

Kwartalnik  
**Tom 56**  
**Suplement 2**  
**2017**

CODEN:  
PMKMAV 56  
(Supl. 2)  
2017

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

# Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Ogólnopolska Konferencja Biotechnologów i Mikrobiologów  
BIOMILLENIUM 2017  
„Trendy i rozwiązania w biotechnologii i mikrobiologii”  
Gdańsk 6–8 września 2017

Index Copernicus ICV = 111,53 (2015)  
Impact Factor ISI = 0,311 (2016)  
Punktacja MNiSW = 15,00 (2015)

<http://www.pm.microbiology.pl>

#### RADA REDAKCYJNA

JACEK BARDOWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), DARIUSZ BARTOSIK (Uniwersytet Warszawski),  
JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski),  
JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), NADZIEJA DRELA (Uniwersytet Warszawski),  
EUGENIA GOSPODAREK-KOMKOWSKA (Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu),  
JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),  
MAREK JAKÓBISIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), JACEK MIĘDZOBRODZKI (Uniwersytet Jagielloński),  
ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski), ANTONI RÓŻALSKI (Uniwersytet Łódzki),  
ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski), RADOŚLAW STACHOWIAK (Uniwersytet Warszawski),  
BOHDAN STAROŚCIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański),  
ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowa Akademia Techniczna),  
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego), GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański),  
PIOTR ZALESKI (Instytut Biotechnologii i Antybiotyków), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

#### REDAKCJA

JACEK BIELECKI (redaktor naczelny), RADOŚLAW STACHOWIAK (zastępca), BOHDAN STAROŚCIAK (redaktor),  
PIOTR ZALESKI (sekretarz), MARTA BRZÓSTKOWSKA (korekta tekstów angielskich)

#### ADRES REDAKCJI

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: 22 3786229, 22 5541312; fax 22 5541404  
e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

#### Redaktorzy:

Redaktor naczelny: Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 5541304; fax 22 5541404  
e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl

Zastępca: Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 5541312; fax 22 5541404  
e-mail: radeks@biol.uw.edu.pl

Redaktor: Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
ul. Oczki 3 (parter), 02-007 Warszawa; tel.: 22 6280822, 22 6211351

Sekretarz: Instytut Biotechnologii i Antybiotyków  
ul. Starościńska 5, 02-516 Warszawa; tel. 22 3786229; e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

#### PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

Redaktor odpowiedzialny: STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA (Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie)

Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy  
ul. Malinowa 11, 72-003 Wołczkowo  
tel. 605031324; fax (91) 3113186; e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@pum.edu.pl

#### STALI RECENZENCI:

JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),  
EUGENIUSZ MAŁAFIEJ (Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki),  
ANNA PRZONDO-MORDARSKA (Akademia Medyczna we Wrocławiu)

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

#### **Informacja o zdjęciu na okładce:**

*Komórki Neisseria gonorrhoeae, mutant szczepu FA1090.*

*Preparatyka: dr Agnieszka Kwiatek, Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski.  
Zdjęcie: mgr Paweł Bącal, Pracownia Teorii i Zastosowań Elektrood, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej,  
Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski.*

*Obraz SEM uzyskano przy użyciu aparatury zakupionej w ramach projektu CePT POIG.02.02.00-14-024/08-00.*

---

P O L S K I E T O W A R Z Y S T W O M I K R O B I O L O G Ó W

Nakład 250 egz., Objętość 12,5 ark. wyd., Papier offset 90 g

---

Skład i druk: Zakład Wydawniczy Letter Quality, tel.: 22 115 38 10, 607 217 879  
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com; projekt okładki: Jerzy Grzegorkiewicz

# Ogólnopolska Konferencja Biotechnologów i Mikrobiologów

## BIOMILLENIUM 2017

### „Trendy i rozwiązania w biotechnologii i mikrobiologii”

GDAŃSK, 6–8 WRZEŚNIA 2017

Konferencja pod patronatem JM Rektora Politechniki Gdańskiej  
Prof. dr hab. Jacka Namieśnika

#### Patronat Honorowy:

Prezydent Miasta Gdańska Paweł Adamowicz  
Wojewoda Pomorski Dariusz Drelich  
Rektor Uniwersytetu Gdańskiego dr hab. Jerzy Gwizdała, prof. nadzw.  
Prorektor ds. Nauki Politechniki Gdańskiej prof. dr hab. Janusz Smulko  
Przewodniczący Komitetu Biotechnologii PAN prof. dr hab. Tomasz Twardowski  
Elamed Media Group/Laboratorium-Przegląd Ogólnopolski



Patronat Honorowy  
Prezydent  
Miasta Gdańska  
PAWEŁ ADAMOWICZ



WOJEWODA POMORSKI  
DARIUSZ DRELICH



#### Patronat Medialny:



**Organizator:**

Politechnika Gdańska  
Wydział Chemiczny  
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii



**Współorganizatorzy:**

Uniwersytet Szczeciński  
Wydział Biologii  
Katedra Immunologii i Mikrobiologii

Polskie Towarzystwo Epidemiologów  
i Lekarzy Chorób Zakaźnych



Polskie Towarzystwo Mikrobiologów



### **KOMITET HONOROWY KONFERENCJI:**

Rektor Politechniki Gdańskiej  
prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik, prof. zw. PG

Dziekan Wydziału Chemicznego PG  
prof. dr hab. inż. Sławomir Milewski, prof. zw. PG

### **KOMITET NAUKOWY KONFERENCJI:**

dr hab. inż. Agnieszka Bartoszek, prof. nadzw. PG  
prof. dr hab. Krzysztof Bielawski  
dr hab. inż. Anna Brillowska-Dąbrowska, prof. nadzw. PG  
dr hab. inż. Hubert Cieśliński  
prof. dr hab. Wiesław Deptuła  
prof. dr hab. Henryka Długońska  
prof. dr hab. Jarosław Dziadek  
dr inż. Bartłomiej Ferra  
prof. dr hab. Jan Fiedurek  
prof. dr hab. n. med. Eugenia Gospodarek  
dr hab. inż. Lucyna Holec-Gąsior  
dr hab. inż. Roman Kotłowski  
prof. dr hab. inż. Agata Kot Wasik  
dr hab. Beata Krawczyk, prof. nadzw. PG  
dr hab. n. med. Andrzej Marszałek  
prof. dr hab. inż. Zofia Mazerska  
dr n. med. Michał Michalik  
dr inż. Marcin Olszewski  
dr hab. inż. Rafał Piątek  
dr hab. inż. Paweł Sachadyn, prof. nadzw. PG  
dr n. med. Alfred Samet  
dr hab. n. med. Tomasz Smiatacz  
dr hab. inż. Hanna Staroszczyk  
dr hab. Paweł Stączek, prof. nadzw. UŁ  
prof. dr hab. inż. Joanna Surmacz-Górska  
prof. dr hab. Marianna Turkiewicz  
dr inż. Marta Wanarska  
prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn  
dr hab. Beata Zalewska-Piątek

**KOMITET ORGANIZACYJNY:**

Politechnika Gdańska  
Wydział Chemiczny  
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii

**Przewodnicząca:**

dr hab. Beata Krawczyk prof. nadzw. PG

**Członkowie:**

dr hab. inż. Anna Brillowska-Dąbrowska  
dr hab. inż. Hubert Cieśliński  
dr inż. Bartłomiej Ferra  
dr hab. inż. Lucyna Holec-Gąsior  
dr hab. Beata Zalewska-Piątek  
dr hab. inż. Rafał Piątek  
dr inż. Marcin Olszewski  
dr inż. Marta Wanarska  
dr hab. inż. Roman Kotłowski

Uniwersytet Szczeciński  
Wydział Biologii  
dr hab. n. biol. Beata Hukowska-Szematowicz prof. US  
Prof. dr hab. Wiesław Deptuła  
dr hab. n. biol. Beata Tokarz-Deptuła prof. US

Polskie Towarzystwo Epidemiologów  
i Lekarzy Chorób Zakaźnych  
dr Jolanta Komarnicka  
dr hab. med. Katarzyna Sikorska  
lek. med. Marcin Dręczewski

**SPONSOR GŁÓWNY:**



**SPONSORZY:**

A&A Biotechnology, ABE-IPS Sp. z o.o., ABL&E-JASCO Polska Sp. z o.o.,  
ABO Sp. z o.o., Biogenet, Biokom S.J.,  
Bio-Rad Polska Sp. z o.o., BioMaxima, BLIRT S.A., Centrum Medyczne MML,  
Enbio Technology Sp. z o.o., Eppendorf Poland Sp. z o.o.,  
Genomed S.A., Hydrolab, Instytut Mikrobiologii,  
Jagiellońskie Centrum Innowacji, Lab-JOT® Ltd. Sp. z o.o. Sp.k.



ABL&E JASCO Polska Sp. z o.o.



LGC Standards Sp. z o.o., LightBox, Linegal,  
LKB Biotech Violetta Kochmańska i Marek Wełnicki Sp. j., LPP Equipment,  
Merck Sp. z o.o., Olympus Polska,  
Polpharma S.A., PZ HTL S.A./EQUIMED,  
QiaLab Sp. z o.o., Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.,  
SANLAB J. Kaczorek, M. Bińczak Sp. j., SHIM-POL A.M. Borzymowski,  
Synevo Sp. z o.o., VWR International Sp. z o.o.



**LKB Biotech**



**MERCK**





## PLAN KONFERENCJI

---

### Dzień I (środa, 6 września)

---

#### INAUGURACJA (Aula Politechniki Gdańskiej, Gmach Główny)

16.00 **PROFESOR JÓZEF KUR – NAUKOWIEC I PRZYJACIEL**

Dr hab. Beata Krawczyk, prof. nadzw. PG – Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny  
Dr n. med. Alfred Samet – MML Centrum Medyczne Warszawa  
Prof. dr hab. Wiesław Deptuła – Uniwersytet Szczeciński, Wydział Biologii

17.00 **STRUKTURA I ROLA BIOLOGICZNA MIKROBIOTY PRZEWODU POKARMOWEGO CZŁOWIEKA W ZDROWIU I W CHOROBIĘ**

Prof. dr hab. Adam Jaworski  
Społeczna Akademia Nauk w Łodzi

17.30 **NAPRAW ALBO ZGIŃ. PROCESY NAPRAWY DNA A PATOGENNOŚĆ PRĄTKÓW GRUŻLICY**

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek  
Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi

18.15 **Koncert pt. „W pewien piękny wieczór”**

Anna Malus-Wróblewska – mezzosopran  
Leszek Holec – bas-baryton  
Magdalena-Holec – fortepian

19.30 **Poczęstunek**

---

### Dzień II (czwartek, 7 września)

---

#### BIOTECHNOLOGIA W PRZEMYSŁE, ROLNICTWIE I ŚRODOWISKU (Sala 300, Gmach Główny)

Prof. dr hab. inż. Paweł Kafarski  
Dr hab. inż. Agnieszka Bartoszek-Pączkowska, prof. nadzw. PG

9.00 **BIOTRANSFORMACJE JAKO NARZĘDZIE W PROCESACH BIORAFINACJI**

Prof. dr hab. inż. Paweł Kafarski  
Politechnika Wrocławska, Zakład Chemii Bioorganicznej

9.30 **KWASY NUKLEINOWE JAKO NIEOCENIONY SKŁADNIK ŻYWNOŚCI**

Dr hab. inż. Agnieszka Bartoszek-Pączkowska, prof. nadzw. PG  
Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny

10.00 **QIALAB: IZOLACJA KWASÓW NUKLEINOWYCH Z MATERIAŁÓW ZWYCZAJNYCH ORAZ NIETYPOWYCH – TECHNOLOGIE I ZASTOSOWANIA**

Filip Gołębiowski

10.20 **MIKROBIOLOGICZNA PRODUKCJA 2,3-BUTANODIOLU Z BIOMASY**

Aneta Białkowska

10.40 **MODYFIKACJA WŁAŚCIWOŚCI KATALITYCZNYCH WYBRANYCH OKSYDOREDUKTAZ Z WYKORZYSTANIEM WIRUJĄCEGO POŁA MAGNETYCZNEGO**

Agata Wasak

11.00 WYKORZYSTANIE GLICEROLU JAKO ŹRÓDŁA WĘGLA DO PRODUKCJI ADAPTOWANYCH DO ZIMNA  $\beta$ -GALAKTOZYDAZ PRZEZ REKOMBINANTOWE SZCZEPY DROŹDŹY *PICHTIA PASTORIS*

Marta Wanarska

11.20 **Przerwa kawowa**

11.40 CHARAKTERYSTYKA PAN-GENOMU NOWYCH GATUNKÓW BAKTERYJNYCH PATOGENÓW ROŚLIN

Prof. dr hab. Ewa Łojkowska  
Uniwersytet Gdański, Instytut Biotechnologii

12.10 BADANIA NAD KULTURAMI *IN VITRO* *GINKGO BILOBA*

Agnieszka Szewczyk

12.30 OZONOWANIE SUROWCA ROŚLINNEGO PRZED ETAPEM WYDZIELENIA ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH

Justyna A. Dąbrowska

12.50 ACYLOTRANSFERAZY ACYLO-COA: LIZOFOSFATYDYLOETANOLOAMINA – NOWE REGULATORY WZROSTU ROŚLIN

Katarzyna Jasieniecka-Gazarkiewicz

13.10 **Przerwa obiadowa – Dziedziniec Fahrenheita – Gmach Główny PG**

**BIOTECHNOLOGIA W PRZEMYSŁE, ROLNICTWIE I ŚRODOWISKU (Sala 300, Gmach Główny)**

Prof. dr hab. Joanna Surmacz-Górska  
Dr inż. Marta Wanarska

14.30 NOWE TECHNOLOGIE USUWANIA AZOTU W OCZYSZCZANIU ŚCIEKÓW

Prof. dr hab. Joanna Surmacz-Górska  
Politechnika Śląska, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki

15.00 BIONANOTECHNOLOGIA W ROLNICTWIE

Paweł Nawrotek

15.20 WPŁYW NAWOZÓW WAPNIOWYCH WZBOGACONYCH MIKROBIOLOGICZNIE NA WZROST I PŁONOWANIE ROŚLIN OGRODNICZYCH

Lidia Sas Paszt

15.40 WPŁYW SUBSTANCJI PROBIOTYCZNYCH NA STAN EKOLOGICZNY JEZIOR ZASIEDLONYCH PRZEZ MAŁŻE

Barbara Wojtasik

16.00 UDZIAŁ ŚWINI DOMOWEJ W PULI GENOWEJ NATURALNYCH POPULACJI DZIKA EUROPEJSKIEGO W POLSCE

Ewa Zastempowska

17.00 **Koncert w wykonaniu orkiestry VITA ACTIVIA – przez sztukę do samodzielności (ECEKON – Europejskie Centrum Edukacji Kulturalnej Osób Niepełnosprawnych) – Aula – Gmach Główny PG**

19.00 **Uroczysta kolacja**

**– Dziedziniec Fahrenheita – Gmach Główny PG przy muzyce zespołu „Wrack człowieka”**

**BIOTECHNOLOGIA W MEDYCYNIE I BIOLOGII MOLEKULARNEJ  
(Sala 211, Gmach Główny)**

Dr Agnieszka Bernat-Wójtowska  
Dr hab. Daniel Krowarsch

**9.00 ZROZUMIEĆ PLURIPOTENCJĘ: INŻYNIERIA GENETYCZNA I KOMÓRKOWA  
W BADANIACH MACIERZYSTYCH KOMÓREK ZARODKOWYCH**

Dr Agnieszka Bernat-Wójtowska  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMED

**9.30 ZASTOSOWANIE FGF1 W TERAPII CUKRZYCY**

Dr hab. Daniel Krowarsch  
Uniwersytet Wrocławski, Zakład Inżynierii Białka

**10.00 BIO-RAD: ZASTOSOWANIE TECHNIK PCR III GENERACJI W DIAGNOSTYCE  
I BIOTECHNOLOGII**

Agnieszka Ciesielska

**10.20 PROCES AUTOFAGII INDUKOWANY GENISTEINĄ JAKO NOWE PODEJŚCIE  
W LECZENIU CHOROÓB NEURODEGENERACYJNYCH**

Karolina Pierzynowska

**10.40 HAMOWANIE INWAZYJNOŚCI KOMÓREK CZERNIAKA POPRZEZ STOSOWANIE  
KOMBINACJI SIRNA DLA N-KADHEDRYNY I INHIBITORÓW KINAZ BIAŁKOWYCH**

Dorota Ciołczyk-Wierzbicka

**11.00 JEDNOSTKA KATALITYCZNA TELOMERAZY JAKO POTENCJALNY CEL MOLEKULARNY  
W CHEMIOTERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ**

Katarzyna Serbakowska

**11.20 *Przerwa kawowa*****11.40 TOKSOPLAZMA GONDII: MIĘDZY NATURĄ, MEDYCYNĄ I BIOTECHNOLOGIĄ**

Prof. dr hab. Henryka Długońska  
Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

**12.10 NOWY TEST Z DETEKcją CHEMILUMINESCENCYJNĄ JAKO ALTERNATYWA  
KLASYCZNEGO TESTU ELISA W DIAGNOSTYCE TOKSOPLAZMOZY**

Lucyna Holec-Gąsior

**12.30 UŻYTECZNOŚĆ DIAGNOSTYCZNA REKOMBINANTOWYCH TETRAWALENTNYCH  
ANTYGENÓW CHIMERYCZNYCH TOXOPLAZMA GONDII**

Bartłomiej Ferra

**12.50 POLPHARMA BIOLOGICS: ZASTOSOWANIE SPEKTROMETRII MAS W OPRACOWANIU  
TECHNOLOGII PROCESU LEKÓW W BIOPODOBNYCH**

Tomasz Welerowicz

**13.10 *Przerwa obiadowa (Dziedziniec Fahrenheita – Gmach Główny PG)***

**BIOTECHNOLOGIA W MEDYCYNIE I BIOLOGII MOLEKULARNEJ (Sala 211, Gmach Główny)**

Dr hab. Paweł Stączek, prof. nadzw. UŁ  
Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

**14.30 POCHODNE TIOSEMIKARBAZYDU – W POSZUKIWANIU NOWYCH ZWIĄZKÓW O DZIAŁANIU PRZECIWDROBNOUSTROJOWYM**

Dr hab. Paweł Stączek, Prof. nadzw. UŁ  
Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii

**15.00 AKTYWNOŚĆ PRZECIWBAKTERYJNA PROTEGRYNY-1 WOBEC GRONKOWCÓW WYIZOLOWANYCH OD ZWIERZĄT**

Małgorzata Jarosiewicz

**15.20 ZASTOSOWANIE BIOGENNYCH NANOCZĄSTEK ZŁOTA W FOTODYNAMICZNEJ INAKTYWACJI DROBNOUSTROJÓW**

Irena Maliszewska

**15.40 PORÓWNANIE DZIAŁANIA PRZECIWDROBNOUSTROJOWEGO OLEJKÓW ETERYCZNYCH Z PELARGONII (*PELARGONIUM L'HÉR*)**

Adriana Pacia

**16.00 WRAŻLIWOŚĆ BAKTERII NA DZIAŁANIE EKSTRAKTU POLIFENOLOWEGO Z LIŚCI PIGWOWCA**

Magdalena Efenberger-Szmechtyk

**17.00 *Koncert w wykonaniu orkiestry VITA ACTIVIA – przez sztukę do samodzielności (ECEKON – Europejskie Centrum Edukacji Kulturalnej Osób Niepełnosprawnych) – Aula – Gmach Główny PG*****19.00 *Uroczysta kolacja – Dziedziniec Fahrenheita – Gmach Główny PG przy muzyce zespołu „Wrack Człowieka”*****MIKROBIOLOGIA KLINICZNA I MOLEKULARNA AULA (Aula, Gmach Główny PG)**

Prof. Stella Nowicki  
Prof. Bogdan Nowicki

**9.00 PRZEWLEKŁE ZAPALENIA A WITAMINA D3: TO D OR NOT TO D**

Prof. Stella Nowicki  
Institute for Women's Health Research, USA

**9.30 ZAKAŻENIA UKŁADU MOCZOWEGO W CIĄŻY I RYZYKO DLA ROZWOJU PŁODU**

Prof. Bogdan Nowicki  
Institute for Women's Health Research, USA

**10.00 MECHANIZM PATOGENEZY DRÓG MOCZOWYCH SZCZEPAMI *E. COLI* POCHODZĄCYMI Z UKŁADU POKARMOWEGO**

Rafał Piątek

**10.20 POCHODNE KWASU AMINOMETYLOFOSFINOWEGO O AKTYWNOŚCI ANTYUREOLITYCZNEJ I ANTYBAKTERYJNEJ**

Ewa Grela

10.40 ANALIZA WYSTĘPOWANIA POLIMORFIZMÓW POJEDYNCZYCH NUKLEOTYDÓW (SNP) W WYBRANYCH GENACH KODUJĄCYCH CZYNNIKI WIRULENCJI  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA*  
Marcin Brzozowski

11.20 **Przerwa kawowa**

11.40 *ESCHERICHIA COLI* W ETIOPATOGENEZIE ZATOK PRZYNOSOWYCH  
Dr n. med. Michał Michalik  
MML Centrum Medyczne Warszawa

12.10 NOWO POJAWIAJĄCE SIĘ GATUNKI W ZAKAŻENIACH U CZŁOWIEKA  
Alicja Sękowska

12.30 CHLAMYDIE ŚRODOWISKOWE – REALNE ZAGROŻENIE?  
Małgorzata Pawlikowska-Warych

12.50 STREPTOCOCCUS GRUPA VIRIDANS – UDZIAŁ W ZAKAŻENIACH I METODY IDENTYFIKACJI  
Agnieszka Mikucka

13.10 **Przerwa obiadowa – Dziedziniec Fahrenheita – Gmach Główny PG**

#### **MIKROBIOLOGIA KLINICZNA I MOLEKULARNA (Gmach Główny PG)**

Dr hab. n. med. Tomasz Smiatacz  
Dr hab. n. med. Katarzyna Sikorska

14.30 BORELIOZA – AKTUALNE PROBLEMY DIAGNOSTYKI I LECZENIA  
Dr hab. n. med. Tomasz Smiatacz  
Szpital Chorób Zakaźnych Gumed Gdańsk

15.00 ZNACZENIE DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ W OCENIE SKUTECZNOŚCI LECZENIA WIRUSOWEGO ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C  
Katarzyna Sikorska

15.20 WPŁYW POLIMORFIZMU GENU *NTCP* NA PRZEBIEG PRZEWLEKŁEGO ZAPALENIA WĄTROBY TYPU B  
Anna Woziwodzka

15.40 ZDOLNOŚĆ NOWO WYZOŁOWANYCH BAKTERIOFAGÓW DO ERADYKACJI BIOFILMU WYTWORZONEGO PRZEZ METYCYLINOOPORNE SZCZEPY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*  
Natalia Łubowska

16.00 ROLA BIAŁKA MSMEG0432 *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS* W METABOLIZMIE AZOTANÓW I AZOTYNÓW  
Magdalena Antczak

17.00 **Koncert w wykonaniu orkiestry VITA ACTIVIA – przez sztukę do samodzielności (ECEKON – Europejskie Centrum Edukacji Kulturalnej Osób Niepełnosprawnych) – Aula – Gmach Główny PG**

19.00 **Uroczysta Kolacja – Dziedziniec Fahrenheita – Gmach Główny PG – przy muzyce zespołu „Wrack Człowieka”**

---

**Dzień III (Piątek, 8 Września)**

---

**BIOTECHNOLOGIA W PRZEMYSŁE, ROLNICTWIE I ŚRODOWISKU  
(Sala 300, Gmach Główny PG)**

Prof. dr hab. Katarzyna Turnau  
Dr hab. inż. Hubert Cieśliński

**9.00 INTYMNE ZWIĄZKI GRZYBÓW I ROŚLIN W WARUNKACH EKSTREMALNYCH,  
NOWE MOŻLIWOŚCI W FITOREMEDIACJI I ROLNICTWIE**

Prof. dr hab. Katarzyna Turnau  
Uniwersytet Jagielloński, Instytut Nauk o Środowisku

**9.30 WYKORZYSTANIE METAGENOMIKI DO POSZUKIWANIA NOWYCH  
BIOKATALIZATORÓW I BIOPRODUKTÓW**

Dr hab. inż. Hubert Cieśliński  
Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny

**10.00 NOWATORSKIE UKŁADY IMMOBILIZOWANEJ LAKAZY JAKO EFEKTYWNE SYSTEMY  
DO BIODEGRADACJI BISFENOLI**

Katarzyna Antecka

**10.20 ROZWÓJ GRZYBÓW PLEŚNIOWYCH NA PIANCE POLIURETANOWEJ**

Aleksandra Kemon

**10.40 BIODEGRADACJA ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH PRZEZ WYBRANE  
SZCZEPY DROŻDŻY**

Natalia Filipowicz

**11.00 BIOSYNTETA ESTERAZY Z PSEUDOMONAS SP. S9 W KOMÓRKACH *PICHTIA PASTORIS*,  
OCZYSZCZANIE I CHARAKTERYSTYKA**

Monika Wicka-Grochocka

**11.20 *Przerwa kawowa*****BIOTECHNOLOGIA W PRZEMYSŁE, ROLNICTWIE I ŚRODOWISKU  
(Sala 300, Gmach Główny PG)**

Dr hab. inż. Hanna Staroszczyk, Prof. nadzw. PG  
Prof. dr hab. Piotr Stępień

**11.40 TREHALOZA – ZASTOSOWANIE I SPOSOBY OTRZYMYWANIA ZE SZCZEGÓLNYM  
UWZGLĘDNIENIEM ENZYMU SYNTAZY TREHALOZY**

Dr inż. Paweł Filipkowski  
Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny

**12.10 DLACZEGO LUBIMY KSIĄŻKI DANA BROWNA – MECHANIZMY PROPAGANDY  
ANTY-GMO**

Prof. dr hab. Piotr Stępień  
IBB Warszawa

- 12.40 **GENETYCZNA I BIOCHEMICZNA CHARAKTERYSTYKA DROŹDŹY WYIZOLOWANYCH Z GLEBY ANTARKTYCZNEJ**  
Tomasz Florczak
- 13.00 **PROTEAZA ASPARTYLOWA PSYCHROTROFOWYCH DROŹDŹY SPOROBOLOMYCES ROSEUS I JEJ WYKORZYSTANIE W PRODUKCJI PEPTYDÓW O WŁAŚCIWOŚCIACH PRZECIWUTLENIAJĄCYCH**  
Joanna Krysiak
- 13.20 **IZOLACJA DROŹDŹY PSYCHROTOLERANCYJNYCH ORAZ OCENA ICH ZDOLNOŚCI DO WYKORZYSTANIA N-FOSFONOMETYLOGLICYNY JAKO ŹRÓDŁA PIERWIASTKÓW BIOGENNYCH**  
Agata Terebieniec
- 13.40 **Przerwa obiadowa (Dziedziniec Fahrenheita – Gmach Główny PG)**

**BIOTECHNOLOGIA W MEDYCYNIE I BIOLOGII MOLEKULARNEJ  
(Sala 211, Gmach Główny PG)**

Dr inż. Iwona Gabriel  
Dr hab. inż. Anna Brillowska-Dąbrowska, prof. nadzw. PG

- 9.00 **ENZYMY SZLAKÓW BIOSYNTETY AMINOKWASÓW JAKO CELE MOLEKULARNE W CHEMOTERAPII PRZECIWGRZYBOWEJ**  
Dr inż. Iwona Gabriel  
Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny
- 9.30 **LEKOWRAŻLIWOŚĆ GRZYBÓW**  
Dr hab. inż. Anna Brillowska-Dąbrowska, prof. nadzw. PG  
Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny
- 10.00 **A-1,3-GLUKAN, SKŁADNIK ŚCIANY KOMÓRKOWEJ GRZYBÓW – NOWY WZORZEC MOLEKULARNY PATOGENÓW?**  
Sylwia Stączek
- 10.20 **MECHANIZM PRZECIWGRZYBOWEGO DZIAŁANIA DEFENSYNY *GALLERIA MELLONELLA***  
Katarzyna Grygorczuk
- 10.40 **BLIRT S.A./DNA – GDAŃSK „BIOLAB INNOVATIVE RESEARCH TECHNOLOGIES”**  
Katarzyna Anczykowska
- 11.00 **OPORNOŚĆ IZOLATÓW *CANDIDA KRUSEI* NA KASPOFUNGINĘ**  
Martyna Mroczyńska
- 11.10 **OPORNOŚĆ IZOLATÓW *ASPERGILLUS FUMIGATUS* NA IZOWUKONAZOL**  
Ewelina Kurzyk
- 11.20 **Przerwa kawowa**



**BIOTECHNOLOGIA W MEDYCYNIE I BIOLOGII MOLEKULARNEJ (Sala 211, Gmach Główny PG)**

Prof. dr hab. Ewa Bartnik  
Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn

- 11.40 **OD ENZYMÓW RESTRYKCYJNYCH DO CRISPR – OSIĄGNIĘCIA I PROBLEMY**  
Prof. dr hab. Ewa Bartnik  
Uniwersytet Warszawski, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie
- 12.10 **DZIEDZICZENIE KOMPLEKSU REPLIKACYJNEGO PRZEZ JEDNĄ Z DWÓCH POTOMNYCH CZĄSTECZEK DNA**  
Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn  
Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii
- 12.40 **DETEKCJA KOMÓREK UŚPIONYCH, TOLERUJĄCYCH OBECNOŚĆ CZYNNIKÓW STRESOWYCH**  
Karolina Stojowska-Swedrzyńska
- 13.00 **ROLA „TAJEMNICZEJ” OTWARTEJ RAMKI ODCZYTU 63 (ORF63) W ROZWOJU FAGA  $\lambda$  ORAZ FAGA  $\Phi 24_b$ , PRZEDSTAWICIELA FAGÓW PRZENOSZĄCYCH GENY TOKSYN SHIGA**  
Aleksandra Dydecka
- 13.20 **FUZYJNE POLIMERAZY DNA JAKO UŻYTECZNE NARZĘDZIA W AMPLIFIKACJI TRUDNYCH MATRYC**  
Marta Śpibida
- 13.40 **Przerwa obiadowa – Dziedziniec Fahrenheita – Gmach Główny PG**

**MIKROBIOLOGIA KLINICZNA I MOLEKULARNA (Alua, Gmach Główny PG)**

Prof. dr hab. Eugenia Gospodarek-Komkowska  
Dr n. med. Mirosława Gałęcka

- 9.00 **MIKROBIOM CZŁOWIEKA – ZNACZENIE W FIZJOLOGII I PATOLOGII**  
Prof. dr hab. Eugenia Gospodarek-Komkowska  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Farmaceutyczny
- 9.30 **WPŁYW MIKROBIOMU JELITOWEGO NA UKŁAD IMMUNOLOGICZNY**  
Dr n. med. Mirosława Gałęcka  
Instytut Mikrobiologii Poznań
- 10.00 **DEMODEKOZA JAKO KLINICZNY EFEKT INTERAKCJI: MIKROBIOM – ROZTOCZ – CZŁOWIEK**  
Piotr Kleina-Schmidt
- 10.20 **IDENTYFIKACJA PEPTYDÓW ODPORNOŚCIOWYCH BARCIAKA WIĘKSZEGO PO ZAKAŻENIU BAKTERIĄ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***  
Anna Siemińska-Kuczer
- 10.40 **ZASTOSOWANIE METOD MOLEKULARNYCH W CHARAKTERYSTYCE SZCZEPÓW ENTEROCOCCUS FAECIUM OPORNYCH NA GLIKOPEPTYDY I LINEZOLID**  
Tomasz Bogiel
- 11.00 **INAKTYWACJA PDTAS ZMIENIA WRAŻLIWOŚĆ *M. SMEGMATIS* NA AMINOGLIKOZYDY**  
Karolina Dadura
- 11.20 **Przerwa kawowa**



**MIKROBIOLOGIA KLINICZNA I MOLEKULARNA**

Dr hab. Izabela Sitkiewicz, prof. nadzw. NIL

Dr hab. Beata Krawczyk, prof. nadzw. PG

11.40 **JAK SEKWENCJONOWANIE NOWEJ GENERACJI MOŻE UŁATWIĆ ŻYCIE  
MIKROBIOLOGOWI**

Dr hab. Izabela Sitkiewicz, prof. nadzw.

NIL Narodowy Instytut Leków, Warszawa

12.10 **GENOMED SEKWENCJONOWANIA NGS W BADANIACH METAGENOMICZNYCH**

Anna Wąsowska

12.40 **AKTYWNOŚĆ POCHODNYCH SEMIKARBAZYDU I TIOSEMIKARBAZYDU WOBEC  
BAKTERII TWORZĄCYCH BIOFILM W WARUNKACH STACJONARNYCH**

Urszula Kosikowska

13.00 **WYSTĘPOWANIE I ZNACZENIE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* O GRANICZNEJ  
OPORNOŚCI NA OKSACYLINĘ (BORSA)**

Maria Hryniewicz

13.20 **WPŁYW INAKTYWACJI FOTODYNAMICZNEJ NA PRZEŻYWALNOŚĆ  
I LEKOWRAŻLIWOŚĆ WIELOLEKOOPORNYCH IZOLATÓW *S. AUREUS***

Agata Woźniak

13.40 ***Przerwa obiadowa – Dziedziniec Fahrenheita – Gmach Główny PG***

14.40 ***Zakończenie Konferencji***

***Rozstrzygnięcie Konkursów – Aula – Gmach Główny PG***



## ABSTRAKTY PREZENTOWANYCH PRAC

### SESJA I

## BIOTECHNOLOGIA W PRZEMYŚLE, ROLNICTWIE I ŚRODOWISKU

### WYKŁADY PLENARNE

#### I-WPL 1

### BIOTRANSFORMACJE JAKO NARZĘDZIE W PROCESACH BIORAFINACJI

Paweł Kafarski

Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej

*e-mail: pawel.kafarski@pwr.edu.pl*

Termin – rafinacja, był najczęściej stosowany dla określania procesów przeróbki ropy naftowej lub rud metali. Konsekwentnie, słowo biorafinacja jest używane dla procesów oczyszczanie i uszlachetniania surowców pochodzenia biologicznego, głównie roślinnego i zwierzęcego.

Termin biorafinacja pojawił się w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia, jako opis jednej z gałęzi gospodarki opartej na substratach odnawialnych i w pierwszym znaczeniu dotyczyło to biopaliw. Dzisiaj biorafinacja nie ogranicza się do produkcji paliw, ale jest postrzegana, jako racjonalnie zaprojektowany ciąg technologii, który pozwoli wykorzystać do maksimum możliwości przetwórstwa surowców odnawialnych. Filozofia postępowania jest taka sama jak postępowanie w przemyśle rafineryjnym – jeden surowiec należy wykorzystać tak, aby uzyskać z niego jak najwięcej użytecznych substancji.

W przypadku biorafinacji surowcem może być dowolny rodzaj biomasy: pochodzącej z upraw czy hodowli (na przykład mikroalg) dedykowanych do zastosowania w biorafineriach; drewno i pochodne; odpady, które są najbardziej zróżnicowaną formą biomasy (z przemysłu spożywczego, z gospodarstw domo-

wych i restauracji, rolnictwa, leśnictwa jak np. przemysłu papierniczego, czy ścieki).

Wykorzystanie odpadów rolnictwa, leśnictwa i wielu gałęzi przemysłu można oprzeć na procesach biotransformacji wybranych składników w nowe użyteczne produkty. Takie może przyczynić się do wytworzenia dóbr trudnych do otrzymania innymi drogami i o rzadkich cechach użytkowych. Biotransformacjami nazywamy przekształcenia, zachodzące z udziałem biokatalizatorów, którymi mogą być enzymy, komórki (mikroorganizmów, roślin czy zwierząt), rzadziej organy roślin i całe rośliny wyższe, oraz incydentalnie zwierzęta. Produkty biotransformacji bardzo często nie mają żadnego znaczenia dla komórki, a niekiedy wręcz mogą okazać się dla niej toksyczne. Procesy te pozwalają otrzymać całą gamę, strukturalnie różnorodnych substancji chemicznych, niekiedy niemożliwych do otrzymania za pomocą obecnie istniejących technologii. Tak otrzymuje się substraty do produkcji leków, dodatków do żywności i pasz. Procesy te służą też do modyfikowania struktur leków i kosmetyków tak, aby jak najmniej ingerować w ich budowę chemiczną, a jednocześnie otrzymywać substancje o ulepszonej jakości.

#### I-WPL 2

### KWASY NUKLEINOWE – ZANIEDBANY SKŁADNIK ŻYWNOCI

Joanna Głazowska, Agnieszka Bartoszek

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

*agnieszka.bartoszek@pg.gda.pl*

Większość konsumentów, także tych zawodowo zajmujących się naukami przyrodniczymi, nie kojarzy DNA czy RNA z wyrobami spożywczymi. Wyjątek stanowią uprawy GMO i ewentualne oceny fałszowania żywności na podstawie badań DNA. Jednak kwasy nukleinowe i ich składniki są stałym elementem żywności. Mimo to ich rola żywieniowa nie jest w zasadzie poznana. Świeża żywność może zawierać nie tylko DNA, ale także różnego rodzaju RNA, w tym także szereg niekodujących RNA (ncRNA) zamkniętych w egzozomach czyniących je odpornymi na trawienie. Ilość spożywanych kwasów nukleinowych szacuje się na ok. 1 g dzien-

nie, choć te szacunki są dalekie od wiarygodności ze względu na brak dedykowanych badań.

Oczywista rola żywieniowa kwasów nukleinowych to wykorzystanie ich składników budulcowych do ponownej syntezy tych cząsteczek w organizmie konsumenta. Szacuje się, że około 5% spożywanych kwasów nukleinowych stanowi źródło składników budulcowych w trakcie syntezy DNA i RNA. Pozostała część podlega katabolizmowi, a powstałe metabolity uczestniczą w wielu kluczowych procesach zachodzących w organizmie człowieka, np. w metabolizmie glukozy na drodze do kwasu moczowego.

Poznana jest też rola pochodnych guaniny jako wzmacniaczy smaku umami, co sugeruje ważną rolę ewolucyjną żywieniowych kwasów nukleinowych. Co więcej, metabolizm komórkowy składników kwasów nukleinowych, zapewne także egzogennych, jest procesem wysokoenergetycznym i powiązany z powstawaniem reaktywnych form tlenu, co wydaje się być potencjalnie istotne w regulacji wielu szlaków sygnalizacyjnych wrażliwych na homeostazę redoks. Najnowsze badania wskazują, że nie tylko nukleotydy czy egzosomy zawierające krótkołańcuchowe kwasy nukleinowe mogą być przyswajane, ale nawet bardzo długie fragmenty

DNA mogą przenikać z układu pokarmowego do krwiobiegu. Znaczenie tego procesu jest jednak nieznane.

Jeszcze bardziej intrygująca jest sugerowana ostatnio rola informacyjna i regulatorowa pokarmowych kwasów nukleinowych. Najlepiej poznana obecnie, choć wciąż daleko tu do pełnej wiedzy, jest rola mikroRNA obecnych w mleku kobiecym na rozwój układu immunologicznego dziecka. Doniesienia literaturowe sugerują, że rośnie zainteresowanie naukowców tym zaniedbanym polem badawczym. Wiele wskazuje, że te makrocząsteczki staną się wkrótce obiektem intensywnych badań w obszarze nauk o żywności.

### I-WPL 3

## CHARAKTERYSTYKA PANGENOMU DWÓW NOWYCH GATUNKÓW BAKTERYJNYCH PATOGENÓW ROŚLIN

Ewa Łojkowska, Agata Motyka, Sabina Żołędowska, Wojciech Ślędź, Małgorzata Golanowska, Marta Potrykus, Alessio Mengoni

Katedra Biotechnologii Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

[ewa.lojkowska@biotech.ug.edu.pl](mailto:ewa.lojkowska@biotech.ug.edu.pl)

Bakterie z niedawno wyróżnionych gatunków *Dickeya solani* i *Pectobacterium parmentieri* należą do rodziny *Pectobacteriaceae*, rzędu *Eubacteriales* i są ważnymi gospodarczo patogenami roślin ozdobnych i użytkowych, przede wszystkim ziemniaka. Badania pangenomu wymienionych gatunków bakterii przeprowadzono na podstawie analizy sekwencji 10 szczepów *D. solani* i 8 szczepów *P. parmentieri* wyizolowanych w Polsce, Belgii i Finlandii. Sekwencje genomowe wymienionych szczepów uzyskano za pomocą technologii NGS: Illumina i PacBio (6 szczepów z każdego gatunku) oraz danych dla szczepów referencyjnych dostępnych w GenBank (4 sekwencje *D. solani* i 2 sekwencje *Pectobacterium parmentieri*). Genomy szczepów sekwencjonowanych w naszym laboratorium złożono za pomocą programów Illumina reads i SPAdes a następnie optymalizowano za pomocą PacBio reads i Quiver software.

Szczepy badanych gatunków bakterii różnią się istotnie bioróżnorodnością; szczepy *D. solani* charakteryzują się homogennością genomu, jednocześnie wykazując zróżnicowaną wirulencję, natomiast szczepy *P. parmentieri* wykazują większą zmienność

w obrębie genomu oraz zróżnicowaną wirulencję. Przeprowadzone badania wykazały, iż genom podstawowy (ang. core genome) obu gatunków jest podobnej wielkości i obejmuje odpowiednio 3756 i 3788 genów w przypadku *D. solani* i *P. parmentieri*. Genom dodatkowy (ang. accessory genome) i unikatowy (ang. unique genome) *P. parmentieri* jest większy i obejmuje odpowiednio 1201 i 1625 genów podczas gdy w przypadku *D. solani* odpowiednie genomy obejmują 430 i 130 genów.

Wirulencja bakterii gatunków *D. solani* i *P. parmentieri* związana jest przede wszystkim z wytwarzaniem szerokiej gamy enzymów degradujących składniki roślinnych ścian komórkowych: pektynaz, celulaz i proteaz ale także wytwarzaniem biofilmu i sideroforów oraz zdolnością do ruchu. Obecnie prowadzone badania zmierzają do identyfikacji ważnych w procesie patogenyzy genów strukturalnych i mających wpływ na ich ekspresję genów regulatorowych. Prowadzone badania pozwolą na opisanie bioróżnorodności tych dwóch gatunków patogenów oraz na opracowanie metod ochrony roślin uprawnych przed tymi patogenami.

### I-WPL 4

## NOWE TECHNOLOGIE USUWANIA AZOTU W OCZYSZCZANIU ŚCIEKÓW

Joanna Surmacz-Górska, Grzegorz Cema, Sebastian Żabczyński, Anna Gnida, Jarosław Wiszniowski

Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Politechnika Śląska

[Joanna.s.gorska@polsl.pl](mailto:Joanna.s.gorska@polsl.pl)

Poszukiwanie nowych, odnawialnych źródeł energii oraz wprowadzanie w życie zasad gospodarki o obiegu zamkniętym spowodowało w ostatnich latach wzrost zainteresowania produkcją biometanu oraz różnych wartościowych produktów chemicznych ze związków organicznych zawartych w ściekach przemysłowych, miejskich oraz osadach ściekowych. Skutkuje to rozwojem nowych technologii wykorzystujących związki organiczne trafiające do oczyszczalni wraz ze ściekami i koniecznością modyfikacji technologii aktualnie stosowanych do oczyszczania ścieków. Pobranie związków organicznych ze ścieków w celu produkcji z nich energii

i wartościowych produktów powoduje, że w ściekach pozostaje sporo mineralnych związków azotu i fosforu bez potrzebnych i wykorzystywanych dotąd do ich usunięcia biodegradowalnych substancji organicznych. Dodatkowo kofermentacja osadów ściekowych z odpadami organicznymi w celu intensyfikacji produkcji energii prowadzi często do wzrostu stężenia azotu w wodach z odwadniania przefermentowanych osadów. Te nowe tendencje w wykorzystaniu związków organicznych ze ścieków powodują, że aby spełniać normy dotyczące jakości oczyszczonych ścieków, należy rozwijać i wprowadzać do oczyszczania ścieków nowe tech-

nologii usuwania azotu. Aktualnie w miejskich oczyszczalniach ścieków azot usuwa się wykorzystując dwa tradycyjne procesy – nityfikację i denityfikację. Pierwszy proces służy utlenieniu azotu amonowego do azotanów przez bakterie autotroficzne w obecności tlenu, a drugi umożliwia usunięcie azotu gazowego ze ścieków dzięki oddychaniu azotanowemu bakterii denityfikacyjnych utleniających związki organiczne i wykorzystujących do tego celu azotany zamiast tlenu. W ostatnich latach usuwanie azotu wspomaga się dodatkowo wprowadzając do bocznego ciągu, prowadzącego wody z odwadniania osadów przefermentowanych,

proces skróconej nityfikacji i anammox, aby znaczną część azotu usunąć bez wykorzystywania do tego celu węgla organicznego oraz w celu ograniczenia zużycia energii i emisji dwutlenku węgla. Natomiast w dalszej perspektywie, na skutek pogłębionego wykorzystania węgla organicznego ze ścieków na cele energetyczne i wytworzenia wartościowych produktów chemicznych będzie konieczne wprowadzenie procesów skróconej nityfikacji i anammox również do ciągu głównego oczyszczalni i zupełne wyeliminowanie heterotroficznej denityfikacji. Nad takim rozwiązaniem prowadzonych jest wiele prac w licznych laboratoriach na całym świecie.

## I-WPL 5

### INTYMNE ZWIĄZKI GRZYBÓW I ROŚLIN W WARUNKACH EKSTREMALNYCH, NOWE MOŻLIWOŚCI W FITOREMEDIACJI I ROLNICTWIE

Katarzyna Turnau

Instytut Nauk o Środowisku, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

*katarzyna.turnau@uj.edu.pl*

Ostatnie kilkanaście lat przyniosło przełom w badaniach symbiontów roślinnych. Każda część rośliny skolonizowana jest przez endofityczne bakterie, archeony i grzyby, zbiorczo określone mikrobiomem roślinnym. Szeroka gama tych organizmów może być stosowana w uprawie roślin jako substytut nawozów, środków ochrony roślin, w ochronie roślin przed patogenami i bioremediacji. Przeprowadzone badania koncentrowały się na identyfikacji i selekcji najbardziej efektywnych grzybów endofitycznych i mykoryzowych. Stwierdzono, że zwierzęta są ważnym czynnikiem służącym jako wektory mikroorganizmów oraz jako źródło kluczowych składników odżywczych. Szczepy grzybów wyizolowano z roślin zasiedlających tereny o wysokim stężeniu metali toksycznych w glebie. Zarówno grzyby mykoryzowe jak i endofityczne stanowią równie ważne narzędzie w rolnictwie i bioremediacji. Grzyby endofityczne izolowane z pędów i korzeni są bardziej powszechne niż grzyby mykoryzowe. Grzyby endofityczne wydają się być istotne także w obecności grzybów arbuskularnych

(AMF), ale nie mogą ich zastąpić, przynajmniej w przypadku badanych roślin. Przygotowanie szczepionki AMF powinno być zawsze pierwszym krokiem w przypadku użycia roślin mykoryzowych. Endofity grzybowe i bakteryjne przejmują dominującą rolę w przypadku roślin niemykoryzowych. Ważnym krokiem przy opracowywaniu nowych technologii powinna być ściślejsza współpraca pomiędzy bakteriologami i mykologami. Tradycyjnie te dwie grupy badaczy pracują oddzielnie, podczas gdy w warunkach naturalnych interakcje bakterii i grzybów prowadzą do istotnej zmiany zdolności roślin do wzrostu w warunkach ekstremalnych. Przeprowadzono testy w celu wykazania skuteczności interakcji mikroorganizmów zasiedlających rośliny w obecności metali ciężkich. Ilościowe i jakościowe analizy wtórnych metabolitów i aktywności enzymów antyoksydacyjnych w roślinach są najskuteczniejszym sposobem oceny wpływu drobnoustrojów na rośliny.

*Badania przeprowadzono w ramach projektu MAESTRO (NCN, 2011/02/A/NZ9/00137).*

## I-WPL 6

### WYKORZYSTANIE METAGENOMIKI DO POSZUKIWANIA NOWYCH BIODOKATALIZATORÓW I BIOPRODUKTÓW

Hubert Cieśliński, Marta Wanarska, Natalia Filipowicz, Agata Terebieniec, Monika Wicka-Grochocka, Ewelina Krajewska

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

*hcieslin@pg.edu.pl*

W roku 1998 w publikacji Handelsmana i wsp. pojawia się po raz pierwszy termin metagenom na określenie procesu racjonalnej analizy kolektywnego genomu wszystkich mikroorganizmów bytujących w badanej przez nich próbce gleby. To nowatorskie podejście było pokłosiem rozwoju inżynierii genetycznej, który dostarczył nowych narzędzi w ręce badaczy umożliwiających izolację totalnego DNA z próbek środowiskowych, konstrukcję w oparciu o ten materiał bibliotek metagenomowych oraz ich analizę funkcjonalną.

Początkowo badania metagenomowe służyły do badania bioróżnorodności różnych środowisk. Jednym z pierwszych było badanie metagenomu morza Sargasowego, które potwierdziło

wcześniejsze przypuszczenie badaczy, że rzeczywista bioróżnorodność mikroorganizmów w środowisku jest znacznie wyższa niż wynikało to z badań przeprowadzonych z zastosowaniem klasycznych technik mikrobiologicznych, bazujących na izolacji czystych kultur mikroorganizmów z próbek środowiskowych. Obecnie, w dobie licznych wyników badań metagenomowych, ocenia się, że metody klasyczne pozwalają badać bioróżnorodność zaledwie 1–2% wszystkich mikroorganizmów bytujących w środowisku. Poza dokonaniem dzięki metagenomice postępu w zakresie badań bioróżnorodności życia na Ziemi, w ostatnich 10 latach nastąpił rozwój innej gałęzi badań metagenomicznych. To podejście badawcze zostało wykorzystane do identyfikacji

szeregu nowych enzymów, poznania ich struktury, funkcji oraz oceny potencjału biotechnologicznego, dzięki identyfikacji kodujących je genów pochodzących ze „niehodowlanych” w laboratorium mikroorganizmów ekstremofilnych. Ponadto, funkcjonalna analiza bibliotek metagenomowych, wsparta przez rozwój nowoczesnych

wydajnych metod sekwencjonowania i nowe narzędzia bioinformatyczne opracowane do analizy tak uzyskanych danych pozwoliła także na odkrycie nowych antybiotyków oraz innych substancji biologicznie czynnych badanych pod kątem ich możliwego terapeutycznego użycia w medycynie.

## I-WPL 7

### TREHALOZA – ZASTOSOWANIA I SPOSOBY OTRZYMYWANIA ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM ENZYMU SYNTAZY TREHALOZY

Paweł Filipkowski

Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności

Trehaloza jest specyficznym dwucukrem występującym w przyrodzie. Stanowi czynnik ochronny przed niekorzystnymi warunkami środowiska jak i materiał zapasowy u wielu gatunków. W trakcie ewolucji w organizmach wytworzyło się wiele alternatywnych dróg biosyntezy trehalozy mających na celu przetrwanie w trakcie nadmiernego ogrzewania, odwodnienia lub życia w skrajnie niskich temperaturach. Trehaloza składa się z dwóch cząsteczek glukozy powiązanych wiązaniem  $\alpha$  (1-1) glikozydowym. Połączenie to łączy dwie cząsteczki cukru prostego, dając rzadko spotykaną w przyrodzie symetryczną strukturę o niskiej reaktywności. Jako cukier nieredukujący nie uczestniczy w reakcji Maillarda, jest wysoce odporna na hydrolizę w kwaśnym środowisku oraz na wysoką temperaturę. Wykazuje również wysoką hydrofilność i stabilność chemiczną. Trehaloza w komórkach pełni przede wszystkim funkcję zabez-

pieczającą integralność struktur komórkowych. Jej działanie polega na zabezpieczeniu struktury białek lub dwuwarstwowych błon lipidowych poprzez wytwarzanie wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi cukrów, a polarnymi grupami białek bądź fosfolipidami błony. Struktury trehalozy i cukrozy/sacharozy, są do siebie zbliżone, przy czym w cukrozie cząsteczki glukozy i fruktozy połączone są innym typem wiązania. Disacharyd ten jest hydrolizowany w naszym organizmie m.in. z udziałem enzymu – trehalazy. Właściwości trehalozy dają podstawę do rozważań licznych zastosowań w przemyśle, między innymi: spożywczym, farmaceutycznym, weterynaryjnym, a także kosmetycznym. Sposoby otrzymywania trehalozy zmieniały się na przestrzeni lat. Nowoczesne techniki pozwalają otrzymywać trehalozę z odpowiednią wydajnością i w odpowiedniej cenie do zastosowań na skalę przemysłową.

## I-WPL 8

### DLACZEGO LUBIMY KSIĄŻKI DANA BROWNA – MECHANIZMY PROPAGANDY ANTY-GMO

Piotr Stępień

IBB Warszawa

stepien@ibb.waw.pl

Wykład będzie przedstawiał techniki fałszerstw i manipulacji stosowane w propagandzie przeciwników GMO, szczepień, zapłodnienia *in vitro* itp.

## WYSTĄPIENIA USTNE

## I-U 1

## MIKROBIOLOGICZNA PRODUKCJA 2,3-BUTANODIOLU Z BIOMASY

Aneta Białkowska, Ewa Gromek, Halina Kalinowska, Barbara Sikora

Instytut Biochemii Technicznej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka

Aneta.bialkowska@p.lodz.pl

Ekonomicznie opłacalne otrzymywanie wielu związków chemicznych było dotychczas możliwe niemal wyłącznie na drodze syntezy chemicznej, opartej o ulegające stopniowemu wyczerpaniu surowce kopalne. Rozwój nowych, przyjaznych dla środowiska biotechnologii, wykorzystujących mikroorganizmy zdolne do biokonwersji surowców odnawialnych, w tym surowców traktowanych wcześniej jako odpady, stał się obecnie koniecznością już nie tylko ze względów ekonomicznych, ale także ekologicznych. Przykładem związku, który można otrzymać na drodze fermentacji z produktów ubocznych po produkcji żywności lub biopaliw jest 2,3-butanodiol (2,3-BD). Związek ten znalazł zastosowanie jako środek przeciwdziałający zamarzaniu oraz w produkcji pestycydów, farmaceutyków, środków zapachowych i zmiękczejących, a po przekształceniu do 1,3-butadienu, również do produkcji gumy syntetycznej. Ponadto, ze względu na stosunkowo wysoką wartość opałową 2,3-butanodiolu ( $27\,198\text{ J g}^{-1}$ ), w porównaniu z innymi alkoholami (metanol  $22\,081\text{ J g}^{-1}$ , etanol  $29\,055\text{ J g}^{-1}$ ), może on sta-

nowić cenny dodatek do paliw. Najwydajniejszymi producentami tego alkoholu są głównie bakterie z rodzaju *Klebsiella* i *Enterobacter*, które uznane są za szczepy patogenne i nieprzydatne dla zastosowań przemysłowych. Dąży się zatem do pozyskiwania szczepów niechorobotwórczych. Takim przykładem są bakterie z rodzaju *Bacillus*, np. *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliqueafciens* czy *B. subtilis*. W celu zwiększenia poziomu biosyntezy docelowego diolu stosuje się różne strategie ulepszania bioproduktu, np. nadekspresję wybranych genów szlaku butanodiolowego, inżynierowanie metaboliczne komórki czy wybór właściwego rodzaju hodowli producenta.

Autorzy w ramach swoich badań wyselekcjonowali wydajnych producentów 2,3-butanodiolu. Do badań wybrali szczepy z rodzaju *Bacillus* i opracowali dla nich wydajną produkcję 2,3-BD z hydrolizatów odpadów rolno-spożywczych, np. wysłoków buraczanych, wytlóków jabłkowych czy melasy. Najwyższy poziom biosyntezy diolu z biomasy uzyskali w hodowlach z dokarmianiem.

## I-U 2

## MODYFIKACJA WŁAŚCIWOŚCI KATALITYCZNYCH WYBRANYCH OKSYDOREDUKTAZ Z WYKORZYSTANIEM WIRUJĄCEGO POLA MAGNETYCZNEGO

Agata Wasak<sup>1</sup>, Radosław Drozd<sup>1</sup>, Rafał Rakoczy<sup>2</sup><sup>1</sup>Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej, Szczecin<sup>2</sup>Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Zakład Ciepłownictwa i Gospodarki Odpadami, Szczecin

agata.wasak@zut.edu.pl

Enzymy jako biokatalizatory o wysokiej selektywności i efektywności działania, są powszechnie stosowane w wielu gałęziach przemysłu. W związku z tym, nieustannie poszukuje się metod pozwalających na uzyskanie wzrostu ich aktywności oraz modyfikację właściwości katalitycznych, np. pożądaną w danym procesie technologicznym. Różne rodzaje pól elektromagnetycznych (PEM), w tym pola magnetyczne (PM), są zdolne do indukowania oraz modyfikacji przebiegu reakcji enzymatycznych. Wpływ ten zależy od rodzaju pola, jego częstotliwości, indukcji magnetycznej oraz czasu ekspozycji. Obecnie, prowadzi się intensywne badania nad wykorzystywaniem PEM o niskiej częstotliwości w projektowaniu i optymalizacji konkretnych reakcji, dzięki zmianie właściwości katalitycznych przeprowadzających je biokatalizatorów.

Oksydoreduktazy, stanowią ok. 20% wszystkich biokatalizatorów stosowanych w przemyśle. W przyszłości, bardzo atrakcyjnym rozwiązaniem mogłoby się okazać zintegrowanie procesów enzymatycznych z ich udziałem, z generatorami PEM, otrzymując możliwość prowadzenia wydajnych i ekonomicznych procesów

technologicznych. Celem badań była analiza wpływu wirującego pola magnetycznego (WPM) na aktywność oraz właściwości katalityczne natywnych form oksydoreduktaz. Po przeprowadzeniu badań wstępnych w warunkach laboratoryjnych, wykonano analizy z zastosowaniem aparatury generującej WPM. Badano wpływ WPM o różnej częstotliwości (50–10 Hz), indukcji magnetycznej (16–19 mT) oraz czasie ekspozycji na powyższe parametry. Wstępne wyniki badań, sugerują zróżnicowany wpływ WPM na powyższe parametry, w zależności od częstotliwości, indukcji magnetycznej oraz czasu ekspozycji.

Poznanie mechanizmów oddziaływania PEM na reakcję katalizowaną przez enzymy, może okazać się istotnym narzędziem w różnych gałęziach przemysłu, biotechnologii oraz ochrony środowiska, pozwalając na zwiększenie efektywności wielu procesów.

Projekt badawczy finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki, w ramach konkursu PRELUDIUM 11 (nr grantu 2016/21/N/ST8/02343).



I-U 3

### PROTEAZA ASPARTYLOWA PSYCHROTROFOWYCH DROŻDZY *SPOROBOLOMYCES ROSEUS* I JEJ WYKORZYSTANIE W PRODUKCJI PEPTYDÓW O WŁAŚCIWOŚCIACH PRZECIWIUTLENIAJĄCYCH

Joanna Krysiak, Aneta Białkowska, Marianna Turkiewicz

Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka

joanna.krysiak@dokt.p.lodz.pl

Celem prowadzonych badań było poszukiwanie wydajnych producentów adaptowanych do zimna proteaz wśród drożdży izolowanych z zimnych środowisk (w tym z gleby antarktycznej). Wyselekcjonowane szczepy drożdży zostały scharakteryzowane morfologicznie, fizjologicznie i biochemicznie w oparciu o testy asymilacyjne (API 20 C AUX) oraz enzymatyczne (API ZYM), a następnie poddane funkcjonalnemu skringowi na podłożu z dodatkiem indykatora aktywności proteolitycznej. W toku tych badań wytypowano szczep drożdży charakteryzujący się wysoką aktywnością proteolityczną, został on wyizolowany z wody podziemnej pochodzącej z kopalni srebra i ołowiu Luiza w Zabrzu. Izolat został zidentyfikowany taksonomicznie w oparciu o analizę sekwencji regionu D1/D2 w obrębie genu 26S rDNA jako *Sporobolomyces roseus*. Matematyczna optymalizacja składu podłoża hodowlanego pozwoliła na około czterokrotne zwiększenie aktywności badanego enzymu, do poziomu ponad 2200 U/l, co jest poziomem rzadko spotykanym w przypadku białek zimnolubnych. Testy inhibitorowe wykazały, iż enzym ten należy do grupy pro-

teaz aspartylowych, co jest niezwykle istotne ze względu na fakt, iż jest to jak dotąd dopiero druga opisana kwaśna proteaza pochodząca z zimnolubnych drożdży. O adaptacji tego białka do zimna świadczy wysoka labilność jego cząsteczki, enzym zachowuje stabilność termiczną do 30°C, ale także stosunkowo wysoka aktywność w niskim zakresie temperatur 0–20°C (od 10 do 25% aktywności maksymalnej). Opracowano procedurę oczyszczania enzymu z zastosowaniem chromatografii jonowymiennej oraz filtracji żelowej, w wyniku której otrzymano wysokooczyszczony preparat enzymatyczny. Ze względu na potwierdzoną w ramach niniejszych badań specyficzność substratów badanej proteazy względem aminokwasów aromatycznych i hydrofobowych postanowiono zbadać jej zdolność do wytworzenia peptydów o właściwościach przeciwutleniających. Związki te ze względu na swoje zdolności do zmiatania wolnych rodników, a także zapobieganie reakcjom propagacji peroksydacji lipidów pełnią bardzo ważną rolę w ochronie układów biologicznych przed różnymi chorobami, a także w przedłużaniu okresu przechowywania produktów spożywczych.

I-U 4

### BADANIA NAD KULTURAMI *IN VITRO* *GINKGO BILOBA*

Agnieszka Szewczyk, Mariusz Grabowski

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej UJ CM, Kraków

agnieszka.szewczyk@uj.edu.pl

Miłorząb dwukłapowy (*Ginkgo biloba*) od wielu lat wykorzystywany jest w przemyśle farmaceutycznym. Wyciąg z liści miłorzębu ma wielokierunkowe działanie ze względu na zawartość wielu grup związków biologicznie czynnych, takich jak terpenoidy, flawonoidy, jak również kwasy fenolowe. Preparaty z liści *Ginkgo biloba* znajdują zastosowanie w leczeniu zaburzeń krążenia mózgowego i obwodowego, a także w profilaktyce i leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Wcześniejsze badania wykazały, że komórki z kultur *in vitro* *Ginkgo biloba* mogą akumulować fenolokwasy, ale ich zawartość jest znacznie niższa niż w roślinie gruntowej.

Celem niniejszej pracy było zbadanie możliwości zwiększenia produkcji tych związków poprzez zastosowanie metody dodatku prekursora – fenyloalaniny do kultur zawiesinowych z okazów żeńskich *Ginkgo biloba*, izolacja i identyfikacja kwasów fenolowych występujących w badanym materiale tkankowym. Kultury zawiesinowe *G. biloba* były prowadzone na podłożu wg Mura-shige and Skoog z dodatkiem BAP (2 mg/l) i Pikloramu (4 mg/l). Fenyloalanina była dodawana w stężeniach 25, 50, 75, 100, 150,

200 mg/150 ml podłoża, po 2 i 3 tygodniach od zainicjowania kultur. Biomasa z kultur eksperymentalnych i kontrolnych zbierano co 24 h przez 4 dni. Analizę kwasów fenolowych w ekstraktach metanolowych z biomasy kultur *Ginkgo biloba*, oraz hydrolizatów tychże ekstraktów, przeprowadzono metodą HPLC. Potwierdzono wyraźny wpływ dodatku fenyloalaniny na produkcję kwasów fenolowych i kwasu cynamonowego. Zastosowane stężenia fenyloalaniny nie powodowały zahamowania przyrostu biomasy. Najwyższa całkowita zawartość wolnych kwasów fenolowych i kwasu cynamonowego wyniosła 95,37 mg/100 g s.m., natomiast najwyższa całkowita zawartość związanych kwasów fenolowych – 232,92 mg/100 g s.m. Otrzymane hydrolizaty połączono i frakcjonowano na kolumnie wypełnionej żelom krzemionkowym uzyskując 6 frakcji o wzrastającej polarności. Uzyskane frakcje poddano rozdzielaniu na płytkach TLC stosując mieszaniny eluentów o wzrastającej polarności. Wyizolowane związki poddano analizom HPLC i <sup>1</sup>HNMR. Analiza spektralna pozwoliła na identyfikację 3 kwasów fenolowych – kwasu protokatechowego, *p*-hydroksybenzoesowego, wanilinowego.



## I-U 5

## OZONOWANIE SUROWCA ROŚLINNEGO PRZED ETAPEM WYDZIELENIA ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH

Justyna A. Dąbrowska<sup>1</sup>, Krzysztof B. Śmigielski<sup>1</sup>, Alina Kunicka-Styczyńska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut Podstaw Chemii Żywności, Politechnika Łódzka

<sup>2</sup>Institut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka

*justyna.alicja.dabrowska@gmail.com*

Olejki eteryczne stanowiące źródło związków bioaktywnych pozyskiwane są poprzez hydrodestylację lub destylację z parą wodną. W literaturze jest mało opracowań o nowych metodach pozyskiwania związków biologicznie aktywnych z surowców poprzez degradowanie tkanek roślinnych. Ważność użytkowa olejków eterycznych zarówno w przemyśle spożywczym, kosmetycznym jak i farmaceutycznym wskazuje na celowość poszukiwania nowej strategii ich izolacji.

Innowacje procesowe obejmujące sposób przygotowania surowca przed wyodrębnianiem olejku eterycznego, zmierzają do zwiększenia jego dostępności poprzez mechaniczną, chemiczną lub biochemiczną degradację tkanek. Celem jest zwiększenie wydajności procesu hydrodestylacji, skrócenie czasu jej trwania, a tym samym czasu ekspozycji na działanie wysokich temperatur.

W przeprowadzonych badaniach zastosowano innowację procesową jaką jest ozonowanie. Surowiec stanowiły nasiona selera zwyczajnego (*Apium graveolens* L.), które utraciły wartość komercyjną. Ozonowanie prowadzi do utlenienia składników ścian i błon komórkowych, takich jak: wielonienasycone kwasy tłuszczowe, glikoproteiny i glikolipidy, przez co powoduje zmianę składu jakościowego i ilościowego olejku eterycznego (wzrost

udziału aktywnych tlenowych pochodnych) oraz prowadzi do zwiększenia aktywności biologicznej olejku i wzbogacenia jego walorów organoleptycznych.

Zdecydowano się na prowadzenie reakcji ozonowania w trzech warunkach: w pH zawiesiny nasion selera w wodzie (niemodyfikowanym), w środowisku kwasowym oraz w środowisku zasadowym. Określono skład jakościowy otrzymanych olejków, aktywność przeciwdrobnoustrojową, antyoksydacyjną oraz profil sensoryczny. Wyniki badań porównano z próbą kontrolną, którą stanowił olejek pozyskany z surowca niepoddanego modyfikacji poprzez ozonowanie.

Zastosowanie ozonu do procesu wyodrębniania związków biologicznie aktywnych z surowców roślinnych, prowadzi do zwiększenia wydajności izolacji olejku eterycznego oraz pozyskania innowacyjnego komponentu o zwiększonej aktywności biologicznej – przeciwdrobnoustrojowej i antyoksydacyjnej.

Projekt modyfikacji surowca roślinnego poprzez ozonowanie jest zarówno innowacją technologiczną, jak i produktową. Badania tworzą nową filozofię pozyskiwania olejków eterycznych, poprzez innowacyjną technologię pozyskiwania pełnego potencjału biologicznej aktywności surowca roślinnego.

## I-U 6

## ACYLOTRANSFERAZY ACYLO-CoA: LIZOFOSFATYDYLOETANOLOAMINA – NOWE REGULATORY WZROSTU ROŚLIN

Katarzyna Jasieniecka-Gazarkiewicz

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

*katarzyna.jasieniecka@biotech.ug.edu.pl*

Acylotransferazy acylo-CoA: lizofosfatydyloetanolamina (LPEAT) należą do grupy enzymów acylotransferaz acylo-CoA: lizofosfolipid (LPLAT) zaangażowanych w biosyntezę glicerolipidów – głównych lipidów membranowych i zapasowych roślin. Enzymy typu LPEAT katalizują przeniesienie grupy acylowej z acylo-CoA na lizofosfatydyloetanolaminę syntetyzując fosfatydyloetanolaminę. Dodatkowo w wyniku reakcji przebiegającej w odwrotnym kierunku (reakcje *backward*) mogą one przenosić reszty kwasów tłuszczowych z pozycji sn-2 fosfolipidu do puli cytoplazmatycznego acylo-CoA. Funkcja fizjologiczna LPLATów nie jest dokładnie poznana. Enzymy te (kodowane przez odmienne geny) różnią się między sobą specyficznością substratową, zarówno w stosunku do donora jak i akceptora kwasów tłuszczowych. Ponieważ LPLATy mogą regulować skład kwasów tłuszczowych lipidów membranowych postuluje się, że mogą one wpływać na płynność membran biologicznych a współdziałając z fosfolipazą A2 (PLA2) zmieniają stopień pofałdowania membran komórkowych oraz wpływają na mechanizm transportu pęcherzykowego w komórce.

Celem pracy było określenie funkcji fizjologicznych enzymów typu LPEAT u roślin oraz badania ich aktywności i specyficzności substratowej. W tym celu prowadzono obserwacje morfologii

mutantów *A. thaliana* z wyłączonymi genami kodującymi acylotransferazy acylo-CoA: lizofosfatydyloetanolamina oraz mutantów z nadekspresją genów kodujących białko o aktywności LPEAT (geny *At1g80950* i/lub *At2g45670*). Dodatkowo prowadzono badania składu i zawartości lipidów w tkankach wegetatywnych oraz nasionach tych roślin. W tym celu wykorzystywano podstawowe techniki chromatograficzne jak chromatografia cienkowarstwowa oraz gazowa jak i najnowsze techniki spektrometrii masowej.

Wyniki wskazują że aktywność enzymatyczna LPEAT jest niezbędna do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Rośliny z wyłączonymi genami odpowiedzialnymi za aktywność LPEAT wykazywały karłowaty fenotyp oraz produkowały mniejszą ilość, mniejszych nasion. Nadekspresja zaś genów odpowiedzialnych za aktywność LPEAT wywoływała przeciwne efekty.

Manipulacje genetyczne mające na celu wzrost aktywności enzymów AtLPEAT mogą okazać się przydatnym narzędziem do otrzymywania zarówno genetycznie modyfikowanych, jak i tradycyjnie hodowanych nowych odmian roślin o ulepszonych cechach. Odmiany te mogłyby znaleźć zastosowanie w wielu dziedzinach gospodarki, takich jak produkcja rolna, produkcja biopaliw lub surowców dla przemysłu chemicznego.

I-U 7

**BIONANOTECHNOLOGIA W ROLNICTWIE**

Paweł Nawrotek, Bartłomiej Grygorcewicz, Adrian Augustyniak

Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt,  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

pawel.nawrotek@zut.edu.pl

Bionanotechnologia to stosunkowo nowy, intensywnie rozwijający się, obszar badawczy oparty na innowacyjnych osiągnięciach biotechnologii i nanotechnologii. Zajmuje się badaniami dotyczącymi określonych materiałów i procesów technologicznych w odniesieniu do struktur oraz systemów biologicznych w nanoskali. Jednocześnie, identyfikacja oraz analiza obiektów w nano wymiarze może poszerzyć ten zakres badań o nowe elementy, w tym takie jak np. wirusy bakteryjne (bakteriofagi) charakteryzujące się dużym potencjałem biotechnologicznym.

Znaczenie bionanotechnologii stale rośnie, czego dowodem są przykłady jej zastosowań, szczególnie w sferze ochrony zdrowia ludzi i zwierząt, jak również ekologii i przemysłu spożywczego. Wydaje się, iż niezmiernie ważnym obszarem wykorzystywania bio- i nanotechnologii jest także nowoczesne rolnictwo, w którym coraz częściej podejmuje się próby wdrażania technologii opartych na nanomateriałach. Towarzyszy temu jednak odczuwalny brak odpowiednio zwalidowanych metod analitycznych pozwalających na określenie ewentualnych skutków ich oddziaływania na organizmy żywe występujące w określonych ekosystemach oraz potencjalne ryzyko przedostawania się i kumulowania nano-cząstek w środowisku naturalnym. Ważnym problemem są rów-

nież liczne zagrożenia mikrobiologiczne związane z rolnictwem, takie jak m.in. występowanie i selekcja wielolekoopornych patogenów bakteryjnych (o istotnym znaczeniu klinicznym i epidemiologicznym) oraz związana z tym konieczność poszukiwania alternatywnych sposobów ich eradykacji. W tym kontekście, w Katedrze Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej ZUT w Szczecinie, realizowane są badania dotyczące wpływu wybranych nanostruktur krzemowych i węglowych niemodyfikowanych bądź funkcjonalizowanych metalami lub tlenkami metalina użyteczne biotechnologicznie bakterie środowiskowe z rodzajów *Pseudomonas* i *Streptomyces*. Wstępne wyniki tych badań wskazują na fakt, iż nanomateriały (w dawkach toksycznych wobec bakterii modelowych, takich jak *E. coli* i *S. aureus*) nie tylko nie wywołują efektu antimikrobiologicznego wobec środowiskowych szczepów *Pseudomonas* spp. i *Streptomyces* spp., ale przeciwnie mogą stymulować ich aktywność metaboliczną. Z kolei, w ramach innych realizowanych równolegle badań, wyizolowano środowiskowe bakteriofagi wykazujące aktywność bakterioliptyczną względem zoonotycznych antybiotykoopornych szczepów bakteryjnych wyselekcjonowanych w środowisku rolniczym oraz określono ich potencjał aplikacyjny.

I-U 8

**WPLYW NAWOZÓW WAPNIOWYCH WZBOGACONYCH MIKROBIOLOGICZNIE NA WZROST I PLONOWANIE ROŚLIN OGRODNICZYCH**

Lidia Sas-Pasz

Instytut Ogrodnictwa, Zakład Mikrobiologii, Pracownia Rizosfery, Skierniewice

Lidia.sas@inhort.pl

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu wysokiej jakości, innowacyjnych nawozów wapniowych tj. Wapno Inco i Wapno PMG Inco (wapno wzbogacone mikrobiologicznie) na wzrost roślin ogrodnich, skład mineralny roślin oraz liczebność mikroorganizmów w glebie rizosferowej w warunkach polowych. Doświadczenia zostały przeprowadzone w 2016 roku na Polu Doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach oraz w Sadzie Doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa w Dąbrowicach. Obiektem badań były rośliny truskawki odmiany Elsanta, drzewa jabłoni odmiany Ariwa, rośliny marchwi odmiany Nipomo oraz ogórka odmiany Adam. Wiosną zastosowano nawożenie obornikiem, wapnem oraz wapnem wzbogaconym mikrobiologicznie (Wapno PMG Inco). Poletka kontrolne stanowiły rośliny bez aplikacji nawozów wapniowych oraz obornika. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, iż aplikacja Wapna Inco oraz Wapna PMG Inco (wapno wzbogacone mikrobiologicznie) wpłynęła na istotne zwiększenie plonowania marchwi, ogórka, truskawki i jabłoni. Najwyższe parametry cech wzrostu korzeni

roślin ogrodnich uzyskano po nawożeniu roślin Wapnem Inco i Wapnem PMG Inco. Aplikacja obornika, Wapna Inco oraz Wapna PMG Inco wpłynęła na zwiększenie zawartości makro- i mikroelementów oraz zawartości substancji organicznej w glebie, na której rosły rośliny marchwi i ogórka. Wielkość populacji poszczególnych grup mikroorganizmów była modyfikowana pod wpływem zastosowanego nawożenia. Zastosowanie Wapna Inco i Wapna PMG Inco korzystnie wpłynęło na zwiększenie występowania grzybów AGM oraz lepsze formowanie struktur grzybów mikoryzowych (wezykule, arbuskule, grzybnia i spory) w korzeniach roślin marchwi, ogórka, truskawki i jabłoni.

Doświadczenia w tym zakresie będą kontynuowane w sezonie wegetacji 2017 i 2018 roku. W odpowiedzi na problemy producentów roślin uprawnych użycie przyjaznych dla środowiska nawozów wapniowych w optymalnych dawkach, w zależności od pH i miejscowej zasobności gleby w składniki mineralne, zapewni wysokiej jakości plony przy znacznej oszczędności nakładów finansowych.

## I-U 9

### WPŁYW SUBSTANCJI PROBIOTYCZNYCH NA STAN EKOLOGICZNY JEZIOR ZASIEDLONYCH PRZEZ MAŁŻE

Barbara Wojtasik<sup>1</sup>, Małgorzata Zbawicka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>HydroBiollab, Firma Naukowo-Badawcza i Laboratorium Hydrobiologiczne, Gdynia

<sup>2</sup>Instytut Oceanologii PAN, Zakład Genetyki i Biotechnologii Morskiej, Sopot

hydrobiollab@wp.pl

Przeanalizowano reakcję pospolicie występujących gatunków Mollusca: Bivalvia: szczeżuja pospolita (*Anodonta anatina*, Unionidae) oraz racicznica zmienna (*Dreissena polymorpha*, Dreissenidae) na działanie płynnej substancji probiotycznej w różnych stężeniach. Małże *A. anatina* i *D. polymorpha* zamieszkują wody słodkie i o niskim zasoleniu, stojące i wolno płynące. Testy przeprowadzono na osadzie i wodzie pobranej z różnego typu, pod względem ekologicznym, jezior: oligotroficzne, eutroficzne, zdegradowane. W każdym z eksperymentów wykonywano w ustalonych odstępach czasu pomiary temperatury (T), pH, przewodnictwa elektrolitycznego (C), zawartości procentowej tlenu oraz tlenu rozpuszczonego.

Duże zagęszczenie filtratorów *A. anatina* i *D. polymorpha* wraz ze wzrostem stężenia probiotyku wpływa przede wszystkim na wzrost wartości przewodnictwa elektrolitycznego, ubytek zawartości tlenu oraz spadek wartości pH. W przypadku *A. anatina* zmiany ww. parametrów są większe. W przeprowadzonych eks-

perymentach stwierdzono różnicę pomiędzy temperaturą hodowli bez probiotyku PP, a temperaturą hodowli z płynnym probiotykiem. Przy czym temperatura hodowli z probiotykiem PP była wyższa we wszystkich układach w temperaturze pokojowej. Przejrzystość wody była największa w hodowli kontrolnej, bez dodatku płynnego probiotyku. W hodowlach z dodatkiem płynnego probiotyku pojawiały się zakwity sinic, ścianki akwariów porastały intensywnie glonami. We wszystkich trzech akwariach, w których były mięczaki nastąpił rozwój młodych osobników. W żadnym z przeprowadzonych eksperymentów zastosowany probiotyk nie wykazał właściwości ostrej toksyczności (efekt letalny nie nastąpił po przeniesieniu małży do hodowli z substancją probiotyczną).

*Badania wykonano w ramach projektu NCBiR „GEKON” nr 267948 pt. „Opracowanie i wdrożenie metody rekultywacji jezior i ochrony wód powierzchniowych w oparciu o naturalne technologie biologiczne wykorzystujące pożyteczne mikroorganizmy”.*

## I-U 10

### UDZIAŁ ŚWINI DOMOWEJ W PULI GENOWEJ NATURALNYCH POPULACJI DZIKA EUROPEJSKIEGO W POLSCE

Artur Działuk<sup>1</sup>, Ewa Zastempowska<sup>2</sup>, Radosław Skórzewski<sup>2</sup>,  
Magdalena Twarużek<sup>2</sup>, Jan Grajewski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Genetyki, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz

<sup>2</sup>Katedra Fizjologii i Toksykologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz

ewazas@ukw.edu.pl

W ostatnich latach obserwuje się wzrost częstości występowania zjawiska hybrydyzacji pomiędzy udomowionymi i dzikimi blisko spokrewnionymi zwierzętami. Zjawisko to stanowi zagrożenie dla integralności puli genowej gatunków zwierząt dziko żyjących. Najnowsze wyniki badań sugerują, że introgresja materiału genetycznego ze świni domowej (*Sus scrofa f. domestica*) do dzika (*Sus scrofa scrofa*) w Europie jest znacznie bardziej powszechna w populacjach lokalnych niż sądzono na podstawie badań ogólnoeuropejskich. Celem badań była ocena czystości genetycznej wolno żyjących dzików z dwóch obszarów łowieckich w Polsce na podstawie polimorfizmu genu receptora melanokortyny 1 (*MC1R*), z zastosowaniem techniki biologii molekularnej (PCR-RFLP). Wśród 265 badanych dzików stwierdzono niespodziewanie dużą

liczbę osobników zawierających materiał genetyczny świni domowej (24%), co sugeruje, że powszechnymi przodkami wolno żyjących dzików w Polsce mogły być mieszańce będące wynikiem skrzyżowania dzika ze swinią domową. Ponadto brak istotnej różnicy w częstości występowania alleli typu dzikiego w obrębie dwóch obszarów łowieckich wskazuje na dużą zdolność rozproszenia i przepływu genu w populacjach lokalnych. Wśród mieszańców zidentyfikowano osobniki będące wynikiem krzyżowania wstecznego świniodzików ze swinią i/lub świniodzikiem (2%). Ponadto na obszarze objętym badaniem zjawisko introgresji zachodzi prawdopodobnie z udziałem wielu komercyjnych ras świń. Potrzebne są dalsze badania zmierzające do lepszego zrozumienia mechanizmów i źródeł introgresji w populacji dzików w Polsce.

I-U 11

## NOWATORSKIE UKŁADY IMMOBILIZOWANEJ LAKAZY JAKO EFEKTYWNE SYSTEMY DO BIODEGRADACJI BISFENOLI

Katarzyna Antecka<sup>1</sup>, Jakub Zdarta<sup>1</sup>, Agnieszka Zgoła-Grześkowiak<sup>2</sup>,  
Hermann Erhlich<sup>3</sup>, Teofil Jesionowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska

<sup>2</sup>Instytut Chemii i Elektrochemii Technicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska

<sup>3</sup>Institute of Experimental Physics, TU Bergakademie Freiberg, Niemcy

Katarzyna.antecka@gmail.com

Bisfenol A (BPA) został po raz pierwszy zsyntezowany w 1891 roku przez A. Dianina, jako produkt kondensacji acetonu z dwiema cząsteczkami fenolu. Od tego czasu jego właściwości są szeroko badane, co ma przełożenie na wykorzystanie BPA w wielu gałęziach przemysłu. Stosowany jest do produkcji plastikowych butelek, puszek do żywności, czy zabawek dla dzieci. Należy jednak dodać, że związek ten może zaburzać gospodarkę hormonalną człowieka, przez co wywołuje takie choroby jak zespół policystycznych jajników, otyłość, a nawet raka piersi.

Ciągły wzrost przemysłowego wykorzystania bisfenolu A stawia wyzwanie, którym jest opracowanie efektywnych technik jego usuwania. Jedną z takich metod jest biodegradacja z wykorzystaniem lakaz, a więc enzymów, które poprzez utlenianie fenoli powodują ich rozkład do związków nieszkodliwych dla środowiska oraz ludzkiego zdrowia. Należy podkreślić, że lakazy mogą zostać wykorzystane także do usuwania innych zanieczyszczeń, jak barwniki czy farmaceutyki. Białka te wytwarzane są przez rośliny oraz bakterie,

jednak najszersze zastosowanie przemysłowe znajdują lakazy pozyskane z grzybów, jak na przykład *Trametes versicolor*.

W celu poprawy stabilności oraz wydłużenia katalitycznego działania lakazy, w przeprowadzonych badaniach, poddano ją immobilizacji na powierzchni szkieletu gąbki morskiej *Hippospongia communis*. Zweryfikowano skuteczność zaproponowanej techniki immobilizacji, a także określono wpływ zmiennych warunków procesu biodegradacji bisfenolu na jego efektywność.

Właściwości wytworzonych systemów biokatalitycznych pozwalają na ich wykorzystanie w procesach usuwania wybranych zanieczyszczeń środowiskowych, a zastosowanie takiego rozwiązania jest nie tylko bezpieczne dla środowiska, lecz także atrakcyjne pod kątem finansowym.

*Podziękowania: Praca została sfinansowana i przygotowana w ramach projektu badawczego realizowanego w Politechnice Poznańskiej nr 03/32/DSMK/0710.*

I-U 12

## ROZWÓJ GRZYBÓW PLEŚNIOWYCH NA PIANCE POLIURETANOWEJ

Aleksandra Kemono, Małgorzata Piotrowska

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka

aleksandra.kemono@gmail.com

Poliuretany to tworzywa sztuczne powstające w wyniku reakcji kondensacji poliizocyanianów z polialkoholami. Dodatek do mieszaniny reakcyjnej wody prowadzi do wydzielenia CO<sub>2</sub>, który jest odpowiedzialny za spienianie poliuretanów, w wyniku czego powstają pianki poliuretanowe. Znaczny udział w budowie tych materiałów stanowią wiązania uretanowe, mocznikowe i eterowe.

Polska zajmuje drugie miejsce na świecie jako eksporter materaców i czwarte miejsce jako eksporter mebli, których blisko jedna trzecia to meble tapicerowane.

Bardzo istotną częścią jednych i drugich towarów są elastyczne pianki poliuretanowe (FPUF). Ich roczne zużycie w Polsce przekroczyło 130 tys. ton. Niestety wysoki poziom produkcji prowadzi do powstawania znacznych ilości odpadów. Ze względu na wysoką odporność tych tworzyw na czynniki fizyczne i chemiczne oraz toksyczność produktów spalania, najczęściej stosowaną metodą gospodarowania odpadami zawierającymi te tworzywa jest składowanie – metoda mało ekonomiczna ze względu na niską gęstość pozorną pianek.

Ze względu na zmniejszającą się dostępność miejsca na składowiskach oraz zmiany legislacyjne, w ostatnich latach znacznie wzrosło zapotrzebowanie na opracowanie ekologicznych i stosunkowo niedrogich metod gospodarowania odpadami FPUF.

Ponieważ biodegradacje stanowią doskonałą metodę rozkładu wielu tworzyw sztucznych, istnieje prawdopodobieństwo, że również w przypadku poliuretanów można w tym celu wykorzystać mikroorganizmy.

W poszukiwaniu drobnoustrojów potencjalnie zdolnych do przeprowadzenia biodegradacji pianek poliuretanowych, we wcześniejszych badaniach wyizolowano szczepy pleśni bytujące na odpadach składowanych przez 5 lat w warunkach środowiskowych. Spośród nich wybrano gatunki z rodzajów *Aspergillus*, *Trichoderma* oraz *Epicoccum* wykazujące zdolność do wzrostu na pożywce zawierającej FPUF jako jedyne źródło węgla.

Celem badań była ocena wzrostu tych mikroorganizmów na powierzchni pianki poliuretanowej w warunkach obecności oraz braku dodatkowego źródła węgla w pożywce. Określono wpływ tych mikroorganizmów na strukturę ściany komórek pianki poliuretanowej wykorzystując metody mikroskopowe. Oceniono również metodą FTIR zmiany struktury chemicznej materiałów zachodzące pod wpływem mikroorganizmów.

Stwierdzono, że badane drobnoustroje kolonizują powierzchnie pianek poliuretanowych. Zaobserwowano zmiany w strukturze ściany komórek piankowych występujących w formie przerosłów oraz ubytków, a także niewielkie zmiany w widmie IR.



## I-U 13

**BIODEGRADACJA ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH  
PRZEZ WYBRANE SZCZEPY DROŻDŻY**

Natalia Filipowicz<sup>1</sup>, Malwina Momotko<sup>2</sup>, Ewelina Krajewska<sup>1</sup>, Agata Terebieniec<sup>1</sup>,  
Monika Wicka-Grochocka<sup>1</sup>, Grzegorz Boczkaj<sup>2</sup>, Hubert Cieśliński<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii

<sup>2</sup> Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej

filipowicz.natalia@wp.pl

Związki fenolowe stanowią poważne zagrożenie dla środowiska naturalnego. Te węglowodory aromatyczne ulegają akumulacji w glebie i wodach gruntowych. Ponadto, są stabilne i odporne na samodegradację w roztworach wodnych. Poszukiwanie alternatywnych metod, w stosunku do aktualnie stosowanych metod fizykochemicznych, które pozwoliłyby na redukcję stężenia węglowodorów w środowisku naturalnym, jest przedmiotem badań wielu grup naukowych. Główną zaletą metod biologicznych jest brak produkcji wtórnych metabolitów, które charakteryzują się podobną lub nawet wyższą toksycznością niż eliminowany związek

Celem pracy była izolacja szczepów drożdży psychrotolerancyjnych zdolnych do biodegradacji fenolu bądź katecholu poprzez hodowlę wybranych kultur na podłożu zawierającym fenol lub katechol, jako jedyne źródło węgla.

Badaniu poddano 3 szczepy drożdży psychrotolerancyjnych, wyizolowane z próbek gleby i wody pochodzących z terenu torfowiska Rucianka. Szczepy wytypowano na podstawie przeprowadzonych wcześniej badań. Hodowle przeprowadzano w podłożu minimalnym suplementowanym badanym związkiem w stężeniu 500 mg/l–2000 mg/l. Podczas prowadzenia hodowli wykonywano pomiar gęstości optycznej hodowli OD<sub>600</sub> (monitorowanie wzrostu biomasy drożdży w obecności fenolu/katecholu jako jedyne źródła węgla) oraz oznaczenie stężenia fenolu/katecholu w trakcie hodowli drożdży przy pomocy chromatografii gazowej GC-FID.

Dzięki przeprowadzonym testom wytypowano 3 szczepy zdolne do wydajnej biodegradacji związków fenolowych w szerokim spektrum stężeń. We wszystkich testach, degradacja badanych związków zachodziła w stosunkowo krótkim czasie.

## I-U 14

**BIOSYNTETA ESTERAZY Z *PSEUDOMONAS* SP. S9 W KOMÓRKACH  
*PICHIA PASTORIS*, OCZYSZCZANIE I CHARAKTERYSTYKA**

Monika Wicka-Grochocka, Agata Terebieniec, Ewelina Krajewska, Natalia Filipowicz,  
Hubert Cieśliński, Marta Wanarska

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii

monikawicka@wp.pl

Enzymy lipolityczne ze względu na swoje unikalne właściwości takie jak stereo-, chemo- i regiospecyficzność znajdują szereg zastosowań w różnych gałęziach przemysłu. Lipazy i esterazy wykorzystywane są w przemyśle chemicznym, farmaceutycznym, spożywczym oraz w syntezie organicznej.

W ramach wcześniejszych badań zidentyfikowałam i scharakteryzowałam aktywną w niskiej temperaturze esterazę z *Pseudomonas* sp. S9. Esteraza *Pseudomonas* sp. S9 jest przykładem białka dwudomenowego składającego się z domeny katalitycznej i domeny autotransportera. Białko to produkowane było w systemie *E. coli* w postaci nieaktywnej tj. w ciałkach inkluzyjnych i wymagało renaturacji. System ekspresyjny *E. coli* nie sprawdził się w pełni do produkcji esterazy z *Pseudomonas* sp. S9. W związku z tym postanowiono wykorzystać inny system ekspresji w celu otrzymania aktywnego białka produkowanego na zewnątrz komórki.

W pracy wykorzystano system ekspresyjny oparty o komórki mezofilnych drożdży *Pichia pastoris*. Etapy badań obejmowały konstrukcję drożdżowych wektorów ekspresyjnych umożliwiają-

cych produkcję dwóch wariantów rekombinantowych białek tj. białka jednodomenowego (domena katalityczna) oraz dwudomenowego (domena katalityczna i autotransporter). Ponadto, wektory skonstruowano tak by otrzymane białka rekombinantowe na N-końcu posiadały sekwencje sygnałowe ( $\alpha$  faktor), a na C-końcu domenę polihistydynową umożliwiającą efektywne oczyszczanie przy użyciu chromatografii metalopowinowactwa. W wyniku elektroporacji komórek *Pichia pastoris* skonstruowanymi wektorami ekspresyjnymi otrzymano szczepy rekombinantowe produkujące białka zarówno jednodomenowe jak i dwudomenowe. W odróżnieniu od białka jednodomenowego ( $\alpha$ EstS9) produkowanego na zewnątrz komórki wariant dwudomenowy białka ( $\alpha$ EstS9Auto) kotwiczy w błonie komórkowej komórek drożdży *Pichia pastoris* X-33. Wynik ten potwierdza funkcję domeny autotransportera. Przeprowadzona charakterystyka biochemiczna enzymu jednodomenowego (EstS9) wykazała jego odmienność w stosunku do białka dwudomenowego produkowanego w *E. coli*. Odnotowano różnice m.in. w specyficzności substratowej i zakresie temperatur w jakich to białko najlepiej działa

I-U 15

### GENETYCZNA I BIOCHEMICZNA CHARAKTERYSTYKA DROŹDŹY WYIZOLOWANYCH Z GLEBY ANTARKTYCZNEJ

Tomasz Florczak, Katarzyna M. Szulczewska, Joanna Krysiak, Ewa Gromek, Aneta Białkowska, Marianna Turkiewicz

Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka  
tomasz.florczak.1@p.lodz.pl

Pięćdziesiąt siedem szczepów psychrofilnych i psychrotrofovych drożdży wyizolowano z prób gleby pobranych w sąsiedztwie Polskiej Stacji Polarnej. Stacja ta znajduje się na zachodnim wybrzeżu Zatoki Admiralicji i obejmuje siedliska lądowe, które nie są trwale pokryte lodem, w przeciwieństwie do ponad 90% powierzchni wyspy. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat badania nad glebami tych siedlisk ujawniły znaczną bioróżnorodność bakterii, grzybów strzępkowych i, w mniejszym stopniu, drożdży. Jednakże charakterystyka tego złożonego mikrobiomu, szczególnie na poziomie molekularnym, jest wciąż daleka od zadowalającej. Izolaty przypisano do odpowiednich rodzajów i gatunków w oparciu o analizę genetyczną regionów D1/D2 i ITS1-5.8S-ITS2 rDNA. W badanych próbach gleby najliczniej występowały drożdże należące do rodzajów: *Goffeauzyma*, *Naganishia*, *Rhodotorula* i *Deba-*

*ryomyces*. W przypadku kilku wybranych szczepów określono komórkową zawartość DNA i karyotyp stosując cytometrię przepływową (FCM) i elektroforezę w pulsacyjnym polu elektrycznym (PFGE). Po raz pierwszy oszacowano wielkość genomu i karyotypy szczepów należących do gatunków *Goffeauzyma gilvescens*, *Naganishia globosa*, *Goffeauzyma gastrica* i *Naganishia albida*. Ponadto wykonano testy sktiningowe, które wykazały, że wyizolowane szczepy drożdży są potencjalnym źródłem biotechnologicznie ważnych enzymów.

Badania nad różnorodnością biologiczną, prezentujące fizjologiczną i molekularną charakterystykę szczepów drożdży psychrotoleracyjnych wyizolowanych z gleby w pobliżu zachodniej zatoki Admiralicji, przyczyniają się do lepszego zrozumienia ekosystemu mikrobiologicznego tego wyjątkowego środowiska.

I-U 16

### WYKORZYSTANIE GLICEROLU JAKO ŹRÓDŁA WĘGLA DO PRODUKCJI ADAPTOWANYCH DO ZIMNA $\beta$ -GALAKTOZYDAZ PRZEZ REKOMBINANTOWE SZCZEPY DROŹDŹY *PICHIA PASTORIS*

Marta Wanarska, Jakub Barański, Ewelina Krajewska, Monika Wicka-Grochocka, Hubert Cieśliński

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska  
marwanar@pg.gda.pl

Metylotroficzne drożdże *Pichia pastoris* są powszechnie stosowane do produkcji rekombinantowych białek, ze względu na dużą wydajność biosyntezy i możliwość sekrecji polipeptydów do pożywki hodowlanej, co ułatwia ich późniejsze oczyszczenie. Drożdże te są zdolne do metabolizowania glukozy, glicerolu i metanolu jako źródła węgla i energii.

Glicerol jest głównym produktem ubocznym powstającym w procesie produkcji biodiesla. Wzrastające zapotrzebowanie na biopaliwo generuje coraz większe ilości surowej frakcji glicerolowej, której efektywne przetwarzanie może przyczynić się do ograniczenia zanieczyszczenia środowiska oraz zwiększenia opłacalności produkcji biodiesla.

Celem badań była ocena przydatności surowej frakcji glicerolowej powstałej przy produkcji biodiesla jako źródła węgla w pożywce do hodowli szczepów *P. pastoris* produkujących adaptowane do zimna  $\beta$ -galaktozydazy.  $\beta$ -Galaktozydazy to enzymy katalizujące hydrolizę  $\beta$ -galaktozydów, w tym dwucukru laktozy, które stosowane są w przemyśle mleczarskim, przede wszystkim do produkcji mleka o obniżonej zawartości laktozy.

Rekombinantowe szczepy *P. pastoris* zdolne do biosyntezy i sekrecji  $\beta$ -galaktozydaz *Arthrobacter* sp. S3\*, *Arthrobacter* sp. 32cB oraz *Paracoccus* sp. 32d hodowano przez 4 doby w 25°C, w pożywce zawierającej glukozę, czysty glicerol lub surowy glicerol jako źródło węgla. Aktywność enzymów w próbkach pożywki pobieranych co 24 h badano w reakcji z o-nitrofenylo- $\beta$ -d-galaktopiranozydem. Ilość powstającej biomasy drożdży oraz aktywność adaptowanych do zimna enzymów były zbliżone w przypadku hodowli prowadzonych w pożywkach z glukozą i czystym glicerolem. Dodatek surowej frakcji glicerolowej do pożywki skutkował niewielkim wzrostem ilości biomasy rekombinantowych szczepów *P. pastoris*, przy jednoczesnym spadku aktywności  $\beta$ -galaktozydaz w płynie pohodowlanym.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na możliwość wykorzystania surowej frakcji glicerolowej jako źródła węgla dla rekombinantowych szczepów drożdży *P. pastoris*, jednakże sekrecja enzymów do pożywki nie jest wskazana, ponieważ zanieczyszczenia zawarte w surowym glicerolu mogą negatywnie wpływać na aktywność i stabilność produkowanych białek.

I-U 17

## IZOLACJA DROŻDŻY PSYCHROTOLERANCYJNYCH ORAZ OCENA ICH ZDOLNOŚCI DO WYKORZYSTANIA *N*-FOSFONOMETRYLOGLICYNY JAKO ŹRÓDŁA PIERWIASTKÓW BIOGENNYCH

Agata Terebieniec<sup>1</sup>, Natalia Filipowicz<sup>1</sup>, Ewelina Krajewska<sup>1</sup>, Monika Wicka-Grochocka<sup>1</sup>,  
Magdalena Klimek-Ochab<sup>2</sup>, Marek Roszko<sup>3</sup>, Hubert Cieśliński<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej

<sup>2</sup>Zakład Chemii Bioorganicznej Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej

<sup>3</sup>Zakład Analizy Żywności Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego

*terebieniecagata@gmail.com*

*N*-fosfonometyloglicyna (PMG, glifosat) jest substancją aktywną herbicydu Roundup o szerokim spektrum aktywności biologicznej. Mechanizm jego działania opiera się na inhibicji aktywności syntazy 5-enolpirogroniano-szikimowo-3-fosforanowej (EPSP), przez co hamowana jest biosynteza aminokwasów aromatycznych u roślin. Glifosat jest związkami fosforoorganicznym, w którego budowie wyróżnia się trwałe wiązanie C-P.

Szybkość rozkładu PMG w glebie zależy od rodzaju gleby oraz aktywności mikroorganizmów w niej bytujących i waha się od 2 do 200 dni. Wyróżnia się dwa mechanizmy całkowitej degradacji *N*-fosfonometyloglicyny. Oba prowadzą do przerwania wiązania fosfor-węgiel. W pierwszym cząsteczka PMG jest poddana działaniu C-P liazy, katalizującej rozpad wiązania C-P z jednoczesnym uwolnieniem sarkozyny i fosforu nieorganicznego. W drugim szlaku, początkowo w wyniku działania oksydoreduktazy glifosatu powstaje kwas aminometylofosfonowy (AMPA) oraz glioksalan. Kolejno, w następstwie aktywności C-P liazy zostaje uwolniona

reszta fosforanowa, natomiast glioksalan włączony w cykl kwasów tri-karboksylowych.

Szczepy drożdży psychrotolerancyjnych zostały wyizolowane z próbek gleby pobranych z terenów rolniczych, na których Roundup stosowany jest cyklicznie, w województwach: warmińsko-mazurskim i lubelskim.

Czyste kultury drożdży inkubowano w temperaturze 18°C na podłożu stałym YPD z dodatkiem ampicyliny i chloramfenikolu. W testach na asymilację PMG jako źródła azotu i fosforu prowadzono hodowle w płynnym Czapek Dox Medium (CDM) z dodatkiem glifosatu w stężeniach: 4 mM i 2 mM odpowiednio dla źródła azotu i fosforu lub 4 mM, jeśli PMG był wykorzystywany przez mikroorganizm jednocześnie jako źródło azotu i fosforu w temperaturze 18°C z wytrząsaniem 180 rpm przez 7 dni. Przeprowadzone badania pozwoliły na wybór kilku izolatów, które zostaną przeanalizowane pod kątem ich potencjału do degradacji glifosatu w glebie.

## POSTERY

## I-P 1

## ANALIZA STRUKTURY POPULACJI MIKROORGANIZMÓW POCHODZĄCYCH Z WÓD STREFY HYPOREICZNEJ BIAŁEJ PRZEMSZY

Anna Kostka<sup>1</sup>, Sławomir Ciesielski<sup>2</sup><sup>1</sup>Katedra Ochrony Środowiska Akademii Górniczo-Hutniczej im. St. Staszica w Krakowie<sup>2</sup>Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

anna.kostka@gmail.com

Biała Przemsza to rzeka o długości 63,9 km, położona w województwie małopolskim i śląskim. Wraz z Czarną Przemszą tworzy Przemszę, która jest lewym dopływem Wisły. Zlewnia Białej Przemszy od XVI w. aż do drugiej połowy XX wieku była narażona na zanieczyszczenia pochodzące z górnictwa cynku i ołowiu, zwłaszcza w rejonie Bukowna. Z ekologicznego punktu widzenia ważne jest określenie, jaki jest wpływ uprzemysłowienia tego regionu na funkcjonowanie ekosystemu rzecznoego.

Próbki wody do badań mikrobiologicznych pobrano z 6 piezometrów zlokalizowanych w obrębie strefy hyporeicznej Białej Przemszy, w 4 sezonach (marzec, maj, lipiec i wrzesień) 2014 roku. Pobrano je z głębokości od 0,5 do 3,5 m p.p.t. Badania metagenomiczne 22 próbek wykonano w oparciu o analizę super-zmiennego regionu V4 16S rRNA.

W próbkach rozpoznano 29 typów, z czego zdecydowanie dominują przedstawiciele *Proteobacteria*, *Firmicutes* i *Actinobac-*

*teria*. Najliczniej reprezentowane rodziny to *Enterobacteriaceae*, *Propionibacteriaceae* oraz *Bacillaceae*. Rodziny te, wraz z *Neisseriaceae*, miały największy wpływ na różnicowanie próbek, jednakże analiza nie wykazała istotnych zależności, ani związanych z miejscem, ani z okresem poboru próbki, co sugeruje stabilność badanej strefy hyporeicznej i jest zgodne z obserwacjami geomorfologicznymi. Największy wpływ na częstotliwość występowania poszczególnych jednostek taksonomicznych miało pH oraz Eh (potencjał oksydacyjno-redukcyjny), a także stężenie As, Pb, Si oraz Zn. Ciekawym aspektem uzyskanych wyników są liczne korelacje pomiędzy parametrami fizyko-chemicznymi a częstotliwością występowania niektórych taksonów, zwłaszcza powiązanych z metabolizmem związków siarki (np. *Sulfurimonas*, *Sulfuricum*). Integracja wyników badań metagenomicznych i mineralogicznych pozwoliła udowodnić, że procesy przemiany siarki odgrywają ważną rolę w strefie hyporeicznej Białej Przemszy.

## I-P 2

OKREŚLENIE LEKOOPORNOŚCI I WYSTĘPOWANIA GENÓW KODUJĄCYCH ENZYMY ESBL U *ESCHERICHIA COLI* IZOLOWANYCH Z WYBRANYCH RZEK NA TERENIE PODHAŁAAnna Lenart-Boroń<sup>1</sup>, Piotr Boroń<sup>2</sup><sup>1</sup>Katedra Mikrobiologii, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie<sup>2</sup>Zakład Fitopatologii Leśnej, Mykologii i Fizjologii Drzew, Wydział Leśny, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

a.lenart-boron@ur.krakow.pl

Celem badań było określenie występowania lekoopornych i posiadających geny kodujące enzymy ESBL szczepów *Escherichia coli* w wodach dwóch rzek na terenie Podhala – Białki i Zakopianki. Próbki pobrano w ośmiu seriach, w sześciu punktach wzdłuż Białki i w pięciu – wzdłuż Zakopianki. Liczebność *E. coli* oznaczono techniką filtracji membranowej na podłożu TBX, a przynależność do gatunku potwierdzono metodą spektrometrii MALDI-TOF. Lekooporność szczepów oznaczono metodą dyfuzji krążkowej, a występowanie mechanizmu ESBL – techniką dwóch krążków. Obecność genów kodujących enzymy ESBL oznaczono techniką PCR ze specyficznymi starterami: *blaCTXM3*, *CTXM9*, *OXA*, *SHV* i *TEM*. Liczba *E. coli* w rzece Białce wahała się od 3 jtk/100 ml w Tatrzańskim Parku Narodowym do ponad 2 mln jtk/100 ml przy zrzucie ścieków z oczyszczalni w Czarnej Górze. W rzece Zakopiance najmniej *E. coli* stwierdzono w centrum Nowego Targu (910 jtk/100 ml), najwięcej zaś przy zrzucie ścieków z oczyszczalni w Zakopanem (47 700 jtk/100 ml). Z każdej rzeki wyizolowano po

98 szczepów *E. coli*, u których najczęściej stwierdzano oporność na antybiotyki, które są jednymi z najchętniej zapisywanych pacjentom w Polsce, tj. ampicylinę, amoksycylinę z kwasem klawulanowym i tikarcylinę ( $\beta$ -laktamy). Z kolei aminoglikozydy – netilmycyna i tobramycyna wykazały się największą skutecznością w stosunku do szczepów izolowanych z Białki (1% opornych szczepów), a ciprofloksacyna (fluorochinolony) była najbardziej skuteczna na szczepy z Zakopianki (5.10% opornych). Udział szczepów produkujących ESBL był podobny w obydwu rzekach – 11,22% w Białce i 12,25% w Zakopiance. Stwierdzono liczną obecność szczepów wieloopornych (MDR) – aż 25,5% w rz. Zakopiance i 16,3% w Białce. Spośród genów kodujących enzymy ESBL najczęściej stwierdzanym był *blaTEM*, gdyż wystąpił u 45,4% wszystkich szczepów (42,9% z Białki i 47,9% z Zakopianki). Z kolei z pozostałych genów, wykryto jedynie *blaCTXM3* i *blaCTXM9* – u szczepu *E. coli*, który posiadał również *blaTEM* i został wyizolowany z punktu przy odpływie ścieków ze szpitala w Zakopanem.



## I-P 3

### ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA POPULACJI MIKROSymbiontów Koniczyny Białej NA OKOŁO 100-LETNIEJ HAŁDZIE Zn-Pb BOLESŁAW W POŁUDNIOWEJ POLSCE

Ewa Oleńska<sup>1</sup>, Wanda Małek<sup>2</sup><sup>1</sup>Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku<sup>2</sup>Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

chwelat@uwb.edu.pl

Metale ciężkie obecne w glebie w wysokich stężeniach mogą selekcyjne ograniczać zmienność genetyczną wewnątrz populacji organizmów żywych, w tym bakterii. Na terenie Polski, do obszarów o wyjątkowo wysokich stężeniach metali ciężkich, np. cynku (Zn), ołowiu (Pb) i kadmu (Cd) należą zwałowiska (hałdy), powstałe w wyniku eksploatacji rud cynku i ołowiu. Hałdy te są zlokalizowane w południowej Polsce, a jedną z nich jest „stara”, około 100-letnia hałda Bolesław. Hałda ta jest zasiedlona przez roślinność pochodzenia naturalnego, np. koniczynę białą. Koniczyna biała (*Trifolium repens*) jest roślinnym gospodarzem diazotroficznej bakterii symbiotycznej *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Celem pracy było określenie struktury genetycznej populacji mikrosymbiontów koniczyny białej, rosnącej na starej (70–100-letniej) hałdzie Zn-Pb Bolesław, w odniesieniu do populacji kontrolnej Bolestraszyce, na podstawie analizy sekwencji genu reduktazy dinitrogenazy *nifH* oraz genomotypowania przy użyciu markerów ERIC- i rep-PCR.

W 21 izolatach pochodzących z brodawek korzeniowych *T. repens*, rosnącej na stanowisku hałdowym oraz 21 izolatach pochodzących z brodawek roślin zasiedlających stanowisko kontrolne określono sekwencję fragmentów genu *nifH* o długości 684 pz oraz poziom polimorfizmu genomowego. Uzyskane wyniki opracowano przy użyciu programów komputerowych BioEdit, Chromas i MEGA4, Fenal, NTSys-PC i Arlequin 3.5. Analiza sekwencji genu *nifH* 42 badanych szczepów wykazała największe podobieństwo (95–100%) ze szczepami referencyjnymi *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, tworząc z nimi monofiletyczną grupę, o współczynniku poparcia (100%). Analizy genetyczne wykazały istotnie mniejszą zmienność genetyczną populacji hałdowej Bolesław w porównaniu do populacji kontrolnej Bolestraszyce oraz istotne zróżnicowanie genetyczne pomiędzy badanymi populacjami. Łączna analiza wzorów DNA metodami ERIC- i rep-PCR umożliwiła genomowe zróżnicowanie wszystkich badanych szczepów ryzobiowych.

## I-P 4

### WEWNĄTRZGATUNKOWE ZRÓŻNICOWANIE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* IZOLOWANYCH Z FERMENTOWANYCH PRODUKTÓW ROŚLINNYCH

Magdalena Polak-Berecka, Dominik Sz wajgier, Adam Waśko

Katedra Biotechnologii, Żywnienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

3mj@wp.pl

*Lactobacillus plantarum* to heterofermentacyjne bakterie kwasu mlekowego, szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Wykorzystywane są w przemyśle spożywczym do produkcji żywności funkcjonalnej, w szczególności fermentowanych produktów owocowo-warzywnych. *Lactobacillus plantarum* zaliczany jest również do bakterii wykazujących korzystny wpływ na organizm człowieka. Dzięki znaczeniu funkcjonalnemu w produkcji żywności i działaniu na zdrowie człowieka jest częstym podmiotem badań. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* wykazują względem siebie wysokie podobieństwo genotypowe, z tego powodu analizy fenotypowe mogą być nie wystarczające i w celu wykazania zróżnicowania pomiędzy izolatami konieczne jest wykorzystanie kilku technik biologii molekularnej.

Celem pracy było wykazanie zróżnicowania genetycznego pomiędzy 10 izolatami z rodzaju *Lactobacillus*, które we wcześniejszych badaniach, w oparciu o metody fenotypowe zostały zidentyfikowane jako *Lb. plantarum*.

W pracy wykorzystano następujące metody: RAPD (w oparciu o startery: M 12 ACGCGCCCT, M13 GAGGGTGGCGGT-TCT, M14 AGCAGCGTGG, OPM05 GGAAGGTGT), rep-PCR

(GTG)<sub>5</sub>, multipleks PCR na obecność genu *recA*, PCR-RFLP *in silico*, sekwencjonowanie produktów amplifikacji genu *recA* i 16S rRNA.

Badania wykazały zróżnicowanie genetyczne 10 izolatów, wśród nich potwierdzono przynależność 9 szczepów do gatunku *Lb. plantarum* oraz 1 szczepu do gatunku *Lb. pentosus*. Analiza zmienności genetycznej wykonana w oparciu o technikę rep-PCR i RAPD potwierdziła pokrewieństwo filogenetyczne gatunków *Lb. plantarum* i *Lb. pentosus* i wskazała na zróżnicowanie genetyczne w obrębie gatunku *Lb. plantarum*. Użycie bardziej selektywnych technik molekularnych tj. multipleks PCR na obecność genu *recA* i PCR-RFLP pozwoliło na określenie zmienności w obrębie gatunku *Lb. plantarum*. Analiza restrykcyjna umożliwiła wykrycie delekcji i inercji cytozyny u szczepu *Lb. plantarum* 1. Występowanie dużej zmienności w obrębie badanych szczepów *Lb. plantarum* potwierdziła również analiza sekwencji genu 16S rRNA.

Wykorzystane w pracy techniki molekularne okazały się skutecznym narzędziem różnicowania blisko spokrewnionych gatunków. Metody genotypowe stanowią nieodzowne uzupełnienie metod genotypowych w celu precyzyjnej identyfikacji bakterii z rodzaju *Lactobacillus*.

I-P 5

### CHARAKTERYSTYKA MATERIAŁU CELULOZOWEGO WYTWARZANEGO PRZEZ BAKTERIE *GLUCONACETOBACTER XYLINUS*

Agata Śliwińska, Paulina Dederko, Hanna Staroszczyk

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

agasiwi@student.pg.gda.pl

Bakteryjna celuloza (BC) jest nierozgałęzionym polimerem glukozy produkowanym przez niektóre szczepy bakterii. W porównaniu z celulozą roślinną, zanieczyszczoną ligninami i hemicelulozami, jest to polimer o dużej czystości, dużym stopniu polimeryzacji i dużej krystaliczności. Jest też zaliczany do nanomateriałów, ponieważ szerokość pojedynczej jego wstęgi mieści się w zakresie 30–100 nm. Materiały na bazie BC znalazły zastosowanie w takich gałęziach przemysłu jak akustyka, kosmetyka, ochrona środowiska, przemysł papierniczy i tekstylny, a także medycyna. Tradycyjnie wykorzystuje się ją też w produkcji żywności w krajach południowoschodniej Azji. Szerokie zastosowanie BC wynika z jej właściwości, które różnią się jednak, m.in. w zależności od produkujących ją szczepów bakterii.

Celem badań było określenie niektórych właściwości użytkowych oraz strukturalnych oryginalnej polskiej BC produkowanej przez wybrany szczep bakterii *Gluconacetobacter xylinus* subsp.

*xylinus* LOCK 89. Oznaczenie przepuszczalności wobec pary wodnej (WVP) przeprowadzono wg normy ASTM E 96-00, a właściwości mechanicznych wg normy ASTM D 882-00. Stopień krystaliczności obliczono wykorzystując obrazy dyfrakcyjne otrzymane metodą dyfraktometrii rentgenowskiej (XRD), temperaturę rozkładu wyznaczono metodą termogravimetryczną (TGA), a morfologię powierzchni BC zobrazowano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Wykazano, że otrzymana BC charakteryzuje się niskim WVP ( $0,055 \text{ g} \cdot \text{mm} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ), dużym napięciem przy zerwaniu (35,5 MPa) i małym wydłużeniem względnym przy zerwaniu (4,5%). BC ma duży stopień krystaliczności (86%) i wysoką temperaturę rozkładu (365°C). Na obrazie SEM powierzchni BC widoczne są pojedyncze włókna, tworzące jednorodną, nieregularną porowatą strukturę. Obraz SEM przekroju BC przedstawia jej trójwymiarową, dobrze zorganizowaną, warstwową strukturę.

I-P 6

### PROCES OTRZYMYWANIA BIOETANOLU PRZY UŻYCIU DROŻDŻY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* UZYSKANYCH METODĄ TASOWANIA GENOMOWEGO

Aleksandra Wawro<sup>1</sup>, Jolanta Batog<sup>1</sup>, Włodzimierz Grajek<sup>2</sup><sup>1</sup> Zakład Innowacyjnych Biomateriałów i Nanotechnologii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich<sup>2</sup> Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

aleksandra.wawro@iwnirz.pl

Bioetanol wytwarzany z surowców roślinnych stanowi odnawialne i czyste źródło energii, wykorzystywane jako paliwo, a także surowiec chemiczny, kosmetyczny i farmaceutyczny. Proces otrzymywania etanolu z biomasy lignocelulozowej składa się z obróbki wstępnej, hydrolizy enzymatycznej i procesu fermentacji etanolowej. W ramach projektu prowadzono prace nad optymalizacją konwersji biomasy sorgo do etanolu. Biomase roślinną rozdrobniono na młynie nożowym, poddano obróbce zasadowej (NaOH) i hydrolizie enzymem celulolitycznym Flashzyme 200. Skuteczność procesu hydrolizy potwierdzono testem fermentacyjnym przy użyciu drożdży gorzelniczych *Saccharomyces cerevisiae*. Następnie zwiększono efektywność procesu fermentacji etanolowej przez skonstruowanie metodą tasowania genomowego wydajnego szczepu drożdży *S. cerevisiae*, odpornego na wysoką temperaturę, stężenie kwasu octowego i podwyższone ciśnienie osmotyczne.

Tasowanie genomowe umożliwia uzyskanie szczepów łączących kilka korzystnych fenotypowo cech, pozwalając na jednoczesne zmiany genetyczne w różnych pozycjach w całym genomie, bez konieczności informacji o sekwencji genomu. W celu ulepszenia szczepów drożdży przeprowadzono mutagenizację chemiczną przy zastosowaniu mutagenu EMS. W efekcie uzyskano

190 mutantów, które poddano skriningowi w kierunku aktywności fermentacyjnej, odporności na kwas octowy (0,05–0,2% v/v) i na podwyższone ciśnienie osmotyczne (glukoza 400–500 g/l, NaCl 20–70 g/l). Wykonano trzy rundy tasowania genomowego obejmujące – protoplastyzację, fuzję protoplastów i regenerację powstałych szczepów, ostatecznie uzyskano 283 nowe szczepy. Po każdej z rund przeprowadzano skrining szczepów, łączących co najmniej dwie wyróżniające się cechy fenotypowe. Ponownie przebadano aktywność fermentacyjną, odporność na kwas octowy, podwyższone ciśnienie osmotyczne i wysoką temperaturę (do 39°C). Analiza polimorfizmu genomowego DNA z zastosowaniem starterów RAPD oraz ISSR pozwoliła na stwierdzenie, że zmiany w obrębie genomu widoczne były tylko w przypadku dwóch szczepów. Zdolności fermentacyjne tych szczepów sprawdzono podczas procesu fermentacji w warunkach stresu termicznego, kwasowego i osmotycznego. Wykazano, że ulepszony genetycznie szczep drożdży gorzelniczych *S. cerevisiae* uzyskał o 40% wyższe stężenie etanolu niż szczep drożdży nie poddany modyfikacji.

Praca wykonana w ramach projektu PBS1/A8/9/2012, finansowanego przez NCBiR.

## I-P 7

## HODOWLA BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ W PODŁOŻACH NA BAZIE KOMOSY RYŻOWEJ

Alina Pacesz<sup>1</sup>, Katarzyna Śliżewska<sup>2</sup>, Anna Sip<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

<sup>2</sup>Politechnika Łódzka, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

Apacesz@up.poznan.pl

Komosa ryżowa (*Chenopodium quinoa*) jest pseudozbożem pochodzącym z Ameryki Południowej. Skład komosy czyni tę rośliną obiecującym składnikiem podłoża do hodowli mikroorganizmów o wysokich wymaganiach pokarmowych. Do ich grona należą m.in. probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej. W pracy postanowiono ocenić przydatność komosy ryżowej jako bazy do opracowania podłoża do hodowli probiotycznych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. W ramach badań wstępnych oznaczono zawartość suchej masy, azotu ogólnego, białek rozpuszczalnych w wodzie, monosacharydów oraz skrobi w ziarnach i zielonych częściach (łodygach i liściach) komosy ryżowej oraz oznaczono stopień ich zanieczyszczenia mikrobiologicznego. Następnie przeprowadzono wstępną fermentację ziaren komosy nieoczyszczonej, ziaren komosy pozbawionej saponin oraz zielonych części (łodyg i liści) komosy. W razie potrzeby dodatkowo poddawano je hydrolizie enzymatycznej. W zależności od wymagań pokarmowych badanych szczepów *Lactobacillus* podłoża z komosy suplementowano dodatkowymi źródłami węgla oraz buforowano. W trakcie hodowli oznaczano liczebność komórek, aktywność fermentacyjną oraz

przeciwdrobnoustrojową. Otrzymane hodowle suszono rozpyłowo w emulsjach stabilizowanych odtłuszczonym mlekiem w proszku. W trakcie suszenia oznaczano przeżywalność szczepów. Badano także jakość utrwalonych preparatów oraz monitorowano ich stabilność w trakcie długoterminowego przechowywania. Ustalono, że komosa ryżowa jest dobrym surowcem do opracowywania nowych podłoży do hodowli probiotycznych szczepów *Lactobacillus*. W podłożach z komosy ryżowej szczepy *Lactobacillus* namnażały się do poziomu porównywalnego do otrzymywanego w stosowanych do tej pory pożywkach płynnych. Hodowle w zbilansowanych pożywkach z komosy były jednocześnie dobrym punktem wyjścia do otrzymywania utrwalonych metodą suszenia rozpyłowego preparatów probiotycznych o korzystnych cechach jakościowych.

Praca wykonana w ramach projektu nr PBS3/A8/32/2015 „Preparat synbiotyczny do profilaktyki zdrowotnej zwierząt monogastrycznych i zapobiegania wystąpienia chorób bakteryjnych i zatruc pokarmowych wywołanych toksynami oraz poprawiającego bezpieczeństwo żywienia i wydajność chowu zwierząt”.

## I-P 8

## INDUKCJA SYNTEZY WIELOMIEDZIOWYCH OKSYDAZ *MYROTHECIUM RORIDUM* W WARUNKACH STRESU OKSYDACYJNEGO WYWOŁANEGO MIEDZIĄ

Anna Jasińska<sup>1</sup>, Małgorzata Kędziora<sup>2</sup>, Monika Jeżewicz<sup>2</sup>, Jerzy Długoński<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

<sup>2</sup>Studenckie Koło Naukowe Biotechnologiczno-Mikrobiologiczne „SKN Bio-Mik”, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

anna.jasinska@biol.uni.lodz.pl

Wielomiedziowe oksydazy (ang. *multicopper oxidases*, MCOs) to enzymy pośredniczące w utlenianiu szerokiego spektrum związków organicznych i nieorganicznych przy jednoczesnej redukcji tlenu cząsteczkowego do wody. Z uwagi na różnorodność reakcji katalizowanych przez MCOs oraz bardzo niską specyficzność substratową tych enzymów możliwe jest ich wykorzystanie w wielu gałęziach przemysłu, medycynie i ochronie środowiska. Spośród wielomiedziowych oksydaz najszerzej zbadane zostały dotąd lakazy, szczególnie te produkowane przez grzyby. Lakazy grzybowe to najczęściej enzymy konstytutywne, stale wytwarzane przez komórki na pewnym, podstawowym poziomie. Jednak poprzez zastosowanie odpowiednich warunków hodowli, a także dodatek induktorów możliwa jest ich nadprodukcja. Regulacja biosyntezy lakaz z wykorzystaniem jonów miedzi, jest szeroko rozpowszechniona. Dowiedziono, że miedź odgrywa ważną rolę zarówno w indukcji ekspresji genów kodujących lakazę, jak i ich regulacji na poziomie transkrypcji i translacji. Ale prawdopodobnie pełni rów-

niez funkcję ochronną, zmniejszając efekty stresu oksydacyjnego wywołanego przez rodniki tlenowe powstające na skutek działania jonów miedzi. W pracy zbadano wpływ jonów miedzi na wzrost, ekspresję zewnątrzkomórkowych białek oraz produkcję MCOs mikroskopowego grzyba *Myrothecium roridum*. Stwierdzono, że miedź wywołując stres oksydacyjny inicjuje produkcję badanych enzymów. Największą aktywność MCOs (ocenioną z wykorzystaniem jako substratu ABTS) zaobserwowano w obecności 1000 μM siarczanu miedzi. Jednocześnie stwierdzono, że wzmożona synteza enzymów była poprzedzona pojawieniem się w grzybni warunków stresu oksydacyjnego (obecność anionorodnika ponadtlenkowego, synteza enzymów antyoksydacyjnych, w tym dysmutazy ponadtlenkowej). Uzyskane wyniki mogą wskazywać na potencjalne znaczenie antyoksydacyjne badanych enzymów *M. roridum*.

Projekt finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki w Krakowie przyznanych na podstawie decyzji nr DEC 2013/11/D/NZ9/02776.

I-P 9

## EFEKT APLIKACJI BRADYRIZOBIOWYCH CZYNNIKÓW NOD NA WYDAJNOŚĆ SYMBIOTYCZNĄ ŁUBINU WĄSKOLISTNEGO

Dominika Kidaj, Jerzy Wielbo, Dominika Adamowicz, Anna Skorupska

Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie

dominika.maj@poczta.umcs.lublin.pl

Łubin to roślina bobowata o dużym znaczeniu w produkcji białka roślinnego w Polsce. Uprawy tej rośliny są prawie samowystarczalne pod względem zapotrzebowania na związki azotu. Jest to możliwe dzięki symbiozie z bakteriami z rodzaju *Bradyrhizobium*. Interakcja łubinu – bradyrizobiainicjowana jest przez specyficzne wydzielane przez korzenie łubinu flawonoidy, indukujące syntezę bakteryjnego czynnika Nod (lipochitooligosacharydu). Bakteryjny czynnik Nod jest silnym mitogenem, który aktywuje syntezę białek roślinnych, tzw. nodulin, będących czynnikiem wywołującym podziały komórek kory korzenia i tworzenie nici infekcyjnych wprowadzających rizobia do brodawek korzeniowych. Wewnątrz brodawki bakterie przekształcają się w bakteroidy z aktywną nitrogenazą redukującą  $N_2$ . Wytworzone przez bakteroidy związki azotowe wspomagają wzrost rośliny-gospodarza.

Eksperyment obejmował dwa szklarniowe, wazonowe doświadczenia roślinne. W pierwszym, nasiona łubinu traktowano czynnikami Nod izolowanymi z *B. japonicum* 113, 331 i 344 w rozcieńczeniu  $10^{-3}$ – $10^{-6}$ . Następnie rośliny zakażano zawiesinami komórek wyżej wymienionych szczepów *Bradyrhizobium*. Rośliny hodowano przez 7 tygodni w podłożu będącym mieszaniną jałowego piachu i perlitu (1:1 v/v). W drugim doświadczeniu, nasiona łubinu traktowano jak w eksperymencie pierwszym, ale rośliny

hodowano w wazonach wypełnionych mieszaniną piasku i niejałowionej gleby (1:1 v/v).

Optymalne rozcieńczenie czynników Nod, promujące wzrost i brodawkowanie łubinu w warunkach szklarniowych, różniło się w zależności od szczepu *Bradyrhizobium* stanowiącego inokulum i mieściło w zakresie  $10^{-3}$ – $10^{-6}$ . Najwyższą aktywność symbiotyczną w odpowiedzi na zaaplikowane czynniki Nod wykazał szczep Bj. 344 w doświadczeniu pierwszym (bez udziału bakterii autochtonicznych). Po 7 tyg. świeża masa pędów wzrosła o około 70%, a liczba brodawek o około 100% w stosunku do roślin zakażonych Bj. 344 i nietraktowanych czynnikami Nod. Z kolei w obecności licznych bakterii autochtonicznych (doświadczenie drugie) wykazano pozytywny skutek działania czynników Nod wszystkich trzech szczepów *Bradyrhizobium*, ale otrzymane wartości świeżej i suchej masy pędów łubinu nie były istotne statystycznie. Podsumowując, efekt aplikacji czynników Nod na nasiona łubinu zależy od rodzaju szczepu będącego ich producentem oraz ilości i składu gatunkowego mikroflory autochtonicznej podłoża, na którym prowadzona jest uprawa.

Badania finansowane ze środków NCBiR, projekt: PBS3/A8/28/2015.

I-P 10

## WPŁYW SUPLEMENTACJI PODŁOŻA HODOWLANEGO PREKURSOREM ORAZ ELICYTORAMINA ZWIĘKSZENIE AKUMULACJI WYBRANYCH METABOLITÓW WTÓRNYCH W WYTRZĄSANYCH KULTURACH PĘDOWYCH *VITEX AGNUS CASTUS*

Ewa Skrzypczak-Pietraszek, Zahira Rebollo Delgado

Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

ewa.skrzypczak-pietraszek@uj.edu.pl

*Vitex agnus castus* L. (Lamiaceae) jest rośliną leczniczą. Surowcem farmakopialnym jest owoc, *Fructus Agni casti* (FP X), stosowany m.in. w terapii różnych schorzeń ginekologicznych. Prócz owoców niepokalanka również jego liście są stosowane w lecznictwie. Kultury roślinne mogą być alternatywnym w stosunku do roślin gruntowych źródłem metabolitów wtórnych. Są różne metody zwiększania akumulacji związków czynnych w kulturach *in vitro*, m.in. dodanie prekursora lub elicytora do podłoża hodowlanego. Celem pracy było zbadanie wpływu dodatku prekursora (*L*-fenyloalaniny) i elicytora (jasmonianu metylu lub etefonu) na akumulację kwasów fenolowych, flawonoidów i aukubiny (irydoid) w wytrząsanych kulturach pędowych ww. gatunku.

Hodowla była prowadzona w kolbach stożkowych przez 3 tygodnie na pożywce MS z dodatkiem: benzyloaminopuryny (BAP) – 1 mg/l, kwasu naftalenoocetowego (NAA) – 0,5 mg/l i kwasu giberelinowego ( $GA_3$ ) – 0,25 mg/l. Następnie do kolb dodawano roztwór *L*-fenyloalaniny (2,4 g/l) oraz roztwór elicytora (50  $\mu$ M).

Biomasa była zbierana po 1 lub 7 dniach od momentu dodania prekursora i elicytora. Przeprowadzono jakościową i ilościową analizę HPLC metabolitów (ogółem 21 związków) w metanowych wyciągach z biomasy z kultur oraz liści roślin macierzystych. Stwierdzono, że zastosowanie *L*-fenyloalaniny oraz elicytorów silnie zwiększa akumulację metabolitów wtórnych w biomacie z kultur *in vitro*, ponadto związki występują w ilościach znacznie większych niż w liściach rośliny macierzystej. W kulturach *V. agnus castus* zawartość wszystkich wolnych kwasów fenolowych zwiększyła się maksymalnie około 2,2-krotnie (wynosząc ok. 1,4%) i była ok. 8-krotnie wyższa niż w liściach rośliny macierzystej. Zawartość flawonoidów zwiększyła się maksymalnie odpowiednio 2,1-krotnie (wynosząc ok. 1,1%) i była ok. 7-krotnie wyższa niż w liściach rośliny macierzystej. Kultury *in vitro* *V. agnus castus* po optymalizacji mogą mieć potencjalne zastosowanie jako biotechnologiczne źródło pozyskiwania wybranych metabolitów wtórnych.



## I-P 11

**BIOTRANSFORMACJE PREKURSORÓW ZWIĄZKÓW ZAPACHOWYCH  
NA PODŁOŻU STAŁYM**

Ewa Szczepańska, Filip Boratyński, Teresa Olejniczak

Katedra Chemii, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

ewa.szczepanska@upwr.edu.pl

Hodowla na podłożu stałym (ang. Solid State Fermentation, SSF) jest jednym z systemów hodowli mikrobiologicznych. Głównym założeniem tego procesu jest wykorzystanie stałego surowca jako podłoża dla bakterii, grzybów i drożdży. Surowiec ten mogą stanowić między innymi odpady i produkty uboczne przemysłu rolno-spożywczego. Charakteryzują się one bogactwem związków odżywczych, takich jak węglowodany, białka, tłuszcze i sole mineralne.

Na szczególną uwagę zasługuje produkt uboczny powstający w wyniku procesu wytłaczania oleju z nasion oleistych, jakim jest makuch. Może on stanowić aż 75% masy nasion. Ze względu na cenny skład podejmowane są próby zastosowania tego surowca jako podłoża do hodowli drobnoustrojów. Do komponentów

makuchów zaliczają się związki fenolowe i kwasy tłuszczowe stanowiące prekursorzy związków zapachowych istotnych dla sektora spożywczego – waniliny i jej pochodnych oraz laktonów.

Celem badań było innowacyjne zagospodarowanie makucha lnianego jako podłoża dla mikroorganizmów zdolnych do biosyntezy związków zapachowych z ich prekursorów. W tym celu przeprowadzono skrining drobnoustrojów metodą hodowli węgłnej. Badania kontynuowano poprzez przeniesienie procesu na hodowlę typu SSF z wybranymi mikroorganizmami. Produkcja użytecznych w przemyśle związków uzyskanych metodą biotransformacji, oparta o mikrobiologiczną degradację odpadów przemysłu rolno-spożywczego może stanowić doskonałe rozwiązanie dla efektywnego i jednocześnie ekonomicznie opłacalnego procesu.

## I-P 12

**CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH BAKTERIOFAGÓW  
WYZIOLOWANYCH ZE ŚCIEKÓW KOMUNALNYCH**Gracja Topka<sup>1</sup>, Sylwia Bloch<sup>1</sup>, Bożena Nejman-Faleńczyk<sup>1</sup>, Agata Jurczak-Kurek,  
Aleksandra Dydecka<sup>1</sup>, Agnieszka Necel<sup>1</sup>, Tomasz Gąsior<sup>2</sup>,  
Grzegorz Węgrzyn<sup>1</sup>, Alicja Węgrzyn<sup>2</sup><sup>1</sup>Wydział Biologii, Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański<sup>2</sup>Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

gracja.topka@phdstud.ug.edu.pl

Bakteriofagi, czyli wirusy infekujące komórki prokariotyczne należą do najliczniejszych form występujących na Ziemi. Zostały odkryte ponad 100 lat temu i od tego czasu odegrały ogromną rolę w rozwoju biologii molekularnej i biotechnologii. Wirusy te charakteryzują się ogromną różnorodnością, mimo to wiedza o większości z nich jest znikoma. W badaniach z zakresu biologii molekularnej oraz biotechnologii skupiano się na niewielkiej liczbie bakteriofagów, co oczywiście miało swoje uzasadnienie z racji wyboru organizmów modelowych, ale z drugiej strony nie ukazywało bogactwa różnorodności bakteriofagów występujących na Ziemi.

W ramach badań wstępnych, wyizolowanych zostało ze ścieków komunalnych ponad 80 nieznanych wcześniej bakteriofagów zakażających różne gatunki bakterii, m.in. *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*. Bakteriofagi te zostały scharakteryzowane przez nas pod względem różnych cech fenotypowych jak morfologia wirionu, morfologia tworzonych lysinek a także pod względem wrażli-

wości na szereg czynników zewnętrznych. Na podstawie otrzymanych wyników wybraliśmy kilka bakteriofagów, charakteryzujących się najciekawszymi fenotypami, których genomy poddaliśmy sekwencjonowaniu.

Analiza morfologiczna i fizjologiczna badanych bakteriofagów wskazuje na dużą różnorodność biologiczną wśród fagów występujących w jednym siedlisku. Wykonując szereg doświadczeń, mających na celu zbadanie rozwoju analizowanych bakteriofagów, zaobserwowałam m.in., iż jednego z nich – faga vB-EcoS-95 cechuje niezwykle szybki cykl rozwojowy (okres latencji wynosi 7,5 minuty), co czyni go potencjalnie interesującym m.in. w kontekście zastosowań biotechnologicznych. Niektóre inne cechy badanych bakteriofagów, takie jak zdolność do tworzenia lysinek w niskiej temperaturze, odporność na rozpuszczalniki organiczne np. Aceton, DMSO, czy odporność na detergenty również wskazują, iż bakteriofagi te mogłyby mieć potencjalne zastosowanie w przemyśle biotechnologicznym.

## OCENA ZANIECZYSZCZENIA MIKROBIOLOGICZNEGO POWIETRZA W WYBRANYCH MIEJSCOWOŚCIACH TURYSTYCZNYCH I UZDROWISKOWYCH W WOJEWÓDZTWIE MAŁOPOLSKIM

Anna Lenart-Boroń<sup>1</sup>, Justyna Chrobak<sup>2</sup>, Dagmara Drab<sup>2</sup>, Iwona Hryniewicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Mikrobiologii, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

<sup>2</sup>Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

*a.lenart-boron@ur.krakow.pl*

Zbadano zanieczyszczenie mikrobiologiczne powietrza w miejscowościach turystycznych i uzdrowiskowych na terenie województwa małopolskiego: Białce Tatrzańskiej i jej okolicach, Krynicy-Zdrój i Rabce. Badania stężenia aerozolu mikrobiologicznego (liczba bakterii heterotroficznych, pleśni, promieniowców i gronkoców) i pyłu zawieszonego (PM10, PM4, PM2,5 i PM1) przeprowadzono w 17 punktach czterokrotnie w ciągu roku. Stężenie bioaerozolu badano metodą zderzeniową przy użyciu aerokopu MAS-100, pomiary pyłu zawieszonego przeprowadzono pyłomierzem DustTrak. Najwyższe średnie stężenie bakterii, grzybów i promieniowców obserwowano w punktach zlokalizowanych w Rabce (odpowiednio 440 jtk/m<sup>3</sup> – Leśniczówka; 1370 jtk/m<sup>3</sup> – Leśniczówka i 376 jtk/m<sup>3</sup> Rabkoland), najwięcej gronkoców odnotowano w centrum Białki Tatrzańskiej (140 jtk/m<sup>3</sup>). Najmniejszą liczebność wszystkich drobnoustrojów odnotowano w Krynicy-Zdrój (12 jtk/m<sup>3</sup> Góra Parkowa, 360 jtk/m<sup>3</sup> Pijalnia Główna, 2 jtk/m<sup>3</sup> Pijalnia Główna oraz 10 jtk/m<sup>3</sup> Dworzec PKP i Jaworzyna Krynicka – odpowiednio dla bakterii, pleśni, gronkoców oraz promieniowców). Zaobserwowano zróżnicowanie sezonowe stężenia bioaerozolu w badanych miejscowościach. W Krynicy Zdrój najwyższe stężenia bakterii heterotroficznych i gronkoców wystąpiły jesienią, latem zaś – grzybów i promie-

niowców; w Białce Tatrzańskiej największe stężenie bioaerozolu obserwowano wiosną, w Rabce – latem. We wszystkich badanych miejscowościach zarówno latem jak i wiosną wysoka temperatura (powyżej 20°C) i brak opadów atmosferycznych sprzyjały wysokiemu stężeniu mikroorganizmów w powietrzu. Natomiast najmniejsze stężenia wszystkich mikroorganizmów w Białce i w Rabce stwierdzono zimą, gdy temperatura oscylowała wokół 0 do +3°C, padał deszcz ze śniegiem i występował silny wiatr. Zarówno w Rabce jak i w Białce Tatrzańskiej stężenie pyłu zawieszonego PM2,5 i PM10 jedynie dwukrotnie (zimą w Klikuszowej oraz przy kasach Ośrodka Narciarskiego Kotelnica Białczańska) nie przekraczało poziomów dopuszczalnych, wynoszących odpowiednio 25 i 50 µg/m<sup>3</sup>. Poziom informowania został przekroczony jednokrotnie (wiosna – Rynek w Nowym Targu), a poziom alarmowy – dwukrotnie (zima – dworzec autobusowy i oczyszczalnia ścieków w Nowym Targu). W badaniach nie stwierdzono istotnej statystycznej zależności pomiędzy stężeniem pyłu zawieszonego w powietrzu badanych miejscowości a liczebnością drobnoustrojów tworzących bioaerozol. Obserwowana liczba drobnoustrojów nie daje podstaw aby stwierdzić iż zanieczyszczenie mikrobiologiczne powietrza stanowi zagrożenie dla mieszkańców badanych miejscowości, czy turystów bądź kuracjuszy tam przebywających.

## ODPOWIEDŹ BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ (LAB) NA CZYNNIKI STRESOGENNE W PROCESACH UTRWALANIA SOKÓW I NAPOJÓW

Joanna Bucka-Kolendo, Barbara Sokołowska

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie,  
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych

*joannabucka@wp.pl*

Odowiedź LAB na stres została dobrze poznana w odniesieniu do takich czynników jak: szok termiczny, kwasy żółciowe, stres oksydacyjny, niskie pH i etanol. Bakteryjna odpowiedź na stres opiera się na skoordynowanej ekspresji genów, które wpływają na różne procesy komórkowe.

Celem pracy było określenie zależności pomiędzy zdolnością przetrwania LAB w warunkach stresogennych, a obecnością mechanizmów regulatorowych odpowiedzi na te czynniki.

Do badań wybrano 9 szczepów LAB wyizolowanych z soków i napojów. Hodowle LAB pochodzące z logarytmicznej fazy wzrostu ( $OD_{600} = 0,6$ ) poddano działaniu warunków stresowych – temperatury (50°C/15') i wysokiego ciśnienia. Liczbę LAB przed i po działaniu czynników stresogennych oznaczano metodą płytkową na pożywce MRS agar, oraz obserwowano szybkość ich wzrostu w hodowlach płynnych.

Z badanych szczepów wyizolowano genomowe DNA i przeprowadzono reakcje PCR w celu zidentyfikowania obecności 10 genów

związanych z odpowiedzią na stres (ctsR, hrcA, clpL, clpP, clpX, ccpA, dnaK, ftsH i groEL, groES). Otrzymane amplicony zostały poddane analizie restrykcyjnej przy użyciu enzymu *Sau3A*.

W hodowlach LAB poddanych działaniu czynników stresogennych zaobserwowano spadek szybkości wzrostu ( $OD_{600}$  po 20 h inkubacji 4,18–4,90), w porównaniu do hodowli nie poddanych stresowi ( $OD_{600} = 7,03$ –8,84).

Dwa szczepy *Lactobacillus plantarum* wykazały obecność ampliconów dla genów groELS, dnaK i ctsR, oraz jeden z nich dodatkowo dla hrcA, ftsH i clpX.

Nie zaobserwowano ścisłej korelacji pomiędzy obniżoną szybkością wzrostu LAB po działaniu czynników stresowych, a obecnością genów odpowiedzi na stres. Otrzymane wstępne wyniki potwierdzają doniesienia innych autorów, że LAB nie mają jednego specyficznego systemu odpowiedzi na stres.

Prowadzone są dalsze badania nad funkcjami szlaków odpowiedzi na stres u LAB.

## I-P 15

**BAFADOR® – PREPARAT BAKTERIOFAGOWY DLA AKWAKULTURY**

Joanna Kołsut<sup>1</sup>, Justyna Kowalska<sup>1</sup>, Małgorzata Stańczyk<sup>1</sup>, Patrycja Schulz<sup>2</sup>,  
Jarosław Dastyk<sup>1</sup>, Andrzej K. Siwicki<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Proteon Pharmaceuticals SA, Łódź

<sup>2</sup> Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej

[jkolsut@proteonpharma.com](mailto:jkolsut@proteonpharma.com)

Akwakultura jest najszybciej rozwijającym się sektorem produkcji żywności na świecie. Jednym z istotnych czynników obniżających jego efektywność jest rozwój chorób zakaźnych, których głównym czynnikiem etiologicznym są bakterie *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Edwardsiella*, *Streptococcus*, *Lactococcus* i *Renibacterium*. W leczeniu zakażeń stosowane są antybiotyki, ale ze względu na wzrastającą antybiotykooporność należy rozważyć inne rozwiązania, aby chronić ryby przed patogenami i zminimalizować negatywne oddziaływanie intensywnej hodowli na środowisko. Alternatywą dla antybiotyków mogą być bakteriofagi. Największą przewagą terapii fagowej nad stosowanymi powszechnie antybiotykami stanowią: specyficzne działanie jedynie przeciwko bakteriom chorobotwórczym, brak chemicznych pozostałości stosowanej substancji czynnej w tkankach oraz brak skutków ubocznych.

W Proteon Pharmaceuticals SA opracowano preparat bakteriofagowy BAFADOR® zawierający 5 bakteriofagów przeciwko *Aeromonas* spp. (60AhydR15PP, 62AhydR11PP, 13AhydR10PP, 14AhydR10PP, 85AhydR10PP) i 3 przeciwko *Pseudomonas* sp. (22PfluR64PP, 67PfluR64PP, 71PfluR64PP). Bakteriofagi izolowano z wody ściekowej i charakteryzowano poprzez RFLP, sekwencjonowanie, badanie spektrum swoistości i aktywności litycznej.

BAFADOR® wykazał znaczące efekty lecznicze podczas badań eksperymentalnego zakażenia karpia bakterią *Pseudomonas* sp., zmniejszając śmiertelność ryb o 73%. Głównym celem prezentowanego badania było określenie wpływu BAFADOR® na niektóre parametry hematologiczne, biochemiczne i immunologiczne we krwi karpia, pstrąga tęczowego i suma. BAFADOR® podawano drogą immersji. Analizę wybranych parametrów przeprowadzono przed podaniem produktu oraz w 1, 2 i 3 dniu po podaniu.

Uzyskane wyniki wskazują, że BAFADOR® nie ma wpływu na parametry hematologiczne (RBC, Ht, Hb, MCH i MCHC) ani biochemiczne (AST, ALT i glukozy) u ryb. Ponadto nie zaobserwowano statystycznej różnicy w poziomie hormonu stresu-kortyzolu. Jednocześnie zaobserwowano znaczące zwiększenie poziomu markerów niespecyficznego odporności komórkowej (aktywność metaboliczna, aktywność fagocytów, proliferacja limfocytów stymulowanych przez ConA i LPS) i odporności humoralnej (aktywność lizozymu i ceruloplazminy, całkowite stężenie białek i immunoglobuliny).

Wyniki sugerują, że BAFADOR® oprócz bezpośredniego działania na bakterie może pośrednio lub bezpośrednio stymulować nieswoistą odpowiedź immunologiczną u ryb, zwiększając ich odporność na zakażenie.

## I-P 16

**EFEKTYWNOŚĆ OBRÓBKI CHEMICZNEJ I ENZYMATYCZNEJ W PROCESIE OTRZYMYWANIA BIOETANOLU**

Jolanta Batog, Aleksandra Wawro

Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Poznań

[jolanta.batog@iwnirz.pl](mailto:jolanta.batog@iwnirz.pl)

Biomasa lignocelulozowa jest odnawialnym surowcem wzbudzającym duże zainteresowanie w kontekście zrównoważonej produkcji paliw, materiałów i substancji chemicznych. Obecnie jednym z surowców do produkcji biopaliw może być sorgo, roślina posiadająca wartość spalania 15 MJ/kg i plon suchej masy 28 t/ha. Produkcja bioetanolu z surowców roślinnych wymaga rozłożenia ścian komórkowych na poszczególne polimery oraz hydrolizy węglowodanów do cukrów prostych składających się z kolejnych etapów – obróbka wstępna (fizyczna, chemiczna, biologiczna), hydroliza enzymatyczna i fermentacja etanolowa.

Biomasa roślinna charakteryzuje się złożonym składem chemicznym, ponieważ w jej strukturze znajduje się kompleks lignocelulozy, który stosunkowo opornie podlega biodegradacji. Skuteczną przeszkodę w wytwarzaniu etanolu z biomasy stanowi lignina, złożona z pochodnych alkoholi fenolowych, która utrudnia dostęp celulazy do mikrofibrilli krystalicznej celulozy, a także wiąże celulazy i prowadzi do ich dezaktywacji. Wymusza to konieczność stosowania obróbki wstępnej, której zadaniem jest rozdrobnienie fazy stałej oraz rozluźnienie zwartej struktury lignocelulozy. W pracy dokonano oceny wpływu obróbki kwasowej (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i zasadowej (NaOH) na zawartość cukrów redukujących (metoda

Millera) uwolnionych w teście enzymatycznym przy użyciu preparatu Celluclast 1.5 L, a także oznaczono skład chemiczny (celuloza, hemicelulozy, lignina) we frakcji stałej biomasy sorgo przed i po obróbce chemicznej. Analiza widm FTIR i składu chemicznego wykazała, że obróbka kwasowa polega głównie na delignifikacji, podczas gdy obróbka kwasowa rozpuszcza większość hemiceluloz.

Kolejnym etapem konwersji biomasy do bioetanolu jest proces hydrolizy enzymatycznej decydujący o ilości cukrów prostych, które mogą być metabolizowane przez drożdże w procesie fermentacji etanolowej. Na podstawie ilości uwolnionej glukozy (HPLC) wg metody płaszczyzny odpowiedzi określono warunki hydrolizy frakcji celulozowej – stężenie substratu 10%, dawka preparatu Flashzyme Plus 200–30 FPU/g, a także parametry procesu (temp. 50°C, odczyn 4,2, czas 72 h). Suplementacja preparatu Flashzyme Plus 200 enzymami β-glukozydazą i ksyłanazą nie spowodowała wzrostu zawartości uwolnionych cukrów redukujących.

Biomasa lignocelulozowa jako alternatywne źródło energii wzmocni bezpieczeństwo energetyczne, a także pozytywnie wpłynie na redukcję emisji gazów cieplarnianych i stabilność cen paliw.

Praca wykonana w ramach projektu PBS1/A8/9/2012, finansowanego przez NCBiR.

I-P 17

### GENETYCZNE I FIZJOLOGICZNE ASPEKTY STOSOWANIA NANOSREBRA W KULTURACH *IN VITRO*. WPŁYW NANOCZĄSTEK NA CYKL KOMÓRKOWY I SYNTEZĘ DNA WYBRANYCH ROŚLIN ROLNICZYCH

Karol Bocian, Elwira Śliwińska, Magdalena Tomaszewska-Sowa, Agnieszka Łojko

Zakład Biologii Molekularnej i Cytometrii,  
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy

karol.bocian@utp.edu.pl

Z punktu widzenia biotechnologii nanocząstki srebra wydają się szczególnie przydatne w kulturach tkankowych i komórkowych roślin. Biologiczne właściwości nanosrebra, takie jak silne działanie bakterio- oraz grzybobójcze, znalazło praktyczne zastosowanie w eliminacji kontaminacji bakteryjnych i grzybowych w kulturach *in vitro*. Jak wykazały wcześniejsze badania, nanosrebro z powodzeniem może być wykorzystywane do utrzymania sterylności kultur tkankowych (Bocian i in. 2016). Jednakże w literaturze pojawiły się przesłanki, że w podwyższonych stężeniach może ono również niekorzystnie wpływać na rośliny, stymulując lub hamując procesy wzrostu i rozwoju korzeni oraz oddziałując na cykl komórkowy. Ponieważ kultury *in vitro* odgrywają coraz większą rolę w pracach hodowlanych gatunków uprawnych, a stosowanie nanocząstek jest łatwiejsze i bardziej ekonomiczne od standardowej metody sterylizacji, ważne jest, aby zoptymalizować warunki ich stosowania dla ważnych gospodarczo gatunków roślin.

Przedmiotem projektu było zbadanie wpływu nanocząstek srebra, dodawanych w różnych stężeniach do pożywki, na aktywność syntezy i zawartość jądrowego DNA, które determinują procesy wzrostu i rozwoju roślin. W projekcie wykorzystano cytometrię

przepływową do zbadania wpływu nanocząstek srebra (w stężeniu 50, 75 i 100 ppm) na cykl komórkowy/endoreduplikację rzepaku jarego (*Brassica napus* L.), buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*), gorczyicy białej (*Sinapis alba*) i koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense* L.).

Analiza morfologiczna roślin wykazała, że obecność nanocząstek w podłożu powoduje zwiększenie długości korzeni wszystkich przebadanych gatunków roślin. Oznacza to, że nanosrebro może wpływać na podziały komórkowe i proces endoreduplikacji, co potwierdziła analiza cytometryczna. Efektem obecności nanocząstek srebra w pożywce jest wzrost udziału jąder o wyższej ploidalności. We wszystkich przypadkach zaobserwowano wzrost średniej ploidalności wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek srebra. Tendencja ta najwyraźniej była widoczna w przypadku korzeni, prawdopodobnie dlatego, że organy te, będąc w bezpośrednim kontakcie z podłożem, są najbardziej narażone na oddziaływanie nanocząstek.

Bocian K., Malczyk P., Tomaszewska-Sowa M., Wojewódzki P., P.406575 pt.: „Sposób powierzchniowego wyjalawiania nasion z wykorzystaniem metalicznych cząstek srebra i miedzi w suspensji wodnej”.

I-P 18

### WPŁYW BENZOTIAZOLU I BENZOTRIAZOLU NA BIORÓŻNORODNOŚĆ BIOCENOZY BAKTERYJNEJ OSADU CZYNNEGO W BIOREAKTORZE MEMBRANOWYM

Katarzyna Kowalska<sup>1,2</sup>, Ewa Felis<sup>1,2</sup>, Anna Węgrzyn<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Politechnika Śląska

<sup>2</sup> Centrum Biotechnologii, Politechnika Śląska

katarzyna.kowalska@polsl.pl

Obecnie narastającym problemem są związki, które nie są wymieniane w przepisach dotyczących jakości oczyszczonych ścieków, co przekłada się na ograniczone możliwości monitoringu stężenia tych substancji w środowisku, bądź też jego brak. Do takich związków należą m.in. heterocykliczne związki aromatyczne: benzotiazol (BT) i benzotriazol (BTA). Substancje te mogą negatywnie wpływać na mikroorganizmy, powodując m.in. zahamowanie ich aktywności oddechowej lub inhibicję wybranych enzymów. Celem niniejszej pracy była ocena wpływu BT i BTA na biocenozę bakteryjną osadu czynnego w bioreaktorach membranowych oczyszczających syntetyczne ścieki bytowo-gospodarcze zawierające badane związki w stężeniu 10 mg/l. Badania oparto na zastosowaniu techniki PCR-DGGE, wyznaczeniu zmian wskaźnika Shannona-Wienera (*H'*) oraz analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Statistica 12.0.

W reaktorze kontrolnym (MBR 1) i roboczym, do którego dozowano BTA (MBR 3), dochodziło do przebudowy biocenozy bakteryjnej. W przypadku MBR 1 związane to było z długotrwa-

łym zasilaniem osadu czynnego pożywką syntetyczną, natomiast w przypadku MBR 3 poza ww. czynnikami, na jej bioróżnorodność wpływały prawdopodobnie metabolity BTA, które działały niekorzystnie na mikroorganizmy osadu czynnego i powodowały przebudowę biocenozy w wyniku procesów adaptacyjnych do obecności nowych związków (pochodnych BTA). Najmniejsze wahania *H'* uzyskano dla reaktora roboczego, do którego dozowano BT (MBR 2), co wskazywało, że BT, jak również jego metabolity wymagają do ich transformacji obecności złożonego konsorcjum bakteryjnego. Prawdopodobnie, BT i jego pochodne limitują dalsze różnicowanie się biocenozy. Może ona dążyć do uzyskania takiego składu gatunkowego, które jest najlepiej przystosowane do obecności i transformacji BT oraz produktów pośrednich jego metabolizmu. W wyniku tego nie podlega ona dalszemu zróżnicowaniu. Na podstawie wyników analizy statystycznej stwierdzono, że BT i BTA nie wpływają istotnie na bioróżnorodność biocenozy bakteryjnej w bioreaktorach membranowych, wykorzystywanych w niniejszym eksperymencie.



## I-P 19

### JADALE SINICE Z RODZAJU *ARTHROSPIRA* – KORZYŚCI I BEZPIECZEŃSTWO STOSOWANIA JAKO SUPLEMENT DIETY

Krzysztof Waleron<sup>1</sup>, Magda Furmaniak<sup>1</sup>, Martyna Franczuk<sup>1</sup>, Małgorzata Dziadziuszko<sup>3</sup>,  
Agnieszka Misztak<sup>2</sup>, Małgorzata Waleron<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny z OML, Gdański Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup>Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny z OML, Gdański Uniwersytet Medyczny

Krzysztof.waleron@gumed.edu.pl

Cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* to mikroorganizmy używane na całym świecie jako suplement diety pod komercyjną nazwą „Spirulina”. Historia konsumpcji biomasy *Arthrospira* sięga czasów cywilizacji Azteków, współcześnie spożywana jest przez ludność zamieszkującą rejon jeziora Czad (Afryka). Bogata w składniki odżywcze biomasa *Arthrospira* jest hodowana na skalę masową w m.in. w Stanach Zjednoczonych, Indiach i Chinach, w Afryce i niektórych krajach Europy. Wysoka zawartość białka, łatwo-przyswajalne żelazo, aminokwasy oraz niska zawartość kwasów nukleinowych to tylko niektóre z cech, które sprawiają, że biomasa *Arthrospira* jest wartościowym suplementem diety. Dodatkowo, nie zawiera celulozy w ścianie komórkowej, co ułatwia jej trawienie przez układ pokarmowy człowieka. Zwiększone zainteresowanie naukowców cyjanobakteriami z rodzaju *Arthrospira* przez ostatnie dwadzieścia lat zaowocowało poszerzoną wiedzą na temat genetyki jak i fizjologii tych mikroorganizmów. Suplementy diety podlegają mniej restrykcyjnym normom jakościowym niż leki, dlatego należy zwrócić szczególną uwagę na czystość chemiczną jak i mikrobiologiczną hodowli wielkoskalowych. *Arthrospira* ze

względem na dużą powierzchnię właściwą komórki oraz wysokie powinowactwo grup funkcyjnych na jej powierzchni do różnych jonów jest zdolna do sprawnego pobierania metali ze środowiska. Aktywność biosorpcyjna i prawdopodobnie bioakumulacyjna biomasy *Arthrospira*, jest niezaprzeczalną zaletą przy wykorzystaniu jej w bioremediacji ale równocześnie może być potencjalnym zagrożeniem dla konsumentów. Większość szczepów *Arthrospira* nie jest hodowana w warunkach aksenicznych, co zwiększa ryzyko zakażenia hodowli potencjalnie szkodliwymi mikroorganizmami.

Celem tego badania był określający czystości mikrobiologicznej oraz zgodności składu pierwiastkowego z deklarowanym przez producenta w preparatach *Arthrospira* o różnym pochodzeniu dostępnych na polskim rynku. Dodatkowo zostały przeprowadzone analizy zawartości metali ciężkich w biomasie.

Spożywanie preparatów zawierających biomasę *Arthrospira* ma niezaprzeczalnie wiele korzyści, jednak szczególna uwaga powinna zostać poświęcona jakości prowadzonych hodowli wielkoskalowych, szczególnie pod kątem zawartości metali ciężkich oraz czystości mikrobiologicznej.

## I-P 20

### BIOFILM BAKTERYJNY I JEGO ZNACZENIE DLA ZAKŁADÓW PRZETWÓRSTWA SPOŻYWCZEGO

Magdalena Kroplewska<sup>1</sup>, Barbara Breza-Boruta<sup>1</sup>, Zbigniew Paluszak<sup>1</sup>, Piotr Dukowski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Mikrobiologii i Technologii Żywności, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, Bydgoszcz

<sup>2</sup>Koral S.A., Tczew

magdalenakroplewska@wp.pl

W sprzyjających warunkach większość drobnoustrojów wykazuje zdolność do uformowania biofilmu na różnego rodzaju powierzchniach. Jest to szczególnie niebezpieczne w przypadku bakterii chorobotwórczych, m.in. *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* (Jamal i wsp., 2015; Strużycka i wsp., 2009).

Biofilm to jedno- lub wielowarstwowa struktura biologiczna, składająca się z mikroorganizmów tego samego lub kilku różnych gatunków, zdolnych do wytworzenia zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych (w tym białek, enzymów i polisacharydów) oraz zatrzymywania wody, odpowiadającej za dystrybucję substancji odżywczych w obrębie macierzy. Podczas tworzenia biofilmu, ekspresja genów ulega zmianie, przez co zmniejsza się wrażliwość agregatów komórkowych na niekorzystne warunki środowiskowe. Bakterie występujące w biofilmie charakteryzują się większą opornością na środki dezynfekcyjne oraz antybiotyki. Jak podają Strużycka i wsp. (2009), przyczyną spadku aktywności substancji przeciwdrobnoustrojowych wobec biofilmu może być wyspecjalizowanie komórek go budujących (Jamal i wsp., 2015; Poulsen, 1999; Strużycka i wsp., 2009).

Biofilm ze względu na heterogenność strukturalną, różnorodność genetyczną i złożoność interakcji może z łatwością tworzyć się na powierzchniach roboczych i trudno dostępnych elementach linii technologicznych w zakładach przetwórstwa spożywczego, co stanowi poważne zagrożenie dla bezpieczeństwa produkowanej żywności oraz zdrowia konsumentów. A zatem, zachodzi konieczność nie tylko monitorowania obecności mikroorganizmów, ale także badania ich zdolności do produkcji biofilmu oraz jego reakcji na substancje przeciwdrobnoustrojowe (Jamal i wsp., 2015; Møretro i wsp., 2003; Pan i wsp., 2006).

#### Źródła:

1. Jamal M., Tasneem U., Hussain T., Andleeb S.: *RRJMB*, 4, 1, (2015)
2. Møretro T., Hermansen L., Holck A.L., Sidhu M.S., Rudi K., Langsrud S.: *Appl. Environ. Microb.* 69, 5648 (2003)
3. Pan Y., Breidt Jr. F., Kathariou S.: *Appl. Environ. Microb.* 72, 7711, (2006)
4. Poulsen L.V.: *Lebensm.-Wiss. Technol.* 32, 321 (1999)
5. Strużycka I., Stępień I.: *Nowa Stomatol.* 3, 85 (2009)

I-P 21

## WPLYW KADMU NA AKTYWNOŚĆ BAKTERII REDUKUJĄCYCH SIARCZANY WYIZOLOWANYCH Z GLEB ZANIECZYSZCZONYCH ROPĄ NAFTOWĄ I METALAMI CIĘŻKIMI

Agnieszka Rożek

Instytut Geochemii, Mineralogii i Petrologii, Wydział Geologii Uniwersytetu Warszawskiego

Przedmiot badań stanowiły sulfidogenne zespoły mikroorganizmów wyizolowane z gleby zanieczyszczonej ropą naftową i metalami ciężkimi. Próbkę gleby pochodziły z obszarów wybranych kopalni ropy naftowej w południowo-wschodniej Polsce. Celem badań było określenie wpływu stężenia kadmu na aktywność wyselekcjonowanych zespołów mikroorganizmów.

Podczas selekcji mikroorganizmów z grupy bakterii redukujących siarczany (BRS) zastosowano zmodyfikowane podłoże Postgate'a C z mleczanem sodu jako jedynym źródłem węgla. Do prowadzonych hodowli dodawano sól metalu ciężkiego  $CdCl_2$  w ilościach odpowiadających końcowemu stężeniu jonów kadmu: 100–800  $\mu g/cm^3$ .

W założonych hodowlach odnotowano aktywną redukcję siarczanów na maksymalnym poziomie 84% z jednoczesną biodegradacją związków organicznych, przejawiających się redukcją ChZT. Uzyskane zespoły mikroorganizmów wykazywały aktywność nawet przy stężeniu jonów kadmu 800  $\mu g/cm^3$ . Dodatkowo roztwory hodowlane poddano analizie chemicznej na obecność białka i jonów Cd (II).

Odnotowano wzrost stężenia białka w hodowlach o niższych zawartościach metalu 100 i 200  $\mu g/cm^3$  oraz znaczny spadek

(max. 60%) stężenia wolnych jonów  $Cd^{2+}$  we wszystkich badanych hodowlach.

Wyniki analizy molekularnej wskazują na obecność typowych przedstawicieli sulfidogennych mikroorganizmów, należących do grupy BRS, takich jak: *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfuromonas acetoxidans*. Odnotowano także obecność bakterii desulfurykacyjnych zdolnych do wewnątrzkomórkowej akumulacji kadmu – *Desulfococcus multivorans* DSM 2059. Niektóre wyizolowane mikroorganizmy np. *Metallosphaera sedula* rozwijają się na terenach skażonych metalami ciężkimi, pomimo wysokiej toksyczności tych pierwiastków.

Uzyskane wyniki wskazują na możliwość zastosowania mikroorganizmów naturalnego biogeochemicznego cyklu siarki w procesach bioremediacji terenów skażonych metalami ciężkimi. Szczególne znaczenie ma tutaj mikrobiologiczny proces immobilizacji metali. Proces ten prowadzi do spadku toksyczności lub wręcz stężenia metali ciężkich w danym środowisku poprzez ich unieruchomienie w postaci nierozpuszczalnych siarczków. Dalsze badania i dokładne poznanie tych mechanizmów pozwoli na efektywniejsze wykorzystanie mikroorganizmów w różnych aspektach biotechnologii środowiskowej.

I-P 22

## MIÓD JAKO ŹRÓDŁO MIKROORGANIZMÓW ZDOLNYCH DO PRODUKCJI SUBSTANCJI O DZIAŁANIU ANTYGRONKOWCOWYM

Piotr Szweda, Magdalena Pajor

Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej, Katedra Technologii Leków i Biochemii

pioszweda@pg.gda.pl

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* spp. należą do najważniejszych patogenów ludzi i zwierząt. Jest to także grupa bakterii, która niezwykle szybko nabywa mechanizmy oporności na stosowane aktualnie antybiotyki. W związku z tym istnieje pilna potrzeba poszukiwania nowych, nieantybiotykowych substancji o aktywności przeciwochronkowcowej, które mogłyby stanowić alternatywę lub uzupełnienie dla klasycznej antybiotykoterapii. Dane literaturowe z ostatnich lat wskazują, że ciekawym rezerwuarem substancji o działaniu przeciwochronkowcowym, w tym przeciwochronkowcowym, są produkty pszczele (miód, propolis, pierzga, mleczko pszczele), a także flora bakteryjna tych produktów (Lee i wsp., 2008). Obecne w miodzie i innych produktach pszczelich bakterie fermentacji mlekowej (LAB – Lactic Acid Bacteria) oraz bakterie z rodzaju *Bacillus* wykazują zdolność do produkcji substancji peptydowych o właściwościach bakteriostatycznych i/lub bakteriobójczych – bakteriocyn. Celem prowadzonych w naszym zespole badań jest izolacja mikroorganizmów zdolnych do wytwa-

rzania substancji przeciwochronkowcowych z miodów pozyskanych w polskich pasiekach. Wyniki dotychczasowych badań potwierdzają doniesienia literaturowe, że miód jest obiecującym źródłem mikroorganizmów zdolnych do produkcji substancji przeciwochronkowcowych. Z osiemdziesięciu przebadanych do tej pory próbek miodów wyizolowano cztery szczepy, których metabolity skutecznie hamują wzrost gronkowców – zarówno szczepów referencyjnych jak i klinicznych. Są to substancje termostabilne, odporne na działanie proteaz, wykazujące aktywność w szerokim zakresie pH. Analiza sekwencji genu kodującego 16S rRNA wykazała, że trzy z wyizolowanych szczepów produkcyjnych należą do rodzaju *Bacillus*. Aktualnie trwają próby oczyszczenia i ustalenia natury chemicznej substancji aktywnych biologicznie.

Lee H., Churey J.J., Worobo R.W.: Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *Int. J. Food Microbiol.* **126**(1–2), 240–244 (2008)

## I-P 23

### NARZĘDZIA DIAGNOSTYCZNE DO WYKRYWANIA WIROIDÓW HSVd, AFCVd, CBCVd W CHMIELU

Marcin Przybyś, Grażyna Korbecka-Glinka, Urszula Skomra

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin

*Mprzybys@iung.pulawy.pl*

Chmiel jest gatunkiem wieloletnim, uprawianym przez szereg lat na tym samym stanowisku, bez zmianowania. Wiroidy są patogenami, które szczególnie łatwo gromadzą się w roślinach, gdyż brak jest skutecznych chemicznych metod ich zwalczania. Choroby wywołane przez wiroidy rzadko powodują widoczne objawy na roślinach chmielu. Żeńskie kwiatostany, zwane szyszkami, zawierają gruczoły lupulinowe o specyficznym składzie chemicznym. Do szczególnie cenionych składników należą alfa kwasy, nadające piwu gorzki smak. Drugą grupą metabolitów wtórnych ważnych dla przemysłu piwowarskiego są olejki eteryczne, które są mieszaniną wielu związków tworzących charakterystyczną kompozycję zapachową. W ekstremalnych przypadkach infekcja wiroidem może doprowadzić do zmian morfologicznych i karłowatości roślin chmielu. Jednak najczęściej rośliny porażone nie wykazują żadnych objawów, ale dają niższy plon szyszek o niekorzystnie zmienionym składzie chemicznym. W Polsce dotychczas nie prowadzono badań nad występowaniem w chmielu: wiroida karłowatości chmielu (Hop stunt viroid, HSVd), wiroida wyboistości

jablek (Apple fruit crinkle viroid, AFCVd) i wiroida IV cytrusowych (Citrus bark cracking viroid, CBCVd). HSVd infekuje liczną grupę roślin wieloletnich: winorośl, śliwa, brzoskwinia, morela i chmiel. Skutkiem choroby jest znaczne obniżenie zawartości alfa kwasów. W szyszkach chmielu HSVd występuje w Azji, Ameryce Północnej i Europie. Wykryty w Japonii AFCVd często występuje w roślinach zakażonych dwoma innymi wiroidami chmielu: HSVd i HLVd. CBCVd po raz pierwszy wykryto w roślinach chmielu w Słowenii. Z uwagi na bardzo szybkie tempo rozprzestrzeniania się na zainfekowanej plantacji umieszczono go na liście alertowej EPPO. Celem aktualnie realizowanego projektu jest opracowanie narzędzi diagnostycznych do wczesnego wykrywania zakażonych przez HSVd, AFCVd i CBCVd roślin oraz monitoring występowania tych patogenów na polskich plantacjach produkcyjnych. Badania prowadzone są w ramach projektu: „Występowanie dotychczas nie monitorowanych wirusów (HpLV, ArMV) i wiroidów (HpSVd, AFCVd, CBCVd) na plantacjach produkcyjnych chmielu w Polsce” finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

## I-P 24

### OCENA WPŁYWU KLINDAMYCYN I KLINDAMYCYNO-OPORNEGO SZCZEPU *PROVIDENCIA RETTGERI* NA STRUKTURĘ ZESPOŁÓW BAKTERII GLEBOWYCH METODĄ PCR-DGGE

Mariusz Cycoń<sup>1</sup>, Kamila Orlewska<sup>1</sup>, Zofia Piotrowska-Seget<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Mikrobiologii i Wirusologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

<sup>2</sup> Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

*mcycon@sum.edu.pl*

Nadmierne i często niekontrolowane stosowanie antybiotyków doprowadziło do zanieczyszczenia środowiska, w tym gleby, do której antybiotyki dostają się razem z odchodami, ściekami i osadami ściekowymi stanowiącymi również rezerwar dla wielu mikroorganizmów opornych na szeroki wachlarz antybiotyków. Dlatego też, celem pracy była ocena wpływu jednego z częściej stosowanych antybiotyków, tj. klindamycyny oraz klindamycyno-opornego szczepu *Providencia rettgeri* na genetyczną bioróżnorodność zespołów bakterii glebowych. Do tego celu wykorzystano elektroforezę w gradiencie czynnika denaturującego (DGGE) poprzedzoną izolacją genomowego DNA z gleby oraz amplifikacją fragmentu genu kodującego 16S rRNA.

Analiza profili DGGE dla poszczególnych prób gleby kontrolnej oraz z dodatkiem klindamycyny i/lub szczepu *Providencia rettgeri* wykazała zmiany w strukturze bakterii glebowych w trakcie 90-dniowego eksperymentu. Najbardziej widoczne różnice odnotowano po 30, 60 i 90 dniach doświadczenia. Dokładna ana-

liza indeksów *S* (bogactwo gatunków) oraz *H* (indeks Shannona-Wienera) potwierdziła istotny ( $P < 0,05$ ) spadek wartości mierzonych parametrów, co sugeruje spadek liczby i bioróżnorodności gatunków. Jednocześnie, odnotowano istotny ( $P < 0,05$ ) wzrost wartości indeksu równomierności ( $E_H$ ).

Wyniki 3-czynnikowej analizy wariancji ANOVA wykazały, że na wartość indeksu *S* istotny wpływ miała dawka antybiotyku ( $P < 0,001$ ), czas ( $P < 0,001$ ) oraz interakcja pomiędzy dwoma czynnikami, tj. szczep  $\times$  dawka klindamycyny ( $P = 0,041$ ). Z kolei, na wartość indeksu *H* istotny wpływ miała dawka antybiotyku ( $P < 0,001$ ), czas ( $P = 0,031$ ) oraz interakcja pomiędzy dwoma czynnikami, tj. dawka klindamycyny  $\times$  czas ( $P = 0,028$ ). Przeprowadzona analiza wykazała również, że w przypadku indeksu  $E_H$ , na jego wartość istotny wpływ miał tylko czas ( $P < 0,001$ ). Ponadto, w przypadku szczepu *Providencia rettgeri* analiza wariancji nie wykazała istotnego jego wpływu na wartości indeksów *S*, *H* i  $E_H$  w trakcie doświadczenia.

I-P 25

### WPLYW WYBRANYCH ŹÓDEŁ AZOTU NA PRZEBIEG PROCESU BIOSYNTETY KWASU D-MLEKOWEGO PRZEZ SZCZEP SPOROLACTOBACILLUS LAEYOLACTICUS DSM 442

Alicja Michalczyk, Anna Cieniecka-Rosłonkiewicz, Arkadiusz Białek, Bolesław Morytz

Instytut Przemysłu Organicznego, Zakład Technologii i Biotechnologii Produktów Biologicznie Czynnich, Warszawa

Michalczyk@ipo.waw.pl

Bakterie mlekowe charakteryzują się złożonymi wymogami rozwojowymi. Według licznych doniesień literaturowych i badań własnych czynniki takie jak: optymalnie dobrane źródło azotu i węgla, kwasy nukleinowe, kompleksy witamin z grupy B oraz minerały znacząco wpływają na wytwarzanie kwasu mlekowego. Do najczęściej wykorzystywanych źródeł azotu w procesach fermentacyjnych z udziałem bakterii mlekowych należy ekstrakt drożdżowy. Jest to jednak substrat stosunkowo drogi a ekonomika, decydująca o możliwości wdrożenia opracowanej technologii, wymusza dalsze badania nad ciągłym doskonaleniem i optymalizacją składu podłoża hodowlanego i warunków namnażania mikroorganizmów. Stosowanie w pożywkach produkcyjnych roślinnych surowców odnawialnych, które oprócz naturalnych węglowodanów zawierają także białka, aminokwasy i witaminy jest korzystne dla ich wzrostu, rozwoju i wytwarzania metabolitów wtórnych. Celem

przewodzonych badań było sprawdzenie możliwości wykorzystania surowców odpadowych (gęstwa drożdżowa, namok kukurydzy), jak również produktów spożywczych (drożdże piekarskie, śruta pszenna, mąka sojowa, orzechy laskowe, nasiona dyni, lnu i słonecznika) jako źródło azotu w procesie fermentacji D-mleczanowej przez szczep *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM 442. Proces fermentacji prowadzono w warunkach stacjonarnych, a jego efekty wyrażono ilością wytworzonego kwasu D-mlekowego (D-LA) i zawartością glukozy w medium pofermentacyjnym oznaczonych metodą enzymatyczną. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że szczep *Sp. laevolacticus* może wykorzystywać azot zawarty w wytypowanych surowcach odpadowych i produktach spożywczych. Zastosowanie ekstraktu drożdżowego pozwala na uzyskanie wyższej wydajności biosyntezy D-LA niż zastosowanie jego substytutów.

I-P 26

### USUWANIE WYBRANYCH SUBSTANCJI FARMACEUTYCZNYCH W OCZYSZCZALNIACH HYDROFITOWYCH

Monika Nowrotek<sup>1,2</sup>, Adam Sochacki<sup>1,2,3</sup>, Ewa Felis<sup>1,2</sup>, Korneliusz Miksch<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Politechnika Śląska

<sup>2</sup>Centrum Biotechnologii, Politechnika Śląska

<sup>3</sup>Department of Applied Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences, Praga, Republika Czeska

monika.nowrotek@polsl.pl

W ciągu ostatnich lat coraz szerzej dyskutowany jest problem obecności pozostałości po farmaceutykach w środowisku naturalnym i skutkach, jakie ta obecność może wywoływać w stosunku do organizmów żywych. Jednym z źródeł zanieczyszczeń farmaceutycznych w środowisku wodnym są ścieki oczyszczone. Niektóre substancje z tej grupy nie są w pełni degradowane w procesach biologicznego oczyszczania ścieków, bazujących na technologii osadu czynnego. Jako alternatywę dla tego typu oczyszczalni można wymienić technologie wykorzystujące rośliny – oczyszczalnie hydrofitowe.

Celem pracy było określenie efektywności usunięcia wybranych farmaceutyków w oczyszczalni hydrofitowej o przepływie pionowym, zstępującym. Kolumny systemu hydrofitowego obsadzone były miskantem olbrzymim (*Miscanthus giganteus*). Badania prowadzono także w kolumnach bez roślin. Do badań wytypowano dwie substancje farmaceutyczne – diklofenak (DCF), niesteroidowy lek przeciwbólowy i przeciwzapalny i sulfametoksazol (SMX), chemioterapeutyk antybiotyczny z rodziny sulfonamidów. Część kolumn była zasilana przez pięć dni w tygodniu, objętością ścieków równą 1 l dziennie, pozostałe kolumny były zasilane 2 razy w tygodniu po 2,5 l ścieków. Średnie stężenie SMX

oraz DCF w ściekach wynosiło 2 mg/l. Średnie usunięcie SMX w kolumnach zasilanych dwa razy w tygodniu objętością ścieków równą 2,5 l wynosiło 79% w kolumnach z roślinami, w kolumnach bez roślin – 54%. W kolumnach zasilanych pięć razy w tygodniu objętością ścieków równą 1 l średnie usunięcie SMX wynosiło 66% w kolumnach z roślinami, natomiast w kolumnach bez roślin, usunięcie było równe 38%. Usunięcie DCF w kolumnach zasilanych dwa razy w tygodniu objętością ścieków 2,5 l wynosiło 81% dla kolumn z roślinami oraz 65% dla kolumn bez roślin. W przypadku kolumn zasilanych pięć razy w tygodniu objętością ścieków równą 1 l, usunięcie DCF w kolumnach z roślinami wynosiło 71%, zaś w kolumnach bez roślin – 48%. Można zaobserwować pozytywny wpływ roślin i mniejszej częstotliwości zasilania na usuwanie DCF i SMX. Usunięcie związków organicznych we wszystkich konfiguracjach systemu było na zbliżonym poziomie, nie wykazano istotnych różnic związanych z częstotliwością zasilania czy obecnością farmaceutyków w nadawie. Zaobserwowano wpływ częstotliwości zasilania systemu na usunięcie związków azotu – w kolumnach zasilanych rzadziej większą objętością ścieków usunięcie azotu było niższe w porównaniu z kolumnami zasilanymi częściej mniejszą objętością ścieków.



## I-P 27

## MIKROROZMNAŻANIE KONOPI K-290

Tomasz Wróbel<sup>1</sup>, Mariola Dreger<sup>1</sup>, Grażyna Mańkowska<sup>1</sup>,  
Karolina Wielgus<sup>1</sup>, Ryszard Słomski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Zakład Biotechnologii

<sup>2</sup>Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Biochemii i Biotechnologii

tomasz.wrobel@iwnirz.pl

Konopie *Cannabis sativa* L. ze względu na zawarte w nich kannabinoidy są roślinami o rosnącym znaczeniu w przemyśle farmaceutycznym. Preparaty zawierające kannabinoidy stosuje się w: łagodzeniu bólu chronicznego i neuropatycznego, spastyczności związanych ze stwardnieniem rozsianym, nudnościach oraz powiązanej z AIDS anoreksji. Na rynku obecne są leki na bazie syntetycznych kannabinoidów takich jak dronabidol (Marinol) czy nabilon (Cesamet) oraz kannabinoidów naturalnych (Sativex). Zawartości substancji aktywnych oraz ich wzajemny stosunek w konopiach są zmienne co utrudnia ich wykorzystanie jako surowca do produkcji leków. Technika mikropropagacji może być użytecznym narzędziem do pozyskania klonów rośliny o pożądanych cechach [1]. W dotychczas opublikowanych raportach dotyczących mikropropagacji konopi włóknistych, pozyskiwano od 3 do 3,22 eksplantatów z jednego pędu, odsetek ukorzenionych roślin wahał się od 80% do 85% [2, 3].

W niniejszej pracy eksplantaty K-290 wykładano na pożywkę 1/2 MS z dodatkiem 0,5 mg/L IAA. Po 21 dniach roślinki o wysokości powyżej 6 cm pozbawiano wierzchołków pędów w celu pobudzenia do wzrostu pędów bocznych. Po dziesięciu dniach

od cięcia pobierano wyrośnięte pędy boczne i wykładano je na tę samą pożywkę. Z jednego pędu otrzymywano 4,75 eksplantatów z czego zregenerowało i ukorzeniło się 73%. Doświadczenie miało charakter pilotowy – prowadzono je w małej skali (ciężo 35 eksplantatów, ukorzeniano 48 eksplantatów).

1. Lata, Chandra, Tचना, Khana, El Sohlya: *In vitro* mass propagation of *Cannabis sativa* L.: A protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plant. *JARMAP*, 3 18–26 (2016)
2. Wang, He, Xia, Tong, Li, Peng: A micropropagation system for cloning of hemp (*cannabis sativa* l.) by shoot tip culture. *Pak. J. Bot.* 41(2), 603 (608 2009)
3. Chaohua, Gonggu, Lining, Chunsheng, Qing, Jianhua, Xinbo, Dingxiang, Jianguang: A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (*Cannabis sativa* L.). *Ind. Crops. Prod.* 83, 61–65 (2016)

Sfinansowano ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu nr: INNOMED/II/11/NCBR/2014.

## I-P 28

### MOŻLIWOŚĆ WYDŁUŻENIA MIKROBIOLOGICZNEJ TRWAŁOŚCI SOKU BRZOSOWEGO POPRZEZ ZASTOSOWANIE DODATKÓW FUNKCJONALNYCH

Maciej Bilek<sup>1</sup>, Angelika Chachura<sup>1</sup>, Sylwia Piekarcz<sup>1</sup>, Agnieszka Radochońska<sup>1</sup>, Marcin Olszewski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Inżynierii Produkcji Rolno-Spożywczej. Uniwersytet Rzeszowski

<sup>2</sup>Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii. Politechnika Gdańska

mbilek@ur.edu.pl

Sok brzożowy stanowi surowiec pobierany przez konsumentów indywidualnych i półprodukt przemysłu spożywczego. Przetwórstwo napotyka jednak na problem niskiej trwałości soku brzożowego, wynoszącej ok. 1 dnia. Degradacji mikrobiologicznej soków sprzyja zawartość cukrów prostych, aminokwasów, składników mineralnych i anionów nieorganicznych; procesowi temu towarzyszą zmiany, które najszybciej wykryć można techniką turbidymetryczną.

Mętnienie soku brzożowego zahamowano do 3 dnia testu przechowalniczego przez przechowywanie w warunkach chłodniczych. Dodatek kwasu cytrynowego w stężeniu 0,5% wydłużył w warunkach chłodniczych trwałość soku do 12 dni, zaś równoczesne wprowadzenie kwasu cytrynowego (0,5%) i sorbinianu potasu (0,03%) zahamowało mętnienie do 9 dni w temperaturze pokojowej i do co najmniej miesiąca w warunkach chłodniczych. Dzięki zastosowaniu w badaniach soku o najwyższej czystości mikrobiologicznej, tzn. zebranego w dniu nawiercenia drzewa, uzyskuje się wydłużenie trwałości do 15 dni w przypadku soku z dodatkiem kwasu cytrynowego oraz do co najmniej miesiąca

w przypadku próbek z dodatkiem kwasu cytrynowego i sorbinianu potasu, niezależnie od temperatury przechowywania. Wysokie stężenie kwasu cytrynowego sprawia, że konieczny jest dodatek substancji słodzących, najkorzystniej o charakterze prozdrowotnym, jak syropy owocowe i miód.

Nie stwierdzono dla nich negatywnego wpływu na trwałość, a ocena sensoryczna wskazała, że optymalną dla konsumenta kompozycję smaku kwaśnego i słodkiego uzyskuje się po wprowadzeniu dodatku słodzącego w stężeniu 10%.

Kwasem spożywczym cieszącym się powszechną akceptacją konsumentów, a przy tym wykazującym efekt prozdrowotny, jest kwas askorbinowy (witamina C), będący naturalnym składnikiem soku brzożowego. Jego zaletą jest smak, w przeciwieństwie do kwasu cytrynowego nie wymagający korekty substancjami słodzącymi. Poprzez zastosowanie kwasu askorbinowego jako dodatku utrwalającego, dla stężenia 0,2 i 0,4% uzyskano trwałość wynoszącą w warunkach chłodniczych 6 dni. Z kolei trwałość soku brzożowego z dodatkiem kwasu askorbinowego i sorbinianu potasu wynosi 9 dni w warunkach chłodniczych.

I-P 29

### ZASTOSOWANIE MIKROFILTRACJI DO WYDŁUŻENIA TRWAŁOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ SOKU BRZozOWEGO

Maciej Bilek<sup>1</sup>, Sylwia Piekarcz<sup>1</sup>, Marta Śpibida<sup>2</sup>, Marcin Olszewski<sup>2</sup><sup>1</sup> Katedra Inżynierii Produkcji Rolno-Spożywczej. Uniwersytet Rzeszowski<sup>2</sup> Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii. Politechnika Gdańska

mbilek@ur.edu.pl

Problem bardzo niskiej trwałości soku brzozowego rozwiązany może być na kilka sposobów. Zastosowanie chemicznych metod wydłużania trwałości związane jest z koniecznością modyfikacji składu, m.in. poprzez wprowadzenie kwasów spożywczych, konserwantów i dodatków poprawiających smak, jednak dzięki braku przetwarzania termicznego, zachowany zostaje w pełni pierwotny skład. Alternatywą dla tych metod jest użycie procesów membranowych, które jako metody nietermiczne również nie wywierają wpływu na skład soku, jednak w świetle badań przeprowadzonych w Korei Południowej, po zastosowaniu ultrafiltracji, zmętnienie soku brzozowego w temperaturze pokojowej obserwowano już w trzecim dniu testu przechowalniczego.

W niniejszych badaniach, w celu wydłużenia trwałości soku drzewnego, zastosowano mikrofiltrację, przy czym sączenie prowadzono do wyjałowionych naczyń, stanowiących jednocześnie naczynia pomiarowe tzw. gęstościomierza optycznego. Naczynia zabezpieczone były w czasie sterylizacji folią aluminiową, dodatkowo opalaną przed dokonaniem filtracji. Mikrofiltrację prowadzono za pomocą filtrów strzykawkowych o średnicy porów

0,45 µm i jałowych strzykawkę, zaś jałowe igły, którymi wprowadzano przesączony sok do zabezpieczonych folią naczyń, były opalane, po czym naczynia pomiarowe powtórnie zabezpieczano drugą warstwą folii aluminiowej, po nałożeniu poddanej opaleniu. Procedura została zastosowana wobec 6 próbek, zaś wobec 6 kolejnych powtórzona z tą różnicą, że sok nie został poddany mikrofiltracji.

Test przechowalniczy prowadzono w temperaturze pokojowej przez 3 miesiące wykonując pomiary gęstości optycznej co 7 dni. W przypadku próbek soku niepoddanych filtracji zmętnienie w siódmym dniu badań wyniosło od 0,19 do 0,34 jednostek McFarlanda (MFU), zaś w ostatnim dniu testu od 0,68 do 4,39 MFU. Z kolei dla wszystkich próbek, wobec których zastosowano mikrofiltrację, nie odnotowano wzrostu gęstości optycznej przez cały test przechowalniczy. Dowiedziono w ten sposób, że sok brzozowy poddany mikrofiltracji prowadzonej w warunkach jałowych i do jałowego naczynia zachowuje co najmniej trzymiesięczną trwałość bez oznak zmętnienia, charakterystycznego dla mikrobiologicznego rozkładu tego surowca.

I-P 30

### WPLYW POLA ELEKTROMAGNETYCZNEGO NA PRZEŻYWALNOŚĆ BAKTERII *SALMONELLA ENTERICA*

Krzysztof Frączek<sup>1</sup>, Karol Bulski<sup>1</sup>, Krzysztof Pawlak<sup>2</sup>, Magdalena Swadźba<sup>2</sup>, Dariusz Ropek<sup>3</sup><sup>1</sup> Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie<sup>2</sup> Zakład Weterynarii, Rozrodu i Dobrostanu Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie<sup>3</sup> Katedra Ochrony Środowiska Rolniczego, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Celem badań było określenie wpływu pola elektromagnetycznego na przeżywalność bakterii *Salmonella enterica*. 24-godziną hodowlę bakterii na agarze TSA przenoszono z pożywki stałej do sterylnych kolb Erlenmayer'a z 25 cm<sup>3</sup> soli fizjologicznej i ustalono wyjściową gęstość optyczną zawiesiny równą 0,5 McF. Kolby z zawiesiną bakteryjną umieszczono na wytrząsarce (22°C, 130 rpm), poddając je oddziaływaniu pola elektromagnetycznego. Źródłem pola elektromagnetycznego (PEM) był specjalnie zaprojektowany na potrzeby doświadczenia generator emitujący fale z zakresu częstotliwości radiowej 1800 MHz i gęstości mocy równej 0,1 W/m<sup>2</sup> ± 0,02. W trakcie trwania eksperymentu antena generatora fal znajdowała się w stałej odległości 24 cm nad kolbami z zawiesiną bakteryjną. Pole elektromagnetyczne emitowane było w sposób ciągły. Kolby z zawiesiną, stanowiące próbę kontrolną, umieszczono na wytrząsarce (22°C, 130 rpm), poza zasięgiem

oddziaływania pola elektromagnetycznego. Obserwacje prowadzono, dokonując pomiaru gęstości optycznej zawiesiny bakteryjnej (McF) przy użyciu densytometru po 1, 12, 24, 48, 72 i 144 godzinach oddziaływania pola elektromagnetycznego i określono liczbę komórek bakteryjnych w 1 cm<sup>3</sup> zawiesiny. Na podstawie przeprowadzonych badań zaobserwowano, że pomiędzy 12, a 72 godziną eksperymentu, nastąpił spadek liczby komórek bakterii w próbkach kontrolnych podczas, gdy w próbkach poddanych oddziaływaniu pola elektromagnetycznego obserwowano wyższą liczebność bakterii w 1 cm<sup>3</sup>. Po 24 godzinach eksperymentu zaobserwowano istotnie wyższy wzrost liczby badanych bakterii w próbkach poddanych działaniu pola elektromagnetycznego, w porównaniu do próbek kontrolnych. Maksymalną liczebność bakterii w próbkach kontrolnych i próbkach poddanych oddziaływaniu pola elektromagnetycznego obserwowano po 144 godzinach eksperymentu.

## BIOTECHNOLOGIA W MEDYCYNIE I BIOLOGII MOLEKULARNEJ

## WYKŁADY PLENARNE

## II-WPL 1

## NAPRAW ALBO ZGIŃ. PROCESY NAPRAWY DNA A PATOGENNOŚĆ PRĄTKÓW GRUŻLICY

Jarosław Dziadek

Instytut Biologii Medycznej PAN, Łódź

jdziaadek@cbm.pan.pl

*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), to najgroźniejszy bakteryjny patogen człowieka, rozprzestrzeniający się drogą kropelkową, odpowiedzialny każdego roku za śmierć prawie 1,5 miliona osób. Prątki gruźlicy zarówno podczas transmisji, jak i w organizmie gospodarza narażone są na działanie szeregu czynników endo- i egzogennych generujących uszkodzenia DNA. Podczas transmisji, poza organizmem gospodarza, mykobakterie mogą podlegać ekspozycji na UV i/lub ulegać procesowi wysychania, który jest fizjologicznym odpowiednikiem promieniowania jonizującego (IR), powodującym podwójne pęknięcia DNA (DSBs). W organizmie gospodarza, mykobakteryjny DNA jest tarczą dla wolnych rodników (ROS, RNI)

wytwarzanych przez komórki fagocytarne, lub powstających endogennie w procesie oddychania podczas zmiany metabolizmu tlenowego na beztlenowy (np. w ziarniniakach). Integralność DNA może zostać także zaburzona w sposób pośredni poprzez uszkodzenia białek zaangażowanych w metabolizm DNA. Podobnie jak inne bakterie, prątki gruźlicy wykształciły szereg mechanizmów pozwalających na naprawy uszkodzeń DNA wynikających z działania czynników mutagennych. Podczas wykładu omawiane będzie znaczenie mykobakteryjnych mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA w aspekcie wirulencji prątków gruźlicy, ze szczególnym uwzględnieniem naprawy podwójnych pęknięć DNA.

## II-WPL 2

## ZROZUMIEĆ PLURIPOTENCJĘ: INŻYNIERIA GENETYCZNA I KOMÓRKOWA W BADANIACH MACIERZYSTYCH KOMÓREK ZARODKOWYCH

Agnieszka Bernat-Wójtowska

Zakład Diagnostyki Molekularnej, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,

Zakład Embriologii Doświadczalnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec

agnieszka.bernat@biotech.ug.edu.pl

Ze względu na swoją dychotomiczną naturę, tj. zdolność do samoodnowy oraz możliwość różnicowania się w dowolny typ tkanki, macierzyste komórki pluripotencjne są nadzieją terapii komórkowo-zastępczych.

Przedstawione zostaną przykłady zastosowania inżynierii genetycznej i komórkowej w badaniach nad pluripotencją i różnicowaniem komórek macierzystych.

Choć od wyodrębnienia mysich macierzystych komórek zarodkowych minęło wiele lat, stanowią one wciąż złoty standard w badaniach nad potencjałem komórek pluripotencjnych. Test tworzenia chimer zarodkowych umożliwia zweryfikowanie pluripotencji komórek zarodkowych, dodatkowo pozwalając na uzyskanie zwierząt chimerowych. Pytania, w jaki sposób zarodek reguluje liczbę przyjętych komórek i jakie warunki hodowli są niezbędne, aby stopień chimeryzmu był wysoki oraz prowadził do transmisji germinalnej, pozostają jednak otwarte. Próbuje się na nie odpowiedzieć, tworząc system śledzenia losów komórek w środowisku wczesnego zarodka, oparty na genetycznym znakowaniu (ang.

*barcoding*) komórek i rozpoznawaniu znaczników dzięki spektrometrii mas i technologii iPLEX MADI-TOF.

Różnicowanie komórek zarodkowych w komórki neuroektodermy i późniejsza ich specyfikacja do neuronów dopaminergicznych pozwoliła na modelowanie choroby Parkinsona w przedklinicznym modelu u naczelnych. Dzięki systemowi indukowanej nadekspresji białka *Lmx1b* w komórkach neuroektodermy możliwe było modelowanie kierunku różnicowania się komórek.

Jedną z najistotniejszych przeszkód w bezpiecznym zastosowaniu komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej jest pojawianie się niestabilności genomowych w trakcie hodowli komórek. Stworzyliśmy więc system monitorowania stresu genotoksycznego, oparty na badaniu częstości rekombinacji homologicznej, która służy naprawie uszkodzeń pojawiających się w obu niciach DNA po ekspozycji na stres. Przykłady te pokazują, iż narzędzia inżynierii genetycznej oraz inżynieria tkankowa są niezbędne, by poznawać biologię komórek pluripotencjnych, modelować ich potencjał i niwelować ograniczenia.



## II-WPL 3

## ZASTOSOWANIE FGF1 W TERAPII CUKRZYCY

Daniel Krowarsch

Zakład Biotechnologii Białek, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski

Daniel.krowarsch@uwr.edu.pl

Kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (FGF1) jest przedstawicielem rodziny polipeptydowych czynników wzrostu, która u kręgowców składa się z 22 przedstawicieli. FGF1 indukuje różnorodne typy odpowiedzi biologicznej stymulując, syntezę DNA, a co za tym idzie proliferację różnego typu komórek. FGF1 spełnia ważne funkcje na różnych etapach morfogenezy i rozwoju organizmu, a także stymuluje angiogenezę oraz gojenie się ran. W ostatnich latach pojawiły się prace wskazujące na jego silne działanie przeciw cukrzycowe. Wykazano, że białko to może mieć zastosowanie w terapii insulinoopornej cukrzycy typu II. Ze względu na stymulację wzrostu naczyń krwionośnych, gojenia się ran oraz własności

przeciw cukrzycowe FGF1 stanowi obiekt poważnego zainteresowania firm farmaceutycznych.

Ze względu na naturalne właściwości mitogenne FGF1, niewskazane jest wykorzystanie dzikiego typu białka w terapii cukrzycowej. Z tego względu nasze badania koncentrują się wokół otrzymania analogu białka FGF1 pozbawionego własności mitogennych przy zachowanej aktywności obniżającej poziom glukozy we krwi. Stosujemy różnego rodzaju strategie polegające na zmianach własności fizykochemicznych białka.

Badania finansowane z projektu NCBiR „Nowa terapia cukrzycy z zastosowaniem analogu białka FGF1” POIR.04.01.04-00-0117/15.

## II-WPL 4

TOXOPLASMA GONDII:  
MIĘDZY NATURĄ, MEDYCYNĄ I BIOTECHNOLOGIĄ

Henryka Długońska

Zakład Immunoparazytologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

henryka.dlugonska@biol.uni.lodz.pl

*Toxoplasma gondii* jest pasożytniczym pierwotniakiem o szerokim kręgu potencjalnych żywicieli (zwierzęta stałocieplne i człowiek). Mimo trwających od 1908 r. prac nad poznaniem biologii tego pasożyta oraz jego znaczeniem dla życia i zdrowia żywicieli, wiele kwestii pozostaje niejasnych, a walka z toksoplazmozą, zwłaszcza u osób z wrodzoną bądź nabytą dysfunkcją układu odpornościowego, jest nadal trudna. Prace badawcze wykonywane w Zakładzie Immunoparazytologii UŁ można ująć w trzy główne zadania, których cele wynikają bezpośrednio z oczekiwań naukowych i praktycznych związanych z toksoplazmozą:

- a) opracowanie profilaktycznych szczepionek nowej generacji (biosyntetycznych),
- b) poszukiwanie skutecznych chemioterapeutyków,
- c) badanie zmian behawioralnych i neurohormonalnych.

Pierwszy (a) wątek badań jest prowadzony we współpracy z Katedrą Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii PG. Przesłankę tych wspólnych badań stanowił (i stanowi nadal) brak komercyjnych szczepionek chroniących przed rozwojem zarażenia *T. gondii* u ludzi i zwierząt hodowanych na cele konsumpcyjne oraz wprowadzenie technik biotechnologicznych do otrzymywania w dużych ilościach standaryzowanych preparatów białkowych. Otrzymywane kolejno antygeny rekombinowane *T. gondii* są testowane, na mysim modelu doświadczalnym, na ich immunogenność oraz aktywność ochronną. Wyniki wskazują, że pojedyncze

antygeny nie są w pełni skuteczne. Obiecującą perspektywą mogą się natomiast okazać antygeny chimeryczne, złożone z wybranych fragmentów kilku lub więcej antygenów.

Niezbyt wysoka skuteczność stosowanych obecnie w terapii nielicznych leków i ich działanie uboczne dopingują do wymiany stosowanych obecnie leków na inne. Nowo syntetyzowane (UM w Lublinie) związki chemiczne są badane pod względem ich potencjalnej użyteczności. Jeden z testowanych ostatnio preparatów z grupy triazoli, a mianowicie 3-(tiofen-2-yl)-1,2,4-triazolo-5-tion wykazał silne właściwości przeciw pasożytnicze, przy niskiej toksyczności dla komórek żywiciela (niska wartość  $IC_{50}$ , wysoki współczynnik  $CC_{30}/IC_{50}$ ) i jest dobrym kandydatem na lek do terapii toksoplazmozy.

Najnowszym problemem naszych badań, prowadzonych przy współpracy z Katedrą Neurobiologii UŁ, jest wpływ zarażenia *T. gondii* na zachowanie żywicieli pasożyta. Testy w otwartym polu (OF) wykazały u zarażonych myszy (zróżnicowanych pod względem genetycznym i płciowym) wiele zmian behawioralnych, zależnych od czasu trwania zarażenia i płci. Zmianom behawioralnym towarzyszyły zmiany w poziomie neuroprzekaźników: noradrenaliny, dopaminy i serotoniny. Zanotowany np. wzrost poziomu dopaminy u samców w stadium późnej ostrej toksoplazmozy znajduje potwierdzenie w danych literaturowych nt. zachowania i biochemii mózgowia zarażonych osobników.

## II-WPL 5

POCHODNE TIOSEMIKARBAZYDU – W POSZUKIWANIU NOWYCH ZWIĄZKÓW  
O DZIAŁANIU PRZECIWDROBNOUSTROJOWYM

Paweł Stączek, Aleksandra Strzelczyk

Zakład Genetyki Drobnoustrojów, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

pstaczek@biol.uni.lodz.pl

Wprowadzenie do leczenia wielu antybiotyków w drugiej połowie XX w., początkowo znacząco zmniejszyło liczbę zachorowań i zgonów spowodowanych przez infekcje bakteryjne. Jednakże obecnie obserwuje się ciągły wzrost wskaźników zachorowalności i śmiertelności wywołanych przez szczepy patogenne. WHO uznała problem lekooporności drobnoustrojów za jedno z trzech największych zagrożeń dla zdrowia publicznego na świecie. Wielolekooporne szczepy, przy jednoczesnym braku nowych, efektywnych związków antybakteryjnych mogą stać się realnym zagrożeniem dla takich rutynowych działań medycznych jak zabiegi chirurgiczne, transplantacje, chemioterapia przeciwnowotworowa czy opieka neonatologiczna. Szacuje się, że łączne koszty spowodowane przez infekcje sięgają co najmniej 1,5 mld euro rocznie. Badania pokazują, że wyeliminowanie szczepów opornych poprzez znaczne ograniczenie stosowania antybiotyków jest procesem długotrwałym, a według niektórych niemożliwym. Dlatego wydaje się, że najskuteczniejszą bronią jest odkrywanie i tworzenie nowych leków przeciwbakteryjnych. Jednakże, pomimo ciągłego wzrostu liczby izolowanych szczepów opornych na większość obecnie stosowanych antybiotyków, od kilkunastu lat obserwuje się zdecydowany spadek wprowadzanych do leczenia nowych związków przeciwbakteryjnych. Między 1983

a 1992 rokiem FDA zatwierdziła 30 leków przeciwbakteryjnych, natomiast między 2003 a 2012 rokiem tylko siedem. Przyczyn tego zjawiska należy upatrywać m.in. w aspektach ekonomicznych, ale pewnym ograniczeniem jest także ograniczona liczba substancji spełniających odpowiednie kryteria potencjalnego leku. Tiosemikarbazydy to małe związki organiczne o wzorze sumarycznym  $\text{CH}_5\text{N}_3\text{S}$ . W literaturze od dawna pojawiały się prace wskazujące na interesujące właściwości biologiczne tiosemikarbazydów i ich pochodnych takich jak semikarbazydy, tiosemikarbazony, a także cykliczne triazole. Najczęściej opisywane były jednak aktywności przeciwnowotworowe, przeciwgrzybicze, przeciwdrgawkowe, antyoksydacyjne oraz przeciwbólowe. W niniejszej prezentacji omówione zostaną właściwości antybakteryjne nowych pochodnych 1,4-dipodstawionego tiosemikarbazydu. Te małowcząstkowe związki mogą być rozpatrywane jako potencjalne substancje o znaczeniu terapeutycznym, gdyż wpisują się w tzw. regułę pięciu Lipińskiego podającą wartości właściwości molekularnych, które są istotne dla farmakokinetyki potencjalnego leku w organizmie żywym. Analizy prowadzone *in silico* oraz modelowanie cząsteczkowe wskazywały, iż jednym z potencjalnych mechanizmów ich działania może być hamowanie aktywności bakteryjnych topoizomeraz klasy II.

## II-WPL 6

ENZYMY SZLAKÓW BIOSYNTETY AMINOKWASÓW  
JAKO CELE MOLEKULARNE W CHEMOTERAPII PRZECIWRZYBOWEJ

Iwona Gabriel

Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

iwogabri@pg.gda.pl

Drobnoustroje grzybowe są przyczyną wielu poważnych, często śmiertelnych chorób infekcyjnych, szczególnie u pacjentów z osłabionym systemem immunologicznym, których liczba narasta lawinowo, zarówno z powodu rozprzestrzeniania się epidemii AIDS, jak i w konsekwencji stosowania metod terapii powodujących osłabienie odporności organizmu. Grzybice układowe są powodowane głównie przez grzyby pleśniowe z rodzaju *Aspergillus* oraz drożdżaki z rodzaju *Candida*. Szereg gatunków mikroorganizmów grzybowych znanych jest jako jedne z najczęściej występujących czynników infekcyjnych powodujących zakażenia szpitalne. Pod tym względem drożdżaki *Candida albicans* zajmują czwarte miejsce na liście najczęściej stwierdzanych czynników etiologicznych infekcji szpitalnych. Leczenie grzybic układowych jest bardzo trudne, zarówno z uwagi na problemy diagnostyczne, jak i z powodu bardzo ograniczonego repertuaru skutecznych chemoterapeutyków przeciwgrzybowych. Każdy ze stosowanych obecnie chemoterapeutyków przeciwgrzybowych obciążony jest różnymi wadami. Związki te są albo bardzo toksyczne dla organizmu ludzkiego, jak np. Amfoterycyna B, albo też, będąc stosunkowo

nietoksycznymi wykazują inne ujemne cechy, jak np. szybkie narastanie oporności lub wyłącznie grzybobójcze działanie (Flukonazol). Przyczyną braku skutecznych chemoterapeutyków przeciwgrzybowych są między innymi duże podobieństwa biochemiczne między komórkami grzybów i ssaków.

W opisanej powyżej sytuacji, panuje powszechne przeświadczenie o pilnej potrzebie poszukiwania nowych potencjalnych chemoterapeutyków przeciwgrzybowych, w tym szczególnie takich, które wykorzystują w swoim mechanizmie działania nowe cele molekularne – elementy różniące jakościowo komórki grzyba od komórek ssaka. Szlaki biosyntezy aminokwasów stanowią potencjalne źródło nowych celów molekularnych w terapii przeciwgrzybowej, zwłaszcza tych aminokwasów, które nie występują w komórkach ludzkich. Proponowane podejście jest uwarunkowane egzogennym charakterem aminokwasów, takich jak lizyna, histydyna, metionina czy feniloalanina i tryptofan dla ludzi oraz zdolnością komórki grzybowej do ich syntezy. Ponadto kluczowe procesy zachodzące podczas infekcji: adhezja, filamentacja, penetracja i niszczenie komórek gospodarza związane są z ekspresją

licznych białek, co prowadzi do znacznego zwiększenia zapotrzebowania na aminokwasy. Udowodniono, że usunięcie genu kodującego określony enzym ze szlaku biosyntezy aminokwasów w komórkach grzybowych może prowadzić do całkowitego zaha-

mowania wzrostu szczepu, do zmniejszenia patogenności, albo do zwiększenia jego wrażliwości na określony lek. Wszystkie takie doniesienia dają nadzieję na opracowywanie nowych możliwości terapeutycznych.

## II-WPL 7

### OD ENZYMÓW RESTRYKCYJNYCH DO CRISPR-CAS – CO NAM DAŁY BAKTERIE - OSIĄGNIĘCIA I PROBLEMY

Ewa Bartnik

Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski i Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

[ebarnik@igib.uw.edu.pl](mailto:ebarnik@igib.uw.edu.pl)

Dwa listy moratoryjne podpisane m.in. przez tak wybitnych naukowców jak David Baltimore i Paul Berg ukazały się w czasopiśmie Science, ale dzieli je 41 lat. Pierwszy „Potential Biohazards of Recombinant DNA molecules” został opublikowany w 1976 r., drugi „Biotechnology: a prudent path forward for genomic engineering and germline gene modifications” w 2015 r.

Pierwszy list zapoczątkował działania, które doprowadziły do rocznego moratorium na badania z dziedziny inżynierii genetycznej oraz do słynnego spotkania w Asilomar, które ustaliło 4 klasy bezpieczeństwa organizmów genetycznie modyfikowanych, w zasadzie obowiązujące do dzisiaj. Było też początkiem różnych nadal krążących obaw o to, co może się stać, jeśli człowiek będzie

majstrował w żywych organizmach. Większość z tych obaw w tej chwili w zasadzie dotyczy tylko genetycznie modyfikowanych roślin, są one jednak tak nieracjonalne jak silnie rozpowszechnione. Warto jednak pamiętać, że wprowadzenie technik inżynierii genetycznej jest tym, co dało ogromny postęp w zrozumieniu jak funkcjonują geny organizmów eukariotycznych i nieprawdopodobne zmiany w rozumieniu chorób genetycznych.

Drugi list dotyczy spraw powiązanych znacznie bardziej z zagadnieniami etyki – o ile techniki redagowania genomów różnych organizmów są sprawdzone *in vivo* i *in vitro*, od paru lat wiele poważnych instytucji i grup zastanawia się nad ewentualną możliwością ingerencji w genom ludzki.

## II-WPL 8

### DZIEDZICZENIE KOMPLEKSU REPLIKACYJNEGO PRZEZ JEDNĄ Z DWÓCH POTOMNYCH CZĄSTECZEK DNA

Grzegorz Węgrzyn

Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, Gdańsk

[grzegorz.wegrzyn@biol.ug.edu.pl](mailto:grzegorz.wegrzyn@biol.ug.edu.pl)

Zjawisko dziedziczenia białkowego kompleksu replikacyjnego przez jedną z dwóch potomnych cząsteczek DNA po zakończonej rundzie replikacji zaproponowali po raz pierwszy w 1987 roku Kur i wsp. [1]. Hipoteza ta, nazwana wówczas „hipotezą niesprawiedliwego posagu”, została przedstawiona na podstawie badań replikacji plazmidów pochodzących od bakteriofaga lambda. Na potwierdzenie doświadczalne tej śmiałej hipotezy trzeba było poczekać 5 lat, gdy istnienie stabilnego kompleksu replikacyjnego, dziedziczonego w sposób zaproponowany w pracy Kur i wsp. [1] udowodniono na podstawie badań w komórkach bakteryjnych hodowanych przy braku jednego z egzogennych aminokwasów [2]. Kolejne badania wskazały na mechanizmy molekularne tego procesu, a także na jego znaczenie w regulacji inicjacji replikacji DNA [3]. Procesy regulacyjne okazały się znacznie bardziej skomplikowane niż przypuszczano wcześniej – zostaną one przedstawione i przedyskutowane podczas prezentacji. Co jest intrygujące to fakt, że proces dziedziczenia kompleksu replikacyjnego przez jedną z dwóch potomnych cząsteczek DNA po rundzie replikacji okazał się nie być ograniczony do bakteriofaga lambda i komórek prokariotycznych, ale został także wykryty

w komórkach eukariotycznych [4]. Jest to więc proces o znaczeniu ogólnobiologicznym [5].

Literatura:

1. Kur J., Górka I., Taylor K.: *Escherichia coli* dnaA initiation function is required for replication of plasmids derived from coliphage lambda. *J. Mol. Biol.* **198**, 203–210 (1987)
2. Węgrzyn G., Taylor K.: Inheritance of the replication complex by one of two daughter copies during lambda plasmid replication in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **226**, 681–688 (1992)
3. Węgrzyn G., Licznarska K., Węgrzyn A. Phage  $\lambda$  – new insights into regulatory circuits. *Adv. Virus. Res.* **82**, 155–178 (2012)
4. Węgrzyn A., Węgrzyn G.: Inheritance of the replication complex: a unique or common phenomenon in the control of DNA replication? *Arch. Microbiol.* **175**, 86–93 (2001)
5. Barańska S., Glinkowska M., Herman-Antosiewicz A., Maciąg-Dorszyńska M., Nowicki D., Szalewska-Pałasz A., Węgrzyn A., Węgrzyn G.: Replicating DNA by cell factories: roles of central carbon metabolism and transcription in the control of DNA replication in microbes, and implications for understanding this process in human cells. *Microb. Cell. Fact.* **12**, 55 (2013)

## WYSTĄPIENIA USTNE

## II-U 1

PROCES AUTOFAGII INDUKOWANY GENISTEINĄ  
JAKO NOWE PODEJŚCIE W LECZENIU CHOROÓB NEURODEGENERACYJNYCH

Karolina Pierzynowska<sup>1</sup>, Magdalena Podlacha<sup>2</sup>, Dorota Myślińska<sup>2</sup>, Irena Majkutewicz<sup>2</sup>,  
Jagoda Mantej<sup>1</sup>, Natalia Niedziałek<sup>1</sup>, Alicja Węgrzyn<sup>3</sup>, Grzegorz Węgrzyn<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biologii Molekularnej i <sup>2</sup> Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Uniwersytet Gdański

<sup>3</sup> Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk

*karolina.pierzynowska@biol.ug.edu.pl*

Liczba osób cierpiących na choroby neurodegeneracyjne wzrasta w dużym tempie, przekraczając obecnie 100 mln na świecie. Większość tych chorób spowodowana jest agregacją makrocząsteczek w komórkach nerwowych, uszkadzając ich prawidłowe funkcjonowanie i prowadząc do wystąpienia objawów psycho-motorycznych. Obecnie leczenie tych chorób polega tylko na łagodzeniu ich objawów. Jedną ze strategii terapeutycznych jest wzmocniona indukcja procesu autofagii w komórkach pacjentów. Proces ten polega na lizosomalnej degradacji nieprawidłowych makrocząstek do monomerów, które następnie ponownie zużywane są przez komórkę. Jednym ze związków wykazujących takie działanie, przekraczającym barierę krew-mózg, a ponadto bezpiecznym w długoterminowym stosowaniu jest genisteina, jeden z izoflawonów. Celem naszych badań było określenie wpływu podawania genisteiny na chorobę Alzheimera (AD) i Huntingtona (HD), charakteryzującymi się odmiennym sposobem dziedziczenia i różnymi objawami ale podobną przyczyną – agregacją nieprawidłowo zwinionych białek w komórkach nerwowych. W trakcie badań wykazaliśmy spadek poziomu tych toksycznych białek – zmutowanej formy huntingtyny w HD oraz  $\beta$ -amyloidu i hiperfosforylowanej formy białka tau w AD. Stwierdziliśmy znaczną

indukcję procesu autofagii pod wpływem badanego izoflawonu, a zahamowanie funkcji lizosomów prowadziło do zmniejszonej efektywności usuwania toksycznych białek, co ostatecznie potwierdza udział tego procesu w ich degradacji. Do określenia działania genisteiny na poziomie organizmu wykorzystaliśmy szczurzy model AD. Zwierzęta te charakteryzują się postępującymi zaburzeniami pamięci, podobnie jak ludzka postać choroby. W teście labiryntu wodnego Morrisa wykazaliśmy znaczną poprawę pamięci u grupy szczurów, którym podawano genisteinę (150 mg/kg/dzień) przez okres miesiąca, w porównaniu z grupą kontrolną. Badanie lokomotoryki poruszających się swobodnie zwierząt przeprowadziliśmy w aktometrach. Szczurze modele AD charakteryzują się zwiększoną liczbą horyzontalnych, wertykalnych oraz ambulatoryjnych ruchów, jednak nasze badania dowiodły, że genisteina redukuje tę liczbę sprawiając, że jest ona nieodróżnialna od wyników zwierząt zdrowych. Podsumowując, proces autofagii, indukowany przez genisteinę, prowadzi do degradacji toksycznych białek będących przyczynami AD i HD, pozwalając na znaczną poprawę behawioru chorych zwierząt i jest nadzieją na leczenie chorób neurodegeneracyjnych spowodowanych agregacją makrocząsteczek w komórkach.

## II-U 2

JEDNOSTKA KATALITYCZNA TELOMERAZY JAKO POTENCJALNY  
CEL MOLEKULARNY W CHEMIOTERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Katarzyna Serbakowska

Katedra Technologii Leków i Biochemii, Politechnika Gdańska

*k.serbakowska@gmail.com*

Prawidłowe funkcjonowanie organizmu wymaga stabilności materiału genetycznego na poziomie komórkowym. Stabilność ta jest zapewniona dzięki szeregowi mechanizmów komórkowych oraz występowaniu telomerów. Telomery są to kompleksy złożone z niekodujących fragmentów DNA oraz ochraniających je białek, zwanych szelteryną. Kompleksy te, umiejscowione na końcach chromosomów, z jednej strony ochraniają końcowe jednoniciowe sekwencje DNA, a z drugiej odpowiadają za utrzymanie zdolności do podziałów komórkowych, do momentu powstania „problemu replikacyjnego końca”. Tzw. Limit Hayflicka uniemożliwia wystąpienie sytuacji, kiedy krytyczne skrócenie jednej z nici telomerowego DNA przy dalszych podziałach komórkowych spowodowałoby utracenie fragmentu materiału genetycznego kodującego funkcjonalne białka. Druga nić telomerowego DNA przyjmuje postać G-kwadrupleksu.

Telomeraza jest zdolna do odtworzenia DNA telomerowego, co pozwala na brak przejścia w stan spoczynku pomimo przekroczenia ilości podziałów wyznaczonych przez limit Hayflicka.

Jedną z cech odróżniających komórki nowotworowe od większości zdrowych komórek somatycznych człowieka jest zdolność do odtwarzania telomerów, co skutkuje unieśmiertelnieniem tych pierwszych. Szacuje się, że 90–80% z nich wykazuje się konstytutywną produkcją telomerazy. Fakt ten sprawia, że telomeraza stanowi obiecujący cel molekularny w projektowaniu leków przeciwnowotworowych.

Telomeraza składa się z dwóch podjednostek: katalitycznej, odpowiedzialnej za syntezę powtórzeń telomerowego DNA (TERT), oraz fragmentu nie-kodującego RNA stanowiącego matrycę do tej syntezy (TR). Opracowywane metody blokowania aktywnej telomerazy w komórkach wskazują na możliwość zahamowania



jej aktywności na różnych etapach. Inhibicja może zachodzić poprzez blokowanie dostępu enzymów do skróconych telomerów, które zachodzi poprzez stabilizowanie struktury G-kwadrupleksów. Ponadto hamowanie może przebiegać już na poziomie RNA,

dzięki czemu nie zachodzi produkcja aktywnego enzymu. Badane związki mogą inhibować aktywny enzym poprzez blokowanie jego podjednostki katalitycznej. Wszystkie mechanizmy umożliwiają specyficzne celowanie w komórki z aktywną telomerazą.

## II-U 3

### NOWY TEST Z DETEKcją CHEMILUMINESCENCYJNĄ JAKO ALTERNATYWA KLASYCZNEGO TESTU ELISA W DIAGNOSTYCE TOKSOPLAZMOZY

Lucyna Holec-Gąsior<sup>1</sup>, Bartłomiej Ferra<sup>1</sup>, Karolina Błaszowska<sup>1</sup>,  
Justyna Czechowska<sup>2</sup>, Karol Krzymiński<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

<sup>2</sup>Katedra Chemii Fizycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

holec@pg.edu.pl

*Toxoplasma gondii* jest bezwzględny pasażerem wewnątrzkomórkowym występującym powszechnie u człowieka oraz u większości zwierząt stałocieplnych. Zażycie *T. gondii* w bardzo wielu przypadkach przebiega bezobjawowo, jednakże może mieć poważne następstwa u osób z niedoborem odporności oraz u kobiet w ciąży, u których w wyniku zażycia dochodzi do poronień lub wrodzonej postaci toksoplazmozy u płodu, przebiegającej z ciężkimi powikłaniami. Niezmiernie istotne jest zatem wykonywanie badań rozpoznających toksoplazmozę. Pomimo dokładnego poznania etiologii wspomnianej choroby nadal stanowi ona poważny problem diagnostyczny. Z tego też powodu szuka się nowych rozwiązań, których przykładem może być zastosowanie w testach diagnostycznych rekombinantowych antygenów chimericznych pasożyta oraz oryginalnych znaczników akrydynowych i opracowywanie na ich podstawie nowych testów chemiluminescencyjnych (CLIA, ang. chemiluminescence immunoassay). Testy takie mogłyby być alternatywą dla powszechnie stosowanej metody ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) opartej na natywnym preparacie TLA (ang. *Toxoplasma lysate* antygen).

Celem pracy było opracowanie prototypu testu IgG CLIA opartego na nowym odczynniku immunochemicznym (tj. przeciwciiele wyznakowanym oryginalnym znacznikiem akrydynowym, Ab\*AE1), w którym do wykrywania swoistych przeciwciał antytoksoplazmowych w surowicach ludzkich wykorzystano trivalenty antygen chimeryczny *T. gondii* (SAG2-GRA1-ROP1). Otrzymane wyniki badań serodiagnostycznych porównano z wynikami uzyskanymi z wykorzystaniem klasycznego testu ELISA, w który zastosowano ten sam antygen chimeryczny. Dzięki przeprowadzonym badaniom stwierdzono, iż nowy test IgG CLIA jest bardziej czułą metodą diagnostyczną, która umożliwia lepsze i bardziej precyzyjne różnicowanie surowic pobranych od pacjentów chorych na toksoplazmozę od prób pacjentów zdrowych. Z tego też względu, test ten może stanowić alternatywę dla bardziej pracochłonnego testu kolorymetrycznego w badaniach wykrywających zażycie *T. gondii*.

Praca była finansowana z grantu Narodowego Centrum Nauki (nr UMO-2012/05/B/ST5/01680).

## II-U 4

### UŻYTECZNOŚĆ DIAGNOSTYCZNA REKOMBINANTOWYCH TETRAWALENTNYCH ANTYGENÓW CHIMERYCZNYCH *TOXOPLASMA GONDII*

Bartłomiej Ferra, Lucyna Holec-Gąsior, Karolina Błaszowska

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

bferra@o2.pl

Wewnątrzkomórkowy pasażer *Toxoplasma gondii* posiada zdolność do zarażania szerokiego spektrum zwierząt stałocieplnych, w tym i człowieka. Prawidłowe rozpoznanie inwazji *T. gondii* ma ogromne znaczenie w przypadku kobiet ciężarnych oraz pacjentów z niedoborami odporności. Obecnie diagnostyka toksoplazmozy opiera się głównie na wykorzystaniu antygenów natywnych w testach immunoenzymatycznych pozwalających na wykrywanie przeciwciał klas IgG, IgM oraz IgA jednak w niektórych przypadkach przeprowadzone badania dają niejednoznaczne wyniki. Z tego powodu poszukuje się nowych narzędzi diagnostycznych, głównie antygenów rekombinantowych, które zdecydowanie łatwiej, taniej, szybciej i bezpieczniej produkować niż antygeny natywne. Dodatkową zaletą wykorzystania tego typu preparatów antygenowych w serodiagnostyce toksoplazmozy jest łatwiejsza standaryzacja testów, jak również możliwość doboru białek cha-

rakterystycznych dla danej formy rozwojowej pasożyta, co może pozwolić na różnicowanie faz choroby.

Celem pracy było skonstruowanie systemów ekspresyjnych *Escherichia coli* do produkcji różnych wariantów rekombinantowych antygenów chimericznych składających się z czterech wybranych fragmentów immunodominujących antygenów pasożyta *T. gondii* (AMA1, GRA1, GRA2, MIC1, MAG1, ROP1, SAG1, SAG2), oraz opracowanie metodyki oczyszczania białek. W kolejnych etapach pracy oszacowano przydatność diagnostyczną uzyskanych preparatów białkowych do wykrywania zarażenia pasożytem w teście IgG oraz IgM ELISA z wykorzystaniem surowic ludzkich. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż nowo wyprodukowane antygeny chimeryczne mogą stanowić alternatywę dla poliwalentnego antygeny natywnego w wykrywaniu swoistych przeciwciał IgG anty-*T. gondii* zawar-

tych w surowicach pacjentów ze stwierdzoną toksoplazmozą, o czym świadczy wysoka czułość opracowanych testów IgG ELISA wynosząca 100%. Antygeny te charakteryzują się również wysokim potencjałem diagnostycznym do wykrywania swoistych przeciw-

ciał IgM w surowicach pobranych od pacjentów ze stwierdzoną wczesną fazą toksoplazmozy.

*Niniejsze badania zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu UMO-2015/17/B/NZ6/03480.*

## II-U 5

### ZASTOSOWANIE BIOGENNYCH NANOCZĄSTEK ZŁOTA W FOTODYNAMICZNEJ INAKTYWACJI DROBNOUSTROJÓW

Irena Maliszewska

Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska

*Irena.helena.maliszewska@pwr.edu.pl*

Wzrost liczby mikroorganizmów opornych na stosowane antybiotyki spowodował zainteresowanie alternatywnymi metodami zwalczania infekcji. Niszczenie drobnoustrojów za pomocą światła nazwano przeciwdrobnoustrojową terapią fotodynamiczną (APDT – ang. *antimicrobial photodynamic therapy*). Koncepcja APDT opiera się na znanym od dawna zjawisku tzw. fotosensytyzacji (fotouczulenia), które polega na tym, że pewne substancje (fotouczulacze/fotosensybilizatory) w obecności światła uczulają komórki drobnoustrojów, zwiększając ich wrażliwość na działanie światła widzialnego. Procesem inicjującym mechanizm fotodynamiczny jest absorpcja promieniowania przez cząsteczkę fotouczulacza, co powoduje jej wzbudzenie. Opisano dwa mechanizmy zjawiska fotosensytyzacji. W reakcjach typu I fotouczulacz absorbuje foton, co powoduje jego wzbudzenie i przejście z singletowego stanu podstawowego do singletowego stanu wzbudzonego.

Następnie w wyniku przejścia interkombinacyjnego, fotouczulacz przechodzi do wzbudzonego stanu trypletowego i w tej postaci może wzbudzać różne molekuly. Takie rodniki mogą dalej reagować z tlenem i tworzyć formy nadtlenkowe, jony ponadtlenkowe i rodniki hydroksylowe (nazywane ogólnie ROS – ang. *Reactive Oxygen Species*), które inicjują wolnorodnikowe reakcje łańcuchowe. Drugi typ reakcji fotouczulających obejmuje przeniesienie fotonu pomiędzy wzbudzoną cząsteczką fotouczulacza a cząsteczką tlenu. W wyniku tego procesu fotouczulacz wraca do stanu podstawowego, tlen zaś zostaje wzbudzony do stanu singletowego. Generowanie tlenu singletowego wydaje się spełniać kluczową rolę w fotodynamicznej cytotoxycznosci. W prezentowanej pracy pokazano możliwość zastosowania nanocząstek złota syntezowanych przez organizmy żywe jako systemu wspomagającego przeciwdrobnoustrojową efektywność terapii fotodynamicznej.

## II-U 6

### MECHANIZM PRZECIWGRZYBOWEGO DZIAŁANIA DEFENSYNY *GALLERIA MELLONELLA*

Katarzyna Grygorczuk<sup>1</sup>, Sylwia Stączek<sup>1</sup>, Aneta Sowa-Jasiłek<sup>1</sup>, Agnieszka Zdybicka-Barabas<sup>1</sup>, Monika Koziej<sup>1</sup>, Paweł Mak<sup>2,3</sup>, Kamil Deryło<sup>4</sup>, Marek Tchórzewski<sup>4</sup>, Jerzy Wydrych<sup>5</sup>, Krzysztof Skrzypiec<sup>6</sup>, Małgorzata Cytryńska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Immunobiologii, <sup>4</sup>Zakład Biologii Molekularnej, <sup>5</sup>Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

<sup>2</sup>Zakład Biochemii Analitycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński

<sup>3</sup>Małopolskie Centrum Biotechnologii, Kraków

<sup>6</sup>Laboratorium Analityczne, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

*k-grygorczuk@wp.pl*

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe, istotne składniki mechanizmów odporności wrodzonej, to niewielkie (3–10 kDa), w większości kationowe cząsteczki o właściwościach amfipatycznych. Dotychczas opisano ponad 2500 peptydów odpornościowych z organizmów eukariotycznych, w tym około dwustu u owadów. Defensyny (4–5 kDa), o strukturze stabilizowanej mostkami disiarczkowymi, są aktywne przeciw bakteriom, jak i grzybom. Jednym z mechanizmów przeciwdrobnoustrojowego działania defensyn jest tworzenie kanałów w błonie komórkowej patogenów, co prowadzi do utraty cytoplazmatycznych jonów potasu. *Candida albicans*, wchodzący w skład mikroflory błon śluzowych przewodu pokarmowego, oddechowego, moczowo-płciowego jest patogenem oportunistycznym, który w warunkach obniżonej odporności wywołuje infekcje powierzchniowe, a także groźne zakażenia układowe. Modelem doświadczalnym szeroko stosowanym w badaniach pato-

genów człowieka, m.in. *C. albicans*, jest barciak większy *Galleria mellonella*. Hemolimfa tego owada jest bogatym źródłem peptydów odpornościowych. Defensyna (DTLIGSCVWGATNYTSDC-NAECKRRGYKGGHCGSFLNVNCWCE) została oczyszczona z hemolimfy *G. mellonella* przy użyciu chromatografii RF-HPLC i sączenia molekularnego. Nasze wcześniejsze badania wykazały jej aktywność wobec *C. albicans* – izolatu klinicznego z jamy ustnej człowieka (MIC 8.5 μM), natomiast mechanizm działania tego peptydu nie został wyjaśniony. Biorąc pod uwagę dane literaturowe wskazujące na możliwość indukcji apoptozy w komórkach drożdżaków przez peptydy odpornościowe, przebadano wybrane markery tego procesu – aktywację metakaspazy oraz eksternalizację fosfatydyloseryny po inkubacji komórek *C. albicans* z defensyną *G. mellonella*. Stwierdzono, że defensyna nie powodowała aktywacji metakaspazy ani ekspozycji fosfatydyloseryny w zewnętrznej

warstwie błony komórkowej, co wskazuje na inny niż apoptoza, mechanizm przeciwrzybowego działania tego peptydu. Wykazano natomiast, że defensyna wiązała się do komórek *C. albicans*. Ponadto, obrazowanie przy użyciu AFM wykazało wyraźne zmiany topografii oraz właściwości powierzchni komórek *C. albicans* zachodzące pod wpływem defensyny *G. mellonella*.

Badania finansowano z grantu NCN 2012/05/B/NZ1/00033. Projekt został częściowo zrealizowany w Krajowym Laboratorium Multidyscyplinarnym Nanomateriałów Funkcjonalnych – Nano-Fun współfinansowanym ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka POIG.02.02.00-00-025/09.

## II-U 7

### OPORNOŚĆ IZOLATÓW *CANDIDA KRUSEI* NA KASPOFUNGINĘ

Martyna Mroczyńska, Anna Brillowska-Dąbrowska

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

annbrill@pg.edu.pl

W ostatnich latach zaobserwowano znaczny wzrost zakażeń grzybiczych ze względu na zwiększającą się liczbę pacjentów z obniżoną opornością. Z badań epidemiologicznych prowadzonych w Stanach Zjednoczonych wynika, iż *Candida* spp. jest czwartym w kolejności patogenem grzybiczym nabywanym w szpitalach, wywołującym infekcje wewnętrzne. Pod względem częstości występowania patogen ten zajmuje trzecie miejsce, a liczbę zakażeń szacuje się od 6 do 13,3 przypadków na 100 000 mieszkańców. Około 17 gatunków z rodzaju *Candida* może wywoływać infekcje, jednak 92–95% wszystkich zakażeń jest powodowana przez *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* i *C. krusei*. Do niedawna najczęstszą przyczyną kandydemii był *C. albicans*, jednak w ostatnich latach obserwuje się zwiększoną liczbę zakażeń gatunkami non-albicans, takim jak *C. glabrata* i *C. krusei*. Dotychczas w tego typu zakażeniach jako lek pierwszego rzutu stosowano należący do grupy azoli, flukonazol. Aczkolwiek ze względu na naturalną oporność grzybów z gatunków *C. glabrata* i *C. krusei*

obecnie to echinokandyny stały się najczęściej stosowanym lekiem w leczeniu kandydemii.

*C. krusei* jest patogenem przyczyniającym się do zakażeniach szpitalnych, występuje głównie u pacjentów zażywających leki immunosupresyjne lub cierpiących na nowotwory krwi. Szacuje się iż gatunki non-albicans są przyczyną kandydemii w 30–65% przypadków, z czego *C. krusei* jest przyczyną w około 2–25% przypadków. Aż 75% badanych izolatów *C. krusei* wykazuje naturalną oporność na flukonazol i jest uważany za wielolekoopronny gatunek. Śmiertelność przy zakażeniu tym patogenem oscyluje w granicach 40%.

Badanie wrażliwości izolatów *C. krusei* na kaspofunginę przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości – EUCAST (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Badanie obejmowało 17 izolatów *C. krusei* pochodzących z dwóch ośrodków w Polsce, Warszawy i Wrocławia. Przeprowadzone badania wykazują, iż wszystkie przebadane izolaty *C. krusei* wykazują oporność na kaspofunginę.

## II-U 8

### OPORNOŚĆ IZOLATÓW *ASPERGILLUS FUMIGATUS* NA IZAWUKONAZOL

Ewelina Kurzyk<sup>1</sup>, Marta Adamik<sup>1</sup>, Urszula Nawrot<sup>2</sup>, Katarzyna Włodarczyk<sup>2</sup>, Anna Brillowska-Dąbrowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

<sup>2</sup>Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

ewelinaurzyk@gmail.com

*Aspergillus fumigatus* jest grzybem pleśniowym szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. Może być przyczyną różnych infekcji. W ostatnich latach częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych powodowanych przez *A. fumigatus* dramatycznie wzrasta zwłaszcza u pacjentów oddziałów hematologicznych. Obecnie inwazyjne aspergilozy dotykają rocznie do 500 000 osób, 4 mln osób rocznie choruje na alergiczną aspergilozę, a 3 mln cierpi na przewlekłe alergiczne zapalenie płuc. Wzrasta także wskaźnik śmiertelności i wynosi on obecnie od 30% u pacjentów w dobrym stanie, do nawet 90% u pacjentów w grupie największego ryzyka (np. chorych na AIDS).

Lekami pierwszego rzutu w chorobach wywołanych przez *Aspergillus* sp. są azole. W terapii wykorzystywane są wankonazol, itraconazol i posakonazol. Azole – jako jedyna grupa związków – są jednocześnie szeroko wykorzystywane w rolnictwie jako środki ochrony roślin. Prowadzi to do selekcji szczepów opornych na azole. Od 1997 roku, kiedy po raz pierwszy stwierdzono występowanie opornych na azole izolatów *A. fumigatus* odnotowuje się

pojawianie się i wzrost ich ilości w wielu krajach świata. Izawukonazol jest nowym związkiem azolowym dopuszczonym przez Komisję Europejską w 2015 roku do stosowania u ludzi. Działa grzybobójczo, blokując syntezę ergosterolu – głównego składnika błon komórkowych grzyba. Skutkuje to osłabieniem budowy i czynności błony komórkowej.

Materiałem użytym do badań było 16 izolatów *A. fumigatus*. Osiem izolatów klinicznych (Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu) oraz osiem środowiskowych (korytarz oddziału Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu). W toku badań oznaczono wrażliwość izolatów na izawukonazol. Minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC) zostało wyznaczone według wytycznych EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility E.DEF 9.3.1).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na występowanie oporności na izawukonazol czterech z 16 izolatów *A. fumigatus*. Oporność obserwowano zarówno wśród szczepów klinicznych (2 izolaty), jak i środowiskowych (2 izolaty).



## II-U 9

## DETEKCJA KOMÓREK UŚPIONYCH, TOLERUJĄCYCH OBECNOŚĆ CZYNNIKÓW STRESOWYCH

Karolina Stojowska-Swędryńska, Ewa Laskowska

Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

karolina.stojowska@biol.ug.edu.pl

Stan uśpiania (*ang.* dormancy) jest stanem fizjologicznym bakterii, rodzajem strategii przetrwania w niekorzystnych warunkach środowiska. Stan ten nie prowadzi do wytworzenia oporności, lecz tolerancji na czynniki stresowe i służy utrzymaniu wyjściowej populacji. Znajdujące się w stanie uśpiania tzw. bakterie przetrwałe (*ang.* persister) i niedzielące się bakterie VBNC (*ang.* Viable But Nonculturable) po ustąpieniu czynników stresowych (np. antybiotykoterapii), są w stanie odtworzyć wyjściową populację, co w przypadku bakterii przetrwałych wymaga zastosowania prostej pożywki i standardowych warunków wzrostu, natomiast w przypadku resuscytacji bakterii VBNC niezbędne jest bogate podłoże i dodatkowe czynniki wzrostowe. Stan uśpiania jest szczególnie niebezpieczny w przypadku bakterii patogennych, które przetrwały antybiotykoterapię, mogą wywołać bakterie nawrotowe. Stąd niezwykle ważna jest szybka detekcja oszacowanie liczebności bakterii przetrwałych i VBNC oraz wyznaczenie czynników indukujących i wspomagających stan uśpiania.

Komórki znajdujące się w stanie uśpiania są żywe, ale nie dzielą się i wykazują minimalną aktywność metaboliczną, zatem klasyczne metody detekcji, np. metoda posiewu na podłoże z dodatkiem antybiotyku, zawodzą. Stan ten nie jest wywołany trwałą

zmianą w genomie lub obecnością dodatkowego elementu genetycznego, zatem nie może być bezpośrednio wykryty na drodze analizy DNA. Istnieją jednak doniesienia, że zarówno VBNC jak i *persisters* akumulują ppGpp – cząsteczkę sygnałową, hamującą proces translacji w warunkach stresu oraz aktywującą tzw. odpowiedź ścisłą (*ang.* stringent response), efektem czego jest wstrzymanie inicjacji replikacji genomowego DNA i zatrzymanie cyklu komórkowego (*ang.* cell cycle arrest).

Me-ddLMS PCR (*ang.* Methylation sensitive double digestion Ligation Mediated PCR) jest nową metodą, która wykorzystując enzymy restrykcyjne, wrażliwe na *dam* metylację, umożliwia rozpoznanie hemimetylowanego DNA w obrębie sekwencji *oriC*. Komórka bakteryjna ze względu na zjawisko sekwestracji, utrzymuje stan hemimetylacji DNA w *oriC* oraz w sekwencji promotora *dnaA* przez ok. 1/3 czasu generacji. Dzięki temu możliwe jest wykrycie zainicjowanego, ale nie zakończonego procesu replikacji genomowego DNA, co wydaje się być charakterystyczne dla komórek będących w stanie uśpiania. Metoda ta umożliwia detekcję komórek uśpionych w hodowli w obecności czynnika stresowego, z zastosowaniem prostych, szeroko dostępnych narzędzi molekularnych.

## II-U 10

ROLA „TAJEMNICZEJ” OTWARTEJ RAMKI ODCZYTU 63 (ORF63) W ROZWOJU FAGA  $\lambda$  ORAZ FAGA  $\Phi 24_B$ , PRZEDSTAWICIELA FAGÓW PRZENOSZĄCYCH GENY TOKSYN SHIGAAleksandra Dydecka<sup>1</sup>, Sylwia Bloch<sup>1</sup>, Bożena Nejman-Faleńczyk<sup>1</sup>, Gracja Topka<sup>1</sup>, Agnieszka Necel<sup>1</sup>, Katarzyna Licznarska<sup>1</sup>, Tomasz Gąsior<sup>2</sup>, Grzegorz Węgrzyn<sup>1</sup>, Alicja Węgrzyn<sup>2</sup><sup>1</sup>Wydział Biologii, Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański<sup>2</sup>Institut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Gdańsk

aleksandra.dydecka@phdstud.ug.edu.pl

Głównym czynnikiem wirulencji enterokrwotocznych szczepów *Escherichia coli* (EHEC) jest toksyna Shiga kodowana przez geny zlokalizowane w genomie profagów lambdoidalnych. Ich ekspresja zachodzi dopiero po indukcji profaga i rozpoczęciu przez niego cyklu litycznego. Bakteriofagi lambdoidalne, z których najbardziej znanym przedstawicielem jest fag  $\lambda$ , wykazują wysokie podobieństwo w cyklu życiowym i organizacji genomu.

Potencjalnymi czynnikami biorącymi udział w regulacji rozwoju fagów mogą być produkty kodowane w rejonie *exo-xis* genomobakteriofaga  $\lambda$ , w obrębie którego znajdują się geny i otwarte ramki odczytu (ORFs), charakteryzujące się wysoko zakonserwowaną wśród przebadanych fagów lambdoidalnych sekwencją ( $\lambda$  i Stx wykazują >80% podobieństwa). Z dotychczasowych doniesień wynika, że mogą one powodować tymczasowe zahamowanie podziału komórki oraz inicjacji replikacji DNA gospodarza, a także brać udział w decyzji o wyborze drogi rozwoju bakteriofaga: liza vs. lizogenia. Badania naszego zespołu wykazały, że profil ekspresji kluczowych genów fagowych, jak i genów oraz otwartych ramek odczytu z rejonu *exo-xis* jest odmienny podczas procesu infekcji i indukcji. Najnowsze wyniki badań, wskazują, iż dele-

cja rejonu *exo-xis* z genomu faga  $\Phi 24_B$  opóźnia proces indukcji profaga w komórkach bakteryjnych *E. coli* po potraktowaniu ich nadtlaniem wodoru, a także znacznie obniża poziom ekspresji fagowych genów regulatorowych. Jak dotąd nie określono funkcji poszczególnych produktów zakodowanych w rejonie *exo-xis* fagów lambdoidalnych. Z tego względu postanowiłam sprawdzić, jaki wpływ na regulację rozwoju ww. fagów może mieć usunięcie z ich genomów poszczególnych elementów rejonu *exo-xis*.

Wykonane przez nas badania wskazują, że znaczącą rolę w tym procesie może odgrywać *orf63*. Delecja wspomnianego fragmentu wpływa na czas indukcji wymuszonej nadtlaniem wodoru oraz indukcji w warunkach komplementacji genotypowej i nadprodukcji z wykorzystaniem wysokokopijnych plazmidów. Dodatkowo zwiększa przeżywalność bakterii *E. coli* po infekcji rekombinowanymi fagami i podwyższa wydajność lizogenizacji gospodarza. Moje obserwacje wykazały, że analizowane fagi wykazują dużą wrażliwość na działanie: SDS, pH4 i pH10. Interesujące wyniki zauważyłam również analizując wewnątrzkomórkowy rozwój lityczny analizowanych fagów. Uzyskane rezultaty mogą doprowadzić w przyszłości do opracowania efektywnych metod leczenia infekcji EHEC.

## II-U 11

### PORÓWNANIE DZIAŁANIA PRZECIWDROBNOUSTROJOWEGO OLEJKÓW ETERYCZNYCH Z PELARGONII (*PELARGONIUM l'Hér*)

Adriana Pacia, Małgorzata Nabrdalik, Agnieszka Dołhańczuk-Śródka

Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski  
a.pacia@o2.pl

Od wielu lat trwają poszukiwania, naturalnych substancji aktywnych, które mogłyby zastąpić syntetyczne konserwanty stosowane w przemyśle kosmetycznym. Olejki eteryczne są poddawane wielu badaniom określającym ich aktywność wobec chorobotwórczych bakterii i grzybów. Celem przeprowadzonych badań było porównanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych olejków geraniowych pozyskanych z trzech różnych gatunków pelargonii.

Do badań wykorzystano komercyjne olejki: Avicenna-Oil (*Pelargonium odorantissimum*), ETJA (*P. graveolens*) oraz Aromatika (*P. roseum*). Oceniono aktywność przeciwdrobnoustrojową ich etanolowych roztworów w zakresie stężeń od 0,25 do 10,0  $\mu\text{l/ml}$ . Materiał biologiczny stanowiły szczepy referencyjne z kolekcji ATCC: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Candida albicans*. Do badań wrażliwości szczepów na olejek wykorzystano metody: seryjnych rozcieńczeń w bulionie, seryjnych rozcieńczeń w agarze oraz metodę dyfuzyjno-krążkową. Na podstawie wyników wyznaczono MIC oraz MBC/MFC.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż najmniej aktywnym olejkiem był olejek pozyskany z *P. odorantissimum*, a najbardziej aktywny okazał się olejek otrzymany z *P. graveolens*. Spośród badanych szczepów najbardziej opornym był *P. aeruginosa*, dla którego wartość MIC była równa 10  $\mu\text{l/ml}$  w obecności wszystkich analizowanych olejków. Wartość MBC ustalono jedynie dla olejku Aromatika i wynosiła 10  $\mu\text{l/ml}$ . Największą wrażliwością na działanie olejków charakteryzował się szczep *C. albicans*. Minimalne stężenie hamujące jego wzrost, w obecności wszystkich olejków, wynosiło 0,5  $\mu\text{l/ml}$ . Badane olejki cechowały się różnym działaniem bójczym wobec *C. albicans*. Dla olejku pozyskanego z *P. graveolens* MFC wynosiło 1,0  $\mu\text{l/ml}$ , dla *P. roseum* 2,5  $\mu\text{l/ml}$ , a dla *P. odorantissimum* 5,0  $\mu\text{l/ml}$ .

Badane olejki geraniowe (zależnie od gatunku pelargonii i jej pochodzenia) charakteryzowały się wysoką aktywnością przeciwdrobnoustrojową, co potwierdza możliwość wykorzystania ich jako naturalnych konserwantów w przemyśle kosmetycznym.

## II-U 12

### WRAŻLIWOŚĆ BAKTERII NA DZIAŁANIE EKSTRAKTU POLIFENOLOWEGO Z LIŚCI PIGWOWCA

Magdalena Efenberger-Szmechtyk, Agnieszka Nowak, Paulina Pęczek, Agata Czyżowska

Institut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka, Łódź  
magdalena.efenberger-szmechtyk@dokt.p.lodz.pl

W ostatnich latach, coraz więcej badań skupia się na opracowaniu naturalnych metod konserwacji żywności wykorzystujących substancje bioaktywne zawarte w surowcach roślinnych, zwłaszcza polifenole. Związki polifenolowe są silnymi przeciwutleniaczami, ale wykazują także aktywność przeciwdrobnoustrojową. Najbogatszym ich źródłem są liście.

Celem pracy było więc zbadanie wpływu ekstraktu polifenolowego pozyskanego z liści pigwowca na wzrost wybranych bakterii typowych dla środowiska mięsnego.

W ramach badań przeprowadzano wodną ekstrakcję polifenoli z liści pigwowca pośredniego (*Chaenomeles superba*) zebranych w lipcu. W ekstrakcie oznaczano zawartość polifenoli ogółem metodą Folin-Ciocalteu i aktywność antyoksydacyjną metodą rodnika DPPH. Przeprowadzano identyfikację związków metodą LC-MS i oznaczano ich zawartość metodą HPLC. Badano wpływ różnych stężeń ekstraktu z liści pigwowca (1–10%) na wzrost bak-

terii typowych dla środowiska mięsnego: *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Moraxella osloensis* ATCC10973, *Brochothrix thermosphacta* MMAP4. Z użyciem programu DMfit obliczano parametry wzrostu bakterii: właściwą szybkość wzrostu, czas trwania lag fazy i końcowe namnożenie. Metodą barwienia fluorescencyjnego z użyciem oranżu akrydyny, określano zmiany w żywotności bakterii spowodowane działaniem ekstraktu z liści pigwowca.

Zawartość polifenoli ogółem w ekstrakcie z liści pigwowca była wysoka i wynosiła 15,6 mg  $\frac{\text{mg}_{\text{kwasu galusowego}}}{\text{g}}$  liści, a stopień inhibicji rodnika DPPH wynosił 83,6%. W liściach pigwowca zidentyfikowano polifenole należące do grupy kwasów fenolowych i flawonoidów (flawony, flawanony i flawonole).

Stwierdzono, że ekstrakt z liści pigwowca wpływa na parametry wzrostu bakterii obniżając właściwą szybkość wzrostu i/lub wydłużając czas trwania lag fazy. Zaobserwowano także zmniejszenie żywotności bakterii pod wpływem ekstraktu z liści pigwowca.

## II-U 13

### HAMOWANIE INWAZYJNOŚCI KOMÓREK CZERNIAKA POPRZEZ STOSOWANIE KOMBINACJI SIRNA DLA N-KADHERYNY I INHIBITORÓW KINAZ BIAŁKOWYCH

Dorota Ciołczyk-Wierzbicka, Dorota Gil, Piotr Laidler

Katedra Biochemii Lekarskiej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków  
mbciolcz@cyf-kr.edu.pl

Migracja i inwazja komórkowa jest kluczowym czynnikiem wpływającym na progresję nowotworową. N-kadheryna odgrywa zasadniczą rolę w procesie inwazji komórkowej raka piersi, prostaty,

żołądka, jelita grubego i czerniaka. Najnowsze prace sugerują, że oddziaływanie cząsteczki N-kadheryny z fibroblastycznym czynnikiem wzrostu, zapobiega dimeryzacji receptora i powoduje aktywa-

cję szlaku MAPkinazowego, który prowadzi do nasilenia migracji, sekrecji metaloproteinaz oraz wzrostu inwazyjności komórkowej.

Celem badania było poznanie potencjalnej roli N-kadheryny i wybranych kinaz białkowych: PI3K, ERK1/2 i mTOR w inwazji komórek czerniaka. Komórki czerniaka transfekowano małym interferującym RNA (siRNA), dla genu N-kadheryny (*CDH2*). Inhibitory LY294002 (PI3K), U0126 (ERK1/2) i Everolimus (mTOR) zastosowano do hamowania wybranych kinaz szlaków sygnałowych. Migrację komórek *in vitro* badano stosując komory

Boydena pokryte matrycelem, a analizę aktywności metaloproteinaz: MMP-2 i MMP-9 przeprowadzono w oparciu o technikę zymogramu. Hamowanie inwazyjności komórek czerniaka po zastosowaniu optymalnej kombinacji inhibitorów kinaz białkowych i siRNA dla N-kadheryny prowadziło do znacznego zmniejszenia ekspresji i aktywności metaloproteinaz, a także zmniejszenia inwazji komórek czerniaka.

Wyniki wskazują również, że N-kadheryna, jak również badane kinazy, należy uznać za potencjalny cel w leczeniu czerniaka.

## II-U 14

### FUZYJNE POLIMERAZY DNA JAKO UŻYTECZNE NARZĘDZIA W AMPLIFIKACJI TRUDNYCH MATRYC

Marta Śpibida, Marcin Olszewski, Beata Krawczyk, Beata Zalewska-Piątek, Rafał Piątek

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

*spibida.marta@gmail.com*

Obecnie reakcje PCR wykazują bardzo szerokie zastosowanie w diagnostyce, biologii molekularnej czy inżynierii genetycznej. Efektywność tych reakcji rozumiana jako wydajność i wierność przeprowadzonej amplifikacji jest nieodłącznie związana ze stosowaną polimerazą i warunkami prowadzenia reakcji PCR. Liczne problemy w reakcji PCR napotykamy podczas amplifikacji tzw. trudnych matryc. Są to przede wszystkim duże produkty, produkty o dużej zawartości par GC czy matryce z próbek klinicznych lub środowiskowych posiadających liczne inhibitory polimeraz DNA. Jednym z rozwiązań może być zastosowanie polimeraz fuzyjnych, które posiadają dodatkową domenę wiążącą DNA.

Przedstawione przez nas badania wskazują, że obecność domeny DBD z *Pyrococcus furiosus* zastosowanej jako składowa w fuzyjnej polimerazie DNA poprawia podstawowe cechy enzymu tj. termostabilność, procesywność czy czułość reakcji. Wszystko to sprawia, że polimeraza wzbogacona o domenę DBD jest idealnym rozwiązaniem w przypadku prowadzenia amplifikacji PCR

z wykorzystaniem trudnych matryc. Dwukrotne wydłużenie czasu półtrwania polimerazy fuzyjnej *PfuDBDlig-TaqSw* stosunku do polimerazy odnośnikowej *TaqS*, z 10 do 23 min. w 99°C ma swoje bezpośrednie przełożenie w zwiększonej zdolności polimerazy fuzyjnej do amplifikacji produktów bogatych w pary GC. Prawie 3-krotna poprawa procesywności polimerazy fuzyjnej (z 8 nt do 22 nt) wpływa na zwiększenie wydajności amplifikacji dużych produktów. Polimeraza *PfuDBDlig-TaqS* okazuje się również wykazywać większą odporność na obecność inhibitorów. Toleruje prawie 16-krotnie wyższe stężenie laktoferyny oraz 8-krotnie wyższe stężenie heparyny w mieszaninie reakcyjnej, które są jednymi z podstawowych inhibitorów z próbek klinicznych i środowiskowych.

Obecność białka wiążącego DNA okazała się wpływać korzystnie na cechy enzymu pożądane w biologii molekularnej czy diagnostyce molekularnej. Polimeraza fuzyjna może znaleźć zastosowanie w wielu dziedzinach m.in. w diagnostyce podczas amplifikacji z próbek klinicznych lub środowiskowych.

## II-U 15

### AKTYWNOŚĆ PRZECIWBAKTERYJNA PROTEGRYNY-1 WOBEC GRONKOWCÓW WYIZOLOWANYCH OD ZWIERZĄT

Małgorzata Jarosiewicz<sup>1</sup>, Wojciech Kamysz<sup>2</sup>, Ewa Kwapisz<sup>1</sup>, Katarzyna Garbacz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Gdański Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

*mjar@gumed.edu.pl*

Gronkowce są jednym z najczęstszych patogenów zarówno człowieka jak i zwierząt. Do patogennych gronkowców należą *Staphylococcus aureus* wywołujący zakażenia u ludzi i zwierząt oraz *S. pseudintermedius*, wywołujący głównie zakażenia u psów. Transmisja gronkowców pomiędzy ludźmi a zwierzętami jest istotnym zjawiskiem zarówno w patogenezie jak i epidemiologii zakażeń gronkowcowych.

Drugi istotny problem stanowi ich narastająca lekooporność. Dobrą alternatywą w stosunku do klasycznych antybiotyków wydają się peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. AMPs – Antimicrobial Peptides), które są wytwarzane przez wszystkie organizmy żywe jako podstawowy mechanizm obrony nieswoistej. Do AMPs należą m.in. wytwarzane przez neutrofile protegryny.

Są to niewielkie peptydy (16–18 aminokwasów), które charakteryzują się szerokim spektrum przeciwdrobnoustrojowym.

Przeprowadzone badania miały na celu określenie aktywności przeciwbakteryjnej *in vitro* protegryny-1 w stosunku do szczepów *S. aureus* i *S. pseudintermedius* wyizolowanych z zakażeń od zwierząt. Badania przeprowadzono na 47 szczepach *S. pseudintermedius* i 6 *S. aureus* wyizolowanych z zakażeń od zwierząt (głównie psów). Gronkowce zidentyfikowano metodą polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP) fragmentu zmiennego genu acetylotransferazy fosforanowej (*pta*). Peptyd otrzymano metodą Fmoc na stałym nośniku polimerowym. Wartości MIC (minimal inhibitory concentration) protegryny określono metodą seryjnych rozcieńczeń peptydu w bulionie Mueller-Hinton, na 96-dółkowych

plytkach mikrotitracyjnych. Wartości MBC (minimal bactericidal concentration) wyznaczono poprzez wysianie na podłoże TSB 10  $\mu$ l z każdej studzienki gdzie nie obserwowano wzrostu.

Protegryna-1 była aktywna wobec wszystkich badanych szczepów gronkowców w zakresach stężeń: od 2 do 8  $\mu$ g/ml (MIC<sub>50</sub> 2  $\mu$ g/ml, MIC<sub>90</sub> 4  $\mu$ g/ml, MBC od 2 do 8  $\mu$ g/ml) dla *S. pseudintermedius* oraz

od 8 do 32  $\mu$ g/ml (MIC<sub>50</sub> 8  $\mu$ g/ml, MIC<sub>90</sub> 32  $\mu$ g/ml, MBC od 8 do 32  $\mu$ g/ml) dla *S. aureus*.

Protegryna-1 jest skutecznym związkiem przeciwbakteryjnym wobec gronkowców izolowanych od zwierząt. Odzwierzęce gronkowce z gatunku *S. pseudintermedius* wykazują większą wrażliwość na protegrynę-1 niż gronkowce z gatunku *S. aureus*.

## II-U 16

### $\alpha$ -1,3-GLUKAN, SKŁADNIK ŚCIANY KOMÓRKOWEJ GRZYBÓW – NOWY WZORZEC MOLEKULARNY PATOGENÓW?

Sylwia Stączek<sup>1</sup>, Iwona Wojda<sup>1</sup>, Adrian Wiater<sup>2</sup>, Małgorzata Pleszczyńska<sup>2</sup>, Katarzyna Grygorczuk<sup>1</sup>, Monika Koziej<sup>1</sup>, Wojciech Brzana<sup>1</sup>, Agnieszka Zdybicka-Barabas<sup>1</sup>, Małgorzata Cytryńska<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Immunobiologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

<sup>2</sup> Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

s.staczek@poczta.umcs.lublin.pl

Na powierzchni każdego mikroorganizmu chorobotwórczego znajdują się charakterystyczne struktury, określane jako wzorce molekularne związane z patogenami (ang. Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs), które są rozpoznawane przez układ odpornościowy zwierząt oraz indukują reakcje immunologiczne. Szeroko opisywaną w literaturze, grzybową cząsteczką zaliczaną do tej grupy, jest  $\beta$ -1,3-glukan. Innym polisacharydowym składnikiem ściany komórkowej grzybów, w tym chorobotwórczych dla człowieka, np. *Histoplasma capsulatum*, czy *Blastomyces dermatitidis*, jest  $\alpha$ -1,3-glukan.

Celem prezentowanych badań była analiza odpowiedzi immunologicznej gąsienic *Galleria mellonella* podanie  $\alpha$ -1,3-glukanu, wyizolowanego ze ściany komórkowej grzyba *Aspergillus niger*.

Iniekcja  $\alpha$ -1,3-glukanu do hemocełu gąsienic hamowała aktywność układu oksydazy fenolowej. Sugeruje to udział  $\alpha$ -1,3-glukanu w blokowaniu procesu melanizacji, jednej z pierwszych reakcji owadana zakażenie. Wyniki badań uzyskanych metodą dyfuzji radialnej wykazały wzrost aktywności lizozymu oraz pojawienie się aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie gąsienic immunizowanych  $\alpha$ -1,3-glukanem. Aktywność anty-*E. coli* została potwierdzona metodą bioautografii. Stosując metodę dyfuzji

radialnej na płytkach z *A. niger* stwierdzono ponadto, że po podaniu gąsienicom  $\alpha$ -1,3-glukanu, dochodzi do indukcji odpowiedzi przeciwgrzybowej. Rozdział elektroforetyczny białek hemolimfy gąsienic immunizowanych  $\alpha$ -1,3-glukanem uwidocznił pojawienie się dodatkowych prążków o masie poniżej 10 kDa, odpowiadających peptydom przeciwdrobnoustrojowym. Analiza poziomu ekspresji genów z wykorzystaniem Real Time qPCR wykazała, że ilość transkryptu dla genów cekropiny oraz owadziego inhibitora metaloproteaz wzrasta dwukrotnie w ciele tłuszczowym gąsienic immunizowanych  $\alpha$ -1,3-glukanem. Natomiast poziom ekspresji genów peptydów o aktywności przeciwgrzybowej – galierimycyny i galiomycyny po podaniu  $\alpha$ -1,3-glukanu wzrósł ponad czterokrotnie.

Wykazano, że w odpowiedzi na  $\alpha$ -1,3-glukan u *G. mellonella* dochodzi do indukcji ekspresji genów dla peptydów przeciwgrzybowych, a w hemolimfie pojawia się aktywność przeciwgrzybowa. Uzyskane wyniki wskazują, że  $\alpha$ -1,3-glukan, jako polisacharydowy składnik ściany komórkowej grzybów *A. niger*, może odgrywać rolę cząsteczki PAMP.

Badania finansowane są przez Narodowe Centrum Nauki (Kraków, Polska) w ramach projektu 2013/09/N/NZ6/00838.



## POSTERY

## II-P 1

**WYKORZYSTANIE SEKWENJCI REPETYTYWNYCH L1  
W OZNACZANIU GLOBALNEGO POZIOMU METYLACJI DNA**

Jolanta Kamińska, Bartosz Górniewicz, Paweł Sachadyn

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej

jolantakaminska6@gmail.com

Metylacja DNA jest epigenetycznym mechanizmem regulacji ekspresji genów, który u ssaków polega na przyłączeniu grupy metylowej w pozycji 5 pierścienia cytozyny, przede wszystkim w obrębie dinukleotydów CpG, przez metylotransferazy DNA. Zazwyczaj metylacja DNA sekwencji regulatorowych, takich jak promotory czy wzmacniacze transkrypcji, skutkuje wyciszeniem transkrypcji regulowanych przez nie genów. Utworzenie i utrzymanie prawidłowego wzoru metylacji DNA w obrębie genomu jest konieczne dla prawidłowego działania komórki i pozwala na specjalizację komórek w tkanki pełniące odmienne funkcje. Zaburzenia prawidłowego wzoru i poziomu metylacji DNA, takich jak globalny spadek metylacji DNA, skutkuje aktywacją onkogenów i transpozonów, co prowadzi do zmniejszenia stabilności genomu i rozwoju chorób nowotworowych. Wskazuje to na potrzebę szybkiej

i łatwej metody do oznaczania globalnego poziomu metylacji DNA w celach diagnostycznych, np. ryzyka zapadalności na choroby, prognozy leczenia; lub badawczych, ocena aktywności związków o aktywności inhibitorów metylotransferaz DNA.

Globalny poziom metylacji DNA może być oszacowany na podstawie metylacji DNA regionów repetytywnych, takich jak długie rozproszone elementy jądrowe (ang. LINE, Long Interspersed Nuclear Elements) L1, które u człowieka i myszy stanowią około 18% genomu, lub krótkie rozproszone elementy jądrowe (ang. SINE, Short Interspersed Nuclear Elements) Alu u ludzi i B1 u myszy, które stanowią odpowiednio około 11% i 3% genomu. Proponujemy metodę opartą na trawieniu genomowego DNA za pomocą zależnych lub wrażliwych na metylację DNA enzymów restrykcyjnych oraz następującą po nim ilościową reakcją PCR.

## II-P 2

**BAKTERYJNE TOPOIZOMERAZY TYPU IIA JAKO MOLEKULARNY CEL  
DZIAŁANIA HYBRYDY 1,2,4-TRIAZOLU Z CIPROFLOKSACYNĄ**Aleksandra Strzelczyk<sup>1</sup>, Tomasz Plech<sup>2</sup>, Barbara Kaproń<sup>2</sup>, Paweł Stączek<sup>1</sup><sup>1</sup>Zakład Genetyki Drobnoustrojów, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki<sup>2</sup>Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Wydział Farmacji, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

aleksandra.strzelczyk@biol.uni.lodz.pl

Obecnie obserwuje się ciągły wzrost wskaźników zachorowalności i śmiertelności wywołanych przez szczepy patogene odporne na dotychczas stosowane związki przeciwbakteryjne. Światowa Organizacja Zdrowia uznała problem lekooporności drobnoustrojów za jedno z trzech największych zagrożeń dla zdrowia publicznego na całym świecie. Należy jednak pamiętać, że problem nabywania lekooporności przez bakterie nie jest związany jedynie ze zwiększeniem śmiertelności na skutek zachorowania na określona chorobę infekcyjną, ale stanowi także ogromny problem dla szeroko pojętej współczesnej medycyny. Wielolekooporne szczepy, przy jednoczesnym braku nowych, efektywnych związków antybakteryjnych, mogą stać się realnym zagrożeniem dla tak obecnie rutynowych działań medycznych jak zabiegi chirurgiczne, transplantacje, chemioterapia przeciwnowotworowa czy opieka neonatologiczna. Jednocześnie, pomimo ciągłego wzrostu liczby izolowanych szczepów opornych na większość obecnie stosowanych antybiotyków, od kilkunastu lat obserwuje się zdecydowany spadek wprowadzanych do leczenia nowych związków przeciwbakteryjnych. Dlatego niezmiernie istotne jest ciągle poszukiwanie nowych, alternatywnych leków.

Topoizomerazy typu IIA stanowią atrakcyjny cel molekularny dla opracowania nowych leków przeciwbakteryjnych. Enzymy te, zaangażowane są w tak istotne procesy jak: replikacja, transkryp-

cja, segregacja chromosomu czy rekombinacja, a zahamowanie ich funkcji prowadzi do śmierci komórki bakteryjnej. Badane przez nas związki stanowiące hybrydy ciprofloksacyny z pochodnymi 1,2,4-triazolu wykazują silne działanie przeciwbakteryjne, w kilku przypadkach przewyższające aktywność samej ciprofloksacyny. Wykazano również, zahamowanie aktywności gyrazy do wprowadzenia negatywnych superskrętów do cząsteczki DNA i zdolności topoizomerazy IV do usuwania katenatów powstałych po replikacji. Badane pochodne wykazują również silną aktywność hamującą zdolność topoizomerazy IV z *Escherichia coli*, jak i *Staphylococcus aureus* do relaksacji skręconej cząsteczki DNA. Ponadto, zaobserwowano, że niektóre pochodne ciprofloksacyny działają jako inhibitory podjednostki GyrB/ParE ograniczając hydrolizę ATP przez topoizomerazy typu IIA. Wyższa aktywność przeciwbakteryjna wybranych pochodnych w porównaniu z ciprofloksacyną, niska cytotoksyczność oraz wielokierunkowe hamowanie funkcji bakteryjnych topoizomeraz sprawiają, że hybrydy ciprofloksacyny z pochodnymi 1,2,4-triazolu mogą stać się w przyszłości skuteczną alternatywą w leczeniu infekcji wywołanych przez szczepy wielolekooporne.

Badania zostały sfinansowane ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego przyznanych w ramach grantu Iuventus Plus Nr IP2014 037473.

## II-P 3

**ZASTOSOWANIE BIODEGRADOWALNYCH OPATRUNKÓW (MIKROMATERIAŁÓW BIAŁKOWYCH ZWIĄZANYCH Z KERATYNĄ) W TRUDNO GOJĄCYCH SIĘ RANACH CUKRZYCOWYCH**

Adriana Muchowska<sup>1</sup>, Piotr Lipiński<sup>1</sup>, Joanna Matalińska<sup>1</sup>, Krzysztof Różycki<sup>3</sup>,  
Aleksandra Misicka<sup>1</sup>, Piotr Kosson<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Neuropeptydów, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

<sup>2</sup>Środowiskowe Laboratorium Badań Toksykologicznych CePT

<sup>3</sup>Środowiskowe Laboratorium Syntezy Chemicznej CePT

amuchowska@imdik.pan.pl

Jednym z wielu problemów cywilizacyjnych jest leczenie trudno gojących się ran, np. ran cukrzycowych, a jak wiadomo liczba zachorowań na cukrzycę wzrasta z roku na rok.

Celem pracy było zaprojektowanie i zbadanie przydatności biodegradowalnych opatrunków opartych na keratynie. Keratyna stanowi interesujący surowiec, gdyż jest łatwo dostępna i charakteryzuje się zdolnością do samoorganizacji, ma również pozytywny wpływ na proliferację komórek, jest biokompatybilna i biodegradowalna. Modelem badawczym, były szczury z wyindukowaną cukrzycą, u których na grzbiecie wytworzono dwie rany oparzeniowe (kontrolną i badaną). Surowcem wyjściowym dla opatrunków była włośna z alpaki, poddana procesom obróbki enzymatycznej i dodatkowo inkrustowana związkami wykazującymi działanie biologiczne: związkami przeciwbólowymi (bifalinią), związkami przeciwbakteryjnymi (D76 i P71) oraz związkami o działaniu przeciwbólowym, jak również stymulującym proliferację fibroblastów (AA-3020). Na ranę nakładano biodegradowalny opatrunek w jednej z przytoczonych postaci: zasyпки, zasyпки inkrustowa-

nej związkami, zasyпки i maści inkrustowanej związkami (terapia skojarzona), maści inkrustowanej związkami i maści komercyjnej. Gojenie się ran pod wpływem biodegradowalnych opatrunków porównywano do gojenia się ran kontrolnych (bez zastosowania opatrunku lub z zastosowaniem maści komercyjnej Iruzol® mono). Proces gojenia się rany został oceniony na podstawie szybkości zarastania rany, wyglądu makroskopowego i mikroskopowego (barwienia hemotaksylina i eozyna, trójbarwnego wg Massona).

Z przeprowadzonych badań wynika, że biodegradowalne opatrunki keratynowe wzbogacone dodatkowo w badane związki (bifalinię, D76, P71, AA-3020) mogą wspomagać angiogenezę, regenerację włókien kolagenowych i naskórkowanie.

Na posterze zostaną pokazane szczegółowe wyniki procesu gojenia się ran w zależności od czasu i stosowanego opatrunku.

*Podziękowania. Prof. Andrzejowi W. Lipkowskiemu inicjatorowi projektu „Zastosowanie opatrunków biodegradowalnych w leczeniu trudno gojących się ran”.*

## II-P 4

**WPLYW KINAZY AMPK NA REGULACJĘ CYTOSZKIELETU KOMÓREK PODOCYTARNYCH I PRZEPUSZCZALNOŚĆ BARIERY FILTRACYJNEJ W HIPERGLIKEMII**

Agnieszka Piwkowska, Maria Szrejder, Patrycja Rachubik, Stefan Angielski, Dorota Rogacka

Zespół Kliniczno-Badawczy Molekularnej i Komórkowej Nefrologii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

apiwkowska@imdik.pan.pl

Kluczowym elementem kłębuszkowej bariery filtracyjnej są podocyty, które posiadają w swoich wypustkach stopowatych rozbudowany cytoszkielet aktynowy. Wypustki stopowate sąsiadnych podocytów tworzą strukturę błony szczelinowej. Do dzisiaj nie są znane mechanizmy oraz białka przenoszące sygnał z kompleksu białek szczelinowych i regulujące dynamikę zmian cytoszkieletu aktynowego. Wiadomo, że istotną rolę w regulacji przepuszczalności bariery filtracyjnej odgrywają jony wapnia. Wykazano, że nadekspresja kanału wapniowego TRPC6 w podocytach prowadzi do dezorganizacji F-aktyny, zniszczenia wyrostków stopowatych i zwiększonej filtracji kłębuszkowej. W cukrzycy przewlekła hiperglikemia zaburza homeostazę energetyczną, której głównym czujnikiem jest aktywowana przez AMP kinaza białkowa (AMPK). W niniejszych badaniach zbadano zależność pomiędzy AMPK i TRPC6 oraz wpływ AMPK na białka cytoszkieletu aktynowego w komórkach podocytarnych.

Doświadczenia przeprowadzono na hodowli pierwotnej szczurzych podocytów w obecności aktywatora (metformina) lub inhibitora (związek C) AMPK w środowisku z wysokim (HG 30 mM) lub standardowym (SG 11,1 mM) stężeniem glukozy. W podocytach była oceniana przepuszczalność dla albuminy znakowanej fluo-

resceiną przez monowarstwę podocytów, a także ilości i wewnątrzkomórkowa lokalizacja (Western blot, immunofluorescencja) oraz genowa ekspresja (RT-PCR) badanych białek.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że HG zwiększa ilość kanału wapniowego TRPC6 o 37% (z  $0,603 \pm 0,44$  do  $0,829 \pm 0,078$ ,  $n=6$ ,  $P<0,05$ ), powoduje spadek fosforylacji AMPK o 76% (z  $0,238 \pm 0,011$  do  $0,182$ ,  $n=6$ ,  $P<0,05$ ) i zmniejszenie ilości nefryny (z  $0,686 \pm 0,058$  do  $0,586 \pm 0,053$ ,  $n=6$ ). W HG, w obecności metforminy obserwuje się przywrócenie ilości białek i fosforylacji AMPK do poziomu wartości jakie obserwujemy w SG. W wyniku przeprowadzonej analizy immunofluorescencyjnej zaobserwowano zmiany w wewnątrzkomórkowej lokalizacji białek cytoszkieletu aktynowego (cofilina, aktyna). Wykazaliśmy również, że aktywacja kinazy AMPK przez metforminę skutkuje zmniejszeniem przepuszczalności dla albumin przez warstwę podocytów w komórkach eksponowanych na NG i HG, natomiast inhibitor AMPK powoduje bardzo duży wzrost przepuszczalności w tych warunkach.

W związku z powyższym, otrzymane wyniki badań mogą wskazywać na udział AMPK w zależnej od wapnia regulacji dynamiki cytoszkieletu aktynowego podocytów, a tym samym regulować przepuszczalność bariery filtracyjnej.



## II-P 5

AKTYWNOŚĆ MIKROBIOLOGICZNA PEPTYDOWYCH  
I AMINOKWASOWYCH ANALOGÓW KWASU MYKOFENOLOWEGOAgnieszka Siebert<sup>1</sup>, Magdalena Wysocka<sup>2</sup>, Grzegorz Cholewiński<sup>1</sup>,  
Beata Krawczyk<sup>2</sup>, Janusz Rachoń<sup>1</sup><sup>1</sup>Katedra Chemii Organicznej Politechnika Gdańska<sup>2</sup>Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechnika Gdańska

agnieszka.glowacka15@gmail.com

Kwas mykofenolowy (MPA) wykazuje właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, immunosupresyjne a także przeciwnowotworowe. Jest niekompetencyjnym i odwracalnym inhibitorem (dehydrogenazy inozyno-5'-monofosforanu) IMPDH [1, 2]. Dotychczas stosowane klinicznie są dwie pochodne MPA: mykofenolan mofetylu (*Cell Cept*) oraz mykofenolan sodu (*Myfortic*) jako leki immunosupresyjne. Otrzymaliśmy nowe aminokwasowe i peptydowe analogi kwasu mykofenolowego, które zostały scharakteryzowane za pomocą technik <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR i MS. Związki oceniono pod względem ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej *in vitro* wobec *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL), *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300,

*Staphylococcus aureus* MSSA ATCC 25923, a także dwóch szczepów klinicznych: *K. pneumoniae* ESBL i *Staphylococcus aureus* MSSA. Kilka z nowo otrzymanych pochodnych charakteryzuje się niższą wartością (minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów) MIC aniżeli związki referencyjne (kanamycyna, ampicylina, MPA).

1. Iwaszkiewicz-Grześ D., Cholewiński G., Kot-Wasik A., Trzonkowski P., Dzierzbicka K.: Synthesis and biological activity of mycophenolic acid-amino acid derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **69**, 863–871 (2013)
2. Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W., Stokłosa T.: *Immunologia*, PWN, Warszawa, 2011

## II-P 6

ANALIZA AKTYWNOŚCI ANTYGRZYBICZEJ WYBRANYCH POCHODNYCH  
TIOSEMIKARBAZYDU WOBEC DERMATOFITÓW

Anita Ciesielska, Aleksandra Strzelczyk, Ewelina Lechowicz, Paweł Stączek

Zakład Genetyki Drobnoustrojów, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

anita.ciesielska@biol.uni.lodz.pl

Dermatofity są grzybami keratynofilnymi i keratynolitycznymi, odpowiedzialnymi za powierzchniowe mikozy skóry i jej wytworów. W obrębie dermatofitów wyróżnia się trzy rodzaje: *Trichophyton*, *Microsporum* i *Epidermophyton*. Patogenne dla człowieka i zwierząt gatunki dermatofitów należą do wszystkich trzech rodzajów i grup ekologicznych. Infekcje dermatofitowe stanowią poważny problem dermatologiczny i epidemiologiczny. Współczesne warunki życia, zwiększają prawdopodobieństwo wystąpienia czynników, sprzyjających rozwojowi tego typu infekcji. Na przestrzeni lat obserwuje się wzrost częstości zakażeń grzybiczych, w tym dermatofitoz. Dotyczą one zarówno określonych grup wiekowych, które cechuje szczególna podatność na zakażenie (dzieci, osoby starsze), ale także społecznych czy zawodowych. Dlatego zakażenia skórne wywołane przez dermatofity określa się obecnie mianem chorób cywilizacyjnych, które stanowią ważny problem zdrowia publicznego.

Wraz ze wzrostem użycia środków przeciwgrzybiczych, m.in. azoli, do leczenia dermatofitoz, realnym zagrożeniem staje się rozwój lekooporności, podobnie jak to miało miejsce w przypadku

innych patogennych grzybów. Ponadto, stosowane obecnie leki doustne, m.in. terbinafina czy itraconazol mogą wywoływać silne skutki uboczne, natomiast środki stosowane powierzchniowo, np. amorolfina czy cyklopiroks, działają z niską skutecznością. Dlatego też istnieje konieczność poszukiwania nowych związków, wykazujących silną aktywność w stosunku do tej grupy grzybów. Tiosemikarbazyd to pochodne hydrazyny o małej masie cząsteczkowej (< 400). Liczne badania wykazały, że wprowadzenie różnych podstawników skutkuje powstaniem pochodnych wykazujących wysoką aktywność w zwalczaniu patogenów bakteryjnych jak również wobec chorobotwórczych grzybów z rodzaju *Candida*, często osiągających wyższą skuteczność niż antybiotyki powszechnie stosowane w terapii. Istnieją więc przesłanki do przypuszczeń, że związki te będą również zdolne do zaburzenia wzrostu dermatofitów, stwarzając w przyszłości możliwość opracowania skutecznych leków do terapii zakażeń dermatofitowych.

Badania zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych w ramach grantu OPUS 7/NZ7 (2014/13/B/NZ7/02307).

## II-P 7

**LINIE KOMÓRKOWE O PODWYŻSZONEJ EKSPRESJI ENZYMÓW METABOLICZNYCH,  
JAKO NOWE NARZĘDZIE DO BADANIA ZMIAN AKTYWNOŚCI KATALITYCZNEJ  
ENZYMÓW P450 3A4 ORAZ UGT1A10**

Anna Bejrowska, Monika Pawłowska, Zofia Mazerska

Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

*annbej@gmail.com*

Ważnym etapem podczas badań przedklinicznych nowych leków jest określenie, jakim przemianom podlegają one po wnikięciu do organizmu. Istotne jest również przewidywanie i zmniejszenie efektów ubocznych indukowanych przez chemoterapeutyk oraz określenie jak związek, bądź jego metabolit wpływa na biotransformacje innych substratów. Jest to szczególnie ważne w przypadku chemoterapii, w których stosuje się terapie kombinowane – pacjentom podaje się więcej niż jedną substancję aktywną. Wówczas interakcjom podlegać mogą nie tylko związki wyjściowe, ale również ich metabolity. Obie grupy mogą powodować inhibicję bądź indukację przemian innych leków, co może doprowadzić do zmiany właściwości farmakokinetycznych leków podawanych w terapii. Określenie zdolności nowych związków aktywnych, w tym pochodnych akrydonu – C-1305 oraz C-1311, do aktywacji bądź inhibicji wybranych enzymów metabolicznych należy poznać zarówno w warunkach bezkomórkowych, jak i w miejscu działania związków, czyli w komórkach. Stosowanie natywnych linii komórkowych ma jednak wiele ograniczeń, w tym obniżenie fizjologicznej

aktywności enzymów oraz możliwość odróżnicowania się komórek podczas prowadzenia hodowli. Ważny jest zatem dobór odpowiednich modeli, by we właściwy sposób określić sposób działania związków.

Nasz zespół podjął próbę utworzenia nowych modeli do badań modulacji aktywności enzymów metabolicznych przez leki, subklonów linii komórkowych nowotworów jelita grubego HCT-116-CYP3A4 oraz piersi MCF-7-UGT1A10. Komórki te wykazują stabilną, podwyższoną ekspresję genów kodujących enzymy metaboliczne, odpowiednio cytochromu P450 3A4 oraz UGT1A10. Nowe modele mogą sprostać zapotrzebowaniu na dogodny i miarodajny układ badania aktywności wybranych enzymów metabolizujących. Wyniki uzyskane dla przeciwnowotworowych pochodnych akrydonu, C-1305 oraz C-1311, wobec nowych modeli sugerują znaczny wpływ związków na metabolizm komórkowy w tych liniach. Może to posłużyć określeniu efektów interakcji lek-lek w przyszłych, potencjalnych terapiach, pozwalając w konsekwencji na planowanie bardziej efektywnych terapii.

## II-P 8

**HUMAN BETA DEFENSIN GENES VARIABILITY AS A RISK FACTOR  
FOR DENTAL (CARIES), PERIODONTAL (PERIODONTITIS)  
AND ORAL MUCOSA (RECURRENT APHTHOUS STOMATITIS) PATHOLOGY**

Marta Daszkowska<sup>1,2</sup>, Robert Zasadziński<sup>1,2</sup>, Zuzanna Ślebioda<sup>3</sup>, Elżbieta Szponar<sup>3</sup>,  
Barbara Dorocka-Bobkowska<sup>3</sup>, Maria A. Bobowicz<sup>2</sup>, Anna Kowalska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznań;

<sup>2</sup>Dept. of Genetics, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Poznań;

<sup>3</sup>Dept. of Oral Mucosa Diseases, University of Medical Sciences, Poznań

*Mdaszkowaska5243@gmail.com*

The oral cavity is constantly exposed to various pathogenic microorganisms. The important element of innate, non-specific immunity, which allows maintaining the oral homeostasis are defensins – very active, small proteins with antimicrobial properties. Their various expression occurs either constantly, or after stimulation with bacterial LPS and inflammatory mediators. Defensins manifest several immuno modulating properties: they stimulate immune system by increasing chemotactic activity of monocytes and T lymphocytes and they induce IL-8 production. The role of defensins in pathologic conditions of the oral cavity raises large interest, but so far it remains not clearly defined and understood. Due to their multi directional antimicrobial and immuno modulating properties, defensins could potentially be used in treatment of infectious and inflammatory disorders. Clinical research on developing of drugs containing defensins and other microbial peptides or modulating their expression has already

been started worldwide. It was suggested the use of  $\beta$ -defensin-based agents in a treatment of ulcerative oral conditions, including RAS (recurrent aphthous stomatitis), pemphigoid, pemphigus and ulcerative stomatitis. Modification of defensins gene expression may also influence the risk of malignant transformation in pre-cancerous lesions.

Over 30 human  $\beta$  Defensin genes have been identified so far. Most studies have been focused on the hBD1, -2, 3 and -4. In our presentation we will summarize all known SNPs in the hBD1-4 genes which were considered as genetic risk factors responsible for individual differences in protein expression, thus predisposing to a development of oral cavity diseases: caries, periodontal disease and RAS. We will show also a preliminary data from our study on a genetic association between two DNA polymorphisms within the 5'UTR region of the hBD1 gene (20 G/A, rs11362 and -44 C/G, 1800972) and RAS in a cohort of Polish patients.

## II-P 9

### LINIA KOMÓRKOWA LUDZKIEGO RAKA JELITA HT29 JAKO MODEL DO BADAŃ MODULACJI AKTYWNOŚCI UDP-GLUKURONYLOTRANSFERAZ NA PRZYKŁADZIE POCHODNEJ 1-NITROAKRYDYNY C-1748

Anna Mróz, Zofia Mazerska

Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

anna.mroz89@gmail.com

Badanie zdolności potencjalnych chemoterapeutyków przeciwnowotworowych do inhibicji aktywności enzymów metabolizujących leki jest niezwykle ważnym aspektem badań przedklinicznych. Pozwala to na ocenę ryzyka wystąpienia działań niepożądanych wynikających z oddziaływań pomiędzy lekami w terapiach wielolekowych. Obok cytochromów P450, na szczególną uwagę w tym aspekcie zasługują UDP-glukuronylotransferazy (UGT), enzymy II fazy metabolizmu, które uczestniczą w detoksyfikacji 10% najczęściej przepisywanych leków [1]. Rosnąca liczba doniesień na temat interakcji pomiędzy lekami, a także pomiędzy lekami i składnikami ziół lub substancjami endogennymi wynikającymi z modulacji UGT wskazuje na duże znaczenie tego typu badań dla przewidywania końcowego efektu terapii [2, 3, 4].

Jako źródło enzymów do badań wpływu związków na aktywność katalityczną UGT najczęściej stosowane są ludzkie enzymy rekombinantowe, ludzkie mikrosomy wątrobowe oraz hepatocyty [5]. Jednakże, aby uzyskać pełniejszy obraz wpływu badanych związków na enzymy metabolizujące leki uzasadnione jest stosowanie komórek nowotworowych, będących miejscem docelowego działania chemoterapeutyków przeciwnowotworowych. Dlatego zaproponowaliśmy homogenat otrzymany z linii komórkowej

ludzkiego raka jelita jako model do badań wpływu potencjalnych leków przeciwnowotworowych na aktywność UGT. O przydatności tej linii do badań zdecydował wysoki poziom ekspresji oraz aktywności izoenzymów UGT [6].

Celem niniejszych badań było określenie zdolności do inhibicji UGT obecnych w homogenacie komórek HT29 przez przeciwnowotworową pochodną 1-nitroakrydyny, C-1748 otrzymaną w Katedrze Technologii Leków i Biochemii. Uzyskane wyniki wskazują na potencjał związku C-1748 do wywołania inhibicji UGT. Zastosowany model – homogenat komórek HT29 okazał się przydatny w badaniach zdolności związków przeciwnowotworowych do modulacji aktywności katalitycznej UGT. Zaproponowany schemat badań znajdzie zastosowanie w przewidywaniu interakcji pomiędzy lekami w terapiach wielolekowych co ułatwi proces planowania efektywnych schematów leczenia.

1. Guengerich P.F., *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 70–83 (2008)
2. Zhang D. i in., *Drug. Metab. Dispos.*, **33**, 1729–1739 (2005)
3. Zhang Q. i in., *Phytother. Res.*, **30**, 25–30 (2016)
4. Miners J.O. i in., *Biochem. Pharmacol.*, **129**, 85–95 (2017)
5. Miners J.O. i in., *Drug Metab. Rev.*, **42**, 196–208 (2010)
6. Cummings J. i in., *Cancer Res.*, **63**, 8443–8450 (2003)

## II-P 10

### METFORMINA AKTYWUJE SIRT1 I AMPK W PODOCYTACH Z WYINDUKOWANĄ WYSOKIM STĘŻENIEM GLUKOZY INSULINOOPORNOŚCIĄ

Dorota Rogacka, Irena Audzeyenka, Stefan Angielski, Agnieszka Piwkowska

Zespół Kliniczno-Badawczy Molekularnej i Komórkowej Nefrologii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

drogacka@imdik.pan.pl

Za szczelność bariery filtracyjnej kłębuszka nerkowego odpowiadają wyspecjalizowane komórki podocytarne, stanowiące najbardziej wrażliwy na uszkodzenia element kłębuszka. Utrata podocytów jest wczesnym objawem rozwoju nefropatii cukrzycowej. Podocyty funkcjonują w głównej mierze w oparciu o przemianę glukozy. W ostatnich latach wykazano, że są to komórki wrażliwe na działanie insuliny, jednak po ekspozycji na wysokie stężenie glukozy w podocytach dochodzi do indukcji insulinooporności.

Istotną rolę w regulacji wrażliwości na insulinę pełnią enzymy zaangażowane w metabolizm glukozy, takie jak kinaza białkowa AMPK i deacetylaza SIRT1. Nasze ostatnie badania wykazały, że w warunkach hiperglikemicznych w podocytach zmniejsza się ilość białka i aktywność SIRT1, co prowadzi do zmniejszenia stopnia fosforylacji AMPK i zniesienia stymulującego działania insuliny na dokomórkowy transport glukozy. Obecne badania miały na celu zbadanie zdolności metforminy (MTF) do przywrócenia wrażliwości podocytów na insulinę poprzez regulację aktywności SIRT1 i AMPK. Badania prowadzono na podocytach szczurzych, hodowanych w obecności standardowego (11.1 mM,

SG) lub wysokiego (30 mM, HG) stężenia glukozy. Wrażliwość na insulinę oceniano badając insulinozależny transport glukozy metodą izotopową. Wyciszano ekspresję genów kodujących SIRT1 lub podjednostki katalityczne AMPK ( $\alpha 1$  lub  $\alpha 2$ ) za pomocą odpowiednich siRNA. Aktywność SIRT1 badano metodą spektrofлуorymetryczną, a stopień fosforylacji AMPK metodą Western blot.

Wykazano, że MTF aktywuje SIRT1 oraz AMPK i zwiększa transport glukozy do insulinoopornych podocytów. Zmniejszony w HG poziom białka SIRT1 pod wpływem MTF wzrastał o 37%, a aktywność enzymu o 47%. Podobnie zmniejszony w HG stopień fosforylacji AMPK wzrastał o 74% w obecności MTF. Wyciszenie ekspresji SIRT1 lub AMPK  $\alpha 1/\alpha 2$  znosiło stymulujący efekt insuliny na transport glukozy, podobnie jak w komórkach ekspozowanych na HG, natomiast w obecności MTF transport glukozy wzrastał o 50, 30% i 39% odpowiednio dla siRNA SIRT1, AMPK $\alpha 1$  i AMPK $\alpha 2$ .

Oprócz aktywacji AMPK, korzystne działanie MTF może wynikać ze wzrostu ilości i aktywności SIRT1 w podocytach z wyindukowaną wysokim stężeniem glukozy insulinoopornością.

## II-P 11

**MEGASELIA SCALARIS (DIPTERA, PHORIDAE)  
– GATUNEK LABORATORYJNY PRZYDATNY W POSZUKIWANIU  
NOWYCH PEPTYDÓW ANTYBAKTERYJNYCH (AMP)**

Ewa Durska<sup>1</sup>, Radosław Stachowiak<sup>2</sup>, Magdalena Bednarek<sup>2</sup> Piotr Sterna<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Muzeum i Instytut Zoologii, PAN, Wilcza 64, 00-679 Warszawa, Polska

<sup>2</sup> Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

edurska@miiz.waw.pl

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP) charakteryzują się działaniem przeciwbakteryjnym, przeciwwirusowym, przeciwgrzybicznym, przeciw pasożytniczym, a także przeciwnowotworowym. AMP sterują odpowiedzią układu odpornościowego oraz wpływają na proces gojenia się ran. Wyjątkowa odporność *Megaselia scalaris* na ekstremalne warunki środowiskowe, zwłaszcza w wysokich temperaturach (grupa białek chaperonowych – przeżywalność powyżej 40), jak również wyniki badań wstępnych sugerują, że aktywne peptydy, poszukiwane przez nas w hemolimfie larw, charakteryzują się bardzo silnym działaniem przeciwbakteryjnym.

Nasze badania obejmowały szereg eksperymentów opartych na ocenie (pomiarach) działania hemolimfy, wyekstrahowanej z żywych larw *M. scalaris* w warunkach stresowych (wysoka temperatura, nakłucie, immunizacja) i zastosowanej przeciwko bakte-

riom Gram-ujemnym i Gram-dodatnim. Grupę kontrolną stanowiły larwy *M. scalaris*, które nie zostały poddane działaniom stresu (temperatura pokojowa, larwy nie nakłute i nie immunizowane).

Należy podkreślić, że od ponad piętnastu lat nie zostały zarejestrowane żadne nowe antybiotyki, natomiast wśród pacjentów wzrosła liczba przypadków śmiertelnych, wywołanych m.in. brakiem skuteczności w leczeniu sepsy, którą powoduje oporna na antybiotyki pałeczka ropy błękitnej – *Pseudomonas aeruginosa*.

Obiecujące wyniki badań, dotyczące ekspresji genów białek szoku cieplnego (*hsp*s) oraz wstępne badania nad hemolimfą żywych larw *M. scalaris* wskazują, iż zawarte w hemolimfie aktywne peptydy (AMP) mogą stanowić źródło nowych leków przeciwdrobnoustrojowych, także do zwalczania wyjątkowo odpornej na antybiotyki pałeczki ropy błękitnej – *P. aeruginosa*.

## II-P 12

**KONSTRUKCJA REKOMBINANTOWYCH DROŹDŹY  
DEBARYOMYCES MACQUARIENSIS D50**

Ewelina Krajewska, Monika Wicka-Grochocka, Natalia Filipowicz, Agata Terebieniec,  
Marta Wanarska, Hubert Cieśliński

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Politechnika Gdańska

eweliny.ka@gmail.com

Wzrost zapotrzebowania na białka wykazujące aktywność w niskiej temperaturze pociąga za sobą konieczność opracowywania technologii umożliwiających ich wydajną produkcję i oczyszczenie. Pomimo faktu, iż do obecnej chwili opracowano wiele układów ekspresyjnych umożliwiających ekspresję heterologicznych genów, są one oparte głównie o komórki mezofilnych lub termotolerancyjnych bakterii i drożdży. W związku z wysoką termolabilnością białek aktywnych w niskich temperaturach, systemy te nie są optymalne dla ich wydajnej produkcji z uwagi na to, że temperatura wzrostu tych mikroorganizmów jest równa lub wyższa niż 30°C. Układ ekspresji oparty na psychrotolerancyjnym drożdżowym gospodarzu ekspresyjnym jest potencjalnie najlepszym systemem dla wydajnej produkcji enzymów pochodzących z organizmów zimnolubnych. Drożdże łączą zalety prokariotycznych i eukariotycznych systemów ekspresji ponieważ umożliwiają szybki przyrost biomasy oraz sekrecję białek na zewnątrz komórek, dzięki czemu

otrzymuje się wstępnie oczyszczony preparat. Ponadto, drożdże jako komórki eukariotyczne są zdolne do przeprowadzania modyfikacji potranslacyjnych, a co za tym idzie pozwalają na otrzymanie prawidłowo sfałdowanych białek.

W ramach pracy nad nową platformą do produkcji białek w psychrotolerancyjnym gospodarzu drożdżowym przeprowadzono transformację komórek wyselekcjonowanego wcześniej gospodarza ekspresyjnego *Debaryomyces macquariensis* D50 serią wektorów ekspresyjnych. Wszystkie skonstruowane wektory zawierały sekwencje umożliwiające rekombinację z genomem wybranego gospodarza drożdżowego. Ponadto, w celu przetestowania funkcjonalności nowego drożdżowego systemu ekspresji, skonstruowano również plazmidy rekombinantowe zawierające geny kodujące β-galaktosydazy aktywne w niskiej temperaturze, umożliwiające produkcję tych białek w drożdżach *Pichia pastoris* oraz *Debaryomyces macquariensis* D50.



## II-P 13

### OCENA AKTYWNOŚCI IMMUNOGENNEJ I OCHRONNEJ REKOMBINOWANYCH BIAŁEK FUZYJNYCH *TOXOPLASMA GONDII*

Justyna Gatkowska<sup>1</sup>, Katarzyna Dzitko<sup>1</sup>, Bartłomiej Ferra<sup>2</sup>, Lucyna Holec-Gąsior<sup>2</sup>, Malwina Kawka<sup>1</sup>, Henryka Długowska<sup>1</sup>, Bożena Dziadek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Immunoparazytologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki,

<sup>2</sup>Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

justyna.gatkowska@biol.uni.lodz.pl

Toxoplazmoza wywołana przez bezwzględnie wewnątrzkomórkowego pasożytniczego pierwotniaka *Toxoplasma gondii* jest, obok kamylobakteriozy czy salmonellozy, jedną z najbardziej rozpowszechnionych, przenoszonych drogą pokarmową chorób na świecie. Zażycie *T. gondii* może stanowić nie tylko poważne zagrożenie zdrowia i życia osobników z osłabionym (np. osoby leczone immunosupresorami, pacjenci z AIDS) lub niewykształconym (płody) układem odpornościowym, ale także każdego roku powoduje istotne straty gospodarcze związane z inwazją zwierząt hodowlanych. Pomimo wielu lat intensywnych badań nadal nie opracowano skutecznej i bezpiecznej immunoprofilaktyki tej pasożytozy. Jedną z najnowszych strategii zmierzających do konstrukcji szczepionki przeciw toksoplazmozie jest wykorzystanie jako komponentu antygenowego białek fuzyjnych zawierających immunogenne fragmenty antygenów pierwotniaka pełniących kluczową rolę w procesie inwazji i zasiedlania komórki żywicielskiej.

Celem pracy było sprawdzenie immunogennej i ochronnej aktywności wybranych białek fuzyjnych *T. gondii* jako potencjalnych narzędzi immunoprofilaktycznych. Badane tri- i tetra-walentne rekombinowane białka fuzyjne, zemulsyfikowane z nie-

kompletnym adiuwantem Freund (IFA), podawano podskórnie myszom szczepu C3H/HeOuJ, a następnie oceniano wybrane parametry wzbudzonej poszczepiennej odpowiedzi immunologicznej oraz sprawdzano właściwości protekcyjne uzyskanej odporności po wywołaniu u immunizowanych zwierząt doświadczalnej przewlekłej toksoplazmozy.

Uzyskane do tej pory wyniki wskazują, że zaprojektowane rekombinowane białka fuzyjne charakteryzują się wysoką immunogennością warunkującą wzbudzenie silnej swoistej odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Co więcej, generowana odporność poszczepienna skutkuje znacznym osłabieniem intensywności inwazji *T. gondii* przejawiającej się istotnym statystycznie spadkiem liczby cyst tkankowych u szczepionych osobników. W chwili obecnej prowadzone są dalsze doświadczenia nad potencjałem szczepionkowym kolejnych rekombinowanych białek fuzyjnych, a uzyskane wyniki dotyczące zarówno wybranych parametrów odpowiedzi immunologicznej, jak i aktywności protekcyjnej badanych antygenów zostaną przedstawione na konferencji.

Praca jest finansowana z grantu Narodowego Centrum Nauki (nr UMO-2015/17/B/NZ6/03480).

## II-P 14

### KONSTRUKCJA SYSTEMÓW EKSPRESYJNYCH *ESCHERICHIA COLI* DO PRODUKCJI TRIWALENTNYCH ANTYGENÓW CHIMERYCZNYCH *TOXOPLASMA GONDII* O POTENCJALNEJ UŻYTECZNOŚCI DIAGNOSTYCZNEJ

Karolina Błaszowska, Bartłomiej Ferra, Lucyna Holec-Gąsior

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

blaszkowska.ka@gmail.com

*Toxoplasma gondii* to wewnątrzkomórkowy pasożyt, który posiada zdolność do inwazji szerokiego spektrum zwierząt stałocieplnych, w tym człowieka. Szacuje się, że chroniczne zarażenie tym pierwotniakiem dotyczy około 1/3 światowej populacji ludzi. Pomimo, iż u zdrowych osób przebiega ono zwykle bezobjawowo, to w niektórych przypadkach może nieść ryzyko rozwinięcia się choroby o bardzo ciężkim przebiegu. Wczesne rozpoznanie i leczenie zarażenia *T. gondii* ma szczególne znaczenie w przypadku kobiet ciężarnych i osób z obniżoną odpornością.

Współczesna diagnostyka toksoplazmozy opiera się głównie na testach serologicznych, których specyficzność i czułość zależy m.in. od użytych antygenów. Komercyjnie dostępne zestawy diagnostyczne oparte są na poliwalentnym antygenie natywnym pasożyta, który posiada kilka niepożądanych wad, w tym uciążliwość i kosztowność produkcji, co stymuluje potrzebę poszukiwania innych narzędzi diagnostycznych. Wśród nowych, potencjalnych rozwiązań obiecujących pozycję zajmują antygeny rekombinantowe, zwłaszcza poliwalentne antygeny chimeryczne. Tego typu preparaty są prostsze i tańsze w produkcji niż antygeny natywne oraz

umożliwiają łatwiejszą standaryzację testów. W ramach badań, stanowiących kontynuację wieloletniej pracy prowadzonej w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii PG, skonstruowano systemy ekspresyjne *E. coli* do produkcji dwóch nowych, triwaleńnych antygenów chimerycznych: SAG1-SAG2-GRA1 oraz SAG1-SAG2-GRA2. Fragmenty genów kodujących pojedyncze białka SAG1, SAG2, GRA1 i GRA2 zostały ze sobą połączone w następujących po sobie reakcjach PCR dzięki komplementarnym 3' i 5' końcom, a następnie klonowane do wektora ekspresyjnego. W rezultacie otrzymano plazmidy rekombinantowe, które umożliwiły ekspresję genów kodujących fuzyjne białka rekombinantowe z domenami typu His-Tag na obu końcach, pozwalając na otrzymanie miligramowych ilości antygenów chimerycznych, po zastosowaniu jednoetapowego oczyszczania metodą chromatografii metalopowinowactwa. Wstępną zdolność uzyskanych białek do oddziaływania ze swoistymi przeciwciałami anti-*T. gondii* przebadano z wykorzystaniem metody Western blotting.

Praca jest finansowana z grantu Narodowego Centrum Nauki (nr UMO-2015/17/B/NZ6/03480).

## II-P 15

## 1,4-POCHODNE FENYLOACETONITRYLU JAKO POTENCJALNE LEKI PRZECIWGRZYBICZE

Konrad Kubiński<sup>1</sup>, Maciej Małyk<sup>1</sup>, Monika Janeczko<sup>1</sup>, Aleksandra Martyna<sup>1</sup>,  
Anna Boguszewska-Czubar<sup>2</sup>, Elżbieta Kochanowicz<sup>1</sup>, Oleg Demchuk<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biologii Molekularnej, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Chemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

<sup>3</sup>Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

maciekm@kul.pl

Narastający problem oporności mikroorganizmów na stosowane antybiotyki niesie ze sobą potrzebę nowych terapii opartych na innowacyjnych cząsteczkach. Problem ten dotyczy również drożdżaków z rodzaju *Candida*, które są odpowiedzialne za ok. 95% zakażeń grzybiczych człowieka.

W wyniku badań prowadzonych nad nowymi cząsteczkami anty-drobnoustrojowymi stwierdzono wysoką aktywność anty-*Candida albicans* dwóch związków z grupy fenyloacetonitryli. Przeprowadzone testy wykazały, że cząsteczki te: (i) hamują wzrost

drożdżaków (wartości MIC = 2 – 4 µg/ml), (ii) są supresorami przejścia formy drożdżowej w strzępkową, oraz (iii) hamują wytwarzanie biofilmu. Ponadto, badane cząsteczki w stężeniach efektywnych nie wykazują toksyczności wobec ludzkich erytrocytów, nie wpływają na rozwój embrionalny ryba z gatunku *Danio rerio* oraz nie oddziałują bezpośrednio z DNA. Aktualnie badania prowadzone są w kierunku określenia celu komórkowego związków, ich wpływu na ścianę i błonę komórkową drożdżaków oraz określenia potencjału proapoptotycznego cząsteczek.

## II-P 16

## POSS JAKO INNOWACYJNY SYSTEM DOSTARCZANIA ANTRACYKLIN W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Małgorzata Konopka, Ewelina Sobierajska

Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Ogólnej

gosia\_konopka@wp.pl

Silseskwioxany (POSS) to hybrydowe związki krzemooorganiczne zbudowane z powtarzających się trójfunkcyjnych jednostek T, opisywane ogólnym wzorem  $\text{RSiO}_{1.5}$ . W skład każdej podjednostki wchodzi jeden atom krzemu połączony wiązaniami kowalencyjnymi z trzema atomami tlenu i jedną grupą R, w której miejsce można przyłączyć dowolny podstawnik. POSS to duża i bardzo zróżnicowana grupa związków chemicznych, których zaletą jest możliwość dowolnej modyfikacji ich budowy. Hybrydowa budowa oraz nanometryczne rozmiary silseskwioxanów zapewniają szerokie zastosowanie ich w różnych dziedzinach gospodarki. Obecnie POSSy stosowane są głównie jako nanonapełniacze materiałów polimerowych. Jednakże ze względu na ciekawe właściwości mogą znaleźć także zastosowania w biomedycynie.

Celem badań była ocena stopnia cytotoksyczności silseskwioxanów na wybranych liniach komórkowych oraz sprawdzenie czy zastosowanie tych związków w połączeniu z doksorubicyną poprawi jej efektywność przeciwnowotworową.

Cytotoksyczność silseskwioxanów, doksorubicyny oraz koniugatów POSS-DOX (1:1, 1:2, 1:4, 1:8) oceniliśmy przy użyciu testu MTT na liniach komórkowych (HMEC-1, HeLa i MCF).

Stosując metodę cytometru przepływowego przeprowadziliśmy test, którego celem było oznaczenie szybkości wnikania badanych związków do komórek. Natomiast przy użyciu aparatu Zetasizer Nano ZS firmy Malver przeprowadziliśmy pomiary średnicy hydrodynamicznej.

W przypadku wszystkich linii koniugatów DOX\*POSS w stosunku 8:1 wykazywał najwyższą cytotoksyczność. Wyniki te potwierdzają pomiary wykonane za pomocą cytometru przepływowego. Koniugaty szybciej wnikały do komórek aniżeli wolna doksorubicyna. Największy efekt zaobserwowano dla linii MCF-7. Po przeprowadzeniu pomiarów średnicy hydrodynamicznej doksorubicyny i koniugatów DOX\*POSS zauważono zależność: im wyższy stosunek doksorubicyny do silseskwioxanów tym powstałe koniugaty mniejsze. Wykonane za pomocą mikroskopu konfokalnego zdjęcia wskazują na obecność koniugatów w lizosomach i jądrze komórkowym. Postulowany mechanizm działania kompleksów DOX\*POSS zakłada, że ułatwiają one wnikanie doksorubicyny do komórek, następnie koniugaty rozkładane są przez lizosomy po czym wolna doksorubicyna wnika do jądra komórkowego.

## II-P 17

## LIOFILIZOWANE BIOPOLIMERY POLISACHARYDOWE JAKO BIOMATERIAŁY OPATRUNKOWE O AKTYWNOŚCI PRZECIWPROCHNICZEJ

Małgorzata Miazga-Karska, Katarzyna Klimek, Grażyna Ginalska

Katedra i Zakład Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Medyczny, Lublin

Malina.miazga@gmail.com

Narastająca antybiotykooporność bakterii powoduje wzrost zainteresowania substancjami roślinnymi, jako potencjalnymi terapeutykami w profilaktyce i leczeniu chorób bakteryjnych.

Najbardziej rozpowszechnioną chorobą o podłożu bakteryjnym jest próchnica, której przyczyną są *S. mutans*, *S. sanguinis*. W pracy badano właściwości biologiczne preparatów: miodu



manuka MGO550+, korzenia lukrecji gładkiej, liści rozmarynu, a wyniki porównano z uzyskanymi dla kontrolnego eugenolu. Aktywność przeciwbakteryjną (strefy zahamowania wzrostu, MIC, MBC) testowano wobec wybranych szczepów chorobotwórczych, w tym tych będących czynnikami etiologicznymi próchnicy: *Streptococcus mutans* PCM 2502, *Streptococcus sanguinis* PCM 2335, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Wyznaczono cytotoksyczność substancji względem fibroblastów skóry ludzkiej, co pozwoliło na wyznaczenie indeksu biogodności (IB) świadczącego o możliwości zastosowania takich substancji jako leków dla stomatologii.

Na tej podstawie możliwe było przygotowanie biomateriału stomatologicznego zawierającego substancję aktywną o najwyższym IB. Wybrano rozmaryn o IB wynoszącym 12 i 17 odpowiednio dla *S. mutans* i *S. sanguinis* eugenol (IB wynosił 23 i 27). Do wytworzenia biomateriału zastosowano 1% liniowe polimery

polisacharydowe: alginian i  $\beta$ -glukan. Połączenie ich z substancją aktywną i poddanie liofilizacji doprowadziło do wytworzenia biomateriału o właściwościach przeciwróżniczych, o czym świadczyły uzyskane strefy zahamowania wzrostu *S. mutans* i *S. sanguinis* (wokół materiału zawierającego rozmaryn (100  $\mu$ g) wyniosły odpowiednio 17 mm i 14 mm, a dla materiału z eugenolem (100  $\mu$ g): 18 mm i 16 mm).

Otrzymany materiał był trwały, łatwy w aplikacji i poręczny. Wytworzenie polisacharydowych opatrunków z substancją naturalną drogą liofilizacji zapewniło ich stabilność – mogą być one przechowywane w temperaturze pokojowej bez utraty właściwości biologicznych przez 3 miesiące.

Cechy utworzonego liofilizowanego biomateriału polisacharydowego, świadczą o możliwości stosowania go w leczeniu uzupełniającym paradontopatii powierzchniowych i głębokich oraz w profilaktyce chorób przyzębia.

## II-P 18

### WPLYW DZIAŁANIA PROMIENIOWANIA UV I TEMPERATURY NA WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWE NANOKOMPOZYTÓW ELASTOMEROWYCH

Mariola Mendrycka<sup>1</sup>, Małgorzata Przybyłek<sup>2</sup>, Urszula Kosikowska<sup>3</sup>, Anna Malm<sup>3</sup>, Mohamed Bakar<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Zakład Pielęgniarstwa, Wydział Nauk o Zdrowiu i Kultury Fizycznej,

Uniwersytet Technologiczno-Humanistyczny im. K. Pułaskiego w Radomiu

<sup>2</sup>Zakład Materiałoznawstwa, Technologii Obuwia i Odzieży, Wydział Materiałoznawstwa, Technologii i Wzornictwa,

Uniwersytet Technologiczno-Humanistyczny im. K. Pułaskiego w Radomiu

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej,

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Lublin

<sup>4</sup>Katedra Technologii Materiałów Organicznych, Wydział Materiałoznawstwa, Technologii i Wzornictwa,

Uniwersytet Technologiczno-Humanistyczny im. K. Pułaskiego w Radomiu

*m.mendrycka@uthrad.pl*

Nanokompozyty elastomerowe otrzymano poprzez wprowadzenie różnych ilości nanonapełniacza Nanobent® ZR2 (organomontmorylonit, o-MMT, Zakłady Górniczo-Metalowe „Zębica”). Nanonapełniacz ten jest interaktywnym glinokrzemianem warstwowym modyfikowanym czwartorzędową solą amoniową. Wprowadzono go do kauczuku podczas jego uplastyczniania w postaci dyspersji w plastyfikatorze typu Roflex 50 (fosforan fenylo-izopropylfenyloxy, producent PCC Rokita S.A. Kompleks Chemii Fosforu, Brzeg Dolny). Sposób wytwarzania nanokompozytów elastomerowych jest zgodny z treścią zgłoszenia patentowego P.412842.

Ocenie poddawano wpływ promieniowania UV (fotostarzenie) i temperatury (starzenie termiczne) na właściwości przeciwdrobnoustrojowe nanokompozytów elastomerowych wobec szczepów wzorcowych reprezentujących patogenne i oportunistyczne gatunki bakterii Gram-dodatnich (m.in. *Staphylococcus aureus*) i Gram-ujemnych (m.in. *Escherichia coli*) oraz drożdżaków *Candida* spp. Fotooksydacyjne starzenie prowadzono przez 168 h za pomocą lampy UV o mocy promieniowania 0,009 kW/m<sup>2</sup>, natomiast termostarzenie wykonywano w suszarce w temperaturze 70°C (PN-ISO 188:2000).

Aktywność przeciwdrobnoustrojową oceniano metodą dyfuzji substancji aktywnych z nanokompozytów w podłożu agaro-

wym Mueller-Hinton bez (dla bakterii) lub z dodatkiem 2% glukozy (dla grzybów) na podstawie wielkości strefy zahamowania wzrostu (giz – growth inhibition zone, w mm) drobnoustrojów wokół fragmentów nanokompozytów elastomerowych o zróżnicowanym składzie. Wykazano zależność głównie od gatunku drobnoustrojów i składu nanokompozytów, w mniejszym stopniu od metody starzenia aktywność przeciwdrobnoustrojową badanych elastomerów. Tylko w przypadku niektórych szczepów bakterii Gram-dodatnich aktywność ta była niższa w porównaniu z wartościami kontrolnymi o około 30–45%, w tym wobec *Bacillus subtilis* ATCC 6633 nawet o około 50–60%. Największy spadek aktywności przeciwdrobnoustrojowej zaobserwowano wobec bakterii Gram-ujemnych. Hamowanie namnażania *C. albicans* ATCC 10231 również było niższe nawet o około 60% w porównaniu z wartościami kontrolnymi.

Wykazano, że badane nanokompozyty pomimo poddawania ich procesowi starzenia z użyciem promieniowania UV lub wysokiej temperatury tylko częściowo tracą aktywność przeciwdrobnoustrojową zarówno wobec mikroorganizmów patogennych jak i oportunistycznych. Może to sugerować przydatność tych materiałów do produkcji elementów wykorzystywanych w celach medycznych i/lub użytkowych.

## II-P 19

### PRZECIWGRZYBICZA AKTYWNOŚĆ HYDROLIZATÓW KOLAGENU OTRZYMANYCH METODĄ ENZYMATYCZNO-ALKALICZNĄ WOBEC *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES*

Mariola Mendrycka<sup>1</sup>, Urszula Kosikowska<sup>2</sup>, Anna Malm<sup>2</sup>, Władysław Myjak<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Zakład Pielęgniarstwa, Wydział Nauk o Zdrowiu i Kultury Fizycznej Uniwersytet Technologiczno-Humanistyczny im. K. Pułaskiego w Radomiu

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Lublin

<sup>3</sup>Zakład Ekotechnologii Kolagenu i Tuszczów, Wydział Materiałoznawstwa, Technologii i Wzornictwa, Uniwersytet Technologiczno-Humanistyczny im. K. Pułaskiego w Radomiu

m.mendrycka@uthrad.pl

Celem pracy było opracowanie innowacyjnej technologii otrzymywania hydrolizatów kolagenu ze skór cielęcych pozwalającej na uzyskanie produktów o niezmięnionej strukturze kolagenu (potrójna helisa) posiadających aktywność przeciwgrzybiczą. Skóry poddano wstępnym procesom moczenia, wapnienia oraz odwapniania. Otrzymaną goliznę wytrawiano przez 3,5 h w temperaturze 35°C w roztworze o pH=8, zawierającym w stosunku do masy skór, 200% wody oraz 1% preparatu enzymatycznego Oropon ON2 (TFL, Włochy), oraz siarczan amonu. Następnie zalewano je 10% NaOH w 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w stosunku 1:4 na 48 h, płukano i neutralizowano 2% roztworem H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> otrzymując hydrolizat o pH=6±0,1. W ostatnim etapie skórę rozpuszczano w 20% roztworze kwasu cytrynowego w różnych stosunkach masowych 1:5, 1:6, 1:8 oraz 1:12. Otrzymane podstawowe hydrolizaty kolagenowe buforowano 1 M kwasem cytrynowym stanowiącym roztwór podstawowy i 1 M wodorofosforanem sodowym dwuzasadowym do pH=3,6±0,1.

Ocenie poddawano aktywność otrzymanych hydrolizatów kolagenu wobec drożdżaków *Candida* spp. i dermatofitów *Trichophyton* spp. Aktywność przeciwgrzybiczą oceniano metodą dyfuzji w podłożu agarowym Mueller-Hinton z dodatkiem 2% glukozy na podstawie wielkości strefy zahamowania wzrostu

(giz – growth inhibition zone, w mm) grzybów wokół dołków, do których wprowadzono odpowiednie rozcieńczenia badanych hydrolizatów kolagenu. Wykazano aktywność przeciwgrzybiczą badanej substancji wobec dermatofitów. Hamowanie namnażania dermatofitów było najsilniejsze wokół dołków, do których wprowadzono hydrolizaty kolagenu w stężeniach 1:5, 1:6 oraz 1:8 zarówno wobec wzorcowego szczepu *Trichophyton menthagrophytes* ATCC 9533 (giz = 19,9–21,8 mm; SD = ± 0,6–0,9) jak i klinicznego szczepu tego gatunku (giz = 24,2 – 24,8 mm; SD = ± 0,6 – 1,3). Spośród objętych badaniem drożdżaków *Candida* spp. obecność stref zahamowania wzrostu wykazano w przypadku *C. parapsilosis* (giz = 12,0 – 13,2 mm; SD = ± 0,5–1,6) oraz częściowe hamowanie (około 50–70%) namnażania *C. albicans* ATCC 10231. Nie wykazano wpływu inhibicyjnego badanej substancji na namnażanie innych gatunków drożdżaków, w tym m.in. klinicznych szczepów *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. famata* czy *C. krusi*.

Uzyskane dane wskazują na aktywność badanych hydrolizatów kolagenu otrzymanych innowacyjną technologią enzymatyczno-alkaliczną wobec dermatofitów *Trichophyton* spp., co może sugerować możliwość wykorzystania tych substancji w preparatach stosowanych w dermatozach.

## II-P 20

### DODEKAHEDRON ADENOWIRUSA JAKO WEKTOR DO DOSTARCZANIA LEKÓW DO LEKOOPORNYCH KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

M. Jedynek<sup>1</sup>, P. Dolega<sup>1</sup>, M. Podsiadla-Białoskorska<sup>1</sup>, I. Szurgot<sup>1</sup>, J. Chroboczek<sup>1,2</sup>, E. Szolajska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Biochemii i Biofizyki, Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

<sup>2</sup>Université Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, TIMC-IMAG, Grenoble, Francja

martaj@ibb.waw.pl

Ukierunkowane dostarczanie leków stanowi jedno z głównych wyzwań w terapii nowotworów. Do największych ograniczeń współczesnej chemioterapii zalicza się nieefektywne dostarczenie leku do miejsca docelowego, zwiększające ryzyko wystąpienia cytotoksyczności w zdrowych narządach. Jednym ze sposobów zwiększenia efektywności biodystrybucji oraz poprawy właściwości farmakokinetycznych leków jest wykorzystanie nośników, określanych jako systemy do dostarczania leków.

Dodekahedron (Dd) jest nanocząstką (28 nm) pseudowirusową, zbudowaną z dwunastu kopii pentamerycznego białka podstawy pentonu, jednego z dwóch białek kapsydowych odpowiedzialnych za internalizację do komórek ludzkiego Adenowirusa typu 3. Dd jest biodegradowalny, biokompatybilny i nieimmunogenny, co uzasadnia jego ogromny potencjał jako wektora. Struktura Dd umożliwia przyłączanie wielu kopii cząsteczek biologicznie aktywnych do jego powierzchni.

Analiza dystrybucji Dd *in vivo* z użyciem ksenografów ludzkiego czerniaka złośliwego w modelu myszy, pokazała, że przy podaniu dożylnym Dd wykazuje powinowactwo do skóry oraz wątroby, natomiast przy bezpośredniej iniekcji do guza pozostaje przez ponad 24 godziny w guzie, nie rozprzestrzeniając się w organizmie, co może sugerować optymalną drogę podania. Komórki nowotworowe często wykazują oporność wielolekową, co stanowi poważny problem w chemoterapii. Dd wydajnie penetruje komórki nowotworowe nadprodukujące transportery błonowe, P-glikoproteiny. Ponadto dostarczenie doksorubicyny (Dox) do komórek lekoopornych w formie koniugatu z Dd (Dd-Dox) znacznie zwiększa aktywność leku. Przy użyciu 0,45 μM Dox w postaci Dd-Dox uzyskano ten sam efekt (38% przeżywalności komórek lekoopornych), jak przy użyciu 2 μM wolnej Dox. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do wykorzystania Dd jako nośnika do dostarczania leków do lekoopornych guzów w modelu zwierzęcym.

## II-P 21

### APLIKACJE OPARTE O IMMOBILIZOWANE BIAŁKO MUTS *DEINOCOCCUS RADIODURANS*

Michał Banasik, Bartosz Zalewski, Paweł Sachadyn

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii

psach@pg.edu.pl

Białko MutS jest elementem systemu MMR (ang. DNA mismatch repair) odpowiedzialnego za rozpoznanie i usuwanie błędnie sparowanych i niesparowanych nukleotydów. Tego rodzaju uszkodzenia najczęściej są wynikiem błędu polimerazy DNA lub konsekwencją zachodzenia rekombinacji homologicznej pomiędzy nieznacznie różniącymi się pod względem sekwencji odcinkami DNA. Zdolność MutS do selektywnego rozpoznania i wiązania niekomplementarności DNA, którym *in vivo* towarzyszą miliardy prawidłowo sparowanych nukleotydów było powodem dla którego od wielu lat podejmowane są wysiłki ukierunkowane na wykorzystanie tego białka jako narzędzia biologii molekularnej. Początkowe próby (sięgające lat 80-tych XX wieku) skoncentrowane były na wykorzystaniu MutS jako narzędzia detekcji mutacji. Głównym powodem niepowodzenia tego rodzaju starań był fakt wiązania przez MutS (aczkolwiek ze znacznie niższym powinowactwem) również DNA nie zawierającego niesparowanych nukleotydów. Obecnie czyni się próby wykorzystania białka MutS, jako narzędzia służącego eliminacji DNA z niesparowaną zasadą z roztworu,

w którym DNA nie zawierające uszkodzeń stanowi przeważającą większość (np. eliminacja niewłaściwych produktów chemicznej syntezy genów) lub przeciwnie, jako czynnik powodujący zagęszczenie DNA z niekomplementarnościami (np. ukierunkowana ewolucja *in vitro* białek).

Rezultaty naszych badań nad białkiem MutS immobilizowanym w fazie stałej obejmują opracowanie nowatorskich testów do szybkiej kolorymetrycznej oceny aktywności MutS oraz metoda ilościowego oznaczania DNA wychwyconego przez MutS oparta na PCR w czasie rzeczywistym. Ponadto stwierdziliśmy, że białko MutS z radioopornej bakterii *Deinococcus radiodurans* wykazuje znacznie wyższą niż szeroko opisywane w literaturze białka MutS *Escherichia coli* i *Thermus thermophilus* specyficzność wiązania do DNA z niekomplementarnością. Z tego względu wykorzystaliśmy białko MutS z *D. radiodurans* wzbogacania frakcji DNA z niekomplementarnością i wykonaliśmy pionierskie eksperymenty wykrywania zmian premutacyjnych – zupełnie nowego podejścia w biologicznych badaniach molekularnych.

## II-P 22

### WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWRZYBICZE WYBRANYCH ZWIĄZKÓW Z RODZINY 1,4-NAFTOCHINONÓW

Monika Janeczko<sup>1</sup>, Maciej Małyk<sup>1</sup>, Konrad Kubiński<sup>1</sup>, Aleksandra Martyna<sup>1</sup>,  
Elżbieta Kochanowicz<sup>1</sup>, Oleg Demchuk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biologii Molekularnej, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

<sup>2</sup>Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

mjanec@kul.pl

Grzyby wywołują większość infekcji i powodują wysoką śmiertelność u pacjentów z obniżoną odpornością, po przeszczepach narządów, z białaczką oraz u nosicieli wirusa HIV. Większość tych infekcji powodują drożdżaki z rodzaju *Candida*, w tym przede wszystkim *C. albicans*. W patogenezie zakażeń istotne są czynniki wirulencji, zwłaszcza zjawisko adhezji, wytwarzanie biofilmu, dymorfizm oraz sekrecja enzymów hydrolitycznych. W ostatnich latach zauważalny jest znaczny spadek skuteczności antybiotyków przeciwgrzybiczych ze względu na pojawianie się mikroorganizmów opornych na ich działanie. Problemem jest również pozyskanie selektywnych leków ze względu na eukariotyczny charakter grzybów i bliskie relacje ewolucyjne między komórkami patogenów a ich ludzkimi gospodarzami. Istnieje więc potrzeba poszukiwania lub syntezy nowych, skuteczniejszych związków leczniczych. Jedną z interesujących pod tym względem grup związków o znanym potencjale przeciwgrzybiczym są naturalne i syntetyczne 1,4-naftochinony (1,4-NQ).

Biologiczne i terapeutyczne aktywności 1,4-NQ i ich mechanizmy wynikają głównie z potencjału redoks, hamowania aktywności niektórych enzymów, interkalowania DNA oraz oddziaływania z białkami strukturalnymi. Ze względu na wysoką reaktywność

chemiczną mogą być łatwo modyfikowane przez wprowadzanie różnych podstawników, co daje duże możliwości modulowania ich aktywności biologicznych. Wśród syntetycznych naftochinonów najwięcej właściwości biologicznych wykazują aminowe, alkiłowe i aryłowe pochodne.

Prezentujemy nową grupę 2-arylowych pochodnych 1-4-naftochinonów o interesujących właściwościach przeciwgrzybiczych wobec wybranych referencyjnych gatunków *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr* i *C. lusitanae*) potwierdzając ich wpływ na wzrost *Candida*, na rozwój strzępek *C. albicans* oraz na tworzenie się biofilmu. Wykonano szereg testów w kierunku określenia i potwierdzenia działania hamującego i bójczego związków z wykorzystaniem 100 szczepów klinicznych (*C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. glabrata*). Określono działanie genotoksyczne na komórki *Candida* i cytotoksyczne na erytrocyty ludzkiej krwi.

Ponadto zbadano wpływ naftochinonów na destrukcję ściany i błony komórkowej drożdży. Zastosowanie cytometrii przepływowej pozwoliło na określenie mechanizmu aktywności bójczej w odniesieniu do indukcji apoptozy inekrozy w komórkach planktonowych oraz tworzących biofilm.

## II-P 23

### ANALIZA GLOBALNYCH KORELACJI MIĘDZY POZIOMEM METYLACJI I EKSPRESJI GENÓW W TKANKACH ZWIERZĘCYCH

Piotr A. Sass<sup>1</sup>, Paweł Sosnowski<sup>1</sup>, Piotr Madanecki<sup>2</sup>, Bartosz Górnikiewicz<sup>1</sup>, Justyna Podolak-Popinigis, Paweł Sachadyn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

psach@pg.edu.pl

Zestawiono mikromacierzowe wyniki stopnia metylacji DNA regionów promotorowych oraz poziomu ekspresji genów w tkankach serca, wątroby, śledziony, szpiku kostnego oraz małżowiny usznej w trzech szczepach myszy laboratoryjnych: BALBc, C57BL/6 oraz MRL/MpJ. We wszystkich zbadanych tkankach wykazano stosunkowo niewielkie ujemne korelacje między globalnym poziomem ekspresji genów i stopniem metylacji regionów promotorowych.

Wykonano analizy porównawcze dla tych samych tkanek z różnych szczepów oraz dla różnych tkanek w obrębie jednego szczepu. W ten sposób wyłoniono grupy genów wykazujących silne zależności między poziomem ekspresji genów i stopniem metylacji ich regionów promotorowych. Praca ta jest pierwszą ukazującą zależności pomiędzy metylacją DNA i jej wpływem na ekspresję genów w skali całego genomu w tkankach zwierzęcych.

## II-P 24

### NOWE NARZĘDZIA GENETYCZNE DLA *PSYCHROBACTER* SPP.

Robert Lasek, Monika Krolikowski, Adrian Sówka, Dariusz Bartosik

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

lasek@biol.uw.edu.pl

Badania nad mikroorganizmami przystosowanymi do życia w niskich temperaturach są obiecującą gałęzią rozwoju biotechnologii. Wysoki potencjał aplikacyjny drobnoustrojów psychrofilnych wynika m.in. z cennych właściwości wytwarzanych przez nie enzymów, znajdujących swoje zastosowanie w przemyśle i biologii molekularnej. Na tempo postępu badań nad psychrofilami wpływa jednakże niedobór narzędzi genetycznych specyficznych dla tej grupy prokariotów.

Szczegółowe badania nad pulą plazmidów wyizolowanych z arktycznych szczepów bakterii z rodzaju *Psychrobacter* pozwoliły nam wyselekcjonować moduły genetyczne, które posłużyły do konstrukcji nowych wektorów plazmidowych specyficznych dla tego taksonu. Szczepem modelowym do ich testowania jest scharakteryzowany przez nas *Psychrobacter* sp. DAB\_AL43B, o w pełni zsekwencjonowanym genomie (GenBank: LT799838). Na bazie wektorów wahadłowych, funkcjonalnych w komórkach *Escherichia*

*coli* oraz szczepu DAB\_AL43B, skonstruowaliśmy i przetestowaliśmy następujące narzędzia genetyczne:

(i) wektory ekspresyjne pExPsy z silnym promotorem P<sub>SEF</sub> indukowanym przez laurylaldehyd lub dodecylosiarczan, które pozwalają na indukowaną ekspresję białek opatrzonych znacznikiem histydynowym;

(ii) wektor pRSPsy do badania aktywności promotorów wysokoprzepustową metodą z zastosowaniem testu aktywności β-galaktozydazy;

(iii) dwuplazmidowy system pLOL/pPROFL do wprowadzania delecji w chromosomie szczepu DAB\_AL43B z wykorzystaniem genu *lacZ* jako markera do selekcji negatywnej.

Otrzymane narzędzia genetyczne powinny ułatwić zarówno prowadzenie dalszych badań podstawowych nad *Psychrobacter* spp., jak również umożliwić uzyskiwanie zmodyfikowanych szczepów na potrzeby zastosowań biotechnologicznych.

## II-P 25

### WPŁYW GLICEROFOSFORANU WAPNIA (GPCa) JAKO MODYFIKATORA NA WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNE, MECHANICZNE I BIOLOGICZNE POLIURETANÓW MAJĄCYCH ZASTOSOWANIE JAKO MATERIAŁY W INŻYNIERII TKANEK KOSTNYCH

Justyna Kucińska-Lipka<sup>1</sup>, Alicja Lewandowska, Iga Gubańska, Agnieszka Przybytek, Helena Janik

Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Technologii Polimerów

juskucin@pg.gda.pl

Poliuretany (PUR) są polimerami bardzo szeroko stosowanymi w medycynie, w tym w medycynie regeneracyjnej, jako materiały do wytwarzania rusztowań tkankowych. Ponadto są również bardzo często wykorzystywane do otrzymywania kompozytów o potencjalnym zastosowaniu w inżynierii tkankowej kości. Zasto-

sowanie poliuretanów zapewnia wszechstronność w sterowaniu właściwościami mechanicznymi, fizycznymi, biokompatybilnością i zdolnością do biodegradacji w środowisku panującym w organizmie ludzkim. Jednakże, PUR nie są materiałami aktywnymi biologicznie, nie pobudzają również do kościotworzenia. Dlatego,



w niniejszej pracy wykorzystano glicerofosforan wapnia (GPCa) jako modyfikator, aby potencjalnie nadać otrzymanym materiałom właściwości bioaktywne.

Otrzymano nowe poli(estro-eterouretany) (PEEU) z 1,6-diizocyjanianu heksametylenu (HDI), poli(glikolu etylenowego) (PEG),  $\alpha,\gamma$ -dihydroksyoligo(adypinianu butylenowo-etylenowego) (POLIOS), 1,4-butanodiolu (BDO) jako przedłużacza łańcuchów oraz modyfikatora GPCa. Wytrzymałość na rozciąganie badanych materiałów mieści się w zakresie 12–18 MPa, twardość – 31–35° ShD a hydrofilowość tych materiałów wahała się w granicach 57–72°. Wykazano, iż włączenie GPCa do łańcucha poli-

uretanowego powoduje zwiększenie wytrzymałości na rozciąganie, twardości, oraz podnosi zdolność do kalcyfikacji, nie wpływa natomiast w istotny sposób na cytotoksyczność otrzymanego materiału. Zmiany te zostały spowodowane zwiększeniem ilości segmentów sztywnych poprzez wbudowanie małowcząsteczkowego związku – GPCa w strukturę materiału. W drugim etapie badań z otrzymanego modyfikowanego poliuretanu wytworzono rusztowanie tkankowe o porowatości 82% i wielkości porów 50–100  $\mu\text{m}$ , które w wynikach testów MTT wykazały się brakiem toksyczności. Modyfikacja GPCa potencjalnie zwiększa możliwości aplikacyjne poliuretanu w inżynierii tkankowej kości.

## II-P 26

### WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-MECHANICZNE RUSZTOWAŃ TKANKOWYCH OTRZYMANYCH Z NIEKATALIZOWANYCH POLIURETANÓW

Agnieszka Przybytek, Alicja Lewandowska, Iga Gubańska, Justyna Kucińska-Lipka, Helena Janik

Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Technologii Polimerów

*juskucin@pg.gda.pl*

Inżynieria tkankowa (IT) jest interdyscyplinarną dziedziną nauki, która łączy w sobie osiągnięcia inżynierii materiałowej, biotechnologii oraz medycyny. Jedną z gałęzi rozwijanych przez IT jest projektowanie oraz otrzymywanie rusztowań tkankowych (RT). Są to wysoce porowate materiały stanowiące podporę i wsparcie dla wzrostu i regeneracji nowych, w pełni funkcjonalnych tkanek.

Poliuretany (PUR) należą do szerokiej grupy materiałów inżynierskich. Odpowiednio zaprojektowane mogą znaleźć zastosowanie jako materiały biomedyczne. W przemyśle PUR są otrzymywane z użyciem metaloorganicznych katalizatorów. Według doniesień literaturowych, nawet niewielka zawartość katalizatorów może znacznie obniżyć biokompatybilność materiału [1]. W niniejszej pracy w pierwszym etapie badań przeprowadzono syntezę PUR wykorzystując, alifatyczny 1,6-diizocyjanian heksametylenu (HDI), amorficzny poliestr  $\alpha,\omega$ -dihydroksy (oligoadypinian etylenowo-butylenowy) (PEBA) oraz małowcząsteczkowy przedłużacz łańcucha 1,4-butanodiol (BDO). Otrzymany materiał scharakteryzowano pod względem właściwości fizyko-mechanicz-

nych oraz reologicznych (wytrzymałość na rozciąganie ~12 MPa, procentowe wydłużenie przy zerwaniu ~550%, twardość w skali Shore D rzędu 40°, gęstość = 1,16 g/cm<sup>3</sup>, masowy wskaźnik szybkości płynięcia (160°C, 2.16kg) ~40 g/10min). W drugim etapie badań otrzymany PUR rozpuszczono w dimetylosulfotlenku (DMSO) (20% roztwór) i przy użyciu metody odlewu z rozpuszczalnika połączonego z ługowaniem cząstek stałych (SC/PL) otrzymano rusztowania tkankowe o porowatości całkowitej rzędu 90% oraz wytrzymałości na ściskanie wynoszącej ~200 kPa. Wstępna analiza mikroskopowa pozwoliła scharakteryzować strukturę porów (wielkość, rozmieszczenie, kształt). W wyniku przeprowadzonych badań otrzymano RT z niekatalizowanych PUR o zadowalających właściwościach mechanicznych oraz właściwej morfologii porów. Materiał ten może stanowić alternatywę dla katalizowanych systemów do zastosowań w IT.

1. Tanzi M.C., Verderio P., Lampugnani M.G. *et al.*: *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 5, 393 (1994)

## II-P 27

### OTRZYMYWANIE ATP ZALEŻNEJ LIGAZY DNA *PSYCHROMONAS INGRAHAMII* 37

Marcin Olszewski, Olga Szczęśna, Rafał Walkusz, Marta Śpibida, Beata Zalewska-Piątek, Rafał Piątek

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

Ligazy DNA są powszechnie występującymi enzymami, które katalizują tworzenie wiązania fosfodiesterowego nici DNA i są niezbędne do zachowania prawidłowych funkcji życiowych każdej komórki, warunkując integralność genomu. Biorą udział w wielu procesach metabolizmu DNA tj. replikacji, naprawy oraz rekombinacji DNA. W zależności od wykorzystywanego kofaktora dzieli się je na dwie grupy – ATP zależne oraz NAD<sup>+</sup> zależne. Ligazy DNA wykorzystujące adenozynotrifosforan znalazły szereg zastosowań w technikach inżynierii genetycznej oraz biologii molekularnej.

Obecnie komercyjnie dostępne są jedynie ATP zależne ligazy DNA pochodzące z organizmów mezofilnych i termofilnych. Z danych literaturowych wynika, że jak dotąd nikt nie otrzymał ligazy organizmu psychrofilnego. Enzymy pochodzące z organizmów zimnolubnych charakteryzują się wysoką aktywnością w niskich temperaturach oraz większą selektywnością w porów-

naniu do ich mezofilnych oraz termofilnych odpowiedników. Ograniczenie ruchów oscylacyjno-rotacyjnych, jakie ma miejsce w takich warunkach, pozwala na lepsze dopasowanie cząsteczek, a co za tym idzie poprawę efektywności reakcji. Uzasadnia to poszukiwanie metod produkcji białek pochodzących z organizmów psychrofilnych.

Dlatego podjęto się próby otrzymania ATP zależnej ligazy DNA pochodzącej z psychrofilnej bakterii *Psychromonas ingrahamii* 37 w układzie ekspresyjnym Tabora-Studiera jak również w układzie arabinozowym. Optymalizacja ekspresji genu w szeregu różnych szczepów ekspresyjnych *E. coli* (w tym np. ArcticExpress, BL(DE3), Rosetta (DE3) pLysS) nie przyniosła zadowalających rezultatów – białko powstawało w postaci nierozpuszczalnych ciałek inkluzyjnych. Dopiero zastosowanie białka chaperonowego pG-Tf2 pozwoliło na uzyskanie rozpuszczalnej formy ATP zależnej ligazy DNA.





MIKROBIOLOGIA KLINICZNA I MOLEKULARNA

WYKŁADY PLENARNE

III-WPL 1

CHRONIC INFECTION AND VITAMIN D3, TO D OR NOT TO D?

Stella Nowicki, Natalie Nowicki, Bogdan Nowicki

Nowicki Institute for Women's Health Research, Brentwood, TN, USA

We hypothesize that, due to reduced vitamin D3 hormone exposure, the host innate immunity will exhibit an altered pattern of the monocytes' DAF expression to support chronic Gram-negative infection and vitamin D3 treatment could protect from chronic infection. To test our hypothesis we investigate whether maternal monocytes' pro-inflammatory hyper-responses are attenuated by vitamin D3 exposure.

In order to explore the vitamin D3 hormone-innate immunity crosstalk we evaluated the maternal monocytes' responses

to the pro-inflammatory signal (LPS from Gram-negative bacteria) in vitamin D3 deficient and sufficient environments. We developed a new model for ex-vivo study and we used molecular biology techniques to investigate our hypothesis. In conclusion, our results provide evidence that vitamin D3 exposure altered the pattern of monocyte DAF expression and influences maternal pro-inflammatory/antiinflammatory balance. The role of this balance in the host protection against chronic Gram-negative infection will be discussed.

III-WPL 2

STRUKTURA I ROLA BIOLOGICZNA  
MIKROBIOTY PRZEWODU POKARMOWEGO CZŁOWIEKA W ZDROWIU I W CHOROBI

Adam Jaworski, Katarzyna Dudek, Ireneusz Jurczak

Instytut Nauk o Zdrowiu, Społeczna Akademia Nauk Łódź

[adam@biol.uni.lodz.pl](mailto:adam@biol.uni.lodz.pl)

W czasie wykładu zostaną zaprezentowane dane literatury światowej z ostatnich 10 lat na temat biologii „świata” bakterii zasiedlających ludzki organizm, ich roli biologicznej i znaczenia dla zdrowia każdego człowieka.

Uwagę skoncentrowano na bardzo szybko narastającej wiedzy dotyczącej ogromnych i bardzo różnorodnych populacji bakterii przewodu pokarmowego człowieka. Przedstawimy wyniki licznych prac doświadczalnych, a także hipotezy i wnioski z prac poglądowych oraz monografii dotyczące: składu i różnorodności populacji bakterii kolonizujących przewód pokarmowy nowo-

rodka, człowieka dorosłego oraz zmian zachodzących w podszłym wieku, roli biologicznej mikrobioty dla zdrowia człowieka, a także skutków naruszania symbiotycznej równowagi pomiędzy mikrobiotą a gospodarzem. Szczególna uwaga zostanie zwrócona na ważne, a nawet zaskakujące wyniki prac doświadczalnych z ostatnich kilku lat, dotyczących dróg i mechanizmów komunikacji pomiędzy mikrobiotą przewodu pokarmowego człowieka a ośrodkami w mózgu, które wskazują na istotny udział bakterii przewodu pokarmowego w kształtowaniu również zdrowia psychicznego człowieka.

III-WPL 3

URINARY TRACT INFECTION IN PREGNACY AND RISK FOR FETAL DEVELOPMENT

Bogdan Nowicki, Alexander, Nowicki, Stella Nowicki

Nowicki Institute for Women's Health Research, Brentwood, TN, USA

Asymptomatic bacteriuria/urinary tract infection (ASB/UTI) in pregnant patients is associated with fetal low birth weight. The mechanism of UTI which induces fetal growth restriction in humans is not well understood. One considered option is that this effect might be due to the Dr adhesin (DraE) mediated trans-placental transfer of *E. coli* to the developing fetus leading

to a congenital bacterial infection in fetal organs. We developed an experimental model of infection in pregnant rats. We observe relatively high infection rates in placentas and lower in fetuses. Our preliminary results in rats show fetal growth restriction and therefore offer a unique opportunity to investigate further this process. We observe that an infection caused poor organ development

and growth restriction; a higher dose might lead to fetal death. On the other-hand intrauterine growth restriction may be also a result of infection-induced placental changes, such as thrombosis, necrosis and destruction of placental villi. Accumulation of PMNs may contribute to this tissue injury. This hypothesis is supported by clinical studies, which demonstrate that in 45–60% of placentas of newborns with low birth weights, the histological features of an acute inflammatory process are present. UTI affecting a mother during gestation may result in fetal growth restric-

tions and pre-term labor that will have a life-long impact on the fetus. Until now, aggressive screening to prevent UTI and fetal growth restrictions were our best options. However, a combination of Dr+ *E. coli* gestational tropism in the presence of antibiotic resistance poses the urgent question: should we apply a novel molecular approach for diagnosing high risk pregnancy-associated pathogen/virulence factors (Dr adhesin), and in addition, should we specifically tailor therapy standards to improve maternal and fetal safety?

### III-WPL 4

#### ESCHERICHIA COLI W ETIOPATOGENEZIE ZATOK PRZYNOSOWYCH

Michał Michalik

Centrum Medyczne MML, Warszawa

Michalin@wp.pl

Celem pracy była charakterystyka genetyczna szczepów *Escherichia coli* od pacjentów z rozpoznaniem przewlekłym zapaleniem zatok (PZZ). Rozpoznanie zostało potwierdzone diagnostyką obrazową, badaniami histopatologicznymi oraz biochemicznymi. U wszystkich pacjentów zastosowano leczenie skojarzone: 1) FESS w połączeniu z: korekcją przegrody nosa, korekcją małżowin nosowych metodą Koblacji, płukaniem zatok metodą Hydrodebrider oraz 2) terapię przeciwbakteryjne.

Bakterie wyhodowano z materiału wysokodiagnostycznego z wnętrza zatok, pobranego podczas zabiegu FESS.

FESS ma na celu usunięcie zmian zapalnych (polipów), nieprawidłowości anatomicznych i udrożnienie ujść zatok przynosowych. Poprawia funkcjonowanie zatok, które są lepiej wentylowane i skuteczniej oczyszczane. Jako uzupełnienie metody FESS przeprowadzono endoskopowe płukanie zatok metodą Hydrodebrider. Jest to nowoczesna, małoinwazyjna metoda leczenia. Pod ciśnieniem, z użyciem roztworu soli fizjologicznej następuje oczyszczenie zatok z chorych tkanek oraz usunięcie zalegającej wydzieliny zapalnej. Możliwe jest również dostarczenie do wnętrza zatok leków i antybiotyków do działania miejscowego. Metoda ta usuwa do 99% bakterii.

Pobrano materiał diagnostyczny poddano badaniom mikrobiologicznym. Charakterystyka genetyczna szczepów *Escherichia coli* obejmowała: 1) ustalenie przynależności do grup filogenetycznych B1 i B2 2) określenie występowania 14 czynników wirulencji: fimbrie typu F i Dr, typu I, typu S, typu P, hemolizyna  $\alpha$ , białko specyficzne dla szczepów uropatogennych, cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący, receptor dla jersiniobakteryj, receptor dla aerobakteryj, czynnik inwazji do śródbłonka naczyń mózgowych, receptor dla enterobakteryj, fimbrie typu F1C, otoczka typu II, tworzenie biofilmu. Po zakończeniu terapii u żadnego z pacjentów nie stwierdzono cech PZZ oraz niewyhodowano *Escherichia coli* w okresie od 3 do 16 miesięcy obserwacji. Spośród 30 analizowanych szczepów *Escherichia coli* 14 należało do grupy filogenetycznej B1, a 16 do grupy B2.

Ponowne pojawienie się infekcji po antybiotykoterapii i zabiegu FESS, sugeruje wpływ szczepów bakterii i ich zjadliwości na patogenezę PZZ. Izolaty *Escherichia coli* od pacjentów z PZZ charakteryzują się unikalnym zestawem czynników wirulencji. Zdaniem autorów, dotychczasowe terapie przeciwbakteryjne nie doprowadziły do eradykacji procesu zapalnego, gdyż nie uwzględniały genetycznych cech szczepów. Dopiero pełna charakterystyka szczepu umożliwi dobór celowanej terapii.

### III-WPL 5

#### MIKROBIOM CZŁOWIEKA – ZNACZENIE W FIZJOLOGII I PATOLOGII

Eugenia Gospodarek-Komkowska

Katedra i Zakład Mikrobiologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

kizmikrob@cm.umk.pl

Badania nad mikrobiomem podjęto w latach 90. XX w. Określono go jako „nowo odkryty narząd” mający wpływ na stan zdrowia i wystąpienie pewnych chorób. Mikrobiom tworzą drobnoustroje, które zasiedlają organizm ludzi, zwierząt, roślin lub glebę, ich genomy i wzajemne zależności oraz interakcje ze środowiskiem.

Mikrobiom nie jest przypadkowo „rozproszony” w organizmie, ale lokalizuje się w ściśle określonych miejscach. Mikrobiota człowieka wpływa na rozwój i różne funkcje fizjologiczne organizmu. Poprzez interakcje z gospodarzem przyczynia się do regulowania rozwoju narządów, odpowiedzi immunologicznej, angiogenezy, gospodarki hormonalnej, trawienia i przyswajania składników odżywczych. Złożona aktywność metaboliczna regu-

luje magazynowanie energii, tłuszczów, sprzyja dostarczaniu substratów dla gospodarza i mikrobioty. Odgrywa również korzystną rolę w metabolizmie szkodliwych związków dla gospodarza. Mechanizmy tych oddziaływań dotyczą także, m.in., konkurencji o receptory, składniki odżywcze, stabilizacji bariery śluzowej i wytwarzania związków przeciwdrobnoustrojowych.

Każde naruszenie mikrobioty zaburza różne funkcje w organizmie i może sprzyjać rozwojowi szeregu patologii. Mikrobiota wpływa na perystaltykę jelit, wrażliwość i sygnalizację neuroimmunologiczną, ekspresję receptorów, czynności osłonięto-mózg, zachowanie i nastrój, zaburzenia neurologiczne i psychiatryczne, proces starzenia się. Dysbioza może prowadzić do poważnych

następstw. Zmiany w profilu i metabolizmie drobnoustrojów są powiązane z wielokierunkowymi oddziaływaniami na organizm człowieka, które skutkują licznymi chorobami, np. choroby sercowo-naczyniowe, astma, alergie, zespół jelita drażliwego, zapalne choroby jelit, nowotwory, cukrzyca typu 2, otyłość, lęk, depresja, udar mózgu, stwardnienie rozsiane, choroba Alzheimera, zaostrzenie stresu, zmniejszenie zdolności poznawczych, zachowania społeczne. Wprowadzono określenie "psychobiotyki" dla drobnoustrojów, które wykazując działanie na oś jelito-mózg, mają korzystny

wpływ na zdrowie psychiczne, a także na zespół jelita drażliwego i chroniczne zmęczenie.

Mikrobiota może prowadzić do rozwoju nowych wskaźników prognostycznych i/lub celów dla innowacyjnych strategii prewencyjnych i terapeutycznych. Modyfikacja mikrobioty może stać się nowatorską metodą zapobiegania i leczenia wielu chorób. Wymagane są jednak kolejne badania funkcjonalne, szczególnie z zakresu biologii systemowej i zaawansowanych metod sekwencjonowania.

### III-WPL 6

#### WPLYW MIKROBIOMU JELITOWEGO NA UKŁAD IMMUNOLOGICZNY

Mirosława Gałęcka, Michalina Pazgrat-Patan, Anna M. Basińska, Anna Bartnicka

Instytut Mikroekologii

nauka@instytut-mikroekologii.pl

Obliczono że modelowy organizm człowieka, wliczając stanowiące większość erytrocyty, składa się z 30 bilionów komórek, którym towarzyszy aż 39 bilionów bakterii głównie w jelicie i na powierzchni skóry. Sumarycznie genom bakterii jelitowych 150 razy przewyższa genom człowieka. Najlicniejszy i najbardziej różnorodny zespół bakterii liczący nawet 1000 gatunków występuje w jelicie grubym. Zespoły bakterii zamieszkujące ciało ludzkie wraz z nieznanym udziałem grzybów, archeonów i wirusów oraz ich metabolitami określa się mianem mikrobiomu.

Poszczególne grupy bakterii wytwarzają witaminy z grupy B i K oraz enzymy niezbędne w trawieniu pokarmów. Bardzo istotną rolę mikrobioty jest aktywacja, koordynowanie i trening układu immunologicznego oraz odpowiedzi zapalnej poprzez indukcję odporności nieswoistej z udziałem wydzielniczej IgA (sIgA) oraz sieci cytokinowej (równowaga limfocytów Th1/Th2) [3, 4]. Dominacja w jelicie mikroorganizmów ochronnych z rodzaju *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium* sprawia, że drobnoustroje patogenne

przegrywają konkurencję o substancje odżywcze oraz o miejsce adhezji do śluzówki jelita.

Obecnie styl życia, szczególnie nadużywanie leków, stres, alkohol i nieprawidłowa dieta sprzyja niestety zaburzeniom ilościowym i jakościowym mikroflory jelitowej czyli dysbiozie jelitowej. Ona z kolei wpływa na funkcjonowanie całego organizmu. Zaburzenia mikrobioty jelitowej mogą mieć związek z rozwojem chorób autoimmunologicznych i zapalnych (dominacja Th1) lub alergicznych czy infekcyjnych (dominacja Th2). Ponadto dysbioza jelitowa jest uważana za czynnik wspierający rozwój wielu chorób np. celiakii, nieswoistego zapalenia jelit, zespołu jelita nadwrażliwego, atopowego zapalenia skóry, chorób alergicznych, cukrzycy typu 1, depresji, nowotworów, martwiczego zapalenia jelit noworodków i innych. W związku z tym prawidłowa diagnostyka mikroflory jelitowej, a w przypadku dysbiozy przywrócenie równowagi mikroflory przy pomocy celowanej pre- i probiotykoterapii może być pomocne w leczeniu i wspomaganiu leczenia wielu jednostek chorobowych.

### III-WPL 7

#### JAK SEKWENCJONOWANIE NOWEJ GENERACJI MOŻE UŁATWIĆ ŻYCIE MIKROBIOLOGOWI

Izabela Sitkiewicz

Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków

Iza.sitkiewicz@gmail.com

Poznanie pierwszej sekwencji genomu bakterii rozpoczęło nową erę w dziedzinie mikrobiologii. Pomogło opracować i wprowadzić na szeroką skalę nowe narzędzia, takie jak sekwencjonowanie następnej generacji (NGS), które można wykorzystać do badania bakterii. Przez ostatnie 20 lat byliśmy świadkami rewolucji w mikrobiologii, a nowe technologie w znacznym stopniu zmieniły sposób myślenia o bakteriach.

Ostatnie 2–3 lata przyniosły nam ogromną poprawę technologii sekwencjonowania i dramatyczny spadek kosztów sekwencjonowania, dzięki czemu techniki NGS mogą być wykorzystywane

nie tylko do prostego generowania sekwencji genomowych, ale także do badania regulacji ekspresji genów, badania społeczności bakteryjnych, badania bakterii, których nie można hodować w laboratorium. Techniki osiągnęły czułość i precyzję, która umożliwia nam sekwencjonowanie RNA z pojedynczej komórki i badanie zmian epigenetycznych. Analizy genomowe wykorzystywane są w tak różnych aspektach mikrobiologii, jak odkrywanie nowych szlaków metabolicznych, które mogą być wykorzystane jako źródło nowych leków; diagnostyki, epidemiologii i śledzenie ognisk zakaźnych w czasie rzeczywistym.

## WYSTĄPIENIA USTNE

## III-U 1

ANALIZA WYSTĘPOWANIA POLIMORFIZMÓW POJEDYNCZYCH NUKLEOTYDÓW (SNP)  
W WYBRANYCH GENACH KODUJĄCYCH  
CZYNNIKI WIRULENCJI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*Marcin Brzozowski<sup>1</sup>, Danuta Kosik-Bogacka<sup>2</sup>, Joanna Jursa-Kulesza<sup>1</sup><sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego<sup>2</sup>Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Medycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

marcin.brzozowski@pum.edu.pl

Pałeczka ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*) jest oportunistycznym patogenem wywołującym zakażenia o ciężkim przebiegu u pacjentów z mukowiscydozą, rozległymi oparzeniami, neutropenią, oraz wentylowanych mechanicznie. Szczepy kliniczne *P. aeruginosa* są czynnikiem etiologicznym zakażeń szpitalnych, często wykazują oporność na antybiotyki. Według szacunków Amerykańskiego Centrum ds. Kontroli i Prewencji Chorób (ang. Centers for Disease Control and Prevention, CDC) rocznie bakteria ta odpowiedzialna jest za około 51 tysięcy infekcji szpitalnych w Stanach Zjednoczonych. Pałeczka ropy błękitnej posiada szereg czynników wirulencji, w tym egzotoksyny, alkaliczną proteazę, fosfolipazę, elastazę, piocynę, fimbrie oraz lipopolisacharydy. Ocena występowania genów kodujących wymienione białka często jest wykorzystywana między innymi do scharakteryzowania izolowanych szczepów bakterii *P. aeruginosa* na danym obszarze. W studiach z użyciem metody PCR bardzo ważne jest wykorzystanie starterów komplementarnych do wszystkich możliwych wariantów badanego genu. Wystąpienie polimorfizmu w matrycowym DNA w miejscu łączenia się startera może zablokować reakcję PCR

Celem pracy była analiza występowania polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w sekwencjach genów kodujących czynniki wirulencji *P. aeruginosa*, w tym egzoenzymu *exoS* i *exoU*, toksyny A (*toxA*) oraz ramnolipidu *rhlA*.

Przeanalizowano sekwencje całogenomowe pałeczki ropy błękitnej dostępne w genomowych bazach danych *Pseudomonas* Genome Database oraz International Nucleotide Sequence Database Collaboration. Sekwencje w genomach wyszukiwane były za pomocą programu Nucleotide Blast (ang. Basic Local Alignment Search Tool). W badanych genach oznaczono miejsca występowania polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (ang. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) w odniesieniu do sekwencji szczepu referencyjnego *P. aeruginosa* PAO1.

W analizie wykazano możliwość występowania wielu polimorfizmów w obrębie badanych genów. Stwierdzono występowanie SNP w miejscach łączenia się starterów, których sekwencje opisywane były w publikacjach naukowych. W związku z tym, że polimorfizm może spowodować brak komplementarności primierów z badaną matrycą może to prowadzić do błędnego stwierdzenia braku występowania badanego genu.

## III-U 2

## NOWO POJAWIAJĄCE SIĘ GATUNKI W ZAKAŻENIACH U CZŁOWIEKA

Alicja Sękowska

Katedra i Zakład Mikrobiologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy  
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

asekowska@cm.umk.pl

Zakażenia bakteryjne od lat stanowią jeden z najważniejszych problemów medycyny. Oprócz bakterii o potwierdzonej chorobotwórczości pojawiają się „nowe” gatunki bakterii coraz częściej izolowane z przypadków zakażeń od ludzi. Sytuacja taka wynika z kilku faktów: coraz większej grupy osób z obniżoną odpornością, w podeszłym wieku, z chorobami podstawowymi i wyniszczającymi (cukrzyca, nowotwory, AIDS).

W grupie pałeczek Gram-ujemnych coraz częściej z przypadków zakażeń izolowane są gatunki z rodzajów: *Delftia*, *Pantoea*, czy *Raoultella*, w grupie ziarenkowców Gram-dodatnich: *Arcanobacterium*, *Brevibacterium*, czy *Granulicatella*. Bakterie te dotychczas izolowane były ze środowiska naturalnego (wody, gleby, powietrza), rzadko od zwierząt. Mogą także kolonizować górne drogi oddechowe (*Granulicatella* spp.), przewód pokarmowy (*Raoultella* spp.) człowieka i zasiedlać środowisko szpitalne. Bakterie te nie są potencjalnie chorobotwórcze, ale zwraca uwagę fakt, że ich wirulencja często związana jest z wytwarzaniem czynników (fimbrie, pili, biofilm) ułatwiających adhezję do komórek gospodarza, czy biomateriałów. Wiele z nich charakteryzuje także wysoka aktyw-

ność hydrolityczna (wytwarzanie proteaz, lipaz, enzymów hydrolizujących cukry). Lokalizacja zakażenia jest bardzo zróżnicowana: od powierzchniowych zakażeń (skóry i tkanki podskórnej), przez zakażenia tkanek miękkich aż do zakażeń uogólnionych wyłącznie. W większości szczepy gatunków tych bakterii są wrażliwe na antybiotyki, ale izolowano już szczepy wytwarzające beta-laktamazy o szerokim zakresie działania, metalo-beta-laktamazy (w tym NDM), czy karbapenemazy.

Pojawianie się „nowych” gatunków bakterii związane jest z rozwojem i wprowadzaniem do diagnostyki mikrobiologicznej nowych metod identyfikacji, jak spektrometria mas, sekwencjonowanie, rybotypowanie, które coraz powszechniej są wykorzystywane w laboratoriach mikrobiologicznych. Metody te są wiarygodne, szybkie i dużo tańsze niż te oparte o wyniki reakcji biochemicznych. Pozwalają na różnicowanie nawet blisko spokrewnionych gatunków bakterii. Z drugiej strony w odniesieniu do „nowo” pojawiających się gatunków bakterii w zakażeniach u człowieka można stwierdzić, że nastąpiło „przełamanie” bariery środowiskowej i ich „przejście” ze środowiska naturalnego do organizmu człowieka.



## III-U 3

## CHLAMYDIE ŚRODOWISKOWE – REALNE ZAGROŻENIE?

Małgorzata Pawlikowska-Warych<sup>1</sup>, Wiesław Deptuła

Katedra Mikrobiologii Wydziału Biologii Uniwersytet Szczeciński, Szczecin

malgorzata.pawlikowska@usz.edu.pl

Chlamydie środowiskowe, znane także jako Chlamydio-podobne organizmy (CLO – chlamydia-like organism), tworzą obecnie aż dziewięć rodzin w rzędzie *Chlamydiales*, i są to *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Rhabdochlamydiaceae*, *Waddliaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Clavichlamydiaceae*, *Criblamydiaceae*, *Actinochlamydiaceae* i *Parilichlamydiaceae*.

Bakterie te występują powszechnie, gdyż stwierdzano je w mule wodnym, wodzie, jako endosymbionty owadów, równonogów, pierwotniaków, a także u ryb oraz u ssaków, w tym u ludzi oraz jako wtępy w hodowlach komórkowych (m.in. HeLa). Wykazano, że te chlamydie stanowią realne i potencjalne zagrożenie dla zdrowia człowieka oraz są przyczyną chorób u wielu ssaków (bydło, owce, jelenie, koty, świnki morskie, małe gryzonie, nietoperze), ptaków, ryb, skorupiaków oraz owadów. Stan ten pogarsza także fakt, że wektorami tych bakterii są zarówno roztocza (kleszcze) i owady (wszy, pchły), a także ameby, powszechnie występujące w środowisku naturalnym. Udowodniono także, że wiele z nich (*Parachlamydia acanthamoebae*, *Neochlamydia hartmannellae*, *Protochlamydia*

*naegleriophila*, *Simkania negevensis*, *Rhabdochlamydia porcellionis*, *Candidatus* (Ca.) *Renichlamydia lutjanus*, *Waddlia chondrophila*, Ca. *Piscichlamydia salmonis*, Ca. *Piscichlamydia cyprinis*, Ca. *Clavochlamydia salmonicola*, Ca. *Actinochlamydia clariae*, Ca. *Parilichlamydia carangidicola*, Ca. *Similichlamydia latridicola*, Ca. *Similichlamydia laticola*, Ca. *Similichlamydia labrys*), jest patogennych dla człowieka i zwierząt, powodując schorzenia oczu, układu oddechowego, poronienia, a nawet jak się przypuszcza, biorą udział w patogenezie stwardnienia rozsianego, powodują zmiany miażdżycowe u ludzi oraz komplikują przeszczepy płuc. Ich zdolność do przeżywania wewnątrz ameb, które żyją w wodzie, tj. środowisku z którego człowiek korzysta oraz ich możliwość infekowania komórek ssaczy, m.in. monocytów/makrofagów, wskazuje także na ich prawdopodobny udział w innych schorzeniach u ludzi i zwierząt, które nie zostały zarejestrowane. Stąd przybliżenie danych dotyczących chlamydii środowiskowych wydaje się ważne, gdyż to poszerza wiadomości co do nowych patogenów, którymi, jako jedyni w Polsce zajmujemy się od kilku lat.

## III-U 4

STREPTOCOCCUS GRUPA VIRIDANS  
– UDZIAŁ W ZAKAŻENIACH I METODY IDENTYFIKACJI

Agnieszka Mikucka, Joanna Kwiecińska-Piróg, Małgorzata Prażyńska

Katedra i Zakład Mikrobiologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

a.mikucka@cm.umk.pl

*Streptococcus* grupa *viridans* (Viridans Group Streptococci, VGS) ze względu na heterogenność, często definiowana jest poprzez wykluczenie pozostałych paciorkowców. Wśród VGS występują głównie szczepy alfa-hemolizujące, ale też nie wytwarzające hemolizy i beta-hemolizujące (*Streptococcus anginosus*). Większość z nich nie poddaje się serotypowaniu według R. Lancefield, z wyjątkiem *S. anginosus* (A, C, F, G) i *S. mutans* (D).

VGS należą do mikrobioty fizjologicznej jamy ustnej, przewodu pokarmowego i dróg moczowo-płciowych człowieka. Charakteryzują się niskim potencjałem chorobotwórczym, dlatego zakażenia z ich udziałem najczęściej dotyczą tkanek fizjologicznie jałowych. Są przyczyną ponad 50% przypadków paciorkowcowego zapalenia wśierdza. Izolowane są także z ropni mózgu, wewnątrz-brzusznych, płuc, ropniaków opłucnej, pachwinowych, zakażeń skóry i tkanek miękkich oraz zakażeń powiązanych z wszczepieniem biomateriałów. Wytwarzanie glukanów umożliwia im udział w próchnicy zębów (*S. mutans*, *S. sanguinis*).

Ze względu na dużą zmienność cech tych bakterii nie jest możliwa identyfikacja wszystkich gatunków przy użyciu metod fenotypowych. Identyfikację największej liczby gatunków VGS umożliwia sekwencjonowanie 16S rRNA, analiza sekwencji genów

*sodA*, *rpoB* oraz metoda spektrometrii mas. Aktualnie wyróżnia się 6 grup VGS: *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. anginosus*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. bovis*, które zawierają łącznie 30 gatunków.

W latach 2011–2016 obecność VGS w materiale stwierdzono u 1% chorych Szpitala Uniwersyteckiego Nr 1 w Bydgoszczy. Większość stanowiły próbki krwi i materiał ropny, z których VGS izolowano w monokulturze (46,0%) lub hodowli mieszanej (54,0%). Szczepy identyfikowano metodą biochemiczną w systemie Vitek 2 Compact (bioMérieux) lub MALDI-TOF MS w aparacie MALDI Biotyper (Bruker). Lekowrażliwość oceniano zgodnie z rekomendacjami EUCAST. Najczęściej stwierdzono *S. mitis/oralis* (31,0%), *S. anginosus* (29,0%) i *S. salivarius* (10,0%). Większość szczepów wykazywała wrażliwość na penicylinę (70,5%), cefotaksym (84,4%), cefepim (93,3%), imipenem (97,2%), klindamycynę (72,7%) i wancomycynę (99,6%).

Diagnostyka zakażeń z udziałem VGS jest kłopotliwa ze względu na ich oportunistyczny charakter. VGS powinny być uwzględniane jako przyczyna zakażenia zawsze w powiązaniu z obrazem klinicznym pacjenta, gdy są izolowane z płynów ustrojowych i materiału pobranego w wyniku biopsji, w monokulturze lub jako drobnoustrój dominujący.

## III-U 5

### WPŁYW POLIMORFIZMU GENU *NTCP* NA PRZEBIEG PRZEWLEKŁEGO ZAPALENIA WĄTROBY TYPU B

Anna Woziwodzka<sup>1</sup>, Magda Rybicka<sup>1</sup>, Tomasz Romanowski<sup>1</sup>, Alicja Sznarkowska<sup>1</sup>,  
Marcin Dręzewski<sup>2</sup>, Piotr Stalke<sup>2</sup>, Krzysztof Piotr Bielawski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

<sup>2</sup>Klinika Chorób Zakaźnych, Gdański Uniwersytet Medyczny

anna.woziwodzka@biotech.ug.edu.pl

**Wstęp.** Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV) jest poważnym problemem zdrowotnym na świecie, z ponad 240 milionami osób przewlekle zakażonych. Dostępne metody leczenia przewleklego zapalenia wątroby typu B (PZWB) hamują replikację wirusa lub zapewniają kontrolę układu immunologicznego nad zakażeniem, ale nie zapewniają usunięcia wirusa. Niedawno opisano funkcjonalny receptor HBV na powierzchni hepatocytów, *NTCP* (ang. *sodium taurocholate cotransporting polypeptide*), który stał się atrakcyjnym celem do opracowania nowych terapii przeciwwirusowych. Wpływ polimorfizmów genetycznych w obrębie genu *NTCP* na cykl życiowy wirusa i przebieg zakażenia pozostają słabo poznane. W tym badaniu sprawdziliśmy, czy polimorfizm pojedynczego nukleotydu w rejonie regulatorowym genu *NTCP* (rs7154439) może wpływać na przebieg przewleklego zapalenia wątroby typu B.

**Metody.** Badania przeprowadzono na grupie 173 pacjentów z PZWB. U wszystkich pacjentów oznaczono markery zakażenia: HBsAg, HBeAg, anti-HBe, oraz ilościowe HBV DNA. Analiza histopatologiczna biopłatów wątroby została wykonana u 131 pacjentów. Genotypowanie polimorfizmu w obrębie *NTCP* (rs7154439)

przeprowadzono na platformie MassARRAY w oparciu o spektrometrię mas MALDI-TOF.

**Wyniki.** Genotyp AA był związany z wyższym ryzykiem występowania HBeAg przed rozpoczęciem terapii, zarówno w analizie jednowymiarowej (AA vs AG, GG OR=5,1, 95% CI=1,3-20,6, p=0,021), jak i wielowymiarowej z uwzględnieniem wieku i płci (AA vs AG, GG OR=6,5, 95% CI=1,3-31,6, p=0,019). Nie zaobserwowano z kolei zależności pomiędzy badanym polimorfizmem a poziomem HBV DNA. Badany polimorfizm nie wpływał również na parametry uszkodzenia wątroby: aktywność zapalną oraz stopień włóknienia.

**Wnioski.** Polimorfizm rs7154439 znajdujący się w rejonie regulatorowym genu *NTCP* może wpływać na odpowiedź gospodarza na zakażenie HBV. Jest to pierwsze doniesienie wskazujące na rolę polimorfizmu w obrębie *NTCP* na przebieg PZWB w populacji europejskiej. Lepsze zrozumienie roli czynników gospodarza w przebiegu zakażenia HBV może okazać się kluczowe do opracowania nowych substancji przeciwwirusowych.

Badanie zostało sfinansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu Infect-ERA hepBccc (Infect-ERA 01/2014).

## III-U 6

### ZDOLNOŚĆ NOWO WYIZOLOWANYCH BAKTERIOFAGÓW DO ERADYKACJI BIOFILMU WYTWORZONEGO PRZEZ METYCYLNOOPORNE SZCZEPY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Natalia Łubowska<sup>1</sup>, Lidia Piechowicz<sup>2</sup>, Bartłomiej Grygorcewicz<sup>3</sup>

<sup>1,2</sup>Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Gdański Uniwersytet Medyczny

<sup>3</sup>Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny

nlubowska@gumed.edu.pl

*Staphylococcus aureus* jest jednym z głównych patogenów odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne. Może być przyczyną m.in. ropnych zakażeń skórnych, posocznicy, zapalenia wsierdza. Niektóre z infekcji *S. aureus* przybierają formę zakażeń przewlekłych. W wielu spośród nich duży udział przypisuje się zdolności tego patogenu do wytwarzania biofilmu. Leczenie infekcji wywołanych przez szczepy *S. aureus* odporne na metycylinę (MRSA), które przed działaniem środków antybakteryjnych chronione są również dzięki zewnątrzkomórkowej macierzy biofilmu, stanowi poważny problem terapeutyczny. Nową strategią w zakresie zapobiegania i zwalczania biofilmów bakteryjnych, w tym wytwarzanych przez *S. aureus* mogą stać się bakteriofagi.

Celem pracy była ocena zdolności nowo wyizolowanych fagów z rodziny *Myoviridae* do eradykacji biofilmu wytworzonego przez metycylinyoporne szczepy *S. aureus* (MRSA).

Do badań wykorzystano 2 bakteriofagi z rodziny *Myoviridae*. Ich aktywność lityczną przetestowano wobec 70 izolatów MRSA wykorzystując metodę spot-test. Izolaty bakteryjne wyodrębnione

zostały z różnych materiałów klinicznych, w tym rany, czyraka, plwociny. Wszystkie izolaty oceniono pod kątem zdolności do tworzenia biofilmu przy wykorzystaniu metody płytek mikrotitracyjnych. Intensywność wytworzonego biofilmu analizowano metodą barwienia z użyciem fioleto krystalicznego (CV) oraz metodą oceny redukcji bromku 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowego (MTT). Do analizy eradykacji biofilmu przez bakteriofagi wybrano wyłącznie izolaty scharakteryzowane jako silnie wytwarzające biofilm. Zdolność do eradykacji biofilmu określono poprzez traktowanie 48 godzinnego biofilmu bakteryjnego odpowiednimi rozcieńczeniami lizatu fagowego ( $10^{11}$ ,  $10^7$ ,  $10^2$  pfu/ml).

Fag.1 wykazał silną reakcję lityczną (powyżej 50 lysinek i zlewna liza) wobec 48 badanych szczepów, w 21 przypadkach reakcja była słaba (od 1 do 50 lysinek), 1 szczep był niewrażliwy na działanie faga (brak lysinek). Natomiast przy wykorzystaniu faga 2 silną reakcję zaobserwowano w 47 przypadkach, słabą w 23. Wykazano, że wszystkie analizowane izolaty MRSA mają

zdolność do tworzenia biofilmu *in vitro*, jednak z różną intensywnością. Jako silnie wytwarzające biofilm scharakteryzowanych zostało 16 izolatów ( $CV A_{370} > 1,2$ ;  $MTTA_{340} > 0,9$ ). Oba badane

fagi doprowadziły do znaczącej redukcji biomasy (40–90%) oraz obniżenia aktywności metabolicznej (72–95%) biofilmu wytworzonego przez wybrane izolaty.

### III-U 7

#### DEMODEKOZA JAKO KLINICZNY EFEKT INTERAKCJI: MIKROBIOM – ROZTOCZ – CZŁOWIEK

Maria A. Bobowicz<sup>1</sup>, Piotr Kleina-Schmidt<sup>1, 3, 4</sup>, Bożena Borenstein<sup>1</sup>, Agata Brązert<sup>2</sup>,  
Michalina Nowak-Gabryel<sup>2</sup>, Jarosław Kocięcki<sup>2</sup>, Anna Kowalska<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

<sup>2</sup>Katedra i Klinika Okulistyki, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

<sup>3</sup>NZOZ Euromed, Konin; <sup>4</sup>Prywatny Gabinet Okulistyczny, Poznań

<sup>5</sup>Zakład Funkcji Kwasów Nukleinowych, Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań

Piotr.schmidt07@gmail.com

Przedmiotem badań są dwa gatunki nużeńców *Demodex folliculorum* (nużeniec ludzki) i *Demodex brevis* (nużeniec krótki) pasożytujące na człowieku, reprezentujące nużeńcowate (*Acar*: *Demodicidae*). Oba gatunki preferują obszary, w których znajdują się komórki nabłonka skóry, mieszki włosowe i łój wydzielany przez gruczoły łojowe, stanowiące podstawę ich wyżywienia. *Demodex folliculorum* zasiedla ujścia mieszków włosowych, gdzie występuje w skupiskach od dwóch do kilkunastu osobników. *Demodex brevis* bytuje samotnie w gruczołach łojowych skóry twarzy oraz w powiekowych tarczkowych gruczołach Meiboma. Nie wykryto znaczącej korelacji między częstością nużycy (demodekozy) a warunkami socjalnymi czy współwystępowaniem zespołu metabolicznego. Badania epidemiologiczne potwierdzają, że zarazanie populacji rośnie wraz z wiekiem, z każdą dekadą o 10%. Zarazenie nie jest tożsame z dolegliwościami okulistycznymi. Te pojawiają się dopiero po namnożeniu roztocza. Obecność *Demodex* jest uważana za czynnik istotny w etiologii zapalenia brzegów powiek oraz dysfunkcji gruczołów Meiboma z Zespołem Suchego Oka. Ponadto, ma miejsce transmisja patogenów bytujących wewnątrz nużeńca (głównie paciorkowców i gronkowców) mogących odpowiadać za rozwój zapalenia powiek, ostrego zapalenia gruczołów

tarczkowych (jęczmieniec) czy trądzika. Immunizacyjnie działa także polisacharydowy egzozyskielet chitynowy nużeńca. Wszystkie ww. czynniki stymulują odpowiedź humoralną (*Demodex folliculorum*) oraz komórkową (*Demodex brevis*) w organizmie chorego. Często ma miejsce opóźniona reakcja nadwrażliwości. Stan zapalny nasila trichozę – proces nieprawidłowego wzrostu i wypadania rzęs. W łzach chorych z zapaleniem brzegów powiek zaobserwowano podwyższony poziom cytokin: IL-7, IL-12 oraz IL-17. Ta ostatnia powoduje pobudzenie odpowiedzi autoimmunologicznej i alergicznej, a także stymuluje wydzielanie czynnika wzrostu śródbłonka naczyń VEGF-A odpowiedzialnego za teleangiektazje – poszerzenie naczyń skóry mieszka i powiek. Nagromadzenie komórek nabłonka, histocytów, fibroblastów, limfocytów oraz komórek osocza w obrębie niedrożnych gruczołów tarczkowych może powodować wystąpienie nawracających i opornych na wyleczenie gradówek. Zaczopowanie ujęć gruczołów tarczkowych Meiboma i związany z tym brak zewnętrznej lipidowej warstwy filmu łzowego doprowadza do powstania Zespołu Suchego Oka. W jego następstwie dochodzi do hiperosmolarności filmu łzowego, apoptozy komórek i zmian metabolizmu oraz struktury powierzchni oka.

### III-U 8

#### ZASTOSOWANIE METOD MOLEKULARNYCH W CHARAKTERYSTYCE SZCZEPÓW *ENTEROCOCCUS FAECIUM* OPORNYCH NA GLIKOPEPTYDY I LINEZOLID

Tomasz Bogiel<sup>1, 2</sup>, Agnieszka Mikucka<sup>1</sup>, Eugenia Gospodarek-Komkowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,

<sup>2</sup>Laboratorium Analiz Lekarskich „ALAB”, 10 Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką SP ZOZ w Bydgoszczy

bogiel.tomasz@wp.pl

Wraz z postępem wiedzy na temat właściwości biologicznych drobnoustrojów oraz epidemiologii wywołanych przez nie zakażeń wzrasta konieczność włączenia do codziennej diagnostyki mikrobiologicznej metod molekularnych. Stosowane obecnie metody fenotypowe nie są wystarczające w ocenie podobieństwa bakterii, występowania u nich czynników wirulencji czy określania podłoża oporności na antybiotyki. Pojawienie się w ostatnich dekadach nowych mechanizmów oporności dodatkowo wymusza poszukiwanie metod diagnostycznych o zwiększonej czułości i swoistości, a przede wszystkim umożliwiających wydanie wiarygodnego wyniku w możliwie najkrótszym czasie. Intensywne poszukiwanie

w XXI wieku nowych metod diagnostyki chorób zakaźnych spowodowało dynamiczny rozwój technik biologii molekularnej.

W badaniach wykorzystano szczepy *Enterococcus faecium* fenotypie GLRE (Glycopeptides-Linezolid-Resistant *Enterococcus*) izolowane od pacjentów Szpitala Uniwersyteckiego Nr 1 im. dra A. Jurasza w Bydgoszczy CM w Bydgoszczy UMK w Toruniu.

Ocenę podobieństwa genetycznego wszystkich izolatów GLRE wykonano techniką RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) z wykorzystaniem primerów o różnych sekwencjach oraz metodą MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry).

Najczęstszą przyczynę oporności na linezolid u szczepów *Enterococcus faecium*, mutację G2576T, w sekwencji kodującej 23S rRNA, wykrywano metodą badającą SNP (Single Nucleotide Polymorphism) oraz techniką RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism). Badany fragment regionu 23S rRNA poddano również sekwencjonowaniu. Otrzymane wyniki wskazują na konieczność zastosowania metod molekularnych w ocenie pod-

biństwa i rozprzestrzeniania się szczepów GLRE, poszukiwaniu źródła zakażenia oraz analizie podłoża oporności na antybiotyki. Uzyskanie wiarygodnego wyniku najczęściej wymaga zastosowania jednocześnie przynajmniej dwóch metod molekularnych lub różnych ich wariantów.

*Badania sfinansowano ze środków przyznanych na utrzymanie potencjału badawczego Katedry i Zakładu Mikrobiologii CM UMK.*

### III-U 9

## AKTYWNOŚĆ POCHODNYCH SEMIKARBAZYDU I TIOSEMIKARBAZYDU WOBEC BAKTERII TWORZĄCYCH BIOFILM W WARUNKACH STACJONARNYCH

Kosikowska Urszula<sup>1</sup>, Pitucha Monika<sup>2</sup>, Andrzejczuk Sylwia<sup>1</sup>, Sobótka-Polska Karolina<sup>2</sup>, Malm Anna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Lublin

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Lublin

urszula.kosikowska@umlub.pl

W patomechanizmie zakażeń wywoływanych przez drobnoustroje istotną rolę odgrywa biofilm, który stwarza specyficzne warunki przetrwania patogenów i bakterii oportunistycznych oraz umożliwia nabywanie nowych cech, takich jak zmniejszona podatność na antybiotyki.

Celem pracy była ocena aktywności *in vitro* nowo zsintezowanych liniowych pochodnych semikarbazylu i tiosemikarbazylu na namnażanie i tworzenie biofilmu przez bakterie w warunkach stacjonarnych. Badania prowadzono z wykorzystaniem szczepów wzorcowych bakterii Gram-dodatnich: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *S. epidermidis* ATCC 12228 oraz Gram-ujemnych: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 12453 i *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Wpływ nowo otrzymanych związków na namnażanie komórek i tworzenie biofilmu badano metodą podwójnych rozcieńczeń związku w bulionie. Aktywność badanych pochodnych oceniano spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda = 570$  nm ( $OD_{570}$ ) wobec komórek planktonowych i tworzących biofilm odpowiednio w oparciu o wartość MIC (minimal inhibitory concentration) i MBIC (minimal biofilm inhibitory

concentration, po zastosowaniu 0,1% fioletu krystalicznego). Wykazano zależność od gatunku i badanej pochodnej aktywność wobec *S. aureus* (MIC = 3,9 – 62,5 mg/L, MBIC = 3,9 – 62,5 mg/L) i *S. epidermidis* oraz jej brak (MIC = MBIC =  $\geq 1000$  mg/L) wobec szczepów wzorcowych bakterii Gram-ujemnych. Aktywnością przeciwdrobnoustrojową wobec planktonowych i tworzących biofilm komórek *S. aureus* (MIC = 7,8 – 15,6 mg/L; MBIC = 31,25 mg/L) przy jednoczesnym braku wpływu na *S. epidermidis* (MIC = MBIC  $\geq 1000$  mg/L) charakteryzował się 1-cyjanofenyloacetylo-4-(1-naftylo)semikarbazyl. Pochodne tiosemikarbazylu posiadające ugrupowanie cyjanoacetylowe lub cyjanofenyloacetylowe i różne podstawniki w pozycji 4 hamowały namnażanie i tworzenie biofilmu przez *S. aureus* (MIC = 1,95–62,5 mg/L; MBIC = 62,5 – 500 mg/L) oraz *S. epidermidis* (MIC = 0,49 – 125 mg/L; MBIC = 125 – 500 mg/L).

Uzyskane dane wskazują, że liniowe pochodne semikarbazylu i tiosemikarbazylu mogą być wykorzystywane jako związki wyjściowe do poszukiwania nowych substancji o aktywności przeciwwgronkowcowej zarówno wobec komórek planktonowych jak i tworzących biofilm.

### III-U 10

## WYSTĘPOWANIE I ZNACZENIE STAPHYLOCOCCUS AUREUS O GRANICZNEJ OPORNOŚCI NA OKSACYLINĘ (BORSA)

Maria Hryniewicz, Katarzyna Garbacz

Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Gdański Uniwersytet Medyczny

mariah@gumed.edu.pl

Oporność gronkowców na PRPs (penicillinase-resistant penicillins) stanowi od lat jeden z najważniejszych problemów bakteriologicznej lekooporności. Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) są, obok MRSA, odmianą metacyclinooporności zdecydowanie słabiej poznaną i niewystarczająco zdefiniowaną. Są to szczepy o niskiej, granicznej oporności na PRPs (MIC oksacyliny najczęściej 1–8  $\mu$ g/ml) i w przeciwieństwie do szczepów MRSA – nie posiadające zmutowanego białka PBP2a determinowanego genem *mecA* lub *mecC*. Ich oporność wynika zazwyczaj z hiperprodukcji  $\beta$ -laktamaz, a w niektórych przypadkach z punktowych mutacji w białkach PBP. Szczepy BORSA nie mogą być klasyfikowane ani jako prawdziwie metacyclinooporne ani metacyclinooporne gronkowce, chociaż bywają

mylone w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej z jednymi i drugimi. Stwarza to oczywiste niebezpieczeństwo epidemiologiczne i problemy terapeutyczne.

Wielu badaczy wskazuje na stosowanie antybiotyków jako główny czynnik ryzyka w nabywaniu oporności typu BORSA. Autorzy sugerują, że szczepy pojawiły się pod wpływem selekcyjnej presji antybiotykowej, jako rozwój oporności na metacyclinę.

BORSA są szeroko rozpowszechnione zarówno w środowisku ludzi jak i zwierząt, a także w szpitalach jak i poza nimi. Szczepy BORSA były wykrywane również w żywności. Wykazano, że istnieje zależność pomiędzy nosicielstwem BORSA wśród zwierząt, a późniejszym występowaniem ich w produktach pochodzenia zwierzęcego.



Wydaje się, że zakażenia spowodowane przez BORSA są podobne w epidemiologii i przebiegu do zakażeń MRSA i cięższe niż te wywołane przez MSSA. Wykrycie w materiale od pacjenta szczepów BORSA jest kluczowe dla dalszej, trafnej antybiotykoterapii. Jednak informacje na temat ich detekcji w rutynowej diagnostyce są bardzo skąpe. Dodatkowym niebezpieczeństwem i utrudnieniem w trafnej diagnostyce BORSA jest niewątpliwie brak gatunkowo swoistych czynników, takich jak koagulaza

czy termonukleaza. Leczenie ciężkich infekcji spowodowanych przez BORSA nawet dużymi dawkami oksacyliny może być nieskuteczne.

Badania pokazują, że są często pomijanym i niedocenianym problemem, a ich izolacja z coraz to nowych środowisk wskazuje na pilną potrzebę monitorowania tego rodzaju zakażeń i umiejętność skutecznego różnicowania ich zarówno ze szczepami MSSA jak i MRSA.

### III-U 11

## WPŁYW INAKTYWACJI FOTODYNAMICZNEJ NA PRZEŻYWALNOŚĆ I LEKOWRAŻLIWOŚĆ WIELELEKOOPORNYCH IZOLATÓW *S. AUREUS*

Agata Woźniak, Mariusz Grinholc

Zakład Diagnostyki Molekularnej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

[mariusz.grinholc@biotech.ug.edu.pl](mailto:mariusz.grinholc@biotech.ug.edu.pl)

Przeciwdrobnoustrojowa inaktywacja fotodynamiczna (aPDI, ang. *Antimicrobial Photodynamic Inactivation*) jest współcześnie jedną z alternatywnych technik stosowanych w celu eradykacji opornych na antybiotyki mikroorganizmów, leczenia trądziku, a także skutecznym narzędziem prowadzącym do eliminacji grzybów, pasożytów oraz wirusów. Inaktywacja fotodynamiczna wykorzystuje źródło światła widzialnego o różnym zakresie długości fali, wewnątrzkomórkowe porfiryny bądź nietoksyczne związki fotouczulające oraz tlen. W wyniku absorpcji kwantu światła dochodzi do wzbudzenia fotouczulacza, który na drodze transferu elektronu prowadzi do formowania reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*) bądź w wyniku transferu energii do powstawania tlenu singletowego. Otrzymane w wyniku reakcji fotodynamicznej reaktywne formy tlenu oraz tlen singletowy na skutek promowania stresu oksydacyjnego prowadzą do zniszczenia struktury ściany komórkowej i/lub uszkodzenia DNA w trak-

towanej komórce drobnoustroju. W związku z narastającą lekoopornością drobnoustrojów poszukuje się nowych alternatywnych metod zwalczania zakażeń bakteryjnych. W bieżącym projekcie zbadano wpływ inaktywacji fotodynamicznej na przeżywalność *S. aureus* oraz oddziaływanie aPDI w połączeniu z rutynowo stosowanymi antybiotykami. W badaniach posłużono się izolatami klinicznymi, które wykazywały profil rozszerzonej oporności antybiotykowej XDR (ang. *Extensively Drug Resistant*). Kategoria oporności XDR charakteryzuje się brakiem wrażliwości drobnoustroju na co najmniej jeden antybiotyk ze wszystkich, z wyjątkiem dwóch lub mniej kategorii antybiotyków. Ponadto, skoncentrowano się na wykazaniu interakcji pomiędzy stosowanymi chemioterapeutykami, a inaktywacją fotodynamiczną. W tym celu wykorzystano metodę dyfuzyjno-krażkową, E-testy z rosnącym gradientem stężeń chemioterapeutyków oraz test szachownicy (ang. *Checkerboard Assay*).

### III-U 12

## IDENTYFIKACJA PEPTYDÓW ODPORNOŚCIOWYCH BARCIAKA WIĘKSZEGO PO ZAKAŻENIU BAKTERIĄ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Anna Siemińska-Kuczer<sup>1</sup>, Paweł Mak<sup>2</sup>, Mariola Andrejko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Immunobiologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie,

<sup>2</sup>Zakład Biochemii Analitycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

[asieminska.bio@gmail.com](mailto:asieminska.bio@gmail.com)

Gąsienice barciała większego (*Galleria mellonella*) są coraz częściej stosowanym organizmem modelowym w badaniach dotyczących patogenezы i czynników wirulencji bakterii. W walce z drobnoustrojami organizm uruchamia mechanizmy odpowiedzi humoralnej, w których kluczową rolę odgrywają peptydy odpornościowe. U tego owada sklasyfikowano kilkanaście peptydów, m.in. liniowe peptydy  $\alpha$ -helikalne (cekropiny, moricyny), peptydy o strukturze stabilizowanej mostkami disiarczkowymi (defensyny, galleriomycyna), peptydy o dużej zawartości reszt proliny lub glicyny, a także peptydy anionowe. Peptydy te mogą wykazywać nie tylko właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze, lecz także mogą być zdolne do zabijania pierwotniaków i wirusów.

Gram-ujemna pałeczka, *Pseudomonas aeruginosa* jest oportunistycznym patogenem człowieka powszechnie obecnym w środowisku i wywołującym liczne zakażenia szpitalne. W badaniach użyto

szczepów bakterii, w tym izolatów klinicznych różniących się profilem zewnątrzkomórkowych proteaz. Podjęte badania miały na celu określenie czy rodzaj syntetyzowanych w hemolimfie owada peptydów odpornościowych zależy od szczepu bakteryjnego użytego do zakażenia gąsienic.

Metodą dyfuzji radialnej oraz metodą bioautografii wykazano, że zakażenie owadów bakterią *P. aeruginosa* skutecznie indukuje zarówno aktywność przeciwbakteryjną, jak i przeciwgrzybową w hemolimfie *G. mellonella*. Pojawienie się aktywności przeciwdrobnoustrojowej w hemolimfie związane jest z syntezą peptydów o masie poniżej 6,5 kDa. Zaobserwowano wyraźną zależność poziomu peptydów od szczepu bakteryjnego użytego do zakażenia owadów.

W badaniach wstępnych przeanalizowano profil peptydowy w ekstraktach otrzymanych z hemolimfy zakażonych gąsienic



stosując metodę chromatografii RP-HPLC. W badanym materiale zaobserwowano obecność sześciu peptydów przeciwdrobnoustrojowych: cekropiny, defensyny, peptydu anionowego 1 i 2

oraz peptydu bogatego w prolinę-1 i -2. Należy zaznaczyć, że po infekcji Gram-ujemną bakterią nastąpiła indukcja syntezy peptydów o zróżnicowanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

### III-U 13

## POCHODNE KWASU AMINOMETYLOFOSFINOWEGO O AKTYWNOŚCI ANTYUREOLITYCZNEJ I ANTYBAKTERYJNEJ

Ewa Greła, Katarzyna Macegoniuk, Agnieszka Grabowiecka

Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska

ewa.grela@pwr.edu.pl

Bakterie aktywne ureolitycznie stanowią istotną podgrupę mikroorganizmów chorobotwórczych. Do najbardziej znanych należą Gram-ujemne pałeczki rodzaju *Proteus*. W ich przypadku ureaza jest istotnym czynnikiem wirulencji, odpowiedzialnym za podnoszenie pH moczu i towarzyszące mu wytrącanie kamieni moczowych. Gatunek *Proteus mirabilis* jest jednym z najczęściej spotykanych w przypadku szpitalnych infekcji układu moczowego, w szczególności zakażeń towarzyszących cewnikowaniu.

Zastosowanie efektywnych inhibitorów ureolizy może być obiecującą alternatywą dla stosowanych antybiotyków. Obecnie jedynym inhibitorem ureolizy zatwierdzonym przez FDA do terapii zakażeń układu moczowego jest kwas aceto hydroksamowy (AHA), posiadający znaczące efekty uboczne. W ostatnich latach w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej otrzymano nową grupę inhibitorów ureazy – pochodne kwasu aminometylofosfinowego. Badania na oczyszczonej ureazie *P. mirabilis* pozwoliły na wskazanie kwasu aminometylo(*N,n*-heksyloaminometylo)fosfinowego ( $C_6$ ) jako najaktywniejszego w badanej grupie o  $K_i = 0.2 \mu\text{M}$ , w porównaniu z  $K_i = 5.7 \mu\text{M}$  dla AHA. Podczas inkubacji z całymi komórkami *P. mirabilis* 15 z 21 badanych związków wykazało silniejsze działanie antyureolityczne niż AHA. W tym doświadczeniu  $C_6$  również został określony jako jeden z najefektywniejszych inhibitorów o 10-krotnie silniejszym działaniu niż AHA.

Badania na całych komórkach rozszerzono o oznaczenia aktywności antybakteryjnej. Najaktywniejsze związki – kwasy aminometylo(*N,n*-propyloaminometylo)fosfinowy ( $C_3$ ) oraz aminometylo(*N,n*-heptyloaminometylo)fosfinowy ( $C_7$ ) ograniczały wzrost bakterii do 20% względem próby kontrolnej po 24 h inkubacji przy 0,5 mM stężeniu. Przeprowadzono również test MTT, określający aktywność metaboliczną komórek bakteryjnych poddanych działaniu związków oraz wybarwiono komórki z zastosowaniem zestawu fluorescencyjnego BacLight®, bazującego na zmianach integralności błony bakteryjnej. Otrzymane wyniki charakteryzowały się sporą rozbieżnością w porównaniu z wcześniej przedstawionymi. Wykonane barwienia z zastosowaniem *N*-fenylo-1-naftyloaminy oraz sprawdzenie aktywności  $\beta$ -galaktozydazy pozwoliły stwierdzić, że obserwowane nieścisłości są spowodowane aktywnością permeabilizującą badanych związków. Inhibitory o aktywności antybakteryjnej –  $C_3$  oraz  $C_7$  – należały również do najaktywniejszych permeabilizatorów błony bakteryjnej, osiągając poziom około 80% efektu uzyskiwanego przy inkubacji z analogicznym stężeniem EDTA.

Projekt współfinansowany ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego KNOW na lata 2014-2018 dla Wrocławskiego Centrum Biotechnologii.

### III-U 14

## INAKTYWACJA PdTAS ZMIENIA WRAŻLIWOŚĆ *M. SMEGMATIS* NA AMINOGLIKOZYDY

Dadura Karolina<sup>1,2</sup>, Rumijowska-Galewicz Anna<sup>1</sup>, Żaczek Anna<sup>1</sup>, Lewandowska Karolina<sup>1</sup>, Płocińska Renata<sup>1</sup>, Dziadek Jarosław<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Genetyki i Fizjologii Mycobacterium, Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk, Łódź

<sup>2</sup>Studium Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź

karola-kd@o2.pl

*Mycobacterium tuberculosis* jest czynnikiem etiologicznym gruźlicy, choroby, na którą co roku umierają miliony ludzi na całym świecie. W ostatnich latach obserwuje się intensywny wzrost liczby szczepów wielolekoopornych, przeciwko którym współczesna medycyna bywa bezradna. Sukces *M. tuberculosis* jako patogenu związany jest ze zdolnością tych bakterii do adaptacji do różnorodnych warunków bytowania w organizmie człowieka na różnych etapach infekcji, dzięki szybkiej i adekwatnej odpowiedzi na sygnały docierające z otoczenia. Aby szybko i efektywnie przystosowywać się do zmieniających się warunków otoczenia komórki mykobakterii wykorzystują dwukomponentowe systemy transdukcji sygnałów (TCSS). Białko PdTAS *Mycobacterium tuberculosis* wchodzi w skład dwukomponentowego system transdukcji

sygnału PdTAS/PdTAR. Białko to pełni rolę sensorowej kinazy, która jest zdolna do autofosforylacji i przekazania reszty fosforanowej do regulatora odpowiedzi PdTAR.

Celem projektu jest zbadanie udziału histydynowej kinazy PdTAS oraz białka regulatorowego PdTAR *Mycobacterium tuberculosis* w regulacji wybranych procesów metabolicznych mykobakterii. W ramach przeprowadzonych badań skonstruowano zmutowany szczep *M. smegmatis* pozbawiony funkcjonalnego genu *pdtA*S. Następnie wykorzystano macierze fenotypowe dla identyfikacji warunków wzrostu w których szczep mutant posiada znacząco zmienioną aktywność metaboliczną. Zaobserwowano, że szczep pozbawiony funkcjonalnego białka PdTAS wykazuje zmiany wrażliwości na szereg antybiotyków aminoglikozydowych

oraz inhibitorów łańcucha oddechowego. Zależność pomiędzy transportem elektronów w łańcuchu oddechowym a opornością na aminoglikozydy badano analizując przepuszczalność osłon komórkowych dla wybranych antybiotyków aminoglikozydowych (kanamycyny, streptomycyny, dihydrostreptomycyny, apramycyny, sisomycyny) oraz rifampicyny.

Wykazano, iż przepuszczalność osłon komórkowych szczepu *ΔpdaSM. smegmatis* jest nieznacznie zmniejszona w porównaniu do szczepu kontrolnego. Zaobserwowano również zwiększoną wrażliwość badanych szczepów *M. smegmatis* w stosunku do badanych antybiotyków aminoglikozydowych (kanamycyny, streptomycyny, dihydrostreptomycyny, apramycyny, sisomycyny).

### III-U 15

#### ZNACZENIE DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ W OCENIE SKUTECZNOŚCI LECZENIA WIRUSOWEGO ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C

Katarzyna Sikorska<sup>1</sup>, Anna Wróblewska<sup>2</sup>, Agnieszka Brzozowska<sup>3</sup>, Małgorzata Cheba<sup>4</sup>, Beata Lorenc<sup>4</sup>, Krzysztof P. Bielawski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Medycyny Tropikalnej i Epidemiologii, Gdański Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup>Zakład Diagnostyki Molekularnej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański, Gdański Uniwersytet Medyczny

<sup>3</sup>Zakład Biologii Molekularnej Wirusów, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański, Gdański Uniwersytet Medyczny

<sup>4</sup>Szpital Pomorskie, Specjalistyczny Szpital Zakaźny

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (ang. *hepatitis C virus*, HCV) jest ważnym czynnikiem przyczynowym przewlekłej choroby wątroby, prowadzącej w części przypadków do marskości wątroby i raka wątrobowokomórkowego (ang. *hepatocellular carcinoma*, HCC). Następstwa te stanowią główne wskazanie do transplantacji wątroby w krajach rozwiniętych. Wprowadzenie w ostatnich dwóch latach terapii bezinterferonowej znacznie zwiększyło szanse na całkowite wyleczenie. Wskazuje się na możliwą pełną eliminację zakażenia choć jednocześnie odnotowuje się przypadki reinfekcji lub reaktywacji po skutecznym leczeniu. Dyskutowane jest znaczenie utajonego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (ang. *occult hepatitis C*, OCI). OCI może dotyczyć 10–100% pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C (pzwC) skutecznie leczonych w przeszłości interferonem, u których wykazano trwałą odpowiedź wirusologiczną za pomocą standardowych molekularnych testów diagnostycznych. Diagnoza OCI polega na wykryciu obecności niewielkich ilości HCV-RNA w wątrobie, surowicy lub w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej z użyciem ultraczułych metod. Wiadomo, że OCI wiąże się silnie z upośledzoną odpowiedzią immunologiczną oraz

stanowi czynnik ryzyka rozwoju chorób limfoproliferacyjnych, marskości wątroby HCC. Długofalowy wpływ terapii bezinterferonowej na rozwój OCI nie jest znany.

Celem pracy była ocena częstości wykrywania HCV RNA w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej u chorych, którzy osiągnęli po terapii bezinterferonowej trwałą odpowiedź wirusologiczną, ocenianą przy użyciu standardowych testów diagnostycznych. Do badania włączono 25 chorych. Detekcja HCV-RNA została przeprowadzona w wyizolowanych jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej inkubowanych w obecności mitogenu. Amplifikacja fragmentu HCV-RNA, została wykonana z użyciem starterów komplementarnych do sekwencji w regionie 5'UTR genomu wirusa. Specyficzność otrzymanych produktów potwierdzono za pomocą sekwencjonowania. Obecność HCV RNA wykrywanego tą metodą potwierdzono u 6/25 (24%) pacjentów. Uzyskane wyniki potwierdzają możliwość przetrwania zakażenia HCV w komórkach krwi obwodowej po leczeniu bezinterferonowym, mimo braku detekcji HCV RNA we krwi, stwierdzanego przy użyciu testów stosowanych w rutynowej praktyce klinicznej.

### III-U 16

#### ROLA BIAŁKA MSMEG0432 MYCOBACTERIUM SMEGMATIS W METABOLIZMIE AZOTANÓW I AZOTYNÓW

Magdalena Antczak<sup>1,2</sup>, Renata Płocińska<sup>2</sup>, Przemysław Płociński<sup>2</sup>, Jarosław Dziadek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź

<sup>2</sup>Laboratorium Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*, Instytut Biologii Medycznej PAN, Łódź

[mantczak.biotech@gmail.com](mailto:mantczak.biotech@gmail.com)

W warunkach naturalnych bakterie zmagają się z ograniczonym dostępem do związków azotu. Ich asymilacja umożliwia wbudowanie pierwiastka we własne komponenty i kolejne podziały komórki. U *Mycobacterium smegmatis* globalnym regulatorem metabolizmu azotu jest białko GlnR, który między innymi bezpośrednio reguluje ekspresję potencjalnego czynnika transkrypcyjnego jakim jest białko Msmeg0432. W celu poznania roli białka Msmeg0432 w asymilacji i konwersji związków azotu, szczepy mutanty *Δmsmeg0432* oraz *ΔglnR M. smegmatis* hodowano w warunkach ograniczonego azotu. Z biomas uzyskanych z tych hodowli wyizolowano całkowity RNA z którego uzyskano biblioteki RNA/cDNA celem przeprowadzenia analizy RNA-seq.

Analiza ta wykazała, że podczas ograniczonego dostępu azotu, w mutancie *Δmsmeg0432* dochodzi do zmiany poziomu ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm azotowy. Dane te skłoniły nas do dalszych badań, celem których była ocena wzrostu mutantów *Δmsmeg0432*, *ΔglnR* oraz szczepu dzikiego, w podłożu Sautona zawierającym różne źródła azotu. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że białko Msmeg0432 oraz GlnR biorą udział w konwersji związków azotowych u *M. smegmatis*. Dowiedziono, że GlnR warunkuje możliwość asymilacji azotu z większości badanych przez nas źródeł. Istotną rolę w metabolizmie azotowym pełni również białko Msmeg0432, które prawdopodobnie reguluje transport oraz przemiany azotanów i azotynów.

## POSTERY

## III-P 1

## ZASTOSOWANIE MONOAZYDKU PROPIDYNY (PMA) DO ROZRÓŻNIANIA KOMÓREK ŻYWYCH I MARTWYCH ZA POMOCĄ qPCR

Magdalena Wysocka, Hanna Olech, Beata Krawczyk

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

magwojta@gmail.com

Różnicowanie komórek żywych i martwych jest istotnym wyzwaniem w diagnostyce mikrobiologicznej. W związku z tym, że DNA pozostaje po śmierci komórki, ocena ilościowa oparta o wykrywanie DNA techniką amplifikacji może prowadzić do istotnego przeszacowania ryzyka związanego z patogenami lub dawać fałszywie dodatnie wyniki. Optymalnym rozwiązaniem może być amplifikacja DNA z komórek poddanych wcześniejszemu działaniu barwnikami fluorescencyjnymi. Jednym ze sposobów różnicowania komórek jest wykorzystanie zdolności PMA do przenikania przez błony komórkowe martwych mikroorganizmów i wiązania się z dwuniciowym DNA.

Celem pracy było zbadanie przydatności PMA do selektywnego wykrywania genomowego DNA z żywych komórek *Klebsiella pneumoniae* w warunkach stresogennych (temp. 72°C). Optymalizacji poddano stężenie PMA oraz czas wystawienia na działanie światła w celu indukcji wiązania z DNA. Jako kontrole zastosowano komórki nie poddane działaniu temperatury oraz komórki, które całkowicie utraciły żywotność. Z komórek bakteryjnych izolowano totalne genomowe DNA i stosując reakcję qPCR określano zdolność wyizolowanego DNA do amplifikacji w oparciu o wartość Ct.

Stwierdzono, że 20 i 50 µM stężenia PMA skutecznie blokowały DNA z martwych komórek. Zastosowany czas inkubacji z barwnikiem nie wpłynął w znaczącym stopniu na wydajność wiązania barwnika do DNA, a tym samym na wydajność amplifikacji PCR. Do dalszych eksperymentów wybrano 50 µM stężenie PMA i czas inkubacji 20 minut. Podczas gdy wydajność amplifikacji DNA dla próbek pochodzących z żywych komórek była porównywalna z próbkami, których nie potraktowano PMA, to dla martwych komórek zauważono znaczny spadek w wydajności amplifikacji, który wynikał prawdopodobnie z braku dostępu polimerazy do ssDNA. Najwyższą wartość Ct, tzn. najwyższą redukcję sygnału amplifikacji obserwowano dla kontrolnej próbki DNA pochodzącej z komórek *K. pneumoniae* po zadziałaniu wysoką temperaturą.

Wysunięto wniosek, że barwnik PMA w połączeniu z techniką qPCR może być wiarygodnym narzędziem stosowanym do odróżniania komórek żywych od martwych dla szczepów *K. pneumoniae*. Oszacowanie stopnia przeżywalności komórek bakteryjnych *K. pneumoniae* oraz ich kinetyka śmierci może dostarczyć cennych informacji o ich rzeczywistej wrażliwości na różne czynniki stresogenne.

## III-P 2

WYSTĘPOWANIE LEKOOPORNYCH SZCZEPÓW OTOCZKOWYCH *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* U PACJENTÓW Z PRZEWLEKŁĄ BIAŁACZKĄ LIMFOCYTOWĄUrszula Kosikowska<sup>1</sup>, Sylwia Andrzejczuk<sup>1</sup>, Ewelina Grywalska<sup>2</sup>, Dagmara Pyśniak-Stępień<sup>3</sup>, Elżbieta Fitas<sup>2</sup>, Michał Mielnik<sup>2</sup>, Jacek Roliński<sup>2</sup>, Anna Malm<sup>1</sup><sup>1</sup> Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Lublin<sup>2</sup> Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Lublin<sup>3</sup> Zakład Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

urszula.kosikowska@umlub.pl

Najpowszechniej występującą postacią białaczek jest przewlekła białaczka limfocytowa (PBL). Infekcje są najczęstszą przyczyną chorobowości i śmiertelności wśród pacjentów z PBL, u których mogą się rozwinąć m.in. z powodu hipogammaglobulinemii i dysfunkcji odporności komórkowej oraz immunosupresyjnego działania stosowanej terapii. Do patogenów często występujących u tych pacjentów należy między innymi *Haemophilus influenzae* typu b (Hib).

W pracy oceniano częstość występowania *H. influenzae* w drogach oddechowych u 45 pacjentów z PBL. Izolaty wyosobnione z wymazów z gardła i z nosa identyfikowano oraz biotypowano w oparciu o cechy biochemiczne (API NH), następnie na podstawie profilu białkowego (MALDI-TOF MS – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). Serotypy określano przy użyciu starterów o sekwencjach komple-

mentarnych do genów *bexA*, *acsA*, *bcsB*, *ccsB*, *dcsC*, *ecsC*, *fcsA*, należących do locus otoczkowego *cap*. Lekowrażliwość i fenotypy izolatów oceniano zgodnie z EUCAST (Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości), oporność na ampicylinę oznaczano w oparciu o MIC (minimal inhibitory concentration) z użyciem E-testu (szczepy odporne: MIC ≤ 0,5 mg/L). Zdolność syntezy beta-laktamaz oceniano testem cefinazowym, obecność genów *bla* warunkujących ich wytwarzanie – metodą PCR.

Wykazano, że 4/45 (8,9%) pacjentów z PBL było skolonizowanych przez *H. influenzae*. Wyosobniono cztery izolaty *H. influenzae*, w tym trzy z gardła (biotypy i serotypy odpowiednio Ie, Iib i IIIe) i jeden z nosa (Iib). Wszystkie izolaty były odporne na antybiotyki beta-laktamowe, w tym na ampicylinę (MIC = 0,75 – 1,0 mg/L) i cefuroksym. Izolaty klasyfikowano jako

beta-laktamazo-pozytywne ampicylino-oporne (BLPAR – beta-lactamase-positive ampicillin-resistant), na podstawie badań genetycznych dwa z nich określono jako gBLPAR – beta-lactamase-positive ampicillin-resistant, natomiast dwa jako gBLPACR – beta-lactamase-positive amoxicillin-clavulanicacid-resistant).

Wszystkie pałeczki *H. influenzae* wyizolowane u pacjentów z PBL należały do szczepów otoczkowych o serotypie “b” lub “e” i były odporne na antybiotyki beta-laktamowe, co może sprzyjać infekcjom wywoływanych przez te bakterie oraz problemom terapeutycznym w ich zwalczaniu.

### III-P 3

#### CHARAKTERYSTYKA ENDOLIZYNY LYSB POCHODZĄCEJ Z BAKTERII *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* STR. ALASKA E43

Agnieszka Morzywołek<sup>1</sup>, Magdalena Płotka<sup>1</sup>, Anna-Karina Kaczorowska<sup>2</sup>, Tadeusz Kaczorowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

<sup>2</sup>Kolekcja Plazmidów i Drobnoustrojów, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

agnieszka.morzywolek@phdstud.ug.edu.pl

Światowa organizacja zdrowia w raporcie z 2011 roku ocenia, że na świecie w ciągu roku ponad 7 milionów ludzi zmarło z powodu chorób infekcyjnych wywołanych przez bakterie. Dotychczas efektywną walkę z infekcjami bakteryjnymi prowadzono za pomocą antybiotyków, jednak w ostatnich latach obserwuje się wzrost infekcji wywołanych przez wielolekooporne szczepy bakterii (MDR), a proces opracowywania nowych antybiotyków uległ regresji. Wywołuje to obawę o dostępność skutecznych terapii antybiotykowych w przyszłości. Rozwiązaniem tej sytuacji jest poszukiwanie nowych czynników przeciwbakteryjnych. Alternatywnym sposobem walki z infekcjami bakteryjnymi są m.in. bakteriocyny, drapieżne bakterie, terapia fagowa i enzymy lityczne. To właśnie enzym lityczny jest przedmiotem badań niniejszego projektu.

Celem projektu jest poznanie strukturalnych i funkcjonalnych cech związanych z aktywnością endolizyny LysB, która wykazuje podobieństwo do eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikan (PGRPs). W pierwszym etapie zoptymalizowano nadprodukcję oraz oczyszczono białko LysB. Natępnie wykazano,

że amidaza LysB jest najbardziej aktywna w buforze o pH 6,0. Ultrawirowanie analityczne oraz sączenie molekularne wykazały, że białko LysB występuje w formie dimeru. Za pomocą techniki zymogramu określono spektrum działania endolizyny LysB. Wykazano aktywność wobec bakterii z rodzaju *Clostridium* oraz bakterii *B. cereus* i *S. aureus*. Białko LysB nie wykazało aktywności wobec *E. faecalis* oraz *B. subtilis*. Aktywność potwierdzono także testem na żywych komórkach *B. cereus* oraz *S. aureus*. Podczas obserwacji komórek *C. sporogenes* w mikroskopie elektronowym wywołanych działaniem białka LysB zaobserwowano przerwanie ciągłości ściany komórkowej, wypływ treści komórkowej i w efekcie lizę komórek bakteryjnych. W dalszych badaniach wyodrębniono motyw katalityczny białka LysB i przeprowadzono jego mutagenęz uzyskując potwierdzenie, że reszty H<sup>25</sup>, Y<sup>57</sup> H<sup>126</sup> oraz C<sup>134</sup> odgrywają znaczącą rolę w aktywności badanego białka.

Nasze badania przyczynią się lepszemu zrozumieniu czynników antybakteryjnych o dużej efektywności skierowanych przeciwko groźnym patogenom bakteryjnym.

### III-P 4

#### BAKTERIOFAG VB\_ECO4M-7 – NOWA NADZIEJA W ZWALCZANIU ZAKAŻEŃ ENTEROKRWOTOCZNYMI SZCZEPAMI *ESCHERICHIA COLI* (EHEC)

Agnieszka Necel<sup>1</sup>, Gracja Topka<sup>1</sup>, Aleksandra Dydecka<sup>1</sup>, Sylwia Bloch<sup>1</sup>, Bożena Nejman-Faleńczyk<sup>1</sup>, Agata Jurczak-Kurek<sup>2</sup>, Katarzyna Tomasz Gąsior<sup>3</sup>, Kwaśnicka-Kosznik<sup>1</sup>, Łukasz Nowakowski<sup>1</sup>, Łukasz Grabowski<sup>1</sup>, Alicja Węgrzyn<sup>3</sup>, Grzegorz Węgrzyn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

<sup>2</sup>Katedra Ewolucji Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

<sup>3</sup>Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Kładki 24, 80-822 Gdańsk

agnieszka.necel@phdstud.ug.edu.pl

Bakterie *Escherichia coli* stanowią istotny element flory bakteryjnej człowieka biorąc udział m.in. w produkcji witamin z grupy B i K. Mogą one, na drodze horyzontalnego transferu genów, nabywać nowe cechy genetyczne, co prowadzi do powstania dotąd niespotykanych wirulentnych szczepów bakteryjnych.

Przykładem takich patogenów są Enterokrwotoczne szczepy *Escherichia coli* (EHEC), wśród których najlepiej poznanym jest *E. coli* O157:H7. Głównym rezerwuarem tych bakterii jest bydło, a zakażać nimi można się poprzez spożycie np. zanieczyszczonej odchodami zwierzęcymi żywności (warzywa, owoce). EHEC posiadają zdolność do produkcji toksyny Shiga, której geny

zlokalizowane są w genomach bakteriofagów Stx. Do ich ekspresji dochodzi po indukcji profaga oraz rozpoczęciu litycznego cyklu życiowego. Produkowana toksyna uszkadza wówczas komórki m.in. naczyń krwionośnych i nabłonka nerek, a czasami może dojść do groźnych powikłań jak np. zespół hemolityczno-mocznicowy (HUS).

Leczenie infekcji EHEC jest wysoce problematyczne ze względu na wywoływanie procesu indukcji profaga przez wiele czynników stosowanych w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych. Również środki spowalniające perystaltykę jelit mogą zaostriżyć objawy chorobowe. Obecnie stosuje się tylko leczenie objawowe.



W związku z tym istotne jest poszukiwanie alternatywnych metod zwalczania zakażeń szczepami EHEC.

W ramach prac badawczych nad bioróżnorodnością bakteriofagów wyizolowano ze ścieków komunalnych 83 fagi. Jeden z pozyskanych fagów tj. vb\_Eco4M-7, wykazał zdolność do lizy

tylko szczepu *E. coli* O157:H7, a także klinicznego szczepu *E. coli* O157:H7(ST2-8624). Przeprowadzone przez nas badania wykazały, że bakteriofaga vb\_Eco4M-7 charakteryzuje krótki cykl rozwojowy z plonem fagowym równym około 1000 cząstek potomnych, co może świadczyć o jego potencjale w zwalczaniu zakażeń.

### III-P 5

## INDUKCJA EKSPRESJI GENÓW KODUJĄCYCH CHITYNAZY U *MEDICAGO TRUNCATULA* PO INOKULACJI RYZOBAKTERIAMI

Anna Kisiel<sup>1</sup>, Ewa Kępczyńska

Katedra Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

anna.kisiel@univ.szczecin.pl

Chitynazy należą do białek hydrolizujących wiązania  $\beta$ -1,4-glikozydowe chityny, jednego z najczęściej występujących w przyrodzie polisacharydów. Podstawową funkcją roślinnych chitynaz jest działanie antygrzybowe, ale wykazano, że białka te uczestniczą w rozwoju roślin, a także są ważnym elementem szlaku sygnałowego w odpowiedzi roślin na warunki środowiska. Chitynazy mogą być ekspresjonowane konstytutywnie na niskim poziomie, ale zauważono znaczną indukcję chitynaz przez czynniki abiotyczne i biotyczne.

Występują w ryzosferze bakterie (ryzobakterie) wchodzą w interakcje z roślinami i mogą stymulować ich wzrost poprzez ułatwianie przyswajania związków mineralnych, modulację poziomu hormonów roślinnych, ale także poprzez indukowanie odporności systemicznej przeciw patogenom. Skutkiem wywołania odporności systemicznej jest między innymi aktywacja białek związanych z patogenezą, do których należą m.in. chitynazy.

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie czy ryzobakterie wyizolowane z ryzosfery lucerny siewnej (*Medicago sativa*) są w stanie zaindukować ekspresję genów kodujących chitynazy u rośliny modelowej dla bobowatych, tj. *Medicago truncatula*. Genom *M. truncatula* okazał się niezwykle bogaty w sekwencje

kodujące chitynazy, scharakteryzowano w nim aż 42 geny kodujące te białka, podczas gdy u *Arabidopsis* opisano 26 genów. Spośród genów MtCHIT do analiz wytypowano, te które były najbardziej podobne do opisanych u *Arabidopsis*, tj. 7 sekwencji kodujących chitynazy należące do 4 klas (CHITIA, Ib, III-1, III-2, III-3, IV, V). W roślinach nieinokulowanych bakteriami stwierdzono wyższą ekspresję sześciu badanych genów MtCHIT w korzeniach w porównaniu do liści (z wyjątkiem ekspresji genu kodującego chitynazę klasy Ib), co może sugerować ich udział w odpowiedzi na interakcje ze środowiskiem glebowym, w tym z mikroorganizmami bytującymi w ryzosferze. Inokulacja siewek *M. truncatula* wybranymi trzema wolnożyjącymi szczepami ryzobakterii (*Paenibacillus borealis* KK 4, *Pseudomonas brassicacearum* KK 5, *P. corrugata* KK 7) oraz jednym symbiotycznym szczepem *Sinorhizobium meliloti* KK 13 skutkowała indukcją ekspresji badanych genów w liściach i korzeniach po 24, 72 i 168 h od inokulacji. Najbardziej ekspresję tych genów zwiększała inokulacja siewek *P. brassicacearum* KK 5 i *S. meliloti* KK 13, zaś w mniejszym stopniu szczepem *P. corrugata* KK 7, natomiast niemal wcale nie zanotowano zmian ekspresji genów kodujących chitynazy pod wpływem inokulacji szczepem *Paenibacillus borealis* KK 4.

### III-P 6

## ANALIZA ADHERENCJI BAKTERYJNEJ UROPATOGENNYCH SZCZEPÓW *E. COLI* DR<sup>+</sup> DO LINII KOMÓRKOWEJ CHO-DAF<sup>+</sup> W WARUNKACH STRESU ŚCINAJĄCEGO

Beata Zalewska-Piątek, Rafał Piątek, Marcin Olszewski, Marta Śpibida

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

rafpiate@pg.gda.pl

Adherencja pomiędzy komórką bakteryjną, a komórką gospodarza stanowi kluczowy etap w procesie wstępnej kolonizacji i patogenie zakażeń dróg moczowych. Za trwałość wiązania bakterii do specyficznych receptorów odpowiedzialne są polimeryczne układy adhezyjne na powierzchni komórek bakteryjnych uropatogennych szczepów *E. coli* (UPEC). W przypadku szczepów *E. coli* Dr<sup>+</sup> główną determinantą urowirulentną są fimbrie typu Dr zbudowane z podjednostek adhezyjnych DraE. Pierwszą linię obrony organizmu przed komórkami bakteryjnymi stanowi hydrodynamiczna siła ścinająca (stres ścinający) generowana przepływem płynów ustrojowych. Przepływ moczu w proksymalnych kanałkach nerkowych wywołuje stres o wartości 0,017 pN/ $\mu$ m<sup>2</sup>, natomiast w cewce moczowej może powodować stres o wartości 0,3–0,5 pN/ $\mu$ m<sup>2</sup>. Skutkiem występowania przepływu i generowanej przez niego siły ścinającej jest usuwanie bakterii z organizmu,

które nie uległy skutecznej adherencji. W efekcie podstawową funkcją bakteryjnych układów adhezyjnych jest zagwarantowanie patogenom trwałości wiązania do receptorów komórkowych. Siła adhezji bakterii do receptorów powinna mieć charakter dynamiczny (maksymalnie silna w momencie nasilenia się przepływu płynów ustrojowych – w trakcie mikcji jako zabezpieczenie przed usunięciem bakterii z niszy ekologicznej).

Celem prowadzonych badań była analiza wpływu stresu ścinającego generowanego przepływem cieczy o parametrach specyficznych dla dróg moczowych na proces adherencji szczepów *E. coli* Dr/GFP<sup>+</sup> (produkujących fimbrie Dr i białko reporterowe GFP) do komórek nabłonkowych linii komórkowej CHO transfekowanej cDNA ludzkiej glikoproteiny DAF (głównego receptora wykorzystywanego przez analizowane bakterie). Najsilniejszy efekt adherencji bakteryjnej zaobserwowano przy najniższych wartościach



stresu ścinającego (w zakresie 0.01–0.118 pN/μm<sup>2</sup>). Po związaniu bakterii z komórkami nabłonkowymi nie stwierdzono możliwości ich odplukania przy przepływie o wartościach przekraczających

wielokrotnie warunki fizjologiczne (analogia do braku możliwości wymywania związanych bakterii do komórek nabłonkowych pęcherza przez przepływ moczu).

### III-P 7

## WYSTĘPOWANIE I LEKOWRAŻLIWOŚĆ METYCYLINOOPORNÝCH STAPHYLOCOCCUS AUREUS IZOLOWANYCH Z JAMY USTNEJ

Ewa Kwapisz, Maria Wierzbowska, Katarzyna Garbac, Mariola Krause

Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Gdański Uniwersytet Medyczny

kwapisz@gumed.edu.pl

Gronkowce złociste powodują szereg schorzeń jamy ustnej. Mogą być izolowane z płytek nazębnych, stanów zapalnych dziąseł i przyzębia oraz z ropni okołowierzchołkowych. Ponadto są głównymi patogenami tzw. zakażeń okołoinplantowych. Szacuje się, że 10–20% populacji ludzi jest ich stałymi nosicielami, a około 50% – czasowymi.

Celem pracy było określenie częstości występowania oraz ocena lekowrażliwości metacyclinoopornych *Staphylococcus aureus* (MRSA) pochodzących od pacjentów z różnymi schorzeniami jamy ustnej. W latach 2016–2017 przebadano 535 pacjentów. Pobierane od nich wymazy z jamy ustnej (z błony śluzowej, grzbietowej powierzchni języka, z powierzchni protez) posiewano na podłoże krwawe i Chapman Agar (bioMerieux) i inkubowano w temp. 37°C przez 24–48 godzin. Drobnoustroje wstępnie zidentyfikowano przy użyciu testu Pastorex<sup>tm</sup> staph-plus (Bio-Rad), a następnie biochemicznie testem API ID32 STAPH (bioMerieux). Do oceny lekowrażliwości zastosowano metodę krążkowo-dyfuzyjną na podłożu Mueller-Hinton agar. Interpretację wyników prowadzono zgodnie z rekomendacjami KORLD i CLSI. Użyto następujących antybio-

tyków: cefoksytyna (30 μg), erytromycyna (15 μg), ciprofloksacyna (5 μg), klindamycyna (2 μg), chloramfenikol (30 μg), tetracyklina (30 μg), gentamycyna (10 μg) i kotrimoksazol (sulfametoksazol+trimetoprim 1.25/23,75 μg) firmy Becton-Dickinson.

Wyizolowano 96 (17,9%) szczepów *S. aureus*. Metacyclinooporne gronkowce stanowiły 18,8%. Oporność MRSA najczęściej dotyczyła: gentamycyny (72%), tetracykliny (50%), erytromycyny (44%) i klindamycyny (39%). Wśród MSSA też było najwięcej szczepów opornych na gentamycynę i tetracyklinę, odpowiednio 69% i 38%. Większość badanych gronkowców (MRSA i MSSA) okazała się wrażliwa na ciprofloksacynę i kotrimoksazol. Szczepy MRSA aż w 56% były wielolekooporne (oporność na trzy i więcej grup antybiotyków), w odróżnieniu od szczepów MSSA (12%).

Gronkowiec złocisty występuje u około 20% pacjentów ze schorzeniami jamy ustnej, z czego prawie 20% stanowią MRSA, cechujące się opornością na aminoglikozydy, tetracykliny, makrolidy i linkozamidy. Wyniki pokazują, że badania mikrobiologiczne wymazów z jamy ustnej powinny uwzględniać metacyclinooporne *S. aureus* jako potencjalnie istotny patogen.

### III-P 8

## OKREŚLENIE WPŁYWU MENADIONU JAKO CZYNNIKA STRESU OKSYDACYJNEGO NA BIOTRANSFORMACJĘ β-PINENU PRZY UDZIALE GRZYBNI *CHRYSPORIUM PANNORUM*

Krzysztof Jędrzejewski<sup>1</sup>, Jan Fiedurek<sup>1</sup>, Anna Matuszewska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

<sup>2</sup>Zakład Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

krzysztof.jedrzejewski@poczta.umcs.lublin.pl

Drobnoustroje wykształciły wiele mechanizmów oporności na stesy abiotyczne. Przeciwdziałanie niekorzystnym czynnikom indukuje szereg zmian metabolicznych, które umożliwiają zachowanie równowagi niezbędnej do przeżycia mikroorganizmów. Liczne badania wskazują, że wpływ jednego rodzaju stresu może także zwiększyć oporność drobnoustrojów na inny rodzaj stresu. Jego niskie natężenie może działać na komórki korzystnie, mobilizując ich metabolizm w celu lepszego przystosowania się do tego samego stresu o większym nasileniu. Stresem oksydacyjnym określa się zaburzenie równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w kierunku reakcji utleniania. W warunkach sztucznie wywołanego stresu mikroorganizmy wykorzystywane do biotransformacji terpenów (np. β-pinenu) mogą wykazywać nowe cechy w przekształcaniu tych substratów do wartościowych produktów. W przyszłości biotransformacja łatwo dostępnych i tanich substratów (ale jednocześnie toksycznych, lotnych i nierozpuszczalnych

w wodzie), takich jak α i β pinen, czy limonen może stać się jedną z alternatyw dla pozyskiwania związków terpenoidowych z rzadkich gatunków roślin [1, 2].

Celem tej pracy było określenie wpływu stresu oksydacyjnego na wydajność procesu biotransformacji β-pinenu przy zastosowaniu psychrotroficznego szczepu *Chrysosporium pannorum*. Grzybnię wyrosłą w ciągu 48-godzin na podłożu optymalnym poddano działaniu stresu oksydacyjnego w postaci różnych stężeń (0,1–1 mM) menadionu (2-metylo-1,4-naftochinon, witamina K<sub>3</sub>). Otrzymane produkty terpenowe analizowano za pomocą GC-MS.

Pomiary voltamperometryczne wykazały, że w zakresie 0,05–1 mM menadionu w pożywcze uzyskiwano stopniowy wzrost potencjału redox. Największą aktywność otrzymano hodując grzybnię *C. pannorum* w optymalnych warunkach, zaś proces biotransformacji β-pinenu prowadzono w obecności 0,25 mM menadionu (pik 7,6 μA). Umożliwiło to 1,7-krotne zwiększenie

wydajności tego procesu w stosunku do kontroli. Uzyskane stężenie głównego produktu – *trans*-pinokarweolu wyniosło 576 mg/l.

*Praca finansowana z Badań statutowych – Młodzi Naukowcy.*

1. Fiedurek J., Trytek M., Skowronek M.: Strategies for improving the efficiency of bioprocesses involving toxic compounds.

*Current Organic Chemistry*, Vol. 16, No. 24, pp. 2946–2960 (2012)

2. Fiedurek J., Trytek M., Szczodrak J.: Strain improvement of industrially important microorganisms based on resistance to toxic metabolites and abiotic stress. *Journal of Basic Microbiology*, DOI 10.1002/jobm.201600710 (2017)

### III-P 9

#### ZASTOSOWANIE BIOSENSORÓW TIENOWYCH W TESTACH FIZJOLOGICZNO-BIOCHEMICZNYCH PATOGENÓW ROŚLINNYCH Z RODZAJU *PECTOBACTERIUM*

Joanna Jońca<sup>1</sup>, Aneta Mazurowska<sup>1</sup>, Agnieszka Chylewska<sup>2</sup>, Katarzyna Turecka<sup>1</sup>, Małgorzata Waleron<sup>3</sup>, Krzysztof Waleron<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, GUMed

<sup>2</sup>Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Chemii, UG

<sup>3</sup>Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed.

*krzysztof.waleron@gumed.edu.pl*

Badania przeżywalności oraz wzrostu komórek w różnych warunkach należą do podstawowych technik w wielu dziedzinach nauk biologicznych. Szczególną popularność w ostatnich latach zyskały metody bazujące na monitorowaniu stężenia tlenu w podłożu hodowlanym ze względu na ich wszechstronność i dużą czułość. Badania stężenia tlenu można przeprowadzić w łatwy sposób z użyciem fluorescencyjnych sensorów, których fluorescencja ulega wygaszeniu w obecności tlenu cząsteczkowego. Jednym z częściej stosowanych są związki kompleksowe rutenu (II).

Rozpuszczalny w wodzie tlenowrażliwy sensor [Ru(dpp (SO<sub>3</sub>Na)<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O wykorzystany został przez nas w badaniach wzrostu i przeżywalności bakterii z rodzaju *Pectobacterium* spp. Bakterie te są powszechnie występującymi patogenami roślinnymi odpowiedzialnymi za powstawanie chorób takich jak m.in. mokra zgnilizna i czarna nóżka. Celem pracy było opracowanie protokołu doświadczeń pozwalających na monitorowanie aktywności metabolicznej tej grupy bakterii w różnych warunkach środowiska. Szczepy wykorzystane w badaniach wyizolowane zostały z roślin jednoliściennych i dwuliściennych oraz z prób gleby i wody.

Szczepy testowane były pod względem przeżywalności w różnych stężeniach NaCl, w różnych wartościach pH oraz w warunkach ograniczonej dostępności wody. Prowadzone były również badania zdolności do wykorzystywania cukrów takich jak sacharoza, maltoza i D-sorbitol jako jedyne źródło węgla. Wyniki badań z wykorzystaniem związku rutenu porównaliśmy z prowadzonymi równoległe pomiarami OD oraz z wynikami otrzymanymi za pomocą metody wykorzystującej rezazurynę.

Badania wykazały, że biosensory optyczne oparte na fluoryzujących kompleksach rutenu są dobrą alternatywą dla tradycyjnych metod pomiarowych stosowanych w testach przeżywalności komórek bakteryjnych. Posiadają one wiele zalet w porównaniu do rezazuryny, m.in. możliwość wykonywania pomiarów w czasie rzeczywistym w mikropłytkach z wykorzystaniem czytnika fluorescencji bez konieczności preinkubacji, oraz niewrażliwość na zmiany pH i obecność związków redukujących. Ponadto, mogą być wykonywane jednocześnie z pomiarami OD, co pozwala na ocenę zarówno tempa wzrostu jak i aktywności metabolicznej komórek bakteryjnych.

### III-P 10

#### OPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI I CHEMIOTERAPETYKI IZOLATÓW *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WYIZOLOWANYCH W LATACH 2015–2017 OD OSÓB HOSPITALIZOWANYCH

Kamila Wierzchowska<sup>1</sup>, Barbara Kot<sup>1</sup>, Małgorzata Piechota<sup>1</sup>, Hanna Drzewiczak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii, Uniwersytet Przyrodniczo- Humanistyczny Siedlcach

<sup>2</sup>Mazowiecki Szpital Wojewódzki w Siedlcach

*Kamila.wierzchowska@uph.edu.pl*

Oporność drobnoustrojów na antybiotyki jest poważnym problemem współczesnej medycyny. Celem badań była ocena lekowrażliwości 69 izolatów *Staphylococcus aureus*, które wyizolowano w latach 2015–2017 od pacjentów hospitalizowanych w Mazowieckim Szpitalu Wojewódzkim w Siedlcach. Izolaty pochodziły z dróg oddechowych (6), krwi (7), popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (20), ran (11), ropy (4), nosa (6), odbytu (9), płwociny (2) oraz z innych materiałów klinicznych (4). Przynależność izolatów do gatunku *S. aureus* potwierdzono techniką PCR

przeprowadzając amplifikację fragmentu genu *nuc*, kodującego termostabilną nukleazę. Izolaty zostały ocenione pod względem obecności w genomie genu *mecA*, kodującego oporność na antybiotyki β-laktamowe. Badanie wrażliwości na antybiotyki przeprowadzono metodą dyfuzyjno-krażkową zgodnie z zaleceniami CLSI (M100S, 26<sup>th</sup> ed., 2016).

Wszystkie izolaty *S. aureus* wytwarzały β-laktamazy, a występowanie genu *mecA* stwierdzono u 65,8% izolatów. Wysoki odsetek izolatów *S. aureus* wykazywał oporność na ciprofloksacynę

(78,3%), lewofloksacyne (75,4%), erytromycyne (78,3%), klindamycyne (72,5%). Niższy odsetek izolatów opornych uzyskano w przypadku tetracykliny (13%), gentamycyny (5,8%), amikacyliny (7,2%) i trimetoprimu z sulfametoksazolem (2,9%). Izolaty oporne na tetracyklinę pochodziły od mężczyzn. Stwierdzono, że 88,4% izolatów wykazywało wielooporność. Izolaty pochodzące z dróg oddechowych były oporne na  $\beta$ -laktamy, makrolidy i fluorochinolony oraz niektóre z nich dodatkowo wykazywały oporność na aminoglikozydy i linkozamidy. Izolaty z krwi oprócz oporności na  $\beta$ -laktamy, w większości wykazywały oporność na makrolidy i linkozamidy, a około 43% izolatów dodatkowo wykazywało oporność na fluorochinolony. Wśród izolatów wyhodowanych z popłu-

czyn oskrzelowo-pęcherzykowych dominowały oporne na 4 grupy antybiotyków. Ponad połowa izolatów z ran (54,5%) wykazywała oporność na 3 grupy antybiotyków ( $\beta$ -laktamy, makrolidy, linkozamidy). Wszystkie izolaty z ropy były wielooporne. Wzory oporności izolatów z nosa obejmowały najczęściej antybiotyki należące do 4 grup, natomiast izolaty z odbytu były głównie oporne na 3 grupy antybiotyków. Wszystkie izolaty *S. aureus* wykazywały wrażliwość na linezolid.

Oporność izolatów *S. aureus* wyizolowanych z różnych materiałów klinicznych dotyczyła najczęściej antybiotyków należących do grupy  $\beta$ -laktamów, makrolidów, linkozamidów oraz fluorochinolonów.

### III-P 11

## BADANIE ŻYWOTNOŚCI KOMÓREK GRZYBÓW Z RODZAJU *CANDIDA*-FLUORESCENCYJNA RESPIROMETRIA OPTYCZNA

Katarzyna Turecka<sup>1</sup>, Agnieszka Chylewska<sup>2</sup>, Rafał Hałasa<sup>1</sup>, Krzysztof Waleron<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup> Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

turecak@gumed.edu.pl

Analizy populacji komórek pod względem ich żywotności stanowią niezbędny element badań stosowanych w mikrobiologii, farmacji, medycynie, biologii czy biochemii. Obecnie rośnie zapotrzebowanie na proste, szybkie, czułe i selektywne testy badające żywotność komórek. Fluorescencyjna respirometria optyczna (FRO), metoda stosowana relatywnie niedługo, umożliwia ocenę żywotności komórek poprzez pomiar natężenia fluorescencji w badanej próbce. FRO wykorzystuje analizę fluorescencji biosensora tlenowrażliwego, którego fluorescencja zależy od ilości tlenu w próbce badanej. Biosensory wrażliwe na tlen dostarczają informacji o aktywności metabolicznej drobnoustrojów i czynnikach, które wpływają na ową aktywność (czynniki środowiskowe czy związki chemiczne o aktywności przeciwdrobnoustrojowej). Fizyczną podstawą ich działania jest zjawisko gaszenia fluorescencji przez tlen cząsteczkowy. Tlen zderza się ze wzbudzoną molekułą fluoroforu, doprowadzając tym samym do gaszenia fluorescencji. Luminoforami, wykazującymi najlepsze właściwości, które umożliwiają precyzyjne optyczne wykrywanie tlenu, są związki metaloorganiczne: porfiryne kompleksy platyny (II)

i porfiryne kompleksy palladu (II) oraz związki kompleksowe rutenu (II). W badaniach wykorzystano rozpuszczalny w wodzie tlenowrażliwy sensor –  $(\text{Ru}[\text{dpp}(\text{SO}_3\text{Na})_2]_3)\text{Cl}_2$ , sulfonowany analog wykorzystywanego wcześniej nierozpuszczalnego w wodzie  $(\text{Ru}[\text{dpp}]_3)\text{Cl}_2$ . Kompleksy rutenu (II) cechuje fotostabilność oraz stosunkowo krótkie czasy życia fluorescencji (1-5  $\mu\text{s}$ ). Testy żywotności komórek z wykorzystaniem  $(\text{Ru}[\text{dpp}(\text{SO}_3\text{Na})_2]_3)\text{Cl}_2$ , przeprowadzono na grzybach z rodzaju *Candida*, szczepach zarówno referencyjnych, jak i klinicznych. Ustalono optymalne stężenie wspomnianego biosensora, przeprowadzono testy w różnych temperaturach oraz badano aktywność przeciwrzybiczą (ustalano wartości MIC) nowej klasy związków chemicznych – związków koordynacyjnych Co(III) z diaminowymi ligandami chelatującymi wykorzystując podłoża RPMI 1640 oraz Sabouraud.

Przeprowadzane testy z użyciem rozpuszczalnego w wodzie tlenowrażliwego sensora –  $(\text{Ru}[\text{dpp}(\text{SO}_3\text{Na})_2]_3)\text{Cl}_2$  umożliwiają monitorowanie w czasie rzeczywistym dużej liczby próbek biologicznych jednocześnie oraz stosunkowo szybko i czułą ocenę aktywności metabolicznej badanych mikroorganizmów.

### III-P 12

## PORÓWNANIE METOD DIAGNOSTYCZNYCH ZAKAŻEŃ *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM METODY REAL-TIME PCR

Klaudia Juszcuk, Agnieszka Mikucka, Eugenia Gospodarek-Komkowska

Katedra i Zakład Mikrobiologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

ontiuunia@gmail.com

Ewolucja szczepów *Clostridium difficile* w kierunku zwiększenia wirulencji, oporności na antybiotyki i możliwości rozprzestrzeniania się w środowisku, stwarza realne zagrożenie wzrostu ciężkości przebiegu, nawrotów, trudności leczenia zakażeń o etiologii *C. difficile* (*Clostridium difficile* infection, CDI) i wzrostu śmiertelności chorych oraz wystąpienia kolejnych epidemii.

W ograniczaniu rozprzestrzeniania się szczepów *C. difficile* istotne znaczenie ma ocena ich występowania. Stąd, celem pracy

było porównanie wyników metod stosowanych w diagnostyce CDI. Badaniem objęto 100 próbek kału pobranych od chorych z biegunką poantybiotykową z podejrzeniem etiologii *C. difficile*. Większość pochodziła od pacjentów oddziałów chirurgicznych, intensywnej terapii, geriatry i hematologii Szpitala Uniwersyteckiego Nr 1 w Bydgoszczy. próbki poddano amplifikacji DNA metodą LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification, amplifikacja kwasów nukleinowych w warunkach izotermicznych)

w aparacie Illumigene (Meridian Biosciences) polegającej na ocenie obecności fragmentu DNA warunkującego toksynotwórczość szczepu *C. difficile*. Wyniki uzyskane w metodzie LAMP porównano z wynikami testu eazyplex *C. difficile* complete opartego na metodzie real-time PCR przy użyciu aparatu Genie II (Amplex), w której wykrywano geny dehydrogenazy glutaminianowej, toksyny A, B oraz toksyny binarnej.

Metodą odniesienia był algorytm badania wg American Society of Microbiology uwzględniający ocenę obecności antygeny – dehydrogenazy glutaminianowej i toksyn A/B *C. difficile* w kale lub hodowli.

Uzyskane wyniki potwierdzają potrzebę dostępności metody molekularnej w szerokoprofilowym laboratorium mikrobiologicznym, umożliwiającej wydanie wyniku w krótkim czasie, szczególnie w przypadku wątpliwych wyników w teście przesiewowym. Dużą zaletą testu eazyplex *C. difficile* complete jest krótki (25 minut) czas oczekiwania na wynik oraz możliwość monitorowania epidemiologii zakażeń, w tym występowania szczepów hiperwirulentnych wytwarzających toksyny A, B i binarną.

Badania sfinansowano ze środków przyznanych na realizację grantu służącego rozwojowi uczestników studiów doktoranckich numer MN-SDF – 1/WL/2016.

### III-P 13

## SZYBKA DIAGNOSTYKA MIKROBIOLOGICZNA METODAMI BIOLOGII MOLEKULARNEJ PRZY POMOCY APARATU FILMARREY

Marek Bronk, Anna Śledzińska, Jolanta Komarnicka

Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej, Uniwersyteckie Centrum Kliniczne, Gdańsk

*msb@gumed.edu.pl*

Aparat FilmArrey jest zautomatyzowanym systemem do diagnostyki molekularnej wykorzystujący mgniazdową, multipleksową reakcję PCR (NestedPCR) do wykrywania i identyfikacji wielu docelowych sekwencji kwasów nukleinowych. System FilmArrey składa się z panelu testowego zawierającego wszystkie wymagane odczynniki, aparatu do przeprowadzenia badania oraz komputer z oprogramowaniem sterującym pracą aparatu i interpretującym wyniki wykonywanych testów. Nested, multiplexPCR wykonywany jest w dwóch etapach. Podczas pierwszego z nich, wykorzystuje się „zewnątrzne primery” do przeprowadzenia reakcji PCR na docelowych sekwencjach obecnych w próbce. Drugi etap jest reakcją przeprowadzoną przy użyciu „wewnętrznych primerów” na sekwencjach występujących (zagnieżdżonych) w produktach pierwszego etapu. Do wykrywania produktów reakcji PCR w aparacie FilmArrey wykorzystuje się zjawisko fluorescencji barwnika LCGGreen Plus+. Jest on włączany do podwójnych nici DNA powstających w trakcie każdego cyklu reakcji PCR. Jeśli barwnik zwiąże się z podwójnym łańcuchem DNA wysła fluorescencyjny sygnał wykrywany przez aparat. Po podniesieniu temperatury dwuniciowe kopie DNA ulegają rozpadowi, barwnik zostaje

uwolniony a fluorescencyjny sygnał zanika. Ponieważ poszukiwane sekwencje charakteryzują się określoną, specyficzną temperaturą rozpadu, program aparatu wykorzystuje korelację między zanikiem fluorescencji i temperaturą do precyzyjnej identyfikacji produktów reakcji. W Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego do trzech lat wykonuje się badania na aparacie FilmArrey służącym do szybkiej diagnostyki mikrobiologicznej wykorzystującej metody biologii molekularnej. Używane są panele do wykrywania, bezpośrednio w próbce materiału, głównych patogenów zakażeń dróg oddechowych, układu nerwowego i zakażeń jelitowych oraz czynników etiologicznych sepsy w dodatnich posiewach krwi. Zastosowanie tej techniki badań mikrobiologicznych umożliwiło szybkie wykrycie między innymi takich patogenów jak: *Bordetella pertussis*, *Escherichia coli* wytwarzającą toksyny shiga, *Cryptosporidium parvum*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*. Automatyczne aparaty do wykrywania patogenów bezpośrednio w próbce materiału, przy pomocy metod biologii molekularnej, wykorzystujące technikę multiplex PCR, w najbliższych latach całkowicie odmień laboratoryjną diagnostykę mikrobiologiczną.

### III-P 14

## WYSTĘPOWANIE RÓŻNYCH GATUNKÓW GRONKOWCÓW W JAMIE USTNEJ CZŁOWIEKA

Ewa Kwapisz, Maria Wierzbowska, Katarzyna Garbacz, Mariola Krause, Alina Gębska, Marta Ziółkowska-Klinkosz

Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Katedra Mikrobiologii, GUMed

*marwierz@gumed.edu.pl*

Gronkowce są jednym z najliczniejszych rodzajów bakterii tworzących mikrobiom człowieka. Rodzaj *Staphylococcus* obejmuje kilkadziesiąt gatunków, z których wiele może przejściowo lub stale kolonizować jamę ustną. Interakcja między organizmem człowieka, a gronkowcem może mieć różny charakter – od bezobjawowej kolonizacji, poprzez miejscowe infekcje, aż do ciężkich zakażeń. Grupą szczególnie narażoną na infekcje gronkowcowe są pacjenci użytkujący ruchome uzupełnienia protetyczne.

Niniejsze badania miały na celu porównanie częstości występowania różnych gatunków *Staphylococcus* w jamie ustnej pacjentów użytkujących ruchome uzupełnienia protetyczne i u pacjen-

tów bez nich. W latach 2016–2017 przebadano 535 pacjentów. Pobierane od nich wymazy z jamy ustnej (z błony śluzowej, grzbietowej powierzchni języka, z kąci ust, z powierzchni protez) posiewano na podłoże krwawe i Chapman Agar (bioMerieux) i inkubowano w temp. 37°C przez 24–48 godzin. Drobnoustroje wstępnie zidentyfikowano przy użyciu testu Pastorex<sup>sm</sup>staph-plus (Bio-Rad), a następnie biochemicznie testem API ID32 STAPH (bioMerieux).

Wyzisolowano 174 szczepy gronkowców, co stanowiło 32,5%. Częściej gronkowce izolowano od osób z ruchomymi uzupełnieniami protetycznymi (62,6%), niż bez nich (37,4%). Wyjątek



stanowił *S. aureus*, który częściej występował u pacjentów bez protez (69,2% vs 45,0%). Wśród izolatów *Staphylococcus* zidentyfikowano 12 gatunków, 10 gatunków u pacjentów użytkujących protezy i 8 gatunków u pacjentów bez nich. W obu grupach najczęściej identyfikowane gatunki to: *S. aureus* (54,0%), *S. warneri* (24,1%), *S. haemolyticus* (5,8%), *S. xylosum* (5,2%), *S. saprophyticus* (3,4%) i *S. epidermidis* (2,9%). Rzadziej były to: *S. hominis*, *S. kloosii* (po 1,1%), *S. auricularis*, *S. intermedius*, *S. equorum* i *S. simulans*

(po 0,6%). Szczepy *S. hominis*, *S. kloosii*, *S. equorum* i *S. simulans* wyizolowano jedynie od pacjentów użytkujących protezy.

Gronkowce występują u około 30% ludzi w jamie ustnej. Zarówno u tych użytkujących ruchome uzupełnienia protetyczne jak i nie, *S. aureus* jest najczęściej izolowanym gatunkiem. W jamie ustnej pacjentów z protezami występuje większy odsetek gronkowców i większa różnorodność ich gatunków, w porównaniu do ludzi nie użytkujących protez.

### III-P 15

## BIOINFORMATYCZNA ANALIZA GENETYCZNYCH UWARUNKOWAŃ WYTWARZANIA EGZOSOMÓW PRZEZ BAKTERIE Z RODZAJU *PECTOBACTERIUM*

Martyna Franczuk<sup>1</sup>, Szymon Dziomba<sup>2</sup>, Magda Furmaniak<sup>1</sup>, Krzysztof Waleron<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny z OML, Gdański Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny z OML, Gdański Uniwersytet Medyczny

[marsilka@gumed.edu.pl](mailto:marsilka@gumed.edu.pl)

Egzosomy bakteryjne to struktury pozakomórkowe wielkości 50–250 nm, które powstają wskutek oddzielenia się fragmentu zewnętrznej błony komórkowej i jej zamknięcia wokół przestrzeni periplazmatycznej. Główne składniki strukturalne tych pęcherzyków to lipopolisacharydy, fosfolipidy i białka charakterystyczne dla błony zewnętrznej lub przestrzeni periplazmatycznej. Zdarza się, że dodatkowo zawierają inne substancje, np. enzymy, toksyny i kwasy nukleinowe. Ich uwalnianie jest uwarunkowane działaniem czynników stresowych o różnym charakterze: starzeniem się hodowli, brakiem związków odżywczych, temperaturą, czy stresem oksydacyjnym.

Rola egzosomów w funkcjonowaniu bakterii nie jest do końca wyjaśniona, jednak ze względu m.in. na możliwość przenoszenia „ładunku” biologicznego przypisuje się im kilka funkcji: (1) usuwanie zdenaturowanych lub nieprawidłowo zwiniętych białek, (2) transport toksyn, (3) transfer DNA, (4) przenoszenie cząstek sygnałowych, (5) zewnątrzkomórkowe trawienie związków

odżywczych, (6) transport enzymów rozkładających antybiotyki, (7) wychwytywanie bakteriofagów, (8) immunomodulacja odpowiedzi gospodarza. Ze względu na tak rozliczne możliwości, egzosomy bakteryjne mogą odgrywać niebagatelną rolę w przystosowaniu się mikroorganizmów do zmiennych warunków środowiskowych.

W 1992 Fukuoka i wsp. opublikowali badania dotyczące spontanicznego uwalniania egzosomów przez *Pectobacterium carotovorum* (wówczas *Erwinia carotovora*). Bakterie z tego rodzaju to Gram-ujemne pałeczki, jedne z najistotniejszych patogenów roślin występujące niemal w każdej strefie klimatycznej. Ich duże zdolności adaptacyjne – często do skrajnych warunków klimatycznych – mogą być podyktowane zdolnością do produkcji egzosomów.

Na podstawie sekwencji 132 determinantów genetycznych związanych z wytwarzaniem egzosomów u *Escherichia coli* K12 (dane z bazy EVpedia.info) z wykorzystaniem narzędzia tBLASTn dokonaliśmy analizy genomów bakterii z rodzaju *Pectobacterium* w celu identyfikacji i oceny podobieństwa genów.

### III-P 16

## KONTROLA EKSPRESJI TOKSYCZNEGO GENU ENDONUKLEAZY RESTRYKCYJNEJ W SYSTEMIE RESTRYKCYJNO-MODYFIKACYJNYM CSP231I

Monika Rezulak, Iwona Mruk

Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

[Monika.rezulak@phdstud.ug.edu.pl](mailto:Monika.rezulak@phdstud.ug.edu.pl)

Systemy restrykcyjno-modyfikacyjne (R-M) są niezwykle powszechne wśród *Bacteria* i *Archaea*. Odgrywają ważną rolę w modulowaniu horyzontalnego przepływu genów, ale ich główną funkcją związana jest z ochroną komórki gospodarza przed infekcją inwazyjnym DNA np. bakteriofagowym. Na systemy R-M typu II składają się dwie niezależne aktywności enzymatyczne: endonukleazy restrykcyjnej (R) oraz metylotransferazy DNA (M). Oba enzymy rozpoznają identyczną, palindromową 6 nukleotydową specyficzną sekwencję DNA, w której endonukleaza restrykcyjna dokonuje cięcia, zaś metylotransferaza modyfikacji chroniącej przed działaniem pokrewnej endonukleazy. Ponieważ genomowy DNA gospodarza bakteryjnego jest chroniony przez aktywność metylotransferazy, naturalnym substratem dla endonukleazy restrykcyjnej jest wnikający do komórki, obcy, niezmetylowany DNA. Powszechna mobilność systemów R-M świadczy o obec-

ności mechanizmów kontroli ekspresji swoich genów, gdyż po wejściu systemu R-M do komórki nowego gospodarza, którego DNA nie jest chroniony, aktywność metylotransferazy musi pojawić się wcześniej niż endonukleazy restrykcyjnej, gdyż w innym wypadku genom bakterii zostanie zdegradowany. Zrównoważenie tych dwóch aktywności enzymatycznych jest kluczowe dla komórki bakteryjnej, gdyż konsekwencją nieprawidłowej regulacji genów systemu R-M jest śmierć gospodarza.

Celem badań jest poznanie i zrozumienie mechanizmów regulujących ekspresję genów systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego Csp231I oraz ich wpływ na funkcję ochronną wobec komórek gospodarza i ich żywotność. W systemie R-M Csp231I zaobserwowano skomplikowaną sieć sprzężeń zwrotnych z udziałem dedykowanego białka regulatorowego C, które należy do nowej niebadanej szerzej rodziny białek regulatorowych. Ponadto, na ekspresję



genu toksycznej endonukleazy restrykcyjnej ma również wpływ promotor produkujący antysensowny RNA, którego obecność jest niezbędna do wysokiej ekspresji genu R.

Badania tego typu mogą przyczynić się do poszerzenia wiedzy na temat ogólnych mechanizmów kontrolowania ekspresji toksycz-

nych genów, interakcji molekularnych pomiędzy czynnikami regulatorowymi i antysensownym RNA, a także mogą stanowić bazę wyjściową do dalszych badań nad procesami wpływającymi na regulację genów związaną np. z czynnikami wirulencji u bakterii patogennych.

### III-P 17

#### ZNACZENIE DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ W IDENTYFIKACJI CZYNNIKA ETIOLOGICZNEGO NEUROINFEKЦИИ O ETIOLOGII ENTEROWIRUSA 71 (EV-A71) W MATERIALE ODDZIAŁU OBSERWACYJNO-ZAKAŻNEGO DLA DZIECI SPECJALISTYCZNEGO SZPITALA ZAKAŻNEGO W GDAŃSKU

Mariola Purzyńska<sup>1</sup>, Magdalena Wiczorek<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Oddział Obserwacyjno-Zakaźny dla Dzieci, Specjalistyczny Szpital Zakaźny w Gdańsku

<sup>2</sup> Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

*mariola@purzynscy.pl*

Enterowirus A71 (EV-A71) uważany jest za patogen o zasięgu światowym, o dużym znaczeniu dla zdrowia publicznego ze względu na zdolność do wywoływania epidemii oraz ciężkich powikłań neurologicznych.

W Polsce w 2016 r. po raz pierwszy odnotowano zakażenia ośrodkowego układu nerwowego wywołane przez EV-A71 należącego do subgenogrupy C2 (EV-A71 C2), która wcześniej była identyfikowana w Azji i Europie Zachodniej. W Gdańsku wyodrębniono 1 ognisko epidemiczne neuroinfekcji o ciężkim przebiegu klinicznym wywołane EV-A71 C2. Neuroinfekcje przebiegały pod postacią zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenia mózgu, zapalenia mózdzku, zapalenia rdzenia kręgowego, ostrych porażań wiotkich kończyn z porażeniem nerwów obwodowych.

Wszystkie ciężkie przypadki neuroinfekcji wykryto poprzez system nadzoru nad ostrymi porażeniami wiotkimi w ramach programu monitorującego eradykację Poliomyelitis.

Diagnostykę wirusologiczną neuroinfekcji przeprowadzono w Zakładzie Wirusologii NIZP PZH w Warszawie. W próbkach

kału i płynu mózgowo-rdzeniowego pobranych od pacjentów z Oddziału Obserwacyjno-Zakaźnego Specjalistycznego Szpitala Zakaźnego w Gdańsku wykryto obecność enterowirusowego RNA metodą RT-PCR, jednocześnie z próbek kału izolowano enterowirusy w hodowli komórek RD (rhabdomyosarcoma). Identyfikację izolatów przeprowadzono poprzez sekwencjonowanie genu kodującego białko powierzchniowe kapsydu VP1. W wyniku typowania uzyskanych izolatów u 2 dzieci zidentyfikowano EV-A71 C2 wcześniej niewykrywany w Polsce. Analiza zmienności genetycznej polskich EV-A71 C2 wykazała ścisłe pokrewieństwo ze szczepami wyodrębnionymi podczas zachorowań w Niemczech w 2010 r., na Tajwanie w 2012 r. oraz we Francji w 2013 r.

Globalizacja i rozwój turystyki niosą ze sobą ryzyko swobodnego rozprzestrzeniania się patogenów w tym enterowirusów. Nadzór nad zachorowaniami wywołanymi przez enterowirusy w tym EV71 możliwy jest w oparciu o szybką diagnostykę. Aktualnie rekomenduje się wykrywanie i typowanie enterowirusów w oparciu o metody molekularne.

### III-P 18

#### ADAPTACJA PTASIEGO WIRUSA H1N1 DO ORGANIZMU ŚWINI

Andrzej Kowalczyk<sup>1,2</sup>, Iwona Markowska-Daniel<sup>1,3</sup>, Kinga Urbaniak<sup>1</sup>, Krzysztof Kwit<sup>1</sup>, Małgorzata Pomorska-Mól<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Państwowy Instytut Weterynaryjny-PIB w Puławach

<sup>2</sup> Wrocławskie Centrum Badań EIT+

<sup>3</sup> Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

*andrzej.kowalczyk@eitplus.pl*

Próby adaptacji szczepu wirusa grypy ptasiej (AIV) H1N1 A/Duck/Bavaria/1/77 do organizmu świń zostały dokonane poprzez serię 25 pasażów wirusa *in vivo*. W sumie wykorzystano 70 prosiąt w wieku 6–8 tygodni, trzymany w obiektach doświadczalnych BSL3. Do świń zakażanych eksperymentalnie wprowadzono świnie kontaktowe po wykryciu wirusa u świń zakażanych (Ct ≤ 30 w wymazach do nosa w DPI2). W 4 DPI świnie zakażane poddano eutanazji. Tkanki układu oddechowego zostały przebadane na obecność genomu wirusa za pomocą testu qRT-PCR (gen matrix), a do izolacji wirusa wykorzystano wszystkie pozytywne próbki (zarodku kurze SPF oraz komórki MDCK). Porównano sekwencję całego genomu oryginalnego AIV z izolatami z poszczególnych

pasażów. W pobieranych codziennie wymazach z nosa wynik testu qRT-PCR Ct ≤ 30 w 2 DPI wykryto w pasażach: p8, p15, p19, p20, p23 i p24 i w tych dniach wprowadzono zwierzęta kontaktowe. U tych ostatnich pozytywny qRT-PCR stwierdzono w p19, p23 i p24 co wskazywało na siewstwo wirusa. U obu grup świń nie stwierdzono typowych objawów klinicznych ostrej postaci grypy, jednakże zaobserwowano wzrost wewnętrznej ciepłoty ciała ≥ 40°C w DPI / DPC 2–4.

Zmiany aminokwasowe zaobserwowano w każdym genie wirusa grypy. W antygenach powierzchniowych – hemaglutyninie (HA) i neuraminidazie (NA) stwierdzono najwięcej mutacji. W genie HA mutacje odnotowano głównie w obrębie miejsca

wiążące się z receptorem (aa180 K→E→G, aa203 D→N, aa204 E→D) oraz w domenie odpowiedzialnej za fuzję z błoną komórkową (aa411 G→S).

Na podstawie prezentowanych wyników można stwierdzić, że adaptacja AIV do świń jest możliwa, ale w warunkach eksperymentalnych nie występuje skuteczna transmisja wirusa w organizmie świni. To sugeruje, że bariera między ptakami i świniami

jest silniejsza, a rola i ryzyko świń w przypadku pojawienia się nowych wirusów grypy w populacji ludzkiej jest prawdopodobnie niższe niż wcześniej zakładano. Potwierdzamy również istotne różnice w replikacji podtypu AIV H1N1, w zależności od części dróg oddechowych (dolną częścią) co jest zgodne z tropizmem typowym do ptasiej grypy. Wirus był izolowany najczęściej ze środkowego i prawego płata płuc i tchawicy.

### III-P 19

## ANALIZA OBECNOŚCI GENÓW WIRULENCJI I ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI U IZOLATÓW *LISTERIA* SPP.

Agnieszka Olejnik-Schmidt, Anna Sip, Marcin Schmidt

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

[agao@up.poznan.pl](mailto:agao@up.poznan.pl)

*Listeria* sp. to Gram-dodatnie nieformujące przetrwalników bakterie szeroko rozpowszechnione w środowisku naturalnym, zdolne do bytowania w środowisku produkcyjnym żywności. Dla człowieka patogenne są gatunki *Listeria monocytogenes* oraz *Listeria ivanovii*. U osób z osłabioną odpornością, kobiet w ciąży czy małych dzieci i osób starszych mogą one wywoływać listeriozę, dla której wskaźnik śmiertelności wynosi 20–30%. Transmisja bakterii drogą pokarmową jest główną przyczyną infekcji. Izolaty bakterii z rodzaju *Listeria* charakteryzuje duża bioróżnorodność.

Celem badań było oszacowanie obecności genów na antybiotykooporności i wirulencji u izolatów *Listeria* spp. pochodzących z przemysłu mięsnego i produktów mięsnych. Analizowano obecność genów oporności na streptomycynę, gentamycynę, tetracyklinę, antybiotyki betalaktamowe, klindamycynę i daptomycynę oraz genów wirulencji (*plcA* i *iap*) w celu oszacowania ich potencjału chorobotwórczego. Analizowane izolaty w większości nie stanowią rezerwuaru genów oporności na antybiotyki, a obecność genów wirulencji jest bardzo zróżnicowana.

## PREZENTACJE FIRM

### F 1 SEKWENCJONOWANIA NGS W BADANIACH METAGENOMICZNYCH

**ANNA WĄSOWSKA, GENOMED S.A.**

### F 2 IZOLACJA KWASÓW NUKLEINOWYCH Z MATERIAŁÓW ZWYCZAJNYCH ORAZ NIETYPOWYCH – TECHNOLOGIE I ZASTOSOWANIA

**FILIP GOŁĘBIEWSKI, QiaLab**

### F 3 ZASTOSOWANIE TECHNIK PCR III GENERACJI W DIAGNOSTYCE I BIOTECHNOLOGII

**AGNIESZKA CIESIELSKA BIO-RAD**

### F 4 ZASTOSOWANIE SPEKTROMETRII MAS W OPRACOWANIU TECHNOLOGII PROCESU LEKÓW BIOPODOBNYCH

**TOMASZ WELEROWICZ, POLPHARMA BIOLOGICS**

### F 5 BIOLAB INNOVATIVE RESEARCH TECHNOLOGIES

**KATARZYNA ANCZYKOWSKA, BLIRT S.A.**

## WARSZTATY

## W1

## ZAKAŻENIA DRÓG MOCZOWYCH – PATOMECHANIZM INFEKCJI I ROZWÓJ ALTERNATYWNYCH FORM TERAPEUTYCZNYCH

Beata Zalewska-Piątek, Rafał Piątek, Marcin Olszewski

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

Zakażenia układu moczowego (ZUM) stanowią jedno z najbardziej powszechnych infekcji bakteryjnych, dotykających każdego roku miliony ludzi na świecie. Problematyka tego typu infekcji wynika z nawrotów zakażeń i wzrastającej lekooporności powodujących je uropatogenów, co równocześnie wpływa na koszty leczenia ZUM i towarzyszących im komplikacji (odmiedniczkowe zapalenie nerek wraz z sepsą, uszkodzenie nerek u małych dzieci, przedwczesne porody, komplikacje związane z nadużywaniem antybiotyków). Uropatogenne szczepy *E. coli* (UPEC) stanowią dominujący czynnik etiologiczny ZUM. Szczepy te dysponują szeregiem czynników adhezyjnych zlokalizowanych na powierzchni ich komórek, które odpowiadają za wstępny etap bakteryjnej adhezji i kolonizację dróg moczowych. Pośród UPEC najbardziej rozpowszechnione są monoadhezyjne pile typu 1 i P oraz adhezyny rodziny Dr, których biogeneza odbywa się według zakonserwowanego u bakterii Gram-ujemnych, systemu sekrecji typu „chaperone-usher” (CUP).

Powszechnie stosowana terapia antybiotykowa wydaje się być bardzo skuteczna w kontrolowaniu i terapii ZUM, jednakże narastająca wielo-lekooporność szczepów bakteryjnych, jak i wysoka częstotliwość nawrotów zakażeń stanowi podstawę rozwoju alternatywnych form terapeutycznych i strategii prewencyjnych w postaci innowacyjnych anty-urowirulentnych terapeutyków, szczepionek fimbrialnych, czy inhibitorów receptorów adhezyjnych. Pilicydy (pochodne 2-pirydonu) jako innowacyjna grupa chemoterapeutyków blokująca biogenezę monoadhezyjnych pili/poliadhezyjnych fimbrii wykazuje duży potencjał terapeutyczny, ze względu na możliwość blokowania adhezji i kolonizacji dróg moczowych przez szczepy UPEC, inwazji bakteryjnej i formowania biofilmu (mechanizmów patogenności) a w konsekwencji rozwoju procesu chorobotwórczego. Wykonane badania wskazują na szerokie spektrum działania tych związków obejmując różne patogeny, wykorzystujące pile/fimbrie systemu CUP w patogenezie zakażeń dróg moczowych.

## W2

CZYNNIKI ZJADLIWOŚCI I GENOTYPOWANIE SZCZEPÓW *E. COLI* – ZASTOSOWANIE PRAKTYCZNE METOD BIOLOGII MOLEKULARNEJ W DIAGNOSTYCE PACJENTÓW

Beata Krawczyk

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Politechnika Gdańska

beakrawc@pg.gda.pl

Szczepy *E. coli* mogą być klasyfikowane według kryteriów genetycznych i klinicznych na trzy główne grupy: komensalne *E. coli*, patogenne – jelitowe *E. coli* i pozajelitowe *E. coli* (ExPEC), w tym powodujące zakażenia dróg moczowych (UTI) i sepsę/urosepsę.

W swoich pracach zajmowaliśmy się różnymi problemami, jakie stwarzają szczepy *E. coli*. Były to szczepy izolowane od pacjentów z chorobami hematologicznymi, pacjentów zwiększonego ryzyka rozwoju bakteriemii i posocznicy. Nasza uwaga była skupiona również na szczepach, które są odpowiedzialne za zakażenia układu moczowego u pacjentów po transplantacji nerki oraz na szczepach izolowanych od noworodków i ich matek. Analizowano również pośmiertnie szczepy *E. coli*, które wywołały UTI i sepsę u pacjentki oraz doprowadziły do jej zgonu.

W badaniach zostały wykorzystane molekularne metody typowania genetycznego w celu ustalenia pokrewieństwa genetycznego pomiędzy szczepami bakteryjnymi do celów epidemiologicznych, przeprowadzono typowanie genetyczne dla szczepów izolowanych z łożyska krwionośnego i przewodu pokarmowego pacjentów z rozrostowymi chorobami układu krwiotwórczego przy założeniu, że może dochodzić do translokacji z jelita do układu krwionośnego oraz w poszukiwaniu relacji pomiędzy szczepami w zakażeniach dróg moczowych u pacjentów po przeszczepie nerki. Za pomocą metod typowania genetycznego określono również stopień pokrewieństwa szczepów *E. coli* izolowanych z krwi i z układu pokar-

mowego noworodków. Badaniu typowania genetycznego poddano również szczepy izolowane od ich matek z dróg rodnych. Opisano również przypadek kobiety ciężarnej, dla której stosując metody typowania genetycznego potwierdzono sepsę szczepami UTI.

Poza typowaniem genetycznym zasadne wydaje się określenie grupy filogenetycznej. Obecnie są dobrze rozpoznawane cztery grupy filogenetyczne, które mają oznaczenia A, B1, B2 i D. Szczepy *E. coli* tych czterech grup filogenetycznych różnią się cechami fenotypowymi i genotypowymi oraz wydają się mieć różne nisze ekologiczne i skłonność do powodowania choroby. Komensalne *E. coli* są głównie związane z grupami filogenetycznymi A lub B1, patogenne jelitowe *E. coli* z grupami filogenetycznymi A, B1 lub D. Szczepy UPEC należą głównie do filogenetycznej grupy B2, a w mniejszym stopniu grupy D.

Sugeruje się różnorodność właściwości szczepów UPEC/SEPEC i różnorodną gamę czynników wirulencji, które umożliwiają pokonanie zabezpieczeń gospodarza i wywołanie zakażenia układu moczowego czy sepsy. Czynniki wirulencji szczepów ExPEC to różnorodne adhezyny, toksyny, otoczki polisacharydowe, siderofory, inwazyjny i inne czynniki pokonujące komórki odpornościowe surowicy krwi. Wykrywanie genów kodujących wybrane czynniki wirulencji przeprowadzano techniką PCR. Stwierdzono, że muszą istnieć grupy czynników wirulencji (współwystępowanie) predysponujące szczepy *E. coli* do adhezji, inwazji i wywołania choroby.

## W3

### PACIORKOWCE GRUP A, C, G, F „KILLER- BUGS” JAKO WROTA ZAKAŻEŃ, PATOGEN ZAPALENIA MIGDAŁKÓW I PRZEWLEKŁEGO ZAPALENIA ZATOK

Alfred Samet<sup>1</sup>, Tomasz Wysocki<sup>2</sup>, Roman Nowicki<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Centrum Medyczne MML, Warszawa

<sup>2</sup> Szpital im. M. Kopernika, Gdańsk

<sup>3</sup> Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed, Gdańsk

Paciorkowce to bakterie Gram-dodatnie, klasyfikowane na podstawie ich właściwości hemolitycznych. Paciorkowce grupy serologicznej A wg Lancefield m.in. *Streptococcus pyogenes*, należą do głównych bakteryjnych czynników infekcyjnych górnych dróg oddechowych, w tym zapalenia gardła. Mogą także wywoływać zakażenia miejscowe w postaci różni, vasculitis, cellulitis, jak również infekcje ogólnoustrojowe: nekrotyzujące zapalenie powięzi oraz paciorkowcowy zespół wstrząsu toksycznego. Paciorkowce grupy A wytwarzają liczne czynniki wirulencji, m.in. adhezyny, hemolizyny, leukocydyny, DNA-zy, streptokinazy, toksyny pirogenne, superantygenu. Wymienione zakażenia miejscowe, których czynnikiem etiologicznym są paciorkowce grupy A, mogą być odległym w czasie następstwem infekcji paciorkowcowej w górnych drogach oddechowych i w ten sposób stanowić wrota zakażeń szpitalnych.

Do niedawna szczepy paciorkowców pozostałych grup serologicznych (C, F i G) były uważane za „łagodne patogeny”. Jednakże badania pokazują, że posiadają te same czynniki wirulencji, co paciorkowce grupy A. Pojawiły się doniesienia literaturowe opisujące przypadki zakażeń o etiologii nonGAS (ang. non Group A Streptococci – paciorkowce grup serologicznych innych niż

grupy A). Paciorkowce te mogą przyczyniać się do wystąpienia zapalenia wsierdza, septycznego zapalenia stawów, nekrotyzującego zapalenia powięzi, zakażeń okołoporodowych, zakażenia skóry i tkanki podskórnej (celulitis, vasculitis), paciorkowcowego zespołu wstrząsu toksycznego oraz zespołu Behceta. Na zakażenia narażeni są zwłaszcza pacjenci, u których stwierdzono współwystępowanie choroby podstawowej.

Autorzy przedstawiają przypadki infekcji skóry i tkanki podskórnej u pacjentów z długoletnimi procesami infekcyjnymi o podłożu paciorkowcowym w obrębie górnych dróg oddechowych i twarzoczaszki. Do tej pory przy rozpoznaniu vasulitis i cellulitis nie szuka się wrót zakażenia. Autorzy prezentują również przypadek pacjenta z Zespołem Behceta.

Na podstawie prezentowanych przypadków klinicznych autorzy zwracają uwagę na konieczność poszukiwania wrót zakażeń paciorkowcowych w obrębie górnych dróg oddechowych oraz zrównanie stopnia patogenności paciorkowców beta-hemolizujących wszystkich grup serologicznych. Autorzy proponują nowe schematy diagnostyki paciorkowców w infekcjach tkanek: pobieranie materiałów o wysokiej wartości diagnostycznej i oznaczenie czynników wirulencji.

## W4

### STAPHYLOCOCCUS LUGDUNENSIS – „GROŹNY” PATOGEN W PRZEWLEKŁYM ZAPALENIU ZATOK

Agnieszka Dmowska-Koroblewska, Adrianna Podbielska-Kubera, Michał Michalik

Centrum Medyczne MML, Warszawa

Wśród czynników etiologicznych PZZ coraz częściej wymienia się gronkowce koagulazo-ujemne (CNS). Szczepy CNS przez wiele lat uważane były za drobnoustroje niepatogenne. Jednakże u wielu gronkowców koagulazo-ujemnych występują te same czynniki wirulencji, które odnotowuje się u patogennego gatunku *S. aureus*. Istotnym problemem jest narastająca oporność gronkowców stanowiących naturalną mikroflorę zwierząt, zwłaszcza zwierząt domowych. Szczepy *S. lugdunensis* są obecnie uznawane za potencjalnie bardziej zjadliwe niż inne gronkowce koagulazo-ujemne. Zakażenia *S. lugdunensis* mają często gwałtowny przebieg. *S. lugdunensis* to szczepy będące integralną częścią flory zdrowej skóry. Są również odpowiedzialne za występowanie ropni mózgu, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, szpiku, stawów, wsierdza, jako komplikacja po artroskopii, cesarskim cięciu. *S. lugdunensis* odpowiada także za ciężkie zakażenia stawów oraz zakażenia kardiologiczne. Szczepy *S. lugdunensis* mogą być obecne w odmiedniczkowym zapaleniu nerek, kamicy nerkowej, zapaleniu cewki moczowej, najądrza i gruczołu krokowego u mężczyzn oraz w posocznicy moczowej. *S. lugdunensis*, stanowiąc florę

komensalną górnych dróg oddechowych, może odpowiadać za bakteryjne zapalenia zatok.

*S. lugdunensis* stwarza problemy diagnostyczne. Często jest błędnie identyfikowany jako *S. aureus*. W przypadku *S. lugdunensis* istotna jest wczesna, właściwa diagnoza oraz wszczęcie właściwej antybiotykoterapii.

Celem pracy była charakterystyka gronkowców koagulazo-ujemnych pochodzenia zwierzęcego, szczególną uwagę zwrócono na szczepy *S. lugdunensis*. Określono częstość występowania szczepów u chorych z PZZ, ich chorobotwórczość, profil antybiotykowy, możliwość transmisji pomiędzy zwierzętami i ludźmi. Przeanalizowano także aspekt epidemiologiczny problemu i postępy w leczeniu. Badany materiał pochodził od chorych leczonych w Centrum Medycznym MML w Warszawie. Materiał pobierano z zatok szczękowych, czołowych, sitowych. Następnie przeprowadzono izolację i identyfikację szczepów oraz określono ich antybiotykooporność.

Autorzy przedstawiają przypadki kliniczne chorych z przewlekłym zapaleniem zatok o etiologii *S. lugdunensis*, u których pojawiły się problemy terapeutyczne.

## W5

**ESCHERICHIA COLI AS A PATHOGEN OF CHRONIC SINUSITIS**Bogdan Nowicki<sup>1</sup>, Alfred Samet<sup>3</sup>, Michal Michalik<sup>2</sup>, Beata Krawczyk<sup>4</sup>, Natalie Nowicki<sup>1</sup>, Stella Nowicki<sup>1</sup><sup>1</sup>Nowicki Institute for Women's Health Research, Brentwood, TN, USA<sup>2</sup>Medical Center MML, Warsaw 00-112, Poland<sup>3</sup>Medical Laboratories, SYNEVO, 04-137 Warszawa, Poland<sup>4</sup>Department of Molecular Biotechnology and Microbiology, Faculty of Chemistry, Gdańsk University of Technology, 80-233 Gdańsk, Poland

Chronic sinusitis is among the most common chronic disorders, affecting 4–28% of the European and US populations. Chronic sinusitis is an infection of the sinuses, which last for more than 3 months. This disease significantly reduces the quality of life and is a socioeconomic burden on the community. The diagnosis of chronic sinusitis is based on symptoms, duration of symptoms and objective evidence of inflammation. Management of chronic sinusitis involves an antimicrobial treatment and surgery. Chronic sinusitis is more prevalent in patients with comorbid diseases: asthma, chronic obstructive pulmonary disease or environmental allergies. Abnormalities in the sino-nasal epithelial cell barrier and tissue remodeling can contribute to the chronic inflammation and tissue-deforming processes. The main etiologic factors of sinusitis are *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catharalis*, *Staphylococcus* sp., and less often *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia* or anaerobic species. Common upper airway pathogens are not general microorganisms responsible for chronic sinusitis. The microbiologic features of chronic

sinusitis are not well established, and vary from Gram-positive if collected by swab to Gram-negative including *E. coli* if collected by biopsy. Antibiotic therapy targeting classic sinusitis pathogens in the presence of Gram-negative pathogens could therefore contribute to therapeutic failure and/or chronic process. So far the presence of *E. coli* in chronic sinusitis is poorly documented in the literature. Single reports suggested recovery of *E. coli* only with biopsy. The nature of *E. coli* virulence within the chronic sinusitis host remains largely unknown. Infection in the form of biofilm may have an important, if not central, role in the maintenance of the recalcitrant inflammation for chronic sinusitis as documented for other chronic diseases such as *E. coli* gastrointestinal (GI) and urinary tract infection (UTI). The aim of this presentation was to investigate whether surgical biopsy of sinus tissue in chronic sinusitis, not responsive to antibiotic treatment would detect *E. coli* and to evaluate *E. coli* virulence genes, therefore dispute unlikely pathogenic role of such unusual microorganism in chronic sinusitis.

## W6

**ROLE OF VITAMIN D3 IN CHRONIC SINUSITIS**

Stella Nowicki, Alex Nowicki, Alfred Samet, Michal Michalik, Bogdan Nowicki

Nowicki Institute for Women's Health Research, Medical Center MML Warsaw 00-112, Poland

Chronic Sinusitis is more prevalent during spring, the season of low vitamin D3. Vitamin D3 deficiency may predispose to recurrent infections including chronic sinusitis. Vitamin D3 has diverse immunomodulatory functions, however its role in bacterial sinusitis is not clear. The aim of this study is to investigate the role of vitamin D3 in modulation of innate immunity. We examined the effect of 1,25(OH)2D3 on peripheral blood mononuclear cells isolated from healthy individuals following stimulation with

bacterial lipopolysaccharide (LPS). Our results provide the evidence that vitamin D3 influences monocytes NFκB dependent signaling and significantly modulate expression of CD14, CD18 and CD11b. These results suggest that vitamin D3 plays important roles in the progression of inflammation and eradication of chronic infection. Further clinical studies are needed to confirm the potential beneficial therapeutic effect of vitamin D3 in eradication of chronic sinusitis.

## W7

**METABOLOMIKA W STANACH ZAPALNYCH TWARZOCZASZKI**Wiktorina Struck-Lewicka<sup>1</sup>, Renata Wawrzyniak<sup>1</sup>, Szymon Macioszek<sup>1</sup>, Paweł Lipowski<sup>2</sup>, Agnieszka Laskus<sup>3</sup>, Alfred Samet<sup>4</sup>, Michał Michalik<sup>4</sup>, J. Michał Markuszewski<sup>1</sup><sup>1</sup>Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny z OML, Gdański Uniwersytet Medyczny<sup>2</sup>Katedra i Klinika Okulistyki UCK w Gdańsku<sup>3</sup>Klinika Stomatologiczna TRIO-DENT<sup>4</sup>Centrum Medyczne MML

Intensywny rozwój metod diagnostycznych oraz badań molekularnych obserwowany w obecnych czasach wpływa znacząco na poprawę jakości leczenia oraz wyjaśnianie zjawisk zachodzących w organizmie. Mimo znacznych postępów w dziedzinie nauk

biologiczno-medycznych wciąż wiele jednostek chorobowych wymaga głębszego zbadania. Dlatego też poszukuje się różnych narzędzi badawczych w celu wyjaśniania patomechanizmu chorób. Jedną z dziedzin pozwalających na kompleksową analizę próbek



biologicznych w kierunku poszukiwania potencjalnych związków odpowiedzialnych za rozwój choroby jest metabolomika. Właściwie zaprojektowane badania metabolomiczne pozwalają na jakościowe oraz ilościowe analizy składu próbek biologicznych w kierunku poszukiwania zależności między ich zawartością a występowaniem określonej jednostki chorobowej [1]. Badania nad oznaczaniem metabolitów z wydzielin zatok przynosowych stanowi przykład zastosowania metabolomiki w kierunku wyjaśnienia patomechanizmu stanu zapalnego twarzoczaszki.

Zapalenie części twarzoczaszkowej w dużej mierze wywołane jest przez bakterie i określane jest jako konsekwencja bogatej flory bakteryjnej bytującej w zatokach przynosowych. Skład wydzielin zatok przynosowych w stanach zapalnych wciąż bowiem nie został kompleksowo zbadany a przez to wyjaśnienie przyczyny rozwoju choroby wymaga dalszych analiz. Dzięki zastosowaniu strategii badawczej jaką jest analiza tzw. metabolicznego odcisku palca (ang. *metabolite fingerprinting*) można jakościowo określić skład

wydzieliny zatok przynosowych u pacjentów ze zdiagnozowanym stanem zapalnym twarzoczaszki względem grupy kontrolnej (zdrowi ochotnicy). Następnie, zastosowanie odpowiednich metod bioinformatycznych obejmujących przygotowanie oraz analizę danych pozwala na zaproponowanie związków (metabolitów), które w sposób istotny statystycznie różnicują badane grupy. Dzięki temu możliwe jest określenie roli wyselekcjonowanych metabolitów jako potencjalnych związków odpowiedzialnych za rozwój choroby. W dalszej perspektywie związki takie mogą służyć do oceny poszczególnych etapów rozwoju choroby oraz wdrożenia skutecznego leczenia dedykowanego dla indywidualnego pacjenta (ang. *personalized medicine*).

#### Bibliografia:

1. C.B. Clish: Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine, *Cold. Spring. Harb. Mol. Case. Stud.* 1, a000588 (2015).

## W8

### CZYNNIKI ETIOLOGICZNE PRZEWLEKŁEGO ZAPALENIA ZATOK PRZYNOSOWYCH

Michał Michalik

Centrum Medyczne MML, Warszawa

Przewlekłe zapalenie zatok (PZZ) to jedna z powszechnych chorób przewlekłych, wywierających znaczny wpływ na jakość życia chorych. PZZ generuje także wysokie koszty społeczno-ekonomiczne. Rozpoznanie PZZ opiera się na subiektywnych objawach, czasie trwania objawów i obecności stanu zapalnego. Leczenie chorych z PZZ często obejmuje połączenie terapii ogólnoustrojowych i miejscowych oraz leczenia chirurgicznego.

Przewlekłe zapalenie zatok przynosowych jest wieloczynnikową chorobą, której etiologia nie została w pełni poznana. Z PZZ związane jest występowanie polipów nosa, skrzywienia przegrody nosowej, urazów twarzy, infekcji dróg oddechowych, reakcji alergicznych, kataru siennego i innych chorób, takich jak powikłania mukowiscydozy, refluks żołądkowo-przelykowy, HIV. Pojawiają się badania dotyczące wpływu statusu społeczno-ekonomicznego, położenia geograficznego i czynników kulturowych na częstość występowania PZZ. Pojedyncze badania wskazują również na dziedziczne predyspozycje do zachorowania.

Rola bakterii w etiologii przewlekłego zapalenia zatok nie jest w pełni poznana. Większość przypadków zapalenia zatok stanowią wirusowe zapalenia zatok, bez antybiotykoterapii. PZZ może być spowodowane również przez czynniki bakteryjne: *Streptococcus*

*pneumonia*, *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, gronkowce koagulazo-ujemne, bakterie Gram-ujemne i bakterie beztlenowe. Również grzyby mogą przyczyniać się do występowania zapalenia zatok.

Do najczęściej izolowanych drobnoustrojów od pacjentów z PZZ leczonych w Centrum Medycznym MML w okresie 12.2015–11.2016 zaliczamy gronkowce skórne. Dalsze w kolejności były pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz gronkowiec złocisty i pałeczki niefermentujące.

Podstawą celowanej terapii przeciwdrobnoustrojowej powinna być izolacja czynnika infekcyjnego z materiałów wysokodiagnostycznych oraz określenie jego lekowrażliwości.

Wysoka liczba gronkowców koagulazo-ujemnych uzyskanych od pacjentów MML może wskazywać na ich znaczącą rolę w procesach zapalnych zatok. Zaobserwowano także wzrastającą liczbę pałeczek *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus pneumoniae* oraz enterokoków. Okresowa analiza gatunkowa i lekowrażliwości izolowanych drobnoustrojów ma również wartość epidemiologiczną, ponieważ umożliwia kontrolę szerzenia się szczepów wieloopornych. U pacjentów, od których izoluje się takie szczepy, należy wdrożyć odpowiednie procedury epidemiologiczne.

## W9

### MIKROBIOM JELITA GRUBEGO A PRZEWLEKŁE ZAPALENIA ZATOK

Mirosława Gałęcka<sup>1\*</sup>, Michał Michalik<sup>2</sup>, Alfred Samet<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instytut Mikroekologii, Poznań

<sup>2</sup> Centrum Medyczne MML, Warszawa

\* dr n med. Mirosława Gałęcka, tel. 61 862 63 15  
e-mail: drgalecka@instytut-mikroekologii.pl

Mikrobiom to wg. definicji Joshua Lederberga, zespołu wszystkich mikroorganizmów (mikroflory) człowieka, zarówno komensalnych, symbiotycznych jak i patogennych, które dosłownie dzielą

naszą przestrzeń życiową i determinują zdrowie lub chorobę. W zamyśle Lederberga było, aby na człowieka spojrzeć przez pryzmat wszystkich genów, które go tworzą, w tym także genów jego

rodzimy mikroorganizmów. Najliczniejszy jest mikrobiom jelita grubego. W 1 g treści jelitowej znajduje się aż  $10^{14}$  komórek mikroorganizmów. Genom mikrobioty jelitowej to ok 1 000 000 genów, co przewyższa 150 razy genom człowieka. Przekłada się to na olbrzymi potencjał metaboliczny naszych mikroorganizmów jelitowych. Mikrobiota jelitowa pełni szereg korzystnych funkcji w organizmie człowieka, a jej odpowiedni skład wpływa na zachowanie homeostazy organizmu. Do głównych zadań mikrobioty jelitowej należy aktywacja i koordynowanie pracy układu immunologicznego oraz ochrona przed patogenami. Bez bakterii nie ma sprawnie działającego układu odpornościowego. Ponadto mikroorganizmy jelitowe wytwarzają witaminy z gr. B oraz K i wspomagają proces trawienia. Jednakże na skutek aktualnego stylu życia i nadmiernego reżimu higienicznego coraz częściej dochodzi do dysbiozy jelitowej co niekorzystnie wpływa na funkcjonowanie całego organizmu. Taka sytuacja doprowadza do zachwiania równowagi Th1/Th2, która utrzymywana jest prawidłową mikrobiotą jelit i w związku z tym do rozwoju chorób autoimmunologicznych i zapalnych (przewaga Th1) bądź alergicznych czy infekcyjnych (przewaga Th2).

Dodatkowo zaburzona równowaga mikrobiologiczna w przewodzie pokarmowym, skutkuje zmniejszoną produkcją sIgA na

śluzówkach całego organizmu, co przekłada się na zwiększoną podatność na infekcje wirusowe i bakteryjne. Wydzielnicza IgA stanowi pierwszą linię obrony organizmu i odpowiedzialna jest za wychwytywanie alergenów czy czynników patogennych na śluzówkach, w tym zatok i górnych dróg oddechowych, układu moczowo-płciowego, skóry i innych. Przy niedoborze odporności śluzówkowej może dochodzić do translokacji bakterii ze skóry do zatok i rozwoju procesu zapalnego w ich obrębie. Nierzadko w przypadku przewlekłego zapalenia zatok szczękowych izoluje się gronkowce koagulazoujemne, czyli fizjologiczną mikroflorę skóry i błon śluzowych. Według danych American Academy of Otolaryngology-Head & Neck Surgery Multidisciplinary Rhinosinusitis Task Force gronkowce koagulazoujemne są drugim co do częstości występowania czynnikami etiologicznymi przewlekłego zapalenia zatok. Coraz częściej podnosi się aspekt narastającej lekooporności tych gatunków bakterii. Skorelowane jest to z miejscowym stosowaniem antybiotyków, często przy okazji współistniejącego atopowego zapalenia skóry. Zatem oznaczanie składu mikrobioty jelitowej, a następnie odbudowa ewentualnych zaburzeń (probiotyki i prebiotyki) jest metodą prewencji szeregu jednostek chorobowych, w tym przewlekłego zapalenia zatok oraz efektywną i bezpieczną terapią wspomagającą leczenie.

**W10**

## **PATOMECHANIZMY PRZEWLEKŁEGO ZAPALENIA ZATOK. ROLA GRONKOWCÓW KOAGULAZO-UJEMNYCH**

Piotr Heczko

Katedra Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum

Etiologia przewlekłego zapalenia zatok (PZZ) pomimo wielu dziesiętków lat badań nadal nie jest w pełni wyjaśniona. Należy zatem przyjąć dla tej jednostki chorobowej ogólny patomechanizm dotyczący przewlekłych zapaleń toczących na powierzchniach błon śluzowych, że stan zapalny jest wynikiem współdziałania trzech grup czynników: genetycznych związanych z mutacją jednego lub kilku genów, drobnoustrojowych polegających na dominacji pewnych składników mikrobioty jamy nosowej nad innymi, oraz immunologicznych dotyczących komórek nacieku zapalnego w śluzówce jak i w jej podścielisku, które stymulowane przez produkty bakterii odpowiadają w zmieniony sposób, w wyniku mutacji genetycznej. Jest wiele obserwacji potwierdzających taką hipotezę, chociaż nie jest ona powszechnie uznana. Uważa się, że istnieją dwie formy PZZ, jedna z przewagą mechanizmu alergicznego i naciekiem eozynofilnym, w której udział bakterii i grzybów jest związany z odpowiedzią immunologiczną na ich produkty powstając w zatoce, zaś druga z przewagą mieszanego odczynu komórkowego: limfocytów, makrofagów i neutrofilów, w której czynniki drobnoustrojowe są obecne w zatoce w formie biofilmu, a ich produkty stymulują lokalny układ immunologiczny.

Udział gronkowców koagulazo-ujemnych (CNS) w niealergiczej postaci PZZ wydaje się być istotny z dwóch powodów: stanowią one najliczniejszy składnik mikrobioty jamy nosowej,

a ponadto posiadają wiele czynników umożliwiających im osiedlenie się na powierzchni śluzówki zatok, kolonizację, a następnie otoczenie się biofilmem. Zdolność do wytwarzania biofilmu, została uznana za najważniejszy czynnik wirulencji CNS. Powszechność CNS jako składnika mikrobioty sprawia, że zakażenia wywoływane przez te bakterie są słabo immunogenne. Dodatkowo, stanowiąc główny składnik biofilmu, wielocukrowa adhezyna międzykomórkowa ułatwia ochronę przed neutrofilami, rozkładem dopełniacza i przeciwciałami. Z kolei kwas poli- $\gamma$ -glutaminowy pozwala CNS unikać fagocytozy przez neutrofile.

Dzięki obecności dużych ilości zewnątrzkomórkowej macierzy, penetracja w głąb struktury biofilmu jest utrudniona zarówno dla antybiotyków, jak i komórek i składników białkowych układu odpornościowego gospodarza. Drugim powodem obniżonej wrażliwości bakterii obecnych wewnątrz biofilmów na antybiotyki jest obniżony lub całkowicie zatrzymany wzrost komórek. Ponieważ mechanizm działania wielu antybiotyków opiera się na zaburzeniach syntezy ściany komórkowej, brak lub znaczne spowolnienie wzrostu części komórek czyni je niewrażliwymi. Aktywność metaboliczna komórek w biofilmie jest zróżnicowana, a co za tym idzie w każdym momencie trwania biofilmu część tworzących go komórek jest niewrażliwa na antybiotyki. Około 2% wszystkich komórek w biofilmie.

W11

**MIKROBIOLOGICZNA DIAGNOSTYKA ZAKAŻEŃ UKŁADU MOCZOWEGO  
– OD ZUM DO UROSEPSY**

Alfred Samet

Centrum Medyczne MML, Warszawa

Zakażenia dróg moczowych (ZDM) należą do najczęstszych zakażeń bakteryjnych, dotykających miliony ludzi rocznie. ZDM przyczyniają się do zwiększonej zachorowalności w różnych grupach wiekowych: noworodki i niemowlęta, dzieci, osoby dorosłe aktywne seksualnie, osoby starsze z zaburzeniami hormonalnymi bądź zaburzeniami w odpływie moczu. Ponadto zakażenia dróg moczowych spotykamy u osób, które wymagają długotrwałego cewnikowania, u pacjentów z chorobami podstawowymi: cukrzyca, nowotwory, choroby metaboliczne.

Głównym czynnikiem etiologicznym ZUM są bakterie Gram-ujemne z przewodu pokarmowego lub okolic krocza. Przeważa *Escherichia coli* (50–80% przypadków). Ponadto izoluje się *Proteus* spp., *Enterococcus*, *Pseudomonas* spp., *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*.

*Escherichia coli* stanowi najczęstszy czynnik etiologiczny posocznicy pochodzących z układu moczowego. Bardzo często są to szczepy wielowrażliwe. U takich pacjentów konieczne jest zachowywanie izolowanych szczepów i genetyczne oznaczenie ich czynników wirulencji – tzw. „szczepy uropatogenne”.

Diagnostyka zakażeń układu moczowego (w tym urosepsy) w gabinecie lekarza rodzinnego powinna obejmować: dokładny wywiad, z uwzględnieniem wieku pacjenta (osoby starsze, dzieci

poniżej 1 r.ż), monitorowanie ciśnienia, a także wykonanie badań laboratoryjnych: morfologia z rozmazem, badanie ogólne moczu, posiew moczu, oznaczenie poziomu mocznika i kreatyniny. Pacjenci z wstępnym rozpoznaniem sepsy powinni być w trybie natychmiastowym skierowani na badanie prokalcytoniny.

Właściwe przeprowadzenie badania bakteriologicznego moczu wymaga właściwych procedur: przygotowania się do pobrania materiału, pozyskania i zabezpieczenia materiału, transportu oraz właściwej interpretacji wyników posiewów. W dalszym ciągu główną strategią leczenia ZDM jest leczenie lekami przeciwbakteryjnymi. Proces trwa latami i może doprowadzić do niewydolności nerek lub zaburzeń w oddawaniu moczu, a nawet urosepsy.

Terapia zakażeń układu moczowego wymaga dobrania antybiotyku z uwzględnieniem: parametrów farmakokinetycznych oraz farmakodynamicznych leku, dobrej penetracji do miejsca zakażenia, współistniejących patologii układu moczowego, zdolności do eradykacji biofilmu bakteryjnego.

Nowe strategie leczenia oparte są na mikrobiomie bakteryjnym i leczeniu immunostymulacyjnym. W chwili obecnej leczenie powinno być poparte badaniem genomu *E. coli*, który pomoże zróznicować, czy proces zapalny dotyczy cewki, pęcherza, czy miedniczki nerkowej.

