

Agnieszka Drożdżyńska, Joanna Pawlicka, Katarzyna Czaczyk

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
e-mail: agadro@up.poznan.pl

CHARAKTERYSTYKA I PERSPEKTYWY WYKORZYSTANIA *CITROBACTER* SPP.*

Streszczenie: *Citrobacter* spp. to względnie beztlenowe, Gram-ujemne pałeczki, należące do rodziny Enterobacteriaceae. Do przedstawicieli rodzaju zalicza się 11 gatunków m.in. *C. amalonaticus*, *C. freundii*, *C. koseri* (*diversus*). W niniejszym artykule sklasyfikowano, scharakteryzowano i podano sposoby izolacji oraz identyfikacji *Citrobacter* spp. Przedstawiono także wyniki badań nad biotechnologicznymi możliwościami wykorzystania bakterii z rodzaju *Citrobacter* w procesach bioremediacyjnych, produkcji związków o dużym znaczeniu gospodarczym, np. pirogalolu czy 1,3-propanodiolu, oraz wytwarzaniu enzymów (amylaz, lipaz, metylaz).

Słowa kluczowe: biotechnologia, 1,3-propanodiol, *Citrobacter* spp.

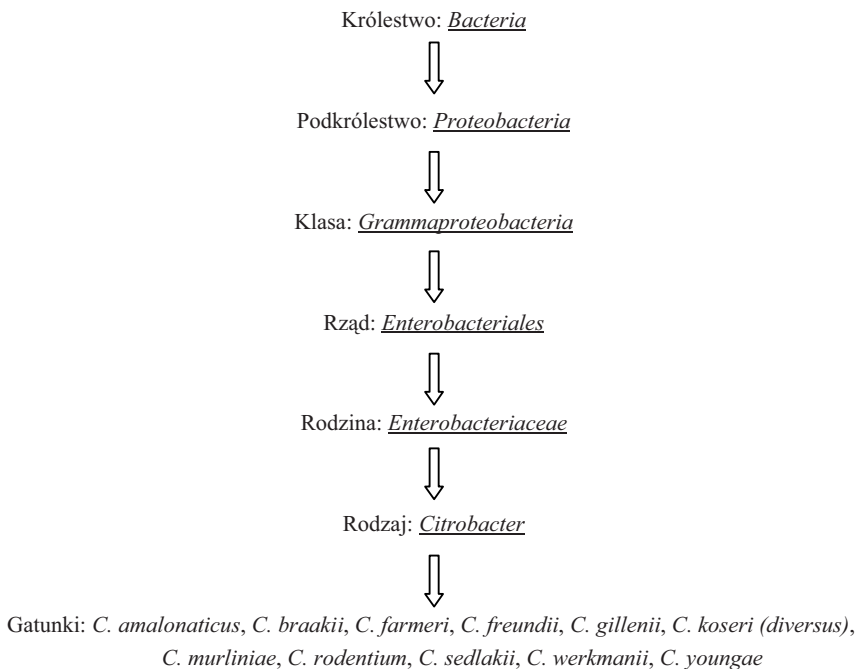
1. Wstęp

Odkrycie ogromnej różnorodności drobnoustrojów i zrozumienie, jak ważna jest ich aktywność w funkcjonowaniu świata, ludzi, zwierząt i roślin, otworzyło nowe horyzonty badań. Mikroorganizmy wyrażają swoją różnorodność, oddziałując na zdrowie człowieka, środowisko naturalne, są też wykorzystywane do otrzymywania różnych produktów, np. w procesach przemysłowych. Szacuje się, że na naszej planecie żyje więcej niż 10^7 - 10^9 różnych gatunków, ale tylko niewielka część jest zidentyfikowana, sklasyfikowana i opisana [Curtis i in. 2002; Schloss, Handelsman 2004].

Citrobacter to rodzaj bakterii należący do rodziny Enterobacteriaceae, obejmujący 11 gatunków (rys. 1). Komórki bakterii *Citrobacter* spp. są stosunkowo dużymi, ruchliwymi pałeczkami (średnica ok. 1 μm i długości 2-6 μm), nie wytwarzają otoczek i są Gram-ujemne. Występują w kale i moczu człowieka oraz innych kręgowców, a także w glebie, wodzie, ściekach, żywności [Sharma, Anad, 2002]. Niektóre gatunki (*C. amalonaticus*, *C. koseri*, *C. freundii*) wykorzystują cytryniany jako jedyne źródło węgla (stąd nazwa rodzajowa opisujących bakterii).

* Pracę zrealizowano w ramach projektu „Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylowych”, który był finansowany z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, projekt PO IG 01.01.02-00-074/09.

W 1932 r. Werkman i Gillen opisali grupę Gram-ujemnych bakterii wykorzystujących cytryniany i zdolnych do produkcji 1,3-propanodiolu z glicerolu. Zaproponowali oni, by wydzielić nowy rodzaj wśród rodziny Bacteriaceae – *Citrobacter*. Z powodu braku zarówno szczepów referencyjnych, jak i pełnej charakterystyki biochemicznej tych mikroorganizmów przez wiele lat *Citrobacter* spp. błędnie zaliczany był do rodzaju *Escherichia* lub *Salmonella*. Na przełomie lat 60. i 70. XX wieku wyodrębniono trzy główne gatunki bakterii z rodzaju *Citrobacter* – *C. freundii*, *C. koseri* oraz *C. amalonaticus* [Frederiksen 1970; Ewing, Davis 1972; Frederiksen, Sogaard 1991].



Rys. 1. Klasyfikacja bakterii z rodzaju *Citrobacter*

Źródło: [Brenner i in.1993; Janda, Abbott 2006].

W 1985 r. ze względu na występowanie różnic biochemicznych pomiędzy badanymi bakteriami wyznaczono biogrupę w obrębie gatunku *C. amalonaticus* – *C. amalonaticus* (biogrupa 1) [Farmer i in. 1985]. W 1993 r. Brenner i in. opracowali nową klasyfikację pałeczek z rodzaju *Citrobacter*, opartą na podobieństwie DNA. Pozwoliło to na wyodrębnienie 11 gatunków, których nazwy zaproponowali Brenner i in. [1993, 1999] oraz Schauer i in. [1995] (tab. 1).

2. Podłoża stosowane do izolacji *Citrobacter* spp.

Bakterie z rodzaju *Citrobacter* rosną na powszechnie dostępnych pożywkach, zarówno selektywnych, jak i różnicujących, stosowanych do izolacji Gram-ujemnych tlenowych i względnie beztlenowych pałeczek.

Citrobacter spp. rosną na agarze z siarczynem bizmutu wg Wilson-Blaira przeznaczonym do izolacji i różnicowania *Salmonella* Typhi. Pożywka zawiera siarczyn bizmutu i zieleń brylantynową, które są składnikami selektywnymi, hamującymi wzrost bakterii typu coli. Składniki zawierające siarkę dostarczają substratu do wytwarzania H₂S, natomiast sole metali barwią kolonie i podłoże na kolor brązowy lub czarny [Compendium of Methods... 1992]. Na opisywanym podłożu *Citrobacter* spp. wzrastają w postaci brązowo-czarnych kolonii bez połysku, w przeciwieństwie do pałeczek *Salmonella* (czarne kolonie z połyskiem).

Tabela 1. Gatunki *Citrobacter*

CITROBACTER SPP.	Gatunki <i>Citrobacter</i> wg Frederiksen'a (1970), Ewing'a, Davis'a (1972)	1. <i>C. freundii</i>	Gatunki <i>Citrobacter</i> wg Farmer'a i in. (1985)	1. <i>C. freundii</i>	Genomowe gatunki <i>Citrobacter</i> wg Brenner'a i in. (na podstawie podobieństwa DNA) (1993)	1. <i>C. freundii</i>
		2. <i>C. koseri</i>		2. <i>C. diversus</i> (<i>C. koseri</i>)		2. <i>C. koseri</i>
		3. <i>C. amalonaticus</i>		3. <i>C. amalonaticus</i>		3. <i>C. amalonaticus</i>
				<i>C. amalonaticus</i> biogrupa 1		4. <i>C. farmeri</i> (<i>C. amalonaticus</i> biogrupa 1)
						5. <i>C. youngae</i>
						6. <i>C. braaki</i>
						7. <i>C. werkamii</i>
						8. <i>C. sedlakii</i>
						9. <i>C. rodentium</i>
						10. <i>C. gillennii</i>
						11. <i>C. murliniae</i> .

Źródło: [Frederiksen 1970; Ewing, Davis 1972; Farmer i in. 1985; Brenner i in. 1993].

Na agarze SS (*Salmonella-Shigella* agar) większość pałeczek *Citrobacter* tworzy kolonie różowe (fermentują laktozę, zakwaszając podłoże, co hamuje tworzenie H₂S), niektóre wzrastają w postaci czarnych kolonii (niefermentujące laktozy, wytwarzające H₂S) i nie różnią się od *Salmonella* spp. Agar SS zawiera zieleń brylantynową, żółć bydłęcą oraz wysokie stężenia tiosiarczanu i cytrynianu, które hamują wzrost Gram-dodatniej flory bakteryjnej. Obecność laktozy jako jedyne źródła węgla pozwala na różnicowanie bakterii na laktozo-dodatnie i laktozo-ujemne. Ponadto zawartość tiosiarczanu i żelaza działa jako wskaźnik wytwarzania siarkowodoru (zaczernienie środków kolonii) [Compendium of Methods... 1992].

Podłoże z ksylozą, lizyną i deoksycholaniem (XLD) można zaliczyć do podłoży wybiórczych. Deoksycholan sodu hamuje wzrost większości bakterii Gram-dodatnich. Zawartość ksylozy, laktozy i sacharozy umożliwia ocenę zdolności badanych drobnoustrojów do wykorzystania wymienionych powyżej cukrów. Bakterie fermentujące jeden z cukrów rosną w postaci żółtych kolonii. Obecność tiosiarczanu sodu i soli żelaza (III) umożliwia sprawdzenie zdolności tworzenia siarkowodoru. Na podłożu XLD *Citrobacter* spp. występują w postaci żółtych, opalizujących kolonii otoczonych żółtą strefą, czasem z czarnym środkiem [*Compendium of Methods...* 1992].

Podłoże MacConkeya służy do izolacji pałeczek Gram-ujemnych, zawiera między innymi sole żółciowe i fiolet krystaliczny, które hamują wzrost bakterii Gram-dodatnich. Jedynym źródłem węgla jest laktoza i na tej podstawie różnicuje się pałeczki laktozo-dodatnie (rozkładające laktozę – różowe kolonie) od laktozo-ujemnych (bezbarwne kolonie). Pałeczki *Citrobacter* wzrastają w postaci bezbarwnych lub blad różowych kolonii [Goodman, Pickett 1966].

Podłoże do izolacji *Yersinia enterocolitica* – CIN (cefsulodin-irgasan-novobiocin), również może być użyte do izolacji bakterii z rodzaju *Citrobacter*. Jest to pożywka diagnostyczno-wybiórcza zawierająca fiolet krystaliczny, cefsulodin, irgasan i nowobiocynę, które hamują wzrost większości Gram-dodatniej i Gram-ujemnej mikroflory. Wiele gatunków rodzaju *Citrobacter* rośnie na agarze CIN, tworząc kolonie z czerwonym środkiem i transparentnymi brzegami, identyczne jak pałeczki *Yersinia enterocolitica* [Devenish, Schiemann 1981].

3. Właściwości biochemiczne

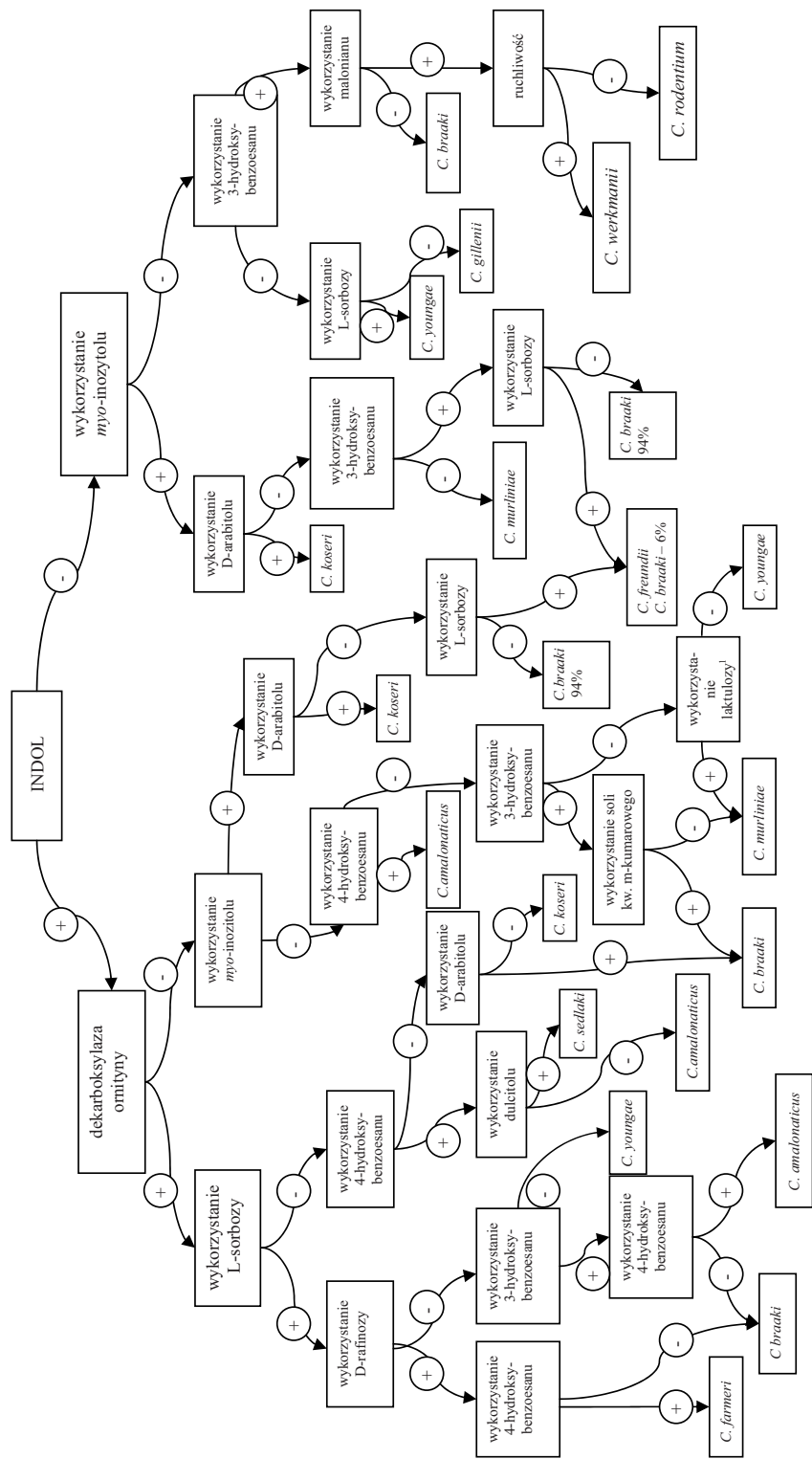
Drobnoustroje z rodzaju *Citrobacter* cechują się różnymi właściwościami biochemicznymi ułatwiającymi określenie ich przynależności gatunkowej. *Citrobacter* spp. nie wytwarzają oksydazy cytochromowej, deaminazy (test na deaminazę fenylalaniny ujemny) ani żelatynazy. Zakwaszają podłoże Clarka (dodatni wynik testu z czerwienią metylową), ale nie wytwarzają acetylometylokarbinolu (test V-P ujemny). Pałeczki te zakwaszają podłoża zawierające: D-glukozę, L-arabinozę, D-mannitol, D-mannozę, L-ramnozę, trehalozę i erytrytol. Nie wykazują aktywności dezoksyrybonukleazy (DNAzy) i nie wytwarzają barwników [*Bergey's Manual...* 1994; Brenner i in. 1999]. Inne cechy biochemiczne są już bardziej zróżnicowane i zależne od gatunku (tab. 2). Testy biochemiczne umożliwiają wstępną identyfikację pałeczek z rodzaju *Citrobacter*. Na rysunku 2 przedstawiono przykładowy klucz dychotomiczny do identyfikacji *Citrobacter* spp. Klucz ten sporządzono na podstawie testów biochemicznych dających wynik pozytywny lub negatywny dla 100% przebadanych przedstawicieli danego gatunku (test nie uwzględnia cech niejednoznacznych – wyjątek stanowią *C. freundii* i *C. braaki*) (tab. 2 i rys. 2).

Tabela 2. Testy biochemiczne przydatne w identyfikacji *Citrobacter* spp.

Test	Procent szczepów ^a										
	C. koseri	C. amalonaticus	C. farmeri	C. freundii	C. youngae	C. braaki	C. werkmanii	C. sedlaki	C. rodentium	C. gillenii	C. murliniae
Indol	94	100	100	38	14	33	0	100	0	0	100
Podłoże Simmonsa	100	100	7	88	76	87	100	83	0	33	100
Arginina	88	81	100	75	52	67	100	100	0	33	67
Ornityna	94	94	100	0	5	93	0	100	100	0	0
Ruch	94	94	100	100	95	87	100	100	0	67	100
Malonian	94	13	0	13	5	0	100	100	100	100	0
D-glukoza (gaz)	100	94	100	100	76	93	100	100	100	100	100
Redukcja azotanów	100	93	100	100	86	100	100	100	100	100	100
Wykorzystanie wybranych źródeł węgla:											
D-arabitol	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sole kw. m-kumarowego	0	0	0	88	96	100	100	67	0	33	0
Dulcitol	44	0	0	13	87	33	0	100	0	0	100
3-hydroksybenzoesan	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0	67
4-hydroksybenzoesan	0	100	100	0	0	0	0	100	0	0	0
D-rafinoza	0	0	100	75	0	6	0	0	0	67	33
L-sorboza	0	87	100	100	100	6	83	0	0	0	100
myo-inozytol	100	0	0	100	0	6	0	100	0	67	0
Laktuloza ^b	0	0	7	88	0	78	17	100	33	67	100

^a Procent szczepów danego gatunku, u których wystąpiła dodatnia reakcja po 48 h inkubacji (wyjątek: wykorzystanie laktulozy – czas inkubacji 96 h); ^b Procent szczepów danego gatunku, u których wystąpiła dodatnia reakcja po 96 h inkubacji.

Źródło: opracowanie własne na podstawie [Brenner i in. 1993].



*Procent przy nazwie oznacza ilość szczepów danego gatunku, u której występuje reakcja (dodatnia lub ujemna) dla danego testu. W przypadku braku oznaczenia, reakcja występuje u 100% szczepów.

Rys. 2. Przykładowy klucz do identyfikacji Citrobacter spp. sporządzony na podstawie tabeli 2

Źródło: opracowanie własne – A. Drożdżyńska. Odczyt testów po 48 h inkubacji (wyjątek – utylizacja laktulozy – po 96 h).

4. Systemy identyfikacji *Citrobacter* spp.

Identyfikacja drobnoustrojów na podstawie cech biochemicznych jest czasochłonna i wymaga dużych nakładów pracy. Do sporządzenia podłoży selekcyjnych potrzebne są specyficzne, często drogie odczynniki. Istnieje wiele komercyjnie dostępnych systemów do identyfikacji drobnoustrojów z rodziny Enterobacteriaceae: Api20E (bioMérieux, Vitek, Hazelwood, Mo.), Vitek GNI (bioMérieux, Vitek, Hazelwood, Mo.), Biolog MicroStation (Biolog, Inc., Harward, Calif.), RapID onE (Innovative Diagnostic Systems, Inc., Norcross, Ga.), autoSCAN W/A (Baxter Diagnostics, Inc., West Sacramento, Calif.) [York i in. 1992; O'Hara i in. 1995].

Przy zastosowaniu systemu autoSCAN W/A w około 50% przypadków istniała konieczność wykonania dodatkowych testów w celu rozróżnienia *C. diversus* od *C. amalonaticus* [York i in. 1992]. *Citrobacter freundii*, *C. koseri*, *C. amalonaticus* w przeważającej większości identyfikowane były prawidłowo za pomocą systemów API20E, Biolog, RapID onE oraz Vitek GNI. *Citrobacter farmeri* prawie zawsze był mylnie identyfikowany jako *C. amalonaticus* (Api20E, RapID onE), ale także jako *C. freundii* (Biolog) czy *E. coli* (Vitek GNI).

Systemy API20E, Biolog, Vitek GNI rozpoznają *C. youngae*, *C. braaki* oraz *C. werkami* jako *C. freundii*, podczas gdy RapID onE identyfikuje je zarówno jako *C. freundii*, jak i *C. amalonaticus*. Wymienione powyżej systemy identyfikują *C. sedlakii* w większości przypadkach jako *C. amalonaticus* (API20E, RapID onE) oraz jako *C. freundii* (Biolog) czy *E. amnigenus* (Vitek GNI). Gatunki *C. rodentium*, *C. gillenii* oraz *C. murliniae* identyfikowane są głównie jako *C. freundii* [O'Hara i in. 1995]. Większość systemów błędnie identyfikuje *Citrobacter* spp. jako *Escherichia coli*, *Escherichia vulneris*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter amnigenus* czy *Klebsiella pneumoniae* [York i in. 1992; O'Hara i in. 1995].

Możliwa jest także identyfikacja *Citrobacter* spp. metodami inżynierii genetycznej. Analiza sekwencji kodującej podjednostkę 16S rRNA jest, jak dotąd, metodą najczęściej używaną w badaniach dotyczących klasyfikacji bakterii. Na powszechność wykorzystania opisywanej metody mają wpływ następujące czynniki: gen 16S rRNA występuje u bakterii, jego funkcja nie zmienia się w czasie i jest on wystarczająco duży (1,500 pz) [Janda i in. 2007]. W niektórych sytuacjach metoda ta jest jednak niewystarczająca. W przypadku charakteryzowania nowych gatunków i jednoznacznego określenia przynależności gatunkowej badanego szczepu stosuje się hybrydyzację DNA-DNA. Za pomocą tej metody Brenner i in. [1993, 1999] wyodrębnili 11 gatunków bakterii z rodzaju *Citrobacter*.

5. Patogenność bakterii z rodzaju *Citrobacter*

Bakterie z rodzaju *Citrobacter* są szeroko rozpowszechnione w środowisku naturalnym, m.in. były izolowane z przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt [Arens, Verbist 1997; Spanggaard i in. 2000; Sharma, Anad 2002; Lowe i in. 2011]. Zdol-

ność drobnoustrojów do kolonizowania układu pokarmowego ludzi jest powszechnie przypisywana mikroorganizmom o małej wirulencji. Jednakże bakterie z rodzaju *Citrobacter* są uważane za oportunistyczne patogeny i mogą powodować szereg infekcji związanych z zakażeniami układów: moczowego (najczęściej), oddechowego, nerwowego oraz zakażeniami otrzewnej czy wsierdzia [Kayser i in. 2007; Al-Hasan i in. 2010]. Opisane są również przypadki wywoływania przez *Citrobacter* spp. zapalenia opon mózgowych czy posocznicy [Badger i in. 1999]. Najczęściej izolowanymi gatunkami wśród przypadków klinicznych były *C. freundii*, *C. koseri* (dawniej *C. diversus*), *C. youngae*, *C. braaki* i *C. amalonaticus* [Janda i in. 1994; Lavinge i in. 2007; Mohanty i in. 2007]. Czynnikiem wirulencji gatunku *Citrobacter freundii* są: toksyna Shiga (-like), ciepłostąła enterotoksyna (homologiczna do enterotoksyny ST Ia produkowanej przez *Escherichia coli*) oraz otoczka bakteryjna z antygenem powierzchniowym Vi (wykazującym podobieństwo do antygeny Vi obecnego u *Salmonella* Typhi) [Pobucewicz, Czernomysy-Furowicz 2010]. Jednakże zaliczanie *Citrobacter* spp. do grupy groźnych patogenów ludzi i zwierząt jest zdaniem niektórych naukowców kontrowersyjne. Najgroźniejsze patogeny najczęściej izolowane są ze środowisk szpitalnych (zakażenia szpitalne). Samonis i in. [2009] badali pacjentów zgłaszających się do szpitala z powodu infekcji bakteryjnych. Podczas dwunastoletniego monitoringu przyczyn zachorowań jedynie 78 przypadków wywołanych było przez bakterie z rodzaju *Citrobacter*. Dodatkowo zakażenia wywołane przez te bakterie charakteryzowały się małą śmiertelnością, a do zachorowań dochodziło głównie u ludzi starszych [Samonis i in. 2009; Al-Hasan i in. 2010]. Najczęściej izolowanym gatunkiem z rodzaju *Citrobacter* był – *Citrobacter freundii*, który w kolekcji DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) jest zaliczany do drugiej grupy ryzyka, gdy tymczasem w kolekcji ATCC (American Type Culture Collection) przypisuje się go do pierwszej grupy ryzyka, do której należą mikroorganizmy stosowane w procesach biotechnologicznych.

Ze względu jednak na fakt, że opisywane bakterie mają geny odpowiedzialne za syntezę β -laktamaz, mogą wykazywać się opornością na wiele antybiotyków [Lavinge i in. 2007]. Z tego punktu widzenia bakterie z rodzaju *Citrobacter* stanowią realne zagrożenie. Jednakże liczba badań klinicznych nad *Citrobacter* spp. jest stosunkowo niewielka, ponieważ zachorowania wywołane opisywanymi mikroorganizmami występują stosunkowo rzadko [Samonis i in. 2009; Al-Hasan i in. 2010]. Wzrost liczby doniesień naukowych dotyczących zastosowań przemysłowych bakterii należących do *Citrobacter* spp. wywołuje potrzebę potwierdzenia postawionych hipotez większą liczbą badań klinicznych [Kobashi i in. 1990; Deckwer 1995; Gunasekaran i in. 2006; Oriji i in. 2009; Sharma, Fulekar 2009; Wang i in. 2009; Saxena i in. 2009].

6. Przemysłowy potencjał bakterii z rodzaju *Citrobacter*

Obecne trendy panujące na rynku światowym, a także w środowiskach naukowych powodują zwiększenie zainteresowania procesami biotechnologicznymi [Rymowicz i in. 2006]. W tym względzie również bakterie z rodzaju *Citrobacter* mogą mieć określony potencjał przemysłowy. Jedną z możliwości jest produkcja enzymów. Komercyjnie dostępnymi enzymami produkowanymi przez pałeczki *Citrobacter* spp. są enzymy restrykcyjne, które znalazły zastosowanie w biologii molekularnej, w procesach manipulacji fragmentami DNA. Przykładowe enzymy izolowane z *Citrobacter* spp. to: Cfr9I, Cfr10I, Cfr13I, Cfr42I. Dostawcami podanych enzymów są firmy: Fermentas International Inc., Toyobo Biochemicals czy Tokara Bio Inc. [Bitinaité i in. 1985; Lubys i in. 1994; Bozic i in. 1996; Gasiunas i in. 2008].

Orij i in. [2009] wyizolowali szczep należący do rodzaju *Citrobacter*, charakteryzujący się zdolnościami amylolitycznymi (pierwszy opisany przypadek). Wyselekcjonowany szczep wykazywał zdolność do produkcji α -amylazy, enzymu powszechnie stosowanego w przemyśle (zbożowo-młynarskim, cukierniczym, spirytusowym i piwowarskim) [Bednarski, Reps 2003; Orij i in. 2009]. Gunasekaran i in. [2006] wyizolowali i zidentyfikowali szczep *Citrobacter freundii* IIT-BT L139, produkujący lipazę (acylohydrolazę triacyloglicerolową – E.C. 3.1.1.3) o bardzo wysokiej aktywności (8.8 U/ml) w środowisku alkalicznym (pH 9) i temperaturze 40°C. Podane właściwości lipazy mogą umożliwić zastosowanie badanego enzymu np. w przemyśle farmaceutycznym i przy produkcji środków czystości. Organizmy produkujące termostabilne lipazy, aktywne w pH wyższym niż obojętne, nie są powszechne. Lipazy pochodzenia mikrobiologicznego są niezwykle cenne dla przemysłu ze względu na: dostępność dużych ich ilości (prosta i tania biosynteza) oraz wysokiej, często nietypowej aktywności [Gunasekaran i in. 2006].

Spośród pałeczek *Citrobacter* spp. wyizolowano bakterie posiadające specyficzne enzymy rozkładające karbaminian etylu do etanolu i amoniaku. Karbaminian etylu jest substancją kancerogenną, mogącą zanieczyszczać napoje alkoholowe [Kobashi i in. 1990]. Enzymatyczne usuwanie karbaminianu pozwoliłoby uwolnić tego rodzaju napoje od niebezpiecznego związku.

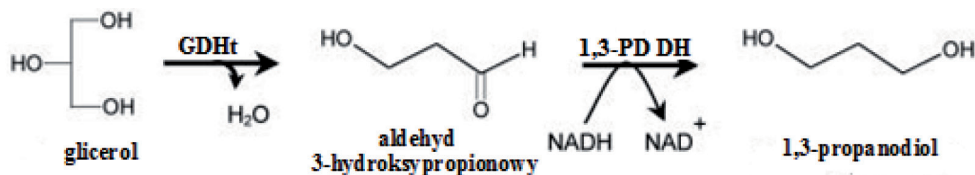
Pałeczki *Citrobacter* spp. potrafią syntetyzować z kwasu galusowego pirogalol (1,2,3-trihydroksybenzen) [Kumar i in. 1992]. Pirogalol jest wykorzystywany w produkcji farb do włosów, maści przeciw łuszczycy oraz jako wywoływacz w fotografii. Biosynteza tego związku w hodowli ciągłej immobilizowanych na nośniku karagenowym komórek *Citrobacter freundii* pozwoliła na uzyskanie 7,3 g/L pirogalolu przy 98,5% wydajności procesu [Kumar i in. 1992]. Obecnie pirogalol otrzymywany jest metodami chemicznymi, cena 1 kg pirogalolu to około 800 zł [<http://www.merck-chemicals.com>].

Powszechnie stosowane przez przemysł tekstylny i farbiarski barwniki aktywne, np. antrachinonowe, azowe, ftalocyjaninowe, trifenylometanowe i inne, wykazują właściwości toksyczne i kancerogenne. Ścieki zawierające barwniki w swoim

składzie stanowią duże zagrożenie dla środowiska. Fizyczne i chemiczne metody usuwania barwników są kosztowne i generują duże ilości skoncentrowanych produktów ubocznych, problematycznych w składowaniu. Wang i in. [2009] opisali szczep *Citrobacter* CK3 zdolny do biodegradacji barwnika Reactive Red 180, jednocześnie wykazujący wysoką tolerancję na stężenie testowanego związku. Autorzy udowodnili, że badany mikroorganizm przeprowadza aktywny rozkład barwników, a nie bierną adsorpcję toksycznych związków. Badania An i in. [2002] potwierdziły, że bakterie z rodzaju *Citrobacter* są zdolne również do biodegradacji innych barwników, między innymi: fioletu krystalicznego, zieleni malachitowej, zieleni brylantowej, czerwieni Kongo i fuksyny [An i in. 2002].

Udowodniono, że pałeczki *Citrobacter* spp. akumulują i unieszkodliwiają metale ciężkie, takie jak miedź, cyrkon czy uran [Jeong i in. 1997; Gadd 2000; Sharma, Fulekar 2009]. Bakterie z rodzaju *Citrobacter* wykazuje się ruchliwością, która jest cechą zwiększającą zdolności bioremediacyjne opisywanych bakterii. Mechanizm wychwytywania metali polega na produkcji fosforanów, które wiążą metale [Gadd 2000; Sharma, Fulekar 2009]. Jeong i Macaskie [1999] opisali fosfatazę pochodzącą z *Citrobacter* sp. odpowiadającą za wiązanie uranu.

Wśród przedstawicieli rodzaju *Citrobacter* znaleźć można producentów 1,3-propanodiolu – związku organicznego znanego też jako: glikol trimetylenowy, glikol propylenowy czy 1,3-dihydroksypropan. Związek ten jest wykorzystywany do produkcji poliestrów, poliuretanów, nowych biodegradowalnych tworzyw sztucznych, smarów, żywic, laminatów czy rozpuszczalników organicznych [Deckwer 1995, da Silva i in. 2009]. W przemyśle farmaceutycznym służy do produkcji np. leków psychotropowych czy kremów (ze względu na właściwości nawilżające). Obecnie na skalę przemysłową większość 1,3-propanodiolu produkowana jest metodami chemicznymi, których wadami są wysokie ciśnienie i temperatura. Dodatkowo syntezы chemiczne wymagają stosowania drogich katalizatorów oraz generują duże ilości toksycznych produktów ubocznych [Saxena i in. 2009].



Rys. 3. Biosynteza 1,3-propanodiolu z glicerolu – szlak metaboliczny GDHt – dehydrataza glicerolowa; 1,3-PD DH – dehydrogenaza 1,3-propanodiolowa

1,3-propanodiol jest także otrzymywany na drodze biosyntezy przeprowadzanej przez mikroorganizmy naturalnie występujące w środowisku bądź genetycznie modyfikowane [Willke, Vorlop 2008; Saxena i in. 2009; da Silva i in. 2009; Celińska 2010] (rys. 3). Najlepszymi producentami 1,3-propanodiolu izolowanymi ze środo-

wiska są bakterie z rodzaju: *Klebsiella* (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*), *Citrobacter* (*C. freundii*) i *Clostridium* (*Cl. butyricum*, *Cl. acetobutylicum*, *Cl. diolis*). Przeprowadzone doświadczenia wskazują na duży potencjał aplikacyjny wymienionych mikroorganizmów – ze względu na uzyskiwane wysokie stężenia 1,3-propanodiolu w hodowlach oraz dużą tolerancję substratową [Willke, Vorlop 2008; Saxena i in. 2009; da Silva i in. 2009; Celińska 2010].

Wzrastająca produkcja biodiesla generuje powstawanie dużych ilości odpadowego glicerolu, który może być wykorzystany jako składnik pożywek do hodowli drobnoustrojów. Pożywki z glicerolem są stosowane w produkcji wielu ważnych przemysłowo metabolitów (między innymi 1,3-propanodiol) [Kośmider, Czaczyk 2009; Saxena i in. 2009; Rymowicz i in. 2010]. W 1992 r. Gottschalk i Averhoff opatentowali sposób otrzymywania 1,3-propanodiolu z glicerolu przy wykorzystaniu szczepu *Citrobacter freundii* DSM 30040. Opracowana technologia pozwala na wydajną biosyntezę związku równą 0,75 g/g glicerolu. Mikrobiologiczna synteza 1,3-propanodiolu wymaga pH bliskiego 7, temperatury 30-37°C oraz dodatku soli kobaltu (pierwiastka zapewniającego odpowiednią aktywność dehydratazy glicerołowej). Proces przebiega dwuetapowo – celem pierwszego etapu jest namnożenie maksymalnej ilości biomasy, a w drugim osiągnięcie maksymalnej wydajności biosyntezy 1,3-propanodiolu. W roku 1994 Pflugmacher i Gottschalk, prowadząc hodowle ciągle immobilizowanego na podłożu poliuretanowym szczepu *Citrobacter freundii* DSM 30040, uzyskali produktywność 8,2 g/dm³/h 1,3-PD. Wynik osiągnięty w hodowlach bakterii immobilizowanych był ponad dwa razy wyższy niż uzyskany w hodowlach komórek wolnych (reaktor z mieszadłem) [Gottschalk, Averhoff 1992; Boenigk i in. 1993]. Wykazano, że immobilizacja *Citrobacter freundii* na nośnikach alginianowych, karagenowych, poliuretanowych czy polistyrenowych pozwala zwiększyć wydajność procesu i umożliwić prowadzenie fermentacji przez dłuższy czas [Gottschalk, Averhoff 1992; Pflugmacher, Gottschalk 1994].

7. Podsumowanie

W niniejszej pracy przedstawiono aktualną wiedzę dotyczącą klasyfikacji, sposobów izolacji oraz identyfikacji bakterii z rodzaju *Citrobacter*. Podjęto próbę określenia stopnia bezpieczeństwa opisywanych bakterii. Na podstawie analizy danych literaturowych wykazano, że pałeczki *Citrobacter* spp. posiadają określony potencjał przemysłowy. Stwierdzono, że bakterie należące do tego rodzaju mają interesujące właściwości metaboliczne. Potrafią syntetyzować związki o dużym znaczeniu gospodarczym – np. pirogalol czy 1,3-propanodiol. Wytwarzają enzymy stosowane w inżynierii genetycznej oraz inne mogące mieć zastosowanie w przemyśle spożywczym. Charakteryzowane mikroorganizmy cechują się zdolnościami do aktywnego wiązania metali ciężkich oraz rozkładu barwników, mającymi zastosowanie w procesach oczyszczania ścieków komunalnych i przemysłowych. Istotne jest jednak poszerzenie wiedzy dotyczącej takich zagadnień, jak bezpieczeństwo stosowania oraz kalkulacja

opłacalności bioprocessów prowadzonych z udziałem bakterii z rodzaju *Citrobacter*. Rozwój biotechnologii i idei zielonej chemii pozwala przypuszczać, że potencjał przemysłowy *Citrobacter* spp. zostanie w użyteczny sposób wykorzystany.

Literatura

- Al-Hasan M.N., Eckel-Passow J.E., Baddour L.M., *Bacteremia complicating gram-negative urinary tract infections: a population base study*, Journal of Infection 2010, 60, s. 278-285.
- Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 3rd ed., American Public Health Association, 1992.
- An S.-Y., Min S.-K., Cha I.-H., Choi Y.-L., Cho Y.-S., Kim C.-H., Lee Y.-C., *Decolorization of triphenylmethane and azo dyes by Citrobacter sp.*, Biotechnology Letters 2002, 24, s. 1037-1040.
- Arens S., Verbist L., *Differentiation and susceptibility of Citrobacter isolates from patients in a university hospital*, Clinical Microbiology and Infection 1997, 3, s. 53-57.
- Badger J.D., Stins M.F., Kim K.S., *Citrobacter freundii invades and replicates in human brain microvascular in endothelial cell*, Infection and Immunity 1999, 67(8), s. 4208-4215.
- Barbিরato F., Himmi E.H., Conte T., Bories A., *1,3-Propanediol production by fermentation: an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries*, Industrial Crops and Products 1998, 7, s. 281-289.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, The Williams and Wilkins company/Baltimore 1994.
- Bednarski W., Rejs A., *Biotechnologia żywności*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2003.
- Biehl H., Marten S., *Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol: use of cosubstrates*, Applied Microbiology and Biotechnology 1995, 44, s. 15-19.
- Bitinaite J.B., Klimasauskas S.J., Butkus V.V., Janulaitis A.A., *Characterization of restriction-modification enzymes Cfr13 I from Citrobacter freundii RFL13*, FEBS Letters 1985, 182(2), s. 509-513.
- Boenigk R., Bowien S., Gottschalk G., *Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of Citrobacter freundii*, Applied Microbiology and Biotechnology 1993, 38, s. 453-457.
- Bozic D., Grazulis S., Siksnys V., Huber R., *Crystal structure of Citrobacter freundii restriction endonuclease Cfr10I at 2.15-Å resolution*, Journal of Molecular Biology 1996, 255, s. 176-186.
- Brenner D.J., Grimont P.A., Steigerwalt A.G., Fanning G.R., Ageron E., Riddle C.F., *Classification of Citrobacteria by DNA hybridization: designation of Citrobacter farmeri sp. nov., Citrobacter youngae sp. nov., Citrobacter braaki sp. nov., Citrobacter werkamii sp. nov., Citrobacter sedlakii sp. nov., and three unnamed Citrobacter Genomospecies*, International Journal of Systematic Bacteriology 1993, 43, s. 645-658.
- Brenner D.J., O'Hara C.M., Grimont P.A.D., *Biochemical identification of Citrobacter species defined by DNA hybridization and description of Citrobacter gillenii sp. nov. (formerly Citrobacter genomospecies 10) and Citrobacter murliniae sp. nov. (formerly Citrobacter genomospecies 11)*, Journal of Clinical Microbiology 1999, 37, s. 2619-2624.
- Curtis T., Sloan W., Scannell J., *Estimating prokaryotic diversity and its limits*, Proceedings of the National Academy of Sciences 2002, 99(16), s. 10494-10499.
- Celińska E., *Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering*, Biotechnology Advances 2010, 28, s. 519-530.
- Da Silva G.P., Mack M., Contiero J., *Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology*, Biotechnology Advances 2009, 27, s. 30-39.
- Daniel R., Boenigk R., Gottschalk G., *Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by Citrobacter freundii*, Journal of Bacteriology 1995, 16, s. 143-149.

- Deckwer W.-D., *Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol*, FEMS Microbiology Reviews 1995, 16, s. 143-149.
- Devenish J.A., Schiemann D.A., *An abbreviated scheme for identification of Yersinia enterocolitica isolated from food enrichment on CIN (ceftulodin-irgasanovobiocin) agar*, Canadian Journal of Microbiology 1981, 27, s. 937-941.
- Ewing W.H., Davis B.R., *Biochemical characterization of Citrobacter diversus (Burkey) Werkman and Gillen and designation of the neotype strain*, International Journal of Systematic Bacteriology 1972, 22, s. 12-18.
- Farmer J.J., Davis B.R., Hickman-Brenner F.W., Mcwhorter A., Huntley-Carter G.P., Asbury M.A., Riddle C., Wathen-Grady H.G., Elias C., Fanning G.R., Steigerwalt A.G., O'Hara C.M., Morris G.K., Smith P.B., Brenner D.J., *Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens*, Journal of Clinical Microbiology 1985, 21, s. 46-76.
- Frederiksen W., Sogaard P., *The genus Citrobacter*, [w:] *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. Ecophysiology, Isolation, Identification, Application*, Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H., 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin 1991, s. 2744-2753.
- Frederiksen W., *Citrobacter koseri (n. sp.) a new species within the genus Citrobacter; with a comment on the taxonomic position of Citrobacter intermedium (Werkman and Gillen)*, Publ. Fac. Sci. Univ. J.E. Purkyne 1970, 47, s. 89-94.
- Gadd G.M., *Bioremediation potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization*, Current Opinion in Biotechnology 2000, 11, s. 271-279.
- Gasiunas G., Sasnauskas G., Tamulaitis G., Urbanke C., Razaniene D., Siksnys V., *Tetrameric restriction enzymes: expansion to the GIY-YIG nuclease family*, Nucleic Acids Research 2008, 36, s. 938-949.
- Goodman R.E., Pickett M.J., *Delayed lactose fermentation by Enterobacteriaceae*, Journal of Bacteriology 1966, 92, s. 318-327.
- Gottschalk G., Averhoff B., *Process for the Microbiological Preparation of 1,3-propanediol from Glycerol by Citrobacter*, United States, 1992, Patent: 5164309.
- Gunasekaran V., Kotay S.M., Das D., *Alkaline lipase production by Citrobacter freundii IIT-BT L139*, Indian Journal of Experimental Biology 2006, 44, s. 485-491.
- Homann T., Tag C., Biehl H., Deckwer W.D., Schink B., *Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by Klebsiella and Citrobacter strains*, Applied Microbiology and Biotechnology 1990, 33, s. 121-126.
- Janda J.M., Abbott S.L., *16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls*, Journal of Clinical Microbiology 2007, 45, s. 2761-2764.
- Janda J.M., Abbott S.L., Cheung W.K., Hanson D.F., *Biochemical identification of Citrobacteria in the clinical laboratory*, Journal of Clinical Microbiology, 32, 1994, s. 1850-1854.
- Janda J.M., Abbott S.L., *The Enterobacteria*, ASM Press, 2nd ed., Washington DC 2006.
- Jeong B.C., Hawes C., Bonthron K.M., Macaskie L.E., *Localization of enzymically enhanced heavy metal accumulation by Citrobacter sp. and metal accumulation in vitro by liposomes containing entrapped enzyme*, Microbiology 1997, 143, s. 2497-2507.
- Jeong B.C., Macaskie L.E., *Production of two phosphatase by a Citrobacter sp. grown in batch and continuous culture*, Enzyme and Microbial Technology 1999, 24, s. 218-224.
- Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M., *Mikrobiologia lekarska*, red. P.B. Heczko, A. Pietrzyk, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007.
- Keuth S., Bisping B., *Vitamin B12 Production by Citrobacter freundii or Klebsiella pneumoniae during Tempeh Fermentation and Proof of Enterotoxin Absence by PCR*, Applied and Environmental Microbiology 1994, 60(5), s. 1495-1499.
- Kobashi K., Takebe S., Sakai T., *Urethane-hydrolyzing enzyme from Citrobacter sp.*, Chemical & Pharmaceutical Bulletin 1990, 38(5), s. 1326-1328.

- Kośmider A., Czaczyk K., *Perspektywy wykorzystania glicerolu w procesach biotechnologicznych*, Postępy Mikrobiologii 2009, 48(4), s. 277-287.
- Kumar A.R., Jayaraman A., Lakshmanan M., Gunasekaran P., *Bioconversion of gallic acid into pyrogallol by immobilized Citrobacter freundii TB3*, Journal of Fermentation and Bioengineering 1992, 74(3), s. 159-162.
- Lavinge J.P., Efez C., Bouziges N., Mahatma A., Sotto A., *Clinical and molecular epidemiology of multidrug-resistant Citrobacter spp. infection in a French university hospital*, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 2007, 26, s. 439-441.
- Lowe B.A., Marsh T.L., Isaacs-Cosgrove N., Kirkwood R.N., Kupel M., Mulks M.H., *Microbial communities in the tonsils of healthy pigs*, Veterinary Microbiology 2011, 147, s. 346-357.
- Lubys A., Menkevičius S., Timinskas A., Butkus V., Janulaitis A., *Cloning and analysis of translational control for genes encoding the Cfr9I restriction-modification system*, Gene 1994, 141, s. 85-89.
- Mohanty S., Singhal R., Sood S., Dhawan B., Kapil A., Das B.K., *Citrobacter infection in a tertiary care hospital in Northern India*, Journal of Infection 2007, 54, s. 58-64.
- O'Hara C.M., Roman S.B., Miller J.M., *Ability of commercial identification systems to identify newly recognized species of Citrobacter*, Journal of Clinical Microbiology 1995, 33, s. 242-245.
- Orij J.C., Neweke C.O., Nwabueze R.N., Nwanyanwu C.E., Alisi C.S., Etim-Osowo E.N., *Production and properties of α -amylase from Citrobacter species*, An Interdisciplinary Journal of Applied Science 2009, 4(1), s. 45-57.
- Pflugmacher U., Gottschalk G., *Development of an immobilized cell reactor for the production of 1,3-propanediol by Citrobacter freundii*, Applied Microbiology and Biotechnology 1994, 41, s. 313-316.
- Pobucewicz A., Czernomysy-Furowicz D., *Charakterystyka Citrobacter freundii, ze szczególnym uwzględnieniem ich zdolności do wytwarzania toksyn*, Postępy Mikrobiologii 2010, 49(1), s. 43-46.
- Rymowicz W., Wojtatowicz M., Radziwicz A., *EKSPERTYZA: Użycie odpadów rolniczych do produkcji użytecznych substancji chemicznych w procesach zielonej chemii i białej technologii – ocena możliwości naukowo-badawczych i wdrożeń*, Dolnośląskie Centrum Zaawansowanych Technologii, Regionalna Sieć Naukowo-Gospodarcza „BIOTECH”, 2006.
- Rymowicz W., Fatykhova A.R., Kamzolova S.V., Rywińska A., Morgunov I.G., *Citric acid production from glycerol-containing waste biodiesel industry by Yarrowia lipolytica in batch, repeated batch, and cell recycle regimes*, Applied Microbiology and Biotechnology 2010, 87, s. 971-979.
- Saffert R.T., Cunningham S.A., Ihde S.M., Monson Jobe K.E., Mandrekar J., Patel R., *Comparison of Bruker Biotyper MALDI-TOF Mass Spectrometer to BD Phoenix Automated Microbiology System for Identification of Gram Negative Bacilli*, Journal of Clinical Microbiology 2011, 49(3), s. 887-892.
- Samonis G., Karageorgopoulos D.E., Kofteridis D.P., Matthaiou D.K., Sidiropoulou V., Maraki S., Falagas M.E., *Citrobacter infectans in a general hospital: characteristics and outcomes*, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 2009, 28, s. 61-68.
- Saxena R.K., Anand P., Saran S., Isar J., *Microbial production of 1,3-propanediol: Recent development and emerging opportunities*, Biotechnology Advances 2009, 27, s. 895-913.
- Schauer D.B., Zabel B.A., Pedraza I.F., O'Hara C.M., Steigerwalt A.G., Brenner D.J., *Genetic and biochemical characterization of Citrobacter rodentium sp. nov.*, Journal of Clinical Microbiology 1995, 33(8), s. 2064-2068.
- Schloss P.D., Handelsman J., *Status of the Microbial Census*, Microbiology and Molecular Biology Reviews 2004, 68(4), s. 686-691.
- Seifert C., Bowien S., Gottschalk G., Daniel R., *Identification and expression of the genes and purification and characterization of the genes products involved in reactivation of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of Citrobacter freundii*, European Journal of Biochemistry 2001, 268, s. 2369-2378.

- Sharma J., Fulekar M.F., *Potential of Citrobacter freundii for bioaccumulation of heavy metal – copper*, Biology and Medicine 2009, 1(3), s. 7-14.
- Sharma M., Anad S.K., *Biofilm evaluation as an essentials component of HACCP for food/dairy processing industry – a case*, Food Control 2002, 13, s. 469-477.
- Spanggaard B., Huber I., Nielsen J., Nielsen T., Appel K.F., Gram L., *The microflora of rainbow trout intestine: A comparison of traditional and molecular identification*, Aquaculture 2000, 182, s. 1-15.
- Szewczyk M. E., *Podłoża izolacyjne*, [w:] *Diagnostyka bakteriologiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
- Thompson L.J., Gray V.M., Kalala B., Lindsay D., Reynolds K., Von Holy A., *Biohydrogen production by Enterobacter cloacae and Citrobacter freundii in carrier induced granules*, Biotechnology Letters 2008, 30, s. 271-274.
- Wang H., Su J.Q., Zheng X.W., Tian Y., Xiong X.J., Zheng T.L., *Bacterial decolorization and degradation of the reactive dye Reactive Red 180 by Citrobacter sp. CK3*, International Biodeterioration & Biodegradation 2009, 63, s. 395-399.
- Willke T., Vorlop K., *Biotransformation of glycerol into 1,3-propanediol*, European Journal of Lipid Science and Technology 2008, 110, s. 831-840.
- York M.K., Brooks G.F., Fiss E.H., *Evaluation of the autoSCAN-W/A rapid system for Identification and Susceptibility Testing of Gram-Negative Fermentative Bacilli*, Journal of Clinical Microbiology 1992, 30, s. 2903-2910.

Źródła internetowe

www.merck-chemicals.com.

www.scribd.com/doc/26899390/genus-citrobacter.

CHARACTERISTICS AND APPLICATIVE POTENTIAL OF CITROBACTER SPP.

Summary: *Citrobacter* spp. are facultatively anaerobic, Gram-negative rods belonging to the Enterobacteriaceae family. The genus consists of eleven species among which are *C. amalonaticus*, *C. freundii*, *C. koseri (diversus)*. In this article the bacteria of the genus *Citrobacter* spp. are classified and characterized. Methods of isolation and identification are specified. In addition, current state of biotechnological research and applications of *Citrobacter* spp. such as: bioremediation processes, synthesis of industrially important organic compounds – e.g. pyrogallol or 1,3-propanediol and production of enzymes (amylases, lipases, metylases) are presented.

Keywords: biotechnology, 1,3-propanediol, *Citrobacter* spp.