

Received: 2016.03.23
Accepted: 2016.12.16
Published: 2017.05.05

Bakteriocyny bakterii fermentacji mlekowej jako alternatywa antybiotyków

Bacteriocins from lactic acid bacteria as an alternative to antibiotics

Aleksandra Ołdak, Dorota Zielińska

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności

Streszczenie

Bakteriocyny to syntetyzowane rybosomalnie substancje o charakterze peptydowym, które hamują wzrost blisko spokrewnionych gatunków drobnoustrojów, przez liczne mechanizmy działania.

Coraz częściej występująca u bakterii patogennych oporność wielolekowa jest jednym z najistotniejszych problemów medycznych ostatnich lat. Naukowcy poszukujący nowoczesnych antybiotyków zwracają uwagę na potencjał kliniczny bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie fermentacji mlekowej.

Bakteriocyny mają wiele cech wspólnych z konwencjonalnymi antybiotykami, jednak różnią się od nich także w kilku aspektach. Mechanizm działania bakterioobójczego bakteriocyn jest niemal identyczny jak w konwencjonalnych antybiotykach. Charakter genów kodujących bakteriocyny czyni je jednak łatwo podatnymi na zastosowanie metod bioinżynierii, przez co możliwe jest zwiększenie aktywności bakteriocyn oraz modulowanie zakresu działania bójczego. Ponadto, często bardzo ograniczony zakres skuteczności antybiotycznej polegający na hamowaniu wzrostu jedynie określonego gatunku, może chronić naturalną mikroflorę jelitową w czasie terapii.

Bakteriocyny wytwarzane przez bakterie fermentacji mlekowej są jedną z najbardziej przebadanych grup substancji o charakterze przeciwdrobnoustrojowym, jednak prace nad ich wykorzystaniem terapeutycznym są nadal w toku. Badania naukowe obejmują wskazanie najbardziej podatnych drobnoustrojów docelowych, ale także opracowanie najskuteczniejszych kombinacji substancji czynnych, ich stężenia i czasu terapii. Innym nurtem są badania nad możliwościami ich wykorzystania do przedłużania trwałości żywności lub w terapii weterynaryjnej. W artykule omówiono bakteriocyny jako potencjalną alternatywę w stosunku do konwencjonalnych antybiotyków na podstawie najnowszych doniesień naukowych.

Słowa kluczowe: bakteriocyny • antybiotyki • bakterie fermentacji mlekowej • antybiotykooporność

Summary

Bacteriocins are ribosomally synthesized, proteinaceous substances that inhibit the growth of closely related species through numerous mechanisms. The classification system used in this review divided bacteriocins into four sub-groups based on their size. Currently, there is extensive research focused on bacteriocins and their usage as a food preservative.

The increasing incidence of multidrug resistant bacterial pathogens is one of the most pressing medical problems in recent years. Recently, the potential clinical application of LAB (Lactic Acid Bacteria) bacteriocin has been the subject of investigations by many scientists.



Key words:	Bacteriocins can be considered in a sense as antibiotic, although they differ from conventional antibiotics in numerous aspects. The gene-encoded nature of bacteriocins makes them easily amenable through bioengineering to either increase their activity or specify target microorganism. Owing to this feature of bacteriocins, antibiotic therapy would become less damaging to the natural gut microflora, which is a common drawback of conventional antibiotic use. Bacteriocins from lactic acid bacteria represent one of the most studied microbial defense systems and the idea of subjecting them to bioengineering to either increase antimicrobial activity or further specify their target microorganism is now a rapidly expanding field. This review aimed to present bacteriocins as a possible alternative to conventional antibiotics basic on latest scientific data. bacteriocins • antibiotics • lactic acid bacteria • antibiotic resistance
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1237161
DOI:	????????????????????????????????????
Word count:	3522
Tables:	3
Figures:	2
References:	72

Adres autorki: dr inż. Dorota Zielińska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności; e-mail: dorota_zielinska@sggw.pl

WSTĘP

Obserwowany od kilku lat zdecydowany wzrost oporności na antybiotyki wśród patogennych szczepów drobnoustrojów jest obecnie jednym z największych wyzwań stojących przed środowiskiem lekarskim, akademickim i farmaceutycznym [44]. Bakterie antybiotykooporne zagrażają zdrowiu i życiu ludności, a organizacje, takie jak WHO alarmują, że koszty leczenia zakażeń będą wciąż rosły. Antybiotykooporność bakterii nie jest zjawiskiem nowym, jednak skala problemu pogłębia się. Liczne mikroorganizmy patogenne, które dzięki antybiotekom przestały stanowić śmiertelne zagrożenie, ponownie stają się niebezpieczne. Dodatkowym problemem wydaje się trudność w badaniu i reagowaniu na nowe mechanizmy wykształcania oporności i niespotykane dotychczas tempo przenoszenia genów oporności między szczepami i gatunkami drobnoustrojów [33]. Wielu autorów podkreśla, że najważniejszą przyczyną tego jest niewłaściwe podawanie i nadużywanie antybiotyków przez lekarzy i pacjentów [12,33].

Od kilku lat peptydy o działaniu przeciwbakteryjnym są obiektem badań naukowców opracowujących nowoczesne antybiotyki. Szczególne nadzieje wiąże się z bakteriocynami – peptydami przeciwdrobnoustrojowymi syntetyzowanymi przez bakterie rodzaju *Lactobacillus* i inne bakterie fermentacji mlekowej (LAB – lactic acid bacteria) [12].

Bakterie fermentacji mlekowej (LAB) i ich metabolity są ogólnie uznawane za bezpieczne (GRAS – Generally Con-

sidered As Safe) i są z powodzeniem wykorzystywane w przemyśle spożywczym jako naturalne konserwanty [18,55]. Oczyszczone preparaty bakteriocyn, takie jak: dostępne komercyjnie Nisaplin® (nizyna A), czy ALTA 2341 (pediocyna PA-1) z powodzeniem są stosowane do konserwowania żywności. Wielokrotnie wykazano, że stosowanie naturalnych związków przeciwdrobnoustrojowych, syntetyzowanych przez LAB w zapobieganiu wzrostowi patogenów w żywności jest skuteczne [6,18,48,71].

Bakteriocynty to aktywne przeciwdrobnoustrojowe substancje, o strukturze białkowej, pod wieloma względami przypominające antybiotyki. W tabeli 1 zamieszczono różnice między bakteriocynami, a konwencjonalnymi antybiotykami [8,55].

Bakteriocynty są odporne na stres związany z wysoką temperaturą, a tolerują szerszy zakres pH w porównaniu do klasycznych antybiotyków. Dzięki białkowej naturze oraz mechanizmom działania, rozwój oporności u bakterii stanowiących cel bakteriocyny jest prawie niemożliwy. W odróżnieniu od antybiotyków, które są przeważnie wtórnymi metabolitami, bakteriocyny są zwykle syntetyzowane rybosomalnie, w czasie fazy G1, dzięki czemu są coraz częstszym przedmiotem prac bioinżynieryjnych [8,12,55]. Masa cząsteczkowa bakteriocyn rzadko przekracza 10 kDa, ponadto mogą być łatwo trawione przez proteazy w przewodzie pokarmowym człowieka, dzięki czemu można wnioskować o ich bezpieczeństwie [8,55].

Tabela 1. Różnice między bakteriocynami a antybiotykami

Rozpatrywany wyróżnik	Bakteriocyny	Antybiotyki
Zastosowanie	Żywność / Kliniczne	Kliniczne
Sposób syntezy	Rybosomalne	Wtórne metabolity
Zakres działania	Wąskie	Szerokie
Aktywność	Nano- i mikromolowe ilości	Mikro- i milimolowe ilości
Stabilność termalna	Duża	Mała
Aktywność w pH	Szeroki zakres	Wąski zakres
Barwa/ smak/ zapach	Brak	Występuje
Podatność na działania bioinżynierii	Tak	Nie
Toksyczność w stosunku do komórek eukariotycznych	Nie	Tak

Opracowanie własne na podstawie [55]

Celem pracy jest zaprezentowanie bakteriocyn jako potencjalnej alternatywy w stosunku do konwencjonalnych antybiotyków na podstawie najnowszych doniesień naukowych dotyczących ich funkcji, mechanizmów działania i badań *in vivo*.

KLASYFIKACJA BAKTERIOCYN

Większość bakteriocyn syntetyzowanych przez LAB to małe, kationowe, termostabilne amfifilowe peptydy, których mechanizm działania jest związany z permeabilizacją błony komórkowej. W ciągu ostatnich 30 lat klasyfikacja bakteriocyn zmieniała się i podlegała rewizji w oparciu o wyniki szeroko zakrojonych badań struktury cząsteczek i mechanizmu działania. Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, bakteriocyny bakterii fermentacji mlekowej można podzielić na trzy główne klasy [11] (tabela 2).

W klasie I zgrupowano lantybiotyki, czyli polipeptydy zawierające charakterystyczne policykliczne aminokwasy tioeterowe, np. lantionina czy metylantionina i nienasycone aminokwasy, tj. dehydroalanina i kwas 2-aminomasłowy [3]. Występowanie nietypowych aminokwasów wynika z potranslacyjnych modyfikacji cząsteczek. Bakteriocyny klasy I wytwarzane przez LAB mają niską masę cząsteczkową (<5 kDa) i dużą oporność termiczną [3,52]. Bazując na podobieństwach strukturalnych, wydzielono w tej klasie dwa typy cząsteczek: A i B. Amfipatyczne, naładowane dodatnio cząsteczki typu A są wydłużone, elastyczne i często przyjmują przestrzenną strukturę przypominającą śrubę. Charakteryzują się niską masą cząsteczkową 2-4 kDa i na ogół działają przez stymulowanie tworzenia się porów oraz przez depolaryzację błony cytoplazmatycznej komórek wrażliwych gatunków docelowych [52]. Najczęściej badacze podają w tym typie przykłady nizyny i laktacyny 3147. Lantybiotyki typu B to struktury kuliste,

które działają przez zakłócenie komórkowych reakcji enzymatycznych. Ich masa cząsteczkowa wynosi 2-3 kDa i albo nie zawierają ładunku lub mają ujemny ładunek netto. Niektórzy badacze wyróżniają również w klasie I podklasy saktibiotyków oraz labiryntopeptydów [52].

Bakteriocyny klasy II, to także małe cząsteczki (<10 kDa), względnie trwale termicznie, niezawierające lantioniny [52]. Są podzielone na cztery główne podklasy. Podklasa IIa obejmuje bakteriocyny pediocynopodobne, szczególnie skuteczne przeciwko bakteriom z rodzaju *Listeria*. Cząsteczki zgrupowane w tej podklasie charakteryzują się N-końcową konsensusową sekwencją aminokwasową Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys. Wykazują wysoki stopień homologii (40-60%) [21,46]. Typowe dla procesu syntezy tego typu bakteriocyn jest również występowanie peptydu liderowego, usuwanego w wyniku proteolitycznej obróbki cząsteczki. Podklasa IIB składa się z bakteriocyn dwuskładnikowych, którym do pełnej aktywności jest niezbędne występowanie dwóch oddzielnych peptydów. Oba łańcuchy wykazują działanie synergistyczne i potęgują działanie antymikrobiologiczne, albo też pojedynczo nie wykazują żadnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej [52,64]. Do podklasy tej zalicza się najczęściej laktocyny F i G oraz laktokokcyny. W podklasie IIC zgrupowano cząsteczki o strukturze kołowej, znacznie bardziej niż inne odporne na działanie proteaz, wykazujące aktywność antylisterijną [64]. Podklasa IID zawiera wszystkie inne liniowe bakteriocyny, niemodyfikowane potranslacyjnie [15].

Najmniej poznana klasa III zawiera termolabilne białka o dużej masie cząsteczkowej (> 30 kDa). Należą do niej helwetycyna J wytwarzana przez *Lactobacillus helveticus* i enterolizyna syntetyzowana przez *Enterococcus faecium*. Obecnie część badaczy wyklucza tę klasę z grupy bakteriocyn, określając cząsteczki bakteriolizynami [21].



Tabela 2. Klasyfikacja bakteriocynt

Klasa	Opis	Typ/Podklasa	Przykłady
I	Lantybiotyki, małe (<5 kDa) peptydy zawierające β-lantioninę	Typ A	Nizyna, Subtilina, Epidermina
		Typ B	Mersacydyna
II	Małe (<10 kDa) stabilne termicznie peptydy, nie zawierające lantioniny	Podklasa IIa	Pediocyna PA-1/AcH, Saracyna A, Leukocyna A
		Podklasa IIb	Plantarycyna EF, Laktacyna F
		Podklasa IIc	Laktokokcyna Q, Enterocyna As-48
III	Bakteriolizyny, duże, termolabilne peptydy		Helvetycyna J, Millerycyna B

Opracowanie własne na podstawie [11]

Tabela 3. Mechanizm działania bakteriocynt i antybiotykw konwencjonalnych

Mechanizm	Bakteriocynta	Antybiotykw konwencjonalny
Zaburzenie biosyntezy ściany komórkowej	Nizyna A, nukacyna ISK-1	Glikopeptydy, β-laktamy
Hamowanie transkrypcji lub replikacji DNA	Mikrocyna B17, kolicyny, karocyna S2	Chinolony
Uszkodzenia błony komórkowej	Plantarycyny, disgalaktycyna, laktokokcyna, bakteriocynty pediocynopodobne, laktacyna Q, nizyna A, mesenterycyna Y105	Lipopeptydy
Zaburzenie biosyntezy białek	Kolicyny	Aminoglikozydy, tetracykliny, chloramfenikol, streptograminy
Tworzenie sept w błonie komórkowej	Garvicyna A, laktokokcyna 972	Pochodne benzamidu, kwasy karboksylowe

Opracowanie własne na podstawie [8]

MECHANIZMY PRZECIWDROBNOUSTROJOWEGO DZIAŁANIA BAKTERIOCYNT

Mechanizm działania konwencjonalnych antybiotykw przeważnie jest związany z oddziaływaniem na przebieg co najmniej jednego z pięciu głównych procesów, prowadzonych w komórce wrażliwej [8]. Najczęściej wykazywany przez antybiotyki efekt przeciwdrobnoustrojowy wynika z:

- zakłócenia procesu biosyntezy peptydoglikanu budującego ściany komórkowe;
- hamowania biosyntezy białek;
- hamowania biosyntezy kwasu foliowego;
- zaburzenia przebiegu replikacji DNA i transkrypcji w komórce wrażliwej;
- przerywania ciągłości błony komórkowej [8,33].

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa bakteriocynt jest związana także ze zdolnością do zakłócania przebiegu wspomnianych procesów. Co więcej, niektóre bakteriocynty wykazują inne mechanizmy działania, czy też korzystają jednocześnie z kilku miejsc docelowych w komórkach wrażliwych. W tabeli 3 zestawiono mechanizmy wykorzystywane przez bakteriocynty i konwencjonalne antybiotyki.

Bakteriocynty mogą hamować wzrost komórek bakterii szczepów blisko spokrewnionych, ale wykazano także, że często dodatkowo powstrzymują rozwój przetrwalników bakteryjnych, a nawet działają fungistatyczne [40,41,69]. Antybiotyki należą do związków chemicznych o znacznie szerszym zakresie działania, co może być związane także z występowaniem licznych działań niepożądanych [44]. Badania nad możliwościami stosowania bakteriocynt

w celach klinicznych wymagają dokładnego sprawdzenia potencjalnych działań niepożądanych oraz oszacowania prawdopodobieństwa występowania bakteriocynoporności u szczepów [8]. Bakteriocyny działają wobec czterech, spośród pięciu wyżej wymienionych klinicznie istotnych celów antybiotykowych [44]. Dotychczas nie zaobserwowano bakteriocyn hamujących biosyntezę kwasu foliowego [8].

Uszkodzenie lub hamowanie biosyntezy ściany komórkowej jest jednym z najskuteczniejszych mechanizmów oddziaływania na drobnoustroje chorobotwórcze [50]. Proces syntezy ściany komórkowej jest wysoce konserwatywny u wielu bakterii patogennych, a jednocześnie nie zachodzi w komórkach ssaków. Ponadto, ściana komórkowa jest integralną częścią komórki bakteryjnej, bez której nie może funkcjonować. Pozwala zachować morfologię i integralność, a także umożliwia redukcję wpływu zmiennego ciśnienia osmotycznego na komórkę. Mechanizm działania β -laktamów opiera się m.in. na blokowaniu syntezy ściany komórkowej [8,45,50]. Obecnie stosowane, konwencjonalne antybiotyki hamują syntezę ściany komórki docelowej na czterech różnych etapach tworzenia peptydoglikanu:

- hamują syntezę lipidu II;
- blokują aktywność nośników cząsteczek lipidu II;
- zatrzymują proces polimeryzacji cząsteczek lipidu II;
- wiążą i blokują miejsca aktywne w białku wiążącym penicylinę (PBP – Penicillin Binding Protein) [33, 36].

Bakteriocyny często oddziałują według wspomnianych mechanizmów. Nizyna A, syntetyzowana przez *Lactococcus lactis* jest jednym z najbardziej popularnych lantibiotyków. Model działania tej bakteriocyny został dokładnie przebadany i wykazano, że oddziałuje na komórkę wrażliwą na kilka sposobów. Nizyna łączy się z lipidem II, prekursorem peptydoglikanu budującego ścianę komórkową. Ponadto cząsteczki nizyny ułożone w „jednostkach permeabilizujących” powodują wykształcenie się porów w błonie komórkowej, co prowadzi do śmierci komórki wrażliwej (ryc.1). W wysokich stężeniach bakteriocyny, działanie antibakteryjne może być podzielone na dwa etapy, z których pierwszy jest bakteriostatyczny a drugi bakteriobójczy [26,33,45]. Wykazano także, że nizyna może działać jako czynnik lityczny [58]. Natomiast trójpierścieniowy lantibiotyk - laktycyna 481, który zawiera motyw wiążący lipid II, działa głównie przez hamowanie syntezy peptydoglikanu katalizowanej przez PBP [9].

Od kilku dekad β -laktamy są jednymi z najpopularniejszych i najczęściej stosowanych antybiotyków, przez co drobnoustroje patogenne miały możliwość wykształcenia licznych mechanizmów oporności na ich działanie [26]. Obserwowany w ostatnich latach spadek ich skuteczności w leczeniu zakażeń szpitalnych potęguje potrzebę wskazania skutecznej terapii alternatywnej

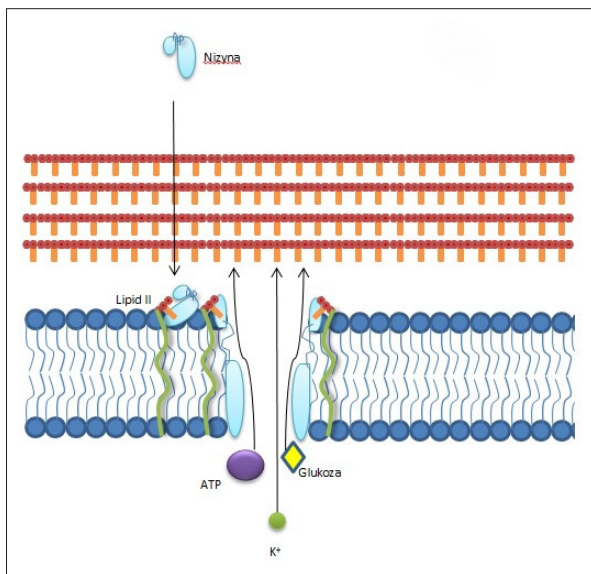
[8]. Oporność patogenów na β -laktamy może być wynikiem syntezy enzymów degradujących, tj. penicylinazy i karbapenemazy [26]. Badacze wskazują na duży potencjał bakteriocyn, zwłaszcza lantibiotykowych, w hamowaniu tego niekorzystnego zjawiska. Jednocześnie należy podkreślić, że odnotowano także występowanie lantibiotykooporności u drobnoustrojów oraz wykształcanie się jej, szczególnie u bakterii narażonych na ich działanie w stężeniach subletalnych przez dłuższy czas [4,34,37].

Nie wszystkie bakteriocyny, powodujące permeabilizację błony komórkowej, wykorzystują jako miejsce wiązania lipid II [17]. W komórkach *Listeria monocytogenes* zidentyfikowano miejsce wiązania wielu bakteriocyn z podklasy IIA. Początkowo, α -helikalne fragmenty cząsteczek bakteriocyny wiążą się elektrostatycznie z powierzchnią błony, za pośrednictwem receptora błonowego, którym najprawdopodobniej są elementy systemu fosfotransferazy mannozy (man-PTS – mannose phosphotransferase system) (ryc. 2). Następnie, hydrofobowe fragmenty w obrębie C-końcowej części cząsteczki bakteriocyny oddziałują z łańcuchami fosfolipidów w błonie komórkowej. N-końcowy fragment bakteriocyny oddziałuje nieswoiście z powierzchnią błony. Ponieważ układ dąży do uzyskania możliwie korzystnego potencjału energetycznego, niepolarnie części peptydu zostają skierowane do wnętrza błony. Oddziaływania hydrofobowe między C-końcową częścią cząsteczki a łańcuchami lipidowymi fosfolipidów błony sprawiają, że błona komórkowa traci ciągłość i powstają pory, przez które wypływają niskocząsteczkowe składniki komórki. Wypływ jonów zaburza siłę protonomotoryczną (gradientu pH po obu stronach błony lub potencjału membranowego), co blokuje syntezę ATP. Letalne działanie bakteriocyn pediocynopodobnych jest spowodowane głównie przez zakłócenie równowagi jonowej i wpływ z komórki nieorganicznych fosforanów [22,23,24,47].

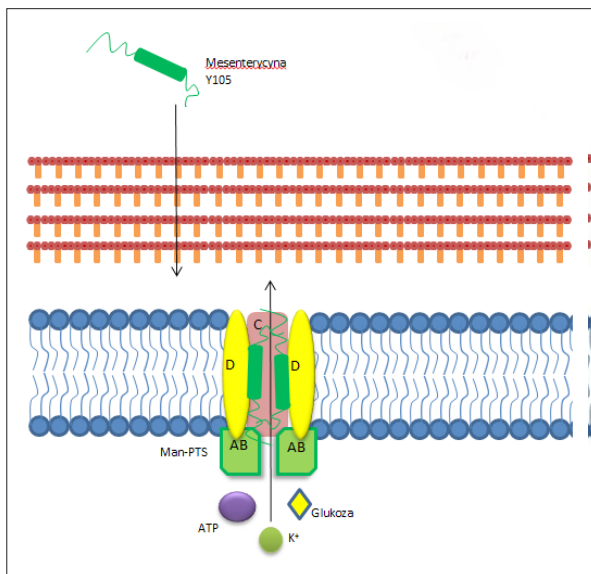
Fosfotransferaza mannozy jest złożonym enzymem odpowiadającym za wychwyt glukozy i jej fosforylację, szczególnie istotnym u bakterii z typu *Firmicutes* [72]. Każdy kompleks man-PTS składa się z czterech podjednostek – IIC i IID umieszczonych w poprzek błony komórkowej oraz IIA i IIB, zazwyczaj występujących jako pojedyncze białka cytoplazmatyczne, wykazujące zdolność do odwracalnego przyłączania się synergicznie do podjednostek błonowych [32].

Wykazano, że w proces wiązania (bakteriocyn) pediocynopodobnych bakteriocyn do błony komórkowej są zaangażowane podjednostki IIC i IID, a podjednostki cytoplazmatyczne nie uczestniczą w nim. Sugeruje się, że w większości bakteriocyn z tej grupy bezpośrednim miejscem wiązania bakteriocyny jest swoisty region około 40 aminokwasów w podjednostce IIC, jednak, prawdopodobnie laktokokcyna A, należąca do podklasy IIC, oddziałuje bezpośrednio z oboma podjednostkami – IIC i IID [32].





Ryc. 1. Permeabilizacja błony komórkowej i wpływ niskocząsteczkowych substancji z komórki bakteryjnej wywołany działaniem nizyny; CM – błona komórkowa, CW – ściana komórkowa (opracowanie własne na podstawie [16])



Ryc. 2. Permeabilizacja błony komórkowej i wpływ niskocząsteczkowych substancji z komórki bakteryjnej wywołany działaniem mesenterycyny Y105; CM – błona komórkowa, CW – ściana komórkowa (opracowanie własne na podstawie [16])

Wykazano, że mutanty *L. monocytogenes* wrażliwych na mesenterycynę Y105 miały nieaktywny gen *rpoN*, który jest niezbędny do ekspresji operonu systemu fosfotransferazy mannozy (phosphotransferase system – PTS) [14,27]. Ponadto, sklonowanie genów kodujących man-PTS do genomu niewrażliwych na bakteriocyny pediocynopodobne szczepów *Lactobacillus lactis*, czyniło je wrażliwymi na enterocynę A, pediocynę PA-1 oraz leukocynę A [61]. Pozbawienie bakterii *L. monocytogenes* podjednostki IIAB, wchodzącej w skład PTS mannozy czyniło je opornymi na działanie leukocyny A [60].

Wykazano także, że aktywność bakteriocyny zależy także od chiralności cząsteczki. Enancjomer D-leukocyny A jest aktywny przeciwko mniejszej liczbie szczepów niż postać L-leukocyny A [61]. Przypuszczalnie jedna z podjednostek systemu man-PTS ma właściwości chiralne [32]. Sugeruje się, że wrażliwość *L. monocytogenes* na działanie bakteriocyn z podklasy IIa może być regulowana pośrednio przez stopień ekspresji σ 54-zależnej permeazy PTS, którą można indukować zwiększając w pożywce zawartość glukozy lub mannozy, co obserwowano na przykładzie mesenterycyny Y105 [60].

W razie nabycia przez bakterię oporności na działanie danej bakteriocyny z podklasy IIa, np. przez sklonowanie genu oporności, bakteriocyna tworzy z podjednostkami mannozowego PTS bardzo silny kompleks, który można wyizolować. Wówczas podjednostki IIAB, IIC i IID wiążą się z cząsteczką bakteriocyny, blokując możliwość powstawania porów w błonie i ścianie komórkowej, co zapobiega efektowi letalnemu odpornej cząsteczki. Powstanie silnego kompleksu hamuje również działanie systemu man-PTS, a więc wychwyt cukrów, powodując spowolnienie wzrostu komórek w środowisku zawiera-

jącym glukozę lub mannozę, jako jedyne źródło energii [17]. Dalsze badania wykazały, że zastosowanie galaktozy jako źródła energii w pożywce umożliwiło dalszy wzrost bakterii [32,51].

Laktocyna P, wytwarzana przez *L. lactis* QU 5, tworzy pory w błonie komórki wrażliwej, przez które wyciekają białka. Aktywność bakteriocyny zależy od stopnia nagromadzenia rodników hydroksylowych, jest także znacząco większa w porównaniu do bakterii Gram-dodatnich. Natomiast laktocyna Q wykazuje selektywność w hamowaniu wzrostu bakterii Gram-dodatnich i nie wykazuje żadnej aktywności w stosunku do Gram-ujemnych szczepów wskaźnikowych, co jest związane z fizyko-chemicznymi różnicami w zewnętrznej budowie błony [28].

Jak dotąd zaobserwowano także inne mechanizmy działania bakteriocyn. Związki, których aktywność wynika z oddziaływań innych niż dotychczas stosowanych antybiotyków konwencjonalnych, mogą być szczególnie obiecujące w zwalczaniu drobnoustrojów patogennych. Jednym z nowych mechanizmów jest blokowanie powstawania sept w komórkach wrażliwych [8].

Badania prowadzone z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej wykazały, że komórki bakteryjne nie są, jak to długi czas przyjmowano, strukturami nieuporządkowanymi [19]. Zaobserwowano, że komórki mają uporządkowaną organizację, w której białka i ich kompleksy są utrzymywane przez białkowe elementy o charakterze zbliżonym do cytoszkieletu komórek eukariotycznych [65]. Opisano wiele homologów białek cytoszkieletowych występujących w komórkach prokariotycznych, m.in. CreS, odpowiednik filamentów pośrednich, który warunkuje kształt półksiężyca *Caulobacter crescentus*,

MreB, odpowiednik aktyny utrzymujący wydłużony kształt pałeczek oraz FtsZ zastępujący tubulinę, inicjujący powstanie przegrody podziałowej w czasie podziału mitotycznego i MinD kontrolujący położenie tej przegrody, a także ParA odpowiadający za segregację chromosomów po replikacji [39,57]. Bakteryjny odpowiednik tubuliny – białko FtsZ jest celem bakteriocyn działających według nowo poznanego schematu [8].

Przegroda mitotyczna powstaje z warstwy błony komórkowej oraz mukopeptydu w końcowej fazie podziału komórkowego. Stosowanie antybiotyków w trakcie procesu cytokinezy hamuje cykl komórkowy. Zaobserwowano, że dwie bakteriocyny garwicyna A i laktokokycyna 972 hamują powstawanie przegrody mitotycznej [42,43]. Garwicyna A wykazuje wąski zakres aktywności w stosunku do innych szczepów *Lactococcus garvieae*, podczas gdy laktokokycyna 972 hamuje wzrost wyłącznie blisko spokrewnionych *Lactococcus* spp. Mechanizm działania laktokokycyny 972 polega na blokowaniu procesu wpuklania przegrody, co znacząco wydłuża i poszerza komórki [43]. Może się wydawać, że cel bakteriocyny jest podobny do blokowania syntezy ściany komórkowej, laktokokycyna 927 wykorzystuje inny mechanizm oddziaływania na komórkę i inne miejsce wiązania. Badacze sugerują, że celem działania bakteriocyn tego typu mogą być białka FtsZ, FtsA i ZipA [8].

Jak dotąd nie zidentyfikowano antybiotyków blokujących białko FtsZ, jednak należy wspomnieć, że potwierdzono hamowanie jego aktywności przez inne niskocząsteczkowe związki przeciwdrobnoustrojowe [8]. Autorzy sugerują, że korzystne może być poszukiwanie innych związków przeciwdrobnoustrojowych działających zgodnie z tym mechanizmem i konieczne są prace bioinżynieryjne mające na celu podniesienie skuteczności tego typu środków przez poszerzenie ich zakresu działania [15,29].

DZIAŁANIE SYNERGICZNE BAKTERIOCYN I KONWENCJONALNYCH ANTYBIOTYKÓW

W wielu badaniach wykazano, że łączenie bakteriocyn i konwencjonalnych antybiotyków może znacząco zwiększać skuteczność terapii [2]. Dwupeptydowa laktycyna 3147 może działać synergicznie z polimyksyną, podnosząc jej skuteczność w hamowaniu wzrostu *Cronobacter* spp. i *E. coli*. Co więcej, cztery plantarycyny – PlnE, PlnF, PlnJ i PlnK wykazują istotną aktywność przeciw *Candida* spp. Wykazano także, że dwie kombinacje plantarycyn – PlnJ i PlnK oraz PlnE i PlnF są najbardziej skuteczne w hamowaniu wzrostu *Candida albicans* [66]. Aktywność jest tak duża, że zastosowanie bakteriocyn mogłoby być potencjalnie istotną alternatywą w leczeniu kandydiozy. Podobnie zaobserwowano synergizm działania między laktycyną Q i nizyną. Stosowanie tych bakteriocyn wspólnie pozwala na zniesienie ograniczeń w stosowaniu ich osobno. Mieszanina bakteriocyn zachowuje aktywność w zasadowym pH, w którym nizyna ulega inaktywacji [25].

Możliwości terapii z wykorzystaniem synergicznych oddziaływań między bakteriocynami oraz bakteriocynami i antybiotykami konwencjonalnymi wydają się obiecujące. Liczba możliwych kombinacji jest wprost nieograniczona. Dobór związków może być kierowany np. miejscem wiązania danej bakteriocyny – wykorzystanie wiedzy na temat mechanizmu jej działania może zwiększać skuteczność mieszaniny lub podnosić aktywność czynnika przeciwdrobnoustrojowego. Wykazano, że kombinacja związków wiążących lipid II – nizyny i andramoplaniny była bardzo skuteczna przeciwko 14 z 20 badanych szczepów MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) [49]. Bakteriocyny mogą także obniżać wartości MIC początkowo niewrażliwych drobnoustrojów patogennych, jeśli są łączone z odpowiednim antybiotykiem [20]. Trzeba pamiętać, że działanie bakteriocyna-antybiotyk może być również całkowicie antagonizujące, przez co zostanie zniesiona ich aktywność przeciwdrobnoustrojowa. Wykazano, że zastosowanie nizyny i chloramfenikolu nie hamowało wzrostu szczepów MRSA [5].

OGRANICZENIA W ZASTOSOWANIU BAKTERIOCYN

Mimo dużego potencjału aplikacyjnego związanego z bakteriocynami, należy pamiętać o pewnych ograniczeniach w wykorzystaniu tych związków zarówno w medycynie, jak i w innych dziedzinach nauki i przemyśle [8]. Najistotniejszym problemem wydaje się oszacowanie zdolności bakterii patogennych do wykształcania oporności na bakteriocyny przy niewłaściwym stosowaniu, podobnie jak konwencjonalnych antybiotyków [45]. Wielu badaczy uważa, że stosowanie nowych związków antimikrobiologicznych może jedynie odroczyć powstanie w pełni opornych szczepów, a nie zrewolucjonizować rynek antybiotyków [8]. Co więcej, terapie synergistyczne (bakteriocyny i antybiotyki konwencjonalne stosowane wspólnie) wprawdzie bardzo skuteczne, mogą być powodem wykształcania szczepów podwójnie opornych. Mimo to, badania prowadzone z wykorzystaniem szczepów LAB wykazały, że wykształcenie oporności na bakteriocynę przeważnie obniża tempo wzrostu komórki w porównaniu do komórek wrażliwych [4]. Obecnie do wyjaśnienia pozostaje możliwość powstawania oporności krzyżowej na kilka klas bakteriocyn w komórkach patogennych [8]. Badań wymaga także ustalenie sposobu podawania bakteriocyn pacjentom - obecnie antybiotyki konwencjonalnie można dostarczać do organizmu doustnie, dożylnie, podskórnie i domięśniowo [2,62]. Podawanie doustnie peptydów o masie cząsteczkowej przewyższającej 3 kDa może być trudne ze względu na utrudnione wchłanianie, cząsteczki poniżej tej masy mogą być łatwo degradowane przez proteazy w układzie trawiennym [2]. Wszystkie te okoliczności, jak również krótki okres półtrwania bakteriocyn w osoczu, wskazują na konieczność zastosowania metod bioinżynierii do modyfikacji właściwości bakteriocyn *in vivo*. Badania powinny zmierzać do podniesienia wydajności syntezy, ale także poprawy ich stabilności. Należy także przeanalizować działanie związków w środowisku naturalnym [8].



METODY PODNOSZENIA WYDAJNOŚCI I STABILNOŚCI BAKTERIOCYN

Podnoszenie wydajności i stabilności bakteriocyn jest niezbędne ze względu na ich naturalne właściwości. Synteza tych związków jest przeważnie mało wydajna i zależna od swoistych czynników, a stabilność bakteriocyn zależy w dużej mierze od właściwości środowiska, tj. pH, temperatura czy obecności innych związków chemicznych. Bakteriocynty wytwarzane przez bakterie fermentacji mlekowej mogą być poddawane pewnym manipulacjom, mającym na celu poprawę ich cech użytkowych. Dotychczas pozytywne skutki takich działań odnotowano dla nizyny, laktocyny 3147, enterocyny E50-52 i pediocyny PA-1 [8].

Najdokładniej przebadano strukturę cząsteczki oraz mechanizm biosyntezy nizyny. Badania zaowocowały danymi, niezbędnymi do przeprowadzenia licznych modyfikacji w obrębie cząsteczki. Porównanie sekwencji bakteriocyn lantibiotykowych wskazuje na znaczne podobieństwo w obrębie pierwszej połowy peptydu liderowego. Wykazano, że w wielu z tych cząsteczek występuje skrajnie konserwatywna sekwencja F(N/D)LD typowa dla różnych lantibiotyków [53,56]. Wyniki licznych badań wykazują, że sekwencja może być podstawowa dla aktywności bakteriocyn klasy I i w obrębie tej sekwencji wprowadzono najwięcej modyfikacji strukturalnych. Często są modyfikowane pierścienie cząsteczki, stwierdzono, że pewne mutacje D-19A F-18H, F-18M, L-16D, L-16K i L-16A powodują intensyfikację biosyntezy nizyny w komórce [56]. Ponadto, w wyniku losowego usuwania N-końcowych pozycji pierścienia tioestrowych ustalono, że usunięcie pierścienia A zwiększa aktywność, usuwanie pierścieni D i E uniemożliwia permeabilizację błony komórek wrażliwych, natomiast otwarcie pierścienia B całkowicie znosi działanie przeciwbakteryjne [43].

Wytwarzanie bakteriocyn w komórkach bakteryjnych jest często mało wydajne, w związku z czym poszukuje się metod jej intensyfikacji. Wykazano, że wprowadzenie dodatkowych kopii genów inicjujących biosyntezę oraz regulatora LtnR zwiększa wytwarzanie laktocyny 3147 na wysokim poziomie. Wprowadzenie dodatkowych kopii genów strukturalnych, takich jak ltnA1A2, zmniejsza wytwarzanie bakteriocyn [10].

SKUTECZNOŚĆ BAKTERIOCYN *IN VIVO*

Dotychczasowe prace opisujące możliwości wykorzystania bakteriocyn jako substancji czynnych w produktach leczniczych, obejmowały przede wszystkim stosowanie preparatów zawierających komórki szczepów bakteriocynogennych. Zakładano, że bakterie, wprowadzone w ten sposób do mikrobiomu człowieka, będą syntetyzować bakteriocynty bezpośrednio w przewodzie pokarmowym (*in situ*). Relatywnie mało prac uwzględniało wykorzystanie oczyszczonych bakteriocyn. Profilaktyczne wykorzystanie szczepów o właściwościach probiotycznych jest obecnie zaakceptowane na świecie i szeroko stosowane. Wykorzystanie oczyszczonych

bakteriocyn w infekcji wydaje się bardzo istotne [38]. Właściwości te potwierdzono m.in. na przykładzie pediocyny PA-1 oraz preparatu szczepu *Pediococcus acidilactici* UL5 (który syntetyzuje bakteriocynę) w organizmach myszy zainfekowanych *L. monocytogenes* [13].

Istotną cechą części bakteriocyn (m.in. pediocynopodobnych) jest wąski zakres działania. Bakteriocynty z podklasy IIa wykazują bardzo silną selektywną aktywność antagonistyczną w stosunku do drobnoustrojów patogennych m.in. *L. monocytogenes*, jednocześnie pozostając bez wpływu na mikrobiom korzystny, występujący w organizmie. W badaniach wykazano, że pediocyna PA-1, nie wykazywała aktywności antagonistycznej w stosunku do bifidobakterii, występujących w przewodzie pokarmowym człowieka, w żadnym z testowanych stężeń [31,35]. Wykorzystanie bakteriocyn z klasy – nizyny A i Z, powodowało zahamowanie wzrostu większości Gram-dodatnich szczepów [31,35]. Co więcej, badania *in vivo*, prowadzone z wykorzystaniem organizmu myszy jako modelu, nie wykazały wpływu pediocyny PA-1 na skład mikroflory jelitowej [35], w przeciwieństwie do klasycznych antybiotyków, tj. penicyliny i tetracykliny, które silnie hamują wzrost pozytywnej mikroflory organizmu [35]. Wykazano także, że nizyna V działa skuteczniej w porównaniu do *L. monocytogenes* niż nizyna A [7].

Bakteriocynty podawano myszom dożylnie [63] i dożołądkowo [13], właściwy wybór metody dawkowania zależy od drobnoustroju wywołującego infekcję oraz od poziomu jej zaawansowania. Dożołądkowe podawanie pediocyny PA-1, w dawce 250 µg dziennie przez 3 dni, obniżało liczbę komórek *L. monocytogenes* w kale zainfekowanych myszy o 2 log. Obserwowano także zmniejszenie liczby komórek w śledzionie i wątrobie [13,59]. Ciekawą metodę zasugerowali też van Staden i wsp., cząsteczki nizyny F włączono w strukturę cementu kostnego, który wszczepione myszom zahamowały infekcję *Staphylococcus aureus* [70].

W badaniach Amer i wsp. [1] zaobserwowano również antypasożytnicze działanie bakteriocyn wytwarzanych przez szczepy probiotyczne z rodzaju *Lactobacillus* - *Lb. acidophilus* (P106) i *Lb. plantarum* (P164). Dawka doustna 50 µg/dobę, stosowana przez 5 dni, pozwoliła na znaczne obniżenie liczby *Giardia lamblia* w jelicie zakażonych myszy. Badania ultrastruktury wykazały, że 5 dawek bakteriocyn wytwarzanej przez *Lb. acidophilus* spowodowało znaczne zmiany w architekturze komórkowej trofozoitów, przede wszystkim związane z dezorganizacją błony komórkowej oraz składników cytoplazmy [1].

Bakteriocynty mają duży potencjał aplikacyjny, nie tylko jako alternatywa, ale przede wszystkim jako czynnik potęgujący działanie klasycznych antybiotyków. Stosowanie nizyny w połączeniu z konwencjonalnymi antybiotykami było skuteczne przeciwko *Salmonella enterica* ser. Typhimurium. Kombinacja nizyny ceftriaksonu lub cefotaksymu potęgowała uszkodzenia błony komórko-

wej opornych szczepów z rodzaju *Salmonella* spp. [67]. Permeabilizacja błony komórkowej przez antybiotyki β-laktamowy umożliwiła absorpcję nizyny oraz hamowanie syntezy DNA, a w konsekwencji - białek. Wykazano także bezpośrednie działanie immunomodulujące podczas badania na myszach zakażonych *Salmonella* [68]. Co więcej, stosowanie szczepów probiotycznych oraz oczyszczonych bakteriocyn, które są przez nie wytwarzane, może skutecznie wspomagać leczenie choroby wrzodowej żołądka, wywołanej infekcją *Helicobacter pylori*, co wykazano w badaniach na myszach [30].

PIŚMIENICTWO

[1] Amer E.I., Mossallam S.F., Mahrous H.: Therapeutic enhancement of newly derived bacteriocins against *Giardia lamblia*. *Exp. Parasitol.*, 2014; 146: 52-63

[2] Arthur T.D., Cavera V.L., Chikindas M.L.: On bacteriocin delivery systems and potential applications. *Future Microbiol.*, 2014; 9: 235-248

[3] Asaduzzaman S.M., Sonomoto K.: Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *J. Biosci. Bioeng.*, 2009; 107: 475-487

[4] Bastos M.C., Coelho M.L., da Silva Santos O.: Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 2015; 161: 683-700

[5] Brumfitt W., Salton M.R., Hamilton-Miller J.M.: Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2002; 50: 731-734

[6] Calix-Lara T.F., Rajendran M., Talcott S.T., Smith S.B., Miller R.K., Castillo A., Sturino J.M., Taylor T.M.: Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on spinach and identification of antimicrobial substances produced by a commercial lactic acid bacteria food safety intervention. *Food Microbiol.*, 2014; 38: 192-200

[7] Champion A., Casey P.G., Field D., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P.: In vivo activity of Nisin A and Nisin V against *Listeria monocytogenes* in mice. *BMC Microbiol.*, 2013; 13: 23

[8] Cavera V.L., Arthur T.D., Kashtanov D., Chikindas M.L.: Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2015; 46: 494-501

[9] Chatterjee C., Patton G.C., Cooper L., Paul M., van der Donk W.A.: Engineering dehydro amino acids and thioethers into peptides using lactacin 481 synthetase. *Chem. Biol.*, 2006; 13: 1109-1117

[10] Cotter P.D., Draper L.A., Lawton E.M., McAuliffe O., Hill C., Ross R.P.: Over production of wild-type and bioengineered derivatives of the lantibiotic lactacin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006; 72: 4492-4496

[11] Cotter P.D., Hill C., Ross R.P.: Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005; 3: 777-788

[12] Cotter P.D., Ross R.P., Hill C.: Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013; 11: 95-105

[13] Dabour N., Zihler A., Kheadr E., Lacroix C., Fliss I.: In vivo study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2009; 133: 225-233

[14] Dalet K., Cenatiempo Y., Cossart P., Hechard Y.: A σ^{54} -dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology*, 2001; 147: 3263-3269

[15] Den Blaauwen T., Andreu J.M., Monasterio O.: Bacterial cell di-

PODSUMOWANIE

Era antybiotyków w walce z infekcjami już się kończy, głównie z powodu narastającej antybiotykooporności szczepów bakterii patogennych. Skutkiem tego jest pilna potrzeba poszukiwania nowych narzędzi i środków terapeutycznych. Bakteriocyny wytwarzane przez bakterie fermentacji mlekowej dają nadzieję, że w przyszłości skutecznie zastąpią antybiotyki. Mimo wielu zalet potrzebne są dalsze prace nad poprawą ich stabilności i wydajności, szczególnie w badaniach *in vivo*.

vision proteins as antibiotic targets. *Bioorg. Chem.*, 2014; 55: 27-38

[16] Dicks L.M., Heunis T.D., van Staden D.A., Brand A., Sutyak Noll K., Chikindas M.L.: Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. W: *Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications*. red.: D. Drider, S. Rebuffat. New York, NY, Springer; 2011; 391-421

[17] Diep D.B., Skaugen M., Salehian Z., Holo H., Nes I.F.: Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 2384-2389

[18] Diop M.B., Dubois-Dauphin R., Tine E., Ngom A., Destain J., Thonart P.: Bacteriocin producers from traditional food products. *Bio-technol. Agron. Soc. Environ.*, 2007; 11: 275-281

[19] Donczew M., Ginda K., Zakrzewska-Czerwińska J., Jakimowicz D.: Odsłona tajemnic komórki bakteryjnej - zastosowanie nowych technik mikroskopii fluorescencyjnej. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 114-123

[20] Draper L.A., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P.: The two peptide lantibiotic lactacin 3147 acts synergistically with polymyxin to inhibit Gram-negative bacteria. *BMC Microbiol.*, 2013; 13: 212

[21] Drider D., Fimland G., Hechard Y., McMullen L.M., Prevost H.: The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2006; 70: 564-582

[22] Eijsink V.G., Axelsson L., Diep D.B., Havarstein L.S., Holo H., Nes I.F.: Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002; 81: 639-654

[23] Ennahar S., Sonomoto K., Ishizaki A.: Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. Bioeng.*, 1999; 87: 705-716

[24] Fimland G., Johnsen L., Dalhus B., Nissen-Meyer J.: Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J. Pept. Sci.*, 2005; 11: 688-696

[25] Fujita K., Ichimasa S., Zendo T., Koga S., Yoneyama F., Nakayama J., Sonomoto K.: Structural analysis and characterization of lactacin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007; 73: 2871-2877

[26] Gutkind G.O., Di Conza J., Power P., Radice M.: β-Lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview. *Curr. Pharm. Des.*, 2013; 19: 164-208

[27] Héchard Y., Pelletier C., Cenatiempo Y., Frère J.: Analysis of σ^{54} -dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EI^{Mann}) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*, 2001; 147: 1575-1580

[28] Iwatani S., Yoneyama F., Miyashita S., Zendo T., Nakayama J.,



- Sonomoto K.: Identification of the genes involved in the secretion and self-immunity of lactacin Q, an unmodified leaderless bacteriocin from *Lactococcus lactis* QU 5. *Microbiology*, 2012; 158: 2927-2935
- [29] Justice S.S., García-Lara J., Rothfield L.I.: Cell division inhibitors SulA and MinC/MinD block septum formation at different steps in the assembly of the *Escherichia coli* division machinery. *Mol. Microbiol.*, 2000; 37: 410-423
- [30] Kaur B., Garg N., Sachdev A., Kumar B.: Effect of the oral intake of probiotic *Pediococcus acidilactici* BA28 on *Helicobacter pylori* causing peptic ulcer in C57BL/6 mice models. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014; 172: 973-983
- [31] Kheadr E., Bernoussi N., Lacroix C., Fliss I.: Comparison of the sensitivity of commercial strains and infant isolates of bifidobacteria to antibiotics and bacteriocins. *Int. Dairy J.*, 2004; 14: 1041-1053
- [32] Kjos M., Salehian Z., Nes I.F., Diep D.B.: An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. *J. Bacteriol.*, 2010; 192: 5906-5913
- [33] Lages M.C., Beilharz K., Morales Angeles D., Veening J.W., Scheffers D.J.: The localization of key *Bacillus subtilis* penicillin binding proteins during cell growth is determined by substrate availability. *Environ. Microbiol.*, 2013; 15: 3272-3281
- [34] Laursen M.F., Bahl M.I., Licht T.R., Gram L., Knudsen G.M.: A single exposure to a sublethal pediocin concentration initiates a resistance-associated temporal cell envelope and general stress response in *Listeria monocytogenes*. *Environ Microbiol.*, 2015; 17: 1134-1151
- [35] le Blay G., Lacroix C., Zihler A., Fliss I.: *In vitro* inhibition activity of nisin A, nisin Z, pediocin PA-1 and antibiotics against common intestinal bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2007; 45: 252-257
- [36] Lee T.K., Tropini C., Hsin J., Desmarais S.M., Ursell T.S., Gong E., Gitai Z., Monds R.D., Huang K.C.: A dynamically assembled cell wall synthesis machinery buffers cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014; 111: 4554-4559
- [37] Liu X., Basu U., Miller P., McMullen L.M.: Stress response and adaptation of *Listeria monocytogenes* 08-5923 exposed to a sublethal dose of carnocyclin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014; 80: 3835-3841
- [38] Lohans C.T., Vederas J.C.: Development of class IIa bacteriocins as therapeutic agents. *Int. J. Microbiol.*, 2012; 2012: 386410
- [39] Löwe J., Amos L.A.: Evolution of cytomotive filaments: the cytoskeleton from prokaryotes to eukaryotes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2009; 41: 323-329
- [40] Majeed H., Gillor O., Kerr B., Riley M.A.: Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *ISME J.*, 2011; 5: 71-81
- [41] Majeed H., Lampert A., Ghazaryan L., Gillor O.: The weak shall inherit: bacteriocin-mediated interactions in bacterial populations. *PLoS One*, 2013; 8: 63837
- [42] Maldonado-Barragán A., Cárdenas N., Martínez B., Ruiz-Barba J.L., Fernández-Garayzábal J.F., Rodríguez J.M., Gibello A.: Garvicin A, a novel class IIc bacteriocin from *Lactococcus garvieae* that inhibits septum formation in *L. garvieae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013; 79: 4336-4346
- [43] Martínez B., Rodríguez A., Suárez J.E.: Lactococcin 972, a bacteriocin that inhibits septum formation in lactococci. *Microbiology*, 2000; 146: 949-955
- [44] Michael C.A., Dominey-Howes D., Labbate M.: The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Front. Public Health*, 2014; 2: 145
- [45] Modi K.D., Chikindas M.L., Montville T.J.: Sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* to heat and the synergistic action of heat and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* 2000; 30: 249-253
- [46] Mogi T., Kita K.: Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2009; 66: 3821-3826
- [47] Moll G.N., Konings W.N., Driessen A.J.: Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999; 76: 185-198
- [48] Montiel R., Martín-Cabrejas I., Langa S., El Aouad N., Arqués J.L., Reyes F., Medina M.: Antimicrobial activity of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* on *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Food Microbiol.*, 2014; 44: 1-5
- [49] Mora L., de Zamaroczy M.: In vivo processing of DNase colicins E2 and E7 is required for their import into the cytoplasm of target cells. *PLoS One*, 2014; 9: e96549
- [50] Nayar A.S., Dougherty T.J., Ferguson K.E., Granger B.A., McWilliams L., Stacey C., Leach L.J., Narita S., Tokuda H., Miller A.A., Brown D.G., McLeod S.M.: Novel antibacterial targets and compounds revealed by a high-throughput cell wall reporter assay. *J. Bacteriol.* 2015; 197: 1726-1734
- [51] Nes I.F., Diep D.B., Yasuyoshi I.: Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control, Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190428/#bacteriocins>. REF. diep.2007.2384 (01.03.2016)
- [52] Nishie M., Nagao J., Sonomoto K.: Antibacterial peptides "bacteriocin": an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.*, 2012; 17: 1-16
- [53] Oman T.J., van der Donk W.A.: Follow the leader: the use of leader peptides to guide natural product biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.*, 2010; 6: 9-18
- [54] Papagianni M., Anastasiadou S.: Pediocins: the bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microb. Cell Fact.*, 2009; 8: 3
- [55] Perez R.H., Zendo T., Sonomoto K.: Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb. Cell Fact.*, 2014; 13: S3
- [56] Plat A., Kluskens L.D., Kuipers A., Rink R., Moll G.N.: Requirements of the engineered leader peptide of nisin for inducing modification, export, and cleavage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011; 77: 604-611
- [57] Pogliano J.: The bacterial cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2008; 20: 19-27
- [58] Prado-Acosta M., Ruzal S.M., Allievi M.C., Palomino M.M., Sanchez Rivas C.: Synergistic effects of the *Lactobacillus acidophilus* surface layer and nisin on bacterial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76: 974-977
- [59] Ramaswamy V., Cresence V.M., Rejitha J.S., Lekshmi M.U., Dharsana K.S., Prasad S.P., Vijila H.M.: *Listeria* - review of epidemiology and pathogenesis. *J. Microbiol., Immunol. Infection*, 2007; 40: 4-13
- [60] Ramnath M., Beukes M., Tamura K., Hastings J.W.: Absence of putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microb.*, 2000; 66: 3098-3101
- [61] Rawlinson E.L., Nes I.F., Skaugen M.: Identification of the DNA-binding site of the Rgg-like regulator LasX within the lactococin S promoter region. *Microbiology*, 2005; 151: 813-823
- [62] Rea M.C., Alemayehu D., Casey P.G., O'Connor P.M., Lawlor P.G., Walsh M., Shanahan F., Kiely B., Ross R.P., Hill C.: Bioavailability of the anti-clostridial bacteriocin thuricin CD in gastrointestinal tract. *Microbiology*, 2014; 160: 439-445
- [63] Rihakova J., Cappelletti J. M., Hue I., Demnerova K., Fédérighi M., Prévost H., Drider D.: In vivo activities of recombinant divercin V41 and its structural variants against *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010; 54: 563-564

- [64] Rogne P., Haugen C., Fimland G., Nissen-Meyer J., Kristiansen P.E.: Three-dimensional structure of the two-peptide bacteriocin plantaricin JK. *Peptides*; 2009; 30: 1613-1621
- [65] Shapiro L., McAdams H.H., Losick R.: Why and how bacteria localize proteins. *Science*, 2009; 326: 1225-1228
- [66] Sharma A., Srivastava S.: Anti-*Candida* activity of two-peptide bacteriocins, plan-taricins (Pln E/F and J/K) and their mode of action. *Fungal. Biol.*, 2014; 118: 264-275
- [67] Singh A.P., Prabha V., Rishi P.: Value addition in the efficacy of conventional antibiotics by nisin against *Salmonella*. *PLoS One*, 2013; 8: e76844
- [68] Singh A.P., Preet S., Rishi P.: Nisin/ β -lactam adjunct therapy against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: a mechanistic approach. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2014; 69: 1877-1887
- [69] Tiwari S.K., Sutyak Noll K., Cavera V.L., Chikindas M.L.: Improved antimicrobial activities of synthetic-hybrid bacteriocins designed from enterocin E50-52 and pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015; 81: 1661-1667
- [70] van Staden A.D., Brand A.M., Dicks L.M.: Nisin F-loaded brushite bone cement prevented the growth of *Staphylococcus aureus in vivo*. *J. Appl. Microbiol.*, 2012; 112: 831-840
- [71] Yang E., Fan L., Jiang Y., Doucette C., Fillmore S.: Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*, 2012; 2: 48
- [72] Zúñiga M., Comas I., Linaje R., Monedero V., Yebra M.J., Esteban C.D., Deutscher J., Pérez-Martinez G., González-Candelas F.: Horizontal gene transfer in the molecular evolution of mannose PTS transporters. *Mol. Biol. Evol.*, 2005; 22: 1673-1685

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

