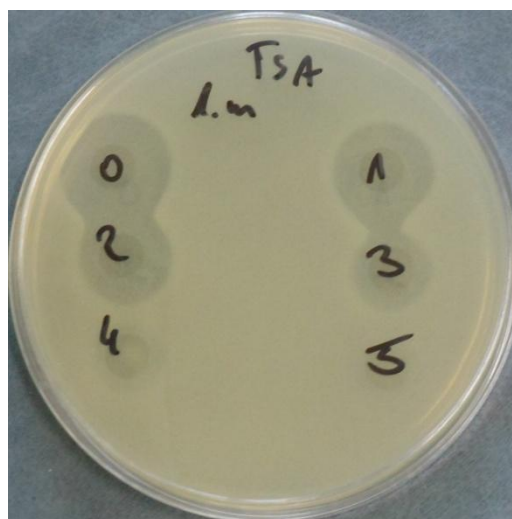


## Schemat 2

Ideowy schemat modyfikacji wprowadzonych w trakcie procedury oczyszczania peptydu z zastosowaniem techniki HPLC



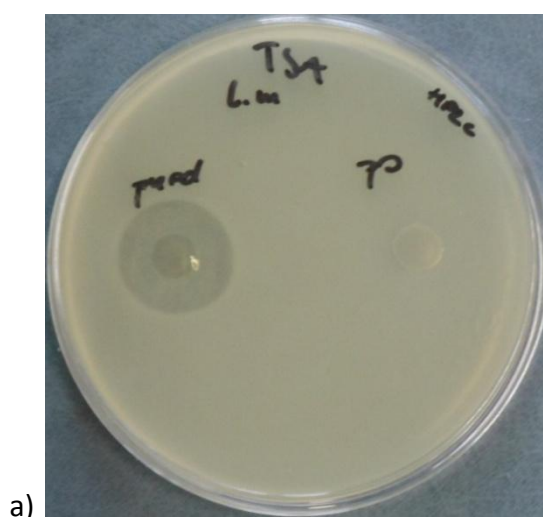




Rys.22

Wyniki testu aktywności preparatu względem szczepu *L. monocytogenes* ATCC10425 ('l.m.'). Oznaczenia: 0 - próbka bez rozcieńczenia (100μl); 1,2,3,4,5 - kolejne dwukrotne rozcieńczenia preparatu oznaczonego jako '0' na płytce

Otrzymany wynik pozwala sądzić, że badana substancja ulega inaktywacji podczas separacji zawierającej ją mieszaniny za pomocą HPLC (Rys. 23). Jest to sytuacja nietypowa i brak jednoznacznego, racjonalnego wytłumaczenia przyczyn takiego stanu rzeczy.



a)

Rys. 23

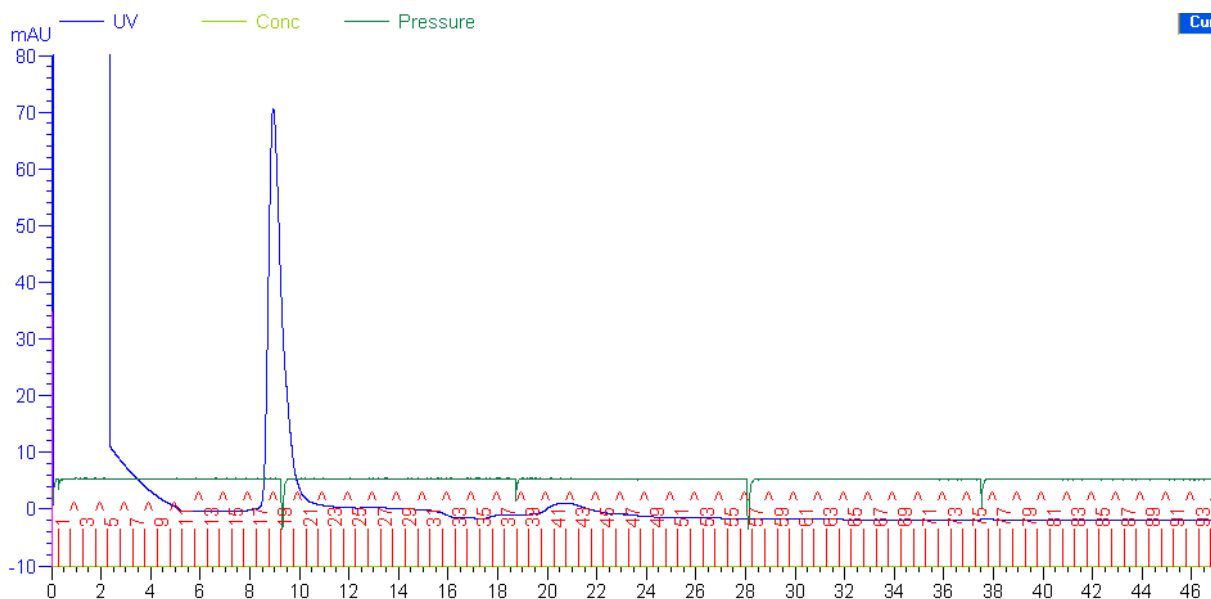
Test aktywności bakteriobójczej preparatu przed ("przed") i po ("po") oczyszczeniu z zastosowaniem HPLC. Zastosowano szczep wrażliwy *L. monocytogenes* ("l.m.")

#### 7.4. Oczyszczanie bakteriocyny z wykorzystaniem FPLC

Niepowodzenie prób oczyszczania preparatu przy pomocy HPLC skłoniło mnie do podjęcia decyzji o zmianie metody oczyszczania preparatu. Zdecydowałam się na wykorzystanie techniki FPLC z kolumną do filtracji żelowej (Superdex Peptide 10/300 GL).

FPLC jest odmianą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, która charakteryzuje się wykorzystywaniem niższych ciśnień niż HPLC. Pory w kolumnach stosowanych do HPLC mają bardzo małe średnice (rzędu 5-40  $\mu\text{m}$ ), powoduje to powstawanie wysokich ciśnień w procesie oczyszczania (nawet do 400 barów). W technice FPLC wykorzystuje się kolumny z porami o większej średnicy, dzięki czemu nie jest wymagane stosowanie tak wysokich ciśnień. Dodatkową różnicą jest również możliwość zastosowania oprócz organicznych rozpuszczalników (zalecanych do większości kolumn stosowanych w HPLC), także roztworów wodnych. FPLC oferuje ponadto szeroki rodzaj kolumn chromatograficznych wypełnionych złożami, które wykorzystują różne techniki chromatograficzne, jak np. chromatografia jonowymienna, filtracja żelowa, chromatografia oddziaływań hydrofobowych. Z powodu wielkości kolumny możliwe jest nałożenie większej ilości preparatu w porównaniu do klasycznych kolumn stosowanych w HPLC. Różnorodność stosowanych złożów oraz możliwość doboru buforów tworzących środowisko idealne dla białka tworzy z FPLC jedną z lepszych opcji w oczyszczaniu białek oraz peptydów. Ze względu na znajomość przybliżonej masy peptydu zdecydowano się na zastosowanie filtracji żelowej jako kolejnej metody oczyszczenia peptydu. Jako eluenty wykorzystano roztwory, o których wiadomo było, że nie wpływają na aktywność peptydu: bufor fosforanowy oraz 60% etanol.

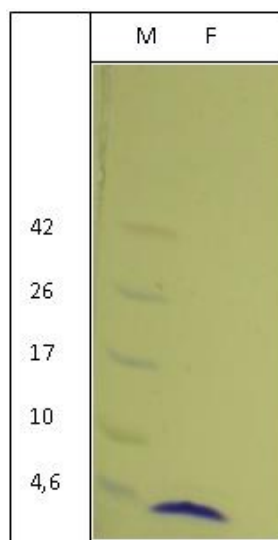
Detekcji dokonywano z zastosowaniem określenia aktywności antybakteryjnej ('Metody 5.4.a') oraz elektroforezy w żelu poliakrylamidowym Tricine SDS-PAGE ('Metody 5.9').



Rys. 24

Chromatogram otrzymany w wyniku oczyszczania preparatu peptydowego z zastosowaniem FPLC z wykorzystaniem kolumny Superdex Peptide 10/300 GL

Na przedstawionym chromatogramie (Rys. 24) widoczny jest pojedynczy sygnał odpowiadający substancji o masie cząsteczkowej około 4 kDa (minuta 10-16). Masa ta została także potwierdzona przez analizę elektroforetyczną tej frakcji (Rys. 25), jednak w teście zalewowym nie stwierdzono efektu bakteriobójczego. Oznacza to, że także w przypadku oczyszczania z wykorzystaniem FPLC aktywność peptydu ulega zanikowi. Może to potwierdzać tezę postawioną po oczyszczaniu peptydu z zastosowaniem HPLC, że peptyd w trakcie procedury oczyszczania z zastosowaniem wysokosprawnych technik chromatograficznych (HPLC i FPLC) traci aktywność przeciwbakteryjną, nie jest zatem możliwe otrzymanie na tej drodze preparatu o stopniu czystości zbliżonym do jednorodności z jednoczesnym zachowaniem aktywności biologicznej.



Rys. 25

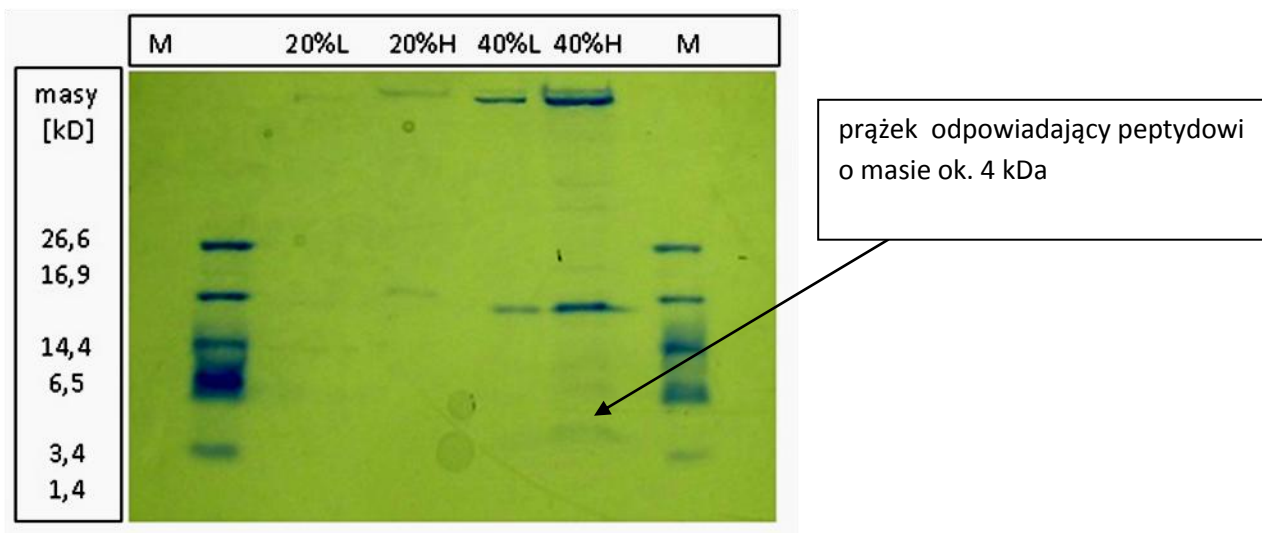
Analiza elektroforetyczna frakcji otrzymanej po zastosowaniu oczyszczania preparatu po HIC z zastosowaniem FPLC. M - marker (Thermo Scientific Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder; MW kDa 1,7; 4,6; 10; 17; 26; 42; F - frakcja, w której obecny jest peptyd

## 8. Badania mające na celu poznanie struktury peptydu

### 8.1. Określenie przybliżonej masy peptydu z zastosowaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym Tricine SDS-PAGE

Preparat otrzymany w wyniku frakcjonowanego wysalania poddano analizie elektroforetycznej w celu określenia przybliżonej masy cząsteczkowej oraz określenia warunków do otrzymania próbki do sekwencjonowania.

Przygotowano dwa identyczne żele Tricine SDS-PAGE. Jedną z kopii wybarwiono przy pomocy roztworu barwnika Coomassie Brilliant Blue, a drugą przepłukano kilkakrotnie wodą jałową i przy wykorzystaniu metody zalewowej sprawdzono aktywność bakteriobójczą poszczególnych prążków na żelu. Obrazy obu żeli przedstawiono na rysunku 26 i 27.



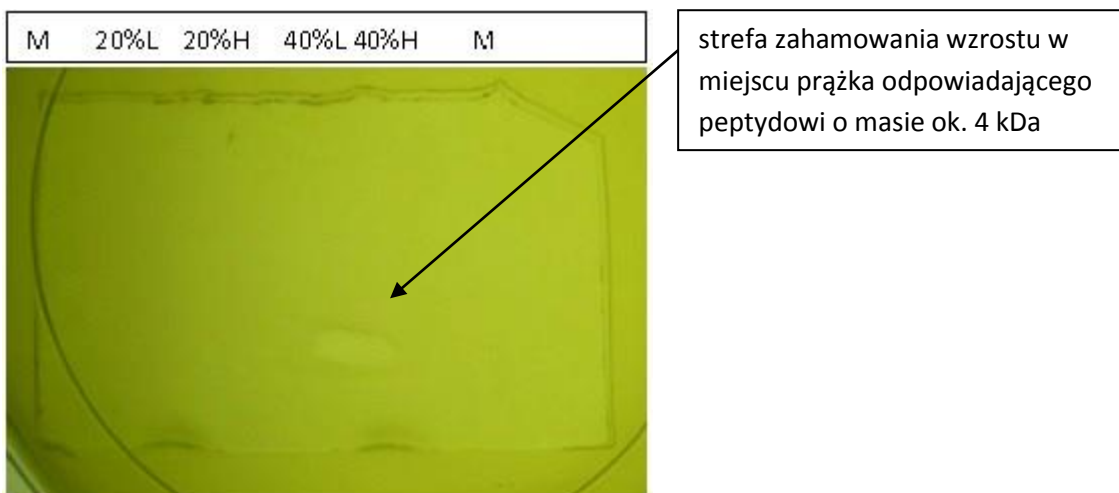
Rys. 26

Elektroforegram Tricine SDS-PAGE po barwieniu barwnikiem Coomassie Brilliant Blue R-250 i odbarwianiu kwasem octowym.

M - markery masy cząsteczkowej 1.4, 3.4, 6.5, 14.4, 16.9, 26.6, 20%L - frakcja po strącaniu 20% siarczanem amonu (niskie stężenie próbki), 20%H - frakcja po strącaniu 20% siarczanem amonu (wysokie stężenie próbki), 40%L - frakcja po strącaniu 40% siarczanem amonu (niskie stężenie próbki), 40%H - frakcja po strącaniu 40% siarczanem amonu (wysokie stężenie próbki).

Niskie stężenie próbki (L): 5 $\mu$ l próbki + 3 $\mu$ l buforu do próbek 2x stężonego

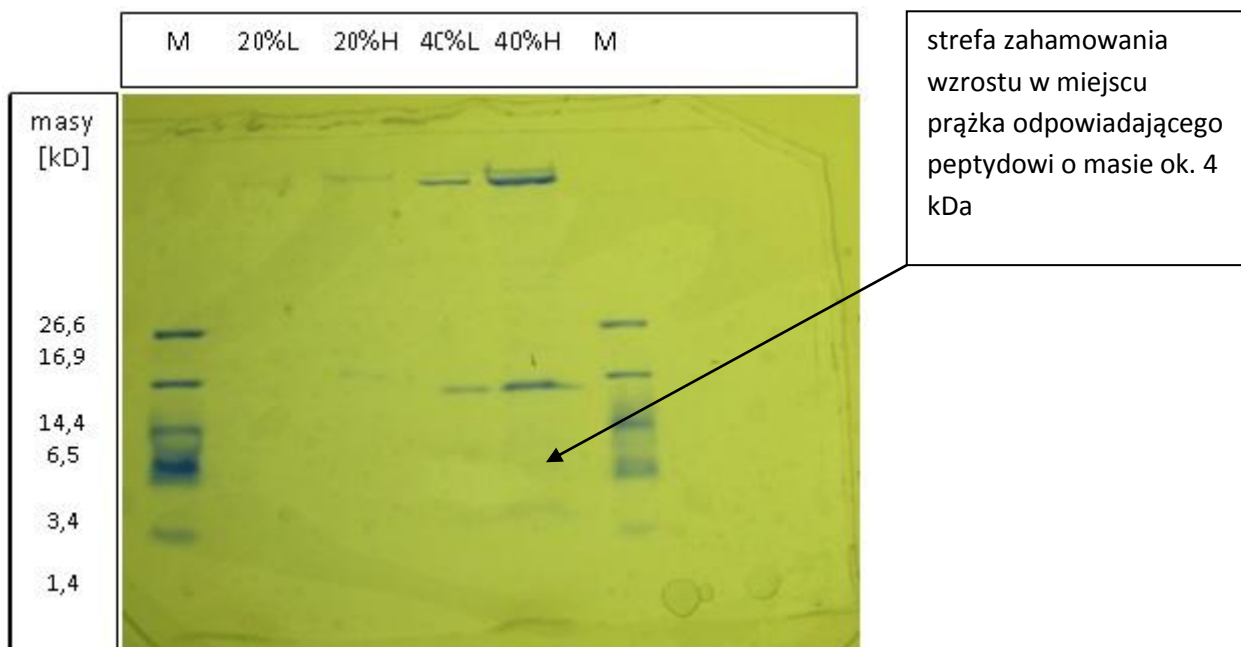
Wysokie stężenie próbki (H): 20 $\mu$ l próbki + 5 $\mu$ l buforu do próbek 5x stężonego



Rys. 27

Aktywność antybakteryjna substancji rozdzielanych metodą Tricine SDS-PAGE. Aktywność wobec *L. monocytogenes* zidentyfikowana z zastosowaniem metody zalewowej.

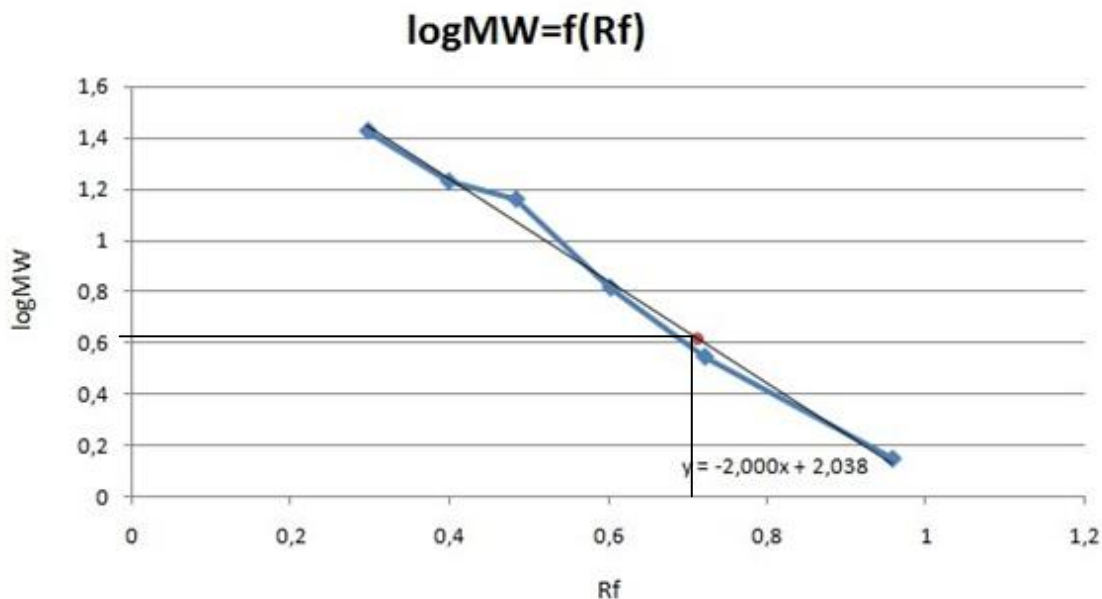
Po nałożeniu na siebie obu kopii żelu można było precyzyjnie określić, który prążek z żelu wybarwionego przy wykorzystaniu roztworu barwnika Coomassie Brilliant BlueR-250 należy do substancji, który wykazuje aktywność antibakteryjną (Rys. 28).



Rys. 28  
Nałożone obrazy żeli przedstawionych na rysunkach 26 i 27

Przybliżoną masę peptydu wyznaczono na podstawie wykresu  $\log MW = f(R_f)$  (Rys. 29). Masa została wyznaczona z równania linii trendu  $y = -2,000x + 2,038$ . Według danych przedstawionych na wykresie przybliżona masa peptydu wynosi 4,11 kDa (punkt oznaczony czerwonym znacznikiem na wykresie). Zakładając średnią MW reszty aminokwasowej około 120 D, można przyjąć, że badana bakteriocyna zbudowana jest z 32-36 reszt aminokwasowych.





Rys. 29

Wykres  $\log MW = f(R_f)$ , który posłużył do obliczenia przybliżonej masy peptydu.

Dodatkowo wynik tego eksperymentu dostarczył też informacji na temat struktury bakteriocyну produkowanej przez szczep M2B. Jest ona najprawdopodobniej zbudowana z jednego łańcucha peptydowego. W przypadku istnienia większej liczby łańcuchów uległyby one denaturacji w warunkach SDS-PAGE, co skutkowałoby zanikiem aktywności. Ponadto na podstawie wyników eksperymentu można stwierdzić też, że bakteriocyна w swojej strukturze nie zawiera mostków disiarczkowych lub jeśli jednak takie mostki występują, to nie mają one znaczenia dla aktywności peptydu. Gdyby w strukturze bakteriocyну występował(y) mostki istotne dla aktywności, uległyby one redukcji przez  $\beta$ -merkaptoetanol, który znajduje się w buforze do nanoszenia próbek.

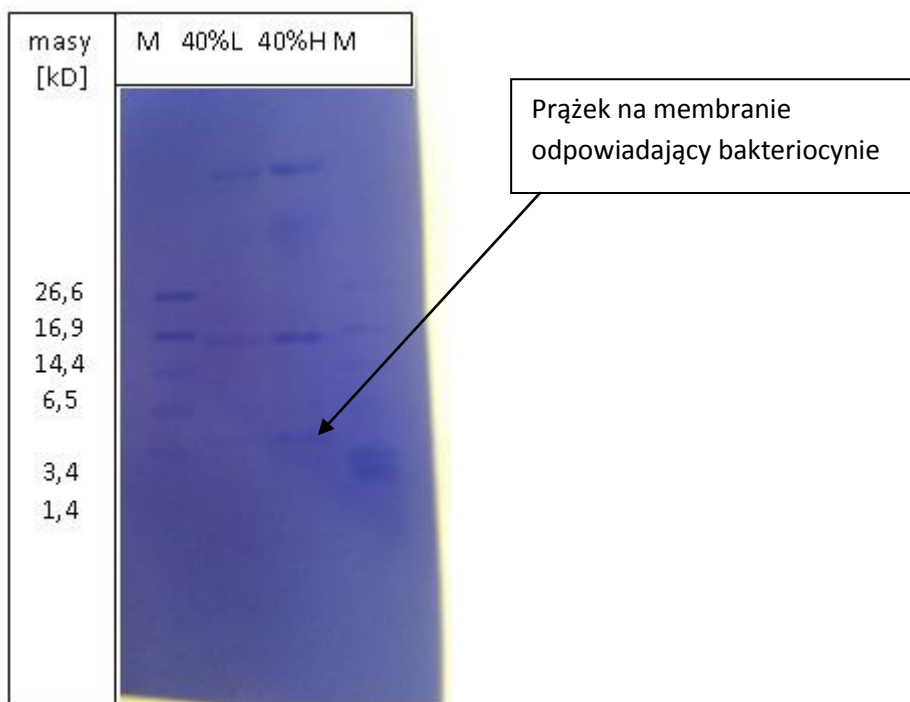
Zidentyfikowana bakteriocyна charakteryzuje się wielkością podobną do wielkości innych bakteriocyну produkowanych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*. Wielkości innych znanych bakteriocyну produkowanych przez gronkowce: aureocin A53 (*S. aureus*) 6,0125 kDa; epicidin (*S. epidermidis*) 2,80kDa; epilancin K7 (*S. epidermidis*) 3,032 kDa; epidermin (*S. epidermidis*) 2,1646 kDa; nukacin ISK-1 (*Staphylococcus warnei*) 2,96 kDa; warnecin RB4 (*S. warnei*) 2,9584 kDa; simulacin 3299

(*Staphylococcus simulans*) około 3 kDa; staphylococcin C55 $\alpha$  (*S. aureus*) 3,339 kDa; staphylococcin C55 $\beta$  (*S. aureus*) 2,993 kDa; staphylococcin 462 (*S. aureus*) 9 kDa; staphylococcin IYS2 (*S. aureus*) 5kDa; staphylococcin Au-26 (*S. aureus*) 2,7 kDa; Bac 1829 (*S. aureus*) 6,418 kDa; staphylococcin 188 (*S. aureus*) 4 kDa (Bastos *et al.* 2009). Można jednoznacznie stwierdzić, że bakteriocyna wytwarzana przez szczep M2B należy on do klasy III bakteriocyn, ponieważ jego wielkość nie przekracza 25kDa.

Dodatkową informacją pochodzącą z powyższych eksperymentów jest przypuszczenie, że bakteriocyna zidentyfikowana w trakcie prowadzenia badań może należeć do klasy II bakteriocyn, ponieważ ma masę mniejszą niż 10 kDa, jest wysoce termostabilna oraz wykazuje aktywność względem bakterii z rodzaju *Listeria*.

## 8.2. Sekwencjonowanie bakteriocyny metodą Edmana

Białka i peptydy z preparatu, który został poddany rozdzielaniu na żelu Tricine SDS-PAGE, po rozdzielaniu zostały przeniesione na membranę przy zastosowaniu elektroblottingu zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 'Metody 5.10'. Na Rys. 30 przedstawiono obraz membrany PVDF+ z przeniesionymi na nią białkami/peptydami znajdującymi się w preparacie, po wybarwieniu barwnikiem Coomassie Brilliant Blue R-250.



Rys. 30

Membrana PVDF+ wybarwiona przy zastosowaniu roztworu barwnika Coomassie Brilliant Blue R-250. M 1.4, 3.4, 6.5, 14.4, 16.9, 26.6 kD (BIO RAD), frakcja po strącaniu 40% siarczanem amonu (niskie stężenie próbki), frakcja po strącaniu 40% siarczanem amonu (wysokie stężenie próbki)

Niskie stężenie próbki (L): 5µl próbki + 3µl buforu do próbek 2x stężonego

Wysokie stężenie próbki (H): 20µl próbki + 5µl buforu do próbek 5x stężonego

Fragment żelu po elektroblottingu odpowiadający bakteriocynie został wycięty, znajdująca się na nim substancja wyekstrahowana i poddana sekwencjonowaniu z zastosowaniem degradacji Edmana (Synthesis and Sequencing Facility at Johns Hopkins University School of Medicine (Baltimore, MD)). Ustalanie sekwencji białek metodą degradacji Edmana (Berg *et al.* 2002) polega „odrywaniu” kolejnych N-końcowych reszt aminokwasowych (bez hydrolizy pozostałych wiązań peptydowych), połączonym z ich znakowaniem. Do procesu wykorzystuje się fenyloizotiocyanian, który reaguje z wolną końcową grupą aminową peptydu, tworząc pochodną fenylotiokarbamoilową. W środowisku lekko kwaśnym uwalnia się tylko pochodna fenylotiokarbamoilowa N-końca peptydu, bez naruszania pozostałej części łańcucha

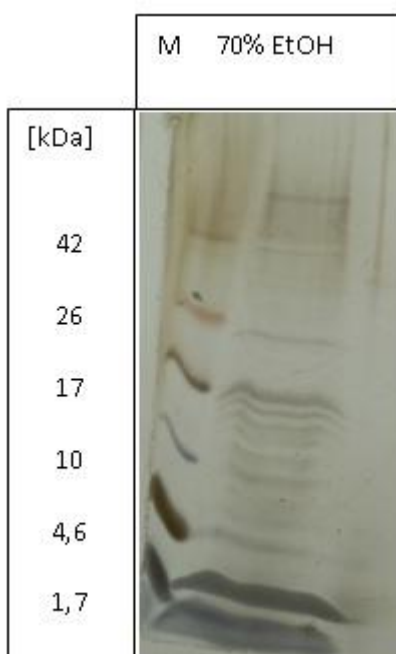
peptydowego. Związek jest fenyltiohydantoinową pochodną aminokwasu, którą można zidentyfikować na pomocą technik chromatograficznych.

W wyniku tej analizy ustalono N-końcową sekwencję aminokwasową:

H<sub>2</sub>N-NIPQLTQLV, czyli Asn-Ile-Pro-Gln-Leu-Thr-Gln-Thr-Leu-Val.

### 8.3. Charakterystyka strukturalna peptydu z wykorzystaniem spektrometrii mas

Ostatnim etapem prowadzonych badań była charakterystyka peptydu z wykorzystaniem spektrometrii mas technikami MALDI-TOF i MS/MS. Z powodu problemu z otrzymaniem czystego preparatu, prace w Laboratorium Spektrometrii Mas wykonywano z użyciem preparatu uzyskanego po chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC). Preparat poddawany analizie, oprócz przypuszczalnej bakteriocyny zawierał też inne białka i peptydy (Rys. 31).

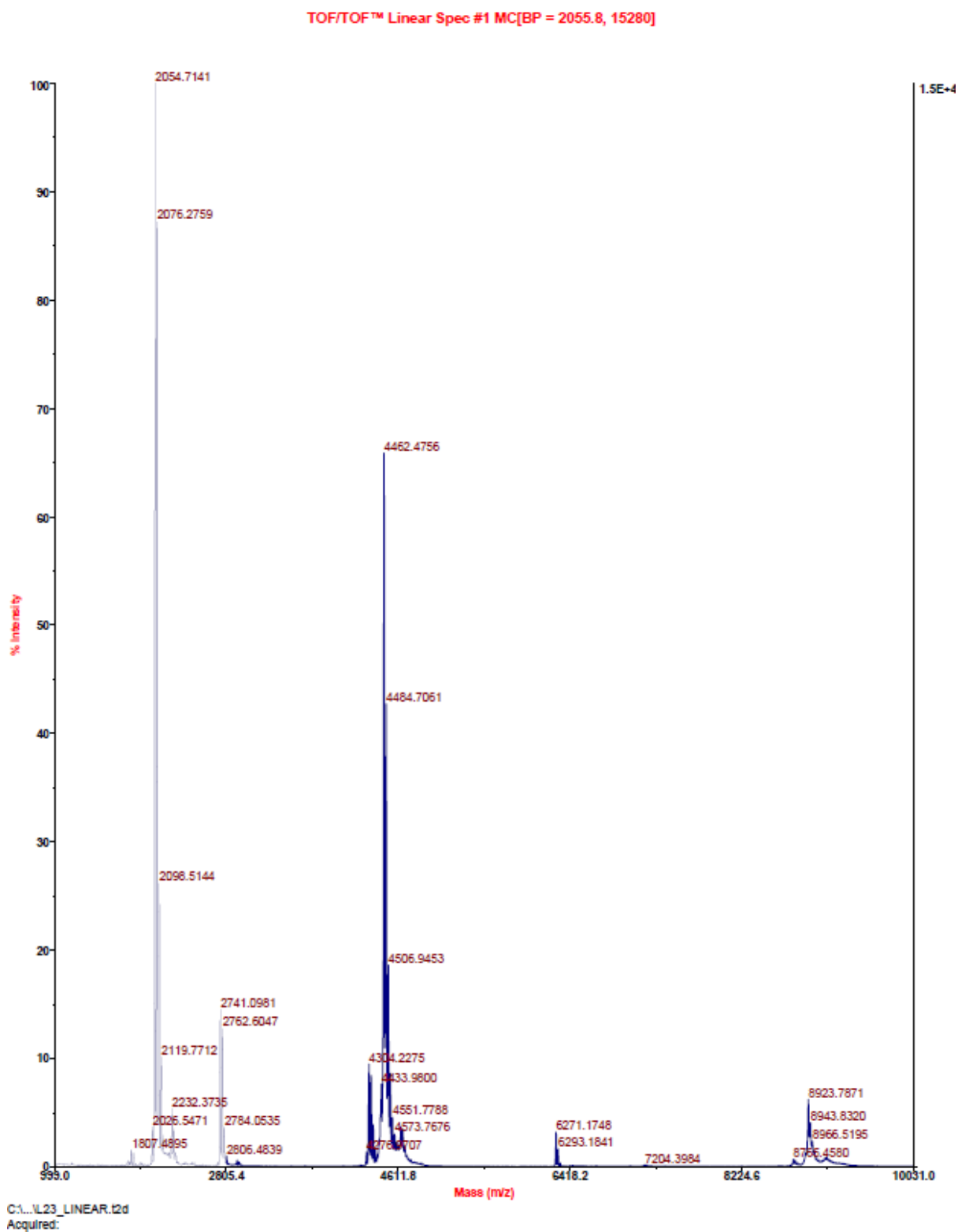


Rys. 31

Analiza elektroforetyczna przedstawiająca skład próbki poddanej badaniom w Laboratorium Spektroskopii Mas, żel wybarwiony przy wykorzystaniu metody srebrowej.

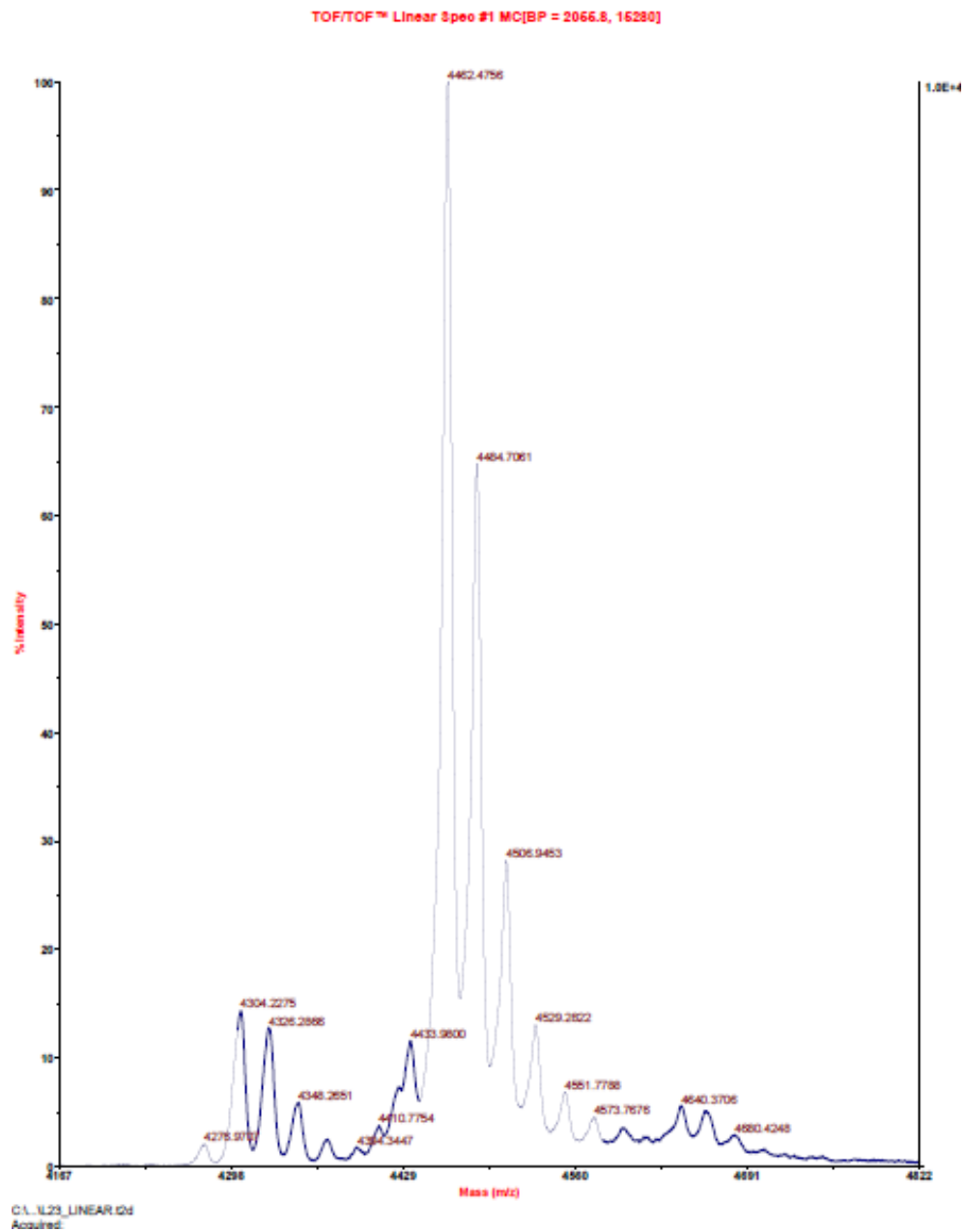
M - marker (ThermoScientific Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder; MW kDa 1,7; 4,6; 10; 17; 26; 42; 70% EtOH - frakcja, w której obecny jest peptyd po oczyszczeniu z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofobowych o zawartości 70% EtOH.

W wyniku analizy widm MS uzyskanych w wyniku eksperymentów MALDI-TOF (Rys. 32 oraz 33) możliwe było określenie masy cząsteczkowej przypuszczalnej bakteriocyny.



Rys. 32

Widmo MALDI-TOF próbki zawierającej badaną bakteriocynę.



Rys. 33

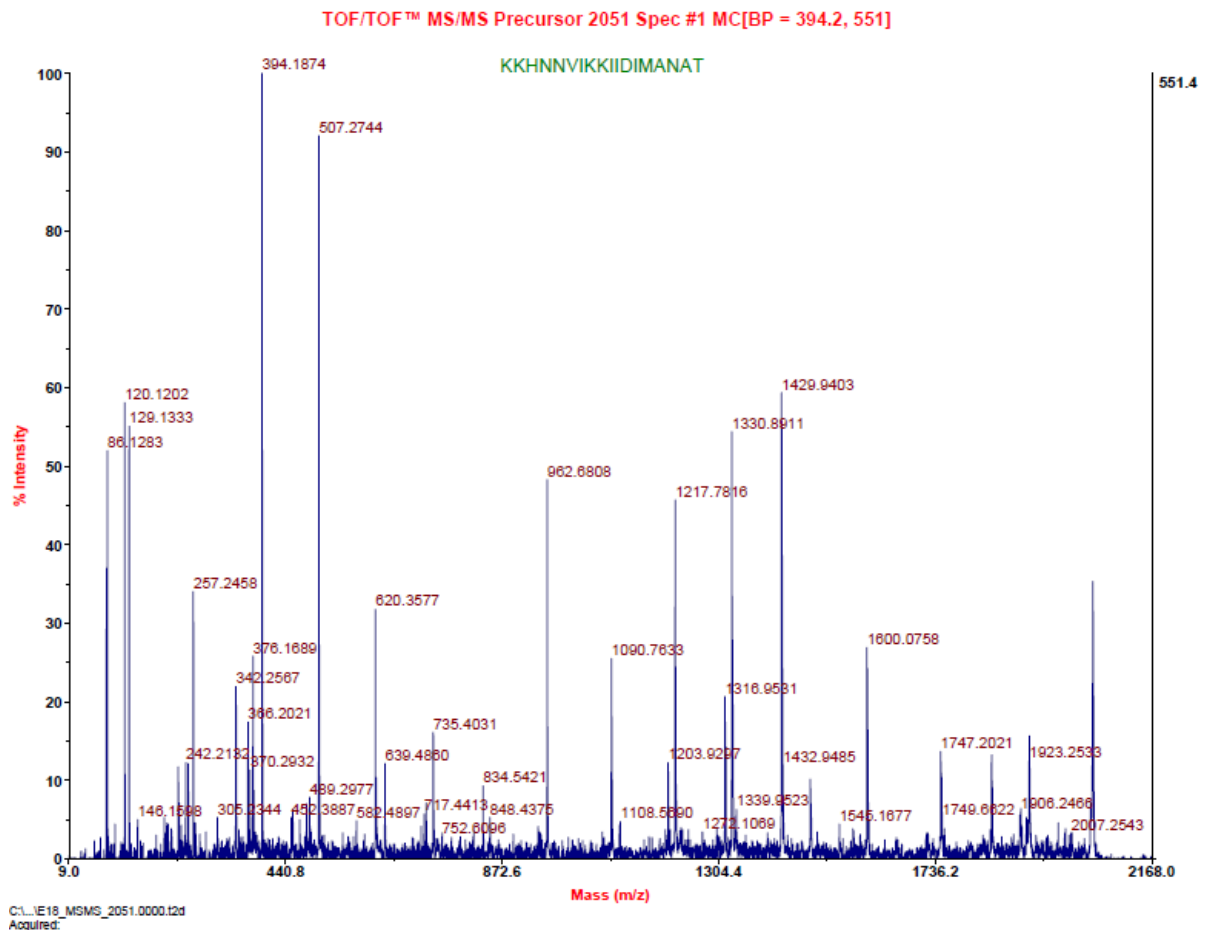
Widmo peptydu o wielkości około 4 kDa (widmo pozyskane przy wykorzystaniu pomiaru w trybie liniowym - droga jonów w trakcie pomiaru w aparacie odbywa w linii prostej). Najintensywniejszy sygnał jest widoczny dla peptydu o masie 4461 Da.

Intensywny pik występujący w obu widmach odpowiada masie 4461 Da, co pozostaje w bardzo dobrej zgodności z wynikiem uzyskanym w analizie SDS-PAGE. Ponadto, na Rys. 30 występuje intensywny pik odpowiadający masie 2052 Da.

Fragmentację MS/MS przeprowadzono dla najintensywniejszych z pików, które pojawiły się w procesie analizy próbki. Dla pików odpowiadających peptydowi o masie 2050 Da fragmentacja przebiegła typowo dla peptydów. Uzyskane widmo przedstawiono na Rys. 33. Umożliwiło to przypisanie każdemu z sygnałów odpowiadającą mu resztę aminokwasową. Udało się ustalić sekwencję aminokwasową całego peptydu - KKHNNVIKKIIDIMANAT. Odpowiada ona sekwencji peptydu występującego w bakterii *S. xylosus* (syntaza kwasu N-acetylmuraminowego, E = 0,65; oksydoreduktaza nukleotydów pirydynowych, E = 0,65). Otrzymany wynik jest zaskakujący, ponieważ otrzymana sekwencja odpowiadać może fragmentom dwóch enzymów, które prawdopodobnie znalazły się w badanej próbce wskutek zanieczyszczenia. Dodatkowo przeprowadzono także fragmentację dla peptydu o masie 1446 Da. Przebiegła również charakterystycznie dla peptydu. Nie udało się jednak przypisać sygnałom konkretnych aminokwasów.

Dla każdego sygnału około wielkości 4 kDa pojawiającego się w trakcie analizy również przeprowadzono fragmentację MS/MS. Nie było możliwe przypisanie aminokwasów do konkretnych sygnałów. Stało się tak z powodu nietypowej fragmentacji oczyszczanej substancji. Otrzymane wyniki częściowo wykazują wzorzec fragmentacji charakterystyczny dla peptydu, ale część widma wygląda w sposób odbiegający od tego wzorca. Uzyskane podczas fragmentacji piki, sugerują, że cząsteczka substancji aktywnej biologicznie nie jest złożona z samych aminokwasów. Najprawdopodobniej jest to peptyd, do którego dołączona jest reszta cukrowa lub inny podstawnik. W wyniku dotychczasowych badań nie udało się zidentyfikować tego fragmentu cząsteczki. Obecność fragmentu niebiałkowego może sugerować, że peptyd po syntezie poddawany jest dalszej obróbce enzymatycznej w komórce. Podobne wnioski można wysnuć analizując rodzaj użytej do pomiarów matrycy. Przy zastosowaniu do badań matrycy charakterystycznej dla peptydów (CHCA - kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy), sygnał odpowiadający peptydowi wielkości około 4 kDa nie pojawia się wcale lub jest bardzo słaby (Rys. 34). Natomiast w przypadku

zastosowaniu matrycy do analizy glikopeptydów (FA – ferulic acid) pojawia się bardzo intensywny sygnał odpowiedni dla peptydów o masie około 4 kDa (Rys. 35).

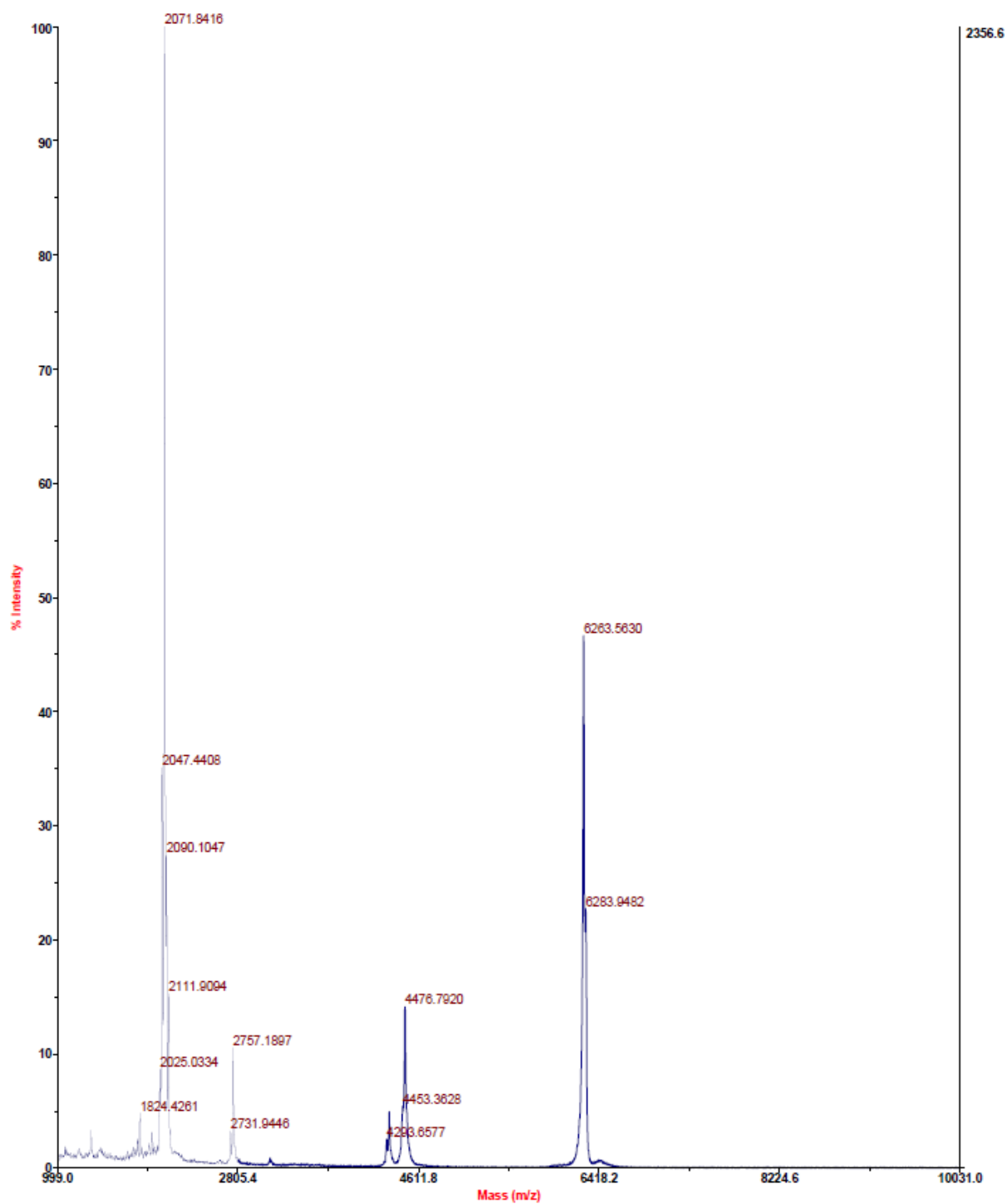


Rys. 34

Widmo przedstawia fragmentację MS/MS dla peptydu o wielkości 2050 Da dającego najintensywniejszy sygnał w widmie masowym całej próbki dostarczonej do laboratorium spektrometrii mas przedstawiające piki z przypisanymi masami



TOF/TOF™ Linear Spec #1 MC[BP = 2072.3, 2357]

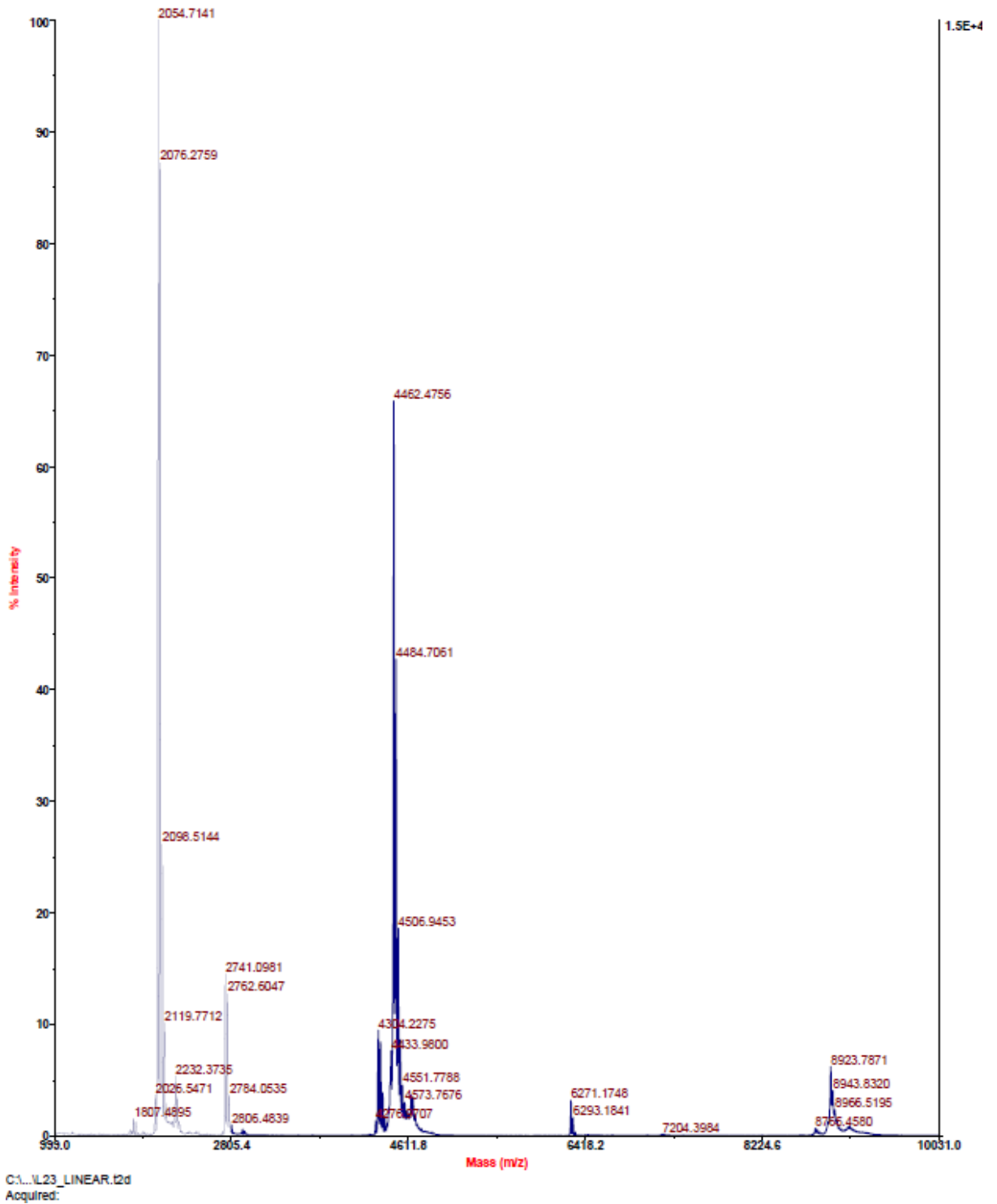


C:\...K22\_LINEAR.12d  
Acquired:

Rys. 35

Widmo masowe dostarczonego preparatu uzyskane przy zastosowaniu matrycy charakterystycznej dla analizy peptydu (CHCA)

TOF/TOF™ Linear Spec #1 MC[BP = 2055.8, 15280]



Rys. 36

Widmo masowe dostarczonego preparatu uzyskane przy zastosowaniu matrycy charakterystycznej dla analizy glikopeptydów (FA)

## 9. Próba identyfikacji genu kodującego bakteriocynę

Szczep, który produkuje potencjalną bakteriocynę trafił do kolekcji KTLiB opisany jako *S. xylosus*. W momencie potwierdzenia, że szczep ten produkuje prawdopodobnie bakteriocynę postanowiono potwierdzić przynależność gatunkową tego izolatu. Szczep hodowano w warunkach optymalnego wzrostu, następnie izolowano materiał genetyczny przy wykorzystaniu komercyjnie dostępnego zestawu do izolacji (Genomic Mini, A&A Biotechnology). Następnie przy pomocy reakcji PCR namnożono fragment DNA kodujący podjednostkę 16S rRNA. Dzięki sekwencjonowaniu podjednostki 16S rRNA (przeprowadzone przez firmę Genomed) szczepu produkcyjnego oraz przeprowadzonej analizie bioinformatycznej uzyskanej sekwencji potwierdzono określoną wcześniej przynależność gatunkową tego szczepu.

Dodatkowo poddano też sekwencjonowaniu cały genom szczepu produkcyjnego. Sekwencjonowanie przeprowadzono również w firmie Genomed. Stosowaną metodą sekwencjonowania była metoda dideoksy. Ogólną zasadę działania tej metody opisano w publikacji pt. 'DNA Sequencing by The Dideoxy Method' (Slatko *et al.* 2001). W tym celu wyizolowano najpierw plazmidowe DNA, a potem DNA chromosomalne. Okazało się, że szczep produkcyjny nie posiada plazmidowego DNA (potwierdzone dzięki analizie elektroforetycznej). Pozwala to sądzić, że geny odpowiedzialne za kodowanie potencjalnej bakteriocyny znajdują się na DNA chromosomalnym. Otrzymane po sekwencjonowaniu genomu szczepu produkcyjnego dane są bardzo podobne do danych dla szczepu referencyjnego (Labrie *et al.* 2014). Podobnie wygląda jego długość - 2 757 577 bp dla szczepu wzorcowego oraz 2 757 557 dla genomu zsekwencjonowanego. Podobieństwa znaleźć można także dla ilości par GC w obydwu genomach, która wynosi 32,9% dla szczepu wzorcowego oraz 32,88 dla szczepu z kolekcji KTLiB. Otrzymane dzięki sekwencjonowaniu dane poddano obróbce informatycznej z zastosowaniem programu UGene. Udało się zidentyfikować otwarte ramki odczytu dla genu kodującego produkt o wielkości około 4 kDa (32-36 reszt aminokwasowych). Udało się znaleźć bardzo wiele ORF potencjalnie kodujących taki fragment (kilka tysięcy). Dodatkowo dzięki poznanej na wcześniejszym etapie badań sekwencji aminokwasowej N-końca bakteriocyny oraz wielkości tego peptydu możliwe było przeszukanie genomu w celu znalezienia sekwencji odpowiedzialnej za kodowanie

bakteriocyny. W wyniku przeprowadzonej analizy nie znaleziono takiego fragmentu genomu, który mógłby być odpowiedzialny za kodowanie bakteriocyny o rozpoznanej N-końcowej sekwencji aminokwasowej.

Zjawisko to może mieć kilka przyczyn:

- a) bakteriocyna może być kolista - w takim przypadku sekwencjonowany fragment nie był N-końcem peptydu;
- b) bakteriocyna może być poddawana różnego rodzaju modyfikacjom posttranslacyjnym po syntezie w komórce
- c) pomimo zastosowania techniki Tricine SDS-PAGE nie udało się uzyskać preparatu homogennej oczyszczonej bakteriocyny i próbka wysłana do sekwencjonowania mogła zawierać domieszki innych peptydów (jest to próbka powstała po strącaniu bakteriocyny siarczanem amonu, poddana rozdzielaniu na żelu poliakrylamidowym Tricine SDS-PAGE, następnie wycięta z membrany). W takim przypadku sekwencjonowanych może być jednocześnie kilka różnych peptydów znajdujących się w próbce.
- d) istnieje także możliwość, że peptyd nie jest syntezowany rybosomalnie, tak więc w genomie nie występuje sekwencja kodująca jego strukturę, lecz sekwencje kodujące kompleks białkowy syntezujący peptyd. W takim przypadku badana substancja nie spełniała by definicji bakteriocyny, lecz jako produkt metabolizmu wtórnego mogłaby zostać uznana za antybiotyk peptydowy.

## PODSUMOWANIE I WNIOSKI OGÓLNE

Analiza uzyskanych wyników pozwoliła sformułować następujące najważniejsze wnioski:

1. W wyniku przeprowadzonej procedury przesiewowej obejmującej 206 szczepów gronkowców pochodzenia klinicznego i weterynaryjnego zidentyfikowano 6 szczepów wytwarzających substancje o działaniu przeciwbakteryjnym, w tym 3 o strukturze peptydowej. W przypadku jednego ze szczepów produkujących substancję antybakteryjną o strukturze peptydowej (*S. xylosus* M2B), wydajność tej produkcji była wystarczająca do przeprowadzenia dalszych badań.
2. Dokonano optymalizacji warunków wydajnej produkcji zidentyfikowanej potencjalnej bakteriocyny w podłożu płynnym. Na podstawie testów aktywności płynu pochodowlanego względem szczepów wrażliwych, jako najodpowiedniejsze do produkcji bakteriocyny podłoże wybrano Tryptic Soy Broth największą wydajność produkcji uzyskano prowadząc hodowlę w objętości 100mL inkubowane z wytrząsaniem 170 rpm w temperaturze 37°C przez okres 24h.
3. Określono termostabilność bakteriocyny. Okazało się, że bakteriocyna wykazuje niezmienną aktywność bakteriobójczą względem szczepów wrażliwych po 15 minutowej inkubacji w 95°C oraz po długotrwałym ogrzewaniu (1h) w temperaturze 50°C.
4. Na wstępnym etapie prowadzenia badań zaproponowano trójstopniową procedurę oczyszczania bakteriocyny: a) strącanie siarczanem amonu, b) oczyszczanie preparatu z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofobowych, c) HPLC. Na każdym etapie dokonywano potwierdzenia obecności peptydu z zastosowaniem testu aktywności oraz elektroforezy w żelu poliakrylamidowym Tricine SDS-PAGE (połączonego z metodą zalewową). Na tym etapie badań udało się otrzymać wstępnie podczyszczony preparat peptydowy.

Kolejnym etapem było oczyszczanie z zastosowaniem układu faz odwróconych RP HPLC (Phenomenex Jupiter 5u C5 300 Å, Phenomenex Jupiter 5u C18 300 Å oraz Phenomenex Jupiter Proteo 4µm 90Å). Ponieważ na tej drodze nie udało się otrzymać homogennego preparatu, podjęto decyzję o zastosowaniu filtracji żelowej z wykorzystaniem systemu AKTA FPLC (Superdex Peptide 10/300 GL). Otrzymano preparat o stopniu czystości bliskim homogenności, nie wykazujący jednak aktywności przeciwbakteryjnej.

Przyczyn takiego stanu rzeczy należy się dopatrywać, w nieznaną jeszcze strukturze bakteriocyny. Taka sytuacja mogłaby mieć miejsce w przypadku bakteriocyny, która składa się z więcej niż jednego łańcucha polipeptydowego. W przypadku zidentyfikowanego w trakcie badań związku bakteriobójczego, na podstawie wyników otrzymanych w trakcie analizy preparatu z zastosowaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym Tricine SDS-PAGE, wiemy że związek składa się tylko z jednego łańcucha lub tylko jeden jest wymagany do wykazywania aktywności bakteriobójczej. Świadczy o tym obecność tylko jednego prążka na elektroforegramie, który wykazuje aktywność przeciwegrowcową. Kolejną przyczyną może być obecność w strukturze bakteriocyny małowcząsteczkowego ligandu (np. jony metalu). W takim przypadku peptyd w trakcie oczyszczania z zastosowaniem HPLC lub FPLC uległby odseparowaniu od peptydu, prowadzący tym samym do jego dezaktywacji. W literaturze znaleźć można przykłady bakteriocyn zawierających w swojej strukturze jony metali np. lizostafyna, która zawiera w swojej strukturze jon cynku (Szweda *et al.* 2012).

5. Z powodu problemów z końcowym oczyszczaniem peptydu, do badań strukturalnych z wykorzystaniem MALDI TOF, elektroforezy i sekwencjonowania metodą degradacji Edmana użyto preparatów otrzymanych po wstępnych etapach oczyszczania.

Uzyskano następujące informacje strukturalne:

- badana substancja jest peptydem składającym się z jednego łańcucha polipeptydowego. W strukturze brak mostków disiarczkowych. Peptyd ma charakter silnie hydrofobowy (silne wiązanie ze złożem Octyl-Sepharose), co wskazuje na dominujący udział w strukturze aminokwasów alifatycznych;
- masa cząsteczkowa badanej substancji wynosi około 4,11 kDa (analiza elektroforetyczna), najprawdopodobniej 4,461kDa (MS MALDI-TOF).
- sekwencja aminokwasowa N-końcowa: Asn-Ile-Pro-Gln-Leu-Thr-Gln-Thr-Leu-Val (degradacja Edmana);
- wyniki analizy MS/MS oraz utrata aktywności podczas chromatografii rozmiarów wykluczających wskazują na możliwość występowania w strukturze badanej substancji elementów niebiałkowych, takich jak: podstawnik(i) cukrowy(e) oraz małącząsteczkowy ligand (np. jon metalu)

Podjęto próbę poznania sekwencji genu kodującego bakteriocynę. W tym celu wyizolowano materiał genetyczny z komórek producenta i poddano go sekwencjonowaniu. W komórkach szczepu producenckiego nie stwierdzono obecności plazmidów, więc ewentualne geny bakteriocyny umieszczone są na chromosomie. Po obróbce informatycznej okazało się, że liczba otwartych ramek odczytu w genomie mogących kodować peptyd o wielkości około 4 kDa jest bardzo duża (kilka tysięcy), jednak, w żadnym z tych miejsc nie stwierdzono obecności genu odpowiadającego fragmentowi sekwencji peptydu, który udało się poznać dzięki sekwencjonowaniu N-końca badanego peptydu. Ponadto w analizowanych ramach odczytu nie stwierdzono także obecności sekwencji kodującej tzw. 'Listeriabox', która powinna występować w przypadku genu kodującego bakteriocynę aktywną wobec *L. monocytogenes*. Wynik ten wskazuje, że najprawdopodobniej biosynteza badanej substancji peptydowej odbywa się poza-rybosomalnie.

7. Część uzyskanych danych wskazuje, że badana substancja jest bakteriocyną. Jest ona wrażliwa na działanie enzymów proteolitycznych, produkowana jest w późnej fazie logarytmicznego wzrostu lub na początku fazy stacjonarnej szczepu produkcyjnego, wykazuje charakter silnie hydrofobowy oraz jest aktywna względem szczepów blisko spokrewnionych ze szczepem produkcyjnym. Z drugiej jednak strony, przypuszczalny poza-rybosomalny charakter biosyntezy tej substancji sugeruje, że może ona nie być bakteriocyną, ale np. antybiotykiem peptydowym.

W literaturze brak informacji o antybiotykach produkowanych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, natomiast są znane antybiotyki peptydowe produkowane przez bakterie, np. gramicydyna S wytwarzana przez *Bacillus brevis* (Swierstra *et al.* 2016). Z drugiej strony, znane są także przykłady glikozylowanych bakteriocyn (Stepper *et al.* 2011; Ji *et al.* 2015). W celu ustalenia, do której grupy związków antybakteryjnych należy zidentyfikowana substancja, potrzebne są dalsze badania strukturalne, poprzedzone opracowaniem metody otrzymywania homogennego preparatu.

8. W toku badań udało się zrealizować cel badawczy, jakim było zidentyfikowanie potencjalnej bakteriocyny produkowanej przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus* aktywne w stosunku do innych izolatów bakterii z tego samego rodzaju. Ustalono optymalne warunki produkcji peptydu, spektrum jego aktywności i optymalne parametry aktywności przeciwgronkowcowej. Uzyskano wstępne dane strukturalne. W ramach kontynuacji badań, które prowadzone będą w Katedrze planuje się ustalenie kompletnej struktury peptydu. Podobnie jak inne bakteriocyny zidentyfikowany peptyd mógłby znaleźć szereg ciekawych zastosowań, na przykład w medycynie, weterynarii czy do eliminacji gronkowców z produktów żywnościowych. Bez wątpienia, aktualnie istotnym czynnikiem limitującym potencjał zastosowania peptydu jest fakt jego wytwarzania w komórkach bakterii *S. xylosus*. Problem ten można by rozwiązać poprzez opracowanie heterologicznych układów ekspresyjnych umożliwiających jego wydajną produkcję w komórkach bakterii *E. coli*, drożdży *P. pastoris* lub *S. cerevisiae* lub nawet bakterii fermentacji mlekowej, na przykład z gatunku



*Lactobacillus*. Peptyd produkowany w komórkach tych mikroorganizmów nie stanowiłby zagrożenia dla zdrowia pacjentów, czy konsumentów. Substancja zidentyfikowana w czasie badań posiada kilka interesujących właściwości z perspektywy przyszłego zastosowania. Cechuje ją wysoka termostabilność, co jest korzystną cechą pod kątem jej ewentualnego zastosowania w przemyśle spożywczym, gdyż dzięki tej cesze badana substancja powinna zachować trwałość podczas obróbki termicznej żywności. Ponadto, spektrum działania przeciwbakteryjnego badanej substancji również wygląda interesująco. Wykazuje ona wysoką aktywność względem wielu bakterii występujących jako możliwe czynniki infekcyjne żywności, takich jak *L. monocytogenes*, *M. luteus* czy *S. aureus*. Kolejną zaletą wydaje się być fakt, iż obecność *S. xylosum* stwierdzono w kilku rodzajach fermentowanych kiełbas (Cocolin, Dolci and Rantsiou 2011), więc jest to gatunek, który występuje naturalnie w niektórych produktach żywnościowych.

## ZAŁĄCZNIK NR 1

Źródło pochodzenia stosowanych szczepów z rodzaju *Staphylococcus* - znajdujące się w kolekcji Katedry technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej.

1) szczepy *S. aureus* izolowane od bydła zarażonego mastitis znajdujące się w kolekcji Katedry od początku prowadzonych badań (dla tych szczepów wykonano wcześniej antybiogram oraz oznaczanie obecności genu *blaZ* przy pomocy reakcji PCR) - izolaty oznaczone numerami od 1 do 132.

2) szczepy udostępnione przez Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach izolowane od bydła zarażonego mastitis (Jakubczak *et al.* 2007; Kot *et al.* 2012) należące do gatunku *S. epidermidis* oraz *S. xylosus* oznaczone jako:

*S. epidermidis* (16 szczepów): 56(D), 249, 14, 30A, 69A, 266, 63b, M1A, 223, 95(S), 80(S), M7A1, 15(S), 83A, 267, M10B

*S. xylosus* (22 szczepy): 46(B), M2B, 70(B), 247, 18(J), 8(J), 197, 21(J), 49(B), 56(B), 191, 30c1, 44(S), 65C, 50(B), 15(J), 48(B), 8c3, 57C, 64(B), 99C, 58(B)

3) szczepy udostępnione przez Katedrę Mikrobiologii Klinicznej przy Szpitalu Centralnym w Vaxjo w (Szwecja) izolowane od pacjentów z infekcjami ran skórnych oraz tkanek miękkich (Sjölund and Kahlmeter 2008). Wszystkie zostały sklasyfikowane jako *S. aureus* i opisane numerami sz1-sz30. Wszystkie szczepy charakteryzowały się wrażliwością na metycylinę. Dodatkowo przesłano dwa szczepy MRSA opisane jako sz31 oraz sz32 izolowane z ropni skórnych pacjentów leczonych szpitalnie - nie zostały one jednak wykorzystane w badaniach.

4) szczepy udostępnione przez Laboratorium Mikrobiologiczne przy Szpitalu Wojewódzkim w Koszalinie (Polska) izolowane od pacjentów z infekcjami ran skórnych oraz tkanek miękkich. Wszystkie szczepy zostały sklasyfikowane jako *S. aureus*. Zostały opisane jako K1-K18.

## **PODZIĘKOWANIA**

Autor uzyskał środki finansowe na przygotowanie rozprawy doktorskiej z Narodowego Centrum Nauki w ramach finansowania stypendium doktorskiego na podstawie decyzji numer DEC-2014/12/T/NZ9/00534.

Postawione cele badawcze udało się zrealizować dzięki wsparciu Narodowego Centrum Nauki (Grant nr UMO-2012/07/N/NZ9/00939).

## LITERATURA

- Allen HK, Trachsel J, Looft T *et al.* Finding alternatives to antibiotics. *Ann NY Acad Sci* 2014;**1323**:91–100.
- Altena K, Guder A, Cramer C *et al.* Biosynthesis of the Lantibiotic Mersacidin: Organization of a Type B Lantibiotic Gene Cluster. *Appl Environ Microbiol* 2000;**66**:2565–71.
- And HC, Hoover D g. Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2003;**2**:82–100.
- Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC.
- Asaduzzaman SM, Sonomoto K. Lantibiotics: Diverse activities and unique modes of action. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2009;**107**:475–87.
- Bali V, Panesar PS, Bera MB *et al.* Bacteriocins: Recent Trends and Potential Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2014:140813060811009.
- Barbour A, Philip K, Muniandy S. Enhanced Production, Purification, Characterization and Mechanism of Action of Salivaricin 9 Lantibiotic Produced by *Streptococcus salivarius* NU10. *PLoS One* 2013;**8**,
- Bassetti M, Righi E. Safety profiles of old and new antimicrobials for the treatment of MRSA infections. *Expert Opinion on Drug Safety* 2016,
- Bastos M do C de F, Coelho MLV, Santos OC da S. Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology* 2015;**161**:683–700.
- Bastos M do C de F, Coutinho BG, Coelho MLV. Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals (Basel)* 2010;**3**:1139–61.

- Bastos MCF, Ceotto H, Coelho MLV *et al.* Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Current pharmaceutical biotechnology* 2009;**10**:38–61.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L *et al.* *Biochemistry*. 5th ed. W H Freeman, 2002.
- Birri DJ, Brede DA, Forberg T *et al.* Molecular and Genetic Characterization of a Novel Bacteriocin Locus in *Enterococcus avium* Isolates from Infants. *Appl Environ Microbiol* 2010;**76**:483–92.
- Borody TJ, Paramsothy S, Agrawal G. Fecal Microbiota Transplantation: Indications, Methods, Evidence, and Future Directions. *Curr Gastroenterol Rep* 2013;**15**,
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;**72**:248–54.
- Bradley JS. Which antibiotic for resistant Gram-positives, and why? *Journal of Infection* 2014;**68**:S63–75.
- Bukhtiyarova M, Yang R, Ray B. Analysis of the pediocin AcH gene cluster from plasmid pSMB74 and its expression in a pediocin-negative *Pediococcus acidilactici* strain. *Appl Environ Microbiol* 1994;**60**:3405–8.
- Chang S-Y, Chen Y-S, Pan S-F *et al.* Enterocin TW21, a novel bacteriocin from dochi-isolated *Enterococcus faecium* D081821. *J Appl Microbiol* 2013;**115**:673–8.
- Choikhet K, Glatz B, Rozing G. The Physicochemical Causes of Baseline Disturbances in HPLC. *LC• GC Europe* 2003:2.
- Christensen GJM, Brüggemann H. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Beneficial Microbes* 2014;**5**:201–15.
- Claypool L, Heinemann B, Voris L *et al.* Residence Time of Nisin in the Oral Cavity Following Consumption of Chocolate Milk Containing Nisin. *Journal of Dairy Science* 1966;**49**:314–6.

- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF *et al.* Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 2001;**71**:1–20.
- Cocolin L, Dolci P, Rantsiou K. Biodiversity and dynamics of meat fermentations: The contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. *Meat Science* 2011;**89**:296–302.
- Costa SS, Viveiros M, Amaral L *et al.* Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open Microbiol J* 2013;**7**:59–71.
- Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Micro* 2005;**3**:777–88.
- De Vliegher S, Fox LK, Piepers S *et al.* Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of Dairy Science* 2012;**95**:1025–40.
- Deegan LH, Cotter PD, Hill C *et al.* Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 2006;**16**:1058–71.
- Delves-Broughton J. Nisin and its application as a food preservative. *International Journal of Dairy Technology* 1990;**43**:73–6.
- Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ *et al.* Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996;**69**:193–202.
- Diep DB, Skaugen M, Salehian Z *et al.* Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:2384–9.
- Dwidar M, Monnappa AK, Mitchell RJ. The dual probiotic and antibiotic nature of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *BMB Rep* 2012;**45**:71–8.
- Floyd JL, Smith KP, Kumar SH *et al.* LmrS Is a Multidrug Efflux Pump of the Major Facilitator Superfamily from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;**54**:5406–12.

- Fredericks DN, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev* 1996;**9**:18–33.
- Garcia M. The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2005;**825**:111–23.
- Garsa AK, Kumariya R, Sood SK *et al.* Bacteriocin Production and Different Strategies for Their Recovery and Purification. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2014;**6**:47–58.
- Generally Recognized as Safe (GRAS).
- Götz F, Perconti S, Popella P *et al.* Epidermin and gallidermin: Staphylococcal lantibiotics. *International Journal of Medical Microbiology* 2014;**304**:63–71.
- Grintzalis K, Georgiou CD, Schneider Y-J. An accurate and sensitive Coomassie Brilliant Blue G-250-based assay for protein determination. *Analytical Biochemistry* 2015;**480**:28–30.
- Hajipour MJ, Fromm KM, Akbar Ashkarran A *et al.* Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology* 2012;**30**:499–511.
- Hammami R, Fernandez B, Lacroix C *et al.* Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2013;**70**:2947–67.
- Hammami R, Zouhir A, Ben Hamida J *et al.* BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. *BMC Microbiol* 2007;**7**:89.
- Hammami R, Zouhir A, Le Lay C *et al.* BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. *Bmc Microbiology* 2010;**10**:22.
- Hassan M, Kjos M, Nes I f. *et al.* Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J Appl Microbiol* 2012;**113**:723–36.

- Heinrich P, Rosenstein R, Böhmer M *et al.* The molecular organization of the lysostaphin gene and its sequences repeated in tandem. *Mol Gen Genet* 1987;**209**:563–9.
- Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 2008;**15**:639–52.
- Heng NCK, Tagg JR. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nat Rev Micro* 2006;**4**, DOI: 10.1038/nrmicro1273-c1.
- Hennekinne J-A, De Buyser M-L, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews* 2012;**36**:815–36.
- Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M *et al.* The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology* 2001;**9**:486–93.
- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997;**40**:135–6.
- Hühne K, Axelsson L, Holck A *et al.* Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin-negative *Lb. sake* strains. *Microbiology* 1996;**142**:1437–1448.
- Jakubczak A, Szweda P, Łukaszewska K *et al.* Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in the east of Poland on the basis of polymorphism of genes coding protein A and coagulase. *Pol J Vet Sci* 2007;**10**:199–205.
- Jang S. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. *Journal of Microbiology* 2016;**54**:1–8.
- Ji S, Li W, Baloch AR *et al.* Improved production of sublancin via introduction of three characteristic promoters into operon clusters responsible for this novel distinct glycopeptide biosynthesis. *Microb Cell Fact* 2015;**14**,



- Kellner R, Jung G, Hörner T *et al.* Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic. *European Journal of Biochemistry* 1988;**177**:53–9.
- Klaenhammer TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 1988;**70**:337–49.
- Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 1993;**12**:39–85.
- Kot B, Piechota M, Antos-Bielska M *et al.* Antimicrobial resistance and genotypes of staphylococci from bovine milk and the cowshed environment. *Pol J Vet Sci* 2012;**15**:741–9.
- Kumar JK. Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008;**80**:555–61.
- Kurlenda J, Grinholc M. Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases. *Acta Biochim Pol* 2012;**59**:171–84.
- Labrie SJ, El Haddad L, Tremblay DM *et al.* First Complete Genome Sequence of *Staphylococcus xylosus*, a Meat Starter Culture and a Host to Propagate *Staphylococcus aureus* Phages. *Genome Announc* 2014;**2**,
- Lee DG, Lee AY, Kim K-T *et al.* Novel Dammarane-Type Triterpene Saponins from *Panax ginseng* Root. *Chem Pharm Bull* 2015;**63**:927–34.
- Lee H, Churey J, Worobo R. Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *International Journal of Food Microbiology* 2008;**126**:240–4.
- Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 2004;**10**:S122–9.
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine* 1998;**339**:520–32.
- Lowy FD. Secrets of a superbug. *Nature Medicine* 2007;**13**:1418–20.

- Lowy FD. Methicillin-resistant staphylococcus aureus: Where is it coming from and where is it going? *JAMA Intern Med* 2013;**173**:1978–9.
- Manosalva L, Mutis A, Urzúa A *et al.* Antibacterial Activity of Alkaloid Fractions from *Berberis microphylla* G. Forst and Study of Synergism with Ampicillin and Cephalothin. *Molecules* 2016;**21**, DOI: 10.3390/molecules21010076.
- Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H *et al.* Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. *J Infect Dis* 2003;**187**:613–24.
- Netz DJA, Bastos M do C de F, Sahl H-G. Mode of Action of the Antimicrobial Peptide Aureocin A53 from *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 2002;**68**:5274–80.
- Nishie M, Nagao J-I, Sonomoto K. Antibacterial Peptides “Bacteriocins”: An Overview of Their Diverse Characteristics and Applications. *Biocontrol Science* 2012;**17**:1–16.
- Nissen-Meyer J, Nes IF. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol* 1997;**167**:67–77.
- Nissen-Meyer J, Rogne P, Oppegard C *et al.* Structure-Function Relationships of the Non-Lanthionine-Containing Peptide (class II) Bacteriocins Produced by Gram-Positive Bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2009;**10**:19–37.
- O’Connell KMG, Hodgkinson JT, Sore HF *et al.* Combating Multidrug-Resistant Bacteria: Current Strategies for the Discovery of Novel Antibacterials. *Angew Chem Int Ed* 2013;**52**:10706–33.
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M *et al.* Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 2012;**28**:1166–7.
- Otto M. Targeted immunotherapy for staphylococcal infections: focus on anti-MSCRAMM antibodies. *BioDrugs* 2008;**22**:27–36.

- Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Biochemistry* 2015;**84**:577–601.
- Piddock LJV. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006;**19**:382–402.
- Riley MA, Chavan MA eds. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Berlin ; New York: Springer, 2007.
- Rogers LA. THE INHIBITING EFFECT OF *STREPTOCOCCUS LACTIS* ON *LACTOBACILLUS BULGARICUS*. *J Bacteriol* 1928;**16**:321–5.
- Romanova NA, Brovko LY, Moore L *et al*. Assessment of Photodynamic Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by Using ATP Bioluminescence. *Appl Environ Microbiol* 2003;**69**:6393–8.
- Ross RP, Morgan S, Hill C. Preservation and fermentation: past, present and future. *International journal of food microbiology* 2002;**79**:3–16.
- Rossi F, Rizzotti L, Felis GE *et al*. Horizontal gene transfer among microorganisms in food: Current knowledge and future perspectives. *Food Microbiology* 2014;**42**:232–43.
- Sagdic O, Ekici L, Ozturk I *et al*. Cytotoxic and bioactive properties of different color tulip flowers and degradation kinetic of tulip flower anthocyanins. *Food Chem Toxicol* 2013;**58**:432–9.
- dos Santos Nascimento J, Abrantes J, Giambiagi-deMarval M *et al*. Growth conditions required for bacteriocin production by strains of *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2004;**20**:941–947.
- Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987;**166**:368–79.

- Schillinger U, Lücke FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* 1989;**55**:1901–6.
- Schindler CA, Schuhardt VT. LYSOSTAPHIN: A NEW BACTERIOLYTIC AGENT FOR THE STAPHYLOCOCCUS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964;**51**:414–21.
- Schnell N, Entian K-D, Schneider U *et al.* Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. *Nature* 1988;**333**:276–8.
- Shahzadi I, Shah MM. Acylated flavonol glycosides from *Tagetes minuta* with antibacterial activity. *Front Pharmacol* 2015;**6**:195.
- Singh B, Sharma RA. Anti-inflammatory and Antimicrobial Properties of Flavonoids from *Heliotropium subulatum* Exudate. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2016.
- Sjölund M, Kahlmeter G. Staphylococci in primary skin and soft tissue infections in a Swedish county. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2008;**40**:894–8.
- Slatko BE, Albright LM, Tabor S *et al.* DNA Sequencing by the Dideoxy Method. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- Snyder AB, Worobo RW. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *J Sci Food Agric* 2014;**94**:28–44.
- Stepper J, Shastri S, Loo TS *et al.* Cysteine S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. *FEBS Letters* 2011;**585**:645–50.
- Stewart PS, William Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* 2001;**358**:135–8.
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;**45**:649–59.
- Swierstra J, Kapoerchan V, Knijnenburg A *et al.* Structure, toxicity and antibiotic activity of gramicidin S and derivatives. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016;**35**:763–9.

- Szweda P, Kotłowski R, Kur J. New effective sources of the Staphylococcus simulans lysostaphin. *Journal of Biotechnology* 2005;**117**:203–13.
- Szweda P, Schielmann M, Frankowska A *et al.* Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus strains isolated from cows with mastitis in eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: lysostaphin, nisin and polymyxin B. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2014a;**76**:355.
- Szweda P, Schielmann M, Frankowska A *et al.* Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus strains isolated from cows with mastitis in eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: lysostaphin, nisin and polymyxin B. *J Vet Med Sci* 2014b;**76**:355–62.
- Szweda P, Schielmann M, Kotłowski R *et al.* Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against Staphylococcus aureus. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;**96**:1157–74.
- Tang SS, Apisarnthanarak A, Hsu LY. Mechanisms of  $\beta$ -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2014;**78**:3–13.
- Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control* 2006;**34**:S3–10.
- Thabit AK, Crandon JL, Nicolau DP. Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2015;**16**:159–77.
- Vijay Simha B, Sood SK, Kumariya R *et al.* Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCD 273 suitable for industrial application. *Microbiological Research* 2012;**167**:544–9.
- Walls D, Loughran ST eds. *Protein Chromatography: Methods and Protocols*. New York, N.Y: Humana Press, 2011.

- Weigel LM, Clewell DB, Gill SR *et al.* Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 2003;**302**:1569–71.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 1991;**173**:697–703.
- World Health Organization ed. *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2014.
- Yang S-C, Lin C-H, Sung CT *et al.* Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol* 2014;**5**, DOI: 10.3389/fmicb.2014.00241.
- Zazo H, Colino CI, Lanao JM. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *Journal of Controlled Release* 2016;**224**:86–102.
- Zecconi A, Scali F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunology Letters* 2013;**150**:12–22.
- Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM *et al.* A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. *Science* 2001;**291**:1962–5.
- Zorn H, Czermak P eds. *Biotechnology of Food and Feed Additives*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014.

## DOROBEK NAUKOWY

### 1. Publikacje

#### 1.1. Artykuły w czasopismach z listy JCR

- 04.2014 Szweda P., Gorczyca G., Filipkowski P., Zalewska M., Milewski S (2014) Efficient production of *Staphylococcus simulans* lysostaphin in a benchtop bioreactor by recombinant *Escherichia coli*. Prep Biochem Biotechnol 44(4);370-381
- 03.2014 Szweda P., Schielmann M., Frankowska A., Kot B., Zalewska M. (2013) Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: lysostaphin, nisin and polymixin B. J Vet Med Sci 76(3):355-62
- 10.2012 Szweda P., Schielmann M., Kotłowski R., Gorczyca G., Zalewska M., Milewski S. (2012) Peptidoglycan hydrolases – potential weapon against *Staphylococcus aureus*. Appl Microbiol Biotechnol 96:1157–1174

#### 1.2. Artykuły w recenzowanych wydawnictwach zbiorowych

- 10.2014 Zalewska M. (2014) Zastosowanie bakteriocyn - peptydów o aktywności bakteriobójczej. Dokonania młodych naukowców 104-106, nr 5, ISSN 2300-4436
- 10.2013 Zalewska M. (2013) DIAGMOL 2013 XIV Conference on 'MOLECULAR BIOLOGY IN DIAGNOSTIC ON INFECTIOUS DISEASES AND BIOTECHNOLOGY' In memory of professor Hilary Koprowski – "Bacteriophages as an antistaphylococcal agent", 152-154; ISBN 978-83-7583-510-6
- 09.2013 Zalewska M. (2013) NOWE TRENDY W NAUKACH PRZYRODNICZYCH – 'Możliwość wykorzystania bakteriocyn i olejków eterycznych jako nieantybiotykowych chemoterapeutyków przeciwgronkowcowych', Creative Science – Monografia 2013, 101-109; ISBN 978-83-63058-31-9

### 2. Patenty i zgłoszenia patentowe:

- 2013 Gorczyca G., Szweda P., Tylingo R., Sadowska M., Milewski S., Zalewska M. The method of obtaining the aqueous solution of chitosan composition, chitosan aerosol, the method of producing the chitosan hydrogel membrane and the method of producing chitosan-protein biopolymer material. Patent application nr PCT/PL2013/000085
- 26.04.2013 Gorczyca G., Szweda P., Tylingo R., Sadowska M., Milewski S., Zalewska M. Kompozycja chitozanowa i sposób wytwarzania hydrożelowej membrany chitozanowej. Zgłoszenie patentowe nr P.403697  
**Patent udzielony - 19.01.2016**
- 31.07.2013 Gorczyca G., Szweda P., Tylingo R., Sadowska M., Milewski S., Zalewska M. 'Sposób wytwarzania biomateriału na bazie chitozanu i polimerów białkowych, biomateriał chitozanowo-białkowy'. Zgłoszenie patentowe nr P.400078  
**Patent udzielony - 08.12.2015**

### 3. Granty:

- 10.2013-03.2016 **Grant PRELUDIUM (NCN)**  
'Próba identyfikacji szczepów produkujących bakteriocyny z populacji bakterii z rodzaju *Staphylococcus* izolowanych z gruczołów mlekowych krów z mastitis'. – 123 500 PLN – kierownik projektu
- 10.2011-09.2013 **Grant finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Polska)**  
'Otrzymywanie bakteriocyn gronkowcobójczych: aureocyny A53 i lizostafiny w heterologicznych układach ekspresyjnych oraz próba ich wykorzystania do otrzymywania polimerowych materiałów bioaktywnych' - wykonawca

### 4. Stypendia:

- 11.2015 **Stypendium "InterPhD"**  
roczne stypendium przyznane ze środków przyznanych Uczelni przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego na 'Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii (Project No: POKL.04.01.01-00-368/09)
- 09.2014 **Stypendium "ETIUDA"**  
grant przyznany przez Narodowe Centrum Nauki na stypendium doktorskie oraz staż w zagranicznym ośrodku naukowym (Grant No: UMO-2014/12/T/NZ9/00534)
- 02.2014 **Stypendium "INNOdoktorant"**  
stypendium przyznawane przez Marszałka Województwa Pomorskiego
- 05.2013 **Founded scientific internship (to Cornell University)**  
scholarship founded by Grant from Polish Ministry of Science and Higher Education for The development of interdisciplinary doctoral studies at the Gdansk University of Technology in modern technologies (Project No: POKL.04.01.01-00-368/09)

### 5. Inne:

- 13-17.05.2015 **konferencja naukowa - 'Biomolecules and Nanostructures 5' (Jaroszwice koło Krakowa, Poland)**  
- prezentacja posteru - 'Isolation and characterization of novel bacteriocin with antistaphylococcal activity (Magdalena Zalewska, Piotr Szweda, Sławomir Milewski, Randy W. Worobo)';
- 25-27.05.2014 **Konferencja naukowa - 'From Computational Biophysics to System Biology (CBSB 2014)' (Gdańsk, Poland)**  
- prezentacja posteru - 'De novo protein folding simulation of bacteriocins in UNRES force field (Zalewska M., Wirecki T., Szweda P., Worobo R., Milewski S.)';



- 25-27.05.2014 **konferencja naukowa - "From Computational Biophysics to System Biology (CBSB 2014)" (Gdańsk, Poland)**  
- organizacja konferencji
- 25-27.04.2014 **konferencja naukowa - 'WPŁYW MŁODYCH NAUKOWCÓW NA OSIĄGNIĘCIA POLSKIEJ NAUKI'(Gdańsk, Poland)**  
- prezentacja posteru - 'Bakteriocyny - białka o aktywności bakteriobójczej (Magdalena Zalewska, Piotr Szweda, Sławomir Milewski)'
- 30.10-02.11.2013 **International Trade Fair 'Ideas-Inventions-New Products' IENA 2013 (Norymberga)**  
srebrny medal – 'Biopolymer material for medical and cosmetic applications' (Gorczyca G., Tylingo R., Szweda P., Milewski S., Sadowska M., Zalewska M.)
- 19.10.2013 **konferencja naukowa- DIAGMOL 2013 XIV Conference on 'MOLECULAR BIOTECHNOLOGY IN DIAGNOSTIC OF INFECTIOUS DISEASES AND BIOTECHNOLOGY' In Memory of Professor Hilary Koprowski (SGGW, Warszawa, Poland)**  
- prezentacja posteru – 'Bacteriophages as an antistaphylococcal agent (Zalewska M., Szweda P., Milewski S., Gorczyca G.)'
- 15.05.2013 **konferencja naukowa- 31<sup>st</sup> Annual Chemistry Graduate Symposium, Department of Chemistry, University at Buffalo, Buffalo, USA**  
- prezentacja posteru – 'Essential oils as a potential weapon against bacterial infection (Zalewska M., Szweda P., Milewski S., Gorczyca G.)'
- 12.04.2013 **konferencja naukowa– 'Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki – IV edycja' – panel nowe trendy w naukach przyrodniczych (Gdańsk, Poland)**  
- prezentacja posteru– 'Zastosowanie olejków eterycznych jako środka o działaniu bakteriobójczym (Zalewska M., Szweda P., Milewski S.)'
- 02-05.04.2013 **XVI Moscow International Salon of Inventions and Innovations Technologies 'Archimedes' (Moskwa, Rosja)**  
- złoty medal - 'Biopolymer material for medical and cosmetic applications' (Gorczyca G., Tylingo R., Szweda P., Milewski S., Sadowska M., Zalewska M.)
- 22-23.10.2102 **Konferencja naukowa – 'Bioinnovation Internetalional Summit 2012' (Gdańsk, Poland)**  
- prezentacja posteru – 'Anti-Staphylococcal protein expression – optimization of culture parameters values in BIOREACTOR (Gorczyca G., Szweda P., Filipkowski P., Tylingo R., Zalewska M.)'