

BARTŁOMIEJ DZIUBA

## **IDENTYFIKACJA WYBRANYCH GATUNKÓW I PODGATUNKÓW BAKTERII Z RODZAJU *LACTOCOCCUS* Z ZASTOSOWANIEM SPEKTROSKOPII FTIR I SZTUCZNYCH SIECI NEURONOWYCH**

### **S t r e s z c z e n i e**

Podjęto badania nad wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) oraz sztucznych sieci neuronowych do identyfikacji bakterii z rodzaju *Lactococcus* na poziomie gatunku i podgatunku. Do selekcji widm FTIR badanych szczepów bakterii i poszerzenia biblioteki widm zastosowano, opracowaną wcześniej, własną metodę pomiaru widm FTIR i strategię ich analizy. Badaniami objęto 7 szczepów referencyjnych bakterii fermentacji mlekojowej z rodzaju *Lactococcus*, pochodzących z Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) oraz 88 szczepów wyizolowanych z produktów żywnościowych. Szczepy bakterii z rodzaju *Lactococcus* izolowano z mleka surowego i fermentowanych produktów mleczarskich.

Zgromadzone w bibliotece widma FTIR badanych szczepów bakterii zostały użyte do opracowania sztucznych sieci neuronowych. Użytkowa wartość sieci neuronowych została ustalona na podstawie wyników identyfikacji szczepów referencyjnych oraz szczepów wyizolowanych z produktów żywnościowych, których przynależność gatunkową określono na podstawie badań PCR z wykorzystaniem specyficznych gatunkowo primerów. Zastosowanie sztucznych sieci neuronowych do analizy widm FTIR umożliwiło w 90 % poprawnie zidentyfikować bakterie z rodzaju *Lactococcus*, należące do określonego gatunku.

**Słowa kluczowe:** *Lactococcus*, spektroskopia FTIR, sztuczne sieci neuronowe

### **Wprowadzenie**

Poprawność identyfikacji bakterii na różnych poziomach takonomicznych jest ważna w diagnostyce mikrobiologicznej. W ostatnich dwóch dekadach rozwinięto wiele metod identyfikacji mikroorganizmów, w tym metod z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). Pionierska okazała się praca Naumanna i wsp. [13], w której zaproponowano rozpatrywanie widm FTIR bakterii jako obrazu daktuloskopowego. Spektra FTIR bakterii są specyficzne dla danego szczepu i przedstawiają charakterystykę wszystkich jego składników komórkowych,

---

*Dr inż. B. Dziuba, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn*

takich jak: kwasy tłuszczone, membranowe i wewnętrzkomórkowe białka, polisacharydy oraz kwasy nukleinowe [10]. Różnice pomiędzy spekrami różnych mikroorganizmów są trudne do zaobserwowania, dlatego do ich analizy konieczne jest zastosowanie metod statystycznych. Z klasycznych metod statystycznych nienadzorowanych najczęściej są wykorzystywane hierarchiczna analiza skupień (HCA – Hierarchical Cluster Analysis) [12], a z nadzorowanych analiza dyskryminacyjna (DA – Discriminant Analysis), analiza funkcji dyskryminacyjnej (DFA – Discriminant Function Analysis) oraz analiza zmiennych kanonicznych (CVA – Canonical Variate Analysis) [1, 11, 16]. Wyniki identyfikacji bakterii przy zastosowaniu metod nadzorowanych są porównywalne do uzyskiwanych metodami bez nadzoru.

Lepsze wyniki identyfikacji bakterii można uzyskać, stosując sztuczne sieci neuronowe (ANN – Artificial Neural Networks) [3, 4, 8, 9, 18, 20]. Prawidłowo wyuczone sieci neuronowe charakteryzują się dużą elastycznością działania, która umożliwia poprawne rozpoznawanie nawet niewielkich różnic pomiędzy widmami przy jednoczesnym wykluczeniu błędów systematycznych, takich jak szумy czy zmiany linii podstawowej. Ich zaletą jest zdolność do zapamiętywania oraz uogólniania wiedzy na podstawie reprezentatywnej grupy przykładów [17]. Wyuczone, gotowe w każdej chwili do zastosowania „symulatory” (sztuczne sieci neuronowe) umożliwiają identyfikację badanych mikroorganizmów na różnych poziomach taksonomicznych.

W poprzednich pracach [5, 6, 7] przedstawiono metodę pomiaru widm FTIR oraz strategię ich analizy z wykorzystaniem sztucznych sieci neuronowych do identyfikacji rodzaju bakterii fermentacji mlekojowej i propionowej. Wykazano, że najlepsze wyniki różnicowania i identyfikacji szczepów badanych bakterii otrzymuje się na podstawie pierwszych pochodnych kombinacji widm z zakresów obszaru polisacharydów, daktuloskopowego i mieszanego.

Celem przeprowadzonych badań było rozwinięcie istniejącej biblioteki widm FTIR bakterii fermentacji mlekojowej i propionowej oraz opracowanie metody identyfikacji bakterii z rodzaju *Lactococcus* wyizolowanych z produktów żywnościowych przy wykorzystaniu spektroskopii FTIR oraz sztucznych sieci neuronowych.

### **Materiał i metody badań**

Materiał do badań stanowiły szczepy referencyjne bakterii fermentacji mlekojowej z rodzaju *Lactococcus* (7 szczepów), pochodzące z Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (tab. 1) oraz 88 szczepów wyizolowanych z produktów żywnościowych. Hodowlę szczepów bakterii z rodzaju *Lactococcus* prowadzono  $48 \pm 2$  h na podłożu M17 (Merck) w temp. 30 °C.

T a b e l a 1

Lista szczepów referencyjnych.

List of reference strains.

Nazwa gatunkowa / Name of species	Szczepy / Strains
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> (T)	DSMZ 20069
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	DSMZ 4367
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (T)	DSMZ 20481
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	DSMZ 4366
<i>Lactococcus raffinolactis</i> (T)	DSMZ 20443
<i>Lactococcus plantarum</i> (T)	DSMZ 20686
<i>Lactococcus plantarum</i>	DSMZ 20687

**Izolacja szczepów bakterii z rodzaju *Lactococcus* z produktów żywnościowych**

Szczepy bakterii z rodzaju *Lactococcus* izolowano z mleka surowego i fermentowanych produktów mleczarskich zgodnie z metodyką opisaną przez Warmińską-Radyko i Łaniewską-Trockenheim [19].

**Izolacja genomowego DNA i amplifikacja specyficznych fragmentów DNA metodą PCR**

Do izolacji DNA wykorzystywano 48-godzinne hodowle szczepów bakterii. Niewielką ilość biomasy bakteryjnej (1-3 kolonie) pobranej oczkiem ezy z powierzchni podłoża zawieszano w 100 µl 10 mM buforu TRIS-HCl (pH 8,0) i trawiono lizozymem (5 µl roztworu o stężeniu 10 mg/ml) w temp. 37 °C przez 1,5 h. Izolację genomowego DNA prowadzono z wykorzystaniem gotowego zestawu Genomic Mini firmy A@A Biotechnology (Gdańsk, Polska) według zaleceń producenta. Identyfikację szczepów metodą PCR z zastosowaniem specyficznych gatunkowo i podgatunkowo par primerów prowadzono zgodnie z metodyką przedstawioną przez Pu i wsp. [15].

**Przygotowanie próbek do pomiaru widm FTIR**

W celu przygotowania próbki do pomiaru FTIR pobierano niewielką ilość komórek bakterii (150 - 300 µg s.s.) przy użyciu ezy z powierzchni płytki agarowej, a następnie zawieszano w 200 µl soli fizjologicznej. Próbkę w ilości 200 µl równomiernie rozprowadzano na powierzchni szkiełka ZnSe i suszono 30 min w temp. 55 °C (do uzyskania przezroczystego filmu). Z każdego szczepu przygotowywano po trzy próbki z trzech niezależnych hodowli (9 próbek). W przypadku szczepów referencyjnych wykonano po 30 widm FTIR każdego szczepu.

### **Pomiary spektroskopowe – operacje na widmach**

Pomiary spektroskopowe próbek bakterii wykonywano metodą transmisji w zakresie długości fali od  $4000\text{ cm}^{-1}$  do  $500\text{ cm}^{-1}$  z użyciem spektrofotometru FTIR (Perkin-Elmer) wyposażonego w rozdzielacz wiązki (KBr) oraz detektor DTGS (Deuterated TriGlycerine Sulfate). Każda próbka była skanowana 64 razy przy rozdzielczości  $4\text{ cm}^{-1}$  i szybkości skanera  $0,2\text{ cm/s}$ . Pomiar widma tła prowadzono w obecności pustego okienka ZnSe. Wszystkie operacje na widmach wykonywano przy użyciu oryginalnego oprogramowania Spectrum One 3.01.00 (Perkin Elmer) oraz zapisywano w formacie ASCII, kompatybilnym z oprogramowaniem Exel (Microsoft) oraz Statistica (StatSoft Polska) [5].

### **Statystyczna ocena danych spektralnych**

Znormalizowane widma FTIR bakterii przenoszono do programu Statistica (StatSoft) w celu przeprowadzenia „testu jakości”. W teście tym uwzględniano poziomy powtarzalności PP1 oraz PP2 obliczane pomiędzy pierwszymi pochodnymi widm w zakresie od  $1500\text{ cm}^{-1}$  do  $900\text{ cm}^{-1}$ . Do analizy danych przy wykorzystaniu sztucznych sieci neuronowych wybierano tylko te widma, których współczynniki korelacji Pearsona wyznaczone w odniesieniu do PP1 wynosiły powyżej 0,999, a PP2 powyżej 0,990. Następnie opracowywano dane (widma podstawowe, ich pierwsza i druga pochodna) z całego zakresu widma ( $4000\text{ cm}^{-1}$  -  $700\text{ cm}^{-1}$ ) oraz z poszczególnych pięciu zakresów spektralnych i ich kombinacji.

### **Budowa uczenie i weryfikacja sztucznych sieci neuronowych**

Szczegóły dotyczące struktury budowanych sztucznych sieci neuronowych zostały opisane we wcześniejszej pracy [4]. Perceptrony wielowarstwowe wykorzystane w pracy miały strukturę trójwarstwową. W procesie uczenia zastosowano algorytm wstecznej propagacji błędu lub algorytm gradientów sprzężonych. Sieci o radialnych funkcjach bazowych wykorzystane w pracy miały strukturę trójwarstwową. Proces uczenia składał się z trzech etapów: określenia centrów radialnych metodą k-srednich, określenia odchyleń radialnych metodą k-sasiadów oraz wyznaczenia wartości wag neuronów wyjściowych metodą pseudoinwersji.

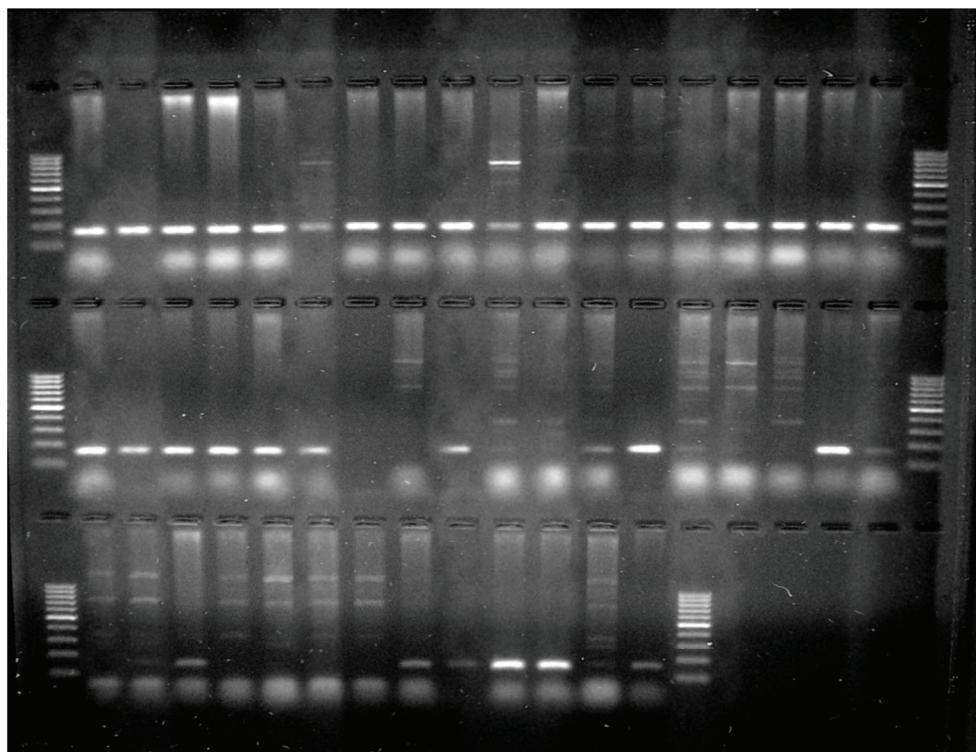
Wszystkie sieci neuronowe uczone były na podstawie widm FTIR bakterii referencyjnych do momentu uzyskania błędu mniejszego niż 0,05 dla zbioru uczącego i weryfikacyjnego. W kolejnych etapach badań wykorzystywano tylko te sieci neuronowe, które poprawnie identyfikowały bakterie w etapie poprzednim. Poprawność identyfikacji bakterii wyizolowanych ze środowiska weryfikowano stosując metody biologii molekularnej (PCR).

## Wyniki i dyskusja

Badania dotyczące identyfikacji bakterii z rodzaju *Lactococcus* na poziomie gatunku i podgatunku z zastosowaniem spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera i sztucznych sieci neuronowych przeprowadzono zgodnie z przyjętą strategią badawczą [4].

Podstawowym zadaniem, związanym z zastosowaniem spektroskopii FTIR było określenie powtarzalności pomiarów i możliwości ich porównywania w dłuższym okresie. Wiązało się to z koniecznością uwzględnienia zmienności mikroorganizmów, eksperymentalnych artefaktów oraz zaburzeń w działaniu aparatu. W celu określenia jakości uzyskiwanych widm FTIR bakterii, konieczne było zastosowanie miary ilościowej. W pracy wykorzystano, zaproponowany przez Naumana i wsp. [13], współczynnik różnicowania  $D$ , obliczany na podstawie współczynników korelacji Pearsona. Adaptacja i rozwinięcie metodyki pomiaru widm FTIR badanych bakterii wymagało oceny wpływu ilości naniesionej biomasy oraz temperatury i czasu hodowli bakterii na jakość (powtarzalność) widm FTIR. Sposób przygotowania próbki do pomiaru miał niewielki wpływ na jakość uzyskanych widm. Jakość widm próbek bakterii nanoszonych w różnych ilościach, wyrażona wartością współczynnika  $D$ , była porównywalna, ale zależna od badanego zakresu widma. Przyjmując za Naumannem i wsp. [14], że widma są nierozróżnialne, jeśli wartość współczynnika  $D$  (obliczona pomiędzy I pochodnymi widm w zakresie  $4000 \text{ cm}^{-1} - 500 \text{ cm}^{-1}$ ) wynosi poniżej 10, można stwierdzić, że ilość pobranej próbki nie wpływała istotnie na jakość uzyskiwanych widm. Aby jednak ograniczyć negatywny wpływ czynników zależnych od ilości próbki, do pomiarów pobierano taką ilość przygotowanej zawiesiny komórek bakterii, aby wartość absorbancji w obszarze amidów I- i II-rzędowych mieściła się w zakresie 0,3 - 0,9. Analiza uzyskanych widm FTIR wykazała, że najlepsze wyniki uzyskuje się prowadząc hodowlę w ciągu 48 h i w temp. 30 °C, czyli optymalnej dla danego szczepu bakterii. Wyniki te potwierdzają spostrzeżenia Curk i wsp. [2]. Stwierdzili oni, że czas i temperatura hodowli bakterii nie zawsze mają tak istotny wpływ na jakość uzyskiwanych widm FTIR, jak można byłoby się spodziewać. Jednocześnie zasugerowali, że lepiej jest zachować takie same warunki, aby zwiększyć powtarzalność pomiarów, a tym samym ułatwić różnicowanie szczepów bakterii na podstawie widm FTIR.

Oceniając wpływ warunków hodowli bakterii oraz sposobu przygotowania próbki na jakość widm FTIR bakterii rozpatrzone dwa „poziomy” powtarzalności pomiarów. W pracy obliczone zostały dwa poziomy powtarzalności. Poziom PP1, opisuje powtarzalność pomiarów widm FTIR próbek przygotowanych z jednej i tej samej zawiesiny komórek bakterii, poziom PP2 opisuje powtarzalność pomiarów widm FTIR próbek przygotowanych z zawiesin komórek niezależnych hodowli tego samego szczepu bakterii. Praktyczne znaczenie dla wykonywanych pomiarów miał poziom powtarzalności



Rys. 1. Elektroforogram produktów PCR uzyskanych ze specyficznymi primerami LacreR i LacF (produkt dla *L. lactis* subsp *lactis*, 162 bp, ścieżki 2-27) oraz LacreR i CreF (produkt dla *L. lactis* subsp *cremoris*, 162 bp, ścieżki 29-54). Ścieżki: 1, 20, 21, 40, 41 i 55 – marker masowy O'GeneRuler 100bp DNA Ladder; 2 – szczep ID 280; 3 – szczep ID 320; 4 – szczep ID 282; 5 – szczep ID 285; 6 – szczep ID 288; 7 – szczep ID 318; 8 – szczep ID 291; 9 – szczep ID 292; 10 – szczep ID 296; 11 – szczep ID 323; 12 – szczep ID 298; 13 – szczep ID 299; 14 – szczep ID 301; 15 – szczep ID 319; 16 – szczep ID 304; 17 – szczep ID 305; 18 – szczep ID 307; 19 szczep ID 309; 22 – szczep ID 310; 23 – szczep ID 311; 24 – szczep ID 324; 25 – szczep ID 325; 26 – szczep ID 315; 27 – szczep ID 326; 29 – szczep ID 280; 30 – szczep ID 281; 31 – szczep ID 282; 32 – szczep ID 285; 33 – szczep ID 322; 34 – szczep ID 289; 35 – szczep ID 291; 36 – szczep ID 292; 37 – szczep ID 296; 38 – szczep ID 297; 39 – szczep ID 298; 42 – szczep ID 299; 43 – szczep ID 301; 44 – szczep ID 303; 45 – szczep ID 304; 46 – szczep ID 305; 47 – szczep ID 307; 48 – szczep ID 309; 49 – szczep ID 310; 50 – szczep ID 311; 51 – szczep ID 313; 52 – szczep ID 314; 53 – szczep ID 315; 54 – szczep ID 321.

Fig 1. Electropherogram of PCR products obtained using specific LacreR and LacF primers (product for *L. lactis* ssp. *Lactis*, 162 bp, lines 2-27) and LacreR and CreF primers (product for *L. lactis* ssp. *Cremoris*, 162 bp, lines 29-54). Lines: 1, 20, 21, 40, 41, and 55 – mass marker: O'GeneRuler 100bp DNA Ladder; 2 – strain ID 280; 3 – strain ID 320; 4 – strain ID 282; 5 – strain ID 285; 6 – strain ID 288; 7 – strain ID 318; 8 – strain ID 291; 9 – strain ID 292; 10 – strain ID 296; 11 – strain ID 323; 12 – strain ID 298; 13 – strain ID 299; 14 – strain ID 301; 15 – strain ID 319; 16 – strain ID 304; 17 – strain ID 305; 18 – strain ID 307; 19 strain ID 309; 22 – strain ID 310; 23 – strain ID 311; 24 – strain ID 324; 25 – strain ID 325; 26 – strain ID 315; 27 – strain ID 326; 29 – strain ID 280; 30 – strain ID 281; 31 – strain ID 282; 32 – strain ID 285; 33 – strain ID 322; 34 – strain ID 289; 35 – strain ID 291; 36 – strain ID 292; 37 – strain ID 296; 38 – strain ID 297; 39 – strain ID 298; 42 – strain ID 299; 43 – strain ID 301; 44 – strain ID 303; 45 – strain ID 304; 46 – strain ID 305; 47 – strain ID 307; 48 – strain ID 309; 49 – strain ID 310; 50 – strain ID 311; 51 – strain ID 313; 52 – strain ID 314; 53 – strain ID 315; 54 – strain ID 321.

PP2, pomimo że w wielu przypadkach był on wielokrotnie niższy niż poziom PP1. Na podstawie analizy wartości współczynników *D* dokonano wyboru widm FTIR badanych bakterii, z których utworzono bibliotekę widm.

Najlepsze wyniki różnicowania i identyfikacji badanych szczeprów bakterii z rodzaju *Lactococcus* na poziomie gatunku i/lub podgatunku uzyskano w odniesieniu do pierwszych pochodnych widm FTIR w kombinacji obszarów W4xW5xW3, a więc kolejno obszaru polisacharydów ( $1200\text{ cm}^{-1}$  –  $900\text{ cm}^{-1}$ ), obszaru daktyloskopowego ( $900\text{ cm}^{-1}$  –  $700\text{ cm}^{-1}$ ) i obszaru mieszanego ( $1500\text{ cm}^{-1}$  –  $1200\text{ cm}^{-1}$ ). Spostrzeżenia te są w dużej mierze zgodne z wynikami badań innych autorów w odniesieniu do bakterii fermentacji mlekoowej [2]. Najbardziej ogólne wnioski przedstawili Mariey i wsp. [12].

T a b e l a 2

Zbiór najlepszych sztucznych sieci neuronowych, zastosowanych do identyfikacji gatunku i podgatunku bakterii z rodzaju *Lactococcus*.

Set of best artificial neural networks applied to identify species and sub-species of *Lactococcus* genus.

Zakres widma Spectrum range	Typ sieci Network type	Liczba neuronów Number of neurons		Błąd zbioru * Error*			Jakość ** Quality**				Liczba epok No. of epochs
		Wejściowe Inlet	Ukryte Hidden	1	2	3	1	2	3	4	
W5W4W3W2	MLP	212	36	0,01	0,03	0,12	1,00	1,00	1,00	0,80	$6,7 \times 10^2$
W5W4W3	MLP	36	37	0,02	0,03	0,11	1,00	1,00	1,00	0,74	$1,5 \times 10^2$
W5W4W3	MLP	181	39	0,01	0,02	0,05	1,00	1,00	1,00	0,75	$2,2 \times 10^2$
$4000\text{cm}^{-1}$ – $500\text{cm}^{-1}$	MLP	100	27	0,01	0,03	0,03	1,00	1,00	1,00	0,74	$2,3 \times 10^2$
W5W4W3	MLP	760	33	0,00	0,02	0,02	1,00	1,00	1,00	0,88	$2,8 \times 10^2$
W5W4W3	MLP	100	27	0,01	0,04	0,02	1,00	1,00	1,00	0,89	$1,9 \times 10^2$
W5W4W3	MLP	228	35	0,00	0,02	0,01	1,00	1,00	1,00	0,90	$1,2 \times 10^2$
W5W4W3	MLP	760	33	0,02	0,03	0,04	1,00	1,00	1,00	0,84	$3,6 \times 10^2$
W5W4W3W2	PNN	1011	72	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,76	-

\* – Błąd zbioru: / Error of : 1 – uczącego / learning set; 2 – walidacyjnego / validation set; 3 – testowego / testing set;

\*\* – Jakość: / Quality of: 1 – uczenia / learning; 2 – walidacji / validation; 3 – testowania 1 / testing 1; 4 – testowania 2 / testing 2.

Weryfikację użytkowej wartości sieci do identyfikacji gatunków i podgatunków bakterii *Lactococcus* przeprowadzono na podstawie widm 7 szczeprów referencyjnych, a następnie widm 88 szczeprów, których przynależność gatunkową określono stosując metodę PCR z wykorzystaniem specyficznych gatunkowo primerów. Zidentyfikowano 60 szczeprów jako *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, 12 szczeprów jako *Lactococcus lactis*

*ssp. cremoris*, 8 szczepów jako *Lactococcus raffinolactis* i 2 jako *Lactococcus plantarum*). W przypadku 6 szczepów *Lactococcus lactis* nie udało się ustalić podgatunku (ID 136, ID 137, ID 181, ID 182, ID 184, ID 185). Na rys. 1. przedstawiono przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR z wykorzystaniem specyficznych podgatunkowo par primerów (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*). W przypadku próbki DNA wyizolowanej ze szczepu o ID 289 (Iz 21) otrzymano specyficzny produkt amplifikacji dla *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* i *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Po ponownej izolacji szczepów i DNA oraz reakcji PCR, szczep o ID 289 (Iz 21) zidentyfikowano jako *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, a nowy izolat o ID 321 (Iz 56) jako *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Podobną procedurę prowadzono ze wszystkimi niejednoznaczonymi wynikami.

Wszystkie testowane sieci neuronowe opracowane zostały na podstawie I pochodnych widm FTIR bakterii. W efekcie poszukiwania zmiennych wejściowych, struktury sieci oraz ich uczenia, wybrane zostały najlepsze sztuczne sieci neuronowe (tab. 2). Zastosowano dwa typy sztucznych sieci neuronowych: perceptrony wielowarstwowe (MLP – Multilayer Perceptrons) i sieci probabilistyczne (PNN – Probabilistic Neural Networks). Przedstawione sztuczne sieci neuronowe poprawnie zidentyfikowały wszystkie szczepy referencyjne ze zbioru testowego I, natomiast bakterie ze zbioru testowego II zostały poprawnie zidentyfikowane w zakresie od 74 % do 90 %. Najlepsze rezultaty uzyskano w przypadku zastosowania sieci MLP wyuczonej na podstawie wybranych zmiennych (liczba neuronów wejściowych – 228, liczba neuronów ukrytych – 35) z kombinacji obszarów widm: W5xW4xW3. Spośród wyizolowanych z produktów spożywczych 88 szczepów sieć jednoznacznie, poprawnie określiła gatunek i/lub podgatunek 78 szczepów (tab. 3). Pięć szczepów (ID 136, ID 167, ID 297, ID 304, ID 316) zostało błędnie sklasyfikowanych. Szczep *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 (ID 136) został sklasyfikowany jako *L. raffinolactis*, szczep *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* 3 (ID 167) został zidentyfikowany jako *L. raffinolactis*, szczep *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* Iz28 (ID 297) jako *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, szczep *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (ID 304) jako *Lactococcus plantarum*, szczep *Lactococcus raffinolactis* Iz 51 (ID 316) jako *Lactococcus plantarum*. Sześć szczepów *L. lactis*, dla których nie udało się ustalić podgatunku (ID 136, ID 137, ID 181, ID 182, ID 184, ID 185), zostało sklasyfikowanych poprawnie, za wyjątkiem wcześniej opisanego *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 (ID 136) (sieć nadała im dodatkowo podgatunek). W przypadku 5 szczepów sieć nie była w stanie jednoznacznie określić gatunku. Biorąc pod uwagę neuron zwycięski, szczepy: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C35 (ID 126), *Lactococcus raffinolactis* 56(1) (ID 133) i *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Iz 58 (ID 323) zostały źle sklasyfikowane, natomiast *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* Iz47 (ID 313) i *Lactococcus raffinolactis* 44(1) (ID 138) poprawnie. Sumarycznie spośród 88 szczepów 80 zostało poprawnie sklasyfikowanych, co w przypadku omawianej, najlepszej sztucznej

sieci neuronowej stanowi ponad 90 %. Wynik ten można poprawić poprzez zwiększenie liczby szczepów, najlepiej o tzw. szczepy typowe. Związane z tym byłoby jednoczesne zwiększenie liczby przypadków uczących, a tym samym zapobieżenie możliwości przeuczenia sieci [17].

T a b e l a 3

Identyfikacja gatunku i podgatunku bakterii z rodzaju *Lactococcus* przez sieć MLP (228:35:4).

Identification of bacteria species and sub-species of *Lactococcus* genus as judged by MLP (228:35:4).

ID	Identyfikacja PCR PCR typing	Szczep Strain	Typowanie Typing	Odpowiedź Answer	Błąd Error	Aktywacja na wejściu Activation on entry			
						* <i>Llsl</i>	<i>Llsc</i>	<i>Lp</i>	<i>Lr</i>
126	<i>Lactococcus l. s. l.</i>	C35	?	?	0,36	0,81	0,41	0,12	0,00
127	<i>Lactococcus l. s. l</i>	4	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
128	<i>Lactoccocus r.</i>	55	<i>Lr</i>	Poprawnie Correct	0,14	0,00	0,00	0,07	0,72
129	<i>Lactococcus l. s. l</i>	55/2	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
130	<i>Lactococcus l. s. l</i>	5	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
131	<i>Lactococcus l. s. l</i>	53/2	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
132	<i>Lactococcus l. s. l</i>	67/2	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
133	<i>Lactococcus r.</i>	56/1	?	?	0,45	0,98	0,00	0,00	1,00
135	<i>Lactococcus r.</i>	T68	<i>Lr</i>	Poprawnie Correct	0,16	0,29	0,00	0,00	0,81
136	<i>Lactococcus l.</i>	1	<i>L.r.</i>	Błędnie False	0,65	0,01	0,00	0,00	0,98
137	<i>Lactococcus l.</i>	3	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,08	1,00	0,00	0,00	0,00
138	<i>Lactococcus r.</i>	44/1	?	?	0,27	0,47	0,00	0,00	0,75
139	<i>Lactococcus l. s. l</i>	63	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
140	<i>Lactococcus l. s. l</i>	51/1	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
141	<i>Lactococcus l. s. l</i>	53/1	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,01	1,00	0,02	0,00	0,00
142	<i>Lactococcus l. s. l</i>	78	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
143	<i>Lactococcus l. s. l</i>	3	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00

144	<i>Lactococcus l. s. l</i>	9	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
145	<i>Lactococcus l. s. l</i>	1	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
146	<i>Lactococcus l. s. l</i>	11	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,01	0,00
147	<i>Lactococcus l. s. l</i>	6	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
148	<i>Lactococcus l. s. l</i>	42/2	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,02	1,00	0,00	0,00	0,07
149	<i>Lactococcus l. s. l</i>	T56	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,02	1,00	0,00	0,04	0,00
153	<i>Lactococcus p.</i>	L5	<i>Lp</i>	Poprawnie Correct	0,08	0,00	0,16	0,99	0,00
156	<i>Lactococcus l. s. l</i>	47	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
158	<i>Lactococcus l. s. l</i>	61/1	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
160	<i>Lactococcus l. s. l</i>	62	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
161	<i>Lactococcus l. s. c.</i>	68	<i>Llsc</i>	Poprawnie Correct	0,08	0,00	1,00	0,00	0,05
162	<i>Lactococcus l. s. l</i>	59	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,05	1,00	0,10	0,01	0,00
163	<i>Lactococcus l. s. l</i>	49	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
165	<i>Lactococcus l. s. l</i>	50/1	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
166	<i>Lactococcus l. s. c.</i>	59	<i>Llsc</i>	Poprawnie Correct	0,11	0,07	0,96	0,00	0,01
167	<i>Lactococcus l. s. c.</i>	3	<i>Lr</i>	Błędnie False	0,57	0,02	0,00	0,00	0,86
168	<i>Lactococcus l. s. l</i>	12	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
169	<i>Lactococcus l. s. l</i>	T36	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
170	<i>Lactococcus l. s. l</i>	10/1	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
171	<i>Lactococcus l. s. l</i>	T40	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
173	<i>Lactococcus r.</i>	45	<i>Lr</i>	Poprawnie Correct	0,02	0,03	0,00	0,00	0,98
175	<i>Lactococcus p.</i>	65	<i>Lp</i>	Poprawnie Correct	0,23	0,08	0,09	0,64	0,00

176	<i>Lactococcus l. s. l</i>	74	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
178	<i>Lactococcus l. s. l</i>	42/1	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
179	<i>Lactococcus l. s. l</i>	42/1	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
181	<i>Lactococcus l.</i>	44/2	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	?	1,00	0,00	0,00	0,00
182	<i>Lactococcus l.</i>	71/1	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	?	1,00	0,00	0,00	0,00
183	<i>Lactococcus l. s. c</i>	71/2	<i>Llsc</i>	Poprawnie Correct	0,07	0,01	1,00	0,12	0,00
184	<i>Lactococcus l.</i>	51/1	<i>Ll</i>	Poprawnie Correct	0,01	1,00	0,00	0,00	0,00
185	<i>Lactococcus l.</i>	51/2	<i>Ll</i>	Poprawnie Correct	0,06	1,00	0,00	0,00	0,00
186	<i>Lactococcus l. s. l</i>	55/1	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,02	1,00	0,05	0,00	0,02
187	<i>Lactococcus l.</i>	55/2	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
188	<i>Lactococcus l.</i>	56/1	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
189	<i>Lactococcus l. s. l</i>	56/2	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
280	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 4	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
281	<i>Lactococcus l. s. c</i>	Iz 9	<i>Llsc</i>	Poprawnie Correct	0,01	0,00	1,00	0,00	0,02
282	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 10	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
285	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 15	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
286	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 16	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
288	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 20	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
289	<i>Lactococcus l. s. c</i>	Iz 21	<i>Llsc</i>	Poprawnie Correct	0,01	0,00	1,00	0,01	0,00
291	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 23	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
292	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 24	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
293	<i>Lactococcus r.</i>	Iz 25	<i>Lr</i>	Poprawnie Correct	0,14	0,00	0,00	0,07	0,72

294	<i>Lactococcus r.</i>	Iz 26	<i>Lr</i>	Poprawnie Correct	0,02	0,02	0,00	0,00	0,98
296	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 27	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
297	<i>Lactococcus l. s. c</i>	Iz 28	<i>Llsl</i>	Błednie False	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
298	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 29	<i>Llsc</i>	Poprawnie Correct	0,11	1,00	0,01	0,22	0,00
299	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 30	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
301	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 32	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,01	1,00	0,03	0,00	0,00
303	<i>Lactococcus l. s. c</i>	Iz 34	<i>Llsc</i>	Poprawnie Correct	0,09	0,00	0,92	0,00	0,01
304	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 35	<i>Lp</i>	Błednie False	0,75	0,22	0,03	0,95	0,00
305	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 36	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
307	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 40	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,11	1,00	0,01	0,22	0,00
309	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 42	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
310	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 43	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,01	1,00	0,03	0,00	0,00
311	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 45	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
313	<i>Lactococcus l. s. c</i>	Iz 47	?	?	0,36	0,31	0,84	0,01	0,00
314	<i>Lactococcus l. s. c</i>	Iz 49	<i>Llsc</i>	Poprawnie Correct	0,00	0,00	1,00	0,00	0,01
315	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 50	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
316	<i>Lactococcus r.</i>	Iz 51	<i>Lp</i>	Błednie False	0,71	0,00	0,00	1,00	0,00
317	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 52	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,01	1,00	0,03	0,00	0,00
318	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 53	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
319	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 54	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,01	1,00	0,00	0,01	0,00
320	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 55	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
321	<i>Lactococcus l. s. c</i>	Iz 56	<i>Llsc</i>	Poprawnie Correct	0,01	0,00	1,00	0,00	0,00

322	<i>Lactococcus l. s. c</i>	Iz 57	<i>Llsc</i>	Poprawnie Correct	0,01	0,01	1,00	0,00	0,00
323	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 58	?	?	0,01	0,54	0,68	0,00	0,00
324	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 59	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,02	1,00	0,00	0,01	0,00
325	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 60	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
326	<i>Lactococcus l. s. l</i>	Iz 61	<i>Llsl</i>	Poprawnie Correct	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00

Objaśnienia: / Explanatory notes:

\* *Ll* – *Lactococcus lactis*; *Llsl* – *Lactococcus lactis* ssp.*lactis*; *Llsc* – *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*;  
*Lp* – *Lactococcus plantarum*; *Lr* – *Lactococcus rafinolactis*.

## Wnioski

- Przeprowadzone badania potwierdziły, że widma w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) są specyficzne dla danego gatunku bakterii.
- Poziom PP2, opisujący powtarzalność pomiarów próbek przygotowywanych z zawiesin komórek niezależnych hodowli tego samego szczepu ma praktyczne znaczenie w pomiarach widm FTIR bakterii z rodzaju *Lactococcus*.
- Do charakterystyki widm FTIR bakterii na poziomie gatunku i podgatunku, najbardziej przydatne są kombinacje obszarów: polisacharydów ( $1200\text{ cm}^{-1}$  –  $900\text{ cm}^{-1}$ ) z dakyloskopowym ( $900\text{ cm}^{-1}$  –  $700\text{ cm}^{-1}$ ) i mieszanym ( $1500\text{ cm}^{-1}$  –  $1200\text{ cm}^{-1}$ ) ich pierwszych pochodnych.
- Zastosowanie sztucznych sieci neuronowych do analizy widm FTIR, jako najbardziej zaawansowanej metody chemometrycznej, pozwala na identyfikację bakterii z rodzaju *Lactococcus* na poziomie gatunku i/lub podgatunku w 90 %.
- Spektroskopia FTIR, połączona z analizą chemometryczną, jest szybką i precyzyjną metodą identyfikacji bakterii.

## Literatura

- [1] Amiel C., Mariey L., Denis C., Pichon P., Travert J.: FTIR spectroscopy and taxonomic purpose: Contribution to the classification of lactic acid bacteria. *Le Lait*, 2001, **81**, 249-255.
- [2] Curk M.C., Peladan F., Hubert J.C.: Fourier transform infrared spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1994, **123**, 241-248.
- [3] Dziuba B.: Identification of selected *Leuconostoc* species with the use of FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *Acta Sci. Pol-Technol.*, 2011, **10**, 275-285.
- [4] Dziuba B., Babuchowski A., Dziuba M., Nałęcz D.: Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *Milchwissenschaft*, 2007, **62**, 28-32.
- [5] Dziuba B., Babuchowski A., Nałęcz D., Niklewicz M.: Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. *Int. Dairy J.*, 2007, **17**, 183-189.
- [6] Dziuba B., Babuchowski A., Niklewicz M., Brzozowski B.: FTIR spectral characteristics of Lactic Acid Bacteria – a spectral library. *Milchwissenschaft*, 2006, **61**, 146-149.

- [7] Dziuba B., Nalepa B.: Identification of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *Food Technol. Biotechnol.*, 2012, **50**, (w druku).
- [8] Goodacre R., Timmins E.M., Burton R., Kaderbhai N., Woodward A. M., Kell D.B., Rooney P.J.: Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism finger-printing and artificial neural networks. *Microbiology*, 1998, **144**, 1157-1170.
- [9] Kirchner C., Maquelin K., Pina P., Ngo-Thi N.A., Choo-Smith L.P., Sockalingum G.D., Sandt C., Ami D., Orsini F., Pelagia F., Pelagia S.M., Allouch P., Mainfait M., Pupplem G.J., Naumann D.: 2001. Classification and identification of Enterococci: a comparative phenotypic, genotypic and vibrational spectroscopy study. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 1763-1770.
- [10] Lang P.L., Hedges J.L., Keefer Ch.D.: The infrared spectroscopic Gram stain. *Cellular and Molecular Biology*, 2001, **47**, 7-14.
- [11] Lefier D., Lamprell H., Mazerolles G.: Evolution of *Lactococcus* strains during ripening in Brie cheese using Fourier transform infrared spectroscopy. *Le Lait*, 2000, **80**, 2472-54.
- [12] Mariey L., Signolle J.P., Amiel C., Travert J. Discrimination, classification, identification of micro-organisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, 2001, **26**, 151-159.
- [13] Naumann D., Helm D., Labischinski H.: 1991. Microbiological characterizations by FTIR spectroscopy. *Nature*, 1991, **351**, 81-82.
- [14] Naumann D., Labischinski H., Giesbrecht P.: The characterization of microorganisms by fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). In: *Modern techniques for rapid microbiological analysis*. W. H. Nelson Eds. VCH Publishers, New York 1991, pp. 43-96.
- [15] Pu Z.Y., Dobos M., Limswutin G.K., Powell I.B.: Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the gram-positive bacterial genus *Lactococcus*. *J. Appl. Microbiol.*, 2002, **93**, 353-361.
- [16] Samelis J., Bleicher A., Delbès-Paus C., Kakouri A., Neuhaus K., Montel M.C.: FTIR-based polyphasic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek Graviera cheese. *Food Microbiol.*, 2011, **28**, 76-83.
- [17] Tadeusiewicz R.: Sieci neuronowe. Akademicka Oficyna Wydawnicza, Warszawa 1993.
- [18] Udelhoven T., Naumann D., Schmitt J.: Development of hierarchical classification systems with artificial neural networks and FT-IR spectra for the identification of bacteria. *Appl. Spectrosc.*, 2000, **54**, 1471-1479.
- [19] Warmińska-Radyko I., Łaniewska-Trockenheim Ł.: Biblioteka majstra mleczarskiego. Nowe metody badań mikrobiologicznych w przemyśle spożywczym. Oficyna Wydawnicza Hoża, Warszawa 2003, ss. 36-39.
- [20] Wenning M., Büchl N.R., Scherer S.: Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *J. Biophotonics*, 2010, **3**, 493-505.

#### **IDENTIFICATION OF SELECTED SPECIES AND SUBSPECIES OF LACTOCOCCUS GENUS WITH THE USE OF FTIR SPECTROSCOPY AND ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS**

##### **S u m m a r y**

A research was undertaken into the application of Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks to identify bacteria of the *Lactococcus* genus at a level of species and subspecies. A methodology of FTIR spectra measurement and strategy of their analysis, previously developed by the author, were used to select FTIR spectra of bacteria strains analyzed and to expand the FTIR library. The research comprised 7 reference strains of milk fermentation bacteria of the *Lactococcus* genus derived

from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) and 88 strains isolated from food products. The bacteria strains of the *Lactococcus* genus were isolated from raw milk and from fermented milk products.

The FTIR spectra of strains compiled in the library were used to develop artificial neural networks. The application value of selected artificial neural networks was verified based on the identification results of reference strains, as well as of the strains isolated from food products; their species affiliation was determined based on a PCR test using species-specific primers. The application of artificial neural networks to analyse FTIR spectra made it possible to correctly identify bacteria of the *Lactococcus* genus belonging to a particular species.

**Key words:** *Lactococcus*, FTIR spectroscopy, artificial neural networks 