

KATARZYNA NEFFE-SKOCIŃSKA, KATARZYNA DYBKA-STĘPIEŃ,
HUBERT ANTOLAK

IZOLACJA I IDENTYFIKACJA SZCZEPÓW BAKTERII KWASU OCTOWEGO O POTENCJALNYCH WŁAŚCIWOŚCIACH PROZDROWOTNYCH

Streszczenie

Celem pracy była izolacja i identyfikacja szczepów bakterii kwasu octowego (AAB) w systemie poli-fazowym oraz wstępne zdefiniowanie *in vitro* ich potencjalnych właściwości probiotycznych w warunkach laboratoryjnych.

Materiał do izolacji bakterii kwasu octowego stanowiły owoce sezonowe pochodzące z lokalnych upraw z województwa mazowieckiego i łódzkiego oraz kultura startowa do produkcji Kombuchy. Identyfikację szczepów przeprowadzono z zastosowaniem systemu polifazowego bazującego na charakterystyce morfologicznej, uzdolnieniach biochemicznych i identyfikacji genetycznej. Na podstawie otrzymanych wyników utworzono kolekcję szczepów AAB bezpiecznych dla zdrowia ludzi, następnie określono antybiotykowrażliwość na 12 wybranych substancji bakteriobójczych i wykonano testy *in vitro* przeżywalności wyselekcjonowanych szczepów w warunkach modelowego przewodu pokarmowego człowieka. Na podstawie analizy fenotypu i sekwencjonowania genu 16S rRNA spośród 9 izolatów bakterii kwasu octowego do badań wybrano 3 szczepy należące do gatunku *Gluconobacter oxydans*: H31 wyizolowany z czarnej porzeczki oraz H30 i H32 – z kultury startowej do produkcji herbaty Kombucha. Stwierdzono, że 2 szczepy: *G. oxydans* H30 wyizolowany z Kombuchy i *G. oxydans* H31 pochodzący z czarnej porzeczki charakteryzują się dobrą przeżywalnością średnio na poziomie 6 log jtk/ml podczas pasażu przez modelowy układ pokarmowy człowieka i tym samym spełniają jedno z podstawowych kryteriów dla bakterii potencjalnie probiotycznych. Wszystkie badane szczepy wykazywały zbliżoną antybiotykowrażliwość. Przeprowadzona diagnostyka wyselekcjonowanych szczepów bakterii kwasu octowego stanowi podstawę do dalszych badań tych mikroorganizmów w kierunku potwierdzenia pozostałych cech probiotycznych.

Słowa kluczowe: bakterie kwasu octowego (AAB), probiotyki, przeżywalność *in vitro*, owoce, Kombucha

Dr inż. K. Neffe-Skocińska, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydz. Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa, dr inż. K. Dybka-Stępień, dr inż. H. Antolak, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydz. Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź. Kontakt: katarzyna_neffe_skocinska@sggw.pl

Wprowadzenie

Bakterie kwasu octowego (ang. *Acetic Acid Bacteria*, AAB) są to tlenowe, Gram-ujemne pałeczki należące do bardzo zróżnicowanej grupy mikroorganizmów szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie. Źródłem ich izolacji są przede wszystkim środowiska pochodzenia roślinnego, w tym kwiaty, owoce, ale również żywność naturalnie fermentowana, octy, napój herbaciany Kombucha, fermentowany napój na bazie ziaren kakaowca oraz mikrobiologicznie zanieczyszczone wina, piwa i miody pitne [1, 2, 6, 8, 13]. Rodzaje *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* i *Komagataeibacter* od tysięcy lat mają znaczący udział w życiu i działalności człowieka. Są one wykorzystywane zarówno w przemyśle spożywczym, jak i w biotechnologii. W literaturze przedmiotu znajdują się doniesienia na temat prozdrowotnego działania metabolitów syntezowanych przez bakterie AAB [10, 12, 17]. Wybrane szczepy AAB charakteryzują się szeregiem właściwości prozdrowotnych, w tym zdolnością do produkcji kwasu glukonowego, glukuronowego i syntezy witaminy C [10, 12, 14]. Mimo wielu korzyści zdrowotnych nie są one uznawane jako potencjalnie probiotyczne. Dlatego zbadanie tej grupy mikroorganizmów pod względem ich właściwości probiotycznych, a tym samym pozytywnego oddziaływania na ludzi, może stanowić dobrą alternatywę dla konwencjonalnych probiotyków.

Celem pracy była izolacja i identyfikacja bakterii kwasu octowego w systemie polifazowym z surowców pochodzenia roślinnego oraz wstępne zdefiniowanie potencjalnych właściwości probiotycznych *in vitro* otrzymanych szczepów.

Material i metody badań

Material do izolacji bakterii kwasu octowego stanowiły owoce sezonowe pochodzące z lokalnych upraw z województwa mazowieckiego i łódzkiego: maliny (*Rubus idaeus* L.), mirabelki (*Prunus domestica* L.), jabłka (*Malus domestica* L.), poziomki (*Fragaria vesca* L.), czarne porzeczki (*Ribes nigrum* L.) i czerwone porzeczki (*Ribes rubrum* L.). W celu wyizolowania szczepów bakterii AAB material roślinny poddawano fermentacji. Surowiec o masie 50 g zalewano 100 ml jałowego roztworu soli fizjologicznej z 2-procentowym dodatkiem etanolu. Proces fermentacji prowadzono na wytrząsarce przez 96 h w temp. 28 °C.

Izolację szczepów bakterii AAB prowadzono metodą posiewu powierzchniowego z wykorzystaniem modyfikowanego podłoża stałego GCA (ang. *Glucose Calcium Carbonate and Agar*) zawierającego składniki wymagane do wzrostu bakterii (2 % glukozy, 0,3 % peptonu K, 0,3 % ekstraktu drożdżowego, 0,7 % węglanu wapnia). Podłoża uzupełniano 2-procentowym dodatkiem alkoholu etylowego, który stanowi podstawowy substrat do tworzenia kwasu octowego. Do pożywki dodawano także

nystatynę hamującą wzrost drożdży i pleśni. Zaszczepione podłoża inkubowano przez 72 h w temp. 28 °C, systematycznie oceniając wzrost mikrobioty.

Jako źródło izolacji AAB stosowano również kulturę startową fermentowanego napoju herbacianego Kombucha (ang. *Symbiotic Cultures of Bacteria and Yeast*, SCOBY). W celu wyizolowania monokultur bakterii kwasu octowego kulturę startową wykorzystywano do zaszczepiania naparu z czarnej herbaty, który sporządzano według Neffe-Skocińskiej i wsp. [12]. Z tak przygotowanego napoju fermentowanego prowadzono izolację czystych kultur AAB. Wykonywano szereg 10-krotnych rozcieńczeń, przenosząc 1 ml napoju do 9 ml soli fizjologicznej, następnie wykonywano posiew powierzchniowy napoju na podłoże GCA. Zaszczepione pożywki inkubowano przez 72 h w temp. 28 °C.

Selekcja kultur bakterii kwasu octowego polegała na ocenie makroskopowych cech wzrostu mikroorganizmów, obserwacjach mikroskopowych oraz podstawowych testach biochemicznych. Po inkubacji posiewów na podłożu GCA, białe, kremowe, brązowe i różowe kolonie charakteryzujące się zdolnością tworzenia kwasów organicznych (powstanie stref przejaśnienia podłoża na skutek rozpuszczenia węglanu wapnia) przesiewano na nową agarową pożywkę GCA techniką posiewu redukcijnego. Otrzymane monokultury oceniano mikroskopowo z zastosowaniem mikroskopu OLYMPUS BX41 (Olympus, Japonia) wyposażonego w wysokorozdzielczą kamerę cyfrową DP72. Podstawowe testy biochemiczne obejmowały określenie aktywności oksydazy cytochromowej IV (Merck, Niemcy), katalazy (Merck, Niemcy) i aminopeptydazy L-alaniny (Merck, Niemcy).

W kolejnym etapie dokonywano genetycznej identyfikacji wybranych monokultur szczepów AAB. Izolację genomowego DNA przeprowadzano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology, Polska), postępując zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta. W celu amplifikacji genu 16S rRNA przeprowadzano reakcję łańcuchowej polimerazy (PCR) z użyciem termocyklera MJ Mini (Bio-Rad Hercules, CA, USA) zgodnie z metodyką Kręgiel i wsp. [11], wykorzystując startery o sekwencjach nukleotydowych 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAT-3' i 5'-CGGCTACCTTGTTACGAC-3'). Mieszanina reakcyjna zawierała 24 µl polimerazy REDTaq ReadyMix (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 24 µl wody o czystości przeznaczonej do reakcji PCR, 1 µl matrycy DNA (50 ng) i po 0,4 µl starterów (100 µM). Protokół amplifikacji obejmował wstępną denaturację (94 °C, 2 min) i 39 cykli składających się z etapu denaturacji (94 °C, 1 min), hybrydyzacji (55 °C, 1 min), elongacji (72 °C, 3 min) oraz końcową elongację w temp. 72 °C w ciągu 2 min. Następnie produkty reakcji PCR poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 1-procentowym żelu agarozowym w buforze 0,5×TBE z dodatkiem barwnika SimplySafe (EURx, Polska). Trzeci etap identyfikacji genetycznej obejmował sekwencjonowanie produktów PCR. W tym celu używano terminatora BigDye Terminator Ready Reaction Cycle

Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) oraz sekwenatora Applied Biosystems model 3730 (Genomed, Polska). Otrzymane sekwencje nukleotydowe porównywano z sekwencjami genu 16S rRNA bakterii kwasu octowego, zdeponowanymi w bazie The National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, USA), przy użyciu programu BLASTN 2.2.27+ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Etap izolacji i identyfikacji szczepów AAB przeprowadzono w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej.

Drugi etap badań prowadzono w Zakładzie Higieny i Zarządzania Jakością Żywności SGGW w Warszawie, a dotyczył on oceny wrażliwości na wybrane antybiotyki oraz przeżywalności wyselekcjonowanych szczepów AAB w warunkach modelowego przewodu pokarmowego człowieka (testy *in vitro*).

Testy wrażliwości badanych szczepów AAB na wybrane antybiotyki wykonywano za pomocą pasków gradientowych MIC Strip (Liofilchem Diagnostici, Włochy). Metoda polega na oznaczeniu minimalnego stężenia hamującego (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*, MIC) antybiotyku przeciwko mikroorganizmom na impregnowanym pasku papierowym o zdefiniowanym gradiencie stężenia danej substancji bakteriobójczej ($\mu\text{g/ml}$).

Ostatnim etapem zaplanowanych badań było określenie przeżywalności szczepów AAB w symulowanych warunkach przewodu pokarmowego. Skład i sposób przygotowania soków trawiennych wykonywano na podstawie publikacji Rzepkowskiej i wsp. [13]. Przygotowane roztwory elektrolitów poddawano sterylizacji w temp. 121 °C przez 15 min. Enzymy (Sigma Aldrich, Niemcy), takie jak lizozym (1 g/l), pepsynę (0,3 g/l) i pankreatynę (1 g/l) dodawano bezpośrednio przed rozpoczęciem doświadczenia. Analizowano dwa poziomy pH soku żołądkowego: 2,0 i 2,5. Przeżywalność bakterii oznaczano przed upływem 120 min trawienia w soku żołądkowym oraz po tym czasie. Podobnie postępowano w przypadku soku jelitowego. Prowadzono analizy przed upływem 180 min trawienia szczepów w żółci o stężeniu 0,3 % oraz po tym czasie. Doświadczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach, niezależnie dla każdego zakresu pH soku żołądkowego przy stałym pH soku jelitowego i stężeniu żółci. Proces inkubacji soków trawiennych z dodatkiem badanych szczepów bakterii AAB prowadzono w temp. 37 °C. Do badań przygotowywano 24-godzinne hodowle szczepów AAB w płynnej pożywce GCA. Początkowa liczba komórek bakterii w inokulum wynosiła średnio ok. 7 log jtk/ml. Posiewy mikrobiologiczne w kierunku określenia przeżywalności badanych bakterii wykonywano metodą kropelkową przed inkubacją w odpowiednim soku trawiennym i po niej. W tym celu pobierano po 100 μl zawiesiny i posiewano po 5 kropel o objętości 20 μl na powierzchnię płytek z zastygniętym podłożem GCA. Po wchłonięciu zawiesiny płytki inkubowano przez 48 h w temp. 25 °C.

Analizę wyników przeprowadzono w programie Statistica (wersja 13, Statsoft, Polska). Wykonano test T dla prób zależnych przy $p \leq 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Bakterie kwasu octowego należą do bardzo zróżnicowanej grupy mikroorganizmów zarówno pod względem morfologicznym jak i biochemicznym. Cechą charakterystyczną wszystkich bakterii AAB jest aktywność katalazy i aminopeptydazy L-alaniny przy jednoczesnym braku aktywności oksydazy cytochromowej IV, co m.in. pozwala odróżnić omawiane mikroorganizmy od pozostałej mikroflory badanych surowców, w tym od bakterii fermentacji mlekowej. Otrzymane szczepy AAB na podłożu GCA rosły w postaci kremowych lub jasnobrązowych kolonii z wyraźnymi strefami przejaśnienia, które powstały w wyniku rozpuszczenia węglanu wapnia przez syntezowane kwasy organiczne. Niektóre z otrzymanych szczepów AAB charakteryzowały się zdolnością syntezy barwnych metabolitów do środowiska, o czym świadczyła brązowa barwa pożywki hodowlanej. Wszystkie wyizolowane i wybrane do dalszych badań szczepy AAB wykazywały charakterystyczne dla tej grupy właściwości biochemiczne. W związku z powyższym już po pierwszym etapie identyfikacji fenotypowej dokonano selekcji otrzymanych szczepów i wybrano szczepy bakterii pochodzące z malin, mirabelek, czarnej i czerwonej porzeczki oraz z Kombuchy. Na tym etapie wyselekcjonowano łącznie 9 szczepów AAB. Z uwagi na otrzymane wyniki testów biochemicznych, jak również zdolność do tworzenia brązowego barwnika, wyizolowane szczepy wstępnie zaklasyfikowano do rodzajów *Gluconobacter* i *Komagataeibacter* (tab. 1).

Do dalszych badań dotyczących przeżywalności w symulowanych warunkach przewodu pokarmowego i oporności na wybrane antybiotyki wybrano 3 szczepy należące do gatunku *Gluconobacter oxydans* – H30, H31 i H32 (tab. 2). Szczepy wybrano na podstawie otrzymanych wyników identyfikacji genotypowej z wykorzystaniem sekwencjonowania genu 16S rRNA. Podczas wyboru kierowano się właściwościami rodzaju *Gluconobacter*, który nie wykazuje patogenności w stosunku do ludzi i zwierząt. Dodatkowo bakterie z tego rodzaju są szeroko stosowane w przemyśle, zarówno spożywczym, biotechnologicznym, jak i do produkcji biosensorów [9, 16, 17]. *Gluconobacter* sp. są szczególnie wartościowe ze względu na zdolność do produkcji prozdrowotnego kwasu glukonowego i glukuronowego. Wichienchot i wsp. [16] zaobserwowali, że glukooligosacharydy produkowane przez szczep *G. oxydans* NCIMB 4943 wykazują właściwości prebiotyczne w stosunku do mikroflory jelitowej człowieka. Dodatkowo bakterie AAB, w tym *Gluconobacter* sp. cechuje oporność na niskie pH środowiska [8, 9].

Liczba bakterii AAB w hodowlach wyjściowych użytych do badań *in vitro* wynosiła dla wszystkich badanych szczepów średnio 7 log jtk/ml. Przedstawiono wyniki przy dwóch wartościach pH soku żołądkowego (2 i 2,5) oraz pH soku jelitowego 7,8 (rys. 1 i 2). Wykazano, że sok żołądkowy o pH 2 z dodatkiem pepsyny i lizozymu wpłynął istotnie na liczbę komórek AAB. Zaobserwowano, że szczep *G. oxydans* H30

Tabela 1. Wyniki podstawowych testów biochemicznych izolatów AAB

Table 1. Results of basic biochemical tests for AAB isolates

Symbol szczepu Symbol of strain	Źródło izolacji Source of isolation	Aktywność katalazy Catalase activity	Aktywność oksydazy Oxidase activity	Aktywność aminopeptydazy Aminopeptidase activity	Klasyfikacja wstępna Preliminary classification
H19	Malina Raspberry	+	-	+	<i>Gluconobacter</i> sp.
H21	Mirabelka Mirabelle	+	-	+	<i>Gluconobacter</i> sp.
H23	Malina Raspberry	+	-	+	<i>Gluconobacter</i> sp.
H24	Czerwona porzeczka Red currant	+	-	+	<i>Gluconobacter</i> sp.
H28	Czarna porzeczka Black currant	+	-	+	<i>Gluconobacter</i> sp.
H29	Malina Raspberry	+	-	+	<i>Gluconobacter</i> sp.
H30	Kombucha	+	-	+	<i>Komagataeibacter</i> sp.
H31	Czarna porzeczka Black currant	+	-	+	<i>Gluconobacter</i> sp.
H32	Kombucha	+	-	+	<i>Komagataeibacter</i> sp.

Objaśnienia / Explanatory notes:

„+” – wykazuje aktywność wybranego enzymu / shows activity of selected enzyme; „-” – brak aktywności wybranego enzymu / no activity of the selected enzyme.

wyizolowany z Kombuchy i szczep *G. oxydans* H31 pochodzący z czarnej porzeczki charakteryzują się stosunkowo małą wrażliwością na modelowe warunki układu pokarmowego człowieka, a tym samym spełniają wymagania stawiane bakteriom potencjalnie probiotycznym. Największą wrażliwością charakteryzował się szczep H32 pochodzący z kultury startowej Kombuchy. Zmniejszenie liczby bakterii obserwowano również w środowisku o pH 2,5. W tym przypadku zmniejszenie wynosiło jeden rząd logarytmiczny po 2 h inkubacji w soku żołądkowym (6,68 log jtk/ml) i dwa rzędy po 3-godzinnej inkubacji w soku jelitowym (5,07 log jtk/ml). Dla porównania w soku żołądkowym o pH 2 liczba bakterii szczepu H32 kształtowała się na poziomie 3,35 log jtk/ml.

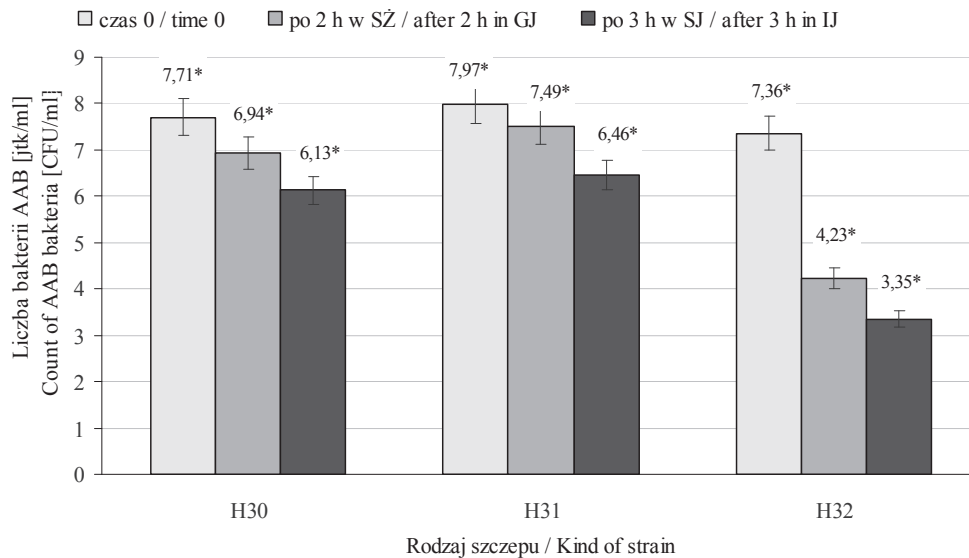
Tabela 2. Klasyfikacja taksonomiczna izolatów na podstawie sekwencji genu 16S rRNA

Table 2. Taxonomic classification of isolates based on the 16S rRNA gene sequence

Symbol szczepu Symbol of strain	Źródło izolacji Source of isolation	Klasyfikacja wstępna (cechy fenotypowe) Preliminary classification (phenotypic features)	Klasyfikacja na podstawie sekwencjonowania Classification based on sequencing	Wybór do dalszych badań Selection for further testing
H19	Malina Raspberry	<i>Gluconobacter</i> sp.	<i>Asaia</i> sp.	nie / no
H21	Mirabelka Mirabelle	<i>Gluconobacter</i> sp.	<i>Serratia</i> sp.	
H23	Malina Raspberry	<i>Gluconobacter</i> sp.	<i>Gluconobacter cerinus</i>	
H24	Czerwona porzeczka Red currant	<i>Gluconobacter</i> sp.	<i>Gluconobacter cerinus</i>	
H28	Czarna porzeczka Black currant	<i>Gluconobacter</i> sp.	<i>Gluconobacter cerinus</i>	
H29	Malina Raspberry	<i>Gluconobacter</i> sp.	<i>Gluconobacter cerinus</i>	
H30	Kombucha	<i>Komagataeibacter</i> sp.	<i>Gluconobacter oxydans</i>	tak / yes
H31	Czarna porzeczka Black currant	<i>Gluconobacter</i> sp.	<i>Gluconobacter oxydans</i>	
H32	Kombucha	<i>Komagataeibacter</i> sp.	<i>Gluconobacter oxydans</i>	

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że szczep *G. oxydans* H30 wyizolowany z Kombuchy i szczep *G. oxydans* H31 pochodzący z czarnej porzeczki wykazały stosunkowo małą wrażliwość na warunki modelowego układu pokarmowego człowieka i osiągnęły ostatecznie wartość 6 log jtk/ml. Bhardwaj i wsp. [3] oraz Haghshenas i wsp. [10] podkreślają, że bakterie probiotyczne są dostarczane do organizmu głównie za pośrednictwem żywności. Pomijając jamę ustną, pierwszą i jednocześnie największą barierą dla ich przeżywalności są warunki panujące w żołądku, które probiotyki powinny tolerować minimum przez 90 min, zanim będą mogły skolonizować dalsze części układu pokarmowego i wywołać efekt prozdrowotny. W jamie ustnej czynnikiem niekorzystnym jest obecność lizozymu. W żołądku, obok niskiego pH, czynnikiem niszczącym komórki bakteryjne jest pepsyna. Zaprojektowany w niniejszych badaniach sok żołądkowy zawierał w swoim składzie obydwie substancje. Kolejną barierą dla probiotyków są sole żółci, których fizjologiczne stężenie w organizmie człowieka wynosi $0,15 \div 0,5$ % (średnio 0,3 %). Do zaprojektowanego soku jelitowego dodano też pankreatynę, która fizjologicznie jest wydzielana przez zewnątrzwydzielnicze komórki trzustki jako mieszanina enzymów: proteazy, amylazy, lipazy [13]. Wymienione składniki soku jelitowego charakteryzują się negatywnym działaniem w stosunku do

komórek bakteryjnych, m.in. przez zwiększanie przepuszczalności błon komórkowych [12, 18].



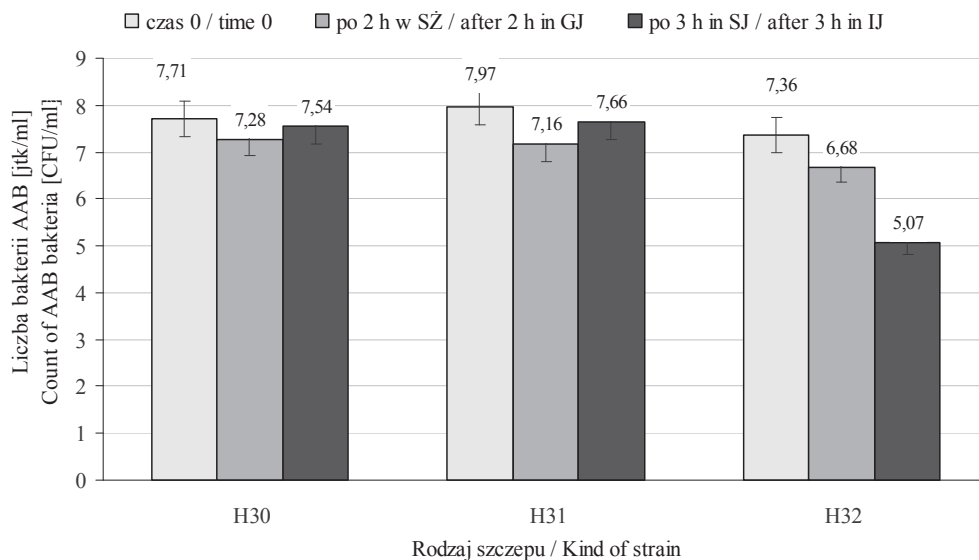
Objaśnienia / Explanatory notes:

SŻ – sok żołądkowy / GJ – gastric juice; SJ – sok jelitowy / IJ – intestinal juice. Na rysunku przedstawiono wartości średnie (w postaci słupków) i odchylenia standardowe (w postaci odcinków) / Figure shows mean values (bars) and standard deviations (line segments); * – wartości statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) / statistically significant values ($p \leq 0,05$).

Rys. 1. Przeżywalność szczepów AAB w modelowych warunkach przewodu pokarmowego człowieka po trawieniu w soku żołądkowym o pH 2,0 i soku jelitowym o pH 7,8.

Fig. 1. Survival of AAB strains under model conditions of human gastrointestinal tract after digestion in gastric juice of pH 2.0 and in intestinal juice of pH 7.8.

Wynik oznaczania lekowrażliwości jest interpretowany z zastosowaniem odpowiednich wartości granicznych, tzw. rekomendacji amerykańskich CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) lub europejskich EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Na podstawie tych wytycznych kwalifikuje się dany mikroorganizm do kategorii „wrażliwy” (S), „średniowrażliwy” (I) lub „oporny” (R) na dany antybiotyk [7]. Specyficzne wartości graniczne są opracowane w szczególności dla mikroorganizmów patogennych. Brakuje szczegółowych wytycznych dla bakterii niechorobotwórczych, w tym dla bakterii kwasu octowego. W tab. 3. przedstawiono wyniki oznaczania minimalnych stężeń hamujących (MIC) wybranych antybiotyków przeciwko trzem wyselekcjonowanym szczepom *G. oxydans* (H30, H31 i H32). Na 12 badanych antybiotyków szczepy wykazały całkowitą oporność



Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes as in Fig. 1.

Rys. 2. Przeżywalność badanych szczepów AAB w modelowych warunkach przewodu pokarmowego po trawieniu w soku żołądkowym o pH 2,5 i soku jelitowym o pH 7,8.

Fig. 2. Survival of AAB strains under model conditions of human gastrointestinal tract after digestion in gastric juice of pH 2.5 and in intestinal juice of pH 7.8.

Tabela 3. Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost szczepów AAB na wybrane antybiotyki
Table 3. Minimum concentration values inhibiting the growth of AAB strains on selected antibiotics

Szczep Strain	Antybiotyk / Antibiotic											
	AMP	C	CD	CN	E	K	P	S	TE	VA	SMX	CIP
	Stężenie / Concentration [$\mu\text{g/ml}$]											
	MIC 0 ÷ 256										MIC 0 ÷ 1024	MIC 0 ÷ 32
H30	32	24	R	0,75	96	1	R	1,5	4	96	R	0,12
H31	64	48	R	0,75	96	1	R	0,5	1	64	96	0,19
H32	32	24	R	0,75	96	1	R	1,5	4	96	R	0,12

Objaśnienia / Explanatory notes:

AMP – ampicylina / ampicillin, C – chloramfenikol / chloramphenicol, CD – klindamycyna / clindamycin, CN – gentamycyna / gentamicin, E – erytromycyna / erythromycin, K – kanamycyna / kanamycin, P – penicylina / penicillin, S – streptomycyna / streptomycin, SMX – sulfametoksazol / sulfamethoxazole, TE – tetracyklina / tetracycline, VA – wankomycyna / vancomycin, CIP – cyprofloksacyna / ciprofloxacin; MIC – minimalne stężenie hamujące / minimum inhibitory concentration; R – całkowita oporność szczepu na dany antybiotyk / total resistance of strain to given antibiotic.

w stosunku do klindamycyny (CD) i penicyliny (P). Szczep *G. oxydans* H31 wyizolowany z czarnej porzeczkii jako jedyny wykazał wrażliwość na działanie sulfametoksazolu (SMX). W tym przypadku minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii wynosiło 96 µg/ml. Szczepy wyizolowane z Kombuchy *G. oxydans* H30 i H32 wykazywały natomiast brak wrażliwości w stosunku do SMX. Dodatkowo w przeprowadzonym doświadczeniu wykazano, że wszystkie badane szczepy AAB wykazywały bardzo zbliżoną wrażliwość na większość spośród 12 zastosowanych antybiotyków, w tym na wankomycynę, która jest jednym z tzw. antybiotyków o wysokiej efektywności hamowania rozwoju infekcji bakteryjnych [5, 7]. Oporność mikroorganizmów probiotycznych, bądź potencjalnie probiotycznych, na ten lek jest dlatego jednym z ważniejszych kryteriów podczas selekcji i wyboru szczepów [10]. Na uwagę zasługuje też to, że spośród trzech badanych szczepów tylko bakterie wyizolowane z czarnej porzeczkii (H31) były wrażliwe na sulfametoksazol, czyli lek należący do sulfonamidów o działaniu bakteriostatycznym. Całkowitą oporność wszystkich badanych szczepów odnotowano natomiast tylko w przypadku klindamycyny i penicyliny. W chwili obecnej EUCAST [7] definiuje jedynie wartości graniczne dotyczące trzech antybiotyków, ale bez wskazania konkretnych gatunków drobnoustrojów (penicylina: $S \leq 250$ i $R > 2000$, ampicylina: $S \leq 200$ i $R > 8000$, cyprofloksacyna: $S \leq 250$ i $R > 500$ µg/l), stąd brakuje odniesienia do uzyskanych wyników. Przeprowadzone badania szczepów *G. oxydans* H30, H31 i H32 mogą stanowić istotną podstawę do diagnozowania antybiotykooporności nowych potencjalnie probiotycznych szczepów bakterii kwasu octowego.

Aktualna definicja drobnoustrojów o właściwościach prozdrowotnych, probiotycznych została opublikowana w 2002 roku przez zespół ekspertów FAO/WHO. Zgodnie z nią drobnoustroje probiotyczne są to żywe mikroorganizmy, które, podawane w odpowiedniej liczbie, wywierają korzystny wpływ na zdrowie człowieka lub zwierząt, w tym głównie na mikroflorę jelitową. Dodatkowo tylko te drobnoustroje mogą być uznane za probiotyczne, którym podczas badań *in vitro* oraz *in vivo* nadano status GRAS oraz udowodniono korzystne efekty dla zdrowia. Określenie „drobnoustroje” w wyżej wymienionej definicji dotyczy zarówno wyselekcjonowanych szczepów bakterii, jak i drożdży. Najczęściej jednak, zarówno w sferze nauki, jak i przemysłu, określenie to zawężane jest do grupy bakterii kwasu mlekowego (ang. *Lactic Acid Bacteria*, LAB). Większość badań *in vitro* czy *in vivo* dotyczy szczepów bakterii LAB pochodzących z przewodu pokarmowego człowieka. W najnowszych doniesieniach naukowych znajdują się jednak informacje na temat pozyskiwania nowych szczepów o właściwościach prozdrowotnych, probiotycznych z żywności fermentowanej spontanicznie [13]. Drugą nową koncepcją jest zwrócenie uwagi na inne rodzaje drobnoustrojów niż bakterie LAB, m.in. na drożdże czy bakterie kwasu octowego. AAB wykazują dużą zdolność adaptacji do panujących warunków środowiskowych, w przeciwień-

stwie do większości znanych szczepów probiotycznych należących do bakterii fermentacji mlekowej, co jest ważną cechą technologiczną w produkcji żywności.

Kolejnym ważnym problemem jest nadużywanie antybiotyków, co skutkuje rozprzestrzenianiem się genów oporności na antybiotyki pomiędzy innymi populacjami mikroorganizmów, dlatego wrażliwość probiotyków na konwencjonalne antybiotyki zaczyna stanowić jedną z podstawowych cech prozdrowotnych takiego szczepu. Najbardziej popularne szczepy probiotyczne należące głównie do grupy LAB mogą nabywać bądź przekazywać geny oporności na antybiotyki innym szczepom probiotycznym lub bakteriom patogennym [4, 10, 15].

Przedstawione wyniki badań mają charakter nowatorski i są pierwszą próbą charakterystyki wybranych szczepów bakterii kwasu octowego jako mikroorganizmów probiotycznych. Na podstawie przeprowadzonych badań wstępnych stwierdzono, że wykazują one pożądane cechy bakterii probiotycznych. Udowodniono, że wyselekcjonowane szczepy AAB mają zdolność przeżywania w modelowym przewodzie pokarmowym człowieka. Aktualnie za wywołującą efekt probiotyczny uznaje się liczbę mikroorganizmów na poziomie minimum 10^6 jtk znajdujących się w gramie/mililitrze produktu żywnościowego lub preparatu farmaceutycznego. W przedstawionych badaniach taki wynik uzyskano po 2 h trawienia hodowli monokultur AAB w soku żołądkowym, co jest dodatkowym potwierdzeniem słuszności wybrania tej grupy bakterii do badań w kierunku ich potencjalnych właściwości probiotycznych. Podsumowując, można stwierdzić, że odpowiednio opracowana i prowadzona diagnostyka w grupie bakterii kwasu octowego może być istotnym wkładem naukowym w rozszerzanie wiedzy na temat potencjalnie prozdrowotnych właściwości tych drobnoustrojów.

Wnioski

1. Na podstawie analizy fenotypu i sekwencjonowania genu 16S rRNA spośród dziewięciu izolatów bakterii kwasu octowego, do badań w kierunku określenia potencjalnych cech probiotycznych wybrano trzy szczepy należące do gatunku *G. oxydans*: H31 wyizolowany z czarnej porzeczki oraz H30 i H32 – z kultury startowej do produkcji herbaty Kombucha.
2. Stwierdzono, że dwa szczepy *G. oxydans*: H30 wyizolowany z Kombuchy i *G. oxydans* H31 pochodzący z czarnej porzeczki charakteryzują się dobrą przeżywalnością, średnio na poziomie 6 log jtk/ml, podczas pasażu przez modelowy układ pokarmowy człowieka i tym samym spełniają jedno z podstawowych kryteriów bakterii potencjalnie probiotycznych.
3. Wszystkie badane szczepy wykazywały zbliżoną antybiotykowrażliwość. Stwierdzono, że otrzymane wyniki mogą stanowić istotną podstawę do diagnozowania antybiotykooporności nowych szczepów potencjalnie probiotycznych, dotyczących bakterii kwasu octowego.

4. Przeprowadzona diagnostyka wyselekcjonowanych szczepów bakterii kwasu octowego stanowi podstawę do dalszych badań tych mikroorganizmów w kierunku innych cech potencjalnie probiotycznych.

Badania wykonano w ramach wewnętrznego trybu konkursowego dla młodego pracownika nauki SGGW w Warszawie.

Literatura

- [1] Antolak H., Kręgiel D.: Bakterie kwasu octowego – taksonomia, ekologia oraz wykorzystanie przemysłowe. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2015, 4 (101), 21-35.
- [2] Antolak H., Kręgiel D.: Bakterie kwasu octowego – istotne zagrożenie w przemyśle spożywczym. *Przem. Spoż.*, 2014, 68, 12-16.
- [3] Bhardwaj A., Gupta H., Kapila S., Kaur G., Vij S., Malik R.K.: Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 2010, 141, 156-164.
- [4] Biradar S.S., Bahagvati S.T., Shegunshi B.: Probiotics and antibiotics: A brief overview. *The Internet J. Nutr. Welln.*, 2004, 2 (1), 1-6.
- [5] Blaskovich M.A.T., Hansford K.A., Butler M.S., Jia Z., Mark A.E., Cooper M.: Developments in glycopeptide antibiotics. *ACS Infect. Dis.*, 2018, 4, 715-735.
- [6] Crotti E., Rizzi A., Chouaia B., Ricci I., Favia G., Alma A., Sacchi L., Bourtzis K., Mandrioli M., Cherif A., Bandi C., Daffonchio D.: Acetic acid bacteria, newly emerging symbionts of insects. *App. Envir. Microbiol.*, 2010, 6963-6970.
- [7] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zones diameters. Version 8.1, 2018. [on line]. Dostęp w Internecie [20.05.2019]: <http://www.eucast.org>
- [8] Gonzalez A., Mas A.: Differentiation of acetic acid bacteria based on sequence analysis of 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, 147, 217-222.
- [9] Gupta A., Singh V.K., Qazi G.N., Kumar A.: *Gluconobacter oxydans*: It's biotechnological applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 3 (3), 445-456.
- [10] Haghshenas B., Nami Y., Abdullah N., Radiah D., Rosli R., Barzegari A., Khosroushahi A.Y.: Potentially probiotic acetic acid bacteria isolation and identification from traditional dairies microbiota. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2015, 50, 1056-1064.
- [11] Kręgiel D., Otlewska A., Antolak H.: Attachment of *Asaia bogorensis* originating in fruit-flavored water to packaging materials. *BioMed Res. Int.*, 2014, #514190. DOI: 10.1155/2014/514190.
- [12] Neffe-Skocińska K., Sionek B., Ścibisz I., Kołożyn-Krajewska D.: Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA – J. Food*, 2017, 15 (4), 601-607.
- [13] Rzepkowska A., Zielińska D., Kołożyn-Krajewska D.: Przeżywalność szczepów *Lactobacillus* wyizolowanych z żywności w warunkach modelowego przewodu pokarmowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2015, 3 (100), 42-52.
- [14] Sainz F., Mas A., Torija M.J.: Effect of ammonium and amino acids on the growth of selected strains of *Gluconobacter* and *Acetobacter*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2017, 242, 45-52.
- [15] Temmerman R., Pot B., Huys G., Swings J.: Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, 81, 1-10.

- [16] Wichienchot S., Prasertsan P., Hongpattarakere T., Gibson G.R., Rastall R.A.: *In vitro* fermentation of mixed linkage glucooligosaccharides produced by *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 by the human colonic microflora. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.*, 2005, 7, 7-12.
- [17] Yamada Y., Yukphan P.: Genera and species in acetic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, 125, 15-24.
- [18] Zaręba D.: Przeżywalność probiotycznego szczepu *Lactobacillus acidophilus* w mleku niefermentowanym i fermentowanym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, 5 (60), 189-196.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ACETIC ACID BACTERIA WITH POTENTIAL PROHEALTH PROPERTIES

S u m m a r y

The objective of the research study was to isolate and identify acetic acid strains (AAB) in the polyphasic system and to *in vitro* predefine their potential probiotic properties under the laboratory conditions.

The material for the isolation of acetic acid strains were seasonal fruits from local crops in the Mazovian and Łódź provinces and a starter culture for the production of Kombucha. The strain identification was carried out using a polyphasic system based on the morphological profile, biochemical abilities and genetic identification. Based on the results obtained, an AAB strain collection was created that were safe for the human health. Next, there was determined the antibiotic susceptibility to 12 selected bacteria killing substances and the tests were performed of *in vitro* survival of selected strains under the conditions of a model human gastrointestinal tract. Based on the phenotype analysis and the sequencing of the 16S rRNA gene from among 9 isolates of AAB, 3 strains belonging to *Gluconobacter oxydans* species were selected: H31 isolated from black currant, and H30 and H32 from the starter culture for the production of Kombucha tea. It was found that two strains, *G. oxydans* H30 isolated from Kombucha and *G. oxydans* H31 from black currant, were characterized by a good survival rate at a level of 6 log CFU/ml while passing through the model human digestive system and thus they met one of the basic criteria for potentially probiotic bacteria. All the strains analysed showed the similar antibiotic susceptibility. The conducted diagnostics of selected acetic acid bacterial strains constitutes a basis for further studies of those microorganisms for the purpose of confirming other probiotic features.

Key words: acetic acid bacteria (AAB), probiotics, *in vitro* survival, fruits, Kombucha ☒