

### Streszczenie popularnonaukowe

Bakterie z rodzaju staphylococcus - gronkowce należą do najważniejszych patogenów zwierząt i człowieka. Jest to także grupa bakterii, która niezwykle szybko nabywa mechanizmy oporności na stosowane aktualnie antybiotyki. W związku z tym istnieje pilna potrzeba poszukiwania nowych, nieantybiotycznych substancji o aktywności przeciwochronkowcowej. W ciągu ostatnich kilku lat, w literaturze wiatowej obserwuje się ponowny wzrost zainteresowania aktywności przeciwochronkowcowej produktów i substancji pochodzenia naturalnego. W przypadku aktywności przeciwochronkowcowej obiecujące właściwości wykazują produkty pszczele: miód, pyłek, pierzga, mleczko pszczele i przede wszystkim propolis. Aktywność pierzgi jest przede wszystkim konsekwencją obecności w tym produkcie metabolitów bakterii fermentacji mlekowej (LAB – Lactic Acid Bacteria) – kwasu mlekowego oraz peptydów o aktywności bakteriostatycznej i/lub bakteriobójczej - bakteriocyn. Celem powyższego projektu jest: 1) wykonanie kompleksowych badań aktywności przeciwbakteryjnej, głównie przeciwochronkowcowej, produktów pszczelich: miodu, pyłku, mleczka pszczelego, pierzgi oraz propolisu; 2) wykonanie badań przesiewowych dotyczących izolacji z pierzgi a także miodu szczepów bakterii fermentacji mlekowej zdolnych produkujących peptydy o aktywności przeciwochronkowcowej; 3) opracowanie metod produkcji i oczyszczania bakteriocyn o najbardziej obiecujących właściwościach; 4) sprawdzenie synergistycznego działania produktów pszczelich oraz bakteriocyn z antybiotykami; 5) sprawdzenie aktywności bakteriocyn i wybranych produktów, w stosunku do bakterii rosnących w formie biofilmu; 6) ustalenie sekwencji aminokwasowej, charakterystyka chemiczna i próby ustalenia struktury przestrzennej najciekawszych bakteriocyn; 7) ustalenie sekwencji genów kodujących bakteriocyny.

Wartość MIC (minimalne stężenie hamujące) produktów pszczelich i bakteriocyn zostanie wyznaczona za pomocą metody rozcieńzeniowej w 96-cio dołkowych płytkach titracyjnych, która wykonywana będzie zgodnie z zaleceniami Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Analizy składu najbardziej aktywnych produktów prowadzone będą z wykorzystaniem chromatografii gazowej i cieczowej, w obydwu przypadkach stosowane będą detektory spektrometrii mas. Badania partnera zagranicznego, Prof. Worobca wskazują, że ciekawym źródłem bakterii produkujących bakteriocyny o różnorodnej aktywności są produkty pszczele. W ramach projektu planowane jest przeprowadzenie badań przesiewowych dotyczących obecności bakterii produkujących bakteriocyny przeciwochronkowcowe w krajowych produktach pszczelich: miodzie i pierzdze. Identyfikacja szczepów produkcyjnych prowadzona będzie z wykorzystaniem metody z tzw. topagarem. W metodzie tej na powierzchni agaru, na którym hoduje się potencjalne szczepy produkcyjne wylewa się kolejną warstwę agaru (topagar) zawierającą zawiesinę szczepu wzorcowego. Pojawienie się strefy zahamowania wzrostu szczepu wzorcowego w topagarze świadczy o tym, że bakteria rosnąca na spodniej warstwie agaru wytwarza substancję przeciwochronkowcową. Oczyszczanie bakteriocyn prowadzona będzie z wykorzystaniem kluczowych metod stosowanych do izolacji białek: wytrącania siarczanem amonu oraz różnorodnych technik chromatograficznych. W początkowych etapach badań optymalizacja wydajności produkcji peptydów prowadzona będzie w skali laboratoryjnej – w kolbach szklanych o objętości 250 – 1000 ml. W przypadku najbardziej obiecujących układów przeprowadzona zostanie także optymalizacja wydajności produkcji w bioreaktorze o objętości roboczej 10 litrów. Planowane jest także ustalenie sekwencji aminokwasowej bakteriocyn oraz sekwencji genów kodujących te peptydy. Przy użyciu zaawansowanych technik spektroskopowych, np. dichroizm kołowy i NMR przeprowadzona zostanie szczegółowa charakterystyka chemiczna wybranych bakteriocyn, w tym próby ustalenia struktury przestrzennej. Działanie synergistyczne produktów pszczelich i bakteriocyn z antybiotykami analizowane będzie z wykorzystaniem metody checkerboard, natomiast ich aktywność w stosunku do bakterii rosnących w formie biofilmu badana będzie metodą kolorymetryczną z wykorzystaniem związku tetrazolowego XTT.

Uzyskane rezultaty przede wszystkim umożliwią weryfikację tezy o możliwości wykorzystania produktów pszczelich i nowo zidentyfikowanych bakteriocyn jako zamienników antybiotyków do zwalczania gronkowców. W przypadku, gdyby któraś z bakteriocyn lub produkt wykazywał obiecujące właściwości mogłyby one być przedmiotem dalszych badań mających na celu sprawdzenie ich przydatności w terapii infekcji gronkowcowych u ludzi i zwierząt.