

Katarzyna Leja<sup>1\*</sup>, Katarzyna Czaczyk<sup>1</sup>, Kamila Myszk<sup>1</sup>

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Poznań, Poland

Wpłynęło w listopadzie 2013 r.

1. Wstęp. 2. Ogólna charakterystyka rodzaju *Clostridium*. 2.1. Morfologia, hodowla i metabolizm. 2.2. Chorobotwórczość. 3. Przemysłowe wykorzystanie *Clostridium* spp. 3.1. Biosynteza acetonu, butanolu i innych rozpuszczalników. 3.2. Synteza 1,3-propanodiolu. 3.3. Produkcja kwasów. 3.4. Produkcja wodoru. 3.5. Inne metabolity. 4. Wykorzystanie bakterii z rodzaju *Clostridium* w medycynie i kosmetyce. 5. Podsumowanie

#### Industrial Application of *Clostridium* spp.

**Abstract:** Bacteria of the genus *Clostridium* are often described only as being a biological threat and a foe of mankind. It is true that within the more than 150 validly described clostridial species of this heterogeneous genus, there are some that produce the most potent natural toxins known on earth. However, there is no much information about positive properties and possibility to use *Clostridium* strains in many industry branches, in medicine, and cosmetology. The modern biotechnology make possible to use the dangerous toxins as a valuable tools in the treatment of severe disease. It is one of the aims of this article to show that using definition “bad clostridia” is mistaken.

1. Introduction. 2. Characterization of *Clostridium* genera. 2.1. Morphology, cultivation and metabolism. 2.2. Pathogenicity. 3. Industrial Application of *Clostridium* spp. 3.1. Acetone, butanol and other solvents biosynthesis. 3.2. 1,3-propanediol biosynthesis. 3.3. Acids production. 3.4. Hydrogen production. 3.5. Other metabolites. 4. Application of *Clostridium* spp. in medicine and cosmetology. 5. Conclusions

**Słowa kluczowe:** aceton, butanol, *Clostridium* spp., medycyna estetyczna, terapia nowotworów, 1,3-propanodiol

**Key words:** acetate, aesthetic medicine, butanol, cancer treatment, *Clostridium* spp., 1,3-propanediol

## 1. Wstęp

Pierwsze doniesienie dotyczące klostridiów pojawiło się już ok. roku 430–370 przed naszą erą. Hipokratę opisał w swojej książce *Epidemie III (Epidemics III)* chorobę, która diagnozowana była jako zgorzel gazowa. Wywoływana była ona przez *Clostridium histolyticum* [66]. Do jej objawów należały gorączka oraz obrzęk skóry w kolorze żółtawo-czerwonym. W niektórych przypadkach dochodziło do utraty kończyn. Takie same objawy uzyskano w późniejszych eksperymentach na zwierzętach zainfekowanych *Cl. histolyticum*. Pierwszy opis innej choroby powodowanej przez bakterie należące do *Clostridium* spp. – tężca – pojawił się natomiast w roku 1824 w *Esseys on the Anatomy and Philosophy of Expression* Charlesa Bella [66]. Jednakże rozpoznanie klostridiów jako odrębnej grupy mikroorganizmów zapoczątkowała praca Louisa Pasteura. W 1861 roku opisał on mikroorganizm zdolny do wzrostu bez obecności tlenu. W tamtych czasach było to ogromną sensacją. Pasteur nazwał tę bakterię *Vibrion butyrique* ze względu na główny produkt fermentacji – maślan i wprowadził termin „beztlenowy” dla określania życia bez wolnego tlenu. Organizm ten został 20 lat później nazwany *Clostri-*

*dium butyricum* przez polskiego mikrobiologa Adama Prażmowskiego [25].

Bakterie z rodzaju *Clostridium* występują w środowisku naturalnym bardzo powszechnie, są obecne między innymi w kurzu, glebie, wodzie, osadach dennych oraz przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt [70]. Znane są przede wszystkim ze swojej chorobotwórczości. Warto zwrócić także uwagę na możliwość wykorzystania gatunków z tego rodzaju w przemyśle. Duża aktywność biochemiczna *Clostridium* sp. wynika z tego, że produkują one liczne enzymy zewnątrzkomórkowe. Bakterie należące do tego rodzaju są zdolne do fermentacji składników organicznych i produkcji dużych ilości dwutlenku węgla, wodoru, kwasów organicznych, butanolu, acetonu i innych składników. Klostridia niebędące patogenami wykazują duży potencjał przemysłowy. Stosowane są między innymi do produkcji kwasu masłowego, niektórych rozpuszczalników (m.in. butanolu, acetonu i izopropanolu) oraz wodoru [14]. Wykorzystywane są także w medycynie. W ciągu ostatniego dziesięciolecia znacznie wzrosło zainteresowanie *Cl. botulinum* i *Cl. tetani*. Prowadzone są intensywne badania nad strukturą, fizjologią oraz biochemią neurotoksyn wytwarzanych przez te bakterie [12, 53, 77, 80], jak również nad wykorzystaniem kompleksu toksyn

\* Autor korespondencyjny: Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań; e-mail: katleja@up.poznan.pl

botulinowych jako czynników terapeutycznych w leczeniu chorób u ludzi [13, 22, 39]. W literaturze pojawiają się także informacje dotyczące produkcji baktteriocyn przez takie szczepy jak między innymi *Cl. sporogenes*, *Cl. butyricum*, *Cl. botulinum* [26], *Cl. perfringens* i *Cl. acetobutylicum* [3, 18].

## 2. Ogólna charakterystyka rodzaju *Clostridium*

### 2.1. Morfologia, hodowla i metabolizm

Komórki laseczek *Clostridium* są różnej wielkości, barwią się gramdodatnio lub gramujemnie oraz tworzą przetrwalniki. Przetrwalniki są owalne lub kuliste. Kolonie tych laseczek są dość duże, płaskie, okrągłe lub owalne, brzeg mogą mieć równy lub postrzępiony, powierzchnię matową, szorstką, barwę szarawą do szarżółtawej. Długość komórek wynosi średnio 0,5–5 µm, a szerokość 0,3–2,0 µm. Kształt komórek bywa zmienny i uwarunkowany jest czynnikami środowiskami. Bakterie należące do tego rodzaju są beztlenowcami, nie wytwarzają katalazy [70]. Komórki są ruchliwe, urzęsione peritrichalnie. Optymalna temperatura wzrostu większości gatunków tego rodzaju mieści się między 30–40°C. Wśród klostridiów są również gatunki termofilne, dla których optymalna temperatura wzrostu wynosi 60 i 75°C. Gatunki te mają szczególne znaczenie w procesach przemysłowych i biotechnologicznych, ponieważ prowadzone przez nie procesy zachodzą szybko, a enzymy tych bakterii wykazują dużą stabilność. Wśród klostridiów znajdują się także gatunki, które nie wykazują typowych cech morfologicznych dla tego rodzaju. Należą do nich *Cl. coccoides*, które tworzą okrągłe komórki, *Cl. perfringens*, *Cl. leptum*, *Cl. barati* i *Cl. spiroforme*, u których nie wykryto przetrwalników, *Cl. tertium*, *Cl. carnis*, *Cl. histolyticum* i *Cl. intestinalis* wzrastające w warunkach tlenowych [85].

Klostridia wykazują intensywny metabolizm fermentacyjny, wykorzystując takie substraty jak monosacharydy, disacharydy i polisacharydy. Do głównych produktów fermentacji prowadzonej przez te bakterie należą kwas octowy, masłowy, mlekowy, mrówkowy, etanol, butanol, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> i NH<sub>3</sub>. Na tej podstawie bakterie te można podzielić na gatunki sacharolityczne, które fermentują głównie mono- i polisacharydy (m.in. *Cl. cellobioparum*, *Cl. cellulovorans*, *Cl. butyricum*, *Cl. acetobutyricum*, *Cl. aceticum*, *Cl. stercorarium*) oraz proteolityczne fermentujące białka i aminokwasy (m.in. *Cl. sporogenes*, *Cl. bifermentans*, *Cl. kluyveri*, *Cl. acidurici*) [69].

### 2.2. Chorobotwórczość

Rodzaj *Clostridium* obejmuje ponad 100 gatunków. Wśród nich znajduje się około 35 gatunków patogennych wytwarzających egzotoksyny, między innymi *Cl. bo-*

*tulinum*, *Cl. perfringens*, *Cl. tetani*, *Cl. barati*, *Cl. haemolyticum*, *Cl. novyi*, *Cl. septicum*, *Cl. chauvoei* oraz *Cl. difficile* [70].

Najbardziej znanym patogenem z rodzaju *Clostridium* jest *Cl. botulinum* powodujący botulizm. Chorobę tę można podzielić na 6 typów – botulizm pochodzenia pokarmowego, czyli klasyczny, botulizm przyranny, botulizm niemowląt, botulizm pochodzenia jelitowego dorosłych, botulizm inhalacyjny i botulizm jatrogenny. W Polsce, w 2004 roku zarejestrowano 53 przypadki botulizmu pochodzenia pokarmowego. Natomiast botulizm przyranny został po raz pierwszy opisany w 1951 roku. Od tego roku do końca lat 90. XX wieku ponad 90% zachorowań zostało rozpoznanych w USA. Od 1988 roku odnotowano duży wzrost liczby nowych przypadków wśród osób zażywających narkotyki w iniekcjach. Objawy kliniczne botulizmu przyrannego są takie same, jak zatrucia jadem kiełbasianym pochodzenia pokarmowego. Botulizm niemowląt jest następstwem połknięcia zarodników *Cl. botulinum*, które kiełkują tworząc formy wegetatywne zdolne do namnażania się i produkcji neurotoksyny botulinowej w świetle jelita grubego. Zachorowania występują począwszy od pierwszych dni życia [11, 70].

*Cl. tetani* wywołuje różne odmiany tężca (m.in. miejscowy oraz uogólniony). Zakażenie następuje podczas urazów penetrujących skażonych glebą, warunkujących rozwój beztlenowy – drobnoustroj zaczyna wydzielać toksynę, która drogą aksonalną dociera do rdzenia kręgowego, w którym zaburza działanie hamujące neuronów wstawkowych [11, 85].

Laseczki *Cl. difficile* są przyczyną szpitalnych zakażeń pokarmowych. Szczepy, które wykazują działanie chorobotwórcze wytwarzają dwie różne toksyny białkowe silną cytotoksynę oraz wywołującą biegunki enterotoksynę, które uwalniane są przez komórki wegetatywne. Bakterie te są także przyczyną 25% wszystkich biegunek rozwijających się po doustnym podaniu antybiotyków [11].

Bakterie *Cl. perfringens* wywołują zgorzel gazową oraz są powodem silnych zatruc pokarmowych związanych z uwalnianiem z komórek wegetatywnych enterotoksyn. W rozwoju zgorzeli gazowej uczestniczą także inne gatunki *Clostridium*, m.in. *Cl. novyi* i *Cl. septicum* [85].

## 3. Przemysłowe wykorzystanie *Clostridium* spp.

### 3.1. Biosynteza acetonu, butanolu i innych rozpuszczalników

Niektóre szczepy rodzaju *Clostridium* posiadają zdolność do produkcji substancji o wartościach rozpuszczalników. Są nimi aceton, butanol i etanol, między innymi *Cl. acetobutylicum*, *Cl. pasteurianum*, *Cl. beijer-*

*rinckii*, *Cl. saccharoperbutylacetonicum* i *Cl. saccharobutylicum* [41, 48]. Najlepiej poznanym szczepem należącym do tej grupy jest *Cl. acetobutylicum*, a acetonowo-butanolowa fermentacja prowadzona przez te bakterie stanowiła przez długi czas podstawę dla produkcji tych rozpuszczalników na skalę przemysłową [2, 44]. Wśród *Cl. beijerinckii* znajdują się szczepy, które oprócz butanolu produkują także izopropanol [15, 30]. *Cl. pasteurianum* fermentuje natomiast węglowodory do butanolu, acetonu, dwutlenku węgla oraz cząsteczkowego wodoru [19, 34].

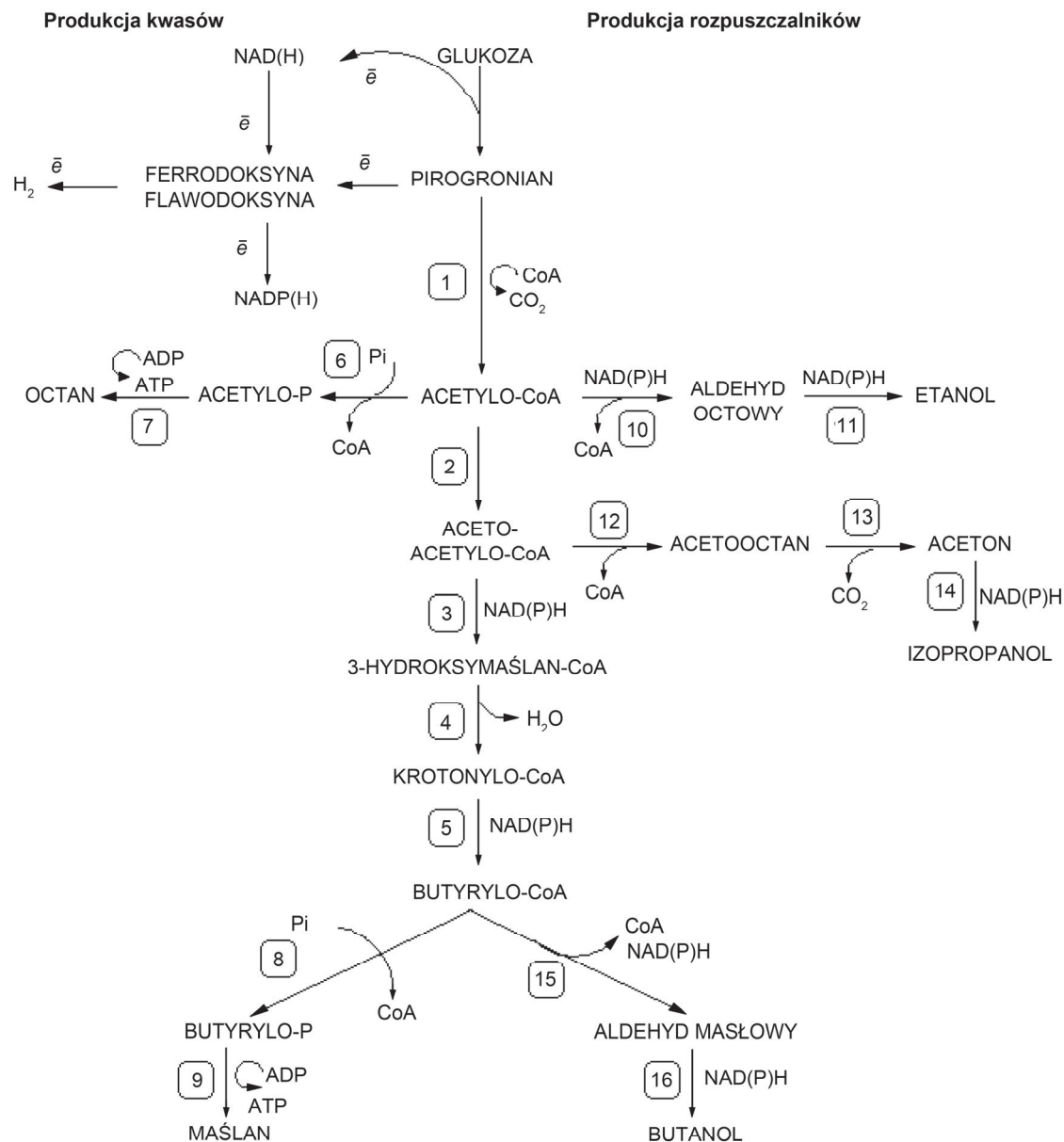
Produkcja acetonu, butanolu i etanolu poprzez fermentację stosowana jest od wielu lat. Szczególne zainteresowanie produkcją acetonu na drodze mikrobiologicznej zaobserwowano podczas I Wojny Światowej, ponieważ stosowany był on jako rozpuszczalnik nitrocelulozy [44]. Po wojnie znacznie spadło zainteresowanie produkcją acetonu, wzrosło natomiast zainteresowanie butanolem, ponieważ stosowany był on do syntezy octanu butylu, który z kolei wykorzystywany był jako rozpuszczalnik do lakierów samochodowych [24]. Jednakże, w latach 20. XX wieku proces produkcji wielu rozpuszczalników na drodze biotechnologicznej został zastąpiony metodami petrochemicznymi, a w latach 60. XX wieku fermentacja prowadzona przez *Clostridium* została całkowicie wyeliminowana z użycia w przemyśle. Powodem rezygnacji z tego procesu była niska produktywność wynikająca z wolnego przebiegu procesu, niewielkiej wydajności oraz wysokich kosztów odzyskiwania produktów (między innymi poprzez destylację). Obecnie zauważalna jest tendencja powrotu do produkcji rozpuszczalników metodą fermentacji. Wzrastająca troska o środowisko i konieczność uniezależnienia produkcji rozpuszczalników od surowców pochodzących z przemysłu petrochemicznego, spowodowały wzrost zainteresowania produkcją rozpuszczalników z surowców naturalnych (kukurydzy, melasy sojowej, hydrolizatów drewna). Postęp w badaniach umożliwił uczynienie tej fermentacji procesem korzystnym dla środowiska oraz konkurencyjnym z ekonomicznego punktu widzenia [19, 43, 74]. Na początku XX wieku fermentacja tego typu stosowana była wyłącznie do produkcji etanolu. Jednakże w kolejnych latach była wykorzystywana również do produkcji pozostałych metabolitów (butanolu i acetonu) [63, 74, 84]. Butanol stanowi dodatek do paliwa, który umożliwia znaczną redukcją wydzielanego dymu [54].

W hodowli dolewowej klostridiów produkujących rozpuszczalniki wyróżnia się dwie znaczące fazy wzrostu. Podczas wczesnej fazy wzrostu (faza kwasowa) głównie produkowane są takie metabolity, jak aceton, maślan, wodór i dwutlenek węgla, co powoduje spadek pH pożywki hodowlanej. W kolejnym etapie hodowli następuje zmiana w metabolizmie i wów-

czas produkowane są butanol, aceton/izopropanol, etanol, a także wodór i dwutlenek węgla (faza produkcji rozpuszczalników). pH pożywki hodowlanej wzrasta podczas produkcji rozpuszczalników w wyniku częściowej reutilizacji produkowanych wcześniej kwasowych produktów końcowych [46]. Badania nad bakteriami należącymi do *Clostridium* spp. pokazały, że w sytuacji niedoboru źródła węgla w pożywce produkowane są tylko kwasy [67]. Minimalnie 10 g/l glukozy musi być obecne podłożu, by bakterie należące do *Cl. saccharobutylicum* mogły produkować rozpuszczalniki [62]. W przypadku *Cl. acetobutylicum* nawet jeżeli w pożywce hodowlanej znajduje się mniej niż 10 g/l glukozy w hodowli dolewowej oraz mniej niż 4 g/l w okresowo-dolewowej, rozpuszczalniki są normalnie produkowane [27, 46].

Oprócz reakcji glikolitycznych, szlak metaboliczny produkcji kwasów i rozpuszczalników dzieli sekwencję następujących po sobie reakcji między pirogronianem i butyrylo-CoA [46]. Podczas fazy produkcji kwasów, aceton produkowany jest z acetylo-CoA, a maślan z butyrylo-CoA. Produkcja ta odbywa się poprzez dwa analogiczne szlaki, podczas których powstaje jedna cząsteczka ATP na każdą reakcję. Podczas produkcji rozpuszczalników, acetylo-CoA i butyrylo-CoA funkcjonują jako kluczowe czynniki pośrednie do produkcji etanolu i butanolu. Acetylo-CoA stanowi kluczowy czynnik pośredni dla syntezy acetonu. U niektórych szczepów *Cl. beijerinckii* i *Cl. aurantibutyricum* aceton jest w późniejszych etapach redukowany do izopropanolu. Zarówno dehydrogenaza aldehydowa, jak i dehydrogenaza alkoholowa są niezbędne do produkcji alkoholu. Pomiar aktywności dehydrogenazy aldehydowej pokazały, że enzym ten jest zdolny do syntezy dwóch aldehydowych półproduktów – aldehydu butylowego i aldehydu octowego, które są niezbędne do wytwarzania butanolu i etanolu przez *Cl. saccharobutylicum* i *Cl. beijerinckii* [32, 46]. Szlak metaboliczny produkcji kwasów i rozpuszczalników przez *Clostridium* sp. przedstawiony został na Rys. 1.

Potencjał tanich surowców rolniczych może być wykorzystany tylko wówczas, jeżeli stosowane będą nowoczesne technologie biokonwersji do związków będących pochodnymi paliw. Wydajność produkcji rozpuszczalników w tradycyjnym reaktorze jest niska i wynosi 0,1–0,3 l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Ponadto wymagane są duże zbiorniki fermentacyjne oraz długie procesy fermentacji. Naukowcy nieustannie poszukują rozwiązań tych problemów. Jednym z nich jest zastosowanie immobilizowanych komórek *Cl. beijerinckii* w procesie fermentacji w celu intensyfikacji produkcji rozpuszczalników [74]. Stosować z powodzeniem można dwie techniki immobilizacji adsorpcję oraz pułapkowanie wewnątrz karagenu i chitozanu [29] oraz alginianu wapnia [54].



Rys. 1 Szlak metaboliczny produkcji kwasów i rozpuszczalników przez *Clostridium beijerinckii*

Enzymy katalizujące reakcję: 1) oksydoreduktaza pirogronian/ferredoksyna; 2) tiolaza; 3) dehydrogenaza 3-hydroksymaślano-CoA; 4) krotonaza; 5) dehydrogenaza maślano-CoA; 6) fosfotransacetylaza; 7) kinaza octanu; 8) fosfotransbutyrylaza; 9) kinaza maślanu; 10) dehydrogenaza aldehydu; 11) dehydrogenaza alkoholowa; 12) transferaza acetoacetylo-CoA:octan/maślano-CoA; 13) dekarboksylaza acetoacetylo-CoA; 14) dehydrogenaza alkoholowa; 15) dehydrogenaza aldehydu; 16) dehydrogenaza alkoholowa

### 3.2. Synteza 1,3-propanodiolu

W ostatnich latach znacznie wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem bakterii należących do *Clostridium* spp. w produkcji 1,3-propanodiolu (1,3-PD). Spośród tej grupy mikroorganizmów najczęściej do produkcji tego diolu stosuje się takie szczepy, jak między innymi *Cl. diolis*, *Cl. acetobutylicum*, *Cl. butylicum*, *Cl. perfingens*, *Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum* [8, 57]. Wśród nich bardzo ważną rolę odgrywa *Cl. butyricum* – charakteryzuje się on wysoką produktywnością oraz małymi wymaganiami podczas hodowli [14, 23]. Podczas produkcji 1,3-PD przez *Cl. pasteurianum* produ-

kowane są także inne metabolity, etanol, kwas octowy oraz butanol [10, 47].

1,3-PD zidentyfikowany został w 1881 roku przez Augusta Freunda podczas fermentacji prowadzonej przez *Cl. pasteurianum*. Produktami w takiej fermentacji są także butanol, etanol i kwas octowy [8]. Klostridia fermentujące glicerol do 1,3-PD zostały natomiast opisane dopiero w roku 1983 [9]. 1,3-PD posiada szerokie zastosowanie w przemyśle, między innymi stanowi wartościowy półprodukt w produkcji polimerów (między innymi poliestrów, polieterów oraz poliuretanów), smarów, kosmetyków, związków pierścieniowych, a także w medycynie [9, 68]. Materiały powstałe z reakcji



Tabela I

Wybrane przykłady syntezy 1,3-PD z odpadowego oraz czystego glicerolu przez wybrane szczepy *Clostridium*

Produkt	Produkty uboczne	Substrat	Szczep	Piśmiennictwo
1,3-Propanodiol (48 g/l, Y = 0,66)	Octan, maślan	Odpadowy glicerol	<i>Clostridium butyricum</i> F2b	[72, 73]
1,3-Propanodiol (30,5 g/l, Y = 0,61)	Octan, maślan	Odpadowy glicerol	<i>Clostridium acetobutylicum</i> DG1 (pSPD5)	[31]
1,3-Propanodiol (86 g/l, Y = 0,65)	Octan, maślan	Czysty glicerol	<i>Clostridium acetobutylicum</i> DG1 (pSPD5)	[35]
1,3-Propanodiol (66,6 g/l, Y = 0,69)	Maślan	Czysty glicerol	<i>Clostridium butyricum</i> VPI3266	[31, 79]
1,3-Propanodiol (63,4 g/l, Y = 0,69)	Octan, maślan	Odpadowy glicerol	<i>Clostridium butyricum</i> CNCM1211	[4]
Butanol	1,3-Propanodiol, etanol, maślan, octan	Czysty glicerol	<i>Clostridium pasteurianum</i> DSM525	[10]

Y = mol produktu/mol glicerolu

polimeryzacji 1,3-PD charakteryzują się wysokim bezpieczeństwem przemysłowym, wysoką specyficznością, a ponadto stosunkowo niską ceną [51].

W ostatnich latach znacznie wzrosło zainteresowanie biotechnologiczną produkcją 1,3-PD z glicerolu będącego produktem ubocznym z produkcji biodiesla. W 2010 roku produkcja biodiesla w Polsce osiągnęła poziom 1,5 mln ton. Równocześnie powstał problem z zagospodarowaniem 300 tys. ton fazy glicerynowej, której zbyt istotnie wpływa na cenę biopaliwa. Zastosowanie odpadowego glicerolu do produkcji przemysłowo użytecznych metabolitów, w tym 1,3-PD, z jednej strony umożliwi utrzymanie cen biopaliwa na niższym poziomie, z drugiej zaś strony da możliwość pozyskiwania ważnych metabolitów z tanich surowców [51]. Wybrane przykłady syntezy 1,3-PD z odpadowego oraz czystego glicerolu przez szczepy *Clostridium* zostały przedstawione w tabeli I.

### 3.3. Produkcja kwasów

Bakterie z rodzaju *Clostridium* wykazują także zdolność syntezy kwasów, między innymi bursztynowego, octowego, masłowego, propionowy i mlekowego [40, 65, 87]. Kwas masłowy znajduje szerokie zastosowanie w przemyśle chemicznym (do syntezy polimerów butyrylowych), farmaceutycznym, a ponadto stosowany jest w technologii spożywczej do wzmacniania masłowej nuty smakowej w produktach spożywczych [61, 89, 91]. Estry kwasu masłowego znajdują także zastosowanie jako składniki aromatyczne w produkcji perfum [89]. Kwas masłowy wytwarzany jest głównie poprzez oksydację aldehydu butyrylu otrzymywanego w wyniku oksosyntezy propylenu [89]. Obecnie jednak, obserwuje się wzrost zainteresowania produkcją tego metabolitu z biomasy poprzez fermentację [91]. Znanych jest wiele rodzajów bakterii beztlenowych produkujących kwas masłowy jako główny produkt fermentacji, między innymi *Butyrivibrio*, *Butyribacterium*, *Sarcina*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* oraz *Megasphaera*. Jednakże, w przemyśle zdecydowanie preferowane do

tego celu są szczepy należące do *Clostridium* spp. (m.in. *Cl. butyricum*, *Cl. beijerinckii*, *Cl. populeti*, *Cl. thermobutyricum* i *Cl. tyrobutyricum*) [90–91]. Zaletą tych bakterii jest umiejętność fermentowania ksylozy, co czyni je szczególnie przydatnymi w produkcji kwasu masłowego z biomasy [90]. Spośród bakterii należących do *Clostridium* dobrym producentem jest *Cl. tyrobutyricum*. Bakterie te mają małe wymagania pokarmowe, a przy tym wykazują znaczną wydajność syntezy kwasu masłowego o wysokiej czystości. Jednakże, tak jak inne bakterie kwasogenne, bakterie kwasu masłowego podlegają inhibicji zwrotnej [89].

Kwas octowy stosowany jest m.in. do produkcji sztucznego jedwabiu, leków, niepalnej taśmy filmowej, kwasu chlorooctowego, octanów, karboksymetylocelulozy, octanu celulozy, jako ocet spożywczy do konserwacji żywności. Nowe przemysłowe zastosowania kwasu octowego obejmują produkcję octanu wapniowo-magnezowego jako niekorozyjnego środka topiącego lód na drogach oraz octan potasu i octan sodu jako środka topiącego lód na pasach startowych na lotniskach. Substancje te są ekologiczne, ale bardzo kosztowne. Dlatego też poszukuje się tanich metod produkcji kwasu octowego oraz octanu poprzez beztlenową fermentację surowców odnawialnych (m.in. glukozy, biomasy drzewnej, odpadów z przemysłu spożywczego). Spośród szczepów *Clostridium* do produkcji kwasu octowego zdolne są m.in. *Cl. thermoaceticum* oraz *Cl. formicoaceticum* (mikroorganizm zdolny do fermentacji fruktozy do kwasu octowego). Kwas octowy jest również często produktem ubocznym podczas otrzymywania innych metabolitów, np. 1,3-PD w wyniku fermentacji glukozy za pomocą *Cl. butyricum* oraz kwasu propionowego w wyniku fermentacji z udziałem *Cl. propionicum* [36, 40, 76, 81].

Kwas propionowy stosowany jest w przemyśle jako konserwant przedłużający zdatność do spożycia produktów spożywczych, działając jako inhibitor pleśni i niektórych bakterii [88]. Metabolit ten otrzymywany jest dla przemysłu spożywczego głównie w wyniku syntezy chemicznej. Powodem tego jest niska wydajność

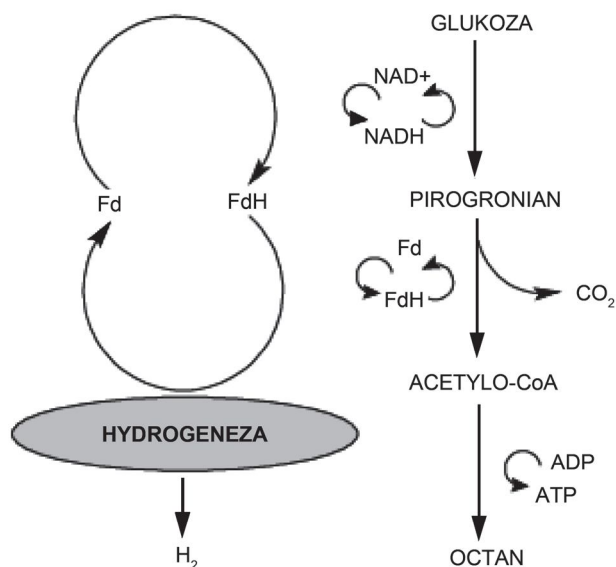
produkcji na drodze fermentacji. Jednakże, opracowanie wydajnej technologii fermentacji propionowej, uczyniłoby technikę tę mocno konkurencyjną dla syntezy chemicznej. Kwas propionowy produkowany jest głównie przez bakterie należące do *Propionibacterium* spp. oraz przez *Cl. propionicum*, mikroorganizm wyizolowany z mułu morskiego. *Cl. propionicum* produkuje kwas propionowy prowadząc rozkład mleczanu, akrylanu i pirogronianu. Podczas tego procesu powstają także kwas octowy oraz dwutlenek węgla [40, 52]. Ponadto, znane są także inne szczepy zdolne do syntezy kwasu propionowego, tj. *Cl. haemolyticum*, *Cl. novyi*, *Cl. botulinum* typ C i D, *Cl. quericolum* oraz *Cl. arcticum* [7].

### 3.4. Produkcja wodoru

Wodór uważany jest za jeden z istotniejszych nośników energii i określany mianem paliwa XXI wieku. Wodór stanowi czyste źródło energii, gdyż jedynym produktem jego spalania jest woda. Kolejną zaletą wodoru jest fakt, że stanowi on bardzo wydajne źródło energii o energii właściwej równej  $33 \text{ Whg}^{-1}$ . Pierwiastek też może być przekształcany w energię w silnikach spalinowych oraz w chemicznych ogniwach paliwowych. Wchodzi także w skład paliw raketowych [82]. Obecnie 90% wodoru jest produkowane z metanu albo w wyniku elektrolizy wody. Zużycie wodoru stanowi zaledwie 3% całkowitego zużycia energii [58].

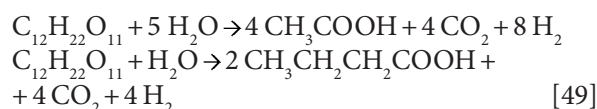
Wodór wytwarzany jest głównie metodami chemicznymi [17]. Jednakże, w ciągu ostatnich dwudziestu lat prowadzonych było wiele badań dotyczących biologicznych procesów produkcji wodoru. Opisano między innymi pośrednią i bezpośrednią biofotolizę, fotofermentację oraz ciemną fermentację [58]. Obiecującym rozwiązaniem dla biologicznej produkcji wodoru jest fermentacja wodorowa. Przebiega ona zarówno w warunkach mezofilnych, termofilnych oraz ekremotermofilnych. Podczas przemian metabolicznych prowadzących do wytworzenia wodoru z glukozy, glukoza rozkładana jest w szlaku glikolizy do pirogronianu. Powstające elektrony przenoszone są na NAD. Pirogronian zostaje utleniony przez oksydoreduktazę pirogronian:ferredoksyna do acetyl-CoA i dwutlenku węgla. Elektrony przenoszone są na ferredoksynę. Wodór produkowany jest przez hydrogenazę, która katalizuje redukcję protonów wykorzystując elektrony z ferredoksyny. Wytwarzanie wodoru kontrolowane jest termodynamicznie przez stężenie wodoru cząsteczkowego [82, 86].

Spośród wielu mikroorganizmów zdolnych do wytwarzania wodoru, najbardziej powszechnie stosowane są beztlenowe kwasogenne bakterie (*Cl. acetobutylicum* oraz *Cl. butyricum*), względne beztlenowce (*Enterobacter aerogenes* i *Enterobacter cloacae*) oraz fotosyntetyczne bakterie (*Rhodobacter sphaeroides* i *R. capsulatus*) [16–17].



Rys. 2. Schemat wytwarzania wodoru przez klostridia

Ciekawą grupę mikroorganizmów zdolnych do biosyntezy wodoru stanowi *Clostridium* spp. Klostridia kwalifikuje się jako proteolityczne albo sacharolityczne w zależności od substratów, które fermentują. Typ proteolityczny zdolny jest do degradacji białek i aminokwasów. Bakterie sacharolityczne fermentują węglowodany i są zdolne do wytwarzania większych ilości wodoru. Przykładem tej grupy jest *Cl. butyricum*. Głównym produktem fermentacji u tych bakterii jest kwas masłowy, a jako produkty uboczne powstają  $\text{CO}_2$ , octan i wodór. Reakcja fermentacji wodorowej wygląda następująco:



Identyczny szlak występuje u ponad 50% poznanych bakterii z rodziny *Clostridium*. Istnieją jednak w tej grupie mikroorganizmów także szczepy zdolne do produkcji wodoru nie tylko z glicerolu, ale także z kszyzozy (*Cl. tyrobutyricum*), [61] oraz szczepy wytwarzające wodór z substratów celulozowych (*Cl. thermocellum*) [58].

Typowy schemat wytwarzania wodoru przez klostridia przedstawiony został na Rys. 2.

### 3.5. Inne metabolity

Bakterie z rodzaju *Clostridium* posiadają specyficzne uzdolnienia biochemiczne. Pełnią pozytywną rolę w przyrodzie biorąc udział w mineralizacji gleby i przetwarzaniu materii organicznej. Ponadto, produkty fermentacji stanowią źródło pokarmu i energii dla wielu mikroorganizmów bytujących w glebie. Bardzo ważną cechą tych bakterii jest zdolność asymilacji azotu atmosferycznego w warunkach beztlenowych. Gatunki proteolityczne tych bakterii poprzez fermentację pektyn rozluźniają strukturę tkankową roślin ułatwiając oddzie-

lenie włókien celulozowych, co czyni je przydatnymi we wstępnym oczyszczaniu lnu i konopi [69].

W literaturze pojawiły się doniesienia o wykorzystaniu bakterii należących do *Clostridium* spp. w celu produkcji bakteriocyn. Taką zdolność posiada *Cl. botulinum*. Mikroorganizm ten jest silnym patogenem, wytwarzającym niebezpieczne toksyny. Okazało się jednak że jest on także zdolny do wytwarzania bakteriocyn [26].

#### 4. Wykorzystanie bakterii z rodzaju *Clostridium* w medycynie i kosmetyce

Oczyszczona neurotoksyna typu A-G (NTX) produkowana przez *Cl. botulinum* stosowana jest w trudności leczenia trzymania moczu wynikających z przewlekłej nadmiernej aktywności mięśnia wypierającego pęcherz. Masa molekularna neurotoksyny A-G wynosi 150 kDa. W hodowlach płynnych oraz w żywności o kwasowym pH neurotoksyny te złączone są z czynnikiem nietoksycznym i tworzą duży kompleks zwany prekursorem toksyn (PTX). Typy A i B PTX są stosowane także w leczeniu zęza, kurczów powiek, oczopłasu, skurczu mięśni twarzy, bezgłosu skurczowego i wielu innych dystonii w tym także szyjnych. Taka terapia jest bardzo skuteczna, jednakże występuje poważny problem związany z wytwarzaniem przeciwciał anti-PTX zawierających anti-NTX przez niektórych pacjentów po przebytej chorobie [38, 55–56, 59]. Pojawiają się także doniesienia dotyczące zastosowania toksyn botulinowych w leczeniu syndromu suchego oka oraz tzw. syndromu krokodylich łez. W pierwszym przypadku toksyny te powodują porażenie mięśnia pierścieniowatego oka, co uniemożliwia wypływanie łez z oka na policzek (łzy pozostają w worku spojówkowym) [21, 33, 83]. Syndrom krokodylich łez powodowany jest przez nadmierną regenerację gruczołu nerwu łzowego. Terapia polega na wstrzykiwaniu w to wyznaczone miejsce preparatu toksyny botulinowej. W obu przypadkach terapia przynosi bardzo dobre rezultaty [83].

W celach terapeutycznych wykorzystywane są nie tylko metabolity bakterii należących do *Clostridium* spp., ale także całe komórki bakteryjne. W badaniach klinicznych wykazano, że mogą być one wykorzystywane jako czynniki probiotyczne przeciwko krwotokom wewnętrznym powodowanym przez enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli*. Ponadto, inhibują one wzrost *Cl. difficile*, *Salmonella typhimurium* i *Vibrio* spp. [71, 75].

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o wykorzystaniu rekombinowanych przetrwalników *Clostridium* spp. w terapii nowotworów. Niepatogenne klostridia takie, jak *Cl. acetobutylicum* stosowane są jako specyficzne wektory do wybiórczego wybarwienia terapeutycznych białek dla litych guzów [71, 78]. Ich specyficzność dla komórek litych guzów oparta jest na

martwiczej, pozbawionej tlenu naturze takich guzów. Rekombinowane przetrwalniki, niosące informację genetyczną dla rekombinowanych białek wstrzykiwane są do chorego organizmu. Zdrowe jego tkanki są dobrze natlenione i uniemożliwiają kiełkowanie i wzrost ściśle beztlenowych bakterii. Jednakże sąsiedztwo komórek nowotworowych, które pozbawione są tlenu, umożliwia kiełkowanie spor i proliferację przez komórki wegetatywne kosztem jedynie komórek martwiczych. W ten sposób dochodzi do ekspresji białek terapeutycznych, które niszczą komórki nowotworowe. Obecnie badane są dwie różne ścieżki: enzymy przekształcające nieszkodliwe proleki w leki wysoce toksyczne [28, 71, 73] oraz cytokiny takie jak czynniki martwicze guza [64, 71].

W medycynie stosowane są także liczne enzymy produkowane przez *Clostridium*, między innymi amylazy, celulazy, pektynazy, pullulanazy i proteinazy. Enzymem szczególnie ważnym dla celów medycznych jest produkowana przez *Cl. histolyticum* kolagenaza. Kolagen stanowi 75% suchej masy tkanki skórnej, dlatego też daje bardzo dobre efekty w leczeniu ubytków skórnych powstałych między innymi wskutek poparzeń [71].

Klostridia znajdują zastosowanie także w kosmetyce [50] oraz w medycynie estetycznej. Po raz pierwszy toksyny botulinowe do leczenia zmarszczek mimicznych zostały zastosowane w roku 1980. Terapia taka jest bardziej skuteczna od innych, a ponadto uniemożliwia powstawanie nowych zmarszczek. Wyraźną poprawę napięcia skóry twarzy obserwuje się u około 90% pacjentów. Pierwszy efekt przy takiej terapii obserwowany jest już po 1–4 dniach, a maksymalny po 2–3 tygodniach. Efekt ostateczny otrzymuje się natomiast po 3–6 miesiącach terapii. Zmarszczki mimiczne powstają przede wszystkim w wyniku intensywnej pracy mięśnia czołowego, mięśni marszczących brwi oraz mięśnia podłużnego. Terapia polega na wstrzykiwaniu do tych mięśni różnych dawek toksyny botulinowej. Preparaty toksyny botulinowej stosowane są także w innych celach w kosmetyce i medycynie estetycznej, między innymi wstrzykiwane są w miejsca ran w celu uniemożliwienia powstawania blizny oraz przyspieszenia regeneracji uszkodzonej skóry. Preparaty te stosowane są także do usuwania zbędnego owłosienia oraz do chemicznej liposukcji [1, 5–6, 20–21, 37, 45, 50, 60].

#### 5. Podsumowanie

Rodzaj *Clostridium* obejmuje wiele gatunków, które wykazują szeroki zakres cech biochemicznych i fizjologicznych, które z jednej strony odpowiadają za patogenność tej grupy, a z drugiej umożliwiają ich przemysłowe wykorzystanie. Klostridia mogą być one stosowane między innymi do produkcji kwasów i rozpuszczalników. Nawet szczepy patogenne (m.in. *Cl. botulinum*), są coraz



częściej wykorzystywane w medycynie, w terapiach nowotworów, a także w kosmetologii w celu usuwania zmarszczek. Te pozytywne aspekty bakterii z rodzaju *Clostridium* powodują, że nieustannie wzrasta zainteresowanie stosowaniem ich w różnych gałęziach przemysłu. Należy uzmysłowić społeczeństwu, że bakterie te nie są jedynie producentami toksyn ani wrogiem ludzkości, ale mają wiele pozytywnych cech, których umiejętność wykorzystania może w przyszłości przynieść wiele korzyści, a także ratować życie ludzkie.

## 6. Piśmiennictwo

- Adelson R.: Botulinum neurotoxins: Fundamentals for the facial plastic surgeon. *Am. J. Otolaryngol.* **28**, 260–266 (2007)
- Bahl H., Gottschalk G. (w) Biotechnology, red. H.J. Rehm i G. Reed, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 56–72 (1998)
- Barber J.M., Robb F.T., Webster J.R., Woods D.R.: Bacteriocin Production by *Clostridium acetobutylicum* in an industrial fermentation process. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 433–437 (1979)
- Barbirato F., Himmi E.H., Conte T., Bories A.: 1,3-Propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerol from the ester and ethanol industries. *Ind. Crops Products*, **7**, 281–289 (1998)
- Bassichis B.A.: Cosmetic use of botulinum toxin in the upper face. *Oper. Tech. Otolaryngol.* **18**, 248–253 (2007)
- Berny-Moreno J., Brancewicz-Łosek M.: Toksyna botulinowa – fenomen trucizny. *Pol. Merk Lek.* **20**, 482–485 (2006)
- Krieg N.R.: (Reds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer, USA, 102–132 (2011)
- Biebl H., Zeng A.P., Menzel K., Deckwer W.D.: Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 24–29 (1998)
- Biebl H., Menzel K., Zeng A.P., Deckwer W.D.: Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 289–297 (1999)
- Biebl H.: Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* batch and continuous culture studies. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 18–26 (2001)
- Bielec D., Modrzewska R.: Zatrucie jadem kiełbasianym dawniej i dziś – aspekty kliniczne. *Przegl. Epidemiol.* **61**, 505–512 (2007)
- Bigalke H., Shoer L.F. (w) Bacterial Protein Toxins. Handbook of Experimental Pharmacology, red. Aktories K., Just I., Springer-Verlag, Berlin, 407–443 (2000)
- Brin M.F.: Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity, and immunology. *Muscle & Nerve* **20**, 156–168 (1997)
- Buckel W. (w) Handbook on Clostridia, CRC Press LLC, Boca Raton, 81–85 (2005)
- Chen J.S., Hiu S.F.: Acetone-butanol-isopropanol production by *Clostridium beijerinckii* (synonym *Clostridium butylicum*). *Biotech. Lett.* **8**, 371–376 (1986)
- Chen W.M., Tseng Z.J., Lee K.S., Hang J.S.: Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *Int. J. Hydrogen Eng.* **30**, 1063–1070 (2005)
- Chin H.L., Chen Z.S., Chou C.P.: Fedbatch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production. *Biotechnol. Prog.* **19**, 383–388 (2003)
- Clarke D.J., Moyra R. R., Morris J.G.: Purification of two *Clostridium bacteriocins* by procedures appropriate to hydrophobic proteins. *AAC*, **3**, 256–264 (1975)
- Dabrock B., Bahl H., Gottschalk G.: Parameters Affecting Solvent Production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1233–1239 (1992)
- De Maio M.: Toksyna botulinowa w połączeniu z innymi metodami odmładzającymi. *J. Cosmet. Laser Ther.* **5**, 210–212 (2003)
- Domżał T.M.: Toksyna botulinowa w praktyce lekarskiej. Wyd. Czelej, Lublin, 114–118 (2002)
- Dressler D.: Botulinum toxin therapy, Theme-Verlag, Stuttgart, 64–67 (2000)
- Drożdżyńska A., Leja K., Czaczyk K.: Biotechnological Production of 1,3-propanediol from crude glycerol. *J. Biotechnol., Comput. Biol. Bionanotechnol.* **1**, 92–100 (2011)
- Dürre P.: New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 639–648 (1988)
- Dürre P. (w) Clostridia: biotechnology and medical applications, red. Bahl, H., Dürre, P., Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany, 1–6 (2001)
- Eklund F.T., Poysky L.M., Mseitif T., Strom M.T.: Evidence for plasmid-mediated toxin and bacteriocin production in *Clostridium botulinum* type G. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1405–1408 (1988)
- Fond O., Petitdemange, E., Petitdemange, H., Gay R.: Effect of glucose flow on the acetone butanol fermentation in fed batch culture. *Biotechnol. Lett.* **6**, 13–18 (1984)
- Fox J.L.: Harnessing *Salmonella's* positive powers against tumors. *ASM News*, **66**, 332–334 (2000)
- Frick C., Schugerl K.: Continuous acetone-butanol production with free and immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 186–193 (1986)
- George H.A., Johnson J.L., Moore W.E.C., Holdeman L.V., Chen J.S.: Acetone, isopropanol and butanol production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *C. butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1160–1163 (1983)
- González-Pajuelo M., Meynial-Salles I., Mendes F., Soucaille P., Vasconcelos I.: Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol: physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5). *Appl. Environ. Microbiol.* **4**, 96–101 (2006)
- Harris L.M., Desai R.P., Welker N.E., Papoutsakis E.T.: Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inactivation mutant: Need for new phenomenological models for solventogenesis and butanol inhibition? *Biotech. Bioeng.* **67**, 1–11 (1999)
- Hawrot-Kawecka A.: Postępowanie w przypadku ataku bioterorystycznego, *Świat Med. Farm.* **3**, 52–54 (2003)
- Heyndrickx M., De Vos P., Vancanneyt M., De Ley J.: The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212 t<sub>2</sub> and 1213 t<sub>2</sub>, and *C. pasteurianum* LMG 3285. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 637–642 (1991)
- Homann T., Tag C., Biebl H., Deckwer W.D., Schink B.: Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 121–126 (1990)
- Huang Y.L., Mann K., Novak J.M., Yu S.T.: Acetic Acid Production from fructose by *Clostridium formicoaceticum* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **14**, 800–806 (1998)
- Huang W., Foster J.A., Rogachevsky S.: Pharmacology of botulinum toxin. *J. Am. Acad. Dermatol.* **43**, 249–259 (2000)
- Jankovic J., Brin M.F.: Therapeutic uses of botulinum toxin. *N. Engl. J. Med.* **324**, 1186–1194 (1991)



39. Jankovic J., Hallet M.: Therapy with botulinum toxin, Marcel Dekker, Inc, New York, 43–45 (1994)
40. Johns A.T.: The Mechanism of propionic acid formation by *Clostridium propionicum*. *J. Gen. Microbiol.* **6**, 123–127 (1952)
41. Johnson J.L., Toth J., Santiwatanakul S., Chen J.S.: Cultures of *Clostridium acetobutylicum* from various collections comprise *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* and two other distinct types based on DNA-DNA reassociation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 420–424 (1997)
42. Johnson E.A., Bradshaw M.: *Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. *Toxicon*, **39**, 1703–1722 (2001)
43. Jones D.T., van der Westhuizen A., Long S., Allcock E.R., Reid S.J., Woods D.R.: Solvent production and morphological changes in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1434–1439 (1982)
44. Jones D.T., Woods D.R.: Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* **50**, 481–524 (1986)
45. Kampioni M.: Wykorzystanie toksyny botulinowej w leczeniu skurczu mięśni poprzecznie prążkowanego dna macicy. *Nowiny Lek.* **70**, 229–235 (2001)
46. Kasap M.: Nitrogen metabolism and solvent production in *Clostridium beijerinckii* NRRL B593. Ph.D. dissertation. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, USA (2002)
47. Katrlík J., Vostiar I., Sefcovicová J., Tkáč J., Mastihuba V., Valach M., Stefuca V., Gemeiner P.A.: A novel microbial biosensor based on cells of *Gluconobacter oxydans* for the selective determination of 1,3-propanediol in the presence of glycerol and its application to bioprocess monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 287–295 (2007)
48. Keis S., Shahneen R., Jones D.: Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 2095–2103 (2001)
49. Khanal S.M., Chen W.H., Sung S.: Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 1123–1131 (2004)
50. Kizerwetter-Świda M., Biniek M.: Zatrucie jadem kiełbasianym – problem wciąż aktualnych. *Post. Mikrobiol.* **40**, 75–85 (2010)
51. Kośmider A., Czaczyk K. Możliwości wykorzystania glicerolu w procesach biotechnologicznych. *Post. Mikrobiol.* **48**, 277–287 (2009)
52. Kośmider A., Drożdżyńska A., Blaszką K., Leja K., Czaczyk K.: Propionic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* using industrial wastes: crude glycerol and whey lactose. *Polish J. Environ. Stud.* **19**, 1249–1253 (2010)
53. Kreydon O.P., Geiges M.L., Boni R., Burg G.: Botulinum toxin: from poison to medicine. A historical review. *Hautarzt*, **51**, 733–737 (2000)
54. Largier S.T., Long S., Santangelo J.D., Jones D.T., Woods D.R.: Immobilized *Clostridium acetobutylicum* P262 mutants for solvent production. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 477–481 (1985)
55. Lee J.C., Yokota K., Arimitsu H., Hwang H.J., Sakaguchi Y., Cui J., Takeshi K., Watanabe T., Ohyama T., Oguma K.: Production of anti-neurotoxin antibody is enhanced by two sub-components, HA1 and HA3b, of *Clostridium botulinum* type B 16S toxin- hemagglutinin. *Microbiol.* **151**, 3739–3747 (2005)
56. Lee J.C., Yokoyama T., Hwang H.J., Arimitsu H., Yamamoto Y., Kawasaki M., Takigawa T., Takeshi K., Nishikawa A., Kumon H., Oguma K.: Clinical application of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin purified by a simple procedure for patients with urinary incontinence caused by refractory detrusor overactivity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **51**, 201–211 (2007)
57. Leja K., Czaczyk K., Myszką K.: 1,3-Propanediol synthesis by biotechnological way using *Clostridium* ssp. *African J. Biotech.* **10**, 11093–11101 (2011)
58. Levin B.D., Islam R., Cicek N., Sparling R.: Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**, 1496–1503 (2006)
59. Lew M.F., Brashear A., Factor S.: The safety and efficacy of botulinum toxin type B in the treatment of patients with cervical dystonia: summary of three controlled clinical trials. *Neurology*, **55**: 29–35 (2000)
60. Lim E., Sett R.: Botulinum toxin, Quo Vadis? *Med. Hypotheses*, **69**, 718–723 (2007)
61. Liu X., Zhu Y., Yang S.T.: Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants. *Enzyme Microb. Technol.* **38**, 521–528 (2006)
62. Long S., Jones D. T., Woods D.R.: Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262 (now known as *Clostridium* sp. P262). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 256–261 (1984)
63. Lonz, T.G., Moreira A.R.: Economic evaluation of the acetone-butanol fermentation. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **19**, 478–483 (1980)
64. Low K.B., Ittensohn M. i wsp.: Lipid: A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNF $\alpha$  induction retain tumor-targeting in vivo. *Nature Biotechnol.* **17**, 37–41 (1999)
65. Luers F., Seyfried M., Daniel R., Gottschalk G.: Glycerol conversion by glycerol fermentation by *Clostridium pasteurianum*: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**, 337–345 (1997)
66. Mayr E.: Principles of systematic zoology. McGraw-Hill, New York, 34–37(1969)
67. McDaniel L.E., Wooley D.W., Peterson W.H.: Growth factors for bacteria: Nutrient requirements of certain butyl-alcohol producing bacteria. *J. Bacteriol.* **37**, 259–268, 1993
68. Menzel K., Zeng A.P., Deckwer W.D.: High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 82–86 (1997)
69. Mitchell W.J. (w) Clostridia: biotechnology and medical applications, red. Bahl H., Dürre P., Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany, 60–65 (2001)
70. Moriishi K., Koura M., Fujii N., Fujinaga Y., Inoue K., Ogumad K.: Mosaic structures of neurotoxins produced from *Clostridium botulinum* strain NCTC 2916. *FEMS Microbiol. Lett.* **140**, 151–158 (1996)
71. Nigel P., Minton J., Brown M., Lambin P., Anne J. (w) Clostridia: biotechnology and medical applications, red. Bahl, H., Dürre, P. Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany, 251–265 (2001)
72. Papanikolaou S., Fick M., Aggelis G.: The effect of raw glycerol concentration on the production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79**, 1189–1196 (2004)
73. Pawelek J.M., Low K.B., Bermudes D.: Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. *Cancer Res.* **57**, 4537–4544 (1997)
74. Qureshi N., Schripsema J., Lienhardt J., Blaschek H.P.: Continuous solvent production by *Clostridium beijerinckii* BA101 immobilized by adsorption onto brick. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 377–382 (2000)
75. Ranade V.V.: Drug delivery systems 1. Site-specific drug delivery using liposomes as carriers. *J. Cancer Pharmacol.* **29**, 685–694 (1989)
76. Rehman A., Matsumur A M., Nomura N., Sato S.: Growth and 1,3-propanediol production on pre-treated sunflower oil bio-diesel raw glycerol using a strict anaerobe *Clostridium butyricum*. *Curr. Res. Bacteriol.* **1**, 7–16 (2008)

77. Rosetto O., Seveso M., Caccin P., Schiavo G., Montecucco C.: Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. *Toxicon*, **39**, 27–41 (2001)
78. Rutman R.J., Ritter C.A., Avadhani N.G., Hansel J.: Liposomal potentiation of the antitumor activity of alkylating drugs. *Cancer Ther. Rep.* **60**, 617–618 (1976)
79. Saint-Amans S., Perlot P., Goma G., Soucaille P.: High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. *Biotech. Lett.* **16**, 831–836 (1994)
80. Schiavo G., Matteoli M., Montecucco C.: Neurotoxins affecting neuroexcitotoxicity. *Physiol. Rev.* **80**, 717–766 (2000)
81. Schwartz R.D., Keller F.A.: Isolation of a strain of *Clostridium thermoaceticum* capable of growth and acetic acid production at pH 4,5. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 117–123 (1982)
82. Sikora A.: Produkcja wodoru w procesach prowadzonych przez drobnoustroje. *Post. Mikrobiol.* **47**, 465–467 (2008)
83. Śliwińska-Mossoń M., Milnerowicz H., Małolepsza K.: Botulinum toxin in conventional and aesthetic medicine. *Adv. Clin. Exp. Med.* **19**, 271–278 (2010)
84. Spivey M. J.: The acetone/butanol/ethanol fermentation. *Process Biochem.* **13**, 2–5 (1978)
85. Stackebrandt E., Hippe H., Dürre P. (w) Clostridia: biotechnology and medical applications, red. Bahl, H., Dürre, P. Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany, 20–22 (2001)
86. Szewczyk K.W.: Biologiczne wytwarzanie wodoru. *Post. Mikrobiol.* **47**, 243–245 (2008)
87. Willims, E.A., Coxhead, J.M., Mathers, J.C.: Anti-cancer effects of butyrate: use of microarray technology to investigate mechanisms. *Proc. Nutr. Soc.* **62**, 107–115 (2003)
88. Woskow S.A., Glatz B.: Propionic acid production acid-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and semi-continuous fermentation. *Appl. Environ. Microb.* **57**, 2821–2828 (1991)
89. Wu Z., Yang S.H.: Extractive fermentation for butyric acid production from glucose by *Clostridium tyrobutyricum*. *Biot. Bioengin.* **82**, 93–102 (2003)
90. Zhu Y., Wu Z., Yang S.T.: Butyric acid production from acid hydrolysate of corn fibre by *Clostridium tyrobutyricum* in a fibrous-bed bioreactor. *Proc. Biochem.* **38**, 657–666 (2002)
91. Zigova J., Sturdik E., Dusan V., Schlosser S.: Butyric acid production by *Clostridium butyricum* with integrated extraction and pertraction. *Process Biochem.* **34**, 835–843 (1999)
92. Zyska B. (w) Mikrobiologia Techniczna, red. Libudzisz Z., Kowal K., Wyd. Politechniki Łódzkiej, 155–175 (2001)

Praca została przygotowana w ramach projektu POIG 01.01.02-00-074/09 współfinansowanego przez Unię Europejską (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, 2007–2013).