Kwartalnik
Tom 61
Zeszyt 4•2022
PAŹDZIERNIK – GRUDZIEŃ

CODEN:
PMKMAV 61 (4)
2022

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advancements of Microbiology

Impact Factor = 1,118 (2021)
Punktacja MNiSW = 20,00 (2019)

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), RADOSŁAW STACHOWIAK (Uniwersytet Warszawski),
BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański), ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowa Akademia Techniczna),
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego),
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

JACEK BIELECKI (Redaktor Naczelny)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel. 22 5541304; e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl

RADOSŁAW STACHOWIAK (Zastępca)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
e-mail: radeks@biol.uw.edu.pl

KAROLINA JAWORSKA (Sekretarz)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
e-mail: post.mikrobiol@uw.edu.pl

ADRES REDAKCJI

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa;
e-mail: post.mikrobiol@uw.edu.pl

REDAKTORZY

MONIKA ADAMCZYK-POPŁAWSKA (Uniwersytet Warszawski), GABRIELA BUGLA-PŁOSKOŃSKA (Uniwersytet Wrocławski),
KATARZYNA GRUDLEWSKA-BUDA (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu)
AGATA GORYLUK-SALMONOWICZ (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie),
TOMASZ JAGIELSKI (Uniwersytet Warszawski), HENRYK KRUKOWSKI (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie),
AGNIESZKA KWIATEK (Uniwersytet Warszawski), BOŻENA NEJMAN-FALEŃCZYK (Uniwersytet Gdański),
RENATA MATLAKOWSKA (Uniwersytet Warszawski), EDYTA PODSIADŁY (Uniwersyteckie Centrum Kliniczne WUM),
ADRIANNA RACZKOWSKA (Uniwersytet Warszawski), KRZYSZTOF SKOWRON (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu),
AGNIESZKA SZCZEPANKOWSKA (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN),
PIOTR ZALESKI (Instytut Biotechnologii i Antybiotyków)

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Informacja o zdjęciu na okładce:

Ludwik Pasteur

Louis_Pasteur_by_Nadar2.jpg
Źródło: Wikimedia Commons

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

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

OD REDAKCJI

Redakcja *Postępów Mikrobiologii* z przyjemnością przedstawia zeszyt specjalny, dedykowany Ludwikowi Pasteurowi, z okazji 200. jubileuszu urodzin tego wybitnego badacza. Przyczynkiem do niniejszej dedykacji jest konferencja „The last word belongs to microbes" organizowana przez Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, która odbędzie się w dniach 29–30 listopada bieżącego roku. Z tej okazji, oprócz regularnych artykułów, prezentujemy publikacje Autorów zaproszonych do udziału w tym specjalnym wydaniu naszego kwartalnika. Sekcję konferencyjną otwiera znakomity artykuł historyczny opisujący różne oblicza Ludwika Pasteura przygotowany przez Dominikę Salamon oraz Tomasza Jagielskiego – pomysłodawcę konferencji. Tak jak wszechstronna i zróżnicowana była działalność tego wielkiego naukowca, tak samo zróżnicowane tematycznie są prezentowane publikacje przeglądowe. Nie mogło naturalnie zabraknąć pracy poświęconej wakcynologii, dziedziny której Pasteur był pionierem. Polecamy Państwa uwadze przegląd autorstwa Rafała Jabłuszewskiego i Agnieszki Wyszyńskiej, dotyczący współczesnych metod poszukiwania potencjalnych antygenowych kandydatów na szczepionki. Zapewne większość z nas uważa Pasteura przede wszystkim za mikrobiologa, znanego z odkrywania bogactwa mikrokosmosu i zasad nim rządzących. Tej aktywności dedykowana jest praca Beaty Tokarz-Deptuła i wsp. na temat mikrobiomu człowieka. Może mniej kojarzymy słynnego mikrobiologa z tematyką enologiczną, ale przecież jedne z ważniejszych badań L. Pasteura to właśnie badania nad procesem fermentacji. Kamila Pachnowska i wsp. przybliżą nam historię winiarstwa oraz wprowadzą nas w tajniki stabilizacji wina. W ostatnim z prezentowanych artykułów Mariusz Dyląg przekazuje nam przegląd wiedzy na temat oportunistycznych, grzybiczych patogenów. Tematyka aktualna zarówno w czasach Pasteura, jak i współczesnych.

Życzymy P.T. Czytelnikom miłej lektury oraz udanej konferencji.

Redakcja

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2022, 61, 4, 169–178
DOI: 10.2478/am-2022-018

BDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS: MORE THAN JUST A BACTERIAL HUNTER

Tayyab Saleem[1]*, Muhammad Ishfaq[2], Muhammad Faheem[3]*, Syed Babar Jamal[3]

[1] School of Science, Monash University, Subang Jaya, Malaysia
[2] Department of Molecular Biology and Genetics, Institute of Basic Medical Sciences, Khyber Medical University, Peshawar, Pakistan
[3] Department of Biological Sciences, National University of Medical Sciences, Abid Majeed Rd, Rawalpindi, Punjab, Pakistan

Submitted in May 2022, accepted in September 2022

Abstract: *Bdellovibrio bacteriovorus* is a predatory gram-negative delta-proteobacteria that preys on other gram-negative bacterial species. With the surge in the cases of Anti-Microbial Resistance and the demand to replace conventional antibiotics, this predatory attribute of *B. bacteriovorus* has led to a vast number of studies in the last decade alone. These studies demonstrated various aspects of predation and proposed using *B. bacteriovorus* as an alternative new approach to conventional antibiotics in humans. Here we review the current progress made in this promising new area of research to develop novel antibacterial approaches.

1. Introduction. 2. Characterizing *B. bacteriovorus*. 2.1. Requirements for survival. 2.2. Predation overview. 2.3. Attack phase. 2.4. Prey entry and invasion. 2.5. Growth phase. 2.6. Survival of attack phase cells. 2.7. Synergistic effect of *B. bacteriovorus* and conventional antibacterials. 3. *B. bacteriovorus*: a possible "live antibacterial". 3.1. *In-vitro* evidence. 3.2. *In-vivo* evidence. 3.3. Obstacles. 4. Industrial applications of *B. bacteriovorus*. 5. Summary

Keywords: antimicrobial, *Bdellovibrio bacteriovorus*, gram-negative, live antibiotic, predatory species

1. Introduction

Bdellovibrio bacteriovorus belongs to a large family of tiny vibrioid-shaped predatory organisms known as *Bdellovibrio*-and-like-organisms (BALO). BALO species possess a single flagellum and an average size of 0.2–0.5 μm × 1.2–1.5 μm. These species are divided into two major categories of α- and δ-proteobacteria. Predation is the only way for BALOs (including *B. bacteriovorus*) to reproduce and they choose gram-negative bacteria as their prey for replication [3, 36, 48, 74]. Specifically, *B. bacteriovorus* is a gram-negative obligate aerobe and a highly motile δ-proteobacteria (size: approximately 1 μm × 0.2 μm). Its ability to feast on microbes makes it ubiquitous and leads to its presence ranging from salt and freshwater to the human gut [3].

Since its discovery in 1962 *Bdellovibrio bacteriovorus* has not been studied extensively compared to other bacterial species. It may be because a dire need for an alternative to antibiotics did not exist either until the start of the twentieth century. Nevertheless, as the cases of antimicrobial resistance (AMR) started to, more frequently, make headlines in newspapers and scientific journals alike, the scientific community diverted their attention to a more formidable threat in the form of AMR. To further substantiate the situation, World Health Organization, as a warning, provided an estimate of 10 million deaths globally, by 2050, at the hands of antibiotic resistance [59]. This marked an increase in the number of studies, especially in the last decade, proposing *Bdellovibrio bacteriovorus* as a "live antibiotic" in humans to primarily treat gram-negative infections; however, the first-ever human trials are yet to be conducted.

In this review, we place special emphasis on research from the last decade that supports the potential use of *B. bacteriovorus* as a possible replacement for presently available antibiotics in treating gram-negative bacterial infections (Fig. 1). Next, we will discuss the predatory lifestyle of *B. bacteriovorus* and the critical studies conducted to illuminate its various features (Fig. 2). We then review the efficacy of *B. bacteriovorus* and certain significant obstacles to its use as a "live antibiotic" in humans. Essential findings regarding treatment of gram-negative infections, interaction with the immune system, efficiency in removing bacterial colonies, toxicity towards human cell lines, will be discussed in the proceeding paragraphs. Finally, we will also emphasize the predatory ability of *B. bacteriovorus* by discussing

* Corresponding authors: Tayyab Saleem, School of Science, Monash University, Subang Jaya, 47500, Malaysia; phone no. +92 334 5386 069, **e-mail: tayyabsaleem262@gmail.com**
Muhammad Faheem, Department of Biological Sciences, National University of Medical Sciences, Abid Majeed Rd, Rawalpindi, Punjab, 46000, Pakistan; **e-mail: faheem08@live.com**

© 2022 Tayyab Saleem et al.
This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

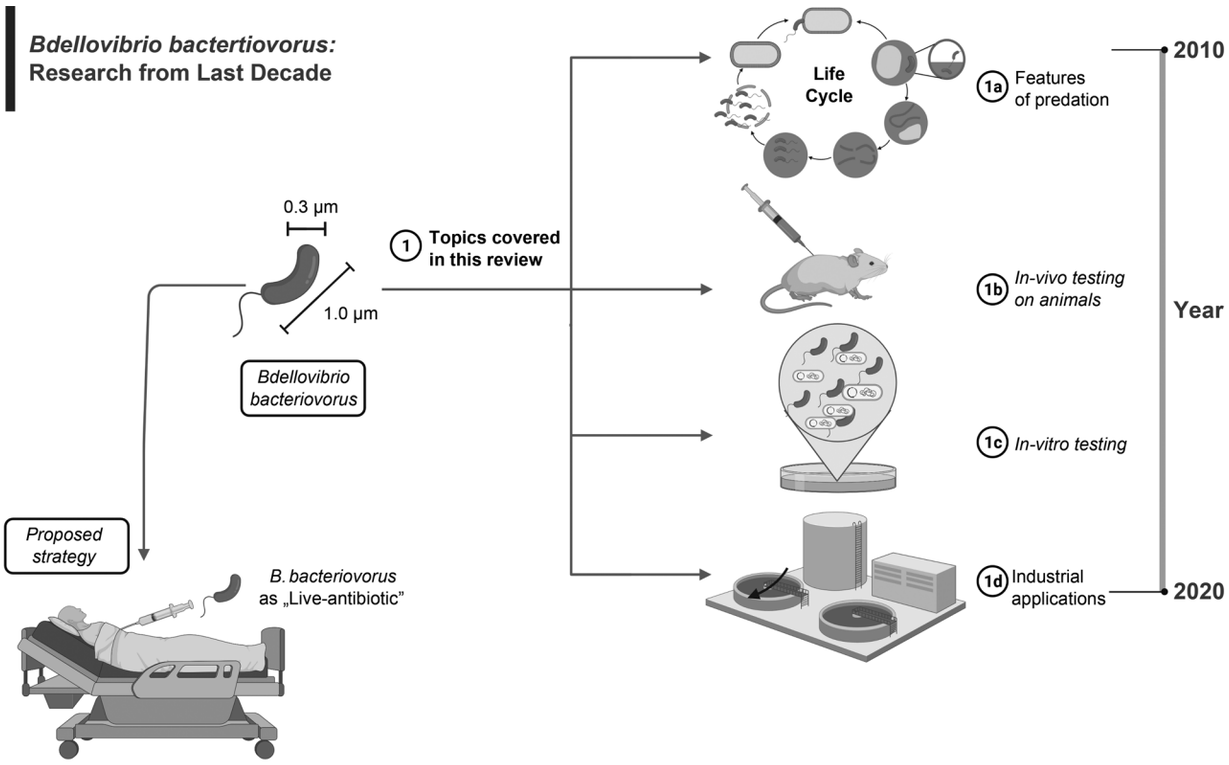


Fig. 1. (*Adapted from "The Role of ILC2s in Asthma Pathogenesis", by BioRender.com (2022). Retrieved from https://app.biorender.com/biorender-templates*)

Description: A visual representation of the type of research conducted in the last decade concerning *B. bacteriovorus.* The review uses studies from the following areas to establish the antibacterial properties of the predator. 1a) The features of predation highlighted by the studies from the last decade provide new insight into the predation process. Followed by the 1b) *In-vitro* testing of the species to establish *B. bacteriovorus* as non-cytotoxic toward human cell lines and effective in preying on known gram-negative pathogens. Moreover, using this information to conduct 1c) *In-vivo* animal studies to test whether the knowledge gained from *in-vitro* studies translates well in animals. But also, to use a mammalian model in mice to study the predator's safety to gain some idea of its efficacy in humans. Lastly, 1d) Industrial applications provide a different perspective on *B. bacteriovorus*. As its ability to prey on gram-negative species is put to use in various commercial settings. Ranging from its role in the food industry, it can prevent spoilage from gram-negative species like *E. coli*. To a more sophisticated field like Biotechnology, using its hydrolytic enzymes, it can obtain hard-to-extract biopolymers like polyhydroxyalkanoates (PHAs) from the cytoplasm of gram-negative bacteria. Adding to the reputation of *B. bacteriovorus* for being efficacious against gram-negative bacteria and being multifaceted. With most of the reviewed studies suggesting the use of this species as an antibiotic replacement, substantial evidence to merit the safety of this predator as an antimicrobial agent in humans is still missing. There are other areas of *B. bacteriovorus*, including its genome, that have received considerable attention in the last decade but lie beyond the scope of this review.

studies exploring the commercial applications of *B. bacteriovorus* as a possible solution to various industrial dilemmas caused by gram-negative species, such as wastewater treatment, protecting food items by prolonging their shelf-life, and so forth. Thus, the review consolidates the reputation of *B. bacteriovorus* as a valuable addition to the list of proposed replacements for antibiotics. And a good asset in the fight against AMR.

2. Characterizing *B. bacteriovorus*

2.1. Requirements for survival

B. bacteriovorus is an oligotroph that tends to favor nutritionally deficient media for colony formation. Under non-symbiotic conditions *B. bacteriovorus* acts as a strict aerobe but reports of survival under anoxic conditions also exist once the predator enters the periplasm [62]. In terms of optimal growth conditions, a temperature of 30°C and a pH ranging between 7.5 and 8 helps the predator grow [63]. Furthermore, *B. bacteriovorus* can be separated into host-dependent (HD) and host-independent (HI) strains, although the HI strain can revert to an HD lifestyle if introduced to prey cells [27]. For an HD strain to locate prey cells it must swim (Fig. 2). However, a lack of prey has been proposed to involve the use cyclic-di-GMP (CdG) effectors and two flagellar-brake proteins by the predator to help reactivate the swim-arrest, which affects the predator's swimming pattern and energy metabolism, and the predator survives as a result. *B. bacteriovorus* starts swimming again in search of prey once the prey is re-introduced [60].

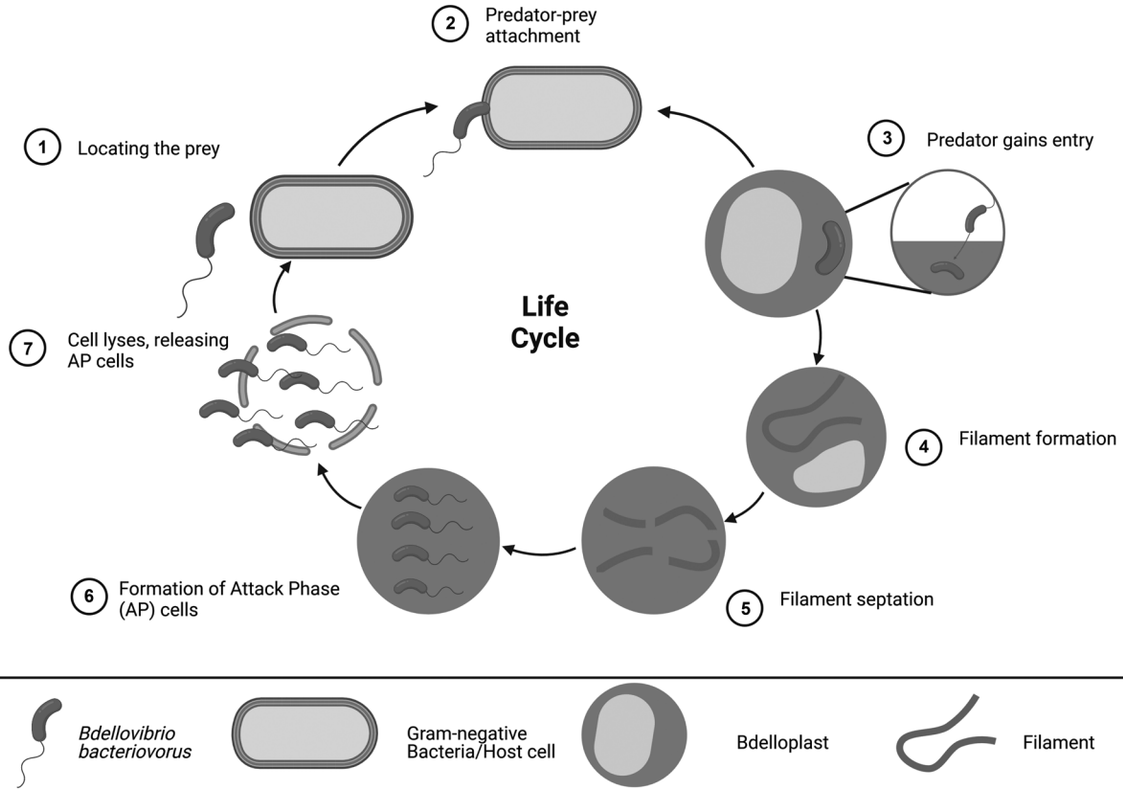


Fig. 2. (*Adapted from "Lytic and Lysogenic Cycle", by BioRender.com (2022). Retrieved from https://app.biorender.com/biorender-templates*)
Description: The life cycle of the predatory, gram-negative bacterial species *B. bacteriovorus*. The life cycle is divided into an Attack Phase (AP) and a Growth Phase (GP). AP: (1. Predator searches for and locates its prey (a gram-negative bacterial host) using chemotaxis followed by swimming towards the prey using its flagellum. 2. *B. bacteriovorus,* upon finding its prey, attaches to its cell wall). GP: (3. Predator uses its massive arsenal of hydrolytic enzymes to enter the prey cell and feed on the prey cell cytoplasm using hydrolases. The host cell is now called a bdelloplast. 4. The predator grows and forms a polynucleoid filament, almost the size of the prey cell itself. 5. Filament undergoes septation. 6. A new line of AP cells is released. 7. The bdelloplast peptidoglycan undergoes deacetylation by the newly formed AP cells. Thus, they are released. And the cycle repeats itself [14, 23, 36, 40, 53, 63, 67, 68].

2.2. Predation overview

HD strain has four life stages (Fig. 1 represents the complete life cycle of *B. bacteriovorus*) [63]. First stage consists of locating and recognizing the prey cell (a gram-negative species) [68]. Upon locating the prey cell, the predator then invades the cell's periplasm by penetrating its peptidoglycan cell wall [63]. Following invasion, the *B. bacteriovorus*-containing prey turns into a round-shaped cell called a bdelloplast [67], and growth phase initiates. The growth phase strategy of *B. bacteriovorus* relies on periplasmic predation, instead of epibiotic predation [40, 53]. Although, it's been suggested by Deeg et al. that *Bdellovibrio*, as a genus, might be ancestrally epibiotic [14]. During growth, predator utilizes the prey cell contents as a source of nutrition. However, there is evidence of rebuttal by the prey cells in certain cases, in the form of transcriptional products released to repair the damage caused by the predator, especially to the cell wall. *B. bacteriovorus*, regardless of the minor defense put up by the affected organism, finished off its prey [36]. Once the prey has no more nutrition to offer, *B. bacteriovorus* septates and new progeny is formed. The new attack phase cells then burst out after the prey cell has undergone lysis [23, 63, 67]. The AP cells then search for other prey cells and the aforementioned process repeats itself.

2.3. Attack Phase

During attack phase *B. bacteriovorus* uses its flagellum [35], to propel it towards the prey cell, followed by a reversible attachment of the two [67, 68]. Due to the temporary nature of this attachment the predator also has the option to detach itself from the prey if the prey is considered unsuitable [6, 67]. In case detachment happens, there are reports of this leaving the prey cell wall discontinuous [1]. On the other hand, the process of attachment that is currently agreed-upon is mediated by Type IV pili, present on the pole across the flagellum in the form of tiny retractile filaments made of protein [55]. Furthermore, the involvement of Type IV pili is

reported to be restricted to the predator-prey attachment only [22]. Multiple factors including PilF, Tfp and PilG have been reported to be essential in the assembly of Type IV pili [9]. However, the specific role of pili in *B. bacteriovorus* life cycle relies on a few important elements. These elements include the PilA protein, which has been reported as essential in recognizing the prey [22]. Moreover, a high level of PilA expression has been observed in both the attack and growth phase, which hints at its participation in the early stages of predation [41]. Other examples of assembly proteins for Type IV pili include PilT2, which has been observed to assist in biofilm predation [10].

2.4. Prey entry and invasion

For the predator to enter and invade the prey cell the formation of pore in the Bdelloplast peptidoglycan is deemed the most crucial step. It was initially thought that certain enzymatic reactions were behind this step [67]. Subsequently, glycanases were proposed to be the main component in hydrolysing the bdelloplast peptidoglycan [70]. In terms of bdelloplast formation, both glycanases and peptidases were at one point considered to be heavily involved in the process. However, later in a study by Tudo et al. it was peptidases, instead of glycanases, that were highlighted as the reason for peptidoglycan hydrolysis [71]. On the other hand, in the last decade this area was further explored by Lerner et al. (2012) who reported that a couple of penicillin-binding proteins (PBP) could be the reason for the rounding of the prey cell [38]. These proteins are expressed at an earlier stage of predation and perform the functions of DD-endopeptidase and DD-carboxypeptidase [38]. In addition, the bdelloplast formation might be a strategy used by the two enzymes to ward off any further attacks by other *B. bacteriovorus* cells, while at the same time allowing entry of the attached predator cell through the peptidoglycan layer with its entire structure intact. Furthermore, the authors of the same study did not associate the two enzymes to any important role during prey invasion.

Genomic sequencing of the predator has also revealed some other components that are important for pore formation and predator entry [16, 55]. In one such study by Lambert et al., multiple enzymes were identified to facilitate the entry of *B. bactreiovorus* into the prey cell [37]. These enzymes included deacetylases, proteases and glycanases, specifically, deacetylase weakened the peptidoglycan layer of the prey [37]. This finding disagrees with previous studies where peptidoglycan deacetylation was thought to protect the bdelloplast from premature lysis by glycanase. The same study further considered the initial formation of the pore to be assisted by deacetylation and not hampered by it [37].

2.5. Growth Phase

After prey invasion, the pore in the outer membrane of the prey cell, used by the predator for entry, is sealed. Shortly after, morphological changes are triggered in the prey cell resulting in the formation of a round shaped cell (bdelloplast) [38]. Furthermore, transpeptidases are released by the predator to aid the peptidoglycan layer of the bdelloplast in building intracellular resistance against osmotic pressure [34]. Next, the predator rapidly depletes the nutrient stores of the bdelloplast to aid its replication. Moreover, recent findings have illuminated the role of *B. bacteriovorus* nucleases (Bd0934 and Bd3507) in the digestion of nucleic acids inside the bdelloplast [5]. The predator grows in the form of a filament (69), along with duplication of its chromosomes. Also, the genetic material of the *B. bacteriovorus* HD strain has been observed to only replicate inside the bdelloplast [42]. In the case of *B. bacterivorous*, a delay has been reported between chromosome replication and cell division which causes a filament to form temporarily, similar events have been observed during the replication of *Streptomyces* [42, 58].

In a study by Fenton et al. the final stages of *B. bacteriovorus* replication inside the bdelloplast were observed [23]. The predator cell simultaneously elongates from both poles. After that, once the elongation reaches maximum length the predator cell produces new progeny cells and septation is complete. For septation to initiate it is imperative for the predator to completely deplete the nutrients of the prey cell. Still, the exact mechanisms deployed by the predator to duplicate its chromosomes and divide into new AP cells are unknown. The newly formed AP cells then lyse what remains of the bdelloplast to exit the prey cell. An inverse proportionality has also been reported between the number of new AP cells and the amount of time it takes them to exit the bdelloplast [23]. In the end, the progeny cells use the pores created in the remains of the bdelloplast to exit the prey. Furthermore, Harding et al. suggested the involvement of lysozyme DslA (acts on peptidoglycans that are GlcNAc-deacetylated) to facilitate prey exit [26]. Following their exit, the new *B. bacterivorus* cells devote a small period to elongate a bit further, and once they are set to initiate a new attack phase the elongation ends [23].

2.6. Survival of attack phase cells

A bacterial predator like *B. bacteriovorus* is not completely protected against extracellular environmental threats. While searching for prey the predator must first deal with its environment which is usually limited in nutrients and contains harmful secondary metabolites secreted by other organisms. These metabolites play

an important role in the ecology and regulation of the extracellular environment, and hence in the interaction between the predator and other bacterial species [72]. No such reports currently exist that highlight specific molecules targeting *B. bacteriovorus*. However, a few observations have been made regarding molecules like cyanide that has been observed to safeguard its source (a bacterial species) from predation [47]. Also, pH and particular carbohydrates have been shown to have a deterrent effect on predation [13].

2.7. Synergistic effect of *B. bacteriovorus* and conventional antibacterials

Under normal conditions, *B. bacteriovorus* shares its habitat and source of nutrients with other organisms. This not only leads to competition amongst different species but also prevents *B. bacteriovorus* from feeding on the entire population of prey [20]. So, to compensate for this type of predator-prey dynamic a possible alternative like combination therapy with other antimicrobials might prove useful. However, prior to pairing the predator with an antibiotic, to increase its preying capacity, it is essential to evaluate the sensitivity of *B. bacteriovorus* towards different antibiotics. With regards to this topic multiple studies have been published in the last decade that expand on this subject. In one such study by Marine et al., the susceptibility of the predator towards several antibiotics was investigated. This was achieved by assaying a liquid co-culture of *E. coli* and *B. bacteriovorus*. The study highlighted Trimethoprim as the antibiotic toward which the predator showed resistance. This was attributed to natural resistance, by the authors, since dihydrofolate reductase of *B. bacteriovorus* displays no affinity [43].

Furthermore, there are reports of a synergistic effect produced by combining *B. bacteriovorus* and Violacein (a bisindole antibiotic that targets gram-positive bacteria) to control the growth of gram-positive species, which otherwise lie outside the spectrum of bacterial classes that *B. bacteriovorus* can negatively impact [18]. Im et al. further tested *B. bacterivorous* and Violacein against a polymicrobial population comprising of gram-negative *A. baumannii* and *K. pneumoniae*, and gram-positive *S. aureus* and *Bacillus cereus*. Both *B. bacteriovorus* and Violacein, when tested separately, effectively reduced the viability of gram-negative and positive strains, respectively. Surprisingly, when used together, both showed an enhanced efficacy in reducing the viability of their respective strains. Furthermore, the antibacterial activity of *B. bacteriovorus* was not negatively impacted in any way by Violacein and vice versa [30]. These findings encourage consideration of combination therapy involving live antibacterials like *B. bacteriovorus* and conventional antibiotics such as Violacein to treat polymicrobial infections. Furthermore, this type of combination therapy could reduce prevalence of antibiotic resistance genes by preventing horizontal gene transfer. This is so as using conventional antibiotics concurrently with *B. bacteriovorus* might induce bacterial resistance and the predator provenly digests the genetic material of gram-negative pathogens besides feeding on the rest of the prey cell contents [46].

Lastly, aside from antibiotics, studies from the past decade have also focused on the use of bacteriophages in combination with *B. bacteriovorus* for pathogen removal. Hobley et al. investigated this concept and observed a mutual tolerance between *B. bacteriovorus* and bacteriophages. The same study showed the predator having a supplementary effect on the ability of phages to control gram-negative species like *E. coli* [28]. This example of predator-bacteriophage cooperation is a promising solution to not only phage resistance but also the predator's inability to destroy the entire prey population.

3. *B. bacteriovorus*: a possible "live antibacterial"

3.1. *in-vitro* evidence

In the last decade, in-vitro testing has been a recurring theme and has provided vital evidence regarding a few aspects of *B. bacteriovorus*. These aspects can be divided into two main categories of prime interest: toxicity and predatory ability/mechanism. Recently, *in-vitro* studies have tested the cytotoxicity of *B. bacteriovorus* on human cells lines like Human Corneal Limbal Epithelium (HCLE) cells [64], keratinocytes, kidney epithelial cells, liver epithelial cells, and monocytes both from blood and spleen [25]. In these cells, cytotoxicity assays showed that *B. bacteriovorus* was unable to generate any inflammatory response and did not affect the viability of these cells [25]. Monnappa et al. (2016) studied Lung epithelial (NuLi-1) and Intestinal epithelial cells, which can produce cytokines against foreign pathogenic bacteria but showed no signs of cytokine induction by *B. bacteriovorus*. The same study also supported the predator's potential to be considered non-cytotoxic to mammalian cells [45].

In terms of its predatory ability/mechanism, recent studies have also focused on the ability of *B. bacteriovorus* to prey upon/reduce host cell viability of Multi-drug Resistant (MDR) bacteria, including nosocomial pathogens that produce beta-lactamases [12, 33]. For instance, *B. bacteriovorus* can eradicate gram-negative strains that are resistant to previously discontinued antibiotics like colistin [15]. Moreover, *B. bacteriovorus* has shown a protective ability toward human

cells. For example, the predator protects epithelial cells from pathogens like *Pseudomonas* sp. while protecting the viability of the epithelial cells or maintaining the microbial balance in the human gut of pediatric patients preventing Dysbacteriosis-induced diseases like celiac disease, inflammatory bowel disease, and cystic fibrosis [29, 19, 32].

3.2. *in-vivo* evidence

One of the concerns with administering *B. bacteriovorus* as a "live antibiotic" is the possibility of abnormally triggering the immune system. However, multiple studies have reported the non-toxicity of *B. bacteriovorus* in animal models [64–66]. In one such study by Shatzkes et al. a slight increase in specific proinflammatory cytokines was observed in response to *B. bacteriovorus* in mice models, but the level returned to normal after almost 24 hours [65]. One possible explanation behind this lack of sustained immune response in mice against *B. bacterivorous* is the presence of neutrally-charged-Lipopolysaccharides (LPS) structure of *B. bacteriovorus* as opposed to negatively charged LPS in other gram-negative bacteria [66]. Furthermore, in terms of cytotoxicity in animal models, *B. bacteriovorus* is reported to show no cytotoxicity towards the ocular surface of mice [57]. However, its contribution is insubstantial in clearing the pathogens from the corneal epithelium [56].

B. bacteriovorus has proven to be highly beneficial, even in removing plaque-causing gram-negative pathogens like *Yersinia pestis*, which devastates small animals like mice and can also inflict massive harm on humans by its transmission through flea vectors [24, 59]. Also, there is evidence of *B. bacteriovorus* protecting C57BL/6/SKH-1 mice from *Y. pestis* in-vivo [24, 59]; however, the exact mechanism of action is unknown. On the other hand, the predator does not protect Balb/c mice from *Y. pestis* [24]. Furthermore, in terms of deadly human pathogens, *Shigella flexneri*, especially the carbenicillin-and-streptomycin-resistant strain, claims around one million human lives annually [39]. The efficacy of *B. bacteriovorus* has been tested against this strain in animal models like zebrafish larvae. It was reported that *B. bacteriovorus* kills the pathogen without inducing any adverse immune system effects. On the contrary, the activity of the immune system is enhanced when working alongside *B. bacteriovorus*, and towards the end of predation *B. bacteriovorus* is removed by the host immune system [75]. Moreover, Shatzkes et al. observed *B. bacteriovorus* finding it challenging to prey upon species in the vasculature compared to a specific immune-privileged organ due to difficulty in locating the prey and removing the predator itself [66].

3.3. Obstacles

A considerable amount of literature has been published establishing the therapeutic ability of *B. bacteriovorus* [12, 15, 19, 24, 25, 29, 32, 45, 59, 64–66, 75], and proposing its use in *in-vivo* human studies. However, certain findings contradict this concept [2, 21, 17, 31]. In a study by Duncan et al. prey motility was identified as a hurdle to predation by *B. bacteriovorus*. The predator finds it challenging to attach to motile prey like *Vibrio cholerae* compared to non-motile prey due to the drag force that it experiences [17]. Among other obstacles to predation, Baker et al. reported a disparity, in terms of pathogen removal by *B. bacteriovorus*, in the human serum and buffer. The authors investigated the interaction between *B. bacteriovorus* and one of the nosocomial pathogens: Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* [2]. The interaction was tested both in human serum and in the buffer. The predator eradicated *K. pneumoniae* initially but took 19 h longer to attach to the prey in the human serum model compared to the buffer. Upon microscopic observation, contact with the serum changed the shape of the predator from vibroid, which indicates predation, to a round shape. More importantly, after predation, *K. pneumoniae* grew back in buffer and serum, but further research is required to substantiate these findings. The same authors speculated that it was due to plastic resistance, but no further attempts were made to explore the reasons for re-growth [2]. Furthermore, Im et al. reported a similar impact of human serum on *B. bacteriovorus* [31]. The study involved the cells of *K. pneumoniae*, *E. coli*, and *Salmonella enterica* that were subjected to predation in human serum. The osmolality of human serum and serum albumin inhibited predation. As the osmolality of the serum rose the activity of *B. bacteriovorus* declined. Furthermore, the serum albumin caused inhibition by binding and coating the cells of the *B. bacteriovorus* [31]. Finally, predation is hindered by indole, which is a metabolite in many gram-positive and gram-negative bacteria and is released during the stationary phase [21]. Indole reduces the motility of *B. bacteriovorus* during the attack phase, which is integral for the predator to locate its prey and slows down the exit of the predator from inside the bdelloplast [21]. Addressing these hurdles will therefore be essential before performing any *in-vivo* studies on human subjects.

4. Industrial applications of *B. bacteriovorus*

In the last decade, numerous studies have surfaced that investigated the unorthodox use of *B. bacteriovorus* as a biocontrol agent in the food, environmental,

healthcare industries, and its biotechnological applications. This indicates that the use of *B. bacteriovorus* is not solely restricted to public health but probably extends further. In the food industry, the predator has been mainly tested against food spoilage, like its use in controlling the growth of bacterial species of genus Dickeya and Pectobacterium. These species are pathogenic towards plants, specifically potatoes, as they tend to damage the roots, as a result, the agricultural production suffers [77]. Furthermore, *B. bacteriovorus* displayed activity which was dependent on its concentration, and the presence of glucose was observed to provide protection from predation. Among other studies on prevention of food spoilage by *B. bacteriovorus*, the predator suppresses the growth of *Pseudomonas tolasii*, thereby protecting the post-harvest mushroom (*Agricus bisporus*) from the toxin, Tolaasin, it produces. Thus, the predator reduces the appearance of brown lesions on the mushroom pileus, making it more appealing to buyers [61]. Similarly, other post-harvest food products such as lettuce and carrots have also been shown to be protected from *E. coli* or *Salmonella* using *B. bacteriovorus* [50]. In addition, the shelf life of prepackaged meat products has been reported to significantly increase when *B. bacteriovorus* is used to mediate the removal of spoilage bacteria like *E. coli* [51]. Finally, as a biocontrol agent, *B. bacteriovorus* (SOIR-1 strain) also provides protection against phytopathogens such as *Xanthomonas campestris* and *Pantoea* sp. strain BCCS responsible for causing rotting of potato tubers and onion bulbs, respectively [49].

As a biocontrol agent *B. bacteriovorus* has been tested in the fishing industry as well. In one such study by Cao et al. the predator was used against shrimp pathogens as a bio-disinfectant [7]. Later, the authors of the same study were, for the first time, able to encapsulate the predator which prolonged its stability and viability at room temperature for approximately 120 days [8]. Furthermore, *B. bacteriovorus* has also shown the ability to alter the feeding behavior of the Mandarin fish: *Siniperca chuatsi*, from live baitfish (costly) to pellet feed (more economically viable), as well as enhance its growth and survival rate. The predator does that by enhancing the expression of genes responsible for regulating appetite: Neuropeptide Y(*Npy*) and Agouti-related peptide (*Agrp*), and by controlling the growth of *Aeromonas* (pathogenic bacteria) in the intestinal microflora of the fish [11]. Among environmental applications of *B. bacteriovorus*, it can be used in pretreatment of rainwater, as a lead-in to solar disinfection and solar photocatalytic treatment, to control the growth of bacterial pathogens such as *Klebsiella pneumoniae* [73]. Like rainwater treatment, *B. bacteriovorus* has also been used in the Wastewater treatment (WWT) plants as a cleaning agent as it can prey upon the sludge microorganisms and prevent the membrane from blocking in membrane bioreactors [52].

With regards to the healthcare industry, *B. bacteriovorus* has shown the ability to target oral pathogens. With the oral microbiota being highly diverse the predator has been reported to prey on certain periodontal pathogens [54]. It has been observed that *B. bacreriovorus* is able to prey on aerobic bacterial species but not the anaerobic ones (such as *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivitis*) inside the oral cavity. Moreover, it has also been suggested that *B. bacteriovorus* can help control the microbial growth of antibiotic-resistant gram-negative *Enterobacter cloacae* JK-2, in knee wear simulators (used to design improved Total Knee Replacement (TKR) implants) [3].

Lastly, *B. bacteriovorus* also has applications as a biotechnological tool. In a study by Martinez et al. *B. bacteriovorus* was successfully used in extracting the hard-to-extract biopolymers like polyhydroxyalkanoates (PHAs) (found in the cytoplasm of both gram-negative and positive bacteria), using its enormous range of hydrolytic enzymes. The predator produced up to 80% yield without any breakage of the product [44]. Moreover, the same study also proposed the use of *B. bacteriovorus* instead of conventional extraction techniques like high-pressure homogenization, which have high costs and a low yield [44]. Furthermore, there are reports of new biotechnological tools like BspK (a protease K derived from *B. bacteriovorus*) that can help speed up the quality control and evaluation process of new therapeutic antibodies. Usually, the quality control process involves cleaving antibodies to their more minor constituents to facilitate their analysis. However, the currently in-use tools like Trypsin are inefficient and ineffective in producing high quality products. This prolongs the approval process for therapeutic antibodies, thus depriving patients in urgent need of these antibodies. Therefore, proteases like BspK can be a valuable addition to the quality control process [4].

5. Summary

In summary, *B. bacteriovorus* has shown potential as a therapeutic agent across various fields and can be considered a possible antibiotic replacement. However, the substantial evidence to merit the safety of this predator as an antimicrobial agent in humans is still missing. The *in-vitro* studies have given some promising results, but issues like prey motility, when used along with indole and the scientific gaps in the knowledge about the function of each gene in the bacterial genome, pose severe hurdles in the route to develop this species as a replacement to traditional antibiotics. The future research should therefore focus on accumulating

conclusive evidence regarding the safety of this predatory species in humans alongside exploring the genome of *B. bacteriovorus*.

References

1. Abram D., Castro e Melo J., Chou D.: Penetration of *Bdellovibrio bacteriovorus* into host cells. *J. Bacteriol.* **118(2)**, 663–680 (1974)
2. Baker M., Negus D., Raghunathan D., Radford P., Moore C., Clark G., Diggle M., Tyson J., Twycross J., Sockett R.E.: Measuring and modelling the response of *Klebsiella pneumoniae* KPC prey to *Bdellovibrio bacteriovorus* predation, in human serum and defined buffer. *Sci. Rep*. **7**, 1–18 (2017)
3. Brandt J-M., Mahmoud K., Koval S., MacDonald S., Medley J.: Antimicrobial agents and low-molecular weight polypeptides affect polyethylene wear in knee simulator testing. *Tribol. Int*. **65**, 97–104 (2013)
4. Bratanis E., Molina H., Naegeli A., Collin M., Lood R.: BspK, a serine protease from the predatory bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus* with utility for analysis of therapeutic antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, e03037–16 (2017)
5. Bukowska-Faniband E., Andersson T., Lood R.: Studies on Bd0934 and Bd3507, two secreted nucleases from *Bdellovibrio bacteriovorus*, reveal sequential release of nucleases during the predatory cycle. *J. Bacteriol.* **202**, e00150–20 (2020)
6. Burnham J.C., Hashimoto T., Conti S.F.: Electron microscopic observations on the penetration of *Bdellovibrio bacteriovorus* into gram-negative bacterial hosts. *J. Bacteriol.* **96(4)**, 1366–1381 (1968)
7. Cao H., An J., Zheng W., He S.: *Vibrio cholerae* pathogen from the freshwater-cultured whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* and control with *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Invertebr. Pathol.* **130,** 13–20 (2015)
8. Cao H., Wang H., Yu J., An J., Chen J.: Encapsulated *bdellovibrio* powder as a potential bio-disinfectant against whiteleg shrimp-pathogenic vibrios. *Microorganisms*, **7(8)**, 244 (2019)
9. Carbonnelle E., H elaine S., Prouvensier L., Nassif X, Pelicic V.: Type IV pilus biogenesis in *Neisseria meningitidis*: PilW is involved in a step occurring after pilus assembly, essential for fibre stability and function. *Mol. Microbiol.* **55(1)**, 54–64 (2005)
10. Chanyi R.M., Koval S.F.: Role of type IV Pili in predation by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *PLoS One*, **9(11)**, e113404 (2014)
11. Chen X., Yi H., Liu S., Zhang Y., Su Y., Liu X., Bi S., Lai H., Zeng Z., Li G.: Promotion of pellet-feed feeding in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) by *Bdellovibrio bacteriovorus* is influenced by immune and intestinal flora. *Aquaculture*, **542**, 736864 (2021)
12. Dashiff A., Junka R., Libera M., Kadouri D.: Predation of human pathogens by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus* and *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Appl. Microbiol*. **110**, 431–444 (2011)
13. Dashiff A., Keeling T.G., Kadouri D.E.: Inhibition of predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Micavibrio aeruginosavorus* via host cell metabolic activity in the presence of carbohydrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **77(7)**, 2224–2231 (2011)
14. Deeg C.M., Le T.T., Zimmer M.M., Suttle C.A.: From the inside out: An epibiotic *Bdellovibrio* predator with an expanded genomic complement. *J. Bacteriol.* **202**, e00565–19 (2020)
15. Dharani S., Kim D.H., Shanks R.M., Doi Y., Kadouri D.E.: Susceptibility of colistin-resistant pathogens to predatory bacteria. *Res. Microbiol.* **169**, 52–55 (2018)
16. Dori-Bachash M., Dassa B., Pietrokovski S., Jurkevitch E.: Proteome-based comparative analyses of growth stages reveal new cell cycle-dependent functions in the predatory bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74(23)**, 7152–7162 (2008)
17. Duncan M.C., Forbes J.C., Nguyen Y., Shull L.M., Gillette R.K., Lazinski D.W., Ali A., Shanks R.M., Kadouri D.E., Camilli A.: *Vibrio cholerae* motility exerts drag force to impede attack by the bacterial predator *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Nat. Commun.* **9**, 1–9 (2018)
18. Duran N., Justo G.Z., Ferreira C.V., Melo P.S., Cordi L., Martins D.: Violacein: properties and biological activities. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **48(Pt 3)**, 127–133 (2007)
19. Dwidar M., Leung B.M., Yaguchi T., Takayama S., Mitchell R.J.: Patterning bacterial communities on epithelial cells. *PLoS One*, **8**, e67165 (2013)
20. Dwidar M., Monnappa A.K., Mitchell R.J.: The dual probiotic and antibiotic nature of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *BMB Rep.* **45(2)**, 71–78 (2012)
21. Dwidar M., Nam D., Mitchell R.J.: Indole negatively impacts predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* and its release from the bdelloplast. *Environ. Microbiol.* **17,** 1009–1022 (2015)
22. Evans K.J., Lambert C., Sockett R.E.: Predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 requires type IV Pili. *J. Bacteriol.* **189(13)**, 4850–4859 (2007)
23. Fenton A.K., Kanna M., Woods R.D., Aizawa S-I., Sockett R.E.: Shadowing the actions of a predator: backlit fluorescent microscopy reveals synchronous nonbinary septation of predatory *bdellovibrio* inside prey and exit through discrete bdelloplast pores. *J. Bacteriol.* **192(24)**, 6329–6335 (2010)
24. Findlay J.S., Flick-Smith H.C., Keyser E., Cooper I.A., Williamson E.D., Oyston P.C.: Predatory bacteria can protect SKH-1 mice from a lethal plague challenge. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019)
25. Gupta S., Tang C., Tran M., Kadouri D.E.: Effect of predatory bacteria on human cell lines. *PLoS One,* **11**, e0161242 (2016)
26. Harding C.J., Huwiler S.G., Somers H., Lambert C., Ray L.J., Till R., Taylor G., Moynihan P.J., Sockett R.E., Lovering A.L.: A lysozyme with altered substrate specificity facilitates prey cell exit by the periplasmic predator *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Nat. Commun.* **11**, 1–12 (2020)
27. Hobley L., Fung R.K., Lambert C., Harris M.A., Dabhi J.M., King S.S., Basford S.M., Uchida K., Till R., Ahmad R.: Discrete cyclic di-GMP-dependent control of bacterial predation versus axenic growth in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *PLoS. Pathog.* **8**, e1002493 (2012)
28. Hobley L., Summers J.K., Till R., Milner D.S., Atterbury R.J., Stroud A., Capeness M.J., Gray S., Leidenroth A., Lambert C.: Dual predation by bacteriophage and *Bdellovibrio bacteriovorus* can eradicate *Escherichia coli* prey in situations where single predation cannot. *J. Bacteriol.* **202**, e00629–19 (2020)
29. Iebba V., Santangelo F., Totino V., Nicoletti M., Gagliardi A., De Biase R.V., Cucchiara S., Nencioni L., Conte M.P., Schippa S.: Higher prevalence and abundance of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the human gut of healthy subjects. *PloS One*, **8**, e61608 (2013)
30. Im H., Choi S.Y., Son S., Mitchell R.J.: Combined application of bacterial predation and violacein to kill polymicrobial pathogenic communities. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017)
31. Im H., Son S., Mitchell R.J., Ghim C-M.: Serum albumin and osmolality inhibit *Bdellovibrio bacteriovorus* predation in human serum. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017)
32. Johnke J., Fraune S., Bosch T.C., Hentschel U., Schulenburg H.: *Bdellovibrio* and like organisms are predictors of microbiome diversity in distinct host groups. *Microb. Ecol.* **79**, 252–257 (2020)
33. Kadouri D.E., To K., Shanks R.M., Doi Y.: Predatory bacteria: a potential ally against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *PloS One*, **8**, e63397 (2013)

34. Kuru E., Lambert C., Rittichier J., Till R., Ducret A., Derouaux A., Gray J., Biboy J., Vollmer W., VanNieuwenhze M, et al.: Fluorescent D-amino-acids reveal bi-cellular cell wall modifications important for *Bdellovibrio bacteriovorus* predation. *Nat. Microbiol.* **2(12)**, 1648–1657 (2017)
35. Lambert C., Evans K.J., Till R., Hobley L., Capeness M., Rendulic S., Schuster S.C., Aizawa S-I., Sockett R.E.: Characterizing the flagellar filament and the role of motility in bacterial prey-penetration by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Mol. Microbiol.* **60(2)**, 274–286 (2006)
36. Lambert C., Ivanov P., Sockett RE.: A transcriptional "Scream" early response of *E. coli* prey to predatory invasion by *Bdellovibrio*. *Curr. Microbiol*. **60**, 419–427 (2010)
37. Lambert C., Lerner T.R., Bui N.K., Somers H., Aizawa S-I., Liddell S., Clark A., Vollmer W., Lovering A.L., Sockett R.E, et al.: Interrupting peptidoglycan deacetylation during *Bdellovibrio* predator-prey interaction prevents ultimate destruction of prey wall, liberating bacterial-ghosts. *Sci. Rep.* **6**, 26010 (2016)
38. Lerner T.R., Lovering A.L., Bui N.K., Uchida K., Aizawa S-I., Vollmer W., Sockett R.E.: Specialized peptidoglycan hydrolases sculpt the intra-bacterial niche of predatory *bdellovibrio* and increase population fitness. *PLoS Pathog.* **8(2)**, e1002524 (2012)
39. Lima I.F., Havt A., Lima A.A.: Update on molecular epidemiology of *Shigella* infection. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **31**, 30–37 (2015)
40. Linares-Otoya L., Linares-Otoya V., Armas-Mantilla L., Blanco-Olano C., Crüsemann M., Ganoza-Yupanqui M.L., Campos-Florian J., König G.M., Schäberle T.F.: Diversity and antimicrobial potential of predatory bacteria from the Peruvian Coastline. *Mar. Drugs*, **15**, 308 (2017)
41. Mahmoud K.K., Koval S.F.: Characterization of type IV pili in the life cycle of the predator bacterium *Bdellovibrio*. *Microbiology*, **156(Pt 4)**, 1040–1051 (2010)
42. Makowski Ł., Trojanowski D., Till R., Lambert C., Lowry R., Sockett R.E., Zakrzewska-Czerwinska J.: Dynamics of chromosome replication and its relationship to predatory attack lifestyles in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **85(14)**, e00730–19 (2019)
43. Marine E., Milner D.S., Lambert C., Sockett R.E., Pos K.M.: A novel method to determine antibiotic sensitivity in *Bdellovibrio bacteriovorus* reveals a DHFR-dependent natural trimethoprim resistance. *Sci. Rep.* **10**, 1–10 (2020)
44. Martínez V., Herencias C., Jurkevitch E., Prieto M.A.: Engineering a predatory bacterium as a proficient killer agent for intracellular bio-products recovery: the case of the polyhydroxyalkanoates. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016)
45. Monnappa A.K., Bari W., Choi S.Y., Mitchell R.J.: Investigating the responses of human epithelial cells to predatory bacteria. *Sci. Rep*. **6**, 1–14. (2016)
46. Monnappa A.K., Dwidar M., Mitchell R.J.: Application of bacterial predation to mitigate recombinant bacterial populations and their DNA. *Soil Biol. Biochem.* **57**, 427–435 (2013)
47. Mun W., Kwon H., Im H., Choi S.Y., Monnappa A.K., Mitchell R.J.: Cyanide production by *Chromobacterium piscinae* shields it from *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 predation. *mBio.* **8(6)**, 1–12 (2017)
48. Nair R.R., Vasse M., Wielgoss S., Sun L., Yuen-Tsu N.Y., Velicer G.J.: Bacterial predator-prey coevolution accelerates genome evolution and selects on virulence-associated prey defences. *Nat. Commun*. **10**, 1–10 (2019)
49. Odooli S., Roghanian R., Ghasemi Y., Mohkam M., Emtiazi G.: Predatory and biocontrol potency of *Bdellovibrio bacteriovorus* toward phytopathogenic strains of *Pantoea* sp. and *Xanthomonas campestris* in the presence of exo-biopolymers: in vitro and in vivo assessments. *Int. Microbiol.* **1**, 1–15 (2021)
50. Olanya O., Niemira B., Cassidy J., Boyd G., Uknalis J.: Pathogen reduction by predatory bacteria and survival of *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Escherichia coli* on produce and buffer treated with low-dose gamma radiation. *LWT,* **130**, 109630 (2020)
51. Ottaviani D., Pieralisi S., Angelico G., Mosca F., Tiscar P.G., Rocchegiani E., Scuota S., Petruzzelli A., Fisichella S., Blasi G.: *Bdellovibrio bacteriovorus* to control *Escherichia coli* on meat matrices. *Int. J. Food Sci.* **55**, 988–994 (2020)
52. Özkan M., Yılmaz H., Çelik M.A., Şengezer Ç., Erhan E., Keskinler B.: Application of *Bdellovibrio bacteriovorus* for reducing fouling of membranes used for wastewater treatment. *Turk Biyokim. Derg.* **43**, 296–305 (2018)
53. Pasternak Z., Njagi M., Shani Y., Chanyi R., Rotem O., Lurie-Weinberger M.N., Koval S., Pietrokovski S., Gophna U., Jurkevitch E.: In and out: an analysis of epibiotic vs periplasmic bacterial predators. *ISME J.* **8**, 625–635 (2014)
54. Patini R., Cattani P., Marchetti S., Isola G., Quaranta G., Gallenzi P.: Evaluation of predation capability of periodontopathogens bacteria by *Bdellovibrio Bacteriovorus* HD100. an in vitro study. *Materials,* **12(12),** 2008 (2019)
55. Rendulic S., Jagtap P., Rosinus A., Eppinger M., Baar C., Lanz C., Keller H., Lambert C., Evans K.J., Goesmann A, et al.: A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science*, **303(5658)**, 689–692 (2004)
56. Romanowski E.G., Gupta S., Pericleous A., Kadouri D.E., Shanks R.M.: Clearance of Gram-Negative Bacterial Pathogens from the Ocular Surface by Predatory Bacteria. *Antibiotics,* **10**, 810 (2021)
57. Romanowski E.G., Stella N.A., Brothers K.M., Yates K.A., Funderburgh M.L., Funderburgh J.L., Gupta S., Dharani S., Kadouri D.E., Shanks R.M.: Predatory bacteria are nontoxic to the rabbit ocular surface. *Sci. Rep.* **6**, 1–9 (2016)
58. Ruban-Osmiałowska B., Jakimowicz D., Smulczyk-Krawczyszyn A., Chater K.F., Zakrzewska-Czerwinska J.: Replisome localization in vegetative and aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **188(20),** 7311–7316 (2006)
59. Russo R., Kolesnikova I., Kim T., Gupta S., Pericleous A., Kadouri D.E., Connell N.D.: Susceptibility of virulent *Yersinia pestis* bacteria to predator bacteria in the lungs of mice. *Microorganisms*, **7**, 2 (2019)
60. Sathyamoorthy R., Kushmaro Y., Rotem O., Matan O., Kadouri D.E., Huppert A., Jurkevitch E.: To hunt or to rest: prey depletion induces a novel starvation survival strategy in bacterial predators. *ISME. J.* **15**, 109–123 (2021)
61. Saxon E.B., Jackson R.W., Bhumbra S., Smith T., Sockett R.E.: *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 guards against *Pseudomonas tolaasii* brown-blotch lesions on the surface of post-harvest *Agaricus bisporus* supermarket mushrooms. *BMC Microbiol.* **14,** 1–12 (2014)
62. Schoeffield A.J., Williams H.N., Turng B., Fackler W.A.: A comparison of the survival of intraperiplasmic and attack phase *bdellovibrios* with reduced oxygen. *Microb. Ecol.* **32(1)**, 35–46 (1996)
63. Seidler R.J., Starr M.P.: Factors affecting the intracellular parasitic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* developing within *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **97(2)**, 912–923 (1969)
64. Shanks R.M., Davra V.R., Romanowski E.G., Brothers K.M., Stella N.A., Godboley D., Kadouri D.E.: An eye to a kill: using predatory bacteria to control Gram-negative pathogens associated with ocular infections. *PLoS One,* **8**, e66723 (2013)
65. Shatzkes K., Chae R., Tang C., Ramirez G.C., Mukherjee S., Tsenova L., Connell N.D., Kadouri D.E.: Examining the safety of respiratory and intravenous inoculation of *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Micavibrio aeruginosavorus* in a mouse model. *Sci. Rep*. **5**, 1–12 (2015)

66. Shatzkes K., Singleton E., Tang C., Zuena M., Shukla S., Gupta S., Dharani S., Rinaggio J., Kadouri D.E., Connell N.D.: Examining the efficacy of intravenous administration of predatory bacteria in rats. *Sci. Rep.* **7,** 1–11 (2017)
67. Starr M.P., Baigent N.L.: Parasitic interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* with other bacteria. *J. Bacteriol.* **91(5)**, 2006–2017 (1966)
68. Stolp H., Starr M.P.: *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp.n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **29(1)**, 217–248 (1963)
69. Thomashow M.F., Cotter T.W.: *Bdellovibrio* host dependence: the search for signal molecules and genes that regulate the intraperiplasmic growth cycle. *J. Bacteriol.* **174(18)**, 5767–5771 (1992)
70. Thomashow M.F., Rittenberg S.C.: Intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J: solubilization of *Escherichia coli* peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **135(3)**, 998–1007 (1978)
71. Tudor J.J., McCann M.P., Acrich I.A.: A new model for the penetration of prey cells by *bdellovibrios*. *J. Bacteriol.* **172(5)**, 2421–2426 (1990)
72. Tyc O., Song C., Dickschat J.S., Vos M., Garbeva P.: The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends Microbiol.* **25(4)**, 280–292 (2017)
73. Waso M., Khan S., Singh A., McMichael S., Ahmed W., Fernandez-Ibanez P., Byrne J., Khan W.: Predatory bacteria in combination with solar disinfection and solar photocatalysis for the treatment of rainwater. *Water Res.* **169,** 115281 (2020)
74. Wen C., Xue M., Liang H., Zhou S.: Evaluating the potential of marine *Bacteriovorax* sp. DA5 as a biocontrol agent against vibriosis in *Litopenaeus vannamei* larvae. *Vet. Microbiol*. **173**, 84–91 (2014)
75. Willis A.R., Moore C., Mazon-Moya M., Krokowski S., Lambert C., Till R., Mostowy S., Sockett R.E.: Injections of predatory bacteria work alongside host immune cells to treat *Shigella* infection in zebrafish larvae. *Curr. Biol*. **26,** 3343–3351 (2016)
76. Wolanski M., Wali R., Tilley E., Jakimowicz D., Zakrzewska-Czerwinska J., Herron P.: Replisome trafficking in growing vegetative hyphae of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **193(5)**, 1273–1275 (2011)
77. Youdkes D., Helman Y., Burdman S., Matan O., Jurkevitch E.: Potential control of potato soft rot disease by the obligate predators bdellovibrio and like organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **86(6)**, 1–13 (2020)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2022, 61, 4, 179–190
DOI: 10.2478/am-2022-019

MICROBIALLY-PRODUCED ORGANIC ACIDS AS LEACHING AGENTS FOR METAL RECOVERY PROCESSES

Itzel A. Cruz-Rodríguez[1], Norma G. Rojas-Avelizapa[1]*, Andrea M. Rivas-Castillo[2]

[1]Laboratory of Environmental Biotechnology, CICATA-QRO-IPN
[2]Universidad Tecnológica de la Zona Metropolitana del Valle de México (UTVAM)

Received in December 2021, accepted in July 2022

Abstract: Minerals have been important throughout history, but nowadays, their use has increased, as well as their extraction needs. Therefore, due to the growing demand for metals, and both the depletion of high-grade ores and their related environmental concerns, the mining industry has been forced to leave behind the past traditional techniques of metal recovery (use of inorganic acids), and adopt eco-friendlier alternatives, such as the utilization of weaker leaching agents, such as organic acids. Thus, the present review is focused on the use of microbially-produced organic acids as a promising alternative to conventional techniques in the mining industry, with emphasis on the following topics: a) the advantages and disadvantages of the use of organic acids for leaching purposes, b) the main microorganisms studied for the production of these organic acids, c) a summary of the latest reports on bioleaching as well as a comparison of the existent techniques; d) the explanation of leaching mechanisms where organic acids may be involved, to fulfill metal recovery; and, e) interactions between metallic ions and organic acids. The review of the current knowledge regarding the use of organic acids for leaching purposes seeks the visualization of relevant strategies that may be improved for metal-recovery processes, intending to develop circular economy practices that may have the potential to be implemented at an industrial scale.

1. Introduction. 2. Generalities of organic acids (OA). 2.1. Advantages and constraints of using organic acids (OA) for leaching purposes. 2.2. Obtention methods of organic acids. 3. Comparison between bioleaching techniques. 4. Recommendations to establish successful bioleaching process using microbial produced OA. 4.1. pH and temperature. 4.2. Pulp density. 4.3. Matrix. 5. Bioleaching mechanisms using organic acids. 5.1. Acidolysis and complexolysis. 5.2. Redoxolysis. 5.3. Interactions between organic acids (OA) and metals. 6. Summary

Keywords: bioleaching, biological synthesis, metal recovery, microbial processes, organic acids

1. Introduction

The use of minerals is of common relevance in daily life, which can go from eating foods rich in some specific elements or compounds to powering every single electronic device at home, considering in between a high number of applications [61]. Indeed, ancient civilizations realized the importance of minerals, giving birth to many mining techniques that have been modified, improved, and explored until nowadays; mining represents an important economic activity for many countries. In 2016, 903 billion United States Dollars (USD) were earned by the top 20 metal-producing countries, which are: China, Australia, United States, India, Russian Federation, South Africa, Indonesia, Brazil, Canada, Chile, Peru, Kazakhstan, Mexico, Germany, Poland, Turkey, Colombia, Congo Democratic Republic, Ukraine, and Ghana [25]. Being mining industry of enormous importance for socio-economical concerns, the processes for mineral extraction have put aside the environmental impact over the years, as most of the anthropogenic actions have done [80].

Both environmental and social impacts of mining activities may vary depending on the characteristics of the mining site and the type of ore therein [83], and such environmental consequences can be reflected at all the trophic levels, causing: a) loss of ecosystems, even preservation areas (fauna and flora); b) soil acidification, which ends up in the loss of agricultural fields; c) pollution problematics related to water and atmosphere, due to contamination by metals; and finally, d) health problems in humans [33, 64, 83].

Besides these environmental issues, mining is facing other challenges, like the depletion of high-grade mineral deposits [7, 98], which makes harder (or even useless) the metal extraction processes commonly employed. Thus, the future of the mining industry, as we know it, seems troublesome. Currently, it is vital to employ greener processes to help the achievement of results while diminishing environmental and health impacts [60, 67]. Therefore, sustainable actions in different fields, such as extraction processes, are evidently supported in various countries like Australia and Canada [53], where biomining is gaining force, being

* Corresponding Author: Norma G. Rojas-Avelizapa, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN, Unidad Querétaro. Cerro Blanco 141 Col. Colinas del Cimatario, C.P. 76090, Querétaro, Qro., México; phone: 442 229 0804; e-mail: nrojasa@ipn.mx
© 2022 Itzel A. Cruz-Rodriguez et al.
This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

successfully used for the extraction of several metals (Co, Cu, Ni, and Zn). In this respect, it has been reported that the 20% of Cu world production comes from the heap or the stockpile bioleaching [31].

Additionally, the main way to obtain mineral resources over the years, until now, has been through mining extraction activities. However, such activities seem to be attached to a clock due to new regulations around the world, which are demanding to diminish environmental impacts; consequently, ways to obtain metals are no longer focused exclusively on mining, but also in their recoveries through other sources, like e-wastes [9, 26, 27, 37, 54, 57, 60] or industrial residues, such as spent catalysts [8, 20, 40, 50, 59, 71, 81]. Regarding traditional mining techniques, pyrometallurgy is mainly used in high-grade ores [14, 42], leaving aside the low-grade deposits due to cost issues. These latter ores represent a new challenge, inciting the appearance of novel processes, such as hydrometallurgy, which can be employed even if the mineral amounts are low [14]. Therefore, hydrometallurgy represents an opportunity not only for low-grade ores but also for recycling processes.

Leaching processes in extractive metallurgy have usually employed inorganic acids (IA) due to their relatively low costs [16, 52]; however, these are not the only leaching agents. Chelating agents like diethylenetriamine pentaacetate (DTPA), ethylendiamine tetraacetate (EDTA), and nitrilotriacetic acid (NTA) have shown good efficiencies. Regrettably, they are not considered biodegradable, due to the environmental effects they may cause, especially when there are leakages into the ecosystems [34, 47, 86]. If well, there are other alternatives like alkaline leaching [9, 39, 54], this technique needs additional leaching steps using other acidic lixiviants in order to extract metals like Cd and Cu, making the processes more complicated and expensive [47]. In the look of more sustainable options, there has been studied the use of organic acids (OA) for leaching purposes, like oxalic, citric, malic, and succinic acids, among others [60, 86], and are reported to be less toxic to many biological communities than IA, apparently, because of the complexing capability they present. This complexing characteristic allows the reduction of metal concentrations that may be considered toxic. Also, OA are much easier to dispose and are biologically degradable [10]. Therefore, this review is focused on the use of microbially-produced OA as a promising alternative to conventional techniques for metal extraction in the mining industry and the recovery of metals from industrial residues.

2. Generalities of organic acids (OA)

OA are low-molecular-weight carbon compounds capable to form complexes with various elements [10]. Their structure is composed of carboxylic groups (-COOH). They consist of aliphatic monobasic carboxylic acids, from formic acid up to the C18 acids [43]. It is known that they are thermally stable, leave no negative impacts on the environment, and usually form strong chelates [22]. It has been reported that there are two forms to classify OA, and this classification can be according to their molecular weight or the number of carboxylic groups. In the first case, they can be of low-molecular-weight OA (LMWOA), if they have five carbons or less, or high-molecular-weight OA (HMWOA) if they have more than five carbons [6]. Examples of LMWOA include acetic, fumaric, oxalic, citric, and tartaric acids; they are found in milimole concentrations in soil, and those amounts are higher in the rhizosphere than in bulk soil [86]. Regarding HMWOA, it is known that they are also present in the soil; however, their content is still undefined. Most HMWOA are referred to as humic and fulvic acids. Both LMWOA and HMWOA possess the capability to form complexes [15]. Therefore, OA have been widely used as additives in foods, and for metal detoxification, which refers to the ability to control the solubility of heavy metals by complex reactions or chelation [72].

2.1. Advantages and constraints of using organic acids (OA) for leaching purposes

The use of OA is versatile due to their characteristics. One of them is their ability to inhibit microbial growth [12]; OA like acetic, lactic, and propionic acids, and their mixtures, have shown bacteriostatic and bactericidal properties [79]. These properties have been exploited by the food industry, by incorporating them as food additives or preservatives. Nowadays, bactericidal activity has been implemented in polymeric films used as food packaging [12]. Besides their antimicrobial activity, some of the OA are also known for their chelating properties and their biodegradability. These characteristics boosted the implementation of them as leaching agents. Table I shows the main differences between OA and IA.

2.2. Obtention methods of organic acids

Naturally, LMWOA are released by root exudation, organic matter decomposition in soils, and the production of microbial metabolites. Oxidative stress, high levels of Pb and Fe, as well as low concentrations of Ca and P, promote higher rates of OA from roots [86]. OA can be also chemically synthesized by oxidation of alcohols, carboxylation of alkenes, or hydrolysis of esters [19]; however, their synthesis has not been suitable for large-scale production because the raw material needed for their obtention is expensive and yields are low. Hence, microbiological production becomes an important economic alternative for the chemical production of OA [10].

Table I
Comparison of the reported characteristics of organic and inorganic acids in leaching processes

Organic acids (OA)	Inorganic acids (IA)	References
Less emission of hazardous gases	High emission of sulfur, chloride, and nitrous oxides	[35]
Serve for soil nutrient acquisition, mineral weathering	Can lead to high consumption either of water or chemicals	[29]
Less risky manipulation during the process.	Risky manipulation during the process.	[82]
Biodegradable	Non-biodegradable	[20, 35]
Delay the corrosion of equipment	Cause prompt corrosion of equipment	[82]
Can be used more than once in metal recovery processes	Cannot be reused in metal recovery processes	[35]
Are costlier than IA, but the process is considered cost-effective due to the environmental impact	Have low cost, but the process is not considered cost-effective due to environmental impact	[37]
Solely act as leaching agents; hence, separation nd purification are still needed	Solely act as leaching agents; hence, separation and purification are still needed	[35]

2.2.1. Biological synthesis of organic acids

OA are building-block chemicals that can be produced by microbial processes, besides chemical synthesis. Biological synthesis of OA is possible because most of them are natural products of microorganisms or intermediates in major metabolic pathways [85]. OA are formed mostly through microbial fermentation, and to do so, either carbohydrates or related substrates are used; many anaerobic and facultative microorganisms can produce OA during fermentation processes [68]. In general, the biological production of OA for bioleaching purposes has been focused on citric, malic, oxalic, and gluconic acids.

Important contributions have been made on this subject by studying OA-producing microorganisms such as *Aspergillus* species [11, 28, 45, 66, 75, 89, 91]; *Penicillium* species [3, 22, 46, 73, 76, 94, 100]; fungal consortia [44, 62, 69, 77, 93]; and bacteria like *Enterobacter aerogenes* [30].

Although it is known that several microorganisms possess the ability to produce this kind of compounds, like the 64 strains of Ascomycota and Basidiomycota reported by Liaud et al., [56], authors like Deepatana & Valix [21] report that *Aspergillus* and *Penicillium* have been preferred as OA bio-fabrics, mainly because of their ability to produce high amounts of these metabolites [58], which makes them microorganisms of relevance for this purpose.

3. Comparison between bioleaching techniques

Bioleaching using OA is still considered a new subject. According to Clarivate Analytics, during the last 5 years the total amount of articles published, including early access articles related to this subject, were 18 (Fig. 1), and doing a broader search from 1980 to 2021, a total of 42 publications were found.

Bioleaching studies reported to date employed diverse techniques for the production of relevant metabolites related to these processes, including OA. These analyses, performed under different conditions, assessed how this metabolite production affects the recovery of metals, in both one-step [4, 5, 58, 65] and two-step [95] direct bioleaching processes (microorganisms and matrix together); and in indirect methodologies (produced metabolites and matrix) [4, 5, 58, 65].

Considering the reports found, it seems that two-step bioleaching (where the microorganism is incubated a few days before being in contact with the matrix) reduces the toxic effects produced by spore germination and fungal growth, and accelerates the bioleaching process in comparison to the one-step methodology (where both microorganism and matrix are incubated at the same time) [95]. Additionally, it has been stated that an increasing pulp density, with both one-step and two-step techniques, results in a decrease of efficiency, which can be attributed to growth inhibition by metal toxicity, affecting metabolite production [74]. Finally, spent-medium techniques (indirect

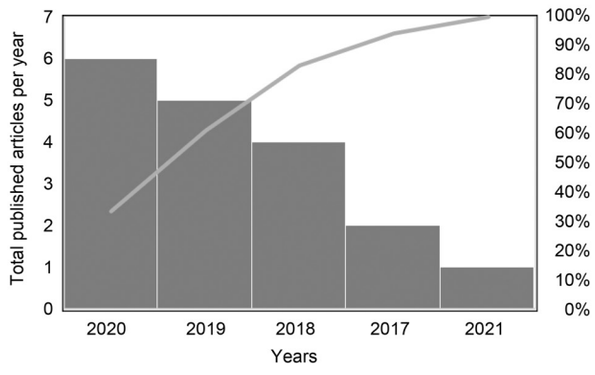


Fig. 1. Published articles from 2017 to 2021 related to bioleaching with OA

Data was taken from Clarivate Analytics in 2021; keywords used for this search were organic acids, bioleaching, metal recovery, and fungi.

Table II
Bioleaching at laboratory scale for metal recovery from industrial wastes using OA-producing microorganisms

Microorganisms	Leaching agent (mg/L)	Temperature (°C)	Time (days)	RPM	Pulp density % (w/v)	Recovery (%)	References
Mixed fungal cultures: *Purpureocillium lilacinum* (71.9%) and *Aspergillus niger* (27.9%) were dominant species. Others (0.2%) include: *Pseudallescheria* sp., *Malassezia obtuse*, *Tomentella* sp., *Davidiellaceae* sp., *Talaromyces* sp., *Fungi* sp., *Herpotrichiellaceae* sp., *Meyerozyma guilliermondii Wickerhamomyces anomalus*, and *Malassezia furfur.*	Oxalic 1022.4 Citric 5533.2 30 Gluconic 894.6	30	27	300	8	56.1 Cu 15.7 Al 20.5 Pb 49.5 Zn 8.1 Sn	[93]
Aspergillus niger	Citric 8131, 8064 Oxalic 1095, 973 Malic 1212, 1086 Gluconic 2065, 2153	Room temperature	21	120	0.092	98.57 Zn 43.95 Ni 64.03 Cu	[94]
Aspergillus niger	Less than 14000 of gluconic acid, less than 4000 of citric and oxalic acid, less than 3000 of malic acid	30	30	130	1	100 Li 94 Cu 72 Mn 62 Al 45 Ni 38 Co	[11]
Penicillium simplicissimum	Citric 5237 Gluconic 3666 Oxalic 1287 Malic 188	30	15	130	1	100 V 40 Ni	[76]
Kombucha-consortium (the bacterium *Komagataeibacter hansenii*, and the yeast *Zygosaccharomyces lentus*)	Gluconic 25500 Acetic 9608	Room temperature	14	300	2.8	(stationary bioleaching) 5.2 of REE* (shaken-mode bioleaching) 7.9 of REE	[44]
Aspergillus niger	Oxalic 17185 Gluconic 4539 Citric 1042 Malic 502	60	7	130	9	83 V 30 Ni	[75]
Aspergillus niger	Gluconic 2126 Malic 1251 Oxalic 1170 Citric 8078	30	30	130	2	69.8 Al 60.0 Ti 25.4 Fe	[89]

*REE, Rare Earth Elements.

biolixiviation) are limited by the content of metabolites produced in relation to pulp density; therefore, optimization of metabolite production is a key factor for increasing efficiencies [17].

More specific results from the last 5 years of direct and indirect bioleaching with OA, at a laboratory scale (mainly fungi), are shown below. Studies about industrial wastes (Table II), ores (Table III), and catalysts (Table IV) were included in these results; considering all of them, the following points can be observed: a) most of the work related to metal recovery has been performed regarding residues, rather than ores; b) concentrations of the OA obtained from the microorganisms (mainly fungi) were low, mostly milimole, comparing with concentrations normally used in leaching with commercial reagents; c) depending on the matrix composition, the percentage of elements recovered varied; however, matrices with Cu, Zn, Li, Ni, and V content reached recovering percentages from 50–100% (w/v) of each element. Overall, it can be concluded from these studies that, besides getting low OA concentrations, positive results can be achieved when using OA for bioleaching purposes, making it a promising technology, especially for recycling processes.

Table III
Bioleaching at laboratory scale for metal recovery from ores using OA-producing microorganisms

Microorganisms	Leaching agent (mM)	Temperature (°C)	Time (days)	RPM	Pulp density (% w/v)	Recovery (%)	References
Enterobacter Aerogenes	Mixture of malic, gluconic and acetic acids < 18 for both direct and indirect bioleaching	30	18	120	1	(direct bioleaching) 2.55 Ce 0.57 La 0.36 Nd	[30]
					2	(indirect bioleaching) 0.66 Ce 0.16 La 0.12 Nd	
Aspergillus sp.	Non-characterized supernatant	37	20	150	2	79 Mn	[65]

Table IV
Bioleaching at laboratory scale for metal recovery from catalysts using OA-producing microorganisms

Microorganisms	Leaching agent (mM)	Temperature (°C)	Time (days)	RPM	Pulp density (% w/v)	Recovery (%)	References
Gluconobacter oxydans	Gluconic < 30	30	1	150	1.5	RPP* maximum 2% of REE**	[77]
						FCC*** catalyst 49% of total REE	
Alternaria alternata	Not reported	30	2	150	1	8285.3 mg/kg V 6662.0 mg/kg Al 4973.8 mg/kg Si 3990.2 mg/kg Mo 177.7 mg/kg Mg 118.2 mg/kg Fe	[81]
					5	29.9 mg/kg As 9872.7 mg/kg Al 6839.0 mg/kg Si 2115.8 mg/kg Mo 1903.0 mg/kg V 279.6 mg/kg Mg	
Aspergillus niger	Citric and Gluconic < 98	30	60	130	1	3% La	[66]
					3	52% La	
					5	33% La	

* RPP, Retorted phosphor powder; ** REE, Rare earth elements; *** FCC, Spent fluid catalytic cracking

4. Recommendations to establish successful bioleaching process using microbial produced OA

Bioleaching processes involving OA can be done using either bacteria or fungi; however, as mentioned before, most of the studies to date are focused on *A. niger* or *Penicillium* spp. [21], mainly because of the following advantages that fungi present: a) fungi like *A. niger* can grow under alkaline pH, so alkaline residues can be treated; b) fungi-leaching processes are considered to be faster than bacterial ones due to the shorter lag phase presented by fungi; and, c) most fungi have the ability to excrete lixiviants, like OA, through Krebs Cycle. Nonetheless, fungal leaching is costlier than bacterial leaching [92].

Concerning OA bioleaching there can be found studies focused either on exploring the ability of some microorganisms for metal recovery (mainly fungi) through different bioleaching techniques or optimizing metal recovery processes. Regarding optimization, it can be done by finding the right parameters to operate the bioleaching processes, like temperature, agitation, pulp density, among others, or even by using genetically modified microorganisms. From the authors that have explored optimization, Amiri et al. [4] achieved the recovery of 99.5% Mo, 45.8% Ni, and 13.9% Al; Biswas

& Bhattacharjee [17] obtained 70.49% Ni and 66.93% Co, while Mafi Gholami et al. [58] reported the recovery of 71% Co, 69% Mo, and 46% Ni. Unfortunately, the results obtained in many bioleaching studies are hard to compare, due to the differences in the techniques employed (direct or indirect bioleaching); the diversity in the evaluation of the parameters, like matrices (ore, industrial residues, etc.) used; and growth conditions for the microorganisms; which all may influence metabolite production. In this regard, Amiri et al. [4] and Amiri et al. [5] stated that the ability of some microorganisms to produce OA as metabolites is not enough to use them for bioleaching purposes, because it is necessary to consider that their metabolite production will be influenced by the pH, the temperature of incubation, the balance amounts of C, PO_4^{3-}, and N (which are essential compounds of the medium), the pre-culture period, the concentration of the inoculum used, the pulp density, the bioleaching period, etc., besides the metallic charge of the matrix and the intrinsic metal resistance of the microorganisms used (in case of direct bioleaching) [96]; each one of these points will be explained below in a deeper way.

Medrano et al. [36] mentioned that to establish a successful bioleaching process, it is basic to understand the specific characteristics of the pre-culture medium, inoculum, growth of the microorganism used, and its resistance to metal ions; specifically, this latter property will allow deciding whether direct or indirect bioleaching is the most appropriate. For example, some pre-culture conditions may help to increase the efficiency of the process due to the cell density, so metabolite production may begin before being in contact with the matrix. This is profitable for the microorganism, as it could result in a decrease of the toxicity caused by the metal charge [96].

4.1. pH and temperature

The pH of the medium will provide conditions for the mechanisms of acidolysis (acid) and complexolysis (alkaline). As to temperature, evaluated by Musariri [67], and Zhou [99], it can be observed that specifically for indirect bioleaching or leaching (no microorganism involved), an increase in temperature helps to improve metal recovery and may diminish the time of the processes. For direct bioleaching, the temperature must be inside the optimum range for microbial growth [36].

4.2. Pulp density

The use of high pulp densities is feasible for indirect bioleaching, also known as spent media, where the matrix is in the presence of the metabolites without the microorganism. If bioleaching is direct, the metallic charge in the system may lead to toxicity that affects culture growth and, hence, metabolite production may be inhibited [96], as has been mentioned before. Authors like Ning et al. [55] and Li et al. [70] evaluated the effect of pulp densities for spent Li-ion batteries, while Zhou et al. [99] used light-emitting diodes (LEDs) for the same purpose. All of them reported that high pulp densities affected metal-recovery efficiencies. Additionally, they stated that low pulp densities reduce the contact area between the matrix and the lixiviant, facilitating bonds between them [99].

4.3. Matrix

The bioleaching process will always be influenced by the matrix. The content of the matrix can be in insoluble phases, and minerals could be completely encased, causing incomplete digestion [48]. Rene et al. [78] mentioned that, for bioleaching purposes, it is necessary that the bonds between metal ions and ligands are stronger than the bonds between metal ions and solid particles. Besides, the particle size of the material is also important, as Mazurek et al. [59] found that reductions of the particle size, ~180–250 μm, increased V recovery, and sizes under that range did not significantly affect V leaching but produced better results for K and Fe. Moreover, Gu et al. [41] reported that large surface-to-volume ratios accelerated the reaction rate, where 45 μm was found as the optimum particle size to improve metal recovery.

5. Bioleaching mechanisms using organic acids

Several authors, like Ilyas et al. [49], Mishra et al. [63], Rene et al. [78], Srichandan et al. [87], Vakilchap et al. [89], and Wu & Ting [92] reported the existence of four different mechanisms during bioleaching processes, which help to solubilize metals: acidolysis, complexolysis, redoxolysis, and bioaccumulation [49, 63, 78, 87, 89, 92]. Qu et al. [74], Qu & Lian [73], and Rasoulnia et al. [76] indicated that acidolysis is the most important and main mechanism for bioleaching [73, 74, 76]. Rasoulnia et al. [76] highlighted that the OA produced by microorganisms are part of both complexolysis and redoxolysis mechanisms, while the amino acids present in the spent medium will perform complexolysis [76]. Regarding metal bioaccumulation in fungi, it is known that the mycelium takes an important part in it, by acting as a sink for the metal ions present in the medium.

5.1. Acidolysis and complexolysis

The OA produced by fungi are metabolites of relevant interest for diverse processes in the food industry, cosmetic industry as well as recovery of metals. When

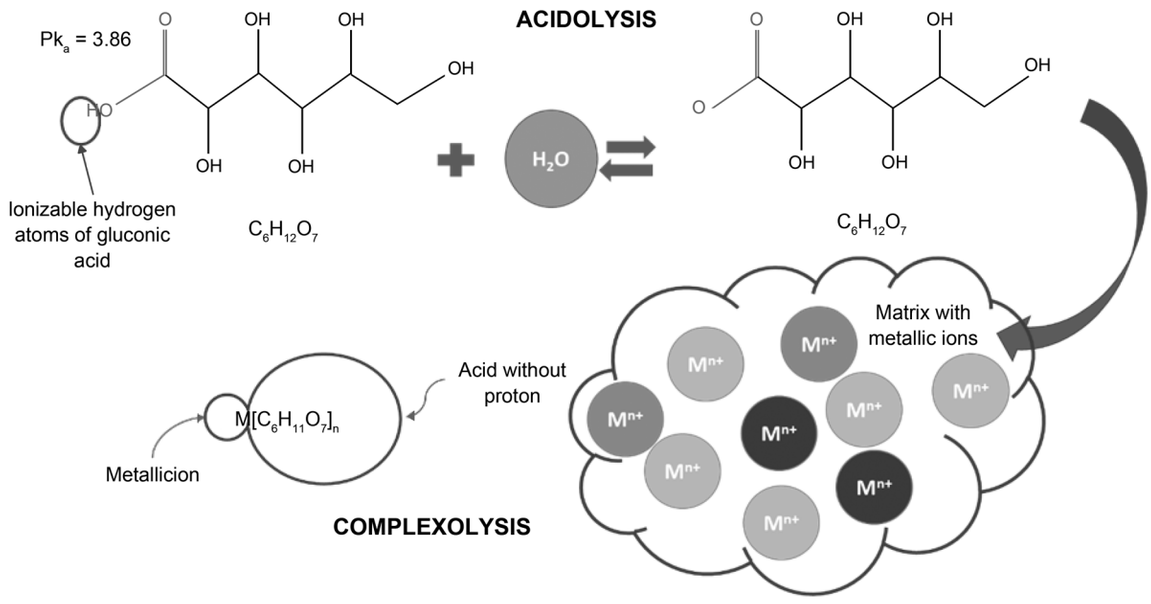


Fig. 2. Acidolysis and complexolysis mechanisms during metal extraction processes

these microorganisms excrete OA in metal-recovery processes, the hydrogen ions of the OA start to decrease the pH (acidolysis), occurring later the formation of metal complexes (complexolysis), until the OA are consumed, causing then a pH increment [11]. Therefore, protons participate in acidolysis while anions in complexolysis [66, 89], allowing to get almost a complete dissociation of the OA. Consequently, it can be presumed that if one mole of OA dissociates, like of gluconic, oxalic, or citric acids, there will be produced 1, 2, and 3 moles of protons, respectively [4]. Rasoulnia & Mousavi [75] complemented this information by emphasizing that, during all the direct bioleaching processes, the number of protons will vary depending on the ability of each microorganism to produce metabolites under specific stress conditions.

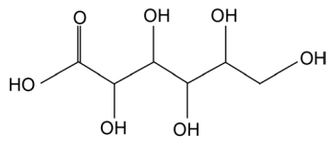
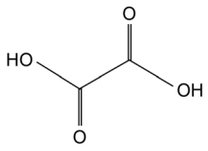
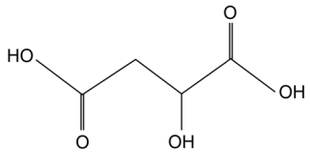
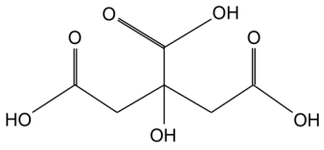
It has also been mentioned that acidolysis and complexolysis may be considered as the foremost mechanisms involved in fungal leaching processes, especially with solid wastes, being both processes highly dependent on the pH value of the system [75]. Regarding the reaction speed of both mechanisms, Rasoulnia et al. [76] reported that acidolysis is faster than complexolysis. Moreover, there has been stated that metal ions solubilized during acidolysis will be stabilized in complexolysis [11]. Figure 2 illustrates both acidolysis and complexolysis mechanisms.

As it can be observed, the acidolysis mechanism acts by liberating protons to the medium, around the surface of the metallic compound, once they are in contact with water. Later, metals are separated from the surface of the compound [7, 74]. Rene et al. [78] explained that protons excreted during acidolysis weak the metal-ion bonds, causing the metal to go into solution, and that to guarantee successful leaching, it is necessary that the bonds metal ions-OA are stronger than those of metal ions and solid particles from the matrix, to achieve either bioleaching or leaching processes [78].

Regarding complexolysis mechanism or ligand-induced metal solubilization, Amiri et al. [4] mentioned that it comprises the solubilization of metal ions, due to the complexing capabilities of molecules, by complex formation or chelates [45]. Complexation depends on the concentration of metals and anions in the solution, as well as the pH and the stability constants of complexes [11]. OA are bound to complexolysis mechanism by their carboxylic groups; thus, chelating agents can form soluble complexes with certain metallic ions such as Cu, Fe, Pb, Mn, and Ca [32]. Horeh et al. [45] gave examples of some OA complexes, including oxalic acid with Al, Fe, and Mg; citric acid with Mg and Ca, and tartaric acid with Fe, Ca, Si, Mg, and Al.

Chelate formation occurs due to an equilibrium reaction that can proceed in forward and backward directions; besides, it will depend on both the dissociation constants (acid strength in solution) and the stability constants (the relation between the chelated metallic ion and the free metallic ion), which will change along with pH variations in the medium. Regarding pH, it is known that chelates can lose stability in mediums with low pH (2–3) or high pH (10–12) [2]. Stability constants play a key role to understand the chelation order in complex matrixes, where the first chelate to be formed will only be the one with the highest tability constant; thus, the highest stability constant will always displace the lowest. Moreover, if there exists an excess of a chelated agent, other chelates with different elements can be formed, too. Otherwise, the

Table V
Reactions involved in acidolysis and complexolysis mechanisms for metal recovery

Organic acid	Acidolysis reactions	pK_a	Complexolysis reactions
Gluconic 	$C_6H_{12}O_7 \rightarrow C_6H_{11}O^-_7 + H^+$	3.86	$n[C_6H_{11}O^-_7] + M^{n+} \rightarrow M[C_6H_{11}O_7]_n$
Oxalic 	a) $C_2H_2O_4 \rightarrow C_2HO^-_4 + H^+$ b) $C_2HO^-_4 \rightarrow C_2O_4^{2-} + H^+$	1.25 4.14	a) $n[C_2HO_4^-] + M^{n+} \rightarrow M[C_2HO_4]_n$ b) $n[C_2O_4^{2-}] + M^{n+} \rightarrow M_2[C_2O_4]_n$
Malic 	a) $C_4H_6O_5 \rightarrow C_4H_5O_5^- + H^+$ b) $C_4H_5O_5^- \rightarrow C_4H_4O_5^{2-} + H^+$	3.40 5.11	a) $n[C_4H_5O_5^-] + M^{n+} \rightarrow M[C_4H_5O_5]_n$ b) $n[C_4H_5O_5^{2-}] + M^{n+} \rightarrow M_2[C_4H_4O_5]_n$
Citric 	a) $C_6H_8O_7 \rightarrow C_6H_7O_7^- + H^+$ b) $C_6H_7O_7^- \rightarrow C_6H_6O_7^{2-} + H^+$ c) $C_6H_6O_7^{2-} \rightarrow C_6H_5O_7^{3-} + H^+$	3.09 4.75 6.40	a) $n[C_6H_7O_7^-] + M^{n+} \rightarrow M[C_6H_7O_7]_n$ b) $n[C_6H_6O_7^{2-}] + M^{n+} \rightarrow M_2[C_6H_6O_7]_n$ c) $n[C_6H_5O_7^{3-}] + M^{n+} \rightarrow M_3[C_6H_5O_7]_n$

metallic ion-chelate agent with the highest stability constant will precipitate, while the other metallic ion-chelate agent will dissolve [90]. Besides, some metals are more sensitive to the formation of chelates than others, which is relevant for metal recovery. A preference to form chelates has been observed on elements that have a biogeochemical meaning, like Fe, Co, Mn, Cu, and Zn [84]. In addition, Rasoulnia et al. [76] recommend that, for the complexolysis to occur, the metal ion needs to be previously solubilized (acidolysis mechanism) [75].

Below (Table V) are shown the reactions of the most studied OA (gluconic, oxalic, malic, and citric acids) in bioleaching processes, including both acidolysis (liberation of protons and pKa values) and complexolysis (OA^- metallic complex formation) mechanisms, previously reported, where Mn^+ and M represent the metal ions [28, 74].

5.2. Redoxolysis

In redoxolysis, metals are mobilized from the matrix through oxidation and reduction reactions [11], by generating a direct electron transfer from metallic ions to microorganisms through the oxidation of Fe^{2+} to Fe^{3+}. This process depends directly on the redox potential present in the medium [24]. In microorganisms, part of this mechanism acts by shifting the oxidation-reduction potential of the growth medium [23]. The reduction of metal ions occurs in acidic environments [7]. As to metal mobility, this will augment according to the metallic ion and its oxidation state [87].

As it can be inferred from the information above, many possible bioleaching mechanisms may work simultaneously during direct bioleaching, and this fact is in agreement with the information presented by Bahaloo-Horeh et al. [11], who mentioned that the three mechanisms: acidolysis, complexolysis, and redoxolysis can occur concurrently. In the case of indirect bioleaching, which only involves metabolite production, it does not entail bioaccumulation due to biomass, because it is not present during the process.

5.3. Interactions between organic acids (OA) and metals

Most of the explanations given by researchers about OA and metals rely on the function of a broad range of mechanisms, and they also point out the variability of the extraction efficiencies, like in the case of Geng et al. [38], who found that high amounts of OA influence the diversity and concentrations of metals that can be recovered. However, little is known about the specific behaviors of OA with specific metal ions. The difficulty to understand these behaviors can be caused by the inherent complexity of the processes, which depend on many factors, such as the antagonistic effects between elements, the chemical form of metals, the properties of the matrix where metals are embedded, the application of pretreatment methodologies [18], and the

leaching time (some OA require more time to dissociate hydrogen ions) [51].

In general, OA are known to get complexed with heavy metals, and their extraction ability is related to the number of hydroxyl and carboxyl groups, as it is known that OA with two or three carboxylic groups can form chelates with structures of 5 or 6 rings [38]. Ji et al. [51] emphasized that, theoretically, OA would be expected to have better results than IA, due to both their acidity and complexing abilities; besides, these characteristics could affect the saturation of leaching solutions or could change the speciation of metal ions, meaning that metals could become less toxic. However, OA are still weak acids and, in practice, their efficiencies are lower than the ones obtained with IA.

Regarding matrix behaviors, Banerjee et al. [13] mentioned that, in matrices such as coal ashes, elements such as Al, Si, Fe, Ca, and Mg are present in the form of aluminosilicates, and the recovery of the metals contained therein is strongly related to the type of leaching agent used; that is, the leaching behaviors of IA and OA are different. In the first scenario, IA either destroy or dissolve mineral phases almost completely, contrary to OA, which can barely break them. Therefore, mineral phases are rarely leached in the latter case, and greater selectivity is achieved with the use of OA.

Citric and malic acids have been reported to promote high leaching efficiencies, especially for the mobilization of Cu, which can be attributed to the complex formation [38, 88, 97]. Additionally, positive results have been also obtained with Cd, Cu, and Pb using citric and malic acids [1], where Cu was the metal most highly recovered, being this recovery of around 36% with citric acid and 39% with malic acid; there was also achieved almost 65% of Cd recovery with oxalic acid.

Malic and citric acids achieved heavy Rare Earth Elements (REE) recoveries of around 30 to 37.5%. However, contrasting results have also been obtained in some cases, like the ones reported by Banerjee et al. (2021), who evaluated the leaching capabilities of five OA: tartaric, citric, lactic, malonic, and succinic acids (commercial reagents), for the recovery of REE, and for Al, Si, Fe, Na, Ca, and Mg, as well [13]. In this study, results showed that the highest leaching efficiency was found when tartaric acid was used, followed by the one obtained with lactic acid. As to the other OA evaluated (succinic and malonic acids), they achieved the lowest recoveries of REE. It was not expected that both tartaric and lactic acids could present better results than citric acid, because citric acid has usually been reported with the best metal-removal efficiencies, and the common way to explain the potential for metal removal of citric acid relays on the total number of carboxylic groups present in the structure of this organic acid (three carboxylic groups). So, this has been one of the explanations given to understand why citric acid has got the highest efficiencies among other OA (with less than three carboxylic groups). Therefore, the results of the latter study described raised more questions and set the precedent that the use of OA for bioleaching processes still needs further study. Thus, under the right conditions, OA could be a potential alternative to IA use at an industrial scale for metal-recovery processes, either when they are used as individual leaching agents or as a complex mixture of various OA when they are biologically produced.

On the other hand, oxalic acid strongly acidifies the leaching medium; therefore, it can facilitate the mobilization of some metals, like Zn, through an acidolysis mechanism [28], or of other metals present in matrices as waste printed circuit boards (WPCB). Additionally, it is known that oxalic acid can help the formation of oxalates in most bio-leaching cases that involved a variety of metals in the matrix. In this regard, authors have reported the formation of oxalates with metals like Cd, Cu, and Pb from soil polluted with metals [1], Ni, and Cu from WPCB [28], and REE from calcination product of a coal coarse [51]. The study published by Ji et al. 2020 also evaluated the potential of some OA to leach REE, where malonic and oxalic acids were evaluated as lixiviants, among other OA; it was found that both OA produced low metal recoveries. Thus, it was suggested by the authors that the low recoveries obtained by malonic and oxalic acids could be due to similarities in their molecular structure; however, this was not studied in deeper detail [51].

As it was mentioned through this document, the mechanisms involved in the recovery of metals will vary depending, first, on the bio-leaching process, and second, on the lixiviant used. Mechanisms as acidolysis, complexolysis, and redoxolysis are expected to happen in both direct and indirect bioleaching with OA, where acidolysis will occur first, and then complexolysis. Regarding the lixiviant, results have shown that all OA will have a different impact on metal-recovery efficiencies and will show some preferences for certain metallic ions, like in the case of citric and malic acids, which appear to have a preference for Cu. However, further studies are necessary to understand in which cases (depending on the matrix and metallic content) a specific OA or a mixture of OA is more appropriate for metal recovery. This could improve efficiencies or even help with metal selectivity, and furthermore, the use of OA would be eco-friendlier.

6. Summary

To the knowledge of the authors, there are not currently available deeper studies that explain the synergistic reactions among microbially-produced OA. Therefore,

research about OA mixtures and how their proportions may influence metal-recovery, results is an area of opportunity. As to reaching high efficiencies that could compete with IA, the following steps are suggested: a) first, the selection of the microorganism to use is crucial, being the ideal microorganism the one that naturally possesses high yields of OA production; b) later, the microorganism could even be genetically modified, to boost OA production of interest; c) subsequently, investigations should focus on adequate growth media (less costly), that does not affect the yields of OA, to enhance the potential to be implemented at an industrial scale; d) finally, bioleaching conditions should be optimized.

Throughout this review, there has been established the potential of OA for metal-recovery processes, whether they are commercial reagents or microbially-produced OA, mainly because of their advantage, as being an eco-friendlier option, compared to IA. As to which type of OA is more appropriate to employ, the information compiled here indicates that the synergistic activity of various microbially-produced OA, even in milimole concentrations, is as effective or even may have a greater potential compared to a single OA (commercial reagent) in M concentrations, which makes them a promising alternative for bioleaching processes, that should be further studied and optimized.

References

1. Achor S., Aravis C., Heaney N., Odion E., Lin C.: Response of organic acid-mobilized heavy metals in soils to biochar application. *Geoderma*, **378**, 114628 (2020)
2. Ahile U.J., Wuana R.A., Itodo A.U., Sha'Ato R., Dantas R.F.: Stability of iron chelates during photo-Fenton process: The role of pH, hydroxyl radical attack and temperature. *J. Water Process. Eng*. **36**, 101320 (2020)
3. Amiri F., Mousavi S.M., Yaghmaei S.: Enhancement of bioleaching of a spent Ni/Mo hydroprocessing catalyst by *Penicillium simplicissimum*. *Sep. Purif. Technol.* **80**, 566–576 (2011)
4. Amiri F., Mousavi S.M., Yaghmaei S., Barati M.: Bioleaching kinetics of a spent refinery catalyst using *Aspergillus niger* at optimal conditions. *Biochem. Eng. J*. **67**, 208–217 (2012)
5. Amiri F., Yaghmaei S., Mousavi S.M.: Bioleaching of tungsten-rich spent hydrocracking catalyst using *Penicillium simplicissimum*. *Bioresour. Technol.* **102,** 1567–1573 (2011)
6. Anangono-Lara C.A.: Efficiency of use of organic acids in shrimp (In Spanish). Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales de la Universidad de Guayaquil, Ecuador, 28.02.2014, http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/25104 (10.05.2020)
7. Anjum F., Shahid M., Akcil A.: Biohydrometallurgy techniques of low-grade ores: A review on black shale. *Hydrometallurgy*, **117–118**, 1–12 (2012)
8. Asghari I., Mousavi S.M.: Effects of key parameters in recycling of metals from petroleum refinery waste catalysts in bioleaching process. *Rev. Environ. Sci. Bio.* **13**, 139–161 (2014).
9. Ashiq A., Kulkarni J., Vithanage, M.: Hydrometallurgical recovery of metals from e-waste (in) Electronic Waste Management and Treatment Technology. Ed. M.N. Vara-Prasad, M. Vithanage, *Elsevier*, Amsterdam, p. 225–246 (2019)
10. Bahaloo-Horeh N., Mousavi S.M.: Enhanced recovery of valuable metals from spent lithium-ion batteries through optimization of organic acids produced by *Aspergillus niger*. *Waste Manage*. **60**, 666–679 (2016)
11. Bahaloo-Horeh N., Mousavi S.M., Baniasadi M.: Use of adapted metal tolerant *Aspergillus niger* to enhance bioleaching efficiency of valuable metals from spent lithium-ion mobile phone batteries. *J. Clean. Prod*. **197**, 1546–1557 (2018)
12. Baldevraj R.S.M., Jagadish R.S.: Incorporation of chemical antimicrobial agents into polymeric films for food packaging (in) Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging, Ed. J.M. Lagarón, *Woodhead Publishing, Cambridge*, 2011, p. 368–420
13. Banerjee R., Mohanty A., Chakravarty S., Chakladar S., Biswas P.: A single-step process to leach out rare earth elements from coal ash using organic carboxylic acids. *Hydrometallurgy*, **201**, 105575 (2021)
14. Beddows C.: Reference module in materials science and materials engineering, 11.06.2015, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.03609-2 (10.05.2020)
15. Bergelin A., Van Hees P.A.W., Wahlberg O., Lundström U.S.: The acid-base properties of high and low molecular weight organic acids in soil solutions of podzolic soils. *Geoderma*, **94**, 223–235 (2000)
16. Bhargava S.K., Ram R., Pownceby M., Grocott S., Ring B., Tardio J., Jones L.: A review of acid leaching of uraninite. *Hydrometallurgy*, **151**, 10–24 (2015)
17. Biswas S., Bhattacharjee K.: Fungal assisted bioleaching process optimization and kinetics: Scenario for Ni and Co recovery from a lateritic chromite overburden. *Sep. Purif. Technol.* **135**, 100–109 (2014)
18. Cao Y., Zhang S., Zhong Q., Wang G., Xu X., Li T., Wang L., Jia Y., Li Y.: Feasibility of nanoscale zero-valent iron to enhance the removal efficiencies of heavy metals from polluted soils by organic acids. *Ecotox. Environ. Safe*. **162**, 464–473 (2018)
19. Clark J.: Making carboxylic acids by oxidation of primary alcohols or aldehydes. LibreTexts,https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Carboxylic_Acids/Synthesis_of_Carboxylic_Acids/Making_Carboxylic_Acids_by_Oxidation_of_Primary_Alcohols_or_Aldehydes (10.07.2020)
20. Das S., Naik Deshavath N., Goud V.V., Dasu V.V.: Bioleaching of Al from spent fluid catalytic cracking catalyst using *Aspergillus* species. *Biotechnol. Rep.* **23**, e00349 (2019)
21. Deepatana A., Valix M.: Recovery of nickel and cobalt from organic acid complexes: Adsorption mechanisms of metal-organic complexes onto aminophosphonate chelating resin. *J. Hazard. Mater*. **137**, 925–933 (2006)
22. Deng X., Chai L., Yang Z., Tang C., Tong H., Yuan P.: Bioleaching of heavy metals from a contaminated soil using indigenous *Penicillium chrysogenum* strain F1. *J. Hazard. Mater*. **233–234**, 25–32 (2012)
23. Desmarais M., Pirade F., Zhang J., Rene E.R.: Biohydrometallurgical processes for the recovery of precious and base metals from waste electrical and electronic equipments: Current trends and perspectives. *Bioresour. Technol. Rep*. **11**, 100526 (2020)
24. Dev S., Sachan A., Dehghani F., Ghosh T., Briggs B.R., Aggarwal S.: Mechanisms of biological recovery of rare-earth elements from industrial and electronic wastes: A review. *Chem. Eng. J.* **397**, 124596 (2020)
25. Ericsson M., Löf O.: Mining's contribution to national economies between 1996 and 2016. *Miner. Econ.* **32**, 223–250 (2019)
26. Esmaeili M., Rastegar S.O., Beigzadeh R., Gu T.: Ultrasound-assisted leaching of 0pent lithium ion batteries by natural organic acids and H2O2. *Chemosphere*, **254**, 126670 (2020)

27. Fan B., Chen X., Zhou T., Zhang J., Xu B.: A sustainable process for the recovery of valuable metals from spent lithium-ion batteries. *Waste Manage. Res*. **34**, 474–481 (2016)
28. Faraji F., Golmohammadzadeh R., Rashchi F., Alimardani N.: Fungal bioleaching of WPCBs using *Aspergillus niger*: Observation, optimization and kinetics. *J. Environ. Manage.* **217**, 775–787 (2018)
29. Farid M., Ali S., Rizwan M., Ali Q., Abbas F., Bukhari S.A.H., Saeed R., Wu L.: Citric acid assisted phytoextraction of chromium by sunflower; morpho-physiological and biochemical alterations in plants. *Ecotox. Environ. Safe*. **145**, 90–102 (2017)
30. Fathollahzadeh H., Becker T., Eksteen J.J., Kaksonen A.H., Watkin E.L.J.: Microbial contact enhances bioleaching of rare earth elements. *Bioresour. Technol. Rep.* **3**, 102–108 (2018)
31. Fathollahzadeh H., Eksteen J.J., Kaksonen A.H., Watkin, E.L.J.: Role of microorganisms in bioleaching of rare earth elements from primary and secondary resources. *Appl. Microbiol. Biot.* **103**, 1043–1057 (2019)
32. Fayed T.A., Gaber M., El-Nahass M.N., Diab H.A., El-Gamil M.M.: Synthesis, Structural characterization, thermal, molecular modeling and biological studies of chalcone and Cr(III), Mn(II), Cu(II), Zn(II) and Cd(II) chelates. *J. Mol. Struct*. **1221**, 128742 (2020)
33. Fernandes G.W., Ribeiro S.P.: Deadly conflicts: Mining, people, and conservation. *Perspect. Ecol. Conserv*. **15**, 141–144 (2017)
34. French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES): Analysis of the most appropriate risk management option (RMOA) for tributyl O-acetylcitrate (ATBC), https://echa.europa.eu/documents/10162/29c7b3b8-f40c-64b2-8b55-053117cd599f (15.11.2020)
35. Fu Y., He Y., Chen H., Ye C., Lu Q., Li R., Xie W., Wang J.: Effective leaching and extraction of valuable metals from electrode material of spent lithium-ion batteries using mixed organic acids leachant. *J. Ind. Eng. Chem.* **79**, 154–162 (2019)
36. Gálan-Wong L.J., Delgado-Licón E., Medrano-Trujillo H.A., Medrano-Roldán H.: Financial Biotechnology (In Spanish). Instituto Tecnológico de Durango, Durango, 2013
37. Gao W., Song J., Cao H., Lin X., Zhang X., Zheng X., Zhang Y., Sun Z.: Selective recovery of valuable metals from spent lithium-ion batteries – Process development and kinetics evaluation. *J. Clean. Prod.* **178**, 833–845 (2018)
38. Geng H., Wang F., Yan C., Tian Z., Chen H., Zhou B., Yuan R., Yao J.: Leaching behavior of metals from iron tailings under varying pH and low-molecular-weight organic acids. *J. Hazard. Mater.* **383**, 121136 (2020)
39. Ghorbani Y., Montenegro M.R.: Leaching behaviour and the solution consumption of uranium-vanadium ore in alkali carbonate-bicarbonate column leaching. *Hydrometallurgy*, **161**, 127–137 (2016)
40. Gómez-Ramírez M., Rojas-Avelizapa N.G., Hernández-Gama R., Tenorio-Sánchez S.A., López-Villegas E.O.: Potential use of Bacillus genera for metals removal from spent catalysts. *J. Environ. Sci. Heal. A*, **54**, 701–710 (2019)
41. Gu T., Rastegar S.O., Mousavi S.M., Li M., Zhou M.: Advances in bioleaching for recovery of metals and bioremediation of fuel ash and sewage sludge. *Bioresource Technol*. **261**, 428–440 (2018)
42. Haldar S.K.: Mineral Processing (in) Mineral Exploration, Ed. S.K. Haldar, *Elsevier*, Ámsterdam, p. 1–21 (2013)
43. Herrick S.S.: Alcoholic beverages. JAMA-J Am. *Med. Assoc.* **8**, 416–419 (1898)
44. Hopfe S., Flemming K., Lehmann F., Möckel R., Kutschke S., Pollmann K.: Leaching of rare earth elements from fluorescent powder using the tea fungus Kombucha. *Waste Manage.* **62**, 211–221 (2017)
45. Horeh N.B., Mousavi S.M., Shojaosadati S.A.: Bioleaching of valuable metals from spent lithium-ion mobile phone batteries using *Aspergillus Niger*. *J. Power Sources*, **320**, 257–266 (2016)
46. Hosseini Nasab M., Noaparast M., Abdollahi H., Amoozegar M.A.: Indirect bioleaching of Co and Ni from iron rich laterite ore, using metabolic carboxylic acids generated by *P. putida*, *P. koreensis, P. bilaji* and *A. niger*. *Hydrometallurgy*, **193**, 105309 (2020)
47. Huang K., Inoue K., Harada H., Kawakita H., Ohto K.: Leaching of heavy metals by citric acid from fly ash generated in municipal waste incineration plants. J. Mater. *Cycles Waste*, **13**, 118–126 (2011)
48. Huggins F.E., Shah N., Huffman G.P., Kolker A., Crowley S., Palmer C.A., Finkelman R.B.: Mode of occurrence of chromium in four US coals. *Fuel Process. Technol*. **63**, 79–92 (2000)
49. Ilyas S., Chi R., Lee J.C., Bhatti H.N.: One step bioleaching of sulphide ore with low concentration of arsenic by *Aspergillus niger* and taguchi orthogonal array optimization. *Chinese J. of Chem. Eng.* **20**, 923–929 (2012)
50. Jadhav U.U., Hocheng H.: A review of recovery of metals from industrial waste. *J. Achiev. Mater. Manuf. Eng.* **54**, 159–167 (2012)
51. Ji B., Li Q., Zhang W.: Leaching recovery of rare earth elements from calcination product of a coal coarse refuse using organic acids. *J. Rare Earth*. DOI: 10.1016/j.jre.2020.11.021 (2020)
52. Kim R., Cho H., Han K.N., Kim K., Mun M.: Optimization of acid leaching of rare-earth elements from mongolian apatite-based ore. *Minerals*, **6**, 63 (2016)
53. Laurence D.: Establishing a sustainable mining operation: An overview. *J. Clean. Prod*. **19**, 278–284 (2011)
54. Li L., Fan E., Guan Y., Zhang X., Xue Q., Wei L., Wu F., Chen R.: Sustainable Recovery of cathode materials from spent lithium-ion batteries using lactic acid leaching system. ACS Sustain. *Chem. Eng.* **5**, 5224–5233 (2017)
55. Li L., Ge J., Wu F., Chen R., Chen S., Wu B.: Recovery of cobalt and lithium from spent lithium ion batteries using organic citric acid as leachant. *J. Hazard. Mater*. **176**, 288–293 (2010)
56. Liaud N., Giniés C., Navarro D., Fabre N., Crapart S., Gimbert I.H., Levasseur A., Raouche S., Sigoillot J.C.: Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. *Fungal Biol. Biotechnol.* **1**, 1–10 (2014)
57. Ma E.: Recovery of waste printed circuit boards through pyrometallurgy (in) Electronic Waste Management and Treatment Technology, Ed. M.J. Vara-Prasad, M. Vithanage, *Elsevier*, Amsterdam, p. 247–267 (2019)
58. Mafi Gholami R., Mousavi S.M., Borghei S.M.: Process optimization and modeling of heavy metals extraction from a molybdenum rich spent catalyst by *Aspergillus niger* using response surface methodology. *J. Ind. Eng. Chem*. **18**, 218–224 (2012)
59. Mazurek K.: Recovery of vanadium, potassium and iron from a spent vanadium catalyst by oxalic acid solution leaching, precipitation and ion exchange processes. *Hydrometallurgy*, **134–135**, 26–31 (2013)
60. Meshram P., Mishra A., Abhilash, Sahu R.: Environmental impact of spent lithium ion batteries and green recycling perspectives by organic acids – A review. *Chemosphere*, **242**, 125291 (2020)
61. Minerals Council of Australia: 30 things produced by the Minerals Council of Australia, https://www.minerals.org.au/sites/default/files/30%20Things.pdf (12.01.2021)
62. Min-Ji K., Ja-Yeon S., Yong-Seok C., Gyu-Hyeok K.: Bioleaching of spent Zn-Mn or Ni-Cd batteries by *Aspergillus* species. *Waste Manage.* **51**, 168–173 (2016)
63. Mishra D., Kim D., Ahn J., Rhee Y.: Bioleaching: A microbial process of metal recovery; A review. *Met. Mater. Int*. **11**, 249–256 (2005)

64. Mishra S.K., Mishra P.: Do adverse ecological consequences cause resistance against land acquisition? The experience of mining regions in Odisha, India. *Extr. Ind. Soc.* **4**, 140–150 (2016)
65. Mohanty S., Ghosh S., Nayak S., Das A.P.: Bioleaching of manganese by *Aspergillus sp*. isolated from mining deposits. *Chemosphere,* **172**, 302–309 (2017)
66. Mouna H.M., Baral S.S.: A bio-hydrometallurgical approach towards leaching of lanthanum from the spent fluid catalytic cracking catalyst using *Aspergillus niger. Hydrometallurgy*, **184**, 175–182 (2019)
67. Musariri B., Akdogan G., Dorfling C., Bradshaw S.: Evaluating organic acids as alternative leaching reagents for metal recovery from lithium ion batteries. *Miner. Eng.* **137**, 108–117 (2019)
68. Naraian R., Kumari S.: Microbial production of organic acids. *Prog. Ind. M*. **33**, 249–272 (1995)
69. Nayaka G.P., Zhang Y., Dong P., Wang D., Pai K.V., Manjanna J., Santhosh G., Duan J., Zhou Z., Xiao J.: Effective and environmentally friendly recycling process designed for LiCoO2 cathode powders of spent Li-ion batteries using mixture of mild organic acids. *Waste Manage*. **78**, 51–57 (2018)
70. Ning P., Meng Q., Dong P., Duan J., Xu M., Lin Y., Zhang Y.: Recycling of cathode material from spent lithium ion batteries using an ultrasound-assisted DL-malic acid leaching system. *Waste Manage*. **103**, 52–60 (2020)
71. Pathak A., Srichandan H., Kim D.J.: Fractionation behavior of metals (Al, Ni, V, and Mo) during bioleaching and chemical leaching of spent petroleum refinery catalyst. *Water Air Soil Poll*. **225**, 1–10 (2014)
72. Piri M., Sepehr E., Rengel Z.: Citric acid decreased and humic acid increased Zn sorption in soils. *Geoderma*, **341**, 39–45 (2019)
73. Qu Y., Lian B.: Bioleaching of rare earth and radioactive elements from red mud using *Penicillium tricolor* RM-10. *Bioresource Technol.* **136**, 16–23 (2013)
74. Qu Y., Lian B., Mo B., Liu C.: Bioleaching of heavy metals from red mud using *Aspergillus niger. Hydrometallurgy*, **136**, 71–77 (2013)
75. Rasoulnia P., Mousavi S.M.: Maximization of organic acids production by *Aspergillus niger* in a bubble column bioreactor for V and Ni recovery enhancement from power plant residual ash in spent-medium bioleaching experiments. *Bioresource Technol*. **216**, 729–736 (2016)
76. Rasoulnia P., Mousavi S.M., Rastegar S.O., Azargoshasb H.: Fungal leaching of valuable metals from a power plant residual ash using *Penicillium simplicissimum*: Evaluation of thermal pretreatment and different bioleaching methods. *Waste Manage*. **52**, 309–317 (2016)
77. Reed D.W., Fujita Y., Daubaras D.L., Jiao Y., Thompson V.S.: Bioleaching of rare earth elements from waste phosphors and cracking catalysts. *Hydrometallurgy*, **166**, 34–40 (2016)
78. Rene E.R., Sahinkaya E., Lewis A., Lens P.N.L.: Sustainable heavy metal remediation. Springer, Switzerland, 2017
79. Ricke S.C.: Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Sci*. **82**, 632–639 (2003)
80. Rivas V., Cendrero A., Hurtado M., Cabral M., Giménez J., Forte L., del Río L., Cantú M., Becker A.: Geomorphic consequences of urban development and mining activities; an analysis of study areas in Spain and Argentina. *Geomorphology*, **73**, 185–206 (2006)
81. Rojas-Avelizapa N.G., Otamendi-Valdez J., Gómez-Ramírez M. Metal leaching from a spent catalyst by *Alternaria alternata*. Mex. *J. Biotechnol*. **2**, 221–231 (2017)
82. Ruiz-Trujillo D.P.: Feasibility study about the use of organic acids as leaching agents (In Spanish). Universidad Tecnológica de Corregidora, México (17.06.2021)
83. Rudke A.P., Sikora de Souza V.A., Mota dos Santos A.M., Freitas Xavier A. C., Rotunno Filho O.C., Martins J.A.: Impact of mining activities on areas of environmental protection in the southwest of the Amazon: A GIS- and remote sensing-based assessment. *J. Environ. Manage*. **263**, 110392 (2020)
84. Santos-Ruiz A.: Chelation phenomenom in the biochemistry of the oligoelements (In Spanish). El fenómeno de quelación en la bioquímica de los oligoelementos. Real Academia de Farmacia de Madrid, https://xdoc.mx/preview/el-fenomeno-de-quelacion-en-la-bioquimica-de-los-oligoelementos-5fc9c4ad0c385 (17.06.2020)
85. Sauer M., Porro D., Mattanovich D., Branduardi P.: Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.* **26**, 100–108 (2008)
86. Shahid M., Pinelli E., Dumat C.: Review of Pb availability and toxicity to plants in relation with metal speciation; role of synthetic and natural organic ligands. *J. Hazard. Mater*. **219–220**, 1–12 (2012)
87. Srichandan H., Mohapatra R.K., Parhi P.K., Mishra S.: Bioleaching approach for extraction of metal values from secondary solid wastes: A critical review. *Hydrometallurgy,* **189**, 105122 (2019)
88. Taghipour M., Jalali M.: Heavy metal release from some industrial wastes: Influence of organic and inorganic acids, clay minerals, and nanoparticles. *Pedosphere*, **28**, 70–83. (2018)
89. Vakilchap F., Mousavi S.M., Shojaosadati S.A.: Role of *Aspergillus niger* in recovery enhancement of valuable metals from produced red mud in Bayer process. *Bioresour. Technol.* **218**, 991–998 (2016)
90. Walco, S.A.: All about chelates (In Spanish), http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portalIG/home_4/mod_virtuales/modulo2/6.pdf (17.06.2020)
91. Wang Y.D., Li G.Y., Ding D.X., Zhang Z.Y., Chen J., Hu N., Li L.: Column leaching of uranium ore with fungal metabolic products and uranium recovery by ion exchange. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **304**, 1139–1144 (2015)
92. Wu H.Y., Ting Y.P. Metal extraction from municipal solid waste (MSW) incinerator fly ash – Chemical leaching and fungal bioleaching. *Enzyme Microb. Tech*. **38**, 839–847 (2006)
93. Xia M., Bao P., Liu A., Wang M., Shen L., Yu R., Liu Y., Chen M., Li J., Wu X., Qiu G., Zeng W.: Bioleaching of low-grade waste printed circuit boards by mixed fungal culture and its community structure analysis. *Resour. Conserv. Recy*. **136**, 267–275 (2018a)
94. Xia M.C., Bao P., Liu A.J., Zhang S.S., Peng T.J., Shen L., Yu R.L., Wu X.L., Li J.K., Liu Y.D., Chen M., Qiu G.Z., Zeng W.M.: Isolation and identification of *Penicillium chrysogenum* strain Y5 and its copper extraction characterization from waste printed circuit boards. *J. Biosci. Bioeng.* **126**, 78–87 (2018b)
95. Xu T.J., Ramanathan T., Ting Y.P.: Bioleaching of incineration fly ash by *Aspergillus niger* – Precipitation of metallic salt crystals and morphological alteration of the fungus. *Biotechnol. Rep.* **3**, 8–14 (2014)
96. Xu T.J., Ting Y.P.: Optimisation on bioleaching of incinerator fly ash by *Aspergillus niger* – Use of central composite design. *Enzyme Microb. Tech.* **35**, 444–454 (2004)
97. Yang X., Liu L., Tan W., Liu C., Dang Z., Qiu G.: Remediation of heavy metal contaminated soils by organic acid extraction and electrochemical adsorption. *Environ. Pollut*. **264**, 114745 (2020)
98. Zeng X., Li J., Shen B.: Novel approach to recover cobalt and lithium from spent lithium-ion battery using oxalic acid. *J. Hazard. Mater*. **295**, 112–118 (2015)
99. Zhou J., Zhu N., Liu H., Wu P., Zhang X., Zhong Z.: Recovery of gallium from waste light emitting diodes by oxalic acidic leaching. *Resour. Conserv. Recy*. **146**, 366–372 (2019)
100. Zhou Y., Huang X., Huang G., Bai X., Tang X., Li Y.: Cu and Fe bioleaching in low-grade chalcopyrite and bioleaching mechanisms using *Penicillium janthinellum* strain GXCR. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, **24**, 1993–2002 (2008)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2022, 61, 4, 191–204
DOI: 10.2478/am-2022-020

ODDZIAŁYWANIA POMIĘDZY MAŁYMI, REGULATOROWYMI RNA A DWUSKŁADNIKOWYMI SYSTEMAMI TRANSDUKCJI SYGNAŁU U BAKTERII GRAM-UJEMNYCH

Karolina Jaworska, Weronika Staniszewska, Patrycja Gomza, Paula Rożen, Katarzyna Brzostek, Adrianna Raczkowska*

Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w kwietniu, zaakceptowano we wrześniu 2022 r.

Streszczenie: Małe, regulatorowe RNA (sRNA) wraz z dwuskładnikowymi systemami transdukcji sygnału (TCS) wchodzą w skład rozbudowanych sieci kontroli ekspresji genów bakteryjnych. Oddziałując ze sobą wzajemnie, zapewniają niezwykle szybką, jak również precyzyjną odpowiedź bakterii na zmieniające się warunki bytowania. Kontrolując wiele procesów wpływają na stan fizjologiczny komórki, skład proteomu osłon komórkowych czy zdolność do wzrostu w postaci biofilmu. Niezwykle często sRNA stanowią brakujące ogniwa, w odpowiedzi na złożone bodźce środowiskowe, pomiędzy dwuskładnikowymi systemami transdukcji sygnału, a genami docelowymi czy innymi systemami regulatorowymi. Współdziałanie TCS-sRNA wydaje się globalną cechą regulacyjną u wielu organizmów prokariotycznych. Zdobywanie wiedzy na temat tych mechanizmów kontroli toruje drogę do opracowania nowych strategii walki z drobnoustrojami patogennymi.

1. Wprowadzenie. 2. Wpływ małych, niekodujących RNA na ekspresję genów u bakterii. 3. Dwuskładnikowe systemy transdukcji sygnału (TCS). 4. Charakterystyka oddziaływań pomiędzy dwuskładnikowymi systemami transdukcji sygnału, a sRNA. 4.1. Regulacja ekspresji genów białek błony zewnętrznej z udziałem TCS i sRNA. 4.2. Wpływ dwuskładnikowych systemów transdukcji sygnału i sRNA na proces tworzenia biofilmu. 4.3. Udział TCS i sRNA w regulacji procesu quorum sensing. 5. Podsumowanie

INTERACTIONS BETWEEN SMALL REGULATORY RNAs AND TWO-COMPONENT SIGNAL TRANSDUCTION SYSTEMS IN GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Summary: Small, regulatory RNA molecules (sRNAs) together with two-component signal transduction systems (TCSs) are part of extensive networks for controlling bacterial gene expression. By interacting with each other, they ensure a swift and precise response of bacteria to changing living conditions. They control many processes, including the composition of the bacterial cell envelope and biofilm formation. Very often, sRNAs are the missing links between TCSs and their target genes or other regulatory systems in response to complex environmental stimuli. TCS-sRNA interaction is now considered a global regulatory feature in many prokaryotes. Learning about these control mechanisms paves the way to developing new strategies to combat pathogens.

1. Introduction. 2. The influence of small, regulatory RNA on gene expression in bacteria. 3. Two-component signal transduction systems (TCSs). 4. Characteristics of interactions between two-component signal transduction systems and sRNA. 4.1. Regulation of the expression of essential outer membrane proteins by TCSs and sRNA. 4.2. The influence of two-component signal transduction systems and sRNA on the process of biofilm formation. 4.3. Participation of TCSs and sRNA in the regulation of the quorum sensing. 5. Summary

Słowa kluczowe: dwuskładnikowe systemy transdukcji sygnału (TCS), małe regulatorowe RNA (sRNA), oddziaływania TCS-sRNA
Keywords: two-component signal transduction systems (TCS), small regulatory RNA (sRNA), TCS-sRNA interactions

1. Wprowadzenie

Zdolność do szybkiego reagowania na zmieniające się warunki środowiska wynikająca z regulacji ekspresji genów jest konieczna dla przetrwania wszystkich żywych organizmów. Istnienie zróżnicowanych mechanizmów regulatorowych pozwala na dokładną i natychmiastową odpowiedź na sygnały płynące ze środowiska, co znacząco zwiększa szansę na przetrwanie. Regulacja może zachodzić poprzez wyciszenie lub aktywację ekspresji wybranych genów i biosyntezę wyspecjalizowanych białek. U Prokaryota kontrola ekspresji genów zwykle nie odbywa się dla pojedynczych genów, lecz dla całych grup genów tworzących operony. Ekspresja genów jest podstawowym procesem pozwalającym na odczytywanie informacji genetycznej danego organizmu, a regulacja ekspresji genów jest podstawowym mechanizmem służącym adaptacji do zmiennych warunków środowiska, zapewnieniu wzrostu i zróżnicowania oraz utrzymaniu homeostazy organizmu.

* Autor korespondencyjny: dr hab. Adrianna Raczkowska, Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. I. Miecznikowa 1, 02-096, Warszawa; tel: (22) 55 41 310; e-mail: ad.raczkowska@uw.edu.pl

© 2022 Karolina Jaworska et al.
This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Ekspresja genów to proces wieloetapowy, a każdy etap może podlegać regulacji. U Prokaryota produktami ekspresji genów mogą być białka i RNA, tj.: rybosomowy (rRNA), transportujący (tRNA), informacyjny (mRNA), transportująco-informacyjny (tmRNA) czy mały, niekodujący RNA (sRNA) [57].

2. Wpływ małych, niekodujących RNA na ekspresję genów u bakterii

Małe, niekodujące cząsteczki RNA (sRNA, small non-coding RNA), określane również jako małe, regulatorowe RNA, zostały po raz pierwszy odkryte u bakterii w 1967 roku, ale ich znaczenie i powszechność występowania były długo niedoceniane [86]. Jeszcze do niedawna uważano, że regulacja ekspresji genów jest kontrolowana prawie całkowicie przez białka wiążące się z kwasami nukleinowymi. W ostatnich latach okazało się, że sRNA pełnią znaczącą funkcję na prawie każdym etapie regulacji ekspresji genów, a kontrola przez sRNA jest określana mianem ryboregulacji [33, 105, 109].

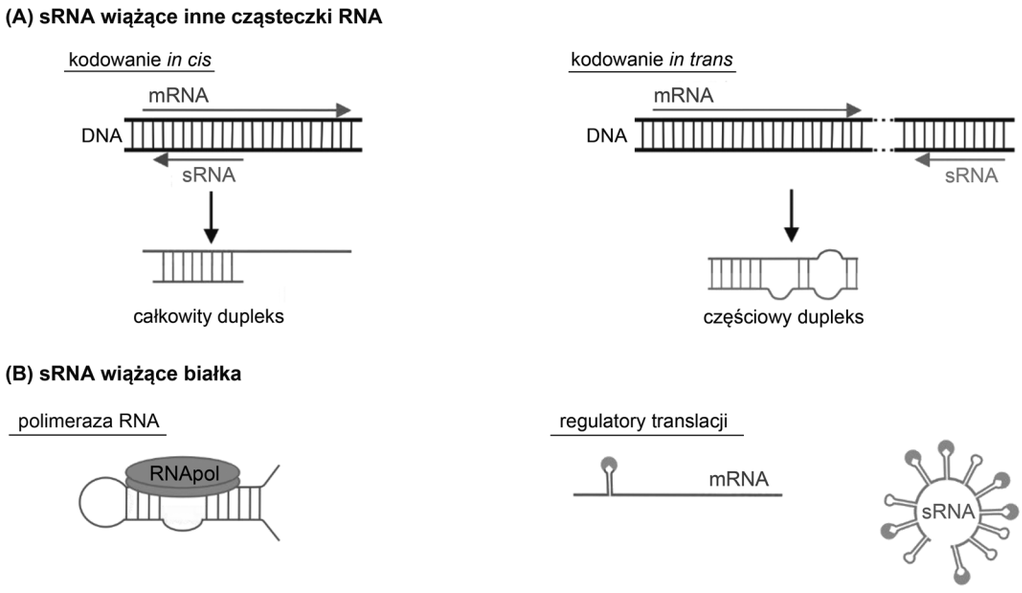
Nadal nie jest znana dokładna liczba sRNA u bakterii. W przypadku modelowej bakterii *Escherichia coli* wytypowano ~100 cząsteczek sRNA (w porównaniu z 4300 białkami), podczas gdy liczby dwa lub trzy razy wyższe zostały zaproponowane dla innych gatunków bakterii. Jeśli w wyliczeniach nie pominięto dużej klasy sRNA pochodzącego z mRNA, wydaje się wysoce prawdopodobne, że u bakterii liczba tego rodzaju RNA oscyluje na poziomie kilkuset cząsteczek. Trudność z ustaleniem dokładnej liczby wynika z faktu, że wiele krótkich transkryptów zostało wykrytych tylko w ramach jednego eksperymentu i nie wykazano ich funkcji [33]. Wydaje się również, że sRNA pełniące określone funkcje regulacyjne są często pomijane w badaniach, ponieważ ulegają ekspresji tylko w bardzo specyficznych warunkach. Ponadto ich budowa i forma sprawiają, że nie są łatwo wykrywalne [9, 33].

Możliwe, że cząsteczki sRNA wyewoluowały bardzo wcześnie, aby uczynić genom bardziej stabilnym. Geny kodujące sRNA wykazują cechy świadczące o ich duplikacji oraz niewątpliwie podlegają horyzontalnemu transferowi. Niewykluczone, że sRNA mogły również ewoluować z tRNA, mRNA lub podczas losowej transkrypcji, aby pomóc w modulowaniu metabolizmu komórkowego, optymalizacji dostępności dla komórki składników odżywczych, czy zwiększeniu prawdopodobieństwa przeżycia mikroorganizmu [33]. Wykazano, że sRNA mogą modulować wirulencję, różnicowanie komórkowe, szlaki metaboliczne oraz wpływać na adaptację bakterii do warunków środowiskowych [69].

Mały, regulatorowy RNA kodowany jest zazwyczaj przez oddzielną, autonomiczną jednostkę transkrypcyjną o długości około 40–500 nukleotydów [55]. Przeważająca część sRNA posiada strukturę spinki oraz regiony nieustrukturyzowane. Często sama sekwencja ujawnia niewiele, zaś funkcjonalność sRNA bądź jego rolę można poznać dopiero podczas głębszych analiz. Pomimo braku wyodrębnienia jednolitych klas bakteryjnych sRNA, istnieją pewne wspólne reguły dotyczące kontroli potranskrypcyjnej, w których biorą one udział [44]. Na tym poziomie kontroli, sRNA należą do najliczniejszej grupy regulatorów u bakterii. Celami dla sRNA są cząsteczki mRNA i białka (Ryc. 1). Cząsteczki sRNA mogą decydować o tym, czy mRNA będzie podlegać translacji bądź też zmieniać aktywność białek regulatorowych (czynników transkrypcyjnych) lub czynników sigma na drodze tzw. mimikry molekularnej. W drugim przypadku sRNA naśladuje cel dla danego białka, przez co ulega ono wymiareczkowaniu i jego aktywność jest hamowana [29].

sRNA mogą pozytywnie, jak i negatywnie regulować ekspresję genów. Zazwyczaj dzieje się to poprzez tworzenie komplementarnych par zasad z docelowymi mRNA, z którymi dzielą większą bądź mniejszą komplementarność sekwencji, co prowadzi do zaburzenia stabilności mRNA, a czasem jego degradacji [32]. Można rozróżnić sRNA kodowane *in cis* oraz *in trans*. Pierwsze z nich transkrybowane są z nici komplementarnej do nici kodującej pojedyncze docelowe mRNA i w rezultacie wiążą się z nim tworząc dupleks na całej długości sekwencji (Ryc. 1A, lewy panel). W większości przypadków efektem regulatorowym jest inhibicja translacji. Ponieważ zarówno sRNA, jak i docelowy mRNA, są transkrybowane w bliskim sąsiedztwie ze względu na położenie *in cis*, dochodzi do wysokiej lokalnej koncentracji obu typów cząsteczek. Zjawisko to wraz z ograniczoną dyfuzją transkryptów prowadzi do wydajnej interakcji pomiędzy antysensowym a docelowym RNA, która jest biologicznie efektywna. Przestrzenna bliskość miejsc promotorowych antysensowego i docelowego RNA powoduje także interferencję transkrypcyjną [10, 86]. Bardzo istotnym jest fakt, iż w tym typie regulacji określony sRNA kontroluje ekspresję tylko jednego genu. Większość sRNA kodowanych *in cis* zlokalizowana jest na plazmidach lub innych mobilnych elementach genetycznych, wtedy też ich rola związania jest z utrzymaniem odpowiedniej liczby kopii tychże elementów genetycznych [10, 107].

W przypadku sRNA kodowanych *in trans,* sRNA i regulowany gen znajdują się w różnych miejscach na chromosomie bakteryjnym, czasem nawet w bardzo dużej odległości od siebie. Co więcej, taki regulatorowy RNA może zawiadować ekspresją nie jednego genu, lecz nawet bardzo wielu genów, ponieważ parowanie nie jest w pełni komplementarne i zachodzi na krótkim odcinku sekwencji (Ryc. 1A, prawy panel). Te sRNA są podobne do eukariotycznych mikroRNA pod względem zdolności do modulowania aktywności i stabilności wielu



Ryc. 1. Podział prokariotycznych sRNA w oparciu o sposób działania

W oparciu o sposób działania można wyróżnić dwa rodzaje sRNA: sRNA oddziałujące z częściowo lub w pełni komplementarnymi regionami w innych cząsteczkach RNA (A) oraz wiążące się z białkami (B) Antysensowe RNA może być kodowane *in cis*, tworzy wtedy pełne dupleksy z docelowym mRNA, lub *in trans* i tworzy wówczas częściowe, krótkie dupleksy z mRNA. sRNA wiążące białka mogą działać poprzez sekwestrację polimerazy RNA lub sekwestrację regulatorów translacji. We wszystkich przypadkach wiązanie sRNA może aktywować lub hamować translację docelowego mRNA lub funkcję białka, z którym oddziałuje. Na podstawie [30 i 108].

mRNA. Jeśli chodzi o efekt regulatorowy, to może nim być, zarówno inhibicja, jak i indukcja translacji. Prawie wszystkie sRNA należące do tej klasy ulegają ekspresji w określonych warunkach wzrostu, począwszy od głodu żelazowego, stresu oksydacyjnego i warunków beztlenowych, do stresu wywołanego zaburzeniem struktury osłon, niskiego stężenia magnezu lub wysokiego stężenia glukozo-6-fosforanu i głodu glukozowego [33].

Ważnym białkiem biorącym często udział w wiązaniu mRNA z sRNA kodowanym *in trans* jest białko Hfq, które pełni rolę molekularnego „opiekuna" (ang. chaperone). Białko to może jednocześnie wiązać sRNA i mRNA, tym samym ułatwiając efektywne parowanie zasad azotowych pomiędzy dwoma łańcuchami. Hfq również chroni sRNA przed degradacją nim dojdzie do sparowania obu cząsteczek RNA oraz może rekrutować czynniki pomocnicze procesów regulacyjnych (przykładem jest rybonukleaza RNaza E) [44]. W badaniach wykazano, że RNA wiążące Hfq posiadają charakterystyczny motyw w sekwencji nukleotydowej, tj. 5'-AAYAAYA-3' [56]. Region ten znajduje się na końcu 5' cząsteczki sRNA i jest miejscem wiązania dla białka Hfq, niezbędnego do funkcjonowania i stabilizacji sRNA [87, 93]. Na końcu 5' występuje również krótki, często wysoce konserwowany i zwykle jednoniciowy region wykorzystywany do parowania zasad z docelowym mRNA. Z kolei w obrębie końca 3' nić przybiera strukturę spinki do włosów, po której występuje ogon poli(U). Obecność ogona poli(U) sprzyja terminacji transkrypcji niezależnej od białka Rho i chroni sRNA przed egzonukleazami degradującymi ten koniec. Jest to powszechnie występujący element w transkryptach bakteryjnego RNA, a taka budowa końca 3' ułatwia rozpoznanie sRNA przez białko opiekuńcze Hfq [87].

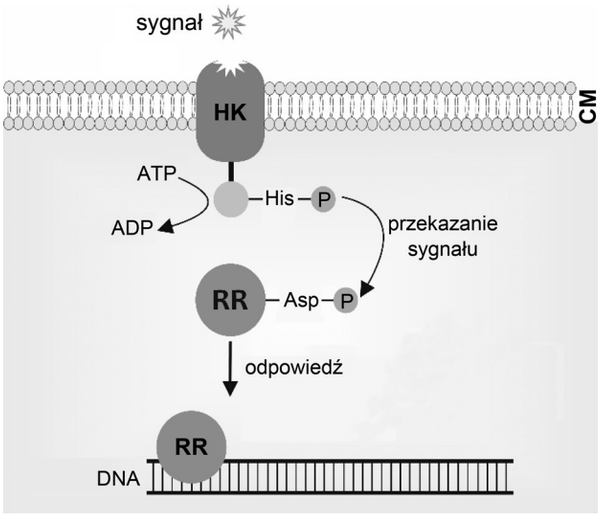
Tworzenie komplementarnych par zasad pomiędzy sRNA i mRNA może mieć szereg skutków regulacyjnych. Parowanie zasad w miejscu wiązania rybosomu na mRNA blokuje proces translacji. Co ciekawe, systematyczne przesuwanie regionu zaangażowanego w oddziaływanie sRNA RybB z mRNA *ompN* u *Salmonella enterica* wykazało, że RybB może blokować translację nawet wtedy, gdy region parowania znajduje się daleko, bo w obrębie piątego kodonu w otwartej ramce odczytu (ORF) [9]. Translacja może być również zablokowana, gdy region parowania znajduje się 50 lub więcej nukleotydów powyżej miejsca wiązania rybosomu [88]. W większości przypadków, gdy wiązanie rybosomu jest zablokowane, obserwuje się również związany z tym spadek stabilności mRNA. Dla innych docelowych mRNA, tworzenie komplementarnych par zasad z sRNA zachodzi poniżej sekwencji Shine-Dalgarno (SD), tak że wiązanie rybosomu nie zostaje zablokowane. Na przykład parowanie zasad pomiędzy małą cząsteczką RNA MicC i mRNA *ompD S. enterica* w obrębie kodonów 23–26 przyspiesza rozpad mRNA zależny od RNazy E bez blokowania wiązania rybosomu [73]. Oprócz hamowania sRNA mogą również aktywować proces translacji, w wielu przypadkach zapobiegając tworzeniu struktury drugorzędowej w mRNA hamującej wiązanie rybosomu [58, 66, 77].

3. Dwuskładnikowe systemy transdukcji sygnału

Proces adaptacji bakterii do dynamicznie zmieniających się parametrów fizycznochemicznych środowiska jest możliwy dzięki obecności zróżnicowanych systemów regulacyjnych. Specyficznymi sygnałami środowiska prowadzącymi do odpowiedzi komórki bakteryjnej są zmiany: pH, osmolarności, gęstości komórek, temperatury czy dostępności tlenu i składników odżywczych. Bakterie nieustanie odbierają sygnały z otoczenia, które przekładają się na zmianę wzoru ekspresji genów, aby sprawnie zaadoptować się do nowych warunków [43, 70].

Systemy transdukcji sygnału, powszechnie określane mianem „dwuskładnikowych" (TCS, two-component system), w swojej najprostszej postaci składają się z pary białek, między którymi dochodzi do transdukcji sygnału, tj. transferu grupy fosforanowej. Bardzo często TCS stanowią złożony szlak fosfotransferu, w którym bierze udział większa liczba komponentów. Systemy te, powszechne u bakterii, obecne są również u niektórych roślin, niższych eukariontów i archeonów [71]. Uczestniczą w regulacji wielu procesów fizjologicznych, do których zaliczamy kompetencję, koniugację, sporulację, bioluminescencję, wirulencję, syntezę antybiotyków, ruchliwość, tworzenie biofilmu, czy transport jonów (np. Fe^{3+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}) i substancji odżywczych niezbędnych dla funkcjonowania bakterii [47]. TCS odbierają sygnały chemiczne i fizyczne, takie jak: temperatura, pH, osmolarność, potencjał redoks, stężenie jonów i związków odżywczych, jak również zawartości tlenu [47, 92].

Działanie dwuskładnikowego systemu regulacyjnego jest oparte na transferze grupy fosforanowej pomiędzy kinazą histydynową (HK, histidine kinase), a regulatorem odpowiedzi (RR, response regulator) [28]. Kinazy to jedna z największych i najbardziej znaczących rodzin wśród wszystkich białek. Rozpoznają sygnały pochodzące ze środowiska zewnętrznego, a mechanizm ich działania polega na oddziaływaniu z innymi białkami, co prowadzi do ich przejściowej fosforylacji [1]. Kinaza histydynowa w TCS jest białkiem zakotwiczonym w błonie cytoplazmatycznej, zbudowanym z dwóch domen: N-końcowej pełniącej rolę sensora oraz C-końcowej o funkcji przekaźnika sygnału. Odebranie sygnału powoduje autofosforylację konserwowanej reszty histydynowej w domenie C-końcowej kinazy, z kolei ufosforylowana kinaza pełni rolę donora grupy fosforanowej dla cytoplazmatycznego białka regulatorowego. Podobnie jak kinazy, białka regulatorowe są złożone z domeny N-końcowej, która tutaj pełni rolę odbiornika (fosforylacji ulega konserwowana reszta asparaginianowa) i efektorowej domeny C-końcowej. Przekazanie sygnału polega na przeniesieniu grupy fosforanowej z kinazy histydynowej na domenę N-końcową regulatora odpowiedzi, który w ten sposób ulega aktywacji i najczęściej pełni rolę regulatora transkrypcji wiążąc się z promotorami regulowanych genów za pomocą swojej domeny C-końcowej (Ryc. 2) [11, 28].



Ryc. 2. Budowa typowego dwuskładnikowego systemu transdukcji sygnału

Najprostszy dwuskładnikowy system transdukcji sygnału, składa się z kinazy histydynowej (HK) oraz regulatora odpowiedzi (RR), który najczęściej wiążąc się z DNA pełni rolę aktywatora lub represora transkrypcji regulowanych genów. Po odebraniu sygnału ze środowiska kinaza histydynowa ulega autofosforylacji. Przekazanie sygnału, czyli transfer grupy fosforanowej zachodzi pomiędzy resztą histydyny w kinazie, a asparaginianem w białku regulatorowym. CM – błona cytoplazmatyczna. Na podstawie [12].

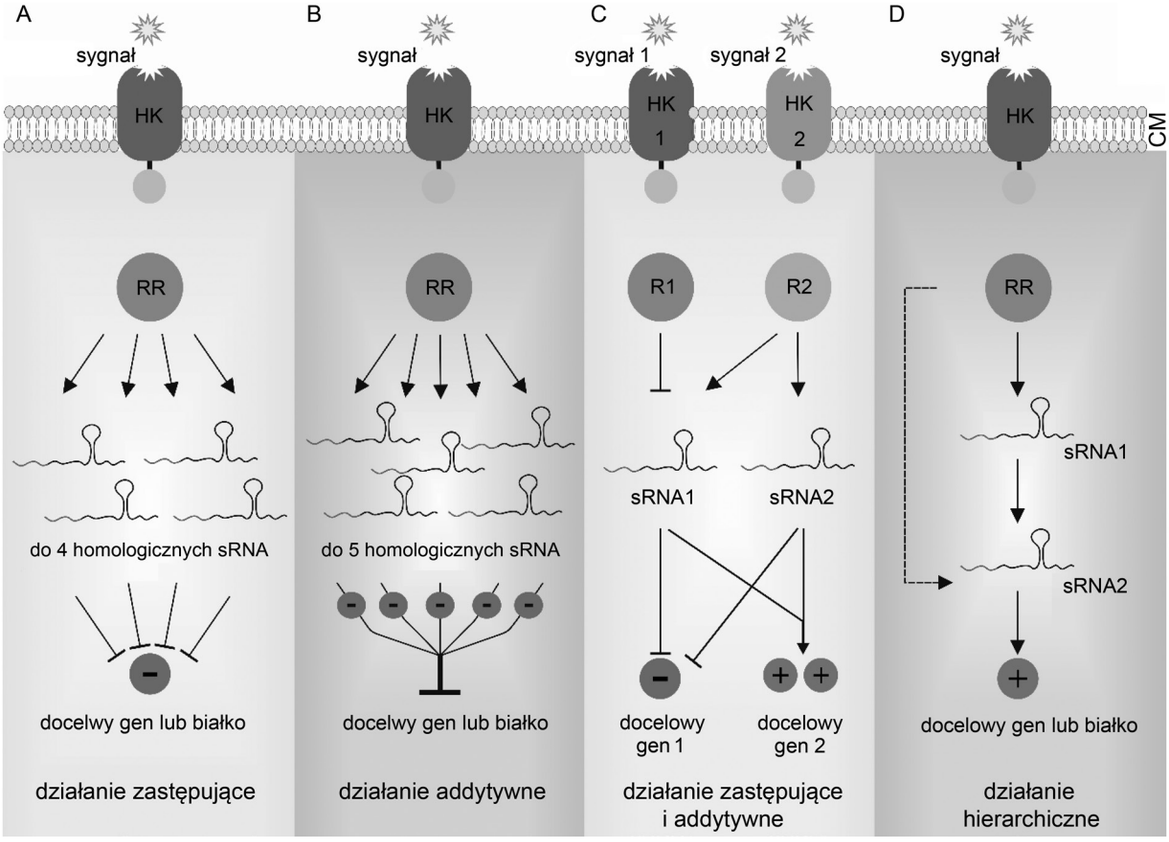
Prototypem TCS jest system EnvZ/OmpR. Jest to jeden z najlepiej poznanych i scharakteryzowanych systemów regulacyjnych, występujący u niepatogennego szczepu *E. coli* K-12. Jego funkcję poznano badając mechanizm regulacji syntezy poryn dyfuzji ogólnej w odpowiedzi na zmiany osmolarności środowiska [91]. Ekspresja genu *envZ* jest niższa niż genu *ompR*, pomimo lokalizacji obu genów w operonie *ompB*, będących pod kontrolą wspólnego promotora oraz ulegających transkrypcji w postaci pojedynczego policistronowego mRNA. Kinaza EnvZ jest zbudowana z 450 reszt aminokwasowych (aa) i zlokalizowana w błonie cytoplazmatycznej w postaci homodimeru. Składa się z peryplazmatycznej domeny receptora (48–162 aa), dwóch regionów transbłonowych (TM1, 16–47 aa oraz TM2, 163–179 aa), regionu łącznika (180–222 aa), jak również cytoplazmatycznej domeny kinazy (223–450 aa). Domena kinazy pełni funkcję, zarówno kinazy, jak i fosfatazy. Wykazano, że jest ona zbudowana z dwóch odrębnych domen funkcjonalnych: A (223–289 aa) i B (290–450 aa). Domena A, zawierająca miejsce autofosforylacji His-243, tworzy stabilny dimer i może być fosforylowana w obecności ATP przez domenę B, która występuje jako monomer. Fosforylowana domena A następnie przenosi wysokoenergetyczną grupę fosforanową na regulator OmpR. Ze względu na swoje unikalne cechy, domeny A i B określane są odpowiednio jako domena DHp (dimeryzacja i fosfotransfer) oraz

domena CA (katalityczna i wiążąca ATP) [14]. Z kolei regulator OmpR, aktywowany w wyniku fosforylacji z udziałem kinazy histydynowej, pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego. W jego N-końcowej domenie znajduje się konserwowana reszta aminokwasowa, kwas asparaginowy (Asp-55), na który przenoszona jest grupa fosforanowa. Zmiana allosteryczna zachodząca w białku pod wpływem tego procesu skutkuje wzmocnieniem wiązania się regulatora z DNA. Fosforylacja zwiększa dimeryzację OmpR i to wzmocnienie tego procesu jest energetyczną siłą napędową regulacji wiązania OmpR-DNA [28].

4. Charakterystyka oddziaływań pomiędzy dwuskładnikowymi systemami transdukcji sygnału a sRNA

Dwuskładnikowe systemy transdukcji sygnału tak samo jak małe, regulatorowe RNA są szeroko rozpowszechnionymi bakteryjnymi regulatorami ekspresji genów. W większości przypadków TCS kontrolują transkrypcję, zaś duża klasa sRNA działa jako potranskrypcyjne regulatory ekspresji genów, które modulują translację lub stabilność docelowego mRNA. Między tymi dwoma typami regulatorów wiele oddziaływań zostało ostatnio zbadanych, w wyniku czego powstają mieszane ścieżki regulacyjne TCS-sRNA [14]. Niezwykle często sRNA stanowią brakujące ogniwa pomiędzy TCS a genami docelowymi, a także biorą udział w angażowaniu TCS i ich regulonów do innych systemów regulacyjnych w odpowiedzi na różne bodźce środowiskowe. Wydaje się, że współdziałanie TCS-sRNA jest globalną cechą regulacyjną u wielu organizmów prokariotycznych [30, 74].

Oddziaływania pomiędzy TCS a sRNA występują powszechnie u bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych i zachodzą na różne sposoby (Ryc. 3). W takiej sieci regulatorowej ekspresja sRNA może być kontrolowana przez TCS i odwrotnie sRNA mogą regulować ekspresję genów wchodzących w skład danego systemu dwuskładnikowego [74].



Ryc. 3. Sposoby oddziaływań sRNA z TCS

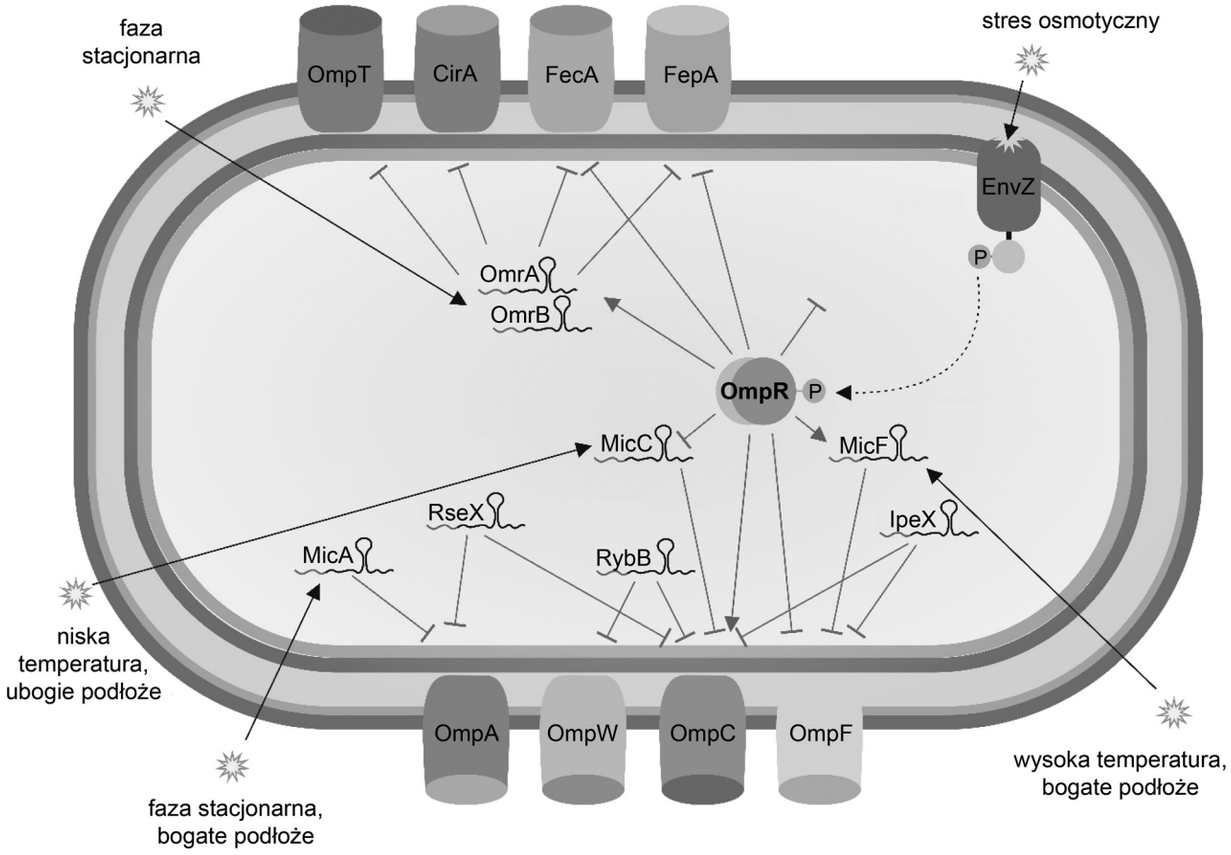
W odpowiedzi na sygnały środowiskowe dwuskładnikowe systemy transdukcji sygnału wpływają na poziom ekspresji wybranych sRNA, a te z kolei kontrolują ekspresję określonych genów w wieloraki sposób: **(A)** Kilka homologicznych sRNA działa na jeden cel, przy czym każdy sRNA ma zasadniczo taki sam wpływ na cel, jak wszystkie razem. Utrata jednego lub kilku sRNA jest kompensowana przez podwyższony poziom pozostałych sRNA (działanie zastępcze). **(B)** W przypadku addytywnie działających sRNA, każdy sRNA przyczynia się do zahamowania ekspresji docelowego genu, a najwyższy poziom hamowania osiąga się wtedy, gdy wszystkie sRNA działają razem. **(C)** Homologiczne sRNA mogą działać zastępczo na jeden gen, ale addytywnie na inny, ekspresja obu sRNA jest regulowana przez wspólny TCS, ale wyłącznie sRNA1 jest regulowane działaniem drugiego, jego aktywacja z kolei ma wpływ na cel 2, ale nie na cel 1. **(D)** sRNA1 działa pośrednio poprzez zapobieganie degradacji sRNA2, ten zaś reguluje ekspresję określonego genu. Na podstawie [31].

Zaletą regulacji z udziałem sRNA jest mniejszy koszt energetyczny potrzebny do ich wytworzenia oraz rozkładu, w porównaniu z białkami. Często obserwuje się nadmiarowość genów sRNA. Oznacza to, że utrata jednego konkretnego genu sRNA może być często kompensowana przez pozostałe, funkcjonalnie równoważne sRNA. Zróżnicowana transkrypcja funkcjonalnie powiązanych sRNA umożliwia precyzyjne „dostrojenie" ekspresji genów docelowych, dzięki czemu wiele sygnałów może być ze sobą zintegrowanych (Ryc. 3) [30, 102].

4.1. Regulacja ekspresji genów białek błony zewnętrznej z udziałem dwuskładnikowych systemów transdukcji sygnału i sRNA

Błona zewnętrzna (OM, outer membrane) chroni bakterie Gram-ujemne przed szkodliwymi czynnikami środowiska. Stanowi również pierwszą warstwę, którą muszą pokonać składniki odżywcze, aby dostać się do wnętrza komórki. Ułatwiają to odpowiednie kanały ogólnej lub specyficznej dyfuzji zbudowane z białek, zwanych porynami. Modelowy organizm *E. coli* ma kilka poryn, wśród których istotną funkcję pełnią poryny dyfuzji ogólnej OmpC i OmpF. OmpF to trimeryczne białko tworzące kanał o średnicy 1,2 nm, które umożliwia pasaż dużych (~ 350 Da) hydrofilowych i hydrofobowych cząstek, natomiast OmpC to trimer tworzący kanał o mniejszej średnicy, a więc wykorzystywany do pobierania mniejszych cząstek [42].

Biorąc pod uwagę znaczenie OM, nie dziwi fakt, że ekspresja poryn podlega złożonej regulacji na wielu poziomach (Ryc. 4). W osmoregulacji ekspresji *ompC* i *ompF* zaangażowany jest TCS EnvZ/OmpR. Warunki wysokiej osmolarności prowadzą do autofosforylacji osmosensora EnvZ, co z kolei skutkuje fosforylacją regulatora odpowiedzi OmpR (OmpR-P). Wysoki poziom ufosforylowanego OmpR aktywuje transkrypcję *ompC*, równocześnie hamując *ompF*. Ponieważ poryna OmpC jest stosunkowo nieprzepuszczalna dla soli żółci, uważa się, że ta regulacja nadaje *E. coli* tolerancję na sole żółci w wysokiej osmolarności, a więc w warunkach panujących w jelicie zwierząt i ludzi. Przy niskiej osmolarności poziom OmpR-P spada, co hamuje ekspresję *ompC*, ale aktywuje *ompF*. Sprzyja



Ryc. 4. Kontrola ekspresji białek błony zewnętrznej u *E. coli* za pomocą sRNA i TCS EnvZ/OmpR

Potranskrypcyjna modulacja ekspresji poryn jest precyzyjnie kontrolowana przez zestaw sRNA w wyniku działania różnych bodźców odbieranych przez TCS EnvZ/OmpR. Ponadto inne czynniki, takie jak faza wzrostu, dostępność składników odżywczych i temperatura również wpływają na ekspresję genów kodujących sRNA (czarne strzałki). Pozytywną kontrolę ekspresji genów zaznaczono niebieskimi strzałkami, natomiast negatywną czerwonymi liniami tępo zakończonymi, linia kropkowana wskazuje na fosfotransfer. Na podstawie [103].

to pobieraniu składników odżywczych przez porynę OmpF w środowisku ubogim w składniki odżywcze, a więc poza organizmem gospodarza [68].

Na poziomie potranskrypcyjnym w ekspresję poryn zaangażowane są antysensowe RNA, MicC (109 nt) oraz MicF (93 nt). MicC wiąże się komplementarnie z liderowym mRNA *ompC* w obecności Hfq i tym samym blokuje wiązanie rybosomu. W mutancie *ompR* zaobserwowano wyższy poziom MicC niż w typie dzikim, co sugeruje, że OmpR bezpośrednio lub pośrednio hamuje ekspresję *micC* [18]. W podobny sposób sRNA MicF reguluje potranskrypcyjnie ekspresję *ompF*. Równolegle z *ompC*, ekspresja *micF* jest indukowana wysoką osmolarnością z udziałem systemu EnvZ/OmpR. MicF jest komplementarny do miejsca wiązania rybosomu i kodonu start AUG w mRNA *ompF*, a to oddziaływanie prowadzi do zahamowania translacji. Podobnie jak MicC, MicF wiąże białko Hfq. Różne czynniki środowiskowe, oprócz stresu osmotycznego, mogą indukować ekspresję *micF*, tj. stres oksydacyjny, wzrost temperatury, bogactwo składników odżywczych, obecność soli żółci, słabych kwasów czy niektórych antybiotyków [117].

Oprócz MicC i MicF system transdukcji sygnału EnvZ/OmpR kontroluje ekspresję sRNA OmrA (88 nt) i OmrB (82 nt) [31]. Są to dwa homologiczne sRNA, które różnią się ok. 30 nukleotydami w środkowej części sekwencji nukleotydowej [35]. Obydwa wiążą Hfq i wiążąc się komplementarnie z docelowym mRNA obniżają jego stabilność lub potencjał translacyjny. Transkrypcja tych sRNA jest pozytywnie regulowana przez TCS EnvZ/OmpR w warunkach wysokiej osmolarności. Słabą ekspresję genów kodujących sRNA OmrA i OmrB zaobserwowano w podłożu minimalnym, natomiast maksymalną w podłożu bogatym, w fazie stacjonarnej dla OmrA oraz w fazie logarytmicznej i stacjonarnej dla OmrB [3, 108]. Ponadto, poziom ekspresji OmrB obniża się w późnej fazie stacjonarnej, natomiast OmrA w tych warunkach ulega akumulacji [106]. Z drugiej strony OmrA/B kontrolują ekspresję genów systemu EnvZ/OmpR [37, 14]. Działanie OmrA i OmrB u *E. coli* polega na hamowaniu ekspresji genów białek błonowych, CirA i OmpT. Białko CirA bierze udział w procesie transportu żelaza, natomiast OmpT to proteaza zlokalizowana w błonie cytoplazmatycznej. Obydwa sRNA regulują również ekspresję genów białek receptorowych FepA i FecA, które rozpoznają kompleksy żelaza z sideroforami i uczestniczą w transporcie żelaza do komórki. Kompleks TonB-ExbB-ExbD zlokalizowany w osłonach dostarcza energii do transportu [74, 76]. Receptory, które są celem działania OmrA/B, są również wykorzystywane przez bakteriofagi lub kolicyny w celu wniknięcia do komórki bakteryjnej. Wydaje się więc, że obniżanie poziomu białek OM w warunkach podwyższonej osmolarności, czyli w warunkach jakie panują w organizmie gospodarza, może być korzystne ponieważ pozwala to na ochronę bakterii przed szkodliwym działaniem toksyn czy bakteriofagów [78].

Kolejnym białkiem OM odgrywającym istotną rolę, przede wszystkim strukturalną, jest OmpA. Białko to występuje w około 100 000 kopii na komórkę, co czyni je jednym z głównych białek błony zewnętrznej *E. coli*, które przyczynia się do utrzymania integralności osłon. Białko to ulega translacji z niezwykle stabilnego mRNA o okresie półtrwania ~ 15 min w fazie logarytmicznego wzrostu. W fazie stacjonarnej okres półtrwania jest skrócony do ~ 4 min. Stabilność tego mRNA zależy od końca 5'-UTR, z którym wiąże się sRNA MicA (75 nt) w obecności Hfq. Sama ekspresja *micA* zachodzi silnie w bogatym podłożu, gdy komórki wchodzą w fazę stacjonarną wzrostu. Wysoki poziom MicA blokuje wiązanie rybosomu z mRNA *ompA*, co ułatwia cięcie przez RNazę E, a następnie rozpad tego mRNA [80, 100]. Wydaje się, że OmpA może odgrywać zarówno pozytywną, jak i negatywną rolę podczas infekcji. Mutanty *E. coli* pozbawione OmpA są mniej zjadliwe w modelach embrionalnych kurcząt i noworodków szczurzych [111]. Ponadto, OmpA jest specyficznie wiązane przez główne białko surowicy ssaków, amyloid A, zaangażowane w odpowiedź immunologiczną [40] i jest wymagane do zabijania bakterii przez elastazę neutrofili w trakcie zakażenia [5]. Zatem zróżnicowana ekspresja *ompA* na różnych etapach wzrostu bakterii *in vivo* może być kluczowa dla zjadliwości. Zmniejszenie bowiem jego ekspresji w odpowiednim czasie może ograniczyć odpowiedź immunologiczną gospodarza.

Wśród innych sRNA, które uczestniczą w regulacji ekspresji poryn znalazły się RybB, IpeX oraz RseX [34]. RybB (sRNA o długości 81 nt) jest syntetyzowany w sposób zależny od σE i oddziałuje z białkiem Hfq [106]. Okazało się, że wśród celów działania tego sRNA są mRNA genów *ompC* i *ompW*. Gen *ompW* koduje porynę wykazującą dużą homologię do OmpC [46]. Kolejny sRNA, IpeX działa potranskrypcyjnie i wpływa na obniżenie ekspresji *ompC* oraz *ompF*, ale prawdopodobnie inaczej niż MicC i MicF. Wykazano, że destabilizacja mRNA *ompC* odbywająca się za pośrednictwem IpeX jest niezależna od Hfq. Ponadto nie stwierdzono występowania komplementarności sekwencji pomiędzy tym sRNA a mRNA *ompC*, co sugeruje, że hamowanie ekspresji może nie obejmować prostego parowania zasad między dwiema cząsteczkami RNA [17]. Inny sRNA, RseX uczestniczy w obniżaniu ekspresji *ompA* i *ompC*, dzięki zdolności do dość rozległego parowania zasad w miejscach wiązania rybosomów zarówno w mRNA *ompA*, jak i *ompC* [23].

Ciekawą obserwacją jest to, że dany gen regulatorowego sRNA często znajduje się w pobliżu genu poryny innej niż ta, której ekspresja zależy od tego sRNA. Mianowicie *micF* i *micC* znajdują się w chromosomie odpowiednio powyżej genów *ompC* i *ompN*, *rseX* jest

położony powyżej genu *ompS1*, podczas gdy *ipeX* jest zlokalizowany poniżej *nmpC*. To bliskie położenie genów poryny i sRNA, które z kolei przyczyniają się do obniżenia syntezy innych poryn, może sugerować, że komórka potrzebuje mechanizmów do utrzymywania pod ścisłą kontrolą całkowitego ładunku poryn w OM. Badania ilościowe wskazują, że chociaż względne poziomy OmpC i OmpF zmieniają się w zależności od warunków wzrostu, sumaryczna ilość tych dwóch poryn jest ogólnie stała [34].

4.2. Wpływ dwuskładnikowych systemów transdukcji sygnału i sRNA na proces tworzenia biofilmu

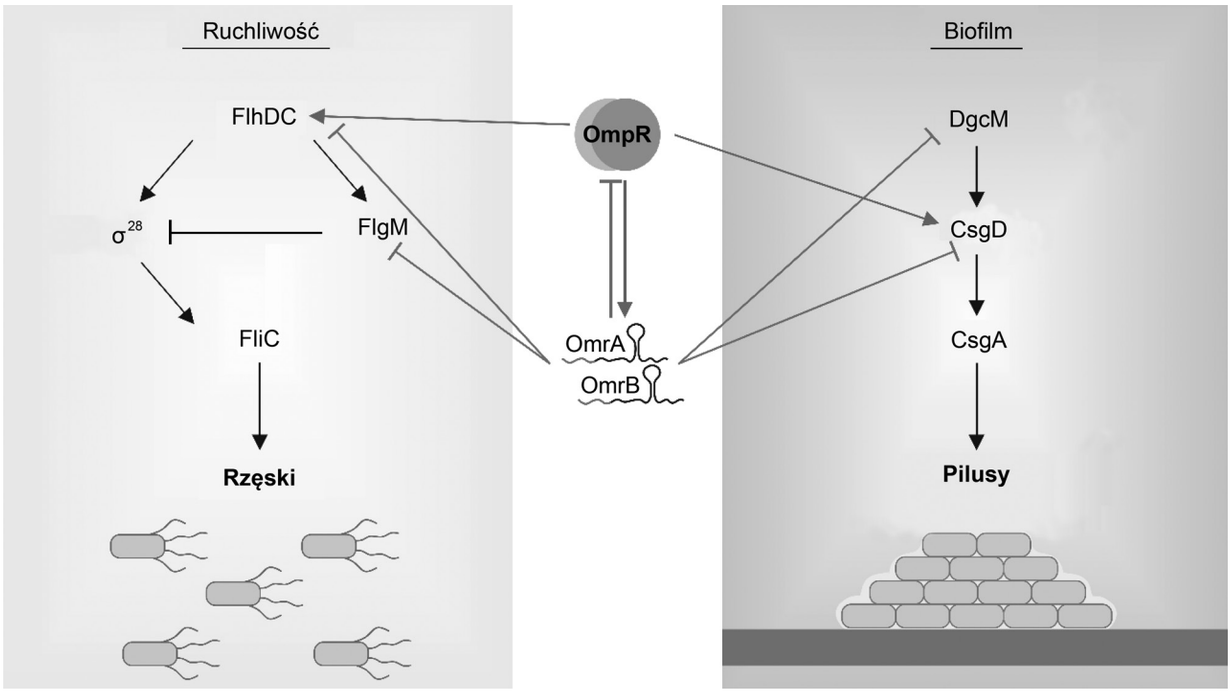
Biofilm jest strukturą tworzoną przez skupiska mikroorganizmów, które przylegają do powierzchni biotycznych i abiotycznych, jak również do siebie nawzajem, a zanurzone są w macierzy zewnątrzkomórkowych polimerów, które chronią mikroorganizmy przed wysychaniem i działaniem substancji toksycznych [22, 38, 104]. Biofilmy mogą być złożone z jednego bądź wielu gatunków bakterii. Charakteryzuje je trójwymiarowość struktury i przestrzenna heterogeniczność, co powoduje powstawanie gradientów odżywczych i chemicznych. Wynikiem tego jest tworzeniem się mikroniszy w obrębie całej społeczności drobnoustrojów, w których dochodzi do zróżnicowanej w czasie i przestrzeni ekspresji genów. Biofilmy odgrywają istotną rolę w patogenezie wielu chorób bakteryjnych. Patogeny rosnąc w postaci biofilmu stają się niewrażliwe na odpowiedź układu immunologicznego czy oporne na działanie antybiotyków [104].

Bakterie *E. coli* oraz *S. enterica* zmieniają swój styl życia w odpowiedzi na dostępność składników odżywczych, tj. mogą tworzyć biofilm lub żyć w postaci planktonicznej. Stany te są ogólnie uważane za wzajemnie wykluczające się, co znajduje odzwierciedlenie w złożonych systemach kontroli transkrypcji, które promują jeden stan, jednocześnie hamując drugi. W tych decyzjach kluczową rolę odgrywają aktywatory transkrypcji FlhDC i CsgD, kontrolujące odpowiednio biosyntezę rzęski lub tworzenie biofilmu (synteza fimbrii spiralnych/celulozy) [60, 84]. Rzęska to złożone organellum, które aby powstać wymaga skoordynowanej ekspresji ponad 60 genów zgrupowanych w wielu operonach [25]. Na szczycie tej hierarchicznej kaskady regulacyjnej u *E. coli* znajduje się aktywator FlhDC, który kontroluje transkrypcję genów klasy II, zależną od głównego czynnika sigma polimerazy RNA (σ70) [20]. W skład tej klasy wchodzą geny kodujące białka strukturalne i pomocnicze konieczne do utworzenia ciała podstawowego i haka, elementów składowych rzęski oraz dwa geny kodujące białka regulatorowe, tj. FlgM i σ28 (FliA). FliA jest pozytywnym regulatorem ekspresji genów klasy III, zwiększa także transkrypcję genów klasy II zależnych od FlhDC. Z kolei FlgM to tzw. czynnik anty-sigma. We wczesnej fazie składania rzęski aktywność FliA jest hamowana przez FlgM, który ściśle wiąże się z FliA. Po złożeniu podstawowego korpusu haka powstaje system sekrecji typu III, który jest zdolny do wydzielania zarówno białkowych podjednostek rzęski, jak i FlgM. Powoduje to uwolnienie FliA, który wiążąc się z rdzeniem polimerazy RNA (RNAP) aktywuje transkrypcję genów klasy III [49].

W przypadku wzrostu bakterii w postaci biofilmu kluczowym regulatorem tego procesu jest CsgD. Białko to moduluje ekspresję, nie tylko operonu *csg* kodującego komponenty fimbrii spiralnych i procesu ich składania [37], ale także zestawu genów, których produkty umożliwiają adaptację bakterii do osiadłego stylu życia [12, 21]. Cyklaza diguanylowa DgcM ma wpływ na poziom ekspresji *csgD*. Ten enzym bezpośrednio stymuluje aktywność białka MlrA, uczestniczącego w pozytywnej regulacji transkrypcji *csgD* (Ryc. 5) [88]. Kontrola ekspresji genów *flhDC* i *csgD* kodujących dwa kluczowe regulatory, jest złożonym procesem. Na poziomie transkrypcji istotne funkcje pełnią regulatory MlrA, OmpR i sigma RpoS oraz cykliczny di-GMP [79, 84].

W regulacji potranskrypcyjnej *flhDC* lub *csg* uczestniczą różne sRNA, tj. OmrA/B, McaS, RprA, GcvB, RydC, ArcZ oraz OxyS [59, 60, 63, 84]. Ważną rolę pełnią OmrA/B, które hamują ekspresję genów *flhDC*, *csgD*, jak również *ompR*, *flgM* oraz *dgcM*. System EnvZ/OmpR jest aktywatorem ekspresji *csgD*, jak również *omrA* i *omrB*, tworząc w ten sposób pętlę ujemnego sprzężenia zwrotnego [14]. Chociaż ten sam motyw sekwencji zlokalizowany w regionie 5' sRNA jest używany do tworzenia komplementarnych par zasad ze wszystkimi celami mRNA, to molekularne mechanizmy kontroli z ich udziałem różnią się. W przypadku mRNA *ompR*, sRNA OmrA/B blokują miejsce wiązania rybosomu, podczas gdy wiążą się daleko powyżej miejsca SD w mRNA *csgD*, co prowadzi do zahamowania translacji. Natomiast potranskrypcyjna regulacja ekspresji *dgcM* polega na zależnej od Hfq przebudowie struktury mRNA w celu ułatwienia wiązania OmrA/B. Najnowsze badania wskazują, że OmrA/B hamują ekspresję *flgM*, czyli pośrednio wzmacniają ekspresję genów rzęskowych klasy III [84]. Można więc stwierdzić, że OmrA i OmrB hamują procesy prowadzące do tworzenia biofilmu, ale z drugiej strony mogą hamować również ruchliwość. Sugeruje to istnienie złożonego potranskrypcyjnego mechanizmu regulacji, który może mieć wpływ, zarówno na osiadły, jak i ruchliwy tryb życia (Ryc. 5). Tak więc regulacja ekspresji genów zależna od OmrA/B łączy ze sobą różne sieci regulatorowe, aby precyzyjnie koordynować stan fizjologiczny bakterii [35, 84].

Jedną z kolejnych bakterii chorobotwórczych, u której zaobserwowano oddziaływania TCS z sRNA w kontroli procesu formowania biofilmu jest *Vibrio*



Ryc. 5. Wpływ białka OmpR oraz sRNA OmrA/OmrB na ruchliwość i tworzenie biofilmu u *Enterobacteriaceae*

Wpływ kluczowych regulatorów na ekspresję genów, których produkty związane są z ruchliwością i tworzeniem biofilmu przedstawiono za pomocą czarnych linii. Czerwone linie przedstawiają potranskrypcyjną inhibicję z udziałem sRNA. Niebieskie linie przedstawiają aktywację z udziałem białka OmpR. Na podstawie [80 i 85].

cholerae. Jest to patogen układu pokarmowego człowieka, czynnik etiologiczny cholery. Za jego wysoką patogenność odpowiada głównie toksyna cholery (CT, Cholera toxin) oraz pilusy typu IV (TCP, toxin co-regulated pilus), które łącząc bakterie w mikrokolonie, chronią je przed układem immunologicznym gospodarza i pozwalają na koncentrację wydzielanej toksyny [96]. W regionach endemicznych, *V. cholerae* zwykle występuje w zbiornikach wodnych i tam tworzy struktury biofilmu [110]. Na tym etapie istotna jest ekspresja genów *vps* kodujących egzopolisacharyd (VPS, *Vibrio* polysaccharide), który uczestniczy w tworzeniu biofilmu. Patogen ten posiada w swoim genomie osiemnaście genów *vps*, które zgrupowane są w dwóch klastrach. Wykazano, iż mutanty w genach *vpsD*, *vpsI*, *vpsK* i *vpsL*, charakteryzują się brakiem zdolności do wytwarzania VPS oraz znacznym obniżeniem zdolności do tworzenia biofilmu [26]. *V. cholerae* wykorzystuje TCS, aby za ich pomocą regulować proces tworzenia biofilmu w odpowiedzi na bodźce pochodzące ze środowiska [26, 97]. W genomie *V. cholerae* zidentyfikowano geny kodujące potencjalne 43 kinazy histydynowe (HK) i 53 regulatory odpowiedzi (RR) [97]. Wśród nich, białka VpsR, VpsT i LuxO są aktywatorami tworzenia biofilmu, natomiast PhoB, VarA, VieA i CarR są represorami tego procesu [6, 7, 15, 38, 54, 94, 98, 116].

TCS, który hamuje pośrednio tworzenie biofilmu u *V. cholerae* jest system VarS/A. Bierze on udział w aktywacji ekspresji *csrBCD,* kodujących sRNA, które z kolei hamują ekspresję globalnego regulatora CsrA [53]. Jest to potranskrypcyjny regulator różnych procesów, w tym metabolizmu węgla i tworzenia biofilmu [82, 83]. Obniżony poziom CsrA przekłada się m.in. na niski poziom Qrr1-4, co prowadzi do odblokowania translacji *hapR*, a w efekcie do zmniejszonej ekspresji genów *vps* [53]. Innymi TCS, które hamują proces tworzenia biofilmu są systemy VieS/A, CarS/R oraz NtrB/C. Regulator VieA działa niezależnie od swojej pokrewnej kinazy histydynowej, bowiem domena EAL tego białka, o aktywności fosfodiesterazy diguanylowej, odpowiada za degradację wtórnego przekaźnika c-di-GMP, który jest ważnym pozytywnym regulatorem tworzenia biofilmu [95]. Natomiast system CarS/R negatywnie reguluje ekspresję *vps*, a transkrypcja genów tego TCS obniża sę w odpowiedzi na wzrost jonów wapnia w środowisku zewnętrznym [7].

Kolejny system TCS, VxrA/B indukuje powstawanie biofilmu [97, 99]. Geny *vxrAB* wchodzą w skład operonu, który zawiera jeszcze trzy geny o nieznanej funkcji. Mutanty *V. cholerae* Δ*vxrA* i Δ*vxrB* wykazują obniżoną zdolność do tworzenia biofilmu, podczas gdy w mutancie Δ*vxrC* zaobserwowano zwiększenie tworzenia biofilmu. Z kolei, nadekspresja *vxrB* prowadzi do zahamowania ruchliwości. Wykazano również pozytywny wpływ systemu VxrA/B na poziom cyklicznego di-GMP (c-di-GMP) oraz ekspresję *vpsR* i *vpsT*, kodujących dwa główne regulatory procesu tworzenia biofilmu [97].

Oddziaływania pomiędzy sRNA a TCS zostały również dobrze poznane u *Pseudomonas aeruginosa*. Jest to bakteria Gram-ujemna, znana pod nazwą pałeczki ropy błękitnej, będąca częstym patogenem izolowanym w środowisku szpitalnym. Powoduje ona infekcje o wysokim wskaźniku śmiertelności, co jest związane z wysoką opornością patogenu na wiele środków przeciwdrobnoustrojowych, która często powoduje oporność wielolekową [75]. *P. aeruginosa* posiada ponad 400 czynników transkrypcyjnych, 34 sRNA oraz ponad 60 funkcjonalnych TCS. Wszystkie razem te komponenty budują skomplikowaną i rozległą sieć regulatorową [101]. Jednym z istotniejszych TCS u tego patogenu jest system GacS/A [115]. Kinaza histydynowa GacS przenosi grupę fosforanową na regulator odpowiedzi GacA, który ufosforylowany reguluje ekspresję m.in. *rsmY* i *rsmZ,* kodujących sRNA. Te zaś mogą zapobiegać wiązaniu się rybosomu z sekwencją SD i hamować translację mRNA *rsmA*, kodującego regulator transkrypcji, który jest homologiem CsrA [51]. RsmA kontroluje ekspresję genów systemu sekrecji III typu (T3SS), wytwarzania pili IV typu, ruchliwości oraz wytwarzania biofilmu [115]. RetS i LadS to hybrydowe kinazy sensorowe, które uczestniczą w kontroli ekspresji systemu T3SS oraz tworzenia biofilmu [8]. Pomimo intensywnych badań systemu GacS/A, nie zidentyfikowano sygnałów środowiskowych wyzwalających fosforylację kinaz GacS, LadS i RetS [45].

4.3. Udział TCS i sRNA w regulacji procesu quorum sensing

Gęstość komórek wpływa na ekspresję genów wirulencji u wielu patogennych bakterii, a odbywa się to za pośrednictwem zjawiska quorum sensing (QS) [65]. Chociaż wiele z tych systemów aktywuje ekspresję genów wirulencji przy wysokiej gęstości komórek, u *V. cholerae* jest odwrotnie, gdyż QS wpływa na obniżenie ekspresji genów wirulencji w tych warunkach [64, 118]. System ten jest niezwykle złożony, ponieważ obejmuje co najmniej trzy obwody sensoryczne, które aktywują regulator odpowiedzi LuxO. *V. cholerae* posiada dwa główne autoinduktory: CAI-1, specyficzny dla danego rodzaju bakterii [41, 50, 64] oraz AI-2, wykorzystywany do komunikacji międzygatunkowej [19, 76]. Receptorami dla CAI-1 i AI-2 są odpowiednio CqsS i LuxPQ [4, 64, 67]. W przypadku braku autoinduktora CqsS i LuxPQ działają jako kinazy, które fosforylują białko LuxU, a następnie grupa fosforanowa jest przekazywana na regulator LuxO [27]. Ufosforylowany LuxO aktywuje transkrypcję genów kodujących cztery sRNA: Qrr1-4 [53, 85]. Te sRNA aktywują ekspresję *aphA* oraz hamują ekspresję *hapR*, genów kodujących nadrzędne regulatory QS, które działają w sposób zależny od gęstości komórek [53, 85]. Przy niskiej gęstości komórek syntetyzowany jest regulator AphA, ale nie HapR. W warunkach wysokiej gęstości, CqsS i LuxPQ po związaniu ze swoimi autoinduktorami, przełączają się z aktywności kinazy na aktywność fosfatazy i defosforylują LuxO za pośrednictwem LuxU. Z kolei, defosforylowany LuxO jest nieaktywny, więc transkrypcja *qrr1-4* nie zachodzi. W przypadku braku Qrr sRNA, nie ma aktywacji translacji *aphA*, natomiast translacja *hapR* nie jest już tłumiona, a nagromadzony HapR działa jako represor ekspresji genów *vps*. Dwa inne receptory QS, CqsR i VpsS, w odpowiedzi na niezidentyfikowane dotychczas ligandy, również przekazują informacje do systemu QS za pośrednictwem LuxU [49, 91]

Powszechnie wiadomo, że odpowiednie stężenie żelaza jest wymagane do przeżycia bakterii [81, 114]. Niemniej jednak żelazo nie jest pierwiastkiem łatwo dostępnym w środowisku naturalnym ze względu na jego niską rozpuszczalność w neutralnym pH [72]. Ponadto, bakteriom chorobotwórczym bardzo trudno jest konkurować o żelazo z komórkami gospodarza, dlatego są one wyposażone w różne mechanizmy skutecznego wychwytu żelaza w środowisku gospodarza [16]. Okazało się, że poziom żelaza wpływa na szlak QS, bowiem pierwiastek ten hamuje wytwarzanie autoinduktora AI-2 [112, 113]. Wydaje się, że jedną z najważniejszych funkcji QS jest kontrolowanie ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji patogenu, który atakując komórki gospodarza pozyskuje składniki odżywcze, m.in. żelazo.

Nadrzędnym regulatorem kontrolujących homeostazę żelaza u bakterii, zarówno Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich jest represor Fur [24, 39]. U *V. vulnificus,* Fur w obecności żelaza hamuje ekspresję genów *luxO*, *smcR* oraz genów *qrr*. Jednakże wprowadzona delecja w genie *fur* nie znosiła w pełni obserwowanej represji [113]. Okazało się, że istnieją dodatkowe czynniki kontrolujące system QS. Przeprowadzone analizy wykazały udział sRNA RyhB w kontroli ekspresji genu *luxS*, którego produkt uczestniczy w biosyntezie AI-2 [52]. Ten rodzaj regulacji zapewnia ciągły podstawowy poziom syntezy AI-2, nawet w obecności żelaza, zamiast gwałtownego hamowania ekspresji przy udziale regulatora Fur. Po raz pierwszy RyhB (90 nt) został zidentyfikowany u *E. coli*. W toku badań wykazano, że ten sRNA hamuje ekspresję genów, których produkty uczestniczą w magazynowaniu i wykorzystaniu żelaza, kiedy stężenie tego pierwiastka w środowisku jest niskie [63]. Ponadto, ekspresja samego *ryhB* u *E. coli* jest hamowana przez Fur w odpowiedzi na wysoki poziom żelaza w środowisku [103]. RyhB zmniejsza stabilność specyficznych transkryptów, gdy wraz z Hfq przyłącza się do komplementarnej sekwencji w docelowej cząsteczce mRNA [63, 103]. W dalszej degradacji, zarówno docelowego mRNA, jak i RyhB,

pośredniczą RNaza E i RNaza III [2, 61]. RyhB reguluje ekspresję co najmniej 18 operonów, które zawierają łącznie 56 genów [62]. Może to świadczyć o złożonej roli tego sRNA, nie tylko w metabolizmie, ale również patogenezie wielu enterobakterii.

5. Podsumowanie

Regulatorowe sRNA, będące od niedawna obiektem intensywnych badań u bakterii, stanowią ważny element kontroli ekspresji genów w złożonych sieciach regulacyjnych. Nowe osiągnięcia technologiczne dostarczyły potężnych narzędzi do badania tych procesów. Ujawniono liczne wzajemne połączenia sRNA ze ścieżkami transdukcji sygnału, co zapewnia patogenom odpowiednio szybką reakcję na zmieniające się warunki środowiska i przetrwanie wewnątrz organizmu żywiciela. Zdobywanie wiedzy na temat molekularnych mechanizmów zaangażowanych w te odpowiedzi adaptacyjne i interakcje patogenów z ich gospodarzami toruje drogę do opracowania nowych strategii przeciwdrobnoustrojowych, co stanowi wyzwanie na nadchodzące lata.

Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu Preludium-17, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (NCN, Polska), przyznanych na podstawie umowy nr 2019/33/N/NZ1/00484.

Konflikt interesów

dr hab. Adrianna Raczkowska oraz dr Karolina Jaworska są członkami redakcji Postępów Mikrobiologii. dr hab. Adrianna Raczkowska oraz dr Karolina Jaworska deklarują, że nie wywierały wpływu na proces recenzji i decyzyjny komitetu redakcyjnego podczas powstawania niniejszej pracy.

Piśmiennictwo

1. Adam K., Hunter T.: Histidine kinases and the missing phosphoproteome from prokaryotes to eukaryotes. *Lab. Invest.* **98**, 233–247 (2017)
2. Afonyushkin T., Vecerek B., Moll I., Blasi U., Kaberdin V.: Both RNase E and RNase III control the stability of *sodB* mRNA upon translational inhibition by the small regulatory RNA RyhB. *Nucleic Acids Res.* **33**, 1678–1689 (2005)
3. Argaman L., Hershberg R., Vogel J., Bejerano G., Wagner E.G., Margalit H., Altuvia S.: Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr Biol.* **11**, 941–950 (2001)
4. Bassler B.L., Bejerano G., Silverman M.: Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol. Microbiol.* **13**, 273–286 (1994)
5. Belaaouaj A., Kim K., Shapiro S.: Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science*, **289**, 1185–1188 (2000)
6. Bilecen K., Fong J.C.N., Cheng A., Jones C.Z., Zamorano-Sánchez D., Yldiz F.H.: Polymyxin B resistance and biofilm formation in *Vibrio cholerae* are controlled by the response regulator CarR. *Infect Immun.* **83**, 1199–1209 (2015)
7. Bilecen K., Yildiz F.H.: Identification of a calcium-controlled negative regulatory system affecting *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Environ. Microbiol.* **11**, 2015–2029 (2009)
8. Bordi C., Filoux A. i wsp.: Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **76**, 1427–1443 (2010)
9. Bouvier M., Sharma C.M., Mika F., Nierhaus K.N., Vogel J.: Small RNA binding to 5' mRNA coding region inhibits translational initiation. *Mol. Cell.* **32**, 827–837 (2008)
10. Brantl S.: Regulatory mechanisms employed by *cis*-encoded antisense RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 102–109 (2007)
11. Bretl D.J. Demetriadou C., Zahrt T.C.: Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**, 566–582 (2011)
12. Brombacher E., Barrato A., Dorel C., Landini P.: Gene expression regulation by the curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *J. Bacteriol.* **188**, 2027–2037 (2006)
13. Brosse A. Korobeinikova A., Gottesman S., Guillier M.: Unexpected properties of sRNA promoters allow feedback control via regulation of a two-component system. *Nucleic Acids Res.* **44**, 9650–9666 (2016)
14. Cai S.J., Inouye M.: EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 24155–24161 (2002)
15. Casper-Lindley C., Yildiz F.H.: VpsT is a transcriptional regulator required for expression of *vps* biosynthesis genes and the development of rugose colonial morphology in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J. Bacteriol.* **186**, 1574–1578 (2004)
16. Cassat J.E., Skaar E.P.: Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe*, **13**, 509–519 (2013)
17. Castillo-Keller M., Vuong P., Misra R.: Novel mechanism of *Escherichia coli* porin regulation. *J. Bacteriol.* **188**, 576–586 (2006)
18. Chen S., Zhang A., Blyn L., Storz G.: MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 6689–6697 (2004)
19. Chen X., Schauder S., Potier N., VanDorsselaer A., Pelczer I., Bessler B.L., Hughson F.: Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, **415**, 545–549 (2002)
20. Chilcott G.S., Hughes K.T.: Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 694–708 (2000)
21. Chirwa N.T., Herrington M.B.: CsgD, a regulator of curli and cellulose synthesis, also regulates serine hydroxymethyltransferase synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* (Reading), **149**, 525–535 (2003)
22. Czyżewska-Dors E., Dors A., Pomorska-Mól M.: Właściwości biofilmu bakteryjnego warunkujące oporność na antybiotyki oraz metody jego zwalczania. *Zycie Weterynaryjne*, **93**, 765–771 (2018)
23. Douchin V., Bohn C., Bouloc P.: Down-regulation of porins by a small RNA bypasses the essentiality of the regulated intramembrane proteolysis protease RseP in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **281**, 12253–12259 (2006)
24. Escolar L., Perez-Martin J., de Lorenzo V.: Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* **181**, 6223–6229 (1999)

25. Fitzgerald D.M., Bonocora R., Wade J.: Comprehensive mapping of the *Escherichia coli* flagellar regulatory network. *PLoS Genet.* **10**, e1004649 (2014)
26. Fong J.C.N., Syed K., Klose K., Yldiz F.: Role of *Vibrio* polysaccharide (*vps*) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology* (Reading). **156**, 2757–2769 (2010)
27. Freeman J.A., Bassler B.L.: A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol. Microbiol.* **31**, 665–677 (1999)
28. Gao R., Stock A.M.: Biological insights from structures of two--component proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 133–154 (2009)
29. Gimpel M.: The world of small RNAs and regulatory peptides in prokaryotes. https://schaechter.asmblog.org/schaechter/2019/04/the-world-of-small-rnas-and-regulatory-peptides-in-prokaryotes.html (dostęp: 06.09.2022)
30. Göpel Y., Görke B.: Rewiring two-component signal transduction with small RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 132–139 (2012)
31. Gottesman S., McCullen C.A., Guillier M., Vanderpool C.K., Majdalani N., Benhammou J., Thompson K.M., FitzGerald P.C., Sowa N.A., FitzGerald D.J.: Small RNA regulators and the bacterial response to stress. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **71**, 1–11 (2006)
32. Gottesman S.: Small RNAs shed some light. *Cell*, **118**, 1–2 (2004)
33. Gottesman S., Storz G.: Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 12, (2011)
34. Guillier M., Gottesman S., Storz G.: Modulating the outer membrane with small RNAs. *Genes Dev.* **20**, 2338–2348 (2006)
35. Guillier M., Gottesman S.: Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs. *Mol. Microbiol.* **59**, 231–247 (2006)
36. Guillier M., Gottesman S.: The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6781–6794 (2008)
37. Hammar M., Arnqvist A., Bian Z., Olsen A., Normark S.: Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **18**, 661–670 (1995)
38. Hammer B.K., Bassler B.L.: Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **50**, 101–104 (2003)
39. Hantke K.: Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 172–177 (2001)
40. Hari-Dass R., Shah C., Meyer D., Raynes J.: Serum amyloid A protein binds to outer membrane protein A of gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* **280**, 18562–18567 (2005)
41. Higgins D.A. Pomianek M., Kraml C., Taylor R., Semmelhack M., Bassler B.: The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. *Nature*, **450**, 883–886 (2007)
42. Hikita C., Satake Y., Yamada H., Mizuno T., Mizushima S.: Structural and functional characterization of the OmpF and OmpC porins of the *Escherichia coli* outer membrane: studies involving chimeric proteins. *Res. Microbiol.* **140**, 3, 177–190 (1989)
43. Hoch J.A.: Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 165–170 (2000)
44. Holmqvist E., Vogel J.: A small RNA serving both the Hfq and CsrA regulons. *Genes Dev.* **27**, 1073–1078 (2013)
45. Jimenez P.N., Koch G., Thompson J., Xavier K., Cool R., Quax W.: The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 46–65 (2012)
46. Johansen J. Rasmussen A., Overgaard M., Valentin-Hansen P.: Conserved small non-coding RNAs that belong to the sigmaE regulon: role in down-regulation of outer membrane proteins. *J. Mol. Biol.* **364**, 1–8 (2006)
47. Juda M., Dadas E., Malm A.: Rola dwuskładnikowych systemów regulacyjnych w chorobotwórczości i lekooporności bakterii. *Post. Microbiol.* **46**, 237–247 (2007)
48. Jung S.A., Chapman C., Ng W.: Quadruple quorum-sensing inputs control *Vibrio cholerae* virulence and maintain system robustness. *PLoS Pathog.* **11**, e1004837 (2015)
49. Karlinsey J.E., Tanaka S., Bettenworth V., Yamaguchi S., Boos W., Aizawa S., Hughes K.: Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and *fliC* transcription. *Mol. Microbiol.* **37**, 1220–1231 (2000)
50. Kelly R.C., Bolitho M., Higgins D., Lu W., Ng W., Jeffrey P., Robinowitz J., Semmelhack M., Hughson F., Bassler B.: The *Vibrio cholerae* quorum-sensing autoinducer CAI-1: analysis of the biosynthetic enzyme CqsA. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 891–895 (2009)
51. Lapouge K., Schubert M., Allain F., Haas D.: Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol. Microbiol.* **67**, 241–253 (2008)
52. Lee K., Wen Y., Park N., Kim K.: Quorum sensing and iron--dependent coordinated control of autoinducer-2 production via small RNA RyhB in *Vibrio vulnificus*. *Sci. Rep.* **12**, 831 (2022)
53. Lenz D. Miller M., Zhu J., Kulkarni R., Bassler B.: CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **58**, 1186–1202 (2005)
54. Lenz D., Mok K., Lilley B., Kulkarni R., Wingreen N., Bassler B.: The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell*, **118**, 69–82 (2004)
55. Li W., Ying X., Lu Q., Chen L.: Predicting sRNAs and their targets in bacteria. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **10**, 276–284 (2012)
56. Lorenz C., Gesell T., Zimmermann B., Schoebert U., Bilusic I., Rajkowitsch L., Waldsich C., von Haeseler A., Schroeder R.: Genomic SELEX for Hfq-binding RNAs identifies genomic aptamers predominantly in antisense transcripts. *Nucleic Acids Res.* **38**, 3794–3808 (2010)
57. Machtel P.J.: The ample world of riboswitches. *Postepy Biochem.* **66,** 100–110 (2020)
58. Majdalani N., Hernandez D., Gottesmann S.: Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol. Microbiol.* **46**, 813–826 (2002)
59. Majdalani N., Chen S., Murrow J., St John K., Gottesman S.: Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol. Microbiol.* **39**, 1382–1394 (2001)
60. Mandin P., Gottesman S.: Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA. *EMBO J.* **29**, 3094–3107 (2010)
61. Massé E., Escorcia F., Gottesman S.: Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **17**, 2374–2383 (2003)
62. Massé E., Vanderpool C., Gottesman S.: Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**, 6962–6971 (2005)
63. Massé E., Gottesman, S.: A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 4620–4625 (2002)
64. Miller M.B. Skorupski K., Lenz D., Taylor R., Bassler B.: Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell*, **110**, 303–314 (2002)
65. Miller M.B., Bassler B.L.: Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 165–199 (2001)
66. Morfeldt E., Taylor D., von Gabain A., Arvidson S.: Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans--encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J.* **14**, 4569–4577 (1995)

67. Neiditch M.B., Federele M., Miller S., Bassler B., Hughson F.: Regulation of LuxPQ receptor activity by the quorum-sensing signal autoinducer-2. *Mol. Cell.* **18**, 507–518 (2005)
68. Nikaido, H.: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593–656 (2003)
69. Oliva G., Sahr T., Buchrieser C.: Small RNAs, 5' UTR elements and RNA-binding proteins in intracellular bacteria: impact on metabolism and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 331–349 (2015)
70. Othmer H.G. Xin X., Xue C.: Excitation and adaptation in bacteria-a model signal transduction system that controls taxis and spatial pattern formation. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 9205–9248 (2013)
71. Papon N., Stock, A.M.: Two-component systems. *Curr. Biol.* **29**, R724-R725 (2019)
72. Patel M., Isaacsin M., Gouws E.: Effect of iron and pH on the survival of *Vibrio cholerae* in water. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**, 175–177 (1995)
73. Pfeiffer V., Papenfort K., Lucchini S., Hinton J., Vogel J.: Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 840–846 (2009)
74. Piattelli E., Peltier J., Soutourina O.: Interplay between regulatory RNAs and signal transduction systems during bacterial infection. *Genes* (Basel), **11**, (2020)
75. Poole K.: *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front. Microbiol.* **2**, 65 (2011)
76. Postle K., Kadner R.J.: Touch and go: tying TonB to transport. *Mol. Microbiol.* **49**, 869–882 (2003)
77. Prévost K., Salvail H., Desnowyers G., Phaneuf E., Masse E.: The small RNA RyhB activates the translation of *shiA* mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Mol. Microbiol.* **64**, 1260–1273 (2007)
78. Rabsch W., Klebba P. i wsp.: FepA- and TonB-dependent bacteriophage H8: receptor binding and genomic sequence. *J. Bacteriol.* **189**, 5658–5674 (2007)
79. Raczkowska A., Skorek K., Bielecki J., Brzostek K.: OmpR controls *Yersinia enterocolitica* motility by positive regulation of *flhDC* expression. *Antonie Van Leeuwenhoek,* **99**, 381–394 (2011)
80. Rasmussen A.A., Eriksen M., Gilany K., Udesen C., Franch T., Petersen C., Valentin-Hansen P.: Regulation of *ompA* mRNA stability: the role of a small regulatory RNA in growth phase--dependent control. *Mol. Microbiol.* **58**, 1421–1429 (2005)
81. Ratledge C., Dover L.G.: Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 881–941 (2000)
82. Romeo T.: Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol.* **29**, 1321–1330 (1998)
83. Romeo T., Gong M., Liu M., Brun-Zinkernagel A.: Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J. Bacteriol.* **175**, 4744–4755 (1993)
84. Romilly C., Hoekzema M., Holmqvists., Wagner E.: Small RNAs OmrA and OmrB promote class III flagellar gene expression by inhibiting the synthesis of anti-Sigma factor FlgM. *RNA Biol.* **17**, 872–880 (2020)
85. Rutherford S.T., van Kessel, Shao Y., Bassler B.: AphA and LuxR/HapR reciprocally control quorum sensing in *Vibrios*. *Genes Dev.* **25**, 397–408 (2011)
86. Saberi F., Kamali M., Najafi A., Yazdanparast A., Moghaddam M.: Natural antisense RNAs as mRNA regulatory elements in bacteria: a review on function and applications. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **21**, 6 (2016)
87. Sauer E., Weichenrieder O.: Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13065–13070 (2011)
88. Serra D.O., Hengge R.: A c-di-GMP-based switch controls local heterogeneity of extracellular matrix synthesis which is crucial for integrity and morphogenesis of *Escherichia coli* macrocolony biofilms. *J. Mol. Biol.* **431**, 4775–4793 (2019)
89. Sharma C.M., Darfeuille F., Plantinga T.H., Vogel J.: A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. *Genes Dev.* **21**, 2804–2817 (2007)
90. Shikuma N.J., Fong J., Odell L., Perchuk B., Laub M., Yildiz F.: Overexpression of VpsS, a hybrid sensor kinase, enhances biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **191**, 5147–5158 (2009)
91. Shimada T., Takada H., Yamamoto K., Ishihama A.: Expanded roles of two-component response regulator OmpR in *Escherichia coli*: genomic SELEX search for novel regulation targets. *Genes Cells.* **20**, 915–931 (2015)
92. Soncini F.C., Groisman E.A.: Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. *J. Bacteriol.* **178**, 6796–6801 (1996)
93. Storz G., Vogel J., Wassarman K.: Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol. Cell.* **43**, 880–891 (2011)
94. Sultan S.Z., Silva A., Benitez J.: The PhoB regulatory system modulates biofilm formation and stress response in El Tor biotype *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett*. **302**, 22–31 (2010)
95. Tamayo R., Tischler A. Camilli A.: The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* **280**, 33324–33330 (2005)
96. Taylor R.K., Miller V., Furlong D., Mekalanos J.: Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2833–2837 (1987)
97. Teschler J.K., Cheng A., Yildiz F.: The two-component signal transduction system VxrAB positively regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *J. Bacteriol.* **199**, (2017)
98. Tischler A.D., Camilli A.: Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **53**, 857–869 (2004)
99. Tsou A.M., Liu Z., Cai T., Zhu J.: The VarS/VarA two-component system modulates the activity of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing transcriptional regulator HapR. *Microbiology* (Reading), **157**, 1620–1628 (2011)
100. Udekwu K.I., Darfeuille F., Vogel J., Reimegard J., Holmqvist E., Wagner E.: Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes Dev.* **19**, 2355–2366 (2005)
101. Urbanowicz P., Gniadkowski M.: "Ciężkozbrojny" *Pseudomonas aeruginosa*: mechanizmy lekooporności i ich tło genetyczne. *Kosmos*, **66**, 11–29 (2017)
102. Valverde C., Haas D.: Small RNAs controlled by two-component systems. *Adv. Exp. Med. Biol.* **631**, 54–79 (2008)
103. Vecerek B., Moll I., Blasi U.: Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *EMBO J.* **26**, 965–975 (2007)
104. Vestby L.K., Gronseth T., Simm R., Nesse L.: Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics* (Basel), **9**, 2, (2020)
105. Viegas S.C., Arraiano C.M.: Regulating the regulators: How ribonucleases dictate the rules in the control of small non--coding RNAs. *RNA Biol.* **5**, 4, 230–243 (2008)
106. Vogel J., Bartels V., Tang T., Churakov G., Slagter-Jager J., Huttenhofer A., Wagner E.: RNomics in *Escherichia coli* detects

new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. *Nucleic Acids Res.* **31**, 6435–6443 (2003)
107. Wagner E.G.H., Altuvia S., Romby P.: Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv. Genet.* **46**, 361–398 (2002)
108. Wassarman K.M., Repoila F., Rosenow C., Storz G., Gottesman S.: Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev.* **15**, 1637–1651 (2001)
109. Wassarman K.M.: Small RNAs in bacteria: diverse regulators of gene expression in response to environmental changes. *Cell*, **109**, 141–144 (2002)
110. Watnick P.I., Kolter R.: Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* **34**, 586–595 (1999)
111. Weiser J.N., Gotschlich E.C.: Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. *Infect. Immun.* **59**, 2252–2258 (1991)
112. Wen Y., Kim I., Son J., Lee B., Kim K.: Iron and quorum sensing coordinately regulate the expression of vulnibactin biosynthesis in *Vibrio vulnificus*. *J. Biol. Chem.* **287**, 26727–26739 (2012)
113. Wen Y., Kim I., Kim K.: Iron- and quorum-sensing signals converge on small quorum-regulatory RNAs for coordinated regulation of virulence factors in *Vibrio vulnificus*. *J. Biol. Chem.* **291**, 14213–14230 (2016)
114. Wright A.C., Simpson L., Oliver J.: Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. *Infect. Immun.* **34**, 503–507 (1981)
115. Yi L., Li J., Liu B., Wang Y.: Advances in research on signal molecules regulating biofilms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 130 (2019)
116. Yildiz F.H., Dolganov N., Schoolnik G.: VpsR, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of *vps* biosynthesis genes and EPS(ETr)-associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J. Bacteriol.* **183**, 1716–1726 (2001)
117. Zhang A., Schu D., Tjaden B., Storz G., Gottesman S.: Mutations in interaction surfaces differentially impact *E. coli* Hfq association with small RNAs and their mRNA targets. *J. Mol. Biol.* **425**, 3678–3697 (2013)
118. Zhu J., Miller M., Vance R., Dziejman M., Bassler B., Mekalanos J.: Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 3129–3134 (2002)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2022, 61, 4, 205–209
DOI: 10.2478/am-2022-021

RÓŻNE OBLICZA SŁAWNEGO ODKRYWCY PAMIĘCI LUDWIKA PASTEURA W 200. ROCZNICĘ URODZIN

Dominika Salamon[1], Tomasz Jagielski[2]*

[1] Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej, Katedra Mikrobiologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie
[2] Zakład Mikrobiologii Medycznej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: Ludwik Pasteur uznawany jest za jednego z największych naukowców. A jednak nawet na pomnikowej postaci Pasteura dostrzegane są rysy. Jego charakter i pewne działania są przedmiotem krytyki lub co najmniej kontrowersji. Zawarty w niniejszym artykule przegląd dokonań francuskiego uczonego, przygotowany z okazji dwusetnej rocznicy jego urodzin, pokazuje, że, mimo formułowanych z różnych stron zarzutów, Pasteur w pełni zasługuje na miano „dobroczyńcy ludzkości".

1. Wprowadzenie. 2. Pasteur – chemik. 3. Pasteur – mikrobiolog. 4. Pasteur – wakcynolog. 5. Podsumowanie

DIFFERENT FACES OF THE FAMOUS DISCOVERER IN MEMORY OF LOUIS PASTEUR ON THE 200TH ANNIVERSARY OF HIS BIRTHDAY

Abstract: Louis Pasteur is considered one of the world's greatest scientists. However, some cracks in the Pasteur's monument have been spotted. His character and certain activities are subject to criticism or at least controversy. The review of achievements of the French scientist, contained in this article, prepared on the occasion of the bicentenary of his birth, shows that, despite the accusations formulated from different sides, Pasteur fully deserves to be called a "benefactor of mankind".

1. Introduction. 2. Pasteur – chemist. 3. Pasteur – microbiologist. 4. Pasteur – vaccinologist. 5. Summary

Słowa kluczowe: fermentacja, kwas winowy, samorództwo, szczepienia
Keywords: fermentation, tartaric acid, spontaneous generation, vaccination

1. Wprowadzenie

Nazywany „ojcem mikrobiologii" i „dobroczyńcą ludzkości", Ludwik Pasteur (1822–1895) należy bez wątpienia do najwybitniejszych umysłów nauki i jest jedną z najważniejszych postaci w historii Francji. Jego odkrycia legły u podstaw współczesnej stereochemii i medycyny. W ramach tej ostatniej dały początek nowym dziedzinom, takim jak mikrobiologia i immunologia, a także przyspieszyły rozwój innych dyscyplin – chirurgii oraz medycyny wewnętrznej, z których wyodrębniły się choroby zakaźne. Swoiste kalendarium badań, którym poświęcił swoje życie francuski uczony można zobaczyć w jego mauzoleum, które mieści się w Instytucie Pasteura w Paryżu:

1848 – *Dyssymétrie moléculaire* (asymetria cząsteczkowa);
1857 – *Fermentations* (fermentacje);
1862 – *Générations dites spontanées* (tzw. samorództwo);
1863 – *Études sur le vin* (badania nad winem);
1865 – *Maladies des vers à soie* (choroby jedwabników);
1871 – *Études sur la bière* (badania nad piwem);
1877 – *Maladies virulentes* (choroby wirulentne, zjadliwe – chodzi o pierwsze określenia chorób, które współcześnie nazywamy zakaźnymi);
1880 – *Virus vaccins* (szczepionki wirusowe – w tym wypadku chodzi ogólnie o drobnoustroje patogenne, które w tamtym czasie określano często mianem „wirusów");
1885 – *Prophylaxie de la rage* (zapobieganie wściekliźnie) [5].

Co ciekawe, na temat zarówno samego uczonego, jak i jego osiągnieć, istnieją różne, czasem sprzeczne, a nawet zaskakujące, informacje. Cavillon i Legout mierzący się w swojej pracy z legendą i prawdą o dokonaniach Pasteura, cytują francuskiego lekarza immunologa Patrice'a Debré, autora uważanej za bardzo wyważoną biografii Pasteura. Debré przedstawia obraz człowieka posiadającego wiele negatywnych cech,

* Autor korespondencyjny: dr hab. Tomasz Jagielski, Zakład Mikrobiologii Medycznej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski; ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. +48 22 55 41 427; e-mail: t.jagielski@uw.edu.pl
© 2022 Dominika Salamon & Tomasz Jagielski
This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Ryc. 1. Ludwik Pasteur w swoim laboratorium
Drzeworyt A. Marie, 1885. Źródło: Wellcome Collection, udostępnione na licencji CC BY 4.0.

takich jak arogancja, wyniosłość, chciwość, a nawet bezwzględność wobec swoich oponentów. We wspomnianej biografii pojawia się też chyba najpoważniejszy zarzut, jaki można postawić badaczowi: „czasami sprawia wrażenie, że po prostu sprawdza wyniki opisane przez innych, a następnie czyni je własnymi" [2].

Zatem jaki był naprawdę Ludwik Pasteur? Jakich odkryć rzeczywiście jest autorem? Szukaniem ostatecznej odpowiedzi na te pytania zajmują się jego biografowie i historycy nauki. Jest to o tyle skomplikowane, że Pasteur działał na różnych polach podejmując wyzwania z różnych dziedzin. Niniejszy artykuł ma na celu przywołanie, tylko po krótce, najważniejszych dokonań francuskiego uczonego, których waga i znaczenie w pełni bronią jego miana „dobroczyńcy ludzkości", bez względu na formułowane z różnych stron zarzuty i okoliczności „obciążające".

2. Pasteur – chemik

Wiele źródeł podaje, że Pasteur był przeciętnym uczniem i nic nie wskazywało na jego zainteresowanie przedmiotami ścisłymi. Odznaczał się jednak zdolnościami plastycznymi i miał na swoim koncie kilka udanych prac, które nawet współcześni krytycy sztuki oceniają, jako zdradzające talent [4].

Po raz pierwszy jego zdolności naukowe dały znać o sobie w momencie, kiedy postanowił zweryfikować twierdzenie niemieckiego chemika Eilharda Mitscherlicha o tym, że istnieją dwie formy kwasu winowego o identycznych właściwościach fizykochemicznych, ale jedna skręca światło spolaryzowane w prawo, a druga jest optycznie nieaktywna. Dla Francuza był to impuls do wykonania szeregu doświadczeń, za pomocą których chciał udowodnić, że musi istnieć jakaś różnica chemiczna tłumacząca to zjawisko. Dzięki swemu uporowi i dociekliwości, pracując za pomocą mikroskopu oraz zwykłej pęsety, udało mu się rozdzielić formę optycznie nieczynną na dwa rodzaje kryształów skręcających światło – enancjomery prawoskrętny i lewoskrętny. Równomolowa mieszanina obu form – racemat rzeczywiście dawała efekt znoszenia zjawiska polaryzacji [1]. Doświadczalny dowód na istnienie dwóch różnych form kwasu winowego oraz odkrycie jego lewoskrętnego izomeru przyniosło Pasteurowi rozgłos i popchnęło go do dalszych badań. Kilka lat później, analizując wzrost grzybów w racemacie kwasu winowego i odkrywając, że związek ten stawał się optycznie aktywny (bo ubywało przyswajanej przez drożdże

formy prawoskrętnej), sformułował teorię mówiącą o tym, że tylko żywe organizmy mogą wytwarzać optycznie aktywne związki asymetryczne [1].

Wyniki studiów nad chemią winianu skłoniły go do badań procesu fermentacji. W połowie XIX w. powszechnie uważano, że istnieją substancje chemiczne, które są katalizatorami przemiany jednych związków w inne. I tak, główną rolę w powstawaniu alkoholu z cukru przypisywano mistycznej sile życiowej (łac. *vis vitalis*) zawartej w komórkach drożdży. Gorącym zwolennikiem teorii witalistycznej był niemiecki chemik Justus von Liebig [1, 4]. Pasteur, głównie dzięki długotrwałym i żmudnym obserwacjom mikroskopowym osadu z kadzi „zepsutego" piwa, potwierdził to, co podejrzewali już wcześniej inni badacze, tacy jak Theodor Schwann i Friedrich Kützing, a zrozumiał na kilka lat przed Pasteurem Antoine Béchamp: fermentację piwną (alkoholową) powodują okrągłe drobiny („kuleczki"), czyli mikroorganizmy (drożdże). Obserwowane również w brzeczce piwnej, inne mikroskopijne organizmy w kształcie podłużnych pałeczek (bakterie) Pasteur powiązał z niekorzystną dla produkcji piwa fermentacją mlekową [1, 2]. Z kolei badając fermentację masłową Pasteur dowiódł „życia bez tlenu", a więc istnienia mikroorganizmów ściśle beztlenowych. Na podstawie swoich badań, spopularyzował proponowaną już wcześniej przez winiarza Alfreda de Vergnette de Lamotte'a, metodę zabezpieczenia napojów alkoholowych przed „psuciem się", czyli zanieczyszczeniem niepożądanymi drobnoustrojami, poprzez odpowiednio dobraną obróbkę termiczną [2]. Później zaczęto określać ją mianem „pasteryzacji", mimo, że istota tej metody nie była dziełem francuskiego uczonego. Pasteur znalazł dla niej naukowe potwierdzenie, zdołał przekonać świat o jej skuteczności i zachęcić do jej powszechnego stosowania. Badając rolę fermentujących drobnoustrojów Pasteur powoli stawał się mikrobiologiem.

3. Pasteur – mikrobiolog

Dzięki konsekwentnej i wytrwałej pracy, a także zdolności odpierania ataków sceptyków i naukowych przeciwników, Pasteur doprowadził do obalenia panującej od stuleci teorii samorództwa, zgodnie z którą życie ma swoje źródło w materii nieożywionej. Mimo, że już wcześniej co najmniej kilkoro uczonych, w tym wspomniany T. Schwann, Lazzaro Spallanzani, czy Franz Schulze, podważało ten pogląd, wskazując na powietrze jako źródło drobnoustrojów [2], dopiero Pasteur przeprowadził najbardziej przekonujący dowód na fałszywość teorii abiogenezy. Pomogło tu stałe i cierpliwe doskonalenie warsztatu eksperymentalnego, czego świadectwem są liczne słynne kolby z łabędzimi szyjami, które pozwalały zachować jałowość medium hodowlanego (bulionu) i w ten sposób kontrolować napływ do niego mikroorganizmów z powietrza (kolby te można nadal podziwiać w Muzeum Pasteura w Paryżu). Obalenie dogmatu samorództwa, stanowiącego nie tylko problem biologiczny, ale także religijny i filozoficzny wywołało niemałą wrzawę w środowisku naukowym, a wielu uczonych jeszcze długi czas atakowało Pasteura. Wśród najbardziej nieprzejednanych polemistów byli Hermann Pidoux, Lionel Beal oraz Félix Archimède Pouchet [2, 3]. Odporność na niepowodzenia i krytyczne uwagi, gotowość do debaty na gruncie eksperymentalnym, a nie tylko dialektycznym, pozwoliły Pasteurowi ostatecznie przekonać świat nauki do swoich racji.

Wyniki badań nad fermentacją oraz obalenie doktryny o samorództwie stały się dla francuskiego uczonego impulsem do podjęcia badań nad etiologią chorób zwierząt i człowieka. Pierwszy ważny problem, z jakim Pasteur miał się zmierzyć stanowiła tajemnicza choroba jedwabników znana pod nazwą pebryny (pieprzycy, plamicy). Sam badacz nie ustalił przyczyny choroby (etiologię pasożytniczą sugerował Antoine Béchamp, co potwierdzili potem inni, m.in. Édouard-Gérard Balbiani, czy Désiré Gernez), ale wykazał, że ma ona charakter zakaźny. Co więcej, opracował skuteczną metodę zapobiegania jej rozprzestrzenianiu poprzez kontrolę składanych przez dorosłe owady jaj [2]. Okazało się przy tym, że przyczyną utraty jedwabników była w tamtym czasie również nieco inna choroba – flacherie (flaccidness), za której przyczynę uważa się obecnie wirusa z towarzyszącym bakteryjnym nadkażeniem owadzich jelit. Pasteur, który początkowo utożsamiał chorobę z pebryną i tu wprowadził kilka zasad profilaktyki, m.in. kwarantannę podejrzanych osobników [1].

Kolejnym wyzwaniem dla Pasteura była cholera drobiu. Z sukcesem wyhodował czynnik etiologiczny choroby i zaobserwował zjawisko „starzenia się" bakterii i słabnięcia jej zjadliwości, co wykorzystał w opracowaniu szczepionek [1]. To na jego cześć bakterię nazwano *Pasteurella multocida*, choć należy pamiętać, że jako pierwsi opisali ją dwaj Włosi – Sebastiano Rivolta i Edoardo Perroncito, a we Francji po raz pierwszy wyizolował ją Jean-Joseph Toussaint [2].

W latach 70. XIX w. Pasteur podjął badania nad wąglikiem u zwierząt gospodarskich (gł. owiec i bydła). Potwierdził ustalenia poprzedników, w tym przede wszystkim Roberta Kocha, wywodzące źródło choroby od sporujących bakterii, nazwanych później *Bacillus anthracis*. Nie obyło się przy tym bez, gwałtownej miejscami, dyskusji między Pasteurem a Kochem o palmę pierwszeństwa w odkryciu zarazka wąglika. Ostatecznie przypadła ona Niemcowi, a główną zasługą Pasteura było opracowanie skutecznej szczepionki przeciwko wąglikowi [1, 4].

Przedmiotem zainteresowania Pasteura były również infekcyjne choroby u ludzi, w tym gorączka poło-

gowa, której zwalczanie, jeszcze bez wiedzy mikrobiologicznej, rozpoczął w Wiedniu wiele lat wcześniej Ignacy Semmelweis. Dzięki pracom dwóch lekarzy z Alzacji – Victora Feltza i Léona Coze'a, Pasteur dowiedział się, że przyczyną choroby są bakterie, nazwane potem przez Theodora Billrotha *Coccobacteria septica* (ob. *Streptococcus pyogenes*) [2]. Pasteur badał także przyczyny i możliwości zapobiegania cholerze i dżumie, wysyłając na tereny objęte epidemią, swoich współpracowników, ale to im oraz innym badaczom zawdzięcza się główne odkrycia dotyczące tych chorób.

Odkrycia Pasteura są wynikiem jego wyjątkowej dociekliwości, pracowitości i systematyczności. Są też efektem otwartości i krytycznej oceny dokonań innych, niekiedy bez należytej skrupulatności w uznaniu ich wkładu, jak choćby w wypadku prac Béchampa wokół chorób jedwabników, czy Toussainta, autora pierwszej metody atenuacji pałeczki wąglika. Rzadko wspomina się też Charlesa Chamberlanda, asystenta Pasteura, który skonstruował pierwszy parowy sterylizator ciśnieniowy, a także opracował filtr mikrobiologiczny do jałowienia roztworów (tzw. filtr Chamberlanda lub Pasteura-Chamblerlanda).

Podobnie jak Pasteur korzystał z osiągnięć swoich poprzedników i współpracowników, także jego prace inspirowały i stymulowały do działań innych. Wystarczy wspomnieć choćby Josepha Listera, który zapoznawszy się z badaniami Pasteura, ukazującymi rolę mikroorganizmów w powstawaniu zakażeń, wprowadził do praktyki klinicznej zasady antyspetyki [2, 3].

4. Pasteur – wakcynolog

Najbardziej znaczące dla medycyny są prace Pasteura nad odpornością w chorobach zakaźnych i opracowanie pierwszych szczepionek skonstruowanych na bazie atenuowanych drobnoustrojów[1]. Pierwsze obserwacje wskazujące na możliwy dobroczynny skutek podania zdrowym osobnikom osłabionych mikroorganizmów wywołujących chorobę Pasteur poczynił w trakcie badań nad cholerą drobiu. Eksperymenty z wszczepianiem kurom „starych", pozostawionych jakiś czas na powietrzu i w ten sposób pozbawionych zjadliwości bakterii, potwierdzały nabycie przez zwierzęta odporności na zakażenie. Badania Pasteura pozwoliły również wyjaśnić, w jaki sposób wybuchały epidemie tej choroby. Okazało się, że część zakażonych zwierząt po wyzdrowieniu stawała się nosicielami bakterii, stając się równocześnie zagrożeniem dla innych osobników, które nie miały kontaktu z patogenem [1].

Doświadczenia wyniesione z pracy nad cholerą drobiu, Pasteur wykorzystał w badaniach nad wąglikiem. Opracowana przez Pasteura szczepionka przeciwko tej chorobie, której testowanie odbiło się szerokim echem, bo zostało zorganizowane jako swoisty rodzaj publicznego pokazu w podparyskiej miejscowości Pouilly-le-Fort, miała swoją dramatyczną historię. W myśl zasady, jaką forsował Pasteur, bakterie wąglika miały być atenuowane za pomocą powietrza. Niestety, ten sposób okazał się niewystarczający i współpracownicy badacza (Émile Roux i Ch. Chamberland) musieli szybko, w ostatniej chwili przed pokazem, zaproponować nową, skuteczną metodę atenuacji. Użyli w tym celu dwuchromianu potasu, wzorując się na metodzie opracowanej wcześniej przez weterynarza Jean'a-Joseph'a Toussainta [1, 2]. Ostatecznie pokaz był wielkim sukcesem Pasteura, bo dzięki spektakularnej, choć dość ryzykownej akcji z nie do końca pewną szczepionką, Francuz zyskał wielkie uznanie nie tylko w kraju, ale też za granicą.

Jednak największy triumf przyniosła Pasteurowi szczepionka przeciwko wściekliźnie. To wtedy zaczęto o nim mówić jako „dobroczyńcy ludzkości". Do tej pory ta, jak dziś już wiemy, wirusowa choroba jest uznawana za najbardziej śmiertelną chorobę zakaźną. Pojawienie się szczepionki, która mogła zapobiec rozwojowi choroby u osób pogryzionych, czasem bardzo dotkliwie, przez wściekłe zwierzęta było rzeczywiście wydarzeniem na skalę światową. Dzięki Pierre'owi Victorowi Galtierowi, profesorowi weterynarii z Lyonu, wiadomo już było, że choroba może być przeniesiona na królika ze śliną zakażonego psa. Natomiast Pierre-Henri Duboué, lekarz i członek Akademii Medycznej w Paryżu, odkrył, że przemieszczanie się wirusa wścieklizny do ośrodkowego układu nerwowego odbywa się drogą nerwów obwodowych, a nie z krwią [2]. Pasteur wykorzystał te informacje aby po pierwsze skrócić czas inkubacji choroby z kilku tygodni do kilku dni, po drugie aby uzyskać osłabiony patogen nadający się do podania jako szczepionka. Postanowił więc wraz ze swoimi współpracownikami, a przede wszystkim lekarzem E. Roux (to on był pomysłodawcą opisywanej procedury), wprowadzać bezpośrednio do mózgu królików ekstrakt mózgu padniętych na wściekliznę zwierząt. Szybko uzyskiwał wysoko wirulentny szczep patogenu (tzw. *virus fixé*). Jego atenuację uzyskiwał susząc, przez różną długość czasu, zakażony, króliczy rdzeń kręgowy w strumieniu powietrza. Podawanie zdrowym zwierzętom, sukcesywnie przez 14 dni, ekstraktu rdzeniowego o rosnącym potencjale zakaźnym (co odpowiadało coraz krótszej ekspozycji materiału zakaźnego na suche powietrze) sprawiało, że 15. dnia zwierzęta stawały się odporne na szczep *virus fixé* [1, 3][2].

[1] Jedyna znana wcześniej szczepionka przeciwko ospie, opracowana przez Edwarda Jennera, zawierała limfę z pęcherzy ospy krowiej (*variola vaccinia*).

[2] Patogen wywołujący wściekliznę nazywano wirusem (*virus*, łac. jad, trucizna), bo w tamtym czasie często określano tak bakterie chorobotwórcze.

Kontrowersyjne są okoliczności podania pierwszej dawki szczepionki człowiekowi. Z punktu widzenia współczesnych zasad bioetycznych było to całkowicie niedopuszczalne. Preparat nie był jeszcze dopracowany, a stopień atenuacji patogenu, a więc bezpieczeństwo szczepionki były niepewne. Dodatkowo istnieją wątpliwości, czy dziewięcioletni chłopiec, Joseph Meister, który miał być poddany zabiegowi na rozpaczliwą prośbę matki, został rzeczywiście pogryziony przez wściekłego psa [2]. Sytuacja była na tyle skomplikowana, że najwierniejszy współpracownik Pasteura – E. Roux odmówił podania zastrzyku pacjentowi. Ostatecznie szczepienie przeprowadził Joseph Grancher ze szpitala dziecięcego w Paryżu, który konsultował wcześniej chłopca [1]. Cała operacja zakończyła się sukcesem, a Ludwik Pasteur dla współczesnych sobie stał się rzeczywiście „wybawcą" ludzkości. Mimo, że nie zdołano uniknąć niepowodzeń i szczepionka potrafiła być zawodna, ostatecznie pasteurowska metoda szczepienia przeciwko wściekliźnie zyskała powszechną akceptację, a samemu Pasteurowi przyniosła nieśmiertelną sławę. Ciekawe, że już w 1886 r., szczepionka przeciwko wściekliźnie dotarła na ziemie polskie. Stało się to za sprawą Odona Bujwida, ucznia Pasteura i prekursora polskiej mikrobiologii, który powołał w Warszawie, drugą po Instytucie paryskim, stację szczepień przeciwko wściekliźnie na świecie [3].

4. Podsumowanie

Mimo coraz śmielej pojawiających się krytycznych opinii o zachowaniu i charakterze Pasteura, jego niełatwym, apodyktycznym usposobieniu, skłonności do megalomanii, umiłowaniu świateł jupiterów i wydawałoby się lekceważącym stosunku do osób, które jeszcze przed nim obserwowały zjawiska, stanowiące podstawę jego dalszych przedsięwzięć, to bez wątpienia był on człowiekiem wyjątkowym. Obdarzony niezwykłą ciekawością i intuicją badawczą, wyposażony w umysł nieprzeciętnie wnikliwy i analityczny, a przy tym cechujący się tytaniczną pracowitością, niesłabnącym uporem i odwagą, graniczącą z brawurą reprezentował typ naukowca „przygotowanego" na sukces. Bo jak sam mówił – przypadek sprzyja umysłom przygotowanym. A fakt otaczania się współpracownikami posiadającymi różne umiejętności i specjalizacje (wśród nich byli chemicy, fizycy, lekarze oraz weterynarze) świadczy o tym, że pokora jednak nie była mu obca.

Wśród wielu aforyzmów przypisywanych Pasteurowi jest także zdanie *C'est les microbes qui auront le dernier mot* (To mikroorganizmy będą miały ostatnie słowo). Jak bardzo profetycznie te słowa brzmią dzisiaj, w dobie coraz szybciej pojawiających się nowych chorób zakaźnych, w tym pandemii COVID-19.

Wspomniane słowa są mottem tegorocznej międzynarodowej konferencji naukowej poświęconej jubileuszowi 200-lecia urodzin Ludwika Pasteura. Konferencja pt. „The last word belongs to microbes" organizowana jest w dniach 29–30 listopada br. w Warszawie.

Piśmiennictwo

1. Berche P.: Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. *Clin. Microbiol. Infect.*, **18** (Suppl. 5), 1–6 (2012)
2. Cavillon J-M., Legout S.: Louis Pasteur: between myth and reality. *Biomolecules*, **12** (4), e596 (2022)
3. Kwiatkowski Z. A.: Ludwik Pasteur (1822–1895). Życie i dzieło. *Post Mikrobiol.*, **33** (1), 3–8 (1994)
4. Porter J.R.: Louis Pasteur Sesquicentennial. *Science*, **178**, 1249–1254 (1972)
5. The tomb of Louis Pasteur. *The Lancet*, **149**, 129 (1897)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2022, 61, 4, 211–221
DOI: 10.2478/am-2022-022

WSPÓŁCZESNE METODY IDENTYFIKACJI BIAŁKOWYCH ANTYGENÓW SZCZEPIONKOWYCH

Rafał Jabłuszewski, Agnieszka Wyszyńska*

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w październiku, zaakceptowano w listopadzie 2022 r.

Streszczenie: Postępy w genomice związane z ustawicznym sekwencjonowaniem kompletnych genomów drobnoustrojów, w tym mikroorganizmów patogennych, zrewolucjonizowały podejście do wyboru i projektowania antygenów szczepionkowych nowej generacji. Odwrócono klasyczny proces badawczy, ponieważ to zbiór danych genomowych stał się źródłem hipotez o immunogenności wytypowanych antygenów. W efekcie, możliwe jest wydajne przeanalizowanie tysięcy genów, niezależnie od poziomu ich ekspresji *in vivo*. Na tej podstawie typuje się pulę białkowych kandydatów, które można następnie poddać dalszym badaniom i dokładnie opisać ich epitopy powierzchniowe rozpoznawane przez elementy układu odpornościowego człowieka. Informacje o strukturze wybranego antygenu i jego interakcjach z układem immunologicznym mogą posłużyć do syntezy nowych cząsteczek, optymalizując czas i środki niezbędne do wprowadzenia do użytku nowego preparatu szczepionkowego.

1. Wprowadzenie. 2. Założenia odwrotnej wakcynologii. 3. Opracowanie szczepionki przeciwko *Neisseria meningitidis* ser. B, 4. Odwrotna wakcynologia pangenomowa. 5. Odwrotna wakcynologia 2.0. 6. Wyzwania stojące przed wakcynologią

MODERN METHODS OF IDENTIFICATION OF PROTEIN VACCINE ANTIGENS

Abstract: Advancements in modern genomics driven by the continuous DNA sequencing of complete microbial genomes, including pathogenic microorganisms, have revolutionised the approach to the process of designing new generation vaccine antigens. Genomic data is the source of hypotheses about potential antigen immunogenicity, reversing the standard science research process. As a result, it is possible to analyse thousands of genes regardless of their *in vivo* expression levels. On this basis, we can choose the pool of protein candidates to examine further, mapping their epitopes recognised by the elements of the human immune system. The acquired information on the structure of the selected antigen and its interactions with the immune system may be used to design and synthesise new immunogenic molecules, optimising time and resources needed to introduce new vaccines to the market.

1. Introduction. 2. Principles of reverse vaccinology. 3. Development of a vaccine against *Neisseria meningitidis* ser. B. 4. Pan-genome reverse vaccinology. 5. Reverse vaccinology 2.0. 6. Challenges facing vaccinology

Słowa kluczowe: antygen, odwrotna wakcynologia, szczepionka
Keywords: antigen, reverse vaccinology, vaccine

1. Wprowadzenie

O historii wakcynologii nie można opowiedzieć bez wspomnienia postaci Ludwika Pasteura (1822–1895). Opracowanie metod atenuacji mikroorganizmów chorobotwórczych i zakończone sukcesem testy pierwszych preparatów szczepionkowych na zwierzętach doprowadziły go do sformułowania zasad leżących u podstaw większości stosowanych dzisiaj szczepionek (isolate, inactivate, inject). Szczepionki te, powstałe w oparciu o żywe, atenuowane mikroorganizmy oraz mikroorganizmy zabite, umożliwiły ograniczenie występowania wielu chorób zakaźnych (odra, różyczka, tężec, błonica, polio) [12, 42, 56, 68], a nawet ich eradykację (ospa prawdziwa) [18].

Szczepionki zawierające inaktywowane drobnoustroje działają zgodnie z założeniem, że elementy układu odpornościowego człowieka są w stanie rozpoznawać antygeny eksponowane przez dany patogen pomimo zahamowania jego namnażania i metabolizmu. Najczęściej do inaktywacji stosowano wysoką temperaturę, promieniowanie lub czynniki chemiczne takie jak formalina czy formaldehyd [13, 49]. Całkowite zahamowanie replikacji patogenu wyklucza możliwość jego przypadkowej rewersji do typu dzikiego, zwiększając bezpieczeństwo szczepionki. Z praktyki klinicznej

* Autor korespondencyjny: dr hab. Agnieszka Wyszyńska, Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. I. Miecznikowa 1, 02-096, Warszawa; tel: (22) 55 41 341; e-mail: ak.wyszynska@uw.edu.pl
© 2022 Rafał Jabłuszewski & Agnieszka Wyszyńska. This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

wynika jednak, że odpowiedź układu odpornościowego na podanie antygenów w tej formie jest zwykle słabsza i trwa krócej. Stąd wynikała konieczność stosowania adiuwantów, jak również podania większej liczby dawek [61].

Atenuowane patogeny zachowują z reguły wiele biologicznych cech dzikiego szczepu, m.in. zdolność do replikacji, która w przypadku wirusów jest niezbędna do powstania cytotoksycznych limfocytów T gwarantujących skuteczny poziom ochrony. Ich dłuższa obecność w szczepionym organizmie oraz ekspozycja układu odpornościowego na dużą liczbę antygenów zwiększa efektywność szczepienia. W przypadku takich preparatów istnieje jednak możliwość zachowania resztkowej zjadliwości, która jest niebezpieczna dla osób z niedoborami immunologicznymi. Zastosowanie atenuowanych mikroorganizmów wiąże się także z ryzykiem ponownego nabycia przez nie właściwości patogennych [25].

Ponieważ nieliczne z antygenów, jakie niesie dokonujący inwazji mikroorganizm, mają znaczenie dla powstania odporności przeciwzakaźnej, zwrócono się w stronę szczepionek podjednostkowych, a więc zawierających oczyszczony składnik komórki patogenu. W latach 80. XX wieku opracowano pierwszą szczepionkę, w której wykorzystano antygen powierzchniowy wirusa HBV, produkowany w komórkach rekombinowanych drożdży i oczyszczony z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa [36]. Identyfikacja nowych antygenów białkowych, w oparciu o laboratoryjną weryfikację immunogenności tych białek, była jednak czasochłonna i kosztowna. Wymagała również oczyszczenia dużej ilości białka, co znacznie ograniczało pulę potencjalnych antygenów. Co więcej, prawdopodobieństwo spełnienia przez białko oczekiwanych warunków, takich jak wysoki poziom ekspresji, ekspozycja na powierzchni komórki, niska zmienność sekwencji aminokwasowej czy zdolność do wywołania odpowiedzi immunologicznej było stosunkowo niskie.

W ostatnich latach przy konstrukcji szczepionek podjednostkowych zwrócono się w stronę genomu jako źródła pełnej informacji o potencjalnie immunogennych białkach. 200. rocznica urodzin Ludwika Pasteura jest okazją do przedstawienia założeń odwrotnej wakcynologii (*reverse vaccinology*) – dziedziny, która pozwoli na pokonanie przeszkód hamujących dalszy rozwój klasycznej wakcynologii.

2. Założenia odwrotnej wakcynologii

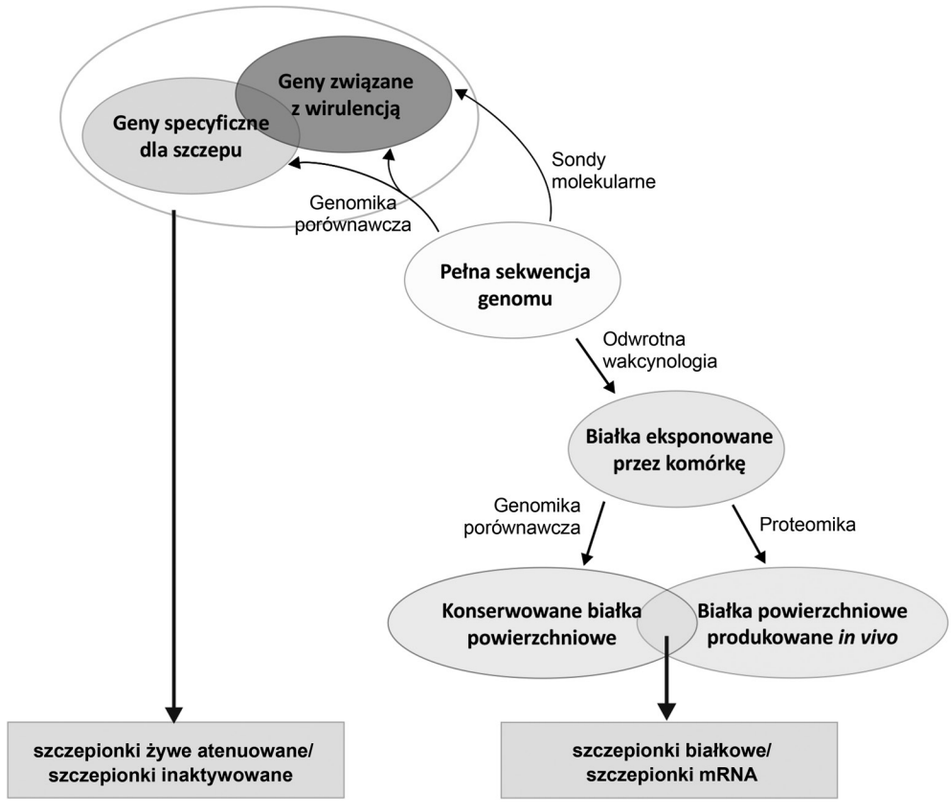
Pierwsza praca opisująca potencjalny wpływ dostępu do pełnych sekwencji genomowych mikroorganizmów patogennych na rozwój wakcynologii została opublikowana w 1997 roku. Zwrócono uwagę, że genomy patogenów niosą informację o kompletnym zestawie antygenów możliwych do wykorzystania w preparatach szczepionkowych i pozwalają na wytypowanie konkretnych genów w celu dokładnej identyfikacji produktów ich ekspresji [43]. Standardowe metody identyfikacji antygenów – mikrobiologiczne, biochemiczne i serologiczne – były kosztowne, wymagały znacznych nakładów pracy i czasu oraz, co najważniejsze, zawodziły w przypadku patogenów o wysokiej zmienności, trudnych w hodowli *in vitro* oraz tych, które nie miały jasno zdefiniowanych antygenów ochronnych. Nowy kierunek w rozwoju mikrobiologii i medycyny nazwano odwrotną wakcynologią (*reverse vaccinology*), ponieważ badania nie rozpoczynają się od analizowania samego patogenu, ale od analizy *in silico* jego pełnej sekwencji genomowej [54].

W pierwszej kolejności przy użyciu narzędzi bioinformatycznych typuje się geny kodujące białka w różny sposób eksponowane na powierzchni komórki lub wydzielane na zewnątrz, a więc potencjalnie rozpoznawane przez składniki układu odpornościowego. W kolejnym etapie, po oczyszczeniu wybranych białek, przeprowadzane są wstępne analizy na modelu zwierzęcym, których celem jest wskazanie antygenów indukujących powstawanie odpowiedzi ochronnej. Dodatkowo, przeprowadzana jest ocena poziomu ekspresji wybranych genów w warunkach *in vivo* z wykorzystaniem technik takich jak elektroforeza dwuwymiarowa białek czy mikromacierze DNA. W efekcie tych działań z kilku tysięcy białek zostaje wytypowana wąska grupa potencjalnych immunogenów, które możemy poddać dalszym szczegółowym badaniom. Taki sposób identyfikacji antygenów jest więc znacznie bardziej wydajny niż metody tradycyjne i zapewnia praktycznie nieograniczone możliwości badawcze. Ryc. 1. Przedstawia najważniejsze założenia odwrotnej wakcynologii.

3. Opracowanie szczepionki przeciw *Neisseria meningitidis* ser. B

Odwrotna wakcynologia po raz pierwszy została z powodzeniem zastosowana przy konstrukcji szczepionki skierowanej przeciw *Neisseria meningitidis*, Gram-ujemnej bakterii występującej w formie dwoinek. Bakterie te kolonizują błony śluzowe górnych dróg oddechowych ludzi. U około 10% występuje bezobjawowe nosicielstwo [8]. Natomiast najgroźniejsze formy zakażenia *N. meningitidis*, które wiążą się z przełamaniem bariery krew–mózg, przebiegają w postaci sepsy i/lub zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych [21]. Choroba może występować jako groźna w skutkach epidemia lub pojawiać się sporadycznie, zwłaszcza u ludzi z niedoborami immunologicznymi.

Jednym z głównych czynników wirulencji *N. meningitidis* jest jej polisacharydowa otoczka [64]. Na pod-

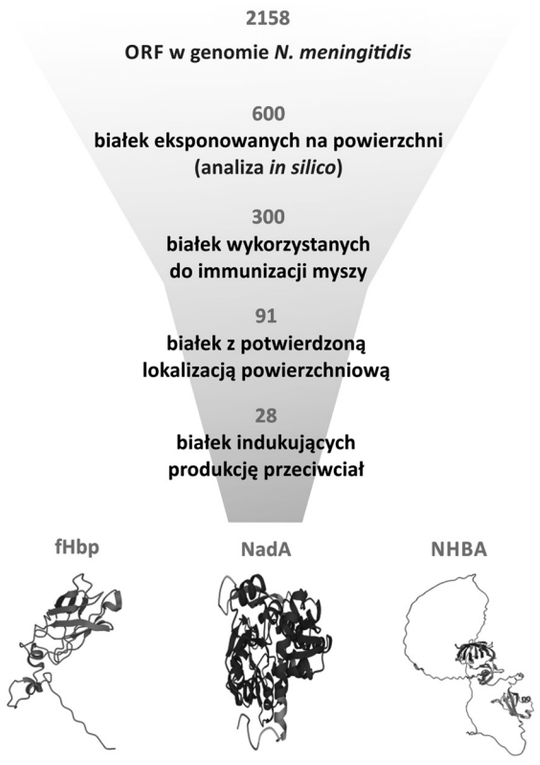


Ryc. 1. Schemat opisujący zależności między różnymi podejściami poszukiwania kandydatów na szczepionki

Oszacowanie lokalizacji komórkowej produktów ekspresji genu pozwala na rozpoczęcie badań od pełnej analizy genomu. Wstępną grupę kandydatów tworzą białka w różny sposób eksponowane na powierzchni komórki. Następnym krokiem jest zbadanie rozpowszechnienia sekwencji wśród znanych izolatów patogenów oraz potwierdzenie białek produkcji *in vivo*. Proteiny spełniające oba kryteria można następnie zbadać pod kątem ich immunogenności. Dodatkowo, genomika porównawcza pozwala na identyfikację *in silico* zestawu genów wirulencji oraz genów szczepowo specyficznych, co można zastosować przy projektowaniu szczepionek atenuowanych. Na podstawie [57].

stawie różnic w jej budowie wyróżniono 12 serotypów *N. meningitidis*, z których sześć (A, B, C, W-135, X, Y) odpowiada za zakażenia związane z zagrożeniem życia. Serotyp B (MenB) to jedyny serotyp *N. meningitidis*, przeciw któremu nie udało się zaprojektować skutecznej szczepionki za pomocą klasycznych metod laboratoryjnych. W odróżnieniu od polisacharydów otoczkowych innych serotypów, polisacharyd B nie indukował bowiem efektywnej odpowiedzi immunologicznej. W 1983 roku wykazano także powinowactwo glikoprotein NCAM (*neural cell adhesion molecule*) zawierających podjednostki kwasu polisjalowego do przeciwciał surowicy końskiej rozpoznających *N. meningitidis* ser. B. Badane glikoproteiny występują na powierzchni ludzkich neuronów, komórek glejowych oraz komórek NK i pełnią rolę w procesach adhezji neuronów m.in. do komórek mięśniowych. NCAM jest modyfikowany przez dołączenie kwasu α-2,8-polisjalowego (PSA) przez transferazy ST8Sia IV/PST oraz ST8Sia II/STX. Obecność cząsteczek PSA-NCAM wykazano przede wszystkim w rozwoju prenatalnym, w tkankach mięśniowych serca i szkieletowych, nerkach oraz w mózgu. Te same tkanki u ludzi dorosłych charakteryzują się bardzo niską obecnością lub brakiem zmodyfikowanej formy NCAM [9]. Duże podobieństwo polisacharydu B do cząsteczek PSA było przyczyną wielu dyskusji o bezpieczeństwie tak zaprojektowanej szczepionki, zwłaszcza dla kobiet w ciąży. Płód ma bezpośredni kontakt z przeciwciałami wytwarzanymi przez matkę, więc istniało niebezpieczeństwo zaburzenia rozwoju ośrodkowego układu nerwowego płodu.

Brak możliwości wykorzystania polisacharydu B ani żadnej z jego modyfikacji do produkcji szczepionki powodował konieczność wytypowania nowych antygenów. Kolejnym obiektem badań stało się białko PorA, eksponowane w OMV (*outer membrane vesicles*). Na rynku pojawiały się szczepionki wtOMV umożliwiające opanowanie lokalnych epidemii. Należy jednak podkreślić, że były one skuteczne jedynie wobec szczepów MenB, które charakteryzowała ekspresja podtypu białka PorA odpowiadającego antygenowi zastosowanemu w szczepionce. Szczepionki wtOMV nie miały potencjału, by stać się szczepionkami globalnymi, ale dostarczyły potwierdzenia, że istnieją inne niż polisacharyd B antygeny, które wywołują efektywną odpowiedź immunologiczną [19].



Ryc. 2. Schemat opisujący kolejne etapy selekcji antygenów w konstrukcji szczepionki przeciwko MenB

Z 2158 potencjalnych ORF odnalezionych w analizie *in silico*, potwierdzono zdolność do indukowania indukcji przeciwciał potwierdzono dla aż 28 białek. Tak duża pula kandydatów zapewniała duży potencjał badawczy przy konstrukcji szczepionki wieloskładnikowej. Ostatecznie wybrano trzy antygeny: fHbp, NadA oraz NHBA, ze względu na największy zakres indukowanej przez nie ochrony, zweryfikowany z użyciem SBA (*serum bactericidal assay*). Na podstawie [34].

Prace nad poszukiwaniem antygenów rozpoczęły się, gdy tylko zsekwencjonowano pierwszą część genomu *Neisseria meningitidis* MC58, szczepu odpowiedzialnego za epidemię w Wielkiej Brytanii. Podejście "odwrotnej wakcynologii" umożliwiło wytypowanie produktów tych genów, których ekspresja zachodziła na niskim poziomie. Większość z wytypowanych kandydatów należała do grupy białek błonowych, eksponowanych na powierzchni komórki, co mogło wskazywać na ich potencjalną zdolność do wywołania reakcji immunologicznej. Schemat prowadzonych badań oraz skrócony opis laboratoryjnej weryfikacji skuteczności wytypowanych antygenów opisuje Ryc. 2.

Podstawą do konstrukcji szczepionki przeciw MenB stały się trzy zidentyfikowane antygeny: fHbp, NHBA oraz NadA. fHbp to zakotwiczona w błonie komórkowej lipoproteina o masie ok. 18,5 kDa. Posiada zdolność wiązania ludzkiego czynnika H (*Factor H*), czyli białka obniżającego aktywność układu dopełniacza poprzez inaktywację składnika C3b oraz konwertazy C3 (C3bBb), która ma kluczowe znaczenie w wytwarzaniu białka C5 i kompleksu atakującego błonę (MAC). Związanie czynnika H na powierzchni *N. meningitidis* pozwala zatem uniknąć bakteriobójczego działania układu dopełniacza, umożliwia tym samym przetrwanie i namnażanie się bakterii we krwi gospodarza. Co więcej, *N. meningitidis* upodabnia się do komórek gospodarza, ponieważ boczne łańcuchy białka fHbp imitują rolę glikozaminoglikanów regionu rozpoznającego czynnik H w komórkach śródbłonka [58]. Analiza ponad 7000 izolatów klinicznych pozwoliła również na wyróżnienie ponad 860 podtypów białka fHbp, które podzielono na trzy główne warianty. Indukowane przeciwciała skutecznie rozpoznawały inne podtypy fHbp tylko w obrębie danego wariantu [3]. Badania te potwierdziły więc konieczność wykorzystania więcej niż jednego wariantu białka fHbp w szczepionce przeciw MenB, co zastosowano przy konstrukcji szczepionki Trumenba® [16].

NHBA jest lipoproteiną o masie ok. 50,5 kDa. Dzięki obecności regionu bogatego w argininę białko jest w stanie *in vitro* wiązać heparynę, która u ludzi jest czynnikiem zapobiegającym krzepnięciu krwi. Białko ełni również rolę w adhezji do komórek gospodarza, a jego ekspresja jest ściśle skorelowana z przeżywalnością bakterii [59].

NadA to natomiast białko o masie 34 kDa. Występuje tylko u ok. 30% izolatów, najczęściej u hiperwirulentnych szczepów *N. meningitidis*. Uczestniczy w adhezji i infekcji komórek śródbłonka oraz indukuje powstawanie przeciwciał o silnych właściwościach bakteriobójczych [28]. Poziom ekspresji NadA różni się pomiędzy szczepami i jest kontrolowany przez regulator NadR, który pełni rolę represora transkrypcji. W warunkach hodowli *in vitro*, ekspresja genu *nadA* zachodzi na niskim poziomie, co było przyczyną niedoszacowania potencjalnej roli antygenu w konstrukcji szczepionki. Zaobserwowano jednak znaczny wzrost ekspresji białka *in vivo*. Zdolność wiązania NadR do sekwencji promotorowej genu *nadA* jest modulowana przez 4-HPA (*4-hydroxyphenylacetic acid*), związek produkowany przy stanach zapalnych i obecny w ślinie [15].

W celu zwiększenia skuteczności szczepionki oraz zakresu indukowanej ochrony, przeprowadzono fuzję ww. białek z innymi antygenami, wybranymi na podstawie zdolności do indukowania produkcji przeciwciał w modelach zwierzęcych. Zaprojektowano i przeanalizowano ponad 30 fuzji. Fuzja białek fHbp z GNA2091 oraz NHBA z GNA1030 zwiększała aktywność bakteriobójczą indukowanych przez nie przeciwciał. Natomiast NadA po połączeniu z innym białkiem tracił swoją skuteczność, co prawdopodobnie wynikało ze zmian w jego strukturze trzeciorzędowej, w związku z czym zrezygnowano z jego dodatkowej modyfikacji [34].

Szczepionka rMenB zawiera zatem zmodyfikowane białka fHbp i NHBA oraz pojedynczy antygen

NadA. Szczepionka indukuje powstawanie przeciwciał wykazujących działanie bakteriobójcze w stosunku do 78% badanych izolatów *N. meningitidis*. W celu zwiększenia skuteczności szczepionki włączono do niej również PorA, czyli poznany wcześniej antygen eksponowany w OMV bakterii [34]. Szczepionka znana wcześniej jako 4CMenB została zarejestrowana pod nazwą Bexsero® przez Novartis Vaccines, a w styczniu 2013 roku Komisja Europejska zatwierdziła możliwość stosowania szczepionki od drugiego miesiąca życia.

4. Odwrotna wakcynologia pangenomowa

Większość gatunków mikroorganizmów charakteryzuje duża zmienność, wynikająca m.in. z napływu nowych genów przez transfer horyzontalny lub powstawanie nowych wariantów genów przez mutacje. Stało się jasne, że informacja genetyczna pochodząca od pojedynczych izolatów patogenów jest niewystarczająca, by na jej podstawie zaproponować nowe antygeny do wykorzystania w szczepionkach. Istniała potrzeba przeprowadzenia globalnych analiz porównawczych, które pozwoliłyby na wskazanie tych antygenów, które występują u większości opisanych szczepów. Zaproponowany w 2005 roku termin "pangenom" obejmuje sumaryczną pulę genów występujących u reprezentantów danego gatunku [41, 66]. Wyróżnienie w jego obrębie genów rdzeniowych (*core*), obecnych w każdym z analizowanych genomów, pozwoliło na uwzględnienie konserwacji oraz rozpowszechnienia antygenów jako ważnych parametrów przy projektowaniu nowych szczepionek.

Narzędzia bioinformatyczne w ciągu ostatniej dekady stały się podstawowymi środkami do poszukiwania nowych celów molekularnych leków lub kandydatów na szczepionki. Opracowany w 2019 roku PanRV jest pierwszym narzędziem umożliwiającym poszukiwanie antygenów *in silico* w kontekście pełnego pangenomu danego gatunku patogenu, w którym cztery funkcjonalne moduły łączą się w integralną całość. PanRV składa się z modułów: i) PGM (*pangenome estimation module*), ii) RVM (*reverse vaccinology module*), iii) FAM (*functional annotation module*), iv) ARM (*antibiotic resistance association module*) [45].

Moduł PGM odpowiada za przeprowadzenie analizy pangenomu na podstawie zadanych sekwencji. Umożliwia przeprowadzenie analizy tysięcy sekwencji genomowych przy użyciu jednego narzędzia. Efektem analizy jest podział zidentyfikowanych genów na grupy zgodnie z ich częstością występowania wśród izolatów. Najważniejszą funkcję pełni moduł RVM, który stosując kolejne filtry ostatecznie typuje odpowiednich kandydatów do dalszej analizy. Funkcje stosowanych filtrów opisano w Tabeli I.

Moduł FAM programu PanRV odpowiada za funkcjonalną adnotację analizowanych genów. Pozwala na opisanie biologicznej i molekularnej funkcji białek oraz oszacowanie ich znaczenia dla komórki bakteryjnej. Na podstawie sekwencji białka w formacie FASTA przeprowadzany jest BLAST [1] w odniesieniu do baz UniProt [2] oraz COG [65]. Ostatnim z modułów jest ARM, którego zadaniem jest sprawdzenie powiązań wytypowanych białek ze znanymi mechanizmami antybiotykooporności na podstawie bazy danych CARD (*antibiotic resistance database*) [37]. Ten krok pozwala na wytypowanie antygenów charakterystycznych dla opornych na antybiotyki szczepów patogenu, m.in. wielooopornych szczepów MDR [45].

W celu przeprowadzenia testu wyżej opisanej procedury analizowano genomy 301 szczepów *Staphylococcus aureus*, bakterii odpowiedzialnej za przypadki sepsy oraz ostrego uszkodzenia płuc (*ALI – acute lung injury*), które cechuje się śmiertelnością na poziomie

Tabela I
Funkcje filtrów wchodzących w skład modułu odwrotnej wakcynologii programu PanRV [45]

Lp.	Kryterium działania filtra	Opis
1.	Lokalizacja białka	Selekcja białek związanych z błoną, peryplazmatycznych oraz ulegających sekrecji
2.	Niezbędność białka	Selekcja białek kluczowych dla utrzymania żywotności bakterii na podstawie bazy DEG [32]
3.	Rola w wirulencji	Selekcja białek zaangażowanych w procesy infekcji i patogenezy na podstawie baz VFdb oraz MvirDB [30, 76]
4.	Homologia do białek gospodarza i nie patogennych bakterii mikrobioty jelitowej	Selekcja białek nie wykazujących homologii do żadnych białek występujących naturalnie u człowieka lub jego mikrobioty w celu uniknięcia reakcji autoimmunologicznej po zaszczepieniu
5.	Domeny transbłonowe białka	Selekcja białek posiadających mniej niż dwie domeny transbłonowe ze względu na trudność oczyszczania białka
6.	Masa molekularna białka	Selekcja białek o masie poniżej 110 kDa ze względu na łatwość ich oczyszczania i manipulacji w trakcie konstruowania szczepionki
7.	Obecność epitopów	Przewidywanie wiązania do receptorów limfocytów B oraz do zespołów białek MHC I oraz MHC II

40% [74]. W wyniku analizy przeprowadzonej przez moduł PGM, spośród puli 11384 genów tworzących pangenom wytypowano 1524 geny rdzeniowe (13%) obecne u wszystkich szczepów. Zastosowanie modułu RVM pozwoliło wskazać wśród nich 7 potencjalnych kandydatów na szczepionkę oraz oszacować ich powinowactwo do receptorów limfocytów T oraz B. Dalsze analizy wykazały istotną rolę każdego z białek w przeżywalności i patogenności bakterii. Zastosowanie analizy pangenomu patogenu i połączenie jej z technikami odwrotnej wakcynologii pozwoliło na znaczne skrócenie czasu prowadzonych badań i wytypowanie antygenów konserwowanych w obrębie gatunku [45].

Kolejnym przykładem zastosowania genomiki porównawczej we współczesnej nauce są badania nad *Mycoplasma pneumoniae*. Ta beztlenowa bakteria jest jedną z najczęstszych przyczyn infekcji górnych i dolnych dróg oddechowych oraz stanów zapalnych płuc, które rozwijają się u 10–40% zakażonych pacjentów [69]. Ze względu na niezdolność bakterii do syntezy peptydoglikanu, jest naturalnie oporna na antybiotyki β-laktamowe. Z powodu tych właściwości *M. pneumoniae* stanowi duże zagrożenie w kontekście szerzącej się wśród szczepów patogennych oporności na kolejne grupy antybiotyków. Wobec tego, głównym zadaniem jest identyfikacja nowych celów molekularnych dla leków oraz odnalezienie antygenów możliwych do wykorzystania przy konstrukcji szczepionki [71]. Do porównawczej analizy genomowej wykorzystano 88 kompletnych sekwencji genomowych *M. pneumoniae* dostępnych w bazie GenBank. Do analizy plików w formacie FASTA wykorzystano narzędzie OrthoFinder. Działanie programu opiera się o algorytmy BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) oraz MCL (*Markov Cluster Algorithm*), co pozwala na odnalezienie regionów homologicznych oraz wygenerowanie „rodzin" białek na podstawie ich sekwencji [14]. Następnie zidentyfikowane geny podzielono na trzy grupy: i) geny „rdzeniowe" obecne u wszystkich szczepów, ii) geny obecne u części ze szczepów, iii) geny występujące u tylko jednego szczepu bakterii. Za pomocą programu BLASTp przyrównano sekwencje aminokwasowe kodowane przez odnalezione geny patogenu do proteomu człowieka w celu wytypowania tych białek bakteryjnych, które nie wykazują homologii wobec żadnego z białek człowieka. Ten krok umożliwił wyeliminowanie tych antygenów, które mogłyby wywołać reakcję autoimmunologiczną lub nie spowodować żadnej odpowiedzi układu odpornościowego [71].

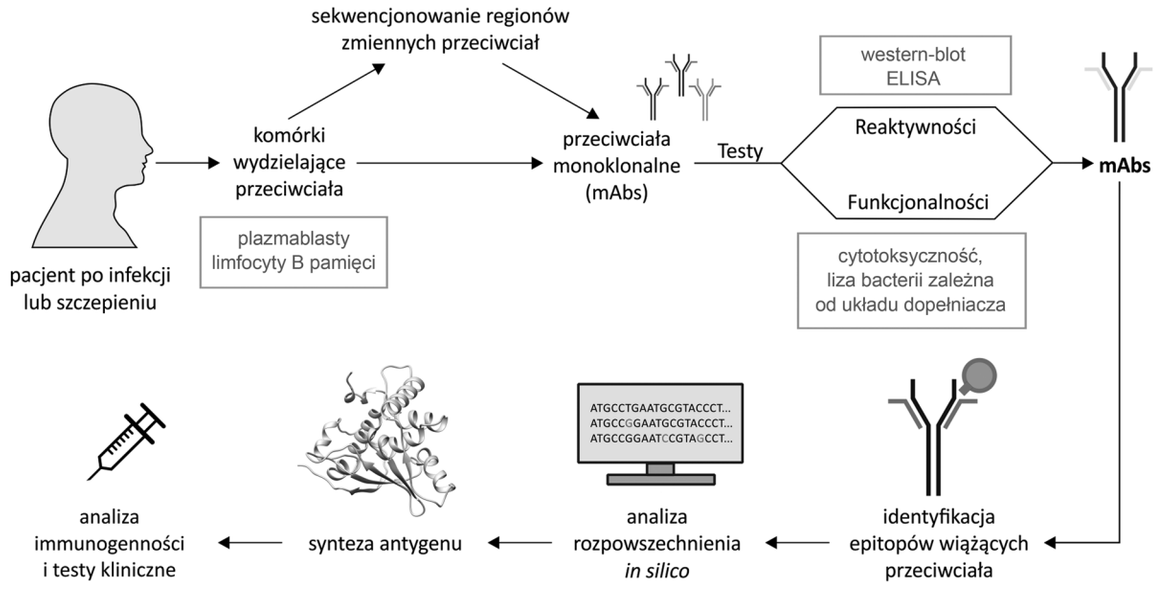
Bazę DEG (*Database of Essential Genes*) wykorzystano do zweryfikowania roli odnalezionych białek. Do dalszej analizy wybrano białka, które uznano za niezbędne lub kluczowe w rozwoju i wirulencji bakterii. Lokalizację komórkową białek oszacowano przy użyciu narzędzia SurfG+, a białka zidentyfikowane jako eksponowane na powierzchni komórki lub ulegające sekrecji wykorzystano w dalszej pracy zgodnie z założeniami odwrotnej wakcynologii [71].

Porównawcze analizy genomowe odgrywają szczególną rolę przy konstrukcji szczepionek skierowanych przeciwko tym bakteriom, których tylko niektóre odmiany są patogenne. Przykładem jest *Escherichia coli,* której niepatogenne warianty są obecne w mikrobiocie jelit ponad 90% populacji [33]. Wśród szczepów *E. coli* powodujących infekcje wyróżniono m.in. EPEC (*enteropathogenic E. coli*), STEC (*Shiga-toxin producing E. coli*), EHEC (*enterohaemorrhagic E. coli*) czy UPEC (*uropathogenic E. coli*). Odnalezienie antygenów obecnych wyłącznie u patogennych szczepów *E. coli* jest koniecznym krokiem w konstrukcji szczepionek. Przykładem odnalezionego antygenu jest FimH, adhezyna charakterystyczna dla uropatogennych szczepów *E. coli* [46].

5. Odwrotna wakcynologia 2.0

Kolejnym krokiem w rozwoju odwrotnej wakcynologii stało się projektowanie antygenów na podstawie izolowanych przeciwciał monoklonalnych. Był on możliwy dzięki osiągnięciom technicznym ostatniej dekady. Po pierwsze, udoskonalono metody klonowania ludzkich limfocytów B oraz ich wykorzystania do produkcji rekombinowanych przeciwciał monoklonalnych lub samych fragmentów Fab zdolnych do wiązania antygenów [26, 63, 75]. Pozwoliło to na opracowanie skuteczniejszych metod szacowania odpowiedzi układu immunologicznego po kontakcie z dowolnym antygenem w trakcie infekcji lub po użyciu szczepionki. Po drugie, techniki mapowania epitopów konformacyjnych, poprzez analizy struktury 3D fragmentów Fab połączonych w kompleksy z ich antygenami, są w stanie opisać je z atomową dokładnością. Wykorzystanie tych danych pozwala na projektowanie nowych immunogenów mających wywołać bardzo precyzyjną odpowiedź immunologiczną celującą w wybrane epitopy [55]. Ryc. 3. przedstawia najważniejsze etapy projektowania nowego antygenu szczepionkowego z wykorzystaniem odwrotnej wakcynologii 2.0.

Szczególnie obiecujące wyniki odwrotnej wakcynologii 2.0 uzyskano jak dotąd w przypadku chorób wirusowych. Strategia ta została wykorzystana m.in. do opracowania szczepionki przeciwko syncytialnemu wirusowi oddechowemu (RSV). Infekcje wywołane przez RSV mogą prowadzić u dzieci poniżej piątego roku życia do ciężkich zaburzeń oddychania [7]. Wirus ten jest główną przyczyną hospitalizacji w tej grupie wiekowej, powoduje też znaczną śmiertelność u osób starszych w skali podobnej do grypy sezonowej. RSV skutecznie unika mechanizmów odporności. Tak na



Ryc. 3. Schemat projektowania szczepionki w odwrotnej wakcynologii 2.0

Limfocyty B lub plazmablasty wyizolowane z krwi chorego pacjenta stanowią źródło przeciwciał powstałych w odpowiedzi na kontakt z antygenem. Następnym krokiem jest selekcja puli przeciwciał poprzez analizę ich reaktywności i funkcjonalności. Uzyskane sekwencje genów Ig odpowiadających wytypowanym przeciwciałom mogą być wykorzystane do produkcji rekombinowanych przeciwciał w odpowiednim systemie. Charakterystyka struktury przeciwciała związanego z antygenem pozwala na dokładne zdefiniowanie konkretnego epitopu. Jeżeli sekwencja kodująca dane białko jest konserwowana w populacji patogenu, proteina może być testowana jako nowy antygen lub wykorzystana jako źródło epitopu przy syntezie antygenu *de novo*. Nowy immunogen jest projektowany tak, by zweryfikowany epitop był w nim wyraźnie prezentowany. Po ustaleniu sposobu dostarczenia immunogenu, możliwe jest rozpoczęcie testów klinicznych. Na podstawie [5].

przykład niestrukturalne białka 1 i 2 hamują funkcje efektorowe interferonu typu I, zaś glikoproteina G działa immunomodulująco i może wpływać na szlaki sygnałowe w komórkach prezentujących antygen [10, 35]. Ponadto infekcja i uwalnianie wirionów na wierzchołkowej powierzchni spolaryzowanego nabłonka dróg oddechowych są względnie izolowane od ogólnoustrojowych odpowiedzi układu odpornościowego.

Szczepionka opracowana w latach 60. XX wieku opierająca się na inaktywowanym wirusie nasilała przebieg zakażenia RSV po naturalnym zachorowaniu, co spowodowało zaprzestanie jej stosowania [60]. Badania *in vitro* wskazywały, że przeciwciała skierowane przeciw glikoproteinie F skutecznie neutralizują wirusa, ale jednocześnie immunizacja zwierząt doświadczalnych nie prowadziła do uzyskania wysokiego poziomu przeciwciał mających tę zdolność. Z pomocą przyszła odwrotna wakcynologia 2.0. Ludzkie limfocyty B po wyizolowaniu bezpośrednio od ozdrowieńców posłużyły jako źródło przeciwciał monoklonalnych (humAbs). Spośród wszystkich przeciwciał przebadanych pod kątem neutralizacji RSV *in vitro*, humAb o nazwie D25 było najsilniejsze, 100–150 razy silniejsze niż licencjonowany paliwizumab, jedyne przeciwciało monoklonalne zatwierdzone przez FDA do stosowania w leczeniu RSV u niemowląt [17, 39, 67]. Potwierdziło to zasadność stosowania powierzchniowej glikoproteiny F w charakterze antygenu szczepionkowego, ale dopiero rozwiązanie struktury krystalicznej tego białka w pełni wytłumaczyło uzyskiwane wcześniej wyniki. Białko F występuje w dwóch stanach konformacyjnych: pre-F (przed fuzją) i post-F (po fuzji). Okazało się, że tylko wtedy, gdy glikoproteina F występuje w konformacji pre-F, na powierzchni jej struktury dostępne są wysoce wrażliwe na neutralizację epitopy (miejsca oznaczone jako Ø, II i V) rozpoznawane m.in. przez przeciwciało D25. Samoistna zmiana konformacji na post-F powoduje, że przeciwciało D25 nie jest zdolne do wiązania się z białkiem F. Stwierdzono również, że chociaż przeciwciała (np. palivizumab) skierowane przeciwko miejscom antygenowym II i IV, które są obecne na powierzchni zarówno konformacji pre-F, jak i post-F, mogą osiągnąć wysoką siłę działania, większość z nich ma umiarkowaną aktywność [29, 40].

Glikoproteina F ustabilizowana w konformacji przedfuzyjnej weszła w skład preparatu (DS-Cav1), który po pozytywnych wynikach uzyskanych na różnych modelach zwierzęcych (myszy, makaki), aktualnie przechodzi badania kliniczne I fazy [38, 44].

Powyższa strategia polegająca na wyborze „miejsca wrażliwego na neutralizację" może mieć również zastosowanie w przypadku opracowania szczepionek przeciwko innym wirusom (np. HIV), choć jej powodzenie zależy m. in. od poziomu aktywności neutralizującej wymaganego do uzyskania ochrony jak również zmienności wirusów. Badania te podkreślają również,

jak istotne jest opisanie mechanizmu naturalnej odpowiedzi układu odpornościowego człowieka na infekcję.

Powstanie odwrotnej wakcynologii 2.0 umożliwiło dalszy rozwój badań nad szczepionką przeciw *N. meningitidis* ser. B i odnalezienie nowych antygenów tej bakterii. Od siedmiomiesięcznego dziecka chorego na IMD (invasive meningococca disease) pobrano krew i opisaną metodą otrzymano osiem różnych przeciwciał monoklonalnych. Trzy z nich charakteryzowało działanie bakteriobójcze przeciw szczepom MenB zależne od elementów układu dopełniacza, które jednak nie rozpoznawały antygenów odnalezionych w trakcie analizy genomu bakterii *in silico* [4].

Odwrotną wakcynologie 2.0 wykorzystano również do identyfikacji funkcjonalnych mAb przeciwko *Staphylococcus aureus* indukowanych podczas bakteriemii. Cztery z dziesięciu odnalezionych mAb, wzmocniły immunofagocytozę szczepu referencyjnego *S. aureus*. Jednak tylko trzy z nich rozpoznawały znane wcześniej antygeny [31].

Inny przykład stanowi *Streptococcus pneumoniae*, którego wysoka zmienność utrudnia zaprojektowanie szczepionki skutecznej przeciw większości wariantów obecnych w populacji. W 2021 roku wyizolowano przeciwciała monoklonalne P13-D9K oraz E12K, których skuteczność następnie przetestowano przeciw 25 szczepom pneumokoków. Wykazano 92% reaktywność obu przeciwciał wobec testowanych serotypów, co sugerowało, że rozpoznają one wysoce konserwowane epitopy. Analiza Western-blot wykazała, że oba typy przeciwciał rozpoznają białko o wielkości około 63 kDa, które nie zostało jeszcze dokładnie opisane – wykazano natomiast bakteriobójcze właściwości przeciwciał *in vitro* oraz *in vivo* [62].

6. Wyzwania stojące przed wakcynologią

Jedną z największych przeszkód przy projektowaniu nowych szczepionek podjednostkowych jest wysoka zmienność antygenów. Elementy układu odpornościowego rozpoznają te epitopy, które są w jakiś sposób eksponowane na powierzchni antygenu – zatem powstawanie nowych wariantów antygenów jest konsekwencją "wyścigu zbrojeń" między patogenami a układem immunologicznym. Może się to wiązać z występowaniem wielu odmian mikroorganizmów patogennych lub częstymi mutacjami powodującymi rozpowszechnienie nowego wariantu antygenu w całej populacji, jak to się dzieje w przypadku wirusa grypy [23]. Być może rozwiązanie tej sytuacji przyniesie właśnie odwrotna wakcynologia 2.0. Strategię tę wykorzystano do opracowania immunogenu, którego celem jest indukcja ochrony przed zakażeniem wirusem HIV. W 2013 roku opisano historię pacjenta, u którego wykształciła się bardzo skuteczna reakcja układu odpornościowego – po ok. 3 latach od infekcji zidentyfikowano przeciwciała szeroko neutralizujące (broadly neutralizing antibodies, bnAb) rozpoznające powierzchniowe białko gp120 wirusa HIV [27, 77]. Badanie repertuaru komórek B izolowanych od osób zainfekowanych HIV umożliwiło wyodrębnienie kilku szeroko neutralizujących przeciwciał, które powstają w wyniku naturalnej infekcji, m.in. przeciwciał klasy VRC01 [73]. Charakteryzują się one wysokim stopniem hipermutacji somatycznej w stosunku do linii zarodkowej, co sugeruje, że ich rozwój wymaga długotrwałej ekspozycji na antygen. Informacje o strukturze wykazującego ogromną zmienność białka gp120 oraz jego interakcjach z wyizolowanymi bnAb zostały wykorzystane do identyfikacji jego konserwowanych epitopów. Zaprojektowano immunogen eOD-GT8, który ma za zadanie aktywować prekursorowe komórki B linii zarodkowej. Dzięki zastosowaniu odwrotnej wakcynologii 2.0 jesteśmy więc w stanie zidentyfikować konkretne epitopy wiążące przeciwciała, co w sytuacji, ogromnej niekiedy, zmienności strukturalnej antygenów pozwoli na konstrukcję preparatów o większym potencjale immunogennym [6, 20].

Rozwijanie i stosowanie nowych strategii projektowania antygenów szczepionkowych jest nierozerwalnie związane z poznaniem mechanizmów odpowiedzi swoistej (nabytej), która wiąże się z produkcją specyficznych przeciwciał w odpowiedzi na kontakt z antygenem. Niedawne wyniki badań wskazują jednak na istnienie zjawiska "wytrenowanej odporności nieswoistej" (trained innate immunity), którego efektem jest wzmocnienie niespecyficznej odpowiedzi immunologicznej przy wtórnym zakażeniu – dokładny mechanizm molekularny tego procesu nie został jeszcze dokładnie poznany. Kolejne wyzwania dotyczą m.in.: (a) odnalezienia nowych adiuwantów w celu zwiększenia potencjału immunogennego szczepionek, [47, 53], (b) opracowania wektorów dla szczepionek podjednostkowych [11], (c) stworzenia szczepionek przeciw bakteriom patogennym, wśród których rozprzestrzeniają się mechanizmy oporności na antybiotyki [22, 24], (d) poznania molekularnych podstaw różnic w skuteczności szczepień w populacji [48, 50, 51] oraz (e) zniwelowanie występowania niepożądanych odczynów poszczepiennych [52, 72].

Poziom zaufania społecznego do szczepionek jest równie istotny, co postępy w dziedzinach wakcynologii, immunologii i genomiki. Brak pewności co do bezpieczeństwa dostępnych preparatów i obawa przed wystąpieniem poważnych skutków ubocznych to jedna z najważniejszych przyczyn zaniechania szczepień ochronnych (vaccine hesitancy). Zwiększenie liczby kontroli i testów nie ma przełożenia na wzrost bezpieczeństwa leków, zatem ich jakość musi zostać

zaprojektowana. Podejście to, nazwane Quality by Design (QbD), może być wykorzystane również przy projektowaniu szczepionek nowej generacji. Opracowanie protokołów postępowania zawierających minimalną ilość zmiennych przyczyni się do zmniejszenia liczby nieprzewidzianych skutków szczepienia. Szczególną uwagę zwraca się na szczepionki zawierające kwasy nukleinowe, ponieważ w ich przypadku jedyną istotną zmienną jest sekwencja DNA lub mRNA wykorzystywanego w preparacie. Rolą odwrotnej wakcynologii jest wskazanie kandydatów na antygeny szczepionkowe na podstawie analiz genomowych, natomiast zastosowanie schematów działania z uwzględnieniem QbD może umożliwić szybkie przejście do fazy testów klinicznych. Pierwszy z takich schematów został opracowany na podstawie badań związanych z epidemią COVID-19 i zaproponowany w kwietniu 2021 roku [70]. Odpowiednia komunikacja osiągnięć współczesnej wakcynologii dzięki współpracy naukowców, specjalistów zdrowia publicznego i dziennikarzy naukowych jest warunkiem koniecznym, by odbudować zaufanie społeczne do obowiązkowych i dobrowolnych szczepień ochronnych.

Piśmiennictwo

1. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403–410 (1990)
2. Bairoch A., Apweiler R., Wu C.H., Barker W.C., Boeckmann B., Ferro S., Gasteiger E., Huang H., Lopez R., Magrane M. *et al.*: The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*, **33**, D154–159 (2005)
3. Biagini M., Spinsanti M., De Angelis G., Tomei S., Ferlenghi I., Scarselli M., Rigat F., Messuti N., Biolchi A., Muzzi A. *et al.*: Expression of factor H binding protein in meningococcal strains can vary at least 15-fold and is genetically determined. *Proc Natl Acad Sci USA*, **113**, 2714–2719 (2016)
4. Bidmos F.A., Nadel S., Screaton G.R., Kroll J.S., Langford P.R.: Cross-Reactive Bactericidal Antimeningococcal Antibodies Can Be Isolated From Convalescing Invasive Meningococcal Disease Patients Using Reverse Vaccinology 2.0. *Front Immunol*, **9**, 1621 (2018)
5. Bidmos F.A., Siris S., Gladstone C.A., Langford P.R.: Bacterial Vaccine Antigen Discovery in the Reverse Vaccinology 2.0 Era: Progress and Challenges. *Front Immunol*, **9**, 2315 (2018)
6. Burton D.R.: Advancing an HIV vaccine; advancing vaccinology. *Nat Rev Immunol*, **19**, 77–78 (2019)
7. Bylsma L.C., Suh M., Movva N., Fryzek J.P., Nelson C.B.: Mortality Among US Infants and Children Under 5 Years of Age with Respiratory Syncytial Virus and Bronchiolitis: A Systematic Literature Review. *J Infect Dis*, **226**, S267–S281 (2022)
8. Christensen H., May M., Bowen L., Hickman M., Trotter C.L.: Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, **10**, 853–861 (2010)
9. Close B.E., Wilkinson J.M., Bohrer T.J., Goodwin C.P., Broom L.J., Colley K.J.: The polysialyltransferase ST8Sia II/STX: posttranslational processing and role of autopolysialylation in the polysialylation of neural cell adhesion molecule. *Glycobiology*, **11**, 997–1008 (2001)
10. Collins P.L., Melero J.A.: Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Res*, **162**, 80–99 (2011)
11. Ding C., Ma J., Dong Q., Liu Q.: Live bacterial vaccine vector and delivery strategies of heterologous antigen: A review. *Immunol Lett*, **197**, 70–77 (2018)
12. Durrheim D.N.: Measles eradication-retreating is not an option. *Lancet Infect Dis*, **20**, e138–e141 (2020)
13. Elveborg S., Monteil V.M., Mirazimi A.: Methods of Inactivation of Highly Pathogenic Viruses for Molecular, Serology or Vaccine Development Purposes. *Pathogens*, **11**, (2022)
14. Emms D.M., Kelly S.: OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. *Genome Biol*, **16**, 157 (2015)
15. Fagnocchi L., Biolchi A., Ferlicca F., Boccadifuoco G., Brunelli B., Brier S., Norais N., Chiarot E., Bensi G., Kroll J.S. *et al.*: Transcriptional regulation of the nadA gene in Neisseria meningitidis impacts the prediction of coverage of a multicomponent meningococcal serogroup B vaccine. *Infect Immun*, **81**, 560–569 (2013)
16. Gandhi A., Balmer P., York L.J.: Characteristics of a new meningococcal serogroup B vaccine, bivalent rLP2086 (MenB-FHbp; Trumenba(R)). *Postgrad Med*, **128**, 548–556 (2016)
17. Gilman M.S., Castellanos C.A., Chen M., Ngwuta J.O., Goodwin E., Moin S.M., Mas V., Melero J.A., Wright P.F., Graham B.S. *et al.*: Rapid profiling of RSV antibody repertoires from the memory B cells of naturally infected adult donors. *Sci Immunol*, **1**, (2016)
18. Henderson D.A.: The eradication of smallpox-an overview of the past, present, and future. *Vaccine*, **29**, D7-9 (2011)
19. Holst J., Oster P., Arnold R., Tatley M.V., Naess L.M., Aaberge I.S., Galloway Y., McNicholas A., O'Hallahan J., Rosenqvist E. *et al.*: Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV): lessons from past programs and implications for the future. *Hum Vaccin Immunother*, **9**, 1241–1253 (2013)
20. First-in-human clinical trial confirms novel HIV vaccine approach developed by IAVI and Scripps Research (https://www.iavi.org/news-resources/press-releases/2021/first-in-human-clinical-trial-confirms-novel-hiv-vaccine-approach-developed-by-iavi-and-scripps-research) (2021)
21. Johswich K.: Innate immune recognition and inflammation in *Neisseria meningitidis* infection. *Pathog Dis*, **75**, (2017)
22. Kennedy D.A., Read A.F.: Why the evolution of vaccine resistance is less of a concern than the evolution of drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, **115**, 12878–12886 (2018)
23. Kim H., Webster R.G., Webby R.J.: Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen. *Viral Immunol*, **31**, 174–183 (2018)
24. Klugman K.P., Black S.: Impact of existing vaccines in reducing antibiotic resistance: Primary and secondary effects. *Proc Natl Acad Sci USA*, **115**, 12896–12901 (2018)
25. Lauring A.S., Jones J.O., Andino R.: Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines. *Nat Biotechnol*, **28**, 573–579 (2010)
26. Le Basle Y., Chennell P., Tokhadze N., Astier A., Sautou V.: Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. *J Pharm Sci*, **109**, 169–190 (2020)
27. Liao H.X., Lynch R., Zhou T., Gao F., Alam S.M., Boyd S.D., Fire A.Z., Roskin K.M., Schramm C.A., Zhang Z. *et al.*: Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus. *Nature*, **496**, 469–476 (2013)
28. Liguori A., Dello Iacono L., Maruggi G., Benucci B., Merola M., Lo Surdo P., Lopez-Sagaseta J., Pizza M., Malito E., Bottomley M.J.: NadA3 Structures Reveal Undecad Coiled Coils and LOX1

Binding Regions Competed by Meningococcus B Vaccine-Elicited Human Antibodies. *MBio*, **9**, (2018)
29. Liljeroos L., Krzyzaniak M.A., Helenius A., Butcher S.J.: Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**, 11133–11138 (2013)
30. Liu B., Zheng D., Zhou S., Chen L., Yang J.: VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res*, **50**, D912-D917 (2022)
31. Lu D.R., Tan Y.C., Kongpachith S., Cai X., Stein E.A., Lindstrom T.M., Sokolove J., Robinson W.H.: Identifying functional anti-*Staphylococcus aureus* antibodies by sequencing antibody repertoires of patient plasmablasts. *Clin Immunol*, **152**, 77–89 (2014)
32. Luo H., Lin Y., Gao F., Zhang C.T., Zhang R.: DEG 10, an update of the database of essential genes that includes both protein-coding genes and noncoding genomic elements. *Nucleic Acids Res*, **42**, D574–580 (2014)
33. Martinson J.N.V., Walk S.T.: *Escherichia coli* Residency in the Gut of Healthy Human Adults. *EcoSal Plus*, **9**, (2020)
34. Masignani V., Pizza M., Moxon E.R.: The Development of a Vaccine Against Meningococcus B Using Reverse Vaccinology. *Front Immunol*, **10**, 751 (2019)
35. Mastrangelo P., Hegele R.G.: RSV fusion: time for a new model. *Viruses*, **5**, 873–885 (2013)
36. McAleer W.J., Buynak E.B., Maigetter R.Z., Wampler D.E., Miller W.J., Hilleman M.R.: Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*, **307**, 178–180 (1984)
37. McArthur A.G., Waglechner N., Nizam F., Yan A., Azad M.A., Baylay A.J., Bhullar K., Canova M.J., De Pascale G., Ejim L. *et al*: The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother*, **57**, 3348–3357 (2013)
38. McLellan J.S., Chen M., Joyce M.G., Sastry M., Stewart-Jones G.B., Yang Y., Zhang B., Chen L., Srivatsan S., Zheng A. *et al.*: Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. *Science*, **342**, 592–598 (2013)
39. McLellan J.S., Chen M., Leung S., Graepel K.W., Du X., Yang Y., Zhou T., Baxa U., Yasuda E., Beaumont T. *et al.*: Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science*, **340**, 1113–1117 (2013)
40. McLellan J.S., Ray W.C., Peeples M.E.: Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, **372**, 83–104 (2013)
41. Medini D., Donati C., Tettelin H., Masignani V., Rappuoli R.: The microbial pan-genome. *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 589–594 (2005)
42. Morales M., Tangermann R.H., Wassilak S.G.: Progress Toward Polio Eradication – Worldwide, 2015–2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **65**, 470–473 (2016)
43. Moxon E.R.: Applications of molecular microbiology to vaccinology. *Lancet*, **350**, 1240–1244 (1997)
44. Mukhamedova M., Wrapp D., Shen C.H., Gilman M.S.A., Ruckwardt T.J., Schramm C.A., Ault L., Chang L., Derrien-Colemyn A., Lucas S.A.M. *et al.*: Vaccination with prefusion-stabilized respiratory syncytial virus fusion protein induces genetically and antigenically diverse antibody responses. *Immunity*, **54**, 769–780 e766 (2021)
45. Naz K., Naz A., Ashraf S.T., Rizwan M., Ahmad J., Baumbach J., Ali A.: PanRV: Pangenome-reverse vaccinology approach for identifications of potential vaccine candidates in microbial pangenome. *BMC Bioinformatics*, **20**, 123 (2019)
46. Nesta B., Pizza M.: Vaccines Against Escherichia coli. *Curr Top Microbiol Immunol*, **416**, 213–242 (2018)
47. O'Hagan D.T., Lodaya R.N., Lofano G.: The continued advance of vaccine adjuvants – 'we can work it out'. *Semin Immunol*, **50**, 101426 (2020)
48. Omersel J., Karas Kuzelicki N.: Vaccinomics and Adversomics in the Era of Precision Medicine: A Review Based on HBV, MMR, HPV, and COVID-19 Vaccines. *J Clin Med*, **9**, (2020)
49. Osterloh A.: Vaccination against Bacterial Infections: Challenges, Progress, and New Approaches with a Focus on Intracellular Bacteria. *Vaccines* (*Basel*), **10**, (2022)
50. Poland G.A., Kennedy R.B., McKinney B.A., Ovsyannikova I.G., Lambert N.D., Jacobson R.M., Oberg A.L.: Vaccinomics, adversomics, and the immune response network theory: individualized vaccinology in the 21st century. *Semin Immunol*, **25**, 89–103 (2013)
51. Poland G.A., Ovsyannikova I.G., Jacobson R.M.: Personalized vaccines: the emerging field of vaccinomics. *Expert Opin Biol Ther*, **8**, 1659–1667 (2008)
52. Poland G.A., Ovsyannikova I.G., Jacobson R.M.: Adversomics: the emerging field of vaccine adverse event immunogenetics. *Pediatr Infect Dis J*, **28**, 431–432 (2009)
53. Pulendran B., P S.A., O'Hagan D.T.: Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov*, **20**, 454–475 (2021)
54. Rappuoli R.: Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 445–450 (2000)
55. Rappuoli R., Bottomley M.J., D'Oro U., Finco O., De Gregorio E.: Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *J Exp Med*, **213**, 469–481 (2016)
56. Rodrigues C.M.C., Plotkin S.A.: Impact of Vaccines; Health, Economic and Social Perspectives. *Front Microbiol*, **11**, 1526 (2020)
57. Scarselli M., Giuliani M.M., Adu-Bobie J., Pizza M., Rappuoli R.: The impact of genomics on vaccine design. *Trends Biotechnol*, **23**, 84–91 (2005)
58. Schneider M.C., Prosser B.E., Caesar J.J., Kugelberg E., Li S., Zhang Q., Quoraishi S., Lovett J.E., Deane J.E., Sim R.B. *et al.*: *Neisseria meningitidis* recruits factor H using protein mimicry of host carbohydrates. *Nature*, **458**, 890–893 (2009)
59. Serruto D., Spadafina T., Ciucchi L., Lewis L.A., Ram S., Tontini M., Santini L., Biolchi A., Seib K.L., Giuliani M.M. *et al.*: *Neisseria meningitidis* GNA2132, a heparin-binding protein that induces protective immunity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**, 3770–3775 (2010)
60. Shaw C.A., Ciarlet M., Cooper B.W., Dionigi L., Keith P., O'Brien K.B., Rafie-Kolpin M., Dormitzer P.R.: The path to an RSV vaccine. *Curr Opin Virol*, **3**, 332–342 (2013)
61. Shi S., Zhu H., Xia X., Liang Z., Ma X., Sun B.: Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine*, **37**, 3167–3178 (2019)
62. Siris S.: Identification of pneumococcal vaccine antigens using Reverse Vaccinology 2.0. *Thesis or dissertation*. London: Imperial College London; 2021.
63. Spadiut O., Capone S., Krainer F., Glieder A., Herwig C.: Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. *Trends Biotechnol*, **32**, 54–60 (2014)
64. Stephens D.S., Greenwood B., Brandtzaeg P.: Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet*, **369**, 2196–2210 (2007)
65. Tatusov R.L., Koonin E.V., Lipman D.J.: A genomic perspective on protein families. *Science*, **278**, 631–637 (1997)
66. Tettelin H., Masignani V., Cieslewicz M.J., Donati C., Medini D., Ward N.L., Angiuoli S.V., Crabtree J., Jones A.L., Durkin A.S. *et al.*: Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae:* implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 13950–13955 (2005)
67. The: Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The IMpact-RSV Study Group. *Pediatrics*, **102**, 531–537 (1998)

68. Thwaites C.L., Loan H.T.: Eradication of tetanus. *Br Med Bull*, **116**, 69–77 (2015)
69. Tong L., Huang S., Zheng C., Zhang Y., Chen Z.: Refractory *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia in Children: Early Recognition and Management. *J Clin Med*, **11** (2022)
70. van de Berg D., Kis Z., Behmer C.F., Samnuan K., Blakney A.K., Kontoravdi C., Shattock R., Shah N.: Quality by design modelling to support rapid RNA vaccine production against emerging infectious diseases. *NPJ Vaccines*, **6**, 65 (2021)
71. Vilela Rodrigues T.C., Jaiswal A.K., de Sarom A., de Castro Oliveira L., Freire Oliveira C.J., Ghosh P., Tiwari S., Miranda F.M., de Jesus Benevides L., Ariston de Carvalho Azevedo V. *et al.*: Reverse vaccinology and subtractive genomics reveal new therapeutic targets against *Mycoplasma pneumoniae*: a causative agent of pneumonia. *R Soc Open Sci*, **6**, 190907 (2019)
72. Whitaker J.A., Ovsyannikova I.G., Poland G.A.: Adversomics: a new paradigm for vaccine safety and design. *Expert Rev Vaccines*, **14**, 935–947 (2015)
73. Wu X., Zhang Z., Schramm C.A., Joyce M.G., Kwon Y.D., Zhou T., Sheng Z., Zhang B., O'Dell S., McKee K. *et al.*: Maturation and Diversity of the VRC01-Antibody Lineage over 15 Years of Chronic HIV-1 Infection. *Cell*, **161**, 470–485 (2015)
74. Yao L., Sun T.: Glycyrrhizin administration ameliorates Streptococcus aureus-induced acute lung injury. *Int Immunopharmacol*, **70**, 504–511 (2019)
75. Yokoyama W.M., Christensen M., Santos G.D., Miller D., Ho J., Wu T., Dziegelewski M., Neethling F.A.: Production of monoclonal antibodies. *Curr Protoc Immunol*, **102**, 251–2529 (2013)
76. Zhou C.E., Smith J., Lam M., Zemla A., Dyer M.D., Slezak T.: MvirDB--a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. *Nucleic Acids Res*, **35**, D391–394 (2007)
77. Zhou T., Georgiev I., Wu X., Yang Z.Y., Dai K., Finzi A., Kwon Y.D., Scheid J.F., Shi W., Xu L. *et al.*: Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science*, **329**, 811–817 (2010)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2022, 61, 4, 223–233
DOI: 10.2478/am-2022-023

MIKROBIOM PRZEWODU POKARMOWEGO CZŁOWIEKA – WYBRANE DANE

Beata Tokarz-Deptuła[1]*, Paulina Dudziak[1], Natalia Gurgacz[1], Wiesław Deptuła[2]

[1] Instytut Biologii, Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytet Szczeciński, Szczecin
[2] Instytut Medycyny Weterynaryjnej, Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Wpłynęło w październiku, zaakceptowano w listopadzie 2022 r.

Streszczenie: W pracy przedstawiono nowe dane wskazujące na skład mikrobiomu przewodu pokarmowego człowieka, składający się z bakterii, archeonów, wirusów (w tym bakteriofagów), a także organizmów eukariotycznych i heterotroficznych jakimi są grzyby – których bytowanie w przewodzie pokarmowym określane jest mianem mykobiomu. Przewód pokarmowy człowieka podzielony na jamę ustną, gardło, przełyk, żołądek, jelito cienkie i grube, zasiedlany wyżej wymienionymi drobnoustrojami, tworzy swoisty jakościowo-ilościowy, bogaty i zróżnicowany swoisty ekosystem. Dzięki stosowaniu metod bioinformatycznych, molekularnych oraz dzięki sekwencjonowaniu metagenomowemu jest on nadal poznawany, a dzięki tym metodom możliwe jest jego lepsze poznanie. W niniejszej pracy scharakteryzowano grupy systematyczne bakterii, archeonów, wirusów i grzybów występujące w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego i wskazano także na enterotypy jelita grubego. Analizując wymienione grupy mikroorganizmów w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego człowieka, należy zauważyć, że odcinek jelita grubego i jamy ustnej jest „wyposażony" w najbardziej bogaty mikrobiom, natomiast gardło i przełyk posiada najmniejszą liczbę drobnoustrojów wchodzących w skład mikrobiomu. Wśród całości mikrobiomu przewodu pokarmowego człowieka najliczniejszą grupę stanowią bakterie usytuowane w jamie ustnej i jelicie cienkim, zaś najbardziej ograniczoną grupę bakterii rejestruje się w gardle i przełyku. Archeony natomiast zostały opisane najliczniej w jelicie grubym i jamie ustnej, a nie zostały stwierdzone w gardle i jelicie cienkim. Wymieniane w odcinkach przewodu pokarmowego wirusy, najliczniej występowały w jelicie grubym i jamie ustnej, natomiast nie stwierdzono ich w żołądku. Występujące w mikrobiomie grzyby, najobficiej stwierdzane były w jelicie grubym i żołądku, a w najmniejszej ilości w gardle i jelicie cienkim.

1. Wstęp. 2. Elementy składowe mikrobiomu przewodu pokarmowego człowieka. 3. Mikroorganizmy przewodu pokarmowego człowieka. 3.1. Bakterie, archeony, wirusy i grzyby występujące w jamie ustnej. 3.2. Bakterie, wirusy i grzyby występujące w gardle. 3.3. Bakterie, archeony, wirusy i grzyby występujące w przełyku. 3.4. Bakterie, archeony i grzyby występujące w żołądku. 3.5. Bakterie, wirusy i grzyby występujące w jelicie cienkim. 3.6. Bakterie, archeony, wirusy i grzyby występujące w jelicie grubym. 4. Podsumowanie

THE HUMAN GASTROINTESTINAL TRACT MICROBIOME – SELECTED DATA

Abstract: The paper presents new data indicating the composition of the human gastrointestinal microbiome, consisting of bacteria, archaea, viruses (including bacteriophages), as well as eukaryotic and heterotrophic organisms such as fungi – the existence of which in the gastrointestinal tract is referred to as the mycobiome. The human digestive tract, divided into the oral cavity, pharynx, esophagus, stomach, and small and large intestine, inhabited by the microorganisms mentioned above, forms a specific qualitative and quantitative, rich and diverse specific ecosystem. Thanks to the use of bioinformatic and molecular methods, including metagenomic sequencing, it is still being discovered. In this review, systematic groups of bacteria, archaea, viruses, and fungi occurring in individual sections of the gastrointestinal tract are presented, and enterotypes of the large intestine are indicated. Considering the amounts of the above-mentioned groups of microorganisms in individual sections of the gastrointestinal tract of the human, the environment of the large intestine and oral cavity are the richest parts of the microbiome, while the throat and esophagus are the poorest. Among the microbiome of the digestive tract of the human, the most numerous group are bacteria located in the mouth and small intestine, while the the most limited group of bacteria is registered in the pharynx and esophagus. Archaea, on the other hand, have been described most frequently in the large intestine and stomach, and were not found in the throat and small intestine. Most viruses in the gastrointestinal tract were found in the large intestine and the oral cavity, while they were absent in the stomach. The fungi found in the microbiome were most abundant in the large intestine and stomach, and the smallest amount in the throat and small intestine.

1. Introduction. 2. Components of the human gastrointestinal tract microbiome. 3. Microorganisms of the human gastrointestinal tract. 3.1. Bacteria, archaea, viruses and fungi occurring in the oral cavity. 3.2. Bacteria, viruses and fungi found in the throat. 3.3. Bacteria, archaea, viruses and fungi found in the esophagus. 3.4. Bacteria, archaea and fungi present in the stomach. 3.5. Bacteria, viruses and fungi found in the small intestine. 3.6. Bacteria, archaea, viruses and fungi found in the large intestine. 4. Conclusions

Słowa kluczowe: archea, bakterie, grzyby, mikrobiom, przewód pokarmowy, wirusy
Keywords: archea, bacteria, fungi, microbiome, gastrointestinal tract, viruses

* Autor korespondencyjny: prof. US, dr hab. Beata Tokarz-Deptuła, Instytut Biologii, Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin; e-mail: beata.tokarz-deptula@usz.edu.pl
© 2022 Beata Tokarz-Deptuła et al.
This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

1. Wstęp

Współczesny człowiek na każdym kroku styka się z mikroskopijnymi zarazkami, które często postrzegane są jako nasi „wrogowie", kojarząc je głównie z mikroorganizmami o właściwościach patogennych. Lata badań nad nimi prowadzone przez mikrobiologów przyczyniły się do opracowania zabiegów profilaktycznych w postaci szczepionek zabezpieczających przed zainfekowaniem się nimi. Jednym z wielkich naukowców – mikrobiologów był Ludwik Pasteur, który opracował szczepionkę przeciw takim chorobom bakteryjnym jak wąglik, pastereloza drobiu, różyca świń, a przede wszystkim przeciw chorobie wirusowej, śmiertelnej dla człowieka, jaką jest wścieklizna. W dzisiejszej dobie oprócz już wielu opracowanych szczepionek, możemy sięgać po chemioterapeutyki i antybiotyki w celu likwidacji mikroorganizmów stanowiących grupę tzw.: „wrogów". Nierzadko jednak czynimy tym sposobem więcej szkody, niż pożytku, gdyż ich eradykacja powoduje szkodliwe skutki wobec ludzkiego organizmu, bo wśród nich są mikroorganizmy egzystujące w symbiozie z organizmem człowieka [1, 29, 71]. Wynika i wiąże się to z faktem, że wiele społeczności mikroorganizmów od zarania dziejów to nasi „sojusznicy", odpowiedzialni za niezliczoną ilość interakcji, zarówno pomiędzy ludzkim organizmem jak i pomiędzy sobą, przez co tworzą one "tarczę" ochronną, w powiązaniu z układem immunologicznym makroorganizmu [17, 79, 94]. Także ich wzajemne oddziaływania w tym na makroorganizm, układają się w dość zawiłą "mapę", co powoduje, że mikroorganizmy oraz balans w proporcjach ich populacji, w sposób bardzo istotny wpływa na zachowanie homeostazy, w tym status odpornościowy organizmu [17, 41, 79, 87, 94]. Wykazano także, że oddziaływanie mikroorganizmów, warunkuje wiele stanów patologicznych m.in. choroby o podłożu immunologicznym, choroby metaboliczne, a nawet nowotworowe [1, 23, 40, 44, 71, 79, 92, 94, 102]. Stany te warunkowane są i tym, że więcej niż połowę komórek w organizmie człowieka stanowią mikroorganizmy przekraczające liczbę 100 trylionów, z czego większość kolonizuje przewód pokarmowy w postaci mikroorganizmów symbiotycznych i komensalnych [71, 102]. Właśnie bakterie symbiotyczne i komensalne zapewniają "ochronę" człowieka przed bakteriami chorobotwórczymi, stąd niszczenie ich stosując choćby chemioterapeutyki, powoduje wyjałowienie organizmu, co prowadzi do zachwiania w ich równowadze i dysbiozę [44]. Charakteryzując skład mikrobiomu należy dodać, że składa się on nie tylko ze „społeczności" mikroorganizmów symbiotycznych i komensalnych, ale także chorobotwórczych [66, 102]. Taki układ ekologiczny mikrobiomu u ssaków, w tym ludzi, jest bardzo dynamiczny, bo zmienia się w zależności od miejsca i trybu życia makroorganizmu, predyspozycji genetycznych, wieku, płci oraz diety, wliczając także stosowanie prebiotyków, probiotyków i ksenobiotyków [102, 114, 120]. Stąd przyjmuje się, że ssaki, w tym człowiek, wraz ze swoim mikrobiomem tworzą "superorganizm" [93].

2. Elementy składowe mikrobiomu przewodu pokarmowego człowieka

Przewód pokarmowy człowieka, który osiąga długość nawet do 7,6 metra , stanowi "dom" dla wielu różnorodnych mikroorganizmów [48]. Mikrobiom przewodu pokarmowego człowieka, tworzą bakterie, archeony, wirusy i grzyby, tworzące swoiste konsorcjum oddziaływujące wzajemnie na siebie, a które można przyrównać do "lasu deszczowego" [10, 102]. Dzieli się on na mikrobiom rdzeniowy – stały i mikrobiom zmienny [110]. Mikrobiom rdzeniowy tworzą dominujące gatunki mikroorganizmów, które znajdują się w różnych częściach zdrowego organizmu, uniwersalne dla większości populacji ludzkiej, natomiast mikrobiom zmienny będąc specyficzny dla danej osoby, ewoluuje w odpowiedzi m.in. na styl życia, miejsce zamieszkania czy jej dietę [110]. Efektem tego występujące w mikrobiomie rodzaje, gatunki i szczepy bakterii, archeonów, wirusów i grzybów, są specyficzne, odmienne i wyjątkowe dla danego osobnika, co można porównać do "odcisku palca" [28]. To konsorcjum mikroorganizmów w przewodzie pokarmowym pełni wiele istotnych funkcji m.in. tworzy ochronę przed patogenami, syntezuje witaminy i bierze udział w wytwarzaniu energii, przez co często określane jest jako "zapomniany organ" [17, 102].

Bakterie występujące i tworzące mikrobiom przewodu pokarmowego stanowią drugą po bakteriofagach największą grupę mikroorganizmów, bo zarejestrowano w jelitach ponad 1000 gatunków bakterii jelitowych, których liczba wciąż rośnie [102]. Dethlefsen i wsp.[28] przyjmują, że co najmniej 80% wszystkich gatunków bakterii w jelitach ludzkich jedynie identyfikować można metodami genetycznymi [64, 102, 110]. Niezależnie od tego faktu bakterie tworzące mikrobiom przewodu pokarmowego, zwiększają swoją liczbę także poprzez zdolność do spontanicznych mutacji i horyzontalnego transferu genów, przez co cechują się dynamiczną adaptacją do zmieniających się warunków, w tym nabywania oporności na działanie chemioterapeutyków [17]. Te jednokomórkowe mikroskopijne mikroorganizmy o tendencji do wszędobylskości i kolonizujące niemal każdy zakątek naszego organizmu, a także wiele środowisk naszego życia, cechują się dużą różnorodnością, choćby w zakresie wielkości. Otóż występująca w środowisku wodnym *Thiomargarita namibiensis* może osiągnąć 750 μm i być widoczna gołym okiem, za to *Francisella tularensis* kolonizująca organizm ssaków, w tym ludzki, ma jedynie 0,2 μm [104, 116, 117]. Pod

względem morfologii bakterii można je podzielić na formy cylindryczne, kuliste, spiralne i nietypowe, zaś ze względu na metabolizm wyodrębnić można wśród nich, bakterie beztlenowe i tlenowe, zaś ze względu na grubość ich ściany komórkowej, bakterie Gram– i Gram+ [86]. Rozmnażanie bakterii zachodzi głownie na drodze bezpłciowej i odbywa się poprzez podział komórki bakteryjnej, z której powstają dwie identyczne komórki potomne [59, 112]. Opisano także u nich podział asymetryczny [83], rozmnażanie przez pączkowanie [55] oraz procesy parapłciowe – transdukcję [3, 121]. Tempo rozmnażania ich jest bardzo duże, bo potrafią w prawie każdym biotypie w dynamiczny sposób dostosowywać swój metabolizm do swoiście wydajnego wykorzystania wszystkich dostępnych składników odżywczych, nawet wbrew zmieniającym się warunkom [12].

Drugą grupą mikroorganizmów tworzących mikrobiom przewodu pokarmowego są archeony, których nazwa pochodzi od greckiego słowa „archaios" oznaczającego „prymitywny" lub „starożytny" [98]. Archeony to organizmy prokariotyczne, żyjące w warunkach termofilnych, ale także mające zdolność rozwoju i przetrwania nawet w warunkach ekstremalnych jak np. w podwodnych hydrotermalnych kominy [5, 37, 48, 63, 98]. Bytują one w warunkach mezofilnych w organizmach ssaków, w tym człowieka [5, 37, 48, 63, 98]. Archeony jako składowe mikrobiomu przewodu pokarmowego człowieka, badane były w mniejszym stopniu niż bakterie. Szacuje się, że w jelitach u ludzi archeony mogą stanowić do 21,1% wszystkich mikroorganizmów, przez co regulują i wpływają na mikrobiom tego biotopu [5, 7, 58, 81]. Większość z nich w ludzkim przewodzie pokarmowym to archeony metanogenne, cechujące się syntrofią bazującą na transporcie wodoru pomiędzy metanogennymi archeonami, a innymi rodzajami mikroorganizmów [58, 81]. Niektóre z nich metabolizują metan i redukują tym samym poziom wodoru, co stymuluje wzrost bakterii sacharolitycznych, choć także opisano archeony uczestniczące w metabolizmie węglowodanów [5, 113]. Archeony mogą być w pewnym stopniu powiązane z chorobami u ludzi [37]. Ich elementy procesów informacyjnych, bardziej przypominają eukariotyczne niż bakteryjne odpowiedniki, choć czasami są wspólne dla domeny Eukaryota i Prokaryota [42]. Cechują się one odmienną w stosunku do bakterii budową ściany komórkowej, w której brak peptydoglikanu, a ich błona posiada wiązania eterowe oraz występują u nich specyficzne enzymy i szlaki metaboliczne [33, 37, 54, 62, 81, 98]. Mają one wielkość od 0,1 μm do 15 μm i podobnie jak w przypadku bakterii, mogą przybierać kształt kulisty, cylindryczny i spiralny, choć także rejestruje się kształty nietypowe [33, 37, 116]. Brak u nich mitochondriów, aparatu Golgiego, retikulum endoplazmatycznego i lizosomów, zaś obecne u nich rybosomy, są zbliżone swoją strukturą do występujących u bakterii [33]. Rozmnażanie u archeonów podobnie jak u bakterii odbywa się drogą bezpłciową przez podział komórkowy, bądź poprzez pączkowanie [32]. Ich struktura genetyczna, a także ich szlaki transkrypcyjne i translacyjne, są bardziej podobne do domeny *Eucaryota* [5, 62].

Trzecią grupą zarazków, które tworzą mikrobiom przewodu pokarmowego ssaków, w tym człowieka są wirusy, które nie posiadają struktury komórkowej z organellami i układem metabolicznym [13]. Ich nazwa pochodzi od łacińskiego słowa *vīrus* oznaczającego truciznę/śluz, bądź jad [39]. Wirusy są najliczniejszymi jednostkami biologicznymi na Ziemi i wszechobecnymi pasożytami form życia komórkowego, w tym w przewodzie pokarmowym [100]. Ich wielkość może się wahać od rozmiaru około 18–26 nm u parwowirusów, do 250 nm – 2000 nm u wirusów olbrzymich [19, 27, 62, 90]. Wirusy zbudowane są z kapsydu o symetrii helikalnej lub kubicznej z zamkniętym w środku kwasem nukleinowym w postaci DNA lub RNA, będącym kodem genetycznym, który służy do replikacji wirusów [100]. Wirusy, podobnie jak bakterie, mutują, ale także ewoluują i adaptują się do układu odpornościowego gospodarza, co pozwala im kolonizować i infekować wiele makroorganizmów, w tym nie tylko ssaków ale także rośliny, bakterie, archeony oraz wirusy olbrzymie np. wirusy z rodziny – np. *Mimiviridae*, infekujące m.in. pierwotniaki występujące w ludzkich jelitach [15, 19, 27, 60, 65, 100]. W tej części przewodu pokarmowego człowieka (jelitach) zidentyfikowano ponad 140 000 gatunków wirusów, z których większość stanowią bakteriofagi [13], a których jest co najmniej dziesięciokrotnie więcej niż bakterii [13, 76, 99]. Laceuit i wsp. [65] wykazali że w treści jelit człowieka bez określenia w którym odcinku, zarejestrowano wirusy ssacze rodziny Picornaviridae (rodzaj *Enterovirus*, *Parechovirus*, *Cardiovirus* i *Salivirus*), *Picobirnaviridae* (rodzaj *Picobirnavirus*), *Astroviridae* (rodzaj *Astrovirus*), *Reoviridae* (rodzaj *Rotavirus*), *Caliciviridae* (rodzaj *Norovirus, Sapovirus*), *Adenoviridae* (rodzaj *Mastadenovirus C* and *F* i inne), *Anelloviridae* (rodzaj *Anellovirus*), *Cycloviridae* (*Circovirus, Cyclovirus*) i *Parvoviridae* (*Bocavirus*). Inne badania [7] wykazały w jamie ustnej, nosie, płynie gardłowym i ślinie, że zawartość wirusów waha się od 10^9 cząstek na gram do 10^8 na mililitr i są to głównie bakteriofagi. W płytce nazębnej stwierdzono 10^{10} cząsteczek wirusowych na miligram płytki [68, 74, 108].

Następną grupę mikroorganizmów tworzących mikrobiom przewodu pokarmowego człowieka stanowią grzyby, które są organizmami eukariotycznymi i heterotroficznymi, a ich populację określa się jako mykobiom [86]. Cechą charakterystyczną grzybów jest tworzenie sieci rozgałęzionych kanalikowych komórek, które tworzą grzybnię oraz występowanie w ich ścianie komórkowej ergosterolu jako substancji przypominającej cholesterol błon komórkowych ssaków oraz

chitynę (30, 78, 97). Grzyby tworzą także mikroskopijne, odporne na czynniki zewnętrzne, zarodniki o wielkości od 3 do 30 mikronów, służące do ich rozprzestrzeniania i pełniące rolę propaguli, cechujące się dużą różnorodnością kształtów oraz pigmentacją [30, 78, 97]. Rozmnażanie grzybów może być bezpłciowe i zachodzi przez fragmentację grzybni, bądź poprzez wytwarzanie zarodników lub na drodze blastokonidiogenezy zwanej potocznie pączkowaniem oraz płciowe odbywające się poprzez zlewanie się ze sobą różnoimiennych strzępek grzybni [78]. Mykobiom ludzkiego przewodu pokarmowego i w stosunku do bakteriomu stanowi tylko około 0,03–2% mikroorganizmów, stąd określa się go jako "rzadką biosferę" w ludzkim mikrobiomie [73, 109]. Niemniej jednak, wpływa on na homeostazę makroorganizmu [36, 111], mimo że charakteryzuje się mniejszym zróżnicowaniem w stosunku do bakterii i wirusów [109]. Komórki grzybów ze względu na to, że są około 100 razy większe niż komórki bakteryjne, mimo mniejszej ich ilości, stwarzają stosunkowo dużą biomasę [73, 80].

3. Mikroorganizmy przewodu pokarmowego człowieka

Mikrobiom przewodu pokarmowego człowieka, to jest jamy ustnej, gardła, przełyku, żołądka, jelita cienkiego i grubego, tworzy swoisty jakościowo-ilościowy bogaty i zróżnicowany, swoisty ekosystem [96]. Jest on nadal ciągle poznawany i wzbogacany wiadomościami z zakresu jego nowych "elementów" w wyniku stosowania metod bioinformatycznych, molekularnych oraz sekwencjonowania metagenomowego, które to metody umożliwiają lepszą jego analizę [1, 17, 61, 102, 110].

3.1. Bakterie, archeony, wirusy i grzyby występujące w jamie ustnej

Jama ustna stanowi początek przewodu pokarmowego człowieka i jest ona bogata w mikroorganizmy (tab. I), gdyż stwierdzono w niej m.in. ponad 700 gatunków bakterii, czemu sprzyja stała jej wilgotność dzięki gruczołom wydzielającym ślinę o pH 6,5–7,0 oraz temperaturze około 37°C [50]. Jama ustna jako odcinek przewodu pokarmowego, „składa" się z warstwy skóry pokrytej nabłonkiem wielowarstwowym płaskim nierogowaciejącym, warg, języka, podniebienia i zębów co tworzy zróżnicowany biotop warunkowany odmiennymi warunkami dla społeczności drobnoustrojów [50]. Wskazuje się, że ze względu na spełnianie odpowiednich wymogów dla mikroorganizmów, środowisko jamy ustnej jest drugim wymieninaym pod względem obfitości odcinkiem przewodu pokarmowego po jelitach [1]. Wpływa na to także fakt, że organizm noworodka ssaka jest kolonizowany przez mikroorganizmy z dróg rodnych matki podczas porodu naturalnego [23]. Dodać należy, że pomimo iż większość drobnoustrojów jelitowych początkowo dostaje się do organizmu człowieka przez jamę ustną, biotop jamy ustnej

Tabela I
Bakterie, archeony, wirusy i grzyby, reprezentujące różne grupy systematyczne występujące w jamie ustnej

Populacje mikroorganizmów		Piśmiennictwo
Bakterie	**Gromada:** *Firmicutes* (obecnie *Bacillota*), *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidota*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *Saccharibacteria*, *Gracilibacteria.* **Rodzina**: *Staphylococcaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Burkholderiaceae*, *Neisseriaceae*, *Fusobacteriaceae.* **Gatunek:** *Streptococcus* (*S*) *sanguinis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *Veillonella* sp., *Granulicatella* sp., *Gamella* sp., *Actinomyces* sp., *Corynebacterium* sp., *Fusobacterium* sp., *Porphyromonas* sp., *Prevotella* sp., *Capnocytophaga* sp., *Haemophilus* sp., *Treponema* sp., *Lactobacterium* sp., *Eikenella* sp., *Leptotrichia* sp., *Peptostreptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Eubacteria* sp., *Pseudoramibacter* sp., *Propionibacterium* sp., *Moraxella* sp., *Campylobacter* sp., *Desulfobacter* sp., *Desulfovibrio* sp., *Fusobacterium* sp., *Selemonas* sp., *Simonsiella* sp., *Wolinella* sp., *Neisseria perflava*, *Rothia mucilaginosa.*	[14, 23, 38, 46, 53, 72, 84, 86, 92, 117]
Archeony	**Rząd:** *Thermoplasmatales.* **Gatunek:** *Methanobrevibacter* (*Mbb.*) sp., w tym: *Mbb. oralis*, *Mbb. smithii*, *Methanobacterium* sp., *Methanosarcina* sp., *Methanosphaera* sp., *Candidatus Nitrososphaera evargladensis*, *Methanomassilicoccus luminyensis.*	[8, 26, 49, 118]
Wirusy	**Rząd:** *Caudovirales.* **Rodzina:** *Herpesviridae*, *Papillomaviridae*, *Anelloviridae*, *Siphoviridae*, *Myoviridae.* **Gatunek:** bakteriofagi dla bakterii z rodzaju *Streptococcus*, *Veillonella*, *Escherichia*, *Bulkholderia*, *Salmonella, Megasphaer*, *Roseolovirus* oraz wirusy*: Human cytomegalovirus*, *Herpes simplex virus*, *Coxsackievirus A5*, *Enterovirus A*, *wirus Epstein-Barr.*	[45, 47, 74, 88, 92, 118]
Grzyby	**Rząd**: *Saccharomycetales.* **Rodzaj:** *Candida*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cryptococcus*, *Alternaria*, *Malassezia.* **Gatunek:** *Candida albicans.*	[1, 6, 14, 23, 45, 80, 118]

i jelit, dzieli wiele typowych dla siebie mikroorganizmów [50]. Bakterie obecne w jamie ustnej człowieka tworzą tzw. biofilm oralny, czyli ustrukturyzowaną społeczność komórek bakteryjnych (tab. I), wśród których pierwszymi są m.in. bakterie z gatunku *Streptococcus* [92]. Kompozycja bakterii w biofilmie oralnym różni się jak wspomniano w zależności od lokalizacji, jako że bakterie, np. występujące na płytce nazębnej, różnią się od tych, które znajdują się na grzbiecie języka [108]. W jamie ustnej najczęściej występującymi bakteriami są *Streptococcus* sp., które występują w 65% na błonie śluzowej, w 66% na zrogowaciałej części dziąseł i w 40% na powierzchni podniebienia twardego [14]. W tej części przewodu pokarmowego stwierdza się aż ponad 65% filotypów bakterii, w tym typowych dla biotopu w żołądku [84]. Natomiast mikrobiom śliny zawiera 51% *Proteobacteria* i 9% bakterii z gromady *Bacteroidota* [38], choć wg Jebba i wsp. [53] dominującymi gatunkami bakterii w ślinie są *Neisseria perflava* i *Rothia mucilaginosa.* W ślinie w tym biotopie wykryto także bakterie typowe dla mikrobiomu skóry, należące do rodziny: *Staphylococcaceae, Propionibacteriaceae, Burkholderiaceae, Neisseriaceae* i *Fusobacteriaceae* [72], a na zębach bakterie Gram-dodatnie takie jak, np: *Actinomyces* sp., *Streptococcus (S.) sanguinis*, *S. mutans* i *S. oralis* [22]. Jamę ustną kolonizują także bogate populacje archeonów, wirusów i grzybów (tab. I). W składzie mikrobiomu jamy ustnej stwierdza się w największej ilości bakterie, ale także bogato reprezentowane są wirusy, archeony i grzyby (tab. I).

3.2. Bakterie, wirusy i grzyby występujące w gardle

Ten odcinek przewodu pokarmowego człowieka dzieli się na trzy to jest: nosowy, ustny i krtaniowy i stanowi połączenie dwóch układów, oddechowego i pokarmowego, w którym stwierdzono, że największą populację wśród mikroorganizmów stanowią bakterie (tab. II) głównie z gromady *Bacteroidota* (27%), które występują o wiele liczniej, niż w innych odcinkach przewodu pokarmowego [38]. Badania metagenomiczne mikrobioty nosogardzieli wykazały, że jest obfita także w wirusy DNA i RNA oraz bakteriofagi (tab. I). Nie stwierdzono w tym biotopie obecności archeonów [86]. Skromne są też informacje dotyczące populacji grzybów, bo stwierdzono jedynie grzyby z rodzaju *Candida* (tab. II).

3.3. Bakterie, archeony, wirusy i grzyby występujące w przełyku

W tym odcinku przewodu pokarmowego tak jak w gardle, stwierdza się bakterie, wirusy i grzyby i archeony (tab. III). Stosunek ilościowy bakterii gatunku *Streptococcus* sp. do *Prevotella* sp. w tym biotopie, jest ważną cechą definiującą do jakiego typu społeczności mikroorganizmów kwalifikuje się przełyk danej osoby [27, 69]. U ludzi zdrowych w przełyku dominują bakterie Gram-dodatnie, w tym z gromady *Firmicutes* oraz bakterie z rodzaju *Streptococcus* [27, 69]. Przyjmuje się, że u osób chorych przeważają bakterie Gram-ujemne, bo

Tabela II
Bakterie, wirusy i grzyby reprezentujące różne grupy systematyczne występujące w gardle

	Populacje mikroorganizmów	Piśmiennictwo
Bakterie	**Gromada:** *Bacteroidota*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* i *Fusobacteria.* **Rodzaj**: Staphylococcus. *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Neisseria* oraz *Haemophilus.* **Gatunek:** *Streptococcus viridans*, *Branhamella catarrhalis, Neisseria* sp., *Haemophilus* sp.	[35, 38, 72]
Archeony	Brak danych.	
Wirusy	**Gatunek:** Koronawirusy, adenowirusy, pikornawirusy, wirus RSV, wirus grypy A, bakteriofagi.	[31]
Grzyby	**Rodzaj**: *Candida.*	[34]

Tabela III
Bakterie, archeony, grzyby i wirusy reprezentujące różne grupy systematyczne występujące w przełyku

	Populacje mikroorganizmów	Piśmiennictwo
Bakterie	**Gromada:** *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria.* **Rodzaj**: *Streptococcus*, *Veillonella, Prevotella, Haemophilus, Neisseria*, *Granulicatella* i *Fusobacterium.* **Gatunek:** *Streptococcus viridans*, *Streptococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria catarrhalis*, *Klebsiella pneumonia.*	[27, 45, 69, 77, 89]
Archeony	**Rodzaj**: *Halobacteria, Methanosarcina.*	[27]
Wirusy	**Rodzina:** *Herpesviridae* (*Betaherpesvirus*, *Gammaherpesvirus*), *Papillomaviridae*, *Gammapapillomavirus*). **Gatunek:** bakteriofagi rodzaju *Streptococcus*, *Campylobacter, Lactococcus* i *γ-Proteobacterii.*	[27]
Grzyby	**Gatunek**: *Candida* (*C.*) *albicans*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae.*	[27]

ich ilość wynosi ponad 50%, wśród których najwięcej jest bakterii rodzaju *Veillonella, Prevotella, Haemophilus, Neisseria, Granulicatella* oraz *Fusobacterium* i ich liczba koreluje dodatkowo z zapaleniem przełyku i przełykiem Barretta [27, 69]. Analizując mikrobiom tego odcinka przewodu pokarmowego należy stwierdzić że bakterie i wirusy stanowią największą liczbę, zaś grzyby i archeony są reprezentowane nielicznie. (tab. III).

3.4. Bakterie, archeony i grzyby występujące w żołądku

Żołądek, w porównaniu z jelitami, jest stosunkowo dość ubogi w mikroorganizmy, co wynika z bardzo niskiego pH w tym biotopie i występującym kwasem solnym, który jest w stanie wyeliminować większość gatunków zarazków [22] (tab. IV). Niektóre mikroorganizmy są w stanie przetrwać warunki, w których pH waha się w granicach 1–3 [17, 84]. Uważa się, że liczba mikroorganizmów żołądka waha się od 10^2 do 10^4 CFU/g [51] i najliczniej reprezentują ją bakterie należące do 5 gromad, 1 rodziny, 23 rodzajów oraz 6 gatunków bakterii (tab. IV). Drugą pod względem liczby najliczniejszą grupę mikroorganizmów w żołądku tworzą grzyby, które reprezentują 7 gromad, 4 rodziny, 5 rodzajów i 3 gatunki (tab. IV). W tym biotopie ale tylko u nowo narodzonych dzieci, stwierdza się archeony z gatunku *Methanobrevibacter smithii* [43]. Nie opisano występowania w żołądku wirusów (tab. IV).

3.5. Bakterie, wirusy i grzyby występujące w jelicie cienkim

Ten odcinek przewodu pokarmowego człowieka stanowi jego najdłuższą część która wynosi od 3 do 5 metrów i składa się z dwunastnicy, jelita czczego i jelita krętego [18, 48]. Wśród mikroorganizmów tego odcinka są bardzo licznie reprezentowane bakterie oraz bardzo mało stwierdzono wirusów i grzybów (tab. V). Szczególnie w tym odcinku przewodu pokarmowego funkcje mikroorganizmów są powiązane z układem odpornościowym, ponieważ „zamieszkujące" go zarazki oddziaływają bardzo istotnie na układ odpornościowy – GALT (gut-associated lymphoid tissue) w tym MALT (mucosal associated lymhpoid tissue). Nadto biorą one udział w regulacji procesów komórek nabłonkowych jelit, ochronie przed działaniem szkodliwych mikroorganizmów oraz są czynnikami usposabiającymi w adaptacji gospodarza do zmian lipidowych wywodzącymi się z diety, a także oddziaływują na wchłaniania i trawienie [48, 75]. Ich liczna obecność w tym biotopie warunkowana jest tym, że gruczoły umiejscowione w śluzówce jelit, wydzielają zasadowy śluz, a gruczoły wewnętrznego wydzielania sok jelitowy co sprawia, że m.in. pH tego odcinka przewodu pokarmowego tworzy odpowiednie warunki bytowania dla tych mikroorganizmów [17]. Także wydzielana przez wątrobę do dwunastnicy żółć i zawarte w niej kwasy żółciowe oddziałują pozytywnie na tą mikroflorę [18, 95, 96]. Wśród bytujących w jelitach cienkich mikroorganizmów, głównymi zarazkami kolonizującymi ten biotop, tuż po urodzeniu, są bakterie, choć w okresie 1–4 miesięcy życia pojawiają się także wirusy [85]. Wykazano, że jelita człowieka mające 200–300 m^2 błony śluzowej, stanowią „tajemniczy ogród" około dziesięciu milionów różnorodnych mikroorganizmów symbiotycznych [1, 71, 114]. Bogactwo mikroorganizmów występujących w jelicie cienkim (tab. V) jest uzależnione m.in. od takich czynników, jak rodzaj spożywanego pokarmu czy też warunków życia, w tym przyjmowanie chemioterapeutyków [88]. Wśród bakterii w jelicie cienkim występują głównie bakterie

Tabela IV
Bakterie, archeony i grzyby reprezentujące różne grupy systematyczne występujące w żołądku

Populacje mikroorganizmów		Piśmiennictwo
Bakterie	**Gromada:** *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria.* **Rodzina:** *Enterobacteriaceae.* **Rodzaj:** *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Corynebacterium*, *Clostridium, Neisseria*, *Stomatococcus*, *Prevotella*, *Rothia*, *Haemophilus, Atopobium*, *Porphyromonas*, *Gamella, Helicobacter*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus, Actinobacillus.* **Gatunek:** *Helicobacter pylori*, *Campylobacter pyloridis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Lactobacillus* (*L.*) *lactis*, *L. brevis*, *L. johnsonii.*	[17, 45, 71, 84, 87, 94, 119, 120]
Archeony	**Gatunek:** *Methanobrevibacter smithii.*	[43]
Wirusy	Brak danych.	
Grzyby	**Gromada:** *Ascomycota*, *Basidiomycota*, **Klasa:** *Saccharomycetes*, *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Agaricomycetes*, *Tremellomycetes.* **Rodzina***: Aspergillaceae*, *Chaetomiaceale*, *Pleosporaceae*, *Trimorphomycetaceae.* **Rodzaj:** *Candida*, *Phialemonium, Alternaria*, *Thermomyces*, *Saitozyma.* **Gatunek:** *Candida albicans*, *Aspergillus montevidensis*, *Penicillium arenicola.*	[45, 119, 120]

Tabela V
Bakterie, wirusy i grzyby reprezentujące różne grupy systematyczne występujące w jelicie cienkim

Populacje mikroorganizmów		Piśmiennictwo
Bakterie	**Gromada:** *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacterioidota*, *Actinobacteria.* **Rodzina:** *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae.* **Rodzaj:** *Fusobacterium*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Atopobium*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, *Leptotrichia*, *Megasphaera*, *Neisseria*, *Porphyromonas*, *Paraprevotellaceae*, *Escherichia*, *Rothia*, *Citrobacter*, *Lachnoclostridium*, *Actinobacillus*, *Parascardovia*, *Oribacterium*, *Granulicatella*, *Campylobacter*, *Ralstonia.* **Gatunek:** *Escherichia coli*, *Neisseria cinerea*, *Prevotella* (*P.*) *melaninogenica*, *P. jejuni, P. veroralis*, *P. aurantiaca*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Porphyromonas pasteri, Porphyromonas endodontalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Moglibacterium neglectum*, *Alloprevotella tannerae*, *Filifactor alocis*, *Morococcus cerebrosus*, *Veillonella montpellierensis*, *Streptobacillus hongkongensis*, *Clostridium leptum.*	[11, 17, 21, 45, 57, 64, 75, 94, 99, 101, 105, 106, 107]
Archeony	Brak danych.	
Wirusy	**Rodzaj:** *Rotavirus*, *Calicivirus*, *Coronavirus*, *Adenovirus.*	[9]
Grzyby	**Rodzaj:** *Candida*, *Saccharomyces.*	[45]

z gromady *Firmicutes, Proteobacteria* i *Verrucomicrobia,* zaś w dwunastnicy bakterie z gromady *Firmicutes* wynoszą 55%, a z gromady *Proteobacteria* 21% wszystkich mikroorganizmów [75, 107]. W jelitach oprócz tych trzech gromad bakterii i innych bakterii zarejestrowano także bakterie reprezentując wiele rodzajów i gatunków, a także wykazano występowanie 4 rodzajów wirusów i 2 rodzajów grzybów ale nie opisano występowania archeonów (tab. V).

3.6. Bakterie, archeony, wirusy i grzyby występujące w jelicie grubym

Ten odcinek przewodu pokarmowego – jelito grube jest najbogatszy w stosunku do zasobów mikroorganizmów bytujących w innych odcinkach przewodu pokarmowego i największą liczbę rejestruje się w kątnicy, okrężnicy, wyrostku robaczkowym i odbytnicy [56, 94] i ich różnorodność jest całkiem odmienna w stosunku do jelita cienkiego [75] (tab. VI). Mikroorganizmy tego odcinka przewodu pokarmowego, cechują się ogromną różnorodnością i stanowią aż 0,15 kg biomasy jelita grubego [20] (tab. VI). Mikrobiom tego odcinka warunkuje reakcję rozkładu i fermentacji cukrów, uczestniczy we wchłanianiu niestrawionych resztek pokarmowych, a także zarazki te są w stanie syntezować witaminy i dzięki temu można ten odcinek przewodu pokarmowego, przyrównać do swoistego bioreaktora [50, 56, 71, 82]. Reakcje w tym odcinku powodują także, że spada stężenie tlenu, a nawet ilości związków przeciwdrobnoustrojowych, co prowadzi do zwiększonej różnorodności mikroorganizmów, stąd wskazuje się, że występuje w tym biotopie z około 100 bilionów drobnoustrojów [71, 102, 103]. Większość z nich to beztlenowce, bo ich pokarmem, czyli głównym źródłem węgla jest błonnik, który za pomocą tych drobnoustrojów ulega procesowi fermentacji [70]. Ze względu na rodzaj spożywanego pokarmu wyróżnia się trzy enterotypy jelita grubego (tab. VII).

W mikrobiomie jelita grubego stwierdza się także liczne gatunki archeonów, które w przeciwieństwie do bakterii, grzybów i wirusów są specyficzne tylko dla tej niszy (tab. VI). Tę bogatą mikroflorę jelita grubego reprezentuje 5 gromad, 6 rodzin, 15 rodzajów bakterii i 2 gromady i 11 gatunków archeonów, a także wirusy należące do 1 rzędu, 15 rodzin w tym przedstawicieli rodziny wirusów olbrzymich (Microviridae), 7 rodzajów i 3 gatunki bakteriofagów (tab. VI). Podaje się także, że gram treści jelita grubego może zawierać nawet 10^8–10^9 wirusowych cząsteczek, z których większość to bakteriofagi z rodziny *Podoviridae* [115]. Grzyby w tym biotopie są bardzo licznie reprezentowane i pochodzą z 3 gromad, 1 rodziny, 13 rodzajów i 13 gatunków i które stanowią tylko 0,1% wszystkich drobnoustrojów w całych jelitach.

4. Podsumowanie

Mikrobiom przewodu pokarmowego człowieka pod względem jego elementów składowych (bakterii, archeonów, wirusów i grzybów) w jego poszczególnych odcinkach jest bardzo zróżnicowany. Najliczniej reprezentowaną jego składową są bakterie, a najuboższą zarówno w kontekście ilościowym i jakościowym archeony. Wirusy reprezentowane są w tym biotopie w ilościach pośrednich między bakteriami, a grzybami. Natomiast rozpatrując ich ilości w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego, najbardziej obfitym w gatunki mikrobiomem jest środowisko jelita grubego i jamy ustnej, a najuboższym gardło i przełyk (tab. I–VII). Wśród mikrobiomu przewodu pokarmowego bakterie występują we wszystkich jego odcinkach, z tym że reprezentowane najliczniej są w jamie ustnej

Tabela VI
Bakterie, archeony, wirusy i grzyby reprezentujące różne grupy systematyczne występujące w jelicie grubym

Populacje mikroorganizmów		Piśmiennictwo
Bakterie	**Gromada:** *Bacteroidota*, *Fiumicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia.* **Rodzina:** *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae.* **Rodzaj:** *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Akkermansia, Roseburia*, *Butyrivibrio, Lachnospira*, *Faecalibacterium.*	[1, 17, 45, 46, 91, 94, 103]
Archeony	**Gromada:** Crenarchaeota, Traumarcheota. **Gatunek:** Methanobrevibacter (*M.*) smithii. *M. stadtmanae*, *M. luminyensis*, *Halorubrum* (*H.*) *koreense*, *H. alimentarium*, *H. saccharovorum*, *Halococcus morrhuae*, *Halopherax massiliense*, *Methanomassiliicoccales* sp., *Nitrosphaera* sp., *Sulfobolus* sp.	[26, 76, 94, 113]
Wirusy	**Rząd:** *Caudovirales.* **Rodzina**: *Podoviridae*, *Picornaviridae*, *Picobirnaviridae*, *Astroviridae*, *Reoviridae*, *Caliciviridae*, *Adenoviridae*, *Anelloviridae*, *Cycloviridae*, *Parvoviridae*, *Retroviridae*, *Pneumoviridae*, *Herpesviridae*, *Hepadnaviridae* i *Microviridae.* **Rodzaj:** *Enterovirus*, *Rotavirus*, *Norovirus*, *Papillomavirus*, *Polyomavirus*, *Mimivirus*, *Marseillevirus.* **Gatunek:** bakteriofagi bakterii rodzaju *Bacteroides*, *Firmicutes* i *Actinobacteria.*	[17, 19, 45, 76, 85, 108, 115]
Grzyby	**Gromada:** *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Mucoromycota.* **Rodzina:** *Cystofilobasidiaceae.* **Rodzaj:** *Saccharomyces*, *Malassezia*, *Candida*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Galactomyces, Cryptococcus, Aspergillus*, *Pichia*, *Mucor*, *Eurotium*, *Rhodotorula*, *Trichosporon.* **Gatunek:** *Beauveria bassiana*, *Lichtheimia ramosa*, *Clavispora lusitaniae*, *Galactomyces geotrichum*, *Isaria farinosa*, *Pleurostomophora richardsiae*, *Rhodosporidium kratochvilovae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Yarrowia lipolytica*, *Aspergillus clavatus*, *Alternalia brassicola*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum* sp., *Cystofilobasidium* sp.	[16, 17, 45, 52, 76, 80, 109]

Tabela VII
Enterotypy jelita grubego [20, 51, 87]

	Dominujące rodzaje bakterii	Dieta
Enterotyp 1	*Bacteroides*	Dieta typu bogata w tłuszcze zwierzęce i białko
Enterotyp 2	*Prevotella*	Dieta wysokobłonnikowa (roślinna)
Enterotyp 3	*Ruminococcus*	Dieta bogata w skrobię

i jelicie cienkim, zaś najmniej w gardle i przełyku, natomiast archeony najliczniej zostały opisane w jelicie grubym i jamie ustnej, a nie stwierdzono ich w gardle i w jelicie cienkim. W przypadku wirusów stwierdza się, że najliczniej reprezentują one odcinek jelicie grubego oraz jamę ustną, a nie stwierdzono ich w żołądku, natomiast grzyby są najobficiej stwierdzane w jelicie grubym i żołądku, a najmniej w gardle i jelicie cienkim.

Piśmiennictwo

1. Adak A., Khan M.R.: An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell. Mol. Life Sci*. **76**, 473–493, doi: 10.1007/s00018-018-2943-4 (2019)
2. Andrews J.H.: Comparative Ecology of Microorganisms and Macroorganisms – Second Edition. *Springer, New York,* doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6897-8 (2017)
3. Anon.: Bacterial Transduction. https://bio.libretexts.org/@go/page/9298 (2021)
4. Azzouz L.L., Sharma S.: Physiology, Large Intestine. *StatPearls Publishing* https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29939634/ (2018)
5. Baker B.J., De Anda V., Seitz K.W., Dombrowski N., Santoro A.E., Lloyd K.G.: Diversity, ecology and evolution of Archaea. *Nat Microbiol*. **5**, 887–900, doi: 10.1038/s41564-020-0715-z (2020)
6. Bandara H.M.H.N., Panduwawala C.P., Samaranayake L.P.: Biodiversity of the human oral mycobiome in health and disease. *Oral Dis*. **25**, 363–371, doi: 10.1111/odi.12899 (2019)
7. Barrera-Vázquez O., Gomez-Verjan J.: The Unexplored World of Human Virome, Mycobiome, and Archaeome in Aging. *The J. of Gerontology.* **75**, doi: 10.1093/gerona/glz274 (2019)
8. Belmok A., de Cena J. A., Kyaw C. M., Damé-Teixeira N.: The Oral Archaeome: A Scoping Review. *J Dent Res.* **99**, 630–643, doi: 10.1177/0022034520910435 (2020)
9. Bishop R.F., Kirkwood C.D.: Enteric Viruses. Encyclopedia of Virology.: 116–123, *Elsevier*, *USA*, doi: 10.1016/B978-012374410-4.00386-1, (2008)
10. Bjorksten B.: The gut microbiota: a complex ecosystem. *Clinical and Experimental Allergy*. **36**, 1215–1217, doi: 10.1111/j.1365-2222.2006.02579.x (2006)
11. Booijink C.C., Zoetendal E.G., Kleerebezem M., de Vos W.M.: Microbial communities in the human small intestine: coupling diversity to metagenomics. *Future Microbiol.* **2**, 285–295, doi: 10.2217/17460913.2.3.285 (2007)
12. Bosdriesz E., Molenaar D., Teusink B., Bruggeman F.J.: How fast-growing bacteria robustly tune their ribosome concentra-

tion to approximate growth-rate maximization. *FEBS J*. **282**, 2029–2044, doi: 10.1111/febs.13258 (2015)
13. Camarillo-Guerrero L.F., Almeida A., Rangel-Pineros G., Finn R.D., Lawley T.D.: Massive expansion of human gut bacteriophage diversity. *Cell.* **184**, 1098–1109, doi: 10.1016/j.cell.2021.01.029 (2021)
14. Caselli E., Fabbri C., D'Accolti M., Soffritti I., Bassi C., Mazzacane S., Franchi M.: Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: the complexity of the healthy picture. BMC Microbiol. **20**, doi: 10.1186/s12866-020-01801-y (2020)
15. Chabé M., Lokmer A., Ségurel L.: Gut Protozoa: Friends or Foes of the Human Gut Microbiota? *Trends Parasitol.* **33**, 925–934, doi: 10.1016/j.pt.2017.08.005 (2017).
16. Chin V.K., Yong V.C., Chong P.P., Amin Nordin S., Basir R., Abdullah M.: Mycobiome in the Gut: A Multiperspective Review. *Mediators Inflamm.* doi: 10.1155/2020/9560684 (2020)
17. Clarke G., Sandhu K.V., Griffin B.T., Dinan T.G., Cryan J.F., Hyland N.P.: Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic-Microbiome Interactions. *Pharmacol. Rev.* **71**, 198–224, doi: 10.1124/pr.118.015768 (2019)
18. Collins J.T., Nguyen A., Badireddy M.: Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine. *StatPearls Publishing, Treasue Island.* (2021)
19. Colson P., Aherfi S., la Scola B.: Evidence of giant viruses of amoebae in the human gut. *Human Microbiome J.* 5–6, doi: 10.1016/j.humic.2017.11.001 (2017)
20. Costea P.I., Hildebrand F., Arumugam M.: Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat Microbiol.* **3**, 8–16, doi: 10.1038/s41564-017-0072-8 (2018)
21. Cotter Paul D.: Small intestine and microbiota. Current Opinion in Gastroenterology. **27**, 99–10, doi: 10.1097/MOG.0b013e328341dc67 (2011)
22. Coutts, A. M.: Review and discussion of the body's normal microorganisms. *Br. J. of Nursing.* **15**, 864–868, doi: 10.12968/bjon.2006.15.16.21850 (2006)
23. Cugini C., Ramasubbu N., Tsiagbe V.K., Fine D.H.: Dysbiosis From a Microbal and Host Perspective Realtive to Oral Health and Disease. *Front Microbiol.* **12**, 1–23, doi. 10,3389/fmicb.2021.617485 (2021)
24. Cui L., Morris A., Ghedin E.: The human mycobiome in health and disease. *Genome Med.* **5**, 63, doi: 10.1186/gm467 (2013)
25. D'A. F. Salvatore: The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin. Chim. Acta*. **7**, 97–102, doi: 10.1016/j.cca.2015.01.003 (2015)
26. Demonfort Nkamga V., Henrissat B., Drancourt M.: Archaea: Essential inhabitants of the human digestive microbiota. *Human Microbiome Journal.* **3**, 1–8, doi: 10.1016/j.humic.2016.11.005 (2017)
27. Deshpande N.P., Riordan S.M., Castaño-Rodríguez N., Wilkins M.R., Kaakoush N.O.: Signatures within the esophageal microbiome are associated with host genetics, age, and disease. *Microbiome.* **6**, doi: 10.1186/s40168-018-0611-4 (2018)
28. Dethlefsen L., McFall-Ngai M., Relman D.A.: An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature.* **449**, 811–818, doi: 0.1038/nature06245 (2007)
29. Dethlefsen L., Relman DA.: Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci USA*, doi: 10.1073/pnas.1000087107 (2011)
30. Dijksterhuis J.: Fungal spores: Highly variable and stress-resistant vehicles for distribution and spoilage. *Food Microbiol.* **81**, 2–11, doi: 10.1016/j.fm.2018.11.006 (2019)
31. Duerkop B., Hooper L.: Resident viruses and their interactions with the immune system. Nat Immunol **14**, 654–659, doi: 10.1038/ni.2614 (2013)
32. Efenberger M, Brzezińska-Błaszczyk E, Wódz K.: Archeony – drobnoustroje ciągle nieznane. *Postepy Hig Med Dosw.* **68**, 1452–1463, doi: 10.5604/17322693.113169 (2014)
33. Efenberger M., Wódz K., Brzezińska-Błaszczyk E.: Archeony – istotny składnik mikrobiomu człowieka. *Przegl. Lek.* **71**, 346–351 (2014)
34. Fenner F., Bachmann P.A., Gibbs E.P.J., Murphy F.A., Studdert M.J., White D.O.: Structure and Composition of Viruses. *Veterinary Virology.* 3–19, doi: 10.1016/B978-0-12-253055-5.50005-0 (2014)
35. Flynn M., Dooley J.: The microbiome of the nasopharynx. *J Med Microbiol.* **70**, doi: 10.1099/jmm.0.001368 (2021)
36. Forbes J.D., Bernstein C.N., Tremlett H., Van Domselaar G., Knox N.C.: A Fungal World: Could the Gut Mycobiome Be Involved in Neurological Disease? *Front Microbiol.* **9**, doi: 10.3389/fmicb.2018.03249 (2019)
37. Gaci N., Borrel G., Tottey W., O'Toole P.W., Brugère J.F.: Archaea and the human gut: new beginning of an old story. *World J Gastroenterol.* **20**, 16062-78, doi: 10.3748/wjg.v20.i43.16062 (2014)
38. Gao Z., Kang Y., Yu J., Ren L.: Human pharyngeal microbiome may play a protective role in respiratory tract infections. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* **12**, 144–150, doi: 10.1016/j.gpb.2014.06.001 (2014)
39. Glare P.G.W.: Oxford Latin Dictionary. *Oxford University Press/Clarendon Press, London* (1982)
40. Glendinning L., Free A.: Supra-organismal interactions in the human intestine. *Front Cell Infect Microbiol.* **4**, doi: 10.3389/fcimb.2014.00047 (2014)
41. Gould A.L., Zhang V., Lamberti L., Jones E.W., Obadia B., Korasidis N., Gavryushkin A., Carlson J.M., Beerenwinkel N., Ludington W.B.: Microbiome interactions shape host fitness. *Proc Natl Acad Sci USA*, **115**, E11951-E11960, doi: 10.1073/pnas.1809349115 (2018)
42. Gribaldo S., Brochier-Armanet C.: The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **361**, 1007–1022, doi: 10.1098/rstb.2006.1841 (2006)
43. Grine G., Boualam MA., Drancourt M.: Methanobrevibacter smithii, a methanogen consistently colonising the newborn stomach. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **36**, 2449–2455, doi: 10.1007/s10096-017-3084-7 (2017)
44. Han Y., Gong Z., Sun G., Xu J., Qi C., Sun W., Jiang H., Cao P., Ju H.: Dysbiosis of Gut Microbiota in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Front Microbiol.* **12**, 1–14, doi: 10.3389/fmicb.2021.680101 (2021)
45. Hillman E.T, Kozik A.J., Hooker C.A., Burnett J.L., Heo Y., Kiesel V.A., Nevins C.J., Oshiro J.M.K.I., Robins M.M., Thakkar R.D., Wu S.T., Lindemann S.R.: Comparative genomics of the genus Roseburia reveals divergent biosynthetic pathways that may influence colonic competition among species. *Microb Genom.* **6**, doi: 10.1099/mgen.0.000399 (2020)
46. Hillman E.T., Lu H., Yao T., Nakatsu C.H.: Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes. Environ.* **32**, 300–313, doi: 10.1264/jsme2.ME17017 (2017)
47. Ho S.X., Min N., Wong E.P.Y.: Characterization of oral virome and microbiome revealed distinctive microbiome disruptions in paediatric patients with hand, foot and mouth disease. *npj Biofilms Microbiomes.* **7**, 1–8, doi: 10.1038/s41522-021-00190-y (2021)
48. Hounnou G., Destrieux C., Desmé J., Bertrand P., Velut S.: "Anatomical study of the length of the human intestine". *Surgical and Radiologic Anatomy.* **24**, 290–294, doi: 10.1007/s00276-002-0057-y (2002)
49. Horz H.P., Conrads G.: Methanogenic Archaea and oral infections – ways to unravel the black box. *J Oral Microbiol.* doi: 10.3402/jom.v3i0.5940 (2011)

50. Horz H.P., Conrads G.: The discussion goes on: What is the role of Euryarchaeota in humans? *Archaea.* 1–8, doi: 10.1155/2010/967271 (2010)
51. Hunt RH, Yaghoobi M.: The Esophageal and Gastric Microbiome in Health and Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. **46**, 121–141, doi: 10.1016/j.gtc.2016.09.009 (2017)
52. Huseyin C.E., O'Toole P.W., Cotter P.D., Scanlan P.D.: Forgotten fungi-the gut mycobiome in human health and disease. *FEMS Microbiol Rev.* **41**, 479–511, doi: 10.1093/femsre/fuw047 (2017)
53. Iebba V., Zanotta N., Campisciano G.: Profiling of Oral Microbiota and Cytokines in COVID-19 Patients. *Front Microbiol.* **12**, 1–13, doi: 10.3389/fmicb.2021.671813 (2021)
54. Jain S., Caforio A., Driessen A.J.: Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids. *Front Microbiol.* **5**, 1–16, doi: 10.3389/fmicb.2014.00641 (2014)
55. Jung A., Raßbach A., Pulpetta R.L.:. Two-step chromosome segregation in the stalked budding bacterium Hyphomonas neptunium. *Nat Commun*. **10**, 1–16, doi: 10.1038/s41467-019-11242-5 (2019)
56. Kahai P., Mandiga P., Wehrle C.J., Lobo S.: Anatomy, Abdomen and Pelvis, Large Intestine. *StatPearls Publishing, Treasure Island* (2020)
57. Kastl A.J. Jr, Terry N.A., Wu G.D., Albenberg L.G.: The Structure and Function of the Human Small Intestinal Microbiota: Current Understanding and Future Directions. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* **9**, 33–45, doi: 10.1016/j.jcmgh.2019.07.006 (2020)
58. Kim J.Y., Whon T.W., Lim M.Y.: The human gut archaeome: identification of diverse haloarchaea in Korean subjects. *Microbiome.* **8**, 114, doi: 10.1186/s40168-020-00894-x.96 (2020)
59. Koch A.L.: Control of the bacterial cell cycle by cytoplasmic growth. *Crit Rev Microbiol.* **28**, 61–77, doi: 10.1080/1040-840291046696 (2002)
60. Koonin, E.V., Senkevich T.G., Dolja V.V.: The ancient Virus World and evolution of cells. *Biology direct.* **1**, 1–27, doi: 10.1186/1745-6150-1-29 (2006)
61. Kosznik-Kwaśnicka K., Węgrzyn A. i wsp.: Biological aspects of phage therapy versus antibiotics against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of chickens. Front. Cell. Infect. Microbiol. 12:941867, doi. 10.3389/fcimb.2022.941867 (2022)
62. Brenner J. D. , Krieg N.R. , Staley J. T. Garrity G.M, Boone D.R., Vos P., Goodfellow M., Rainey F.A., Schleifer K-H.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria. *US: Springer, Baltimore* (2005)
63. Krug R.M., Wagner R.R.: "virus". *Encyclopedia Britannica*, https://www.britannica.com/science/virus *(2022)*
64. La Duc M.T., Dekas A., Osman S., Moiss l.C, Newcombe D., Venkateswaran K.: Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2600–2611, doi: 10.1128/AEM.03007-0 (2007)
65. Lecuit M., Eloit M.: The Viruses of the Gut Microbiota. *Microbiota in Gastroindestinal Pathophysiology* **21**, 179–182 (2017)
66. Lederberg J., McCray A.T.: Ome Sweet 'Omics – a genealogical treasury of words. *Scientist,* **15**, 8 (2001)
67. Leite G.G.S., Weitsman S., Parodi G.: Mapping the Segmental Microbiomes in the Human Small Bowel in Comparison with Stool: A REIMAGINE Study. *Dig Dis Sci.* **65**, 2595–2604, doi: 10.1007/s10620-020-06173-x (2020)
68. Luganini A., Gribaudo G.: Retroviruses of the Human Virobiota: The Recycling of Viral Genes and the Resulting Advantages for Human Hosts During Evolution. *Front Microbiol.* **11**, doi: 10.3389/fmicb.2020.01140 (2020)
69. Lv J., Guo L., Liu J.J., Zhao H.P., Zhang J., Wang J.H.: Alteration of the esophageal microbiota in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* **25**, 2149–2161, doi: 10.3748/wjg.v25.i18.2149 (2018)
70. Macfarlane G.T., Macfarlane S.: Fermentation in the Human Large Intestine. *J. of Clinical Gastroenterology.* **45**, S120–S127, doi: 10.1097/MCG.0b013e31822fecfe (2011)
71. Malard F., Dore J., Gaugler B., Mohty M.: Introduction to host microbiome symbiosis in health and disease. *Mucosal Immunol.* **14**, 547–554, doi: 10.1038/s41385-020-00365-4 (2021)
72. Malinowska M., Tokarz-Deptuła B.. Deptuła W.: Mikrobiom układu oddechowego w warunkach fizjologicznych i patologicznych. *Post. Mikrobiol.* **55**, 279–283 (2015)
73. Mar Rodríguez M., Real J.M. i wsp.: Obesity changes the human gut mycobiome. *Sci Rep*. **5**, 1–14, doi: 10.1038/srep14600 (2015)
74. Martínez A., Kuraji R., Kapila Y.: The human oral virome: Shedding light on the dark matter. *Periodontology 2000.* **87**, 282–298, doi: 10.1111/prd.12396 (2021)
75. Martinez-Guryn K., Hubert N., Frazier K., Urlass S., Musch M.W., Ojeda P., Pierre J.F., Miyoshi J., Sontag T.J., Cham C.M., Reardon C.A., Leone V., Chang E.B.: Small Intestine Microbiota Regulate Host Digestive and Absorptive Adaptive Responses to Dietary Lipids. *Cell Host Microbe.* **23**, 458–469, doi: 10.1016/j.chom.2018.03.011 (2018)
76. Matijašić M., Meštrović T., Paljetak H.Č., Perić M., Barešić A., Verbanac D.: Gut Microbiota beyond Bacteria-Mycobiome, Virome, Archaeome, and Eukaryotic Parasites in IBD. *Int J Mol Sci.* **21**, 1–21, doi: 10.3390/ijms21082668 (2020)
77. May M., Abrams J.A.: Emerging Insights into the Esophageal Microbiome. *Curr Treat Options Gastroenterol.* **16**, 72–85, doi: 10.1007/s11938-018-0171-5 (2018)
78. McConnaughey M. : Physical Chemical Properties of Fungi. *Biomedical Sciences*. *Elsevier, Netherlands* (2014)
79. Mimee M., Citorik R.J., Lu T.K.: Microbiome therapeutics – Advances and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **105**, 44–54, doi: 10.1016/j.addr.2016.04.032 (2016)
80. Mishra K., Bukavina L., Ghannoum M.: Symbiosis and Dysbiosis of the Human Mycobiome. *Front Microbiol.* **12**, 1–15, doi: 10.3389/fmicb.2021.636131 (2021)
81. Moissl-Eichinger C., Pausan M., Taffner J., Berg G., Bang C., Schmitz R. A.: Archaea Are Interactive Components of Complex Microbiomes. *Trends in Microbiology*. **26**, 70–85. doi: 10.1016/j.tim.2017.07.004 (2018)
82. Muñoz-Tamayo R., Muñoz-Tamayo S., Laroche J-P., Marion B., Marion L.: Human colon: a complex bioreactor. Conceptual modelling for the anaerobic digestion of the functional trophic chain. *IWA World Congress on Anaerobic Digestion* (2007)
83. Mushnikov N.V., Fomicheva A., Gomelsky M., Bowman G.R.: Inducible asymmetric cell division and cell differentiation in a bacterium. *Nat Chem Biol*. **15**, 925–931, doi: 10.1038/s41589-019-0340-4 (2019)
84. Nardone G., Compare D.: The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United European Gastroenterol J.* **3**, 255–260, doi: 10.1177/ 20506406 14566846 (2015)
85. Neurath M.F., Überla K., Ng S.C.: Gut as viral reservoir: lessons from gut viromes, HIV and COVID-19. *Gut:* **70**, 1605–1608, doi: 10.1136/gutjnl-2021-324622 (2020)
86. Nimish Deo P., Deshmukh R.: Oral Microbiome – Unveiling the Fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol.* **23**, 122–128, doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_304_18 (2019)
87. Ozbey G., Sproston E., Hanafiah A.: Helicobacter pylori Infection and Gastric Microbiota. *Euroasian J Hepatogastroenterol.* **10**, 36–41, doi: 10.5005/jp-journals-10018-1310 (2020)
88. Pérez-Brocal V., Moya A.: The analysis of the oral DNA virome reveals which viruses are widespread and rare among healthy

young adults in Valencia (Spain). *PLoS One*. **13**, doi: 10.1371/journal.pone.0191867 (2018)
89. Park C.H., Lee S.K.: Exploring Esophageal Microbiomes in Esophageal Diseases: A Systematic Review. *J Neurogastroenterol Motil*. **26**, 171–179, doi: 10.5056/jnm19240 (2020)
90. Pattison J.R., Patou G.: Parvoviruses. *Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch, Galveston* (1996)
91. Qin J., Wang J. i wsp.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. **464**, 59–65, doi: 10.1038/nature08821 (2010)
92. Radaic A., Kapila Y.L.: The oralome and its dysbiosis: New insights into oral microbiome-host interactions. *Comput Struct Biotechnol J.* **19**, 1335–1360, doi: 10.1016/j.csbj.2021.02.010 (2021)
93. Rajendhran J., Gunasekaran P.: Human Microbiomics. *Indian J. Microbiol.* **50**, 109–112, doi: 10.1007/s12088-010-0034-9 (2010)
94. Requena T., Velasco M.: The human microbiome in sickness and in health. *Rev Clin Esp.* doi: 10.1016/j.rce.2019.07.004 (2019)
95. Ridlon J.M., Kang D.J., Hylemon P.B., Bajaj J.S.: Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol.* **30**, 332–338, doi: 10.1097/MOG.0000000000000057 (2014)
96. Ridlon J.M., Kang D.J., Hylemon P.B.: Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res.* **47**, 241–259, doi: 10.1194/jlr.R500013-JLR200 (2006)
97. Rieux A., Soubeyrand S., Bonnot F., Klein E.K., Ngando J.E., Mehl A., Ravigne V., Carlier J., de Lapeyre de Bellaire L.: Long-distance wind-dispersal of spores in a fungal plant pathogen: estimation of anisotropic dispersal kernels from an extensive field experiment. *PloS one.* **9**, doi: 10.1371/journal.pone.0103225 (2014)
98. Robinson N.P.: Archaea, from obscurity to superhero microbes: 40 years of surprises and critical biological insights. *Emerg Top Life Sci.* **2**, 453–458, doi: 10.1042/ETLS20180022 (2018)
99. Rowan-Nash A.D., Korry B.J., Mylonakis E., Belenky P.: Cross-Domain and Viral Interactions in the Microbiome. *Microbiol Mol Biol Rev.* **83**, 1–63, doi: 10.1128/MMBR.00044-18 (2019)
100. Ryu, W.-S.: Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses. *Academic Press*, *Korea* (2007)
101. Saffouri G.B., Shields-Cutler R.R., Chen J.:. Small intestinal microbial dysbiosis underlies symptoms associated with functional gastrointestinal disorders. *Nat Commun.* **10**, doi: 10.1038/s41467-019-09964-7 (2019)
102. Salehi B., Dimitrijević M., Aleksić A., Neffe-Skocińska K., Zielińska D., Kołożyn-Krajewska D., Sharifi-Rad J., Stojanović-Radić Z., Prabu S.M., Rodrigues C.F., Martins N.: Human microbiome and homeostasis: insights into the key role of prebiotics, probiotics, and symbiotics. C*rit Rev Food Sci Nutr*.: **61**, 1415–1428, doi: 10.1080/10408398.2020.1760202 (2021)
103. Scheithauer T.P., Dallinga-Thie G.M., de Vos W.M., Nieuwdorp M., van Raalte D.H.: Causality of small and large intestinal microbiota in weight regulation and insulin resistance. *Mol, Metab.* **5**, 759–770, doi: 10.1016/j.molmet.2016.06.002 (2016)
104. Schulz H.N., Jorgensen B.B.: Big bacteria. *Annu Rev Microbiol.* **55**, 105–137, doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.105 (2001)
105. Sundin O.H., Mendoza-Ladd A., Zeng M., Diaz-Arévalo D., Morales E., Fagan B.M., Ordoñez J., Velez P., Antony N., McCallum R.W.: The human jejunum has an endogenous microbiota that differs from those in the oral cavity and colon. BMC Microbiol., **17**, doi: 10.1186/s12866-017-1059-6 (2017)
106. Sundin O. H., Mendoza-Ladd A., Zeng M., Diaz-Arévalo D., Morales E., Fagan B. M., Ordonez J., Velez P., Antony N., McCallum R. W.: The human jejunum has an endogenous microbiota that differs from those in the oral cavity and colon. *BMC Microbiol.* **17**, 160, doi: 10.1186/s12866-017-1059-6 (2017)
107. Takakura W., Pimentel M.: Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Irritable Bowel Syndrome – An Update. *Front. Psychiatry*. **11**, doi: 10.3389/fpsyt.2020.00664 (2020)
108. The Viruses of the Gut Microbiota. Chapter 21 *Microbiota in Gastrointestinal pathophysiology*. 179–183, doi: 10.1016/B978-0-12-804024-9.00021-5 (2017)
109. Tiew P.Y., Mac Aogain M., Ali N.A.B.M., Thng K.X., Goh K., Lau K.J.X., Chotirmall S.H.: The Mycobiome in Health and Disease: Emerging Concepts, Methodologies and Challenges. *Mycopathologia*. **85**, 207–231, doi: 10.1007/s11046-019-00413-z (2020)
110. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.M., Knight R., Gordon J.I.: The human microbiome project: a strategy to understand the microbial components of the human genetic and metabolic landscape and how they contribute to normal physiology and predisposition to disease. *Nature*. **449**, 804–810, doi: 10.1038/nature06244 (2007)
111. Underhill D.M., Iliev I.D.: The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 405–416, doi: 10.1038/nri3684 (2014)
112. Urry L.A., Cain M.L., Wasserman S.A., Minorsky P.V.: Campbell Biology 12th Edition. *Pearson, New York (*2020)
113. Van de Pol J.A., van Best N., Mbakwa C.A., Thijs C., Savelkoul P.H., Arts I.C., Hornef M.W., Mommers M., Penders J.: Gut Colonization by Methanogenic Archaea Is Associated with Organic Dairy Consumption in Children. *Front Microbiol.* **8**, doi: 10.3389/fmicb.2017.00355 (2017)
114. Varricchi G., Poto R., Ianiro G.: Gut Microbiome and Common Variable Immunodeficiency: Few Certainties and Many Outstanding Questions. *Front Immunol.* **12**, doi: 10.3389/fimmu.2021.712915 (2021)
115. Vemuri R., Shankar E.M., Chieppa M., Eri R., Kavanagh K.: Beyond Just Bacteria: Functional Biomes in the Gut Ecosystem Including Virome, Mycobiome, Archaeome and Helminths. *Microorganisms.* **8**, doi: 10.3390/microorganisms8040483 (2020)
116. Young KD.: Bacterial morphology: why have different shapes? *Curr Opin Microbiol*. 596–600, doi: 10.1016/j.mib.2007.09.009 (2007)
117. Zarco M., Vess T., Ginsburg G.: The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Dis.* **18**, 109–120, doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01851.x (2012)
118. Zhang Y., Wang X., Li H., Ni C., Du Z., Yan F.: Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother*. **99**, 883–893, doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.146 (2018)
119. Zhong M., Xiong Y., Zhao J.: Candida albicans disorder is associated with gastric carcinogenesis. *Theranostics.* **11**, 4945–4956, doi: 10.7150/thno.55209 (2021)
120. Zikai W., Rongrong R., Yunsheng Y.: Mucosa microbiome of gastric lesions: Fungi and bacteria interactions. *Prog Mol Biol Transl Sci*. **171**, 195–213, (2020)
121. Zinder N.D., Lederberg J.: Genetic exchange in Salmonella. *J Bacteriol.* **64**, 679–699, doi: 10.1128/jb.64.5.679-699.1952 (1952)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2022, 61, 4, 235–245
DOI: 10.2478/am-2022-024

DAWNE I WSPÓŁCZESNE METODY STABILIZACJI WINA

Kamila Pachnowska[1, 2], Adrian Augustyniak[3, 4], Jolanta Karakulska[5]*

[1] Katedra Ogrodnictwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
[2] Katedra Fizykochemii Nanomateriałów, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
[3] Instytut Biologii, Uniwersytet Szczeciński
[4] Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
[5] Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wpłynęło w październiku, zaakceptowano w listopadzie 2022 r.

Streszczenie: Enologia, nauka zajmująca się kwestiami związanymi z produkcją wina łączy tradycję starożytną z teraźniejszością. Dopiero Louis Pasteur udowodnił, że winifikacja nie zachodzi samoistnie, a za proces odpowiadają drobnoustroje. Był to początek działu enologii zajmującego się mikrobiologią wina, który doprowadził do stopniowej ewolucji metod przetwórczych i wytworzenia zaawansowanych nowoczesnych technik stabilizacji wina stosowanych współcześnie. Niemniej jednak nadal poszukiwane są metody alternatywne, które mogą zastąpić lub zmodyfikować proces siarkowania, czyli konserwacji wina. Wśród nich można znaleźć metody fizyczne i chemiczne. Także nanotechnologia oferuje enologii usprawnienia procesowe. Niniejsze opracowanie ma na celu przedstawienie przeszłych i aktualnych metod stabilizacji wina, a także podsumowanie kierunków rozwoju tej interdyscyplinarnej gałęzi wiedzy.

1. Wino, historia i dawne metody stabilizacji. 2. Współczesne metody stabilizacji wina. 3. Nanotechnologia w enologii. 4. Podsumowanie

FORMER AND CONTEMPORARY METHODS FOR WINE STABILIZATION

Abstract: Enology, a science dealing with issues related to wine production, combines ancient tradition with the present time. It was not until Louis Pasteur proved that vinification does not happen by itself and that microorganisms are responsible for this process. It was a beginning for a branch of enology focused on the microbiology of wine, which led to gradual evolution of production methods and the development of advanced techniques for wine stabilization. Nevertheless, alternative methods that can replace or modify the sulfation process as wine preservation are still sought. Physical and chemical methods can be found among them. Also, nanotechnology offers process improvements to enology. This article describes the past and the current wine stabilization methods and summarizes the directions for developing this interdisciplinary branch of knowledge.

1. Wine, its history, and former stabilization methods. 2. Contemporary methods for wine stabilization. 3. Nanotechnology in enology. 4. Summary

Słowa kluczowe: biotechnologia, nanobiotechnologia, sterylizacja, wino
Keywords: biotechnology, nanobiotechnology, sterilization, wine

"A bottle of wine contains more philosophy than all the books in the world".
Louis Pasteur

1. Wino, historia i dawne metody stabilizacji

Archeologia uprawy winorośli to dziedzina, której wzrost i intensywność badań raptownie rozwinęły się w ciągu ostatnich dwóch dekad. Ogromny postęp na przestrzeni tych lat znacznie poszerzył i dopracował dotychczasowe interpretacje, dodając nowe odkrycia, metodologie, teorie i dowody archeologiczne. Mimo to, w nauce dominują podejścia i syntezy ukierunkowane na regiony lub miejsca [31]. Uprawa winorośli oraz pierwsze metody produkcji i przechowywania wina sięgają okresu neolitu (10 000–4 000 p.n.e.). Prace archeologiczne wskazują, że początki tradycji winiarstwa miały miejsce na terenach Kaukaskich (ok. 6000 p.n.e.) [6, 19, 56, 70]. Analizy chemiczne starożytnych związków organicznych zaabsorbowanych przez materiały ceramiczne pochodzące z terenów Gruzji, datowane na około 6000–5800 p.n.e., stanowią najwcześniejsze biomolekularne dowody archeologiczne na uprawę winorośli i produkcję wina [56]. Natomiast jednym z najstarszych zbadanych stanowisk, z dobrze zachowanymi szczątkami organicznymi, instalacjami i artefaktami wskazującymi na produkcję wina, jest kompleks jaskiń Areni-1 w południowo-wschodniej Armenii, datowany

* Autor korespondencyjny: Jolanta Karakulska, Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, al. Piastów 45, 70-311 Szczecin; e-mail: jolanta.karakulska@zut.edu.pl
© 2022 Kamila Pachnowska et al.
This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

na około 4000 p.n.e. [6, 56]. Technologia produkcji była pomysłowa, winogrona wyciskano na gipsowych podłogach z których niefiltrowany sok przelewany był do podziemnych słojów [56]. Chemicznymi dowodami na poparcie tej hipotezy były wykryte pozostałości malwidyny z grupy antocyjanów, która odpowiada za czerwoną barwę winogron [6], oraz kwasu winowego [56]. Ślady produkcji wina znaleziono także w Egipcie i Fenicji (ok. 5 000 p.n.e.) oraz w Grecji i na Krecie (ok. 2 000 p.n.e.) [70]. Kolonizacja rzymska rozprzestrzeniła produkcję na tereny Morza Śródziemnego [6, 19, 56] – Sycylii, Włoch, Francji, Hiszpanii, Portugalii i Afryki północnej [70]. Uprawa winorośli osiągnęła także kraje bałkańskie, a Rzymianie zabrali ją do Niemiec i innych części Europy północnej, docierając ostatecznie aż do Wielkiej Brytanii [70].

Wino, obok piwa, było pierwszym napojem wytwarzanymi przez człowieka. Opierając się na dowodach archeologicznych, ich produkcja była istotnym czynnikiem rozwoju rolnictwa i przemiany trybu życia z ludzi wędrownych do osiadłych grup rolników [14]. Ponadto fermentowane napoje, zwłaszcza wino, od dawna odgrywają kluczową rolę w rozszerzaniu kultury między narodami na całym świecie [28, 51]. Odpowiednio zabezpieczone wino może być przechowywane przez znacznie dłuższy okres czasu i z większą łatwością niż piwo. Zatem wino miało silniejszy potencjał aby stać się towarem krążącym, to znaczy dobrem produkowanym na wymianę, a nie natychmiastową konsumpcję. W czasach starożytnych wino było ważnym elementem różnych spotkań kolonialnych na Morzu Śródziemnym i jako towar handlowy przez kilka stuleci służyło za główny element kształtujący stosunki między rdzennymi ludami Galii a obcymi Etruskami, Grekami i Rzymianami. Związek ten w końcu osiągnął takie proporcje, że statki przewożące do 10 000 amfor wina utrzymywały handel. Przez prawie sto lat dostarczano Galii do 16 milionów litrów rzymskiego wina rocznie. Wino stało się także integralną częścią symboli religijnych sięgających głębokiej starożytności. Bogatym źródłem różnorodnych archiwów tekstowych i ikonograficznych na ten temat jest Grecja, gdzie trunek był kluczowym elementem rytuału społecznego i bezpośredniego związku z boską mocą Dionizosa. Wino było również podstawowym aspektem religii starożytnego Egiptu, budzące wiele skojarzeń teologicznych oraz składane pod postacią ofiary w boskich kultach i rytuałach pogrzebowych [29].

Wytwarzanie wina może odbywać się tylko raz w roku, po zbiorze dojrzałych winogron i jest wynikiem wysoko wykwalifikowanych umiejętności, specjalistycznego zaplecza do produkcji oraz odpowiednich środków stabilizujących [8]. Nietrwałość pierwszych sfermentowanych napojów musiała być jednym z głównych wyzwań z jakimi mierzyli się nasi przodkowie. Psucie się wina może być opóźnione przez wysokie zawartości alkoholu i cukru (bakterie kwasu octowego nie rozmnażają się powyżej 16% etanolu, v/v), ale bez innych środków byłoby to rozwiązaniem krótkotrwałym. Podstawowym wymogiem powinno być prawidłowe zamknięcie fermentującego napoju w celu uniknięcia kontaktu z powietrzem, co potwierdzają częste ślady obecności glinianych i korkowych zabezpieczeń w naczyniach starożytnych [40]. Wiele dotychczasowych dowodów archeologicznych wskazuje, że starożytne metody konserwacji wina gronowego i innych napojów fermentowanych polegały na celowym nasączaniu żywicą terpentynową lub sosnową, prawdopodobnie pełniącą rolę środka przeciwutleniającego i leczniczego [52–55]. Żywica, która z łatwością rozpuszcza się w alkoholu, służyła częściowo jako środek zakłócający i hamujący rozwój bakterii (*Acetobacter*) odpowiedzialnych za przetwarzanie wina w ocet oraz maskujący niepożądane smaki i zapachy [53]. Powszechnym dodatkiem były także różnorodne zioła, których zadaniem było wzmocnienie właściwości leczniczych wina. Badania archeologiczne ujawniają, że starożytni przodkowie mieli także sposoby na wzmocnienie słodyczy, smaku i innych właściwości wina oraz zapewnienie wystarczającej ilości drożdży do rozpoczęcia i podtrzymania fermentacji. W tym celu stosowali dodatek w postaci figi pokrojonej w plastry [55]. W związku z powyższym wydaje się zatem, że dwutlenek siarki (SO_2), obecnie najbardziej uznany środek konserwujący, nie był powszechny w czasach starożytnych [40].

Naukowe podstawy przetwarzania winogron i zbóż na napoje alkoholowe ustanowiono dopiero w połowie XIX wieku w wyniku postępów nauk chemicznych i biologicznych będących efektem rozwoju konceptualnego i technologicznego, w tym opracowania ulepszonego typu mikroskopu [13]. Prekursorem wiedzy na temat zrozumienia złożoności procesów chemicznych zachodzących podczas produkcji wina był Louis Pasteur, francuski chemik i mikrobiolog znany z pracy nad fermentacją, pasteryzacją i szczepieniami. W trakcie studiów doktoranckich z chemii odkrył asymetrię molekularną obejmującą preparaty kwasu winowego i parawinianu, które nazwał „kryształami życia". Następnie skupił się na procesie fermentacji, podczas której powstają wspomniane związki [14]. W latach 1854–1857 Pasteur opracował teorię fermentacji drobnoustrojowej opartą na badaniach fermentacji alkoholowej, fermentacji kwasu mlekowego i fermentacji kwasu masłowego [14, 35]. Doszedł do wniosku, że wszystkie procesy fermentacyjne są powodowane przez m.in. specyficzne bakterie i drożdże. Obecnie fermentacja jest definiowana jako proces chemiczny, w którym cząsteczki takie jak glukoza i inne cukry są rozkładane w warunkach beztlenowych. Pasteur nazwał proces fermentacji „La vie sans l'air" („życie bez powietrza") [14]. W 1860 roku Louis Pasteur ostatecznie dowiódł, że żadne życie nie

może powstać w materii nieożywionej – „Komórki tylko z komórek; gatunki tylko z gatunków i organizmy tylko z organizmów". Była to jedna z trzech niezależnych prac naukowców z różnych dziedzin (1858 r. – Rudolf Virchow „Patologia komórkowa", 1859 r. – Karol Darwin „O powstawaniu gatunków") powstałych na przestrzeni trzech lat, ustanawiających tę samą ogólną zasadę ciągłości życia. Tym samym postać Pasteura jest powiązana z początkami współczesnej patologii komórkowej, mikrobiologii i enologii (nauki o winie) [13, 14].

Obecnie wiadomo, że produkcja wina opiera się na fermentacji alkoholowej, czyli przetwarzaniu naturalnie występujących cukrów w winogronach na etanol i dwutlenek węgla przy udziale drożdży [14, 19, 70]. *Saccharomyces cerevisiae* to dominujący gatunek stosowany we współczesnych procesach fermentacji winogron, a także produkcji chleba i warzenia piwa. Praca badawcza Cavalieri i in. [19] potwierdziła obecność DNA *S. cerevisiae* w pozostałościach jednego z najstarszych słojów na wino odkrytych w Egipcie. Oznacza to, że udział tego mikroorganizmu w fermentacji wina sięga prawdopodobnie co najmniej 3150 p.n.e. Ten wniosek niesie także poważne następstwa dla ewolucji drożdży piwnych i chlebowych sugerując, że *S. cerevisiae* naturalnie występujący na powierzchni winogron był również wykorzystywany jako inokulum do fermentacji produktów zbożowych [19]. Oprócz drożdży, także bakterie kwasu mlekowego mogą przeprowadzać fermentację żywności i napojów, umożliwiając produkcję, m.in. jogurtów probiotycznych, serów, kimchi, mleka probiotycznego, kefiru, czy kumysu [1, 9, 69]. Ponadto, odpowiadają za przemianę kwasu jabłkowego w winach, tzw. fermentację jabłkowo-mlekową/malolaktyczną, która następuje zwykle po zakończeniu fermentacji alkoholowej [66]. Fermentacja ta ma jednak drugorzędne znaczenie w przypadku przefermentowanych produktów owocowych [40].

2. Współczesne metody stabilizacji wina

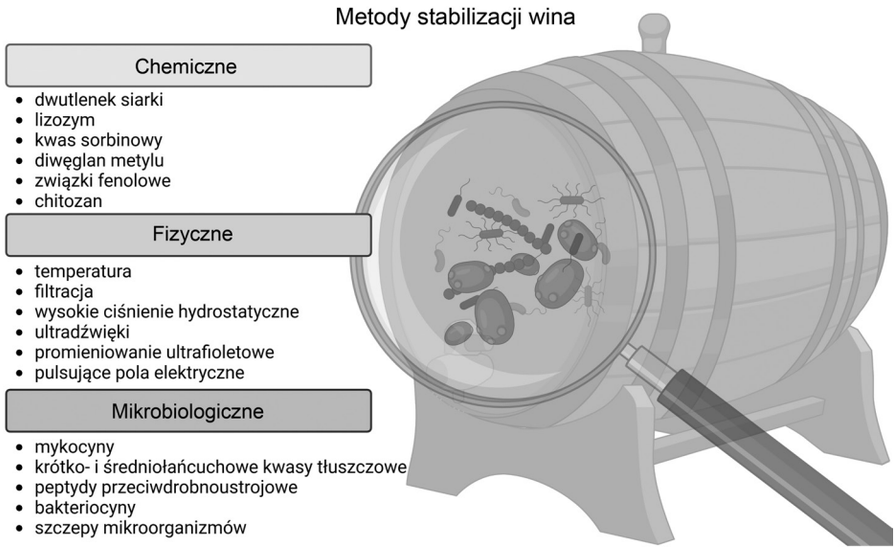
Fermentacja wina to złożony mikrobiologicznie proces, który wymaga monitorowania mikroorganizmów na różnych etapach. Metabolizm drobnoustrojów jest jednym z wielu czynników wpływających na jakość wina. Zalecaną praktyką enologiczną jest kontrola dzikich mikroorganizmów obecnych w moszczu winogronowym w celu zapewnienia odpowiedniej fermentacji alkoholowej przez kultury starterowe drożdży. Z kolei kontrola mikroorganizmów obecnych w winie jest konieczna w celu zapewnienia dominacji odpowiednich szczepów bakterii do fermentacji malolaktycznej (MLF) [49] oraz uniknięcia psucia się wina w wyniku rozwoju niepożądanych drożdży, bakterii kwasu mlekowego (LAB) i bakterii kwasu octowego (AAB), co ma nieodwracalny wpływ na jakość wina i skutkuje znacznymi stratami ekonomicznymi. Niektóre gatunki LAB i AAB, takie jak *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. i *Acetobacter* spp., są przede wszystkim odpowiedzialne za pogorszenie jakości moszczów i win, w wyniku tworzenia się niepożądanych związków zapachowych i smakowych (smak / zapach octu czy acetonu. Do drożdży powodujących psucie się wina należą głównie szczepy z rodzajów: *Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia* i *Zygosaccharomyces*. Zwłaszcza drożdże należące do rodzaju *Dekkera* (anamorfa *Brettanomyces* sp.) są producentami 4-etylofenolu, 4-etylogwajakolu i tetrahydropirydyny, odpowiedzialnych za nieprzyjemny smak wina [46, 89]

W celu zmniejszenia liczebności i kontroli mikroorganizmów powodujących psucie się wina stosowane są różne metody fizyczne, chemiczne i mikrobiologiczne, które zostały zebrane i opisane na ryc. 1.

Metody chemiczne

Dwutlenek siarki (SO_2) jest dodatkiem powszechnie stosowanym do kontroli mikrobiologicznej żywności, w szczególności żywności kwaśnej, takiej jak soki owocowe i wino [61]. Stosowanie siarki w przemyśle winiarskim wynika z szerokiego spektrum działania tego związku, przede wszystkim zdolności kontroli mikrobiologicznej, właściwości antyseptycznych, przeciwutleniających i chroniących aromaty wina, i odbywa się na różnych etapach produkcji [66]. SO_2 dodawany do winogron i moszczu, przed rozpoczęciem fermentacji alkoholowej, hamuje wzrost niepożądanych drożdży spoza rodzaju *Saccharomyces* (ang. non-*Saccharomyces* yeasts), bakterii kwasu octowego AAB (ang. acetic acid bacteria) i bakterii kwasu mlekowego LAB (ang. lactic acid bacteria) [39, 46, 73, 99] oraz przeciwdziała utlenianiu moszczu [46]. Ponadto wpływa na efektywność uwalniania związków fenolowych ze skórek winogron i nasion podczas maceracji [39]. Zapobieganie utlenianiu enzymatycznemu i chemicznemu wina w konsekwencji stabilizuje jego właściwości sensoryczne podczas przechowywania i leżakowania [39, 46, 99]. Poza tym obecność siarki w procesie filtracji, dekantacji i dojrzewania wina, poza działaniem przeciwutleniającym [91], zapewnia także ochronę przeciwdrobnoustrojową, ukierunkowaną zwłaszcza na *Brettanomyces* spp., *Candida* spp., *Pichia* spp. oraz bakterie z grupy AAB [77, 88, 91]. Natomiast siarkowanie win słodkich stanowi istotne zabezpieczenie przed wtórną fermentacją prowadzoną przez *Saccharomyces cerevisiae* [41].

Należy podkreślić, że obecność SO_2 w winie nie wynika jedynie z egzogennego dodatku tego związku podczas produkcji, ale jest konsekwencją fermentacji alkoholowej, tzw. „biologiczny SO_2". Drożdże wykorzy-



Ryc. 1. Metody stabilizacji wina
Opracowanie własne na podstawie [89, 99].

stują siarkę obecną w moszczu do syntezy aminokwasów, a poziom produkowanych przez nie siarczynów podczas fermentacji jest silnie uzależniony od szczepu drożdży i odmiany winorośli [61].

Siarczyny dodawane do moszczu gronowego lub wina mogą mieć postać płynną lub gazową: dwutlenek siarki, siarczyn sodu, wodorosiarczyn sodu, pirosiarczyn sodu, pirosiarczyn potasu, siarczyn wapnia, wodorosiarczyn wapnia i wodorosiarczyn potasu [39, 89].

W uprawie winorośli i przetwórstwie występuje szereg gatunków mikrobiologicznych. Wśród bakterii kwasu octowego AAB, dominującymi gatunkami na winogronach, zwłaszcza tych o gorszej kondycji, są szczepy z rodzajów *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* i *Komagataeibacter*. Proliferacja AAB, zwłaszcza szczepów z rodzaju *Acetobacter*, prowadzi do procesów oksydacyjnych, z niepożądanymi konsekwencjami dla jakości wina. Z tego względu kontrola AAB odbywa się przy użyciu SO_2 oraz ograniczeniu lub uniemożliwieniu kontaktu wina z tlenem [48]. Natomiast wśród bakterii kwasu mlekowego LAB, dominujące gatunki należą do rodzajów *Oenococcus*, *Pediococcus* i *Lactobacillus* [39]. *Oenococcus oeni* odpowiedzialny głównie za fermentację malolaktyczną *(*MLF) w winie, jest w stanie przezwyciężyć stresujące warunki panujące w winie (niskie pH, wysoka zawartość etanolu), ale ma dużą wrażliwość na SO_2 [62]. Wrażliwość *O. oeni* na SO_2 jest cechą pozytywną w kontekście produkcji win białych, w których MLF nie jest pożądany. W przypadku win czerwonych MLF sprzyja częściowo przetrwaniu bakterii, ale w postaci niehodowalnej (VBNC, ang. viable but nonculturable), a inokulacja kultur starterowych promuje szybką biokonwersję [62, 89]. Poza wymienionymi zaletami, stosowanie SO_2 w produkcji wina może mieć także niekorzystne skutki. Pozostałości tego związku w wysokim stężeniu mogą powodować nieprzyjemny smak wina [39]. Co więcej, nadmierne spożycie SO_2 może skutkować różnymi objawami chorobowymi, takimi jak np. skurcz oskrzeli, bradykardia, objawy żołądkowo-jelitowe, bóle głowy, wysypki skórne, niedociśnienie, a w rzadkich przypadkach nawet reakcją anafilaktyczną [25, 38]. W związku z niepożądanymi skutkami ubocznymi wywoływanymi przez siarczyny istnieje obowiązek zamieszczania na etykiecie informacji o ich obecności, w przypadku poziomu przekraczającego 10 mg/L (Dyrektywa 2003/89/WE). Zgodnie z prawem europejskim dopuszczalne stężenia SO_2 w winie nie powinny przekraczać 150 mg/L i 200 mg/L, odpowiednio dla win czerwonych i białych. Z kolei w winach deserowych, w których stężenie cukru resztkowego wynosi co najmniej 5 g/L, dozwolony poziom SO_2 może być dodatkowo zwiększony o 50 mg/L (Rozporządzenie UE nr 606/2009).

Wraz z obawami o zdrowie człowieka i troską o środowisko rośnie zapotrzebowanie konsumentów na wina o niskiej zawartości lub bez dodatku siarczynów, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej jakości i pożądanych cech organoleptycznych [25, 84, 99]. Istnieje szereg rozwiązań alternatywnych dla SO_2 [26, 99], jednak część enologów uważa, że związek ten jest jedynym właściwym, który może zapewnić produkcję win gatunkowych o odpowiedniej trwałości [10].

Chemiczne alternatywy dla SO_2

Lizozym, kwas sorbinowy, diwęglan dimetylu, chitozan i związki fenolowe to dodatki chemiczne o działaniu przeciwdrobnoustrojowym i antyoksydacyjnym, dopuszczone do produkcji wina, zgodnie z Rozp. WE

nr 606/2009 z późniejszymi zmianami i mogące mieć status alternatywy dla SO_2 [34, 39, 46].

Lizozym jest enzymem muramidazy wyizolowanym z białka jaja (EC 3.2.1.17). Enzym ten zrywa wiązania glikozydowe między kwasem N-acetylomuraminowym i N-glukozaminą w ścianie komórki bakteryjnej powodując jej lizę i śmierć [45]. Jest aktywny przeciw bakteriom Gram-dodatnim i nie wykazuje lub wykazuje słabą aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych i drożdży [27]. W produkcji wina lizozym wykorzystywany jest do częściowego zastąpienia dwutlenku siarki na różnych etapach procesu technologicznego oraz jako środek klarujący [68]. W moszczu winogronowym lizozym zmniejsza populację komórek LAB [4], bez wpływu na aktywność drożdży i postęp fermentacji. Do LAB odpowiedzialnych za kontaminację moszczu należą szczepy *Pediococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc mesenteroides* i *O. oeni* [36]. Wykazują one różne stopnie wrażliwości lub oporności na lizozym, na przykład *O. oeni* jest stosunkowo wrażliwy, a *Lactobacillus* spp. i *Pediococcus* spp. tolerują wyższe stężenia [27].

Dodatek lizozymu pozwala na kontrolę LAB i zahamowanie MLF [36], co jest istotne w produkcji białego wina. Natomiast w winach czerwonych lizozym jest mało skuteczny, ponieważ związki polifenolowe mogą hamować jego działanie [7]. Jednakże pozwala uniknąć wzrostu kwasowości lotnej, ogranicza proliferację LAB podczas wydłużonego czasu maceracji i ułatwia późniejsze zaszczepienie wybranego startera malolaktycznego [4].

Dodatek lizozymu nie prowadzi do zmian w zawartości alkoholu, pH i właściwościach organoleptycznych wina. W winach czerwonych białka jaja zawierające lizozym wiążą garbniki na drodze oddziaływań elektrostatycznych, zapobiegając utracie barwy wina [68], natomiast zastosowanie lizozymu wraz z dodatkiem tanin enologicznych poprawia aromat wina dzięki większej zawartości estrów i kwasów [83]. Ustalono także, że wina otrzymane przy użyciu kombinacji lizozymu i diwęglanu dimetylu (DMDC), innego związku proponowanego jako alternatywa dla SO_2, mają lepsze właściwości aromatyczne, niż wina poddane działaniu samego SO_2 [60].

Rozporządzenie CE nr 606/2009 narzuca limit 500 mg/L dodatku lizozymu do moszczu. Należy podkreślić, iż lizozym stosowany w produkcji wina jest izolowany z białka jaja i został oznaczony jako alergen Gal4, więc może wywoływać reakcję alergiczną, nawet w niewielkich ilościach, zwłaszcza gdy jest obecny w winach nietraktowanych bentonitem [96]. W związku z powyższym, przepisy europejskie (dyrektywa 2007/68/WE) wymagają, aby obecność lizozymu od stężenia wynoszącego 0,25 mg/L była zgłaszana na etykiecie.

Podsumowując, zastosowanie lizozymu może prowadzić do redukcji SO_2 w winie, ale nie może zastąpić siarczynów, ponieważ ma tylko działanie przeciwbakteryjne wobec LAB, nie jest w stanie kontrolować proliferacji zanieczyszczających drożdży oraz bakterii Gram-ujemnych, ani zjawiska utleniania w moszczach i winach. Ponadto zastosowanie lizozymu w produkcji wina musi być rozważne z uwagi na możliwe reakcje alergiczne u konsumentów.

Kwas sorbowy jest krótkołańcuchowym nienasyconym kwasem tłuszczowym, słabo rozpuszczalnym w wodzie, rozpuszczalnym w etanolu, stosowanym jako środek przeciwdrobnoustrojowy i przeciwgrzybiczy w konserwacji żywności. W produkcji wina jest używany jako sorbinian potasu, który zawiera 75% kwasu sorbinowego i jest rozpuszczalny w wodzie [73]. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa kwasu sorbowego wynika z połączenia tego związku z grupą wodorosiarczkową układu enzymatycznego mikroorganizmów, prowadząc do jego dezaktywacji [30].

Rozporządzenie UE nr 606/2009 nakłada limit 200 mg/L stężenia kwasu sorbowego w winie. Taka zawartość jest dobrze tolerowana przez kilka zanieczyszczających drożdży obecnych podczas produkcji, takich jak *Z. bailii* [86], *Brettanomyces* spp. [80, 91] oraz *Saccharomycodes* spp. [90]. Ponadto wykazuje brak aktywności wobec bakterii AAB i LAB, na które istotny wpływ mają dopiero stężenia powyżej 0,5–1 g/L [73]. Jednakże w połączeniu z SO_2 kwas sorbowy wykazuje aktywność przeciwko drożdżom, takim jak *S. cerevisiae*, co pozwala uniknąć wtórnej fermentacji win słodkich w butelkach [85] oraz przeciwko drożdżom flor (*Candida* spp.), zdolnym rozwijać się na powierzchni wina [73]. Chociaż kwas sorbowy w ograniczonych prawem stężeniach nie modyfikuje właściwości organoleptycznych wina, LAB w winach czerwonych są w stanie reagować z kwasem sorbowym, wytwarzając niepożądane związki lotne odpowiedzialne za „zapach geranium" [73].

Diwęglan dimetylu (DMDC) jest związkiem organicznym o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Unia Europejska zezwoliła na jego stosowanie w produkcji wina, w maksymalnej dawce 200 mg/L (rozporządzenie CE nr 606/2009). Najczęstszym zastosowaniem komercyjnym jest dodawanie DMDC tuż przed butelkowaniem do win o zawartości cukru co najmniej 5 g/L [24]. W winie DMDC jest szybko hydrolizowany do metanolu i dwutlenku węgla (w ciągu 12 do 24 godzin), jednak bez konsekwencji toksykologicznych i wpływu na właściwości organoleptyczne wina [27].

Mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego DMDC polega na reakcji z grupami aminowymi niektórych enzymów w komórce, takich jak dehydrogenaza alkoholowa i 3-fosforan gliceraldehydu, powodując metoksykarbonylację reszt nukleinowych i prowadząc do śmierci komórki drobnoustroju [72].

DMDC jest skuteczniejszy niż SO_2 wobec drożdży, ponieważ nie indukuje przejścia komórek drożdży w postać zdolną do życia, ale niehodowalną (VBNC), jak to ma miejsce w przypadku SO_2, ale prowadzi do śmierci komórki. Jednak stosowanie tego związku zamiast SO_2 nie jest zalecane, ponieważ DMDC nie ma aktywności przeciwutleniającej, a w zatwierdzonych dawkach jest nieskuteczny wobec bakterii. Dopiero bardzo wysokie dawki mają działanie bakteriostatyczne, np. wzrost *Acetobacter aceti*, czy *Lactobacillus* spp. hamują stężenia, odpowiednio, 1000 mg/L i 500 mg/L [27].

Gatunkami drożdży najbardziej wrażliwymi na DMDC są: *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygoascus hellenicus* i *Lachancea thermotolerans*, podczas gdy inne gatunki, takie jak *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae, Dekkera bruxellensis* i *Pichia guilliermondii* są również wrażliwe, ale w nieco wyższych stężeniach [24]. Generalnie, *Zygosaccharomyces* spp. wykazują większą wrażliwość na DMDC, niż drożdże z rodzaju *Candida*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma* lub *Wickerhamomyces* [100].

Chitozan jest główną pochodną chityny, biopolimeru składającego się z jednostek N-acetyloglukozaminy połączonych wiązaniami β (1→4). Polisacharyd ten występuje bardzo powszechnie w naturze, głównie w mięczakach i skorupiakach, ale także w grzybach i owadach [33]. Jego zastosowanie jako potencjalnego środka konserwującego żywność wynika z szerokiej aktywności biologicznej, w tym przeciwdrobnoustrojowej wobec grzybów strzępkowych, drożdży i bakterii [76]. Chitozan został dopuszczony przez Komisję Europejską (Rozporządzenie CE 53/2011) do produkcji wina, jako środek klarujący. W tym zastosowaniu dopuszcza się jedynie chitozan pochodzący z *Aspergillus niger*, aby uniknąć wszelkich potencjalnych obaw o alergenność skorelowaną z surowcem ze skorupiaków. W zależności od zastosowania chitozanu stosuje się go w różnych dawkach [89].

Dodatek 100 g/hL chitozanu jest stosowany w celu zapobiegania zamgleniu wina i zmniejszenia stężenia metali ciężkich (Fe, Pb, Cd, Cu) [20, 22]. Dawki 500 g/hl mają na celu ograniczenie zanieczyszczenia ochratoksyną A (OTA), mikotoksyną wytwarzaną przez grzyby z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium*, która może być obecna w winie w maksymalnej dawce 2 μg/l (EC 2005) [71]. Z kolei ilość 10 g/hL jest dozwolona w celu zmniejszenia stężenia niepożądanych mikroorganizmów, zwłaszcza drożdży *Brettanomyces* spp.

Różne gatunki LAB wykazują zróżnicowaną wrażliwość na chitozan, np. *Lactobacillus* spp. wykazuje wyższą oporność na chitozan, niż *Pediococcus* spp., a *Lactobacillus plantarum* jest bardziej oporny niż *Lactobacillus hilgardii*, *O. oeni* i *Pediococcus* spp. [5]. Skuteczność chitozanu wobec AAB jest podobna do skuteczności siarczynów [92].

Związki fenolowe lub polifenole, naturalnie występujące w winogronach i winach, są dodatkami chemicznymi dopuszczonymi w enologii przez UE (Rozp. WE nr 606/2009 i późniejszymi zmianami), gdy ich ilość w winogronach i winach jest zbyt mała [77]. Naturalne stężenie związków fenolowych w winie zależy od różnych czynników związanych z jakością winogron (odmiana, czas zbioru, gleba, klimat itp.) i praktykami enologicznymi (czas i temperatura maceracji, fermentacja ze skórkami i nasionami, dodatek enzymów, tłoczenie, MLF itp.) [75]. Głównymi związkami fenolowymi obecnymi w winie są kwasy fenolowe (hydroksycynamonowy i hydroksybenzoesowy), flawonoidy, skondensowane taniny, antocyjany i stilbeny (resweratrol). Związki te odpowiadają za właściwości organoleptyczne win, takie jak kolor i cierpkość [94]. Ponadto, obecność polifenoli w winach wiąże się z korzyściami zdrowotnymi, wynikającymi z ich dobrze znanego działania przeciwutleniającego, przeciwnowotworowego i przeciwzapalnego [97]. Wykazano też aktywność związków fenolowych wobec LAB, *Candida albicans* i patogenów oportunistycznych, takich jak *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis i *Pseudomonas aeruginosa*, sugerując ich potencjalne zastosowanie jako naturalnych środków przeciwdrobnoustrojowych w produkcji wina [65, 81]. Mechanizm przeciwdrobnoustrojowego działania związków fenolowych nie został w pełni wyjaśniony. Ustalono jednak, że fenole zwiększają przepuszczalność błony cytoplazmatycznej z wyciekiem składników wewnątrzkomórkowych bakterii, a także mogą zmieniać skład kwasów tłuszczowych [74]. Wykazano także ich zdolność do hamowania syntezy peptydoglikanu, składnika ściany komórkowej bakterii oraz syntezy kwasów nukleinowych [16, 87].

Wśród związków fenolowych, interesującym i innowacyjnym substytutem SO_2 w czerwonych winach wydaje się resweratrol, który należy do stilbenów, ze względu na jego działanie przeciwutleniające i przeciwdrobnoustrojowe wobec AAB, LAB powodujących psucie się wina oraz drożdży z rodzajów *Dekkera*, *Zygosaccharomyces* i *Hanseniaspora* [93].

Fizyczne alternatywy dla SO_2

Obróbka termiczna i filtracja to główne fizyczne metody stosowane w celu zmniejszenia mikrobiologicznej kontaminacji moszczów i win. Temperatura, oprócz właściwości bójczych wobec bakterii i drożdży, sprzyja ekstrakcji antocyjanów i innych polifenoli, hamuje aktywność enzymów oksydacyjnych i stabilizuje wina słodkie [43, 46]. Filtracja ma jednocześnie zastosowanie do klarowania, stabilizacji i sterylizacji wina. W zależności o rodzaju filtrów działa na LAB, AAB i drożdże [34, 46].

Wymienione metody mogą też negatywnie wpływać na właściwości organoleptyczne wina [95, 99]. Obróbka termiczna w winach czerwonych może skutkować zmianą smaku i degradacją wrażliwych na ciepło polifenoli i innych składników bioaktywnych. Natomiast w winach białych wyższa temperatura obniża stężenie lotnych związków aromatycznych [43]. Z kolei filtracja to proces kosztowny i silnie utleniający wino. Wpływa na obniżenie stężenia związków aromatycznych, smakowych i barwnych [34, 46], przez co może powodować zmniejszenie intensywności barwy, ilości antocyjanów i garbników w winach czerwonych, oraz pogorszenie profilu aromatycznego w winach białych [95].

Spośród innych metod fizycznych stabilizacji wina stosowane są, np. wysokie ciśnienie hydrostatyczne, ultradźwięki, promieniowanie ultrafioletowe i pulsacyjne pole elektryczne [46, 99]. Są to metody skuteczne w kontekście walki z mikroorganizmami powodującymi psucie się wina oraz zachowania jego jakości, jednakże nie zapewniają ochrony antyoksydacyjnej [99]. Skutecznie eliminują LAB i drożdże [57], a promieniowanie UV jest dodatkowo aktywne wobec AAB [43, 46, 78].

Wysokie ciśnienie hydrostatyczne ma nieznaczny wpływ na właściwości fizykochemiczne i organoleptyczne wina [34, 43]. Stosowanie utradźwięków przyspiesza dojrzewanie wina oraz wzmaga ekstrakcję związków fenolowych w winach czerwonych i redukuje aktywność enzymów oksydacyjnych [43, 77]. Promieniowanie UV również wspomaga ekstrakcję związków fenolowych w winach czerwonych oraz zwiększa zawartość związków bioaktywnych (stilbenów) [34, 43, 77]. Z kolei pulsacyjne pole elektryczne ma minimalny wpływ na jakość wina, ale pozwala skrócić czas maceracji, przyspiesza dojrzewanie wina, inaktywuje drożdże w winie słodkim oraz zmniejsza aktywność enzymów oksydacyjnych [34, 46, 77].

Mikrobiologiczne alternatywy dla SO_2

Strategia alternatywna do chemicznych i fizycznych metod kontroli mikroorganizmów powodujących psucie się wina opiera się na wykorzystaniu interakcji i metabolizmu drobnoustrojów [99]. Jednym z mikrobiologicznych rozwiązań problemu psucia się wina jest bioochrona moszczu winogronowego, polegająca na celowym zaszczepieniu gatunków drożdży zdolnych do szybkiej kolonizacji, co zapobiega rozwojowi niepożądanych mikroorganizmów [12, 58]. Najczęściej do bioochrony wina stosowany jest *Saccharomyces cerevisiae* [17, 82], gatunek drożdży zalecany przez Międzynarodową Organizację ds. Winorośli i Wina (OIV, ang. International Organisation of Vine and Wine) do wczesnego zaszczepiania moszczu w celu uniknięcia psucia się wina. Wykazano jednak, że pozytywny wpływ na złożoność i jakość sensoryczną win mogą mieć także inne drożdże [23, 64].

Inne koncepcje ochrony wina przed psuciem, stanowiące propozycję alternatywy dla dodatku SO_2, opierają się na wykorzystaniu szczepów starterowych drożdży, zdolnych do wytwarzania metabolitów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, takich jak mykocyny, krótko i średnio-łańcuchowe kwasy tłuszczowe, czy peptydy przeciwdrobnoustrojowe [46]. Mykocyny wykazują aktywność wobec drożdży powodujących psucie się wina oraz stanowiących zanieczyszczenie podczas produkcji. Są bezpieczne do spożycia dla ludzi, jednak badania nad zastosowaniem oczyszczonych toksyn w produkcji wina są jak dotąd nieliczne [18, 46, 99]. Z kolei krótko i średnio-łańcuchowe kwasy tłuszczowe hamują wzrost drożdży oraz są aktywne wobec LAB. Monolauryna, która jest monoglicerydem kwasu laurowego, posiada status GRAS (ogólnie uznane za bezpieczne, ang. generally recognized as safe) i została zatwierdzona przez OIV jako środek przeciw pieniący w produkcji wina. Udowodniono też wpływ estrów kwasów tłuszczowych na owocowy zapach wina. Poza korzystnym oddziaływaniem kwasów tłuszczowych, są one odpowiedzialne za nieprzyjemne, serowe, tłuste i zjełczałe aromaty w winie [46, 99]. Innymi metabolitami proponowanymi do zastąpienia siarczynów w produkcji wina są przeciwdrobnoustrojowe peptydy z drożdży winiarskich. Są one nietoksyczne dla ludzi i aktywne wobec LAB oraz drożdży odpowiedzialnych za psucie się wina i tworzących biofilm [46, 98, 99].

Naprzeciw koncepcjom produkcji wina o niskiej zawartości SO_2 wychodzą badania nad potencjalnym zastosowaniem *Saccharomyces cerevisiae* [99]. Dotyczą one szlaków metabolicznych związanych z produkcją związków zawierających siarkę przez drożdże winiarskie i ich tolerancją na siarczyny, począwszy od produkcji siarczynu i glutationu do detoksykacji siarczynów poprzez wypływ błonowy oraz produkcji związków wiążących SO_2 [99].

3. Nanotechnologia w enologii

Nanomateriały zyskały duże znaczenie we współczesnej nauce. Są to substancje, których rozmiar w przynajmniej jednej płaszczyźnie jest opisywany w skali nanometrycznej [50]. Liczne prace badawcze dowodzą, że nanomateriały mogą być wykorzystywane w mikrobiologii, szczególnie jako substancje o potencjale bakterio- i grzybobójczym [59]. Takie właściwości zostały wykazane m.in. przeciw znanym patogenom oportunistycznym, w tym *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* [21, 79].

Czy zatem istnieje możliwość wykorzystania nanotechnologii w modernizowaniu procesu winifikacji?

Należy podkreślić, że nanotechnologia już znajduje zastosowanie w ocenie ilościowej i jakościowej wina, głównie poprzez aplikowanie sensorów zawierających nanokomponenty. Mogą one zostać wykorzystane do monitorowania zmieniających się parametrów wina docelowo prowadząc do stworzenia „elektronicznego języka", który będzie oceniał walory jakościowe wina bez konieczności angażowania człowieka [47]. Wydaje się także prawdopodobne, że nanostruktury mają potencjał do wykorzystania w stabilizacji wina, szczególnie uwzględniając struktury złożone z materiałów dopuszczonych do stosowania w przemyśle spożywczym [37, 47]. Do takich materiałów zalicza się krzemionkę, która widnieje w spisie dodatków do żywności pod numerem E551, jako emulgator i środek przeciw spieniający [2]. Nanosfery krzemionkowe były już testowane wobec bakterii *Oenococcus oeni*. Testy te przyniosły efekt redukcji ilości komórek w badanych próbkach, gdzie prawdopodobnym mechanizmem działania była inaktywacja poprzez mechaniczne uszkadzanie komórek lub wywoływanie stresu oksydacyjnego [15]. Przy zastosowaniu nanosfer krzemionkowych w koncentracji 0,5 mg/mL w młodym czerwonym winie uzyskano w przybliżeniu 50% redukcję [63]. Podobne nanostruktury składające się z mezoporowatej krzemionki w formie nanorurek (i z dodatkiem ditlenku tytanu) mogą także stymulować aglomerowanie komórek. Efekt ten został dotychczas wykazany na modelu *P. aeruginosa* [3], a zatem niezwiązanym z procesem winifikacji. Potwierdzenie tego efektu na mikroorganizmach uczestniczących w wytwarzaniu wina nadal wymaga weryfikacji.

Interesującym aspektem badań nad oddziaływaniami drobnoustrojów z nanomateriałami jest znaczenie tych interakcji w specyficznej odpowiedzi fizjologicznej komórek. Wśród efektów opisanych dotychczas należy wyróżnić możliwość destabilizacji membran komórkowych, wspomniane aglomerowanie komórek oraz ich pozostałości do nanomateriałów i agregatów złożonych z tych nanostruktur, a także stymulowanie biofilmowania i pobudzanie wytwarzania metabolitów wtórnych, w tym barwników [42, 44, 67]. Niedawno przeprowadzone badania dowodzą, że charakterystyczne oddziaływanie nanomateriałów z drobnoustrojami może być także wykorzystywane w bioinżynierii procesu produkcji wina. Dušak i wsp. [32] przyłączyli do powierzchni komórek *O. oeni* nanocząstki magnetyczne, które pozwalały na odseparowanie tych bakterii w momencie, kiedy eksperymentatorom zależało na zatrzymaniu fermentacji jabłkowo-mlekowej prowadzonej przez te drobnoustroje. Należy podkreślić, że przyłączone nanocząstki nie powodowały zmiany metabolizmu *O. oeni* przed ich odseparowaniem z procesu. W podobny sposób, stosując superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (γ-Fe_2O_3), możliwe było także usuwanie drożdży z procesu produkcji wina musującego [11].

4. Podsumowanie

Tysiące lat tradycji produkcji wina przez ludzkość doprowadziły do wytworzenia wielu usprawnień tego procesu, czego dowodem są liczne metody fizyczne i chemiczne. Dzięki zwiększaniu zasobów wiedzy dotyczącej drobnoustrojów towarzyszących winifikacji, opracowano także mikrobiologiczne sposoby regulowania tego procesu. Znanych jest wiele metod mogących zapewnić kontrolę mikrobiologiczną winifikacji, przy zachowaniu właściwości i wysokiej jakości wina. Nie ma obecnie dostępnego jednego związku zdolnego do całkowitego zastąpienia SO_2 w tym procesie, ale połączenie wybranych procedur może w efekcie skutecznie zmniejszyć zawartość siarczynów w winie, spełniając tym samym oczekiwania konsumentów zarówno w zakresie zdrowia i bezpieczeństwa, jak i przyjaznego podejścia do środowiska. Co więcej, mimo istniejących skutecznych dróg stabilizowania wina, poszukiwania nowych rozwiązań nadal są tematem rozwojowym, który wraz z upowszechnianiem się metod bioinżynierii i biologii molekularnej będzie się rozwijał w kierunku zrozumienia i manipulacji procesu winifikacji także na poziomie molekularnym. Nie bez znaczenia jest także sięganie po osiągnięcia nanotechnologii. Louis Pasteur miał rację przewidując skomplikowanie z pozoru prostego procesu wytwarzania wina.

Podziękowania

Praca sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu Preludium 13 (Nr 2017/25/N/ST5/01222) pt. „Wpływ nanomateriałów fotoaktywnych na stabilność mikrobiologiczną i skład chemiczny soku winogronowego i wina".

Piśmiennictwo

1. Ağagündüz D., Şahin T.Ö., Ayten Ş., Yılmaz B., Güneşliol B.E., Russo P., Spano G., Özogul F.: Lactic acid bacteria as pro-technological, bioprotective and health-promoting cultures in the dairy food industry. *Food. Biosci.* **47**, 101617 (2022)
2. Athinarayanan J., Periasamy V.S., Alsaif M.A., Al-Warthan A.A., Alshatwi A.A.: Presence of nanosilica (E551) in commercial food products: TNF-mediated oxidative stress and altered cell cycle progression in human lung fibroblast cells. *Cell Biol. Toxicol.* **30**, 89–100 (2014)
3. Augustyniak A., Cendrowski K., Grygorcewicz B., Jabłońska J., Nawrotek P., Trukawka M., Mijowska E., Popowska M.: The response of Pseudomonas aeruginosa PAO1 to UV-activated titanium dioxide/silica nanotubes. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020)
4. Azzolini M., Tosi E., Veneri G., Zapparoli G.: Evaluating the efficacy of lysozyme against lactic acid bacteria under different winemaking scenarios. *South African J. of Enol. Vitic.* **31** (2016)
5. Bağder Elmacı S., Gülgör G., Tokatlı M., Erten H., İşci A., Özçelik F.: Effectiveness of chitosan against wine-related microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **107**, 675–686 (2015)
6. Barnard H., Dooley A.N., Areshian G., Gasparyan B., Faull K.F.: Chemical evidence for wine production around 4000 BCE in the

Late Chalcolithic Near Eastern highlands. *J. Archaeol. Sci.* **38**, 977–984 (2011)
7. Bartowsky E.J., Costello P.J., Villa A., Henschke P.A.: The chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months' cellar storage. *Aust. J. Grape Wine Res.* **10**, 143–150 (2004)
8. Batiuk S.D.: The fruits of migration: Understanding the 'longue dureé' and the socio-economic relations of the Early Transcaucasian Culture. *J. Anthropol. Archaeol.* **32**, 449–477 (2013)
9. Behera S.S., Panda S.K.: Ethnic and industrial probiotic foods and beverages: efficacy and acceptance. *Curr. Opin. Food Sci.* **32**, 29–36 (2020)
10. Benito S.: The Management of Compounds that influence human health in modern winemaking from an HACCP point of view. *Fermentation* **5**, 33 (2019)
11. Berovic M., Berlot M., Kralj S., Makovec D.: A new method for the rapid separation of magnetized yeast in sparkling wine. *Biochem. Eng. J.* **88**, 77–84 (2014)
12. Bordet F., Joran A., Klein G., Roullier-Gall C., Alexandre H.: Yeast-yeast interactions: mechanisms, methodologies and impact on composition. *Microorganisms* **8**, 600 (2020)
13. Buja L.M.: The cell theory and cellular pathology: Discovery, refinements and applications fundamental to advances in biology and medicine. *Exp. Mol. Pathol.* **121**, 104660 (2021)
14. Buja L.M.: The history, science, and art of wine and the case for health benefits: perspectives of an oenophilic cardiovascular pathologist. *Cardiovasc. Pathol.* **60**, 107446 (2022)
15. Burello E., Worth A.P.: A theoretical framework for predicting the oxidative stress potential of oxide nanoparticles. *Nanotoxicol.* **5**, 228–235 (2011)
16. Campos F.M., Couto J.A., Hogg T.A.: Influence of phenolic acids on growth and inactivation of Oenococcus oeni and Lactobacillus hilgardii. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 167–174 (2003)
17. Capece A., Pietrafesa R., Siesto G., Romano P.: Biotechnological approach based on selected Saccharomyces cerevisiae starters for reducing the use of sulfur dioxide in wine. *Microorganisms* **8**, 738 (2020)
18. Carboni G., Fancello F., Zara G., Zara S., Ruiu L., Marova I., Pinna G., Budroni M., Mannazzu I.: Production of a lyophilized ready-to-use yeast killer toxin with possible applications in the wine and food industries. *Int. J. Food. Microbiol.* **335**, 108883 (2020)
19. Cavalieri D., Mcgovern P.E., Hartl D.L., Mortimer R., Polsinelli M.: Evidence for S. cerevisiae fermentation in ancient wine. *J. Mol. Evol.* **57**, 226–232 (2003)
20. Chagas R., Monteiro S., Boavida Ferreira R.: Assessment of potential effects of common fining agents used for white wine protein stabilization. *Am. J. Enol. Vitic.* **63**, 574–578 (2012)
21. Cheong Y.K., Calvo-Castro J., Ciric L., Edirisinghe M., Cloutman-Green E., Illangakoon U., Kang Q., Mahalingam S., Matharu R., Wilson R., Ren G.: Characterisation of the chemical composition and structural features of novel antimicrobial nanoparticles. *Nanomaterials* **7**, 1–16 (2017)
22. Colangelo D., Torchio F., de Faveri D.M., Lambri M.: The use of chitosan as alternative to bentonite for wine fining: Effects on heat-stability, proteins, organic acids, colour, and volatile compouds in an aromatic white wine. *Food Chem.* **264**, 301–309 (2018)
23. Comitini F., Capece A., Ciani M., Romano P.: New insights on the use of wine yeasts. *Curr. Opin. Food Sci.* **13**, 44–49 (2017)
24. Costa A., Barata A., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V.: Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiol.* **25**, 422–427 (2008)
25. Costanigro M., Appleby C., Menke S.D.: The wine headache: Consumer perceptions of sulfites and willingness to pay for non-sulfited wines. *Food Qual. Prefer.* **31**, 81–89 (2014)
26. Cravero M.C.: Organic and biodynamic wines quality and characteristics: A review. *Food Chem.* **295**, 334–340 (2019)
27. Delfini C., Cersosimo M., del Prete V., Strano M., Gaetano G., Pagliara A., Ambrò S.: Resistance screening essay of wine lactic acid bacteria on lysozyme: efficacy of lysozyme in unclarified grape musts. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1861–1866 (2004)
28. Dietler M.: Archaeologies of colonialism: consumption, entanglement, and violence in ancient Mediterranean France. Univ of California Press, 2010
29. Dietler M.: Alcohol: Anthropological/Archaeological Perspectives. *Annu. Rev. Anthropol.* **35**, 229–249 (2006)
30. Dobiášová Z., Pazourek J., Havel J.: Simultaneous determination oftrans-resveratrol and sorbic acid in wine by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **23**, 263–267 (2002)
31. Dodd E.: The archaeology of wine production in roman and pre-roman Italy. *Am. J. Archaeol.* **126**, 443–480 (2022)
32. Dušak P., Benčina M., Turk M., Bavčar D., Košmerl T., Berovič M., Makovec D.: Application of magneto-responsive Oenococcus oeni for the malolactic fermentation in wine. *Biochem. Eng. J.* **110,** 134–142 (2016)
33. Elieh-Ali-Komi D., Hamblin M.R.: Chitin and chitosan: Production and application of versatile biomedical nanomaterials. *Int. J. Adv. Res. (Indore)* **4**, 411–427 (2016)
34. Ferrer-Gallego R., Puxeu M., Martín L., Nart E., Hidalgo C., Andorrà I.: Microbiological, physical, and chemical procedures to elaborate high-quality SO_2-free wines. W: Grapes and Wines – Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization. InTech, 2018
35. Gal J.: The discovery of biological enantioselectivity: Louis Pasteur and the fermentation of tartaric acid, 1857 – A review and analysis 150 yr later. *Chirality* **20**, 5–19 (2008)
36. Gao Y.C., Zhang G., Krentz S., Darius S., Power J., Lagarde G.: Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation. *Aust. J. Grape. Wine Res.* **8**, 76–83 (2002)
37. Garde-Cerdán T., Souza-da Costa B., Rubio-Bretón P., Pérez--Álvarez E.P.: Nanotechnology: recent advances in viticulture and enology. *J. Sci. Food Agric.* **101**, 6156–6166 (2021)
38. Granchi L., Budroni M., Rauhut D., Zara G.: Wine Yeasts and Consumer Health. W: Yeasts in the Production of Wine. Springer, New York, 2019, s. 343–373
39. Guerrero R.F., Cantos-Villar E.: Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends Food Sci. Technol.* **42**, 27–43 (2015)
40. Harutyunyan M., Malfeito-Ferreira M.: The Rise of Wine among Ancient Civilizations across the Mediterranean Basin. *Heritage* **5**, 788–812 (2022)
41. Howe P.A., Worobo R., Sacks G.L.: Conventional measurements of sulfur dioxide (SO_2) in red wine overestimate SO_2 antimicrobial activity. *Am. J. Enol. Vitic.* **69**, 210–220 (2018)
42. Jabłońska J., Dubrowska K., Augustyniak A., Wróbel R.J., Piz M., Cendrowski K., Rakoczy R.: The influence of nanomaterials on pyocyanin production by Pseudomonas aeruginosa. *Appl. Nanosci. (Switzerland)* **12**, 1929–1940 (2022)
43. Kalkan Yıldırım H., Darıcı B.: Alternative methods of sulfur dioxide used in wine production. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **9**, 675–687 (2020)
44. Lemire J. a, Harrison J.J., Turner R.J.: Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **11** 371–384 (2013)
45. Liburdi K., Benucci I., Esti M.: Lysozyme in wine: an overview of current and future applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **13**, 1062–1073 (2014)

46. Lisanti M.T., Blaiotta G., Nioi C., Moio L.: Alternative methods to SO_2 for microbiological stabilization of wine. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **18**, 455–479 (2019)
47. Loira I., Morata A., Escott C., del Fresno J.M., Tesfaye W., Palomero F., Suárez-Lepe J.A.: Applications of nanotechnology in the winemaking process. *Eur. Food Res. Technol.* **246**, 1533–1541 (2020)
48. Mamlouk D., Gullo M.: Acetic Acid Bacteria: Physiology and carbon sources oxidation. *Indian J. Microbiol.* **53**, 377–384 (2013)
49. Mas A., Portillo M.C.: Strategies for microbiological control of the alcoholic fermentation in wines by exploiting the microbial terroir complexity: A mini-review. *Int. J. Food Microbiol.* **367**, 109592 (2022)
50. Maya B.Sadan., Eckert H., i wsp.: Springer handbook of nanomaterials. Springer, 2013
51. McGovern P.E.: Uncorking the past: the quest for wine, beer, and other alcoholic beverages. Univ. of California Press, 2009
52. McGovern P.E.: Ancient Wine. Princeton University Press, Princeton 2013
53. McGovern P.E., Glusker D.L., Exner L.J., Voigt M.M.: Neolithic resinated wine. *Nature* **381**, 480–481 (1996)
54. McGovern P.E., Luley B.P., Rovira N., Mirzoian A., Callahan M.P., Smith K.E., Hall G.R., Davidson T., Henkin J.M.: Beginning of viniculture in France. *PNAS* **110**, 10147–10152 (2013)
55. McGovern P.E., Mirzoian A., Hall G.R.: Ancient Egyptian herbal wines. *PNAS* **106**, 7361–7366 (2009)
56. McGovern P., Jalabadze M., Batiuk S., Callahan M.P., Smith K.E., Hall G.R., Kvavadze E., Maghradze D., Rusishvili N., Bouby L., Failla O., Cola G., Mariani L., Boaretto E., Bacilieri R., i wsp.: Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. *PNAS* **114**, E10309–E10318 (2017)
57. Mijowska K., Cendrowski K., Grygorcewicz B., Oszmiański J., Nawrotek P., Ochmian I., Zielińska B.: Preliminary study on the influence of UV-C irradiation on microorganism viability and polyphenol compounds content during winemaking of 'Regent' red grape cultivar. *Pol. J. Chem.Tech.* **19**, 130–137 (2017)
58. Nardi T.: Microbial resources as a tool for enhancing sustainability in winemaking. *Microorganisms* **8**, 507 (2020)
59. Nawrotek P., Augustyniak A.: Nanotechnologia w mikrobiologii – wybrane aspekty. *Post. Mikrobiol.* **3**, 275–282 (2015)
60. Nieto-Rojo R., Luquin A., Ancín-Azpilicueta C.: Improvement of wine aromatic quality using mixtures of lysozyme and dimethyl dicarbonate, with low SO_2 concentration. *Food Addit. Contam. A.* **2015**, 1–11, (2015)
61. Noble J., Sanchez I., Blondin B.: Identification of new Saccharomyces cerevisiae variants of the MET2 and SKP2 genes controlling the sulfur assimilation pathway and the production of undesirable sulfur compounds during alcoholic fermentation. *Microb. Cell Fact.* **14**, 68 (2015)
62. Onetto C.A., Costello P.J., Kolouchova R., Jordans C., McCarthy J., Schmidt S.A.: Analysis of transcriptomic response to SO_2 by Oenococcus oeni growing in continuous culture. *Microbiol. Spectr.* **9** (2021)
63. Pachnowska K., Cendrowski K., Stachurska X., Nawrotek P., Augustyniak A., Mijowska E.: Potential use of silica nanoparticles for the microbial stabilisation of wine: an in vitro study using oenococcus oeni as a model. *Foods* **9**, 1–16 (2020)
64. Padilla B., Gil J. v., Manzanares P.: Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. Front. Microbiol. **7** (2016)
65. Papadopoulou C., Soulti K., Roussis I.G.: Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans. *Food Technol. Biotechnol.* **43**, 41–46 (2005)
66. Pascal Ribéreau-Gayon, Denis Dubourdieu, Bernard Donèche, Aline Lonvaud: Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications. John Wiley & Sons, 2006
67. Patra J.K., Baek K.H.: Antibacterial activity and synergistic antibacterial potential of biosynthesized silver nanoparticles against foodborne pathogenic bacteria along with its anticandidal and antioxidant effects. *Front. Microbiol.* **8**, 1–14 (2017)
68. Peñas E., di Lorenzo C., Uberti F., Restani P.: Allergenic Proteins in Enology: A review on technological applications and safety aspects. *Molecules* **20**, 13144–13164 (2015)
69. Petrova P., Ivanov I., Tsigoriyna L., Valcheva N., Vasileva E., Parvanova-Mancheva T., Arsov A., Petrov K.: Traditional bulgarian dairy products: ethnic foods with health benefits. *Microorganisms* **9**, 480 (2021)
70. Pretorius I.S.: Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**, 675–729 (2000)
71. Quintela S., Villarán M.C., de Armentia I.L., Elejalde E.: Ochratoxin A removal from red wine by several oenological fining agents: bentonite, egg albumin, allergen-free adsorbents, chitin and chitosan. *Food Addit. Contam. A.* **29**, 1168–1174 (2012)
72. Renouf V., Strehaiano P., Lonvaud-Funel A.: Effectiveness of dimethlydicarbonate to prevent Brettanomyces bruxellensis growth in wine. *Food Control* **19**, 208–216 (2008)
73. Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A.: The Microbiology of Wine and Vinifications . W: Handbook of Enology. John Wiley & Sons Inc. Hoboken 2005
74. Rodríguez H., Curiel J.A., Landete J.M., de las Rivas B., de Felipe F.L., Gómez-Cordovés C., Mancheño J.M., Muñoz R.: Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **132**, 79–90 (2009)
75. Sacchi K.L., Visón L.F., Adams D.O.: A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **56**, 197–205 (2005)
76. Sagoo S., Board R., Roller S.: Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled pork products. *Food Microbiol.* **19**, 175–182 (2002)
77. Santos M.C., Nunes C., Saraiva J.A., Coimbra M.A.: Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 1–12 (2012)
78. Santos M.C., Nunes C., Saraiva J.A., Coimbra M.A.: Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 1–12 (2012)
79. Sikora P., Augustyniak A., Cendrowski K., Nawrotek P., Mijowska E.: Antimicrobial activity of Al_2O_3, CuO, Fe_3O_4, and ZnO nanoparticles in scope of their further application in cement-based building materials. *Nanomaterials* **8**, 212 (2018)
80. Silva P., Cardoso H., Gerós H.: Studies on the wine spoilage capacity of Brettanomyces/Dekkera spp. *Am. J. Enol. Vitic.* **55** (2004)
81. Silva V., Igrejas G., Falco V., Santos T.P., Torres C., Oliveira A.M.P., Pereira J.E., Amaral J.S., Poeta P.: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. *Food Control.* **92**, 516–522 (2018)
82. Simonin S., Roullier-Gall C., Ballester J., Schmitt-Kopplin P., Quintanilla-Casas B., Vichi S., Peyron D., Alexandre H., Tourdot-Maréchal R.: Bio-protection as an alternative to sulphites: impact on chemical and microbial characteristics of red wines. *Front. Microbiol.* **11** (2020)
83. Sonni F., Cejudo Bastante M.J., Chinnici F., Natali N., Riponi C.: Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of white wines. *J. Sci. Food Agric.* **89**, 688–696 (2009)

84. Staub C., Michel F., Bucher T., Siegrist M.: How do you perceive this wine? Comparing naturalness perceptions of Swiss and Australian consumers. *Food Qual. Prefer.* **79**, 103752 (2020)
85. Stead D.: The effect of hydroxycinnamic acids and potassium sorbate on the growth of 11 strains of spoilage yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 82–87 (1995)
86. Steels H., James S.A., Roberts I.N., Stratford M.: Sorbic acid resistance: the inoculum effect. *Yeast* **16**, 1173–1183 (2000)
87. Stivala M.G., Villecco M.B., Enriz D., Aredes Fernández P.: Effect of phenolic compounds on viability of wine spoilage lactic acid bacteria. A structure-activity relationship study. *Am. J. Enol. Vitic.* **68**, 228–233 (2017)
88. Suárez R., Suárez-Lepe J.A., Morata A., Calderón F.: The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera Brettanomyces and Dekkera: A review. *Food Chem.* **102**, 10–21 (2007)
89. Tedesco F., Siesto G., Pietrafesa R., Romano P., Salvia R., Scieuzo C., Falabella P., Capece A.: Chemical methods for microbiological control of winemaking: An overview of current and future applications. *Beverages* **8**, 58 (2022)
90. du Toit M., Pretorius I.S.: Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal – a review. *South African J. of Enol. Vitic.* **21** (2019)
91. du Toit W.J., Pretorius I.S., Lonvaud-Funel A.: The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of Acetobacter pasteurianus and a strain of Brettanomyces bruxellensis isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 862–871 (2005)
92. Valera M.J., Sainz F., Mas A., Torija M.J.: Effect of chitosan and SO_2 on viability of Acetobacter strains in wine. *Int. J. Food Microbiol.* **246**, 1–4 (2017)
93. Vestergaard M., Ingmer H.: Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. *Int. J. Antimicrob. Agents* **53**, 716–723 (2019)
94. Waterhouse A.L.: Wine Phenolics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **957**, 21–36 (2002)
95. Waterhouse A.L., Sacks G.L., Jeffery D.W.: Understanding Wine Chemistry. Wiley, 2016
96. Weber P., Kratzin H., Brockow K., Ring J., Steinhart H., Paschke A.: Lysozyme in wine: A risk evaluation for consumers allergic to hen's egg. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 1469–1477 (2009)
97. Xia E.Q., Deng G.F., Guo Y.J., Li H.B.: Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 622–646 (2010)
98. Zara G., Budroni M., Mannazzu I., Fancello F., Zara S.: Yeast biofilm in food realms: occurrence and control. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **36** 134 (2020)
99. Zara G., Nardi T.: Yeast metabolism and its exploitation in emerging winemaking trends: from sulfite tolerance to sulfite reduction. *Fermentation* **7**, 57 (2021)
100. Zuehlke J.M., Glawe D.A., Edwards C.G.: Efficacy of dimethyl dicarbonate against yeasts associated with washington state grapes and wines. *J. Food Process. Preserv.* **39**, 1016–1026 (2015)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2022, 61, 4, 247–259
DOI: 10.2478/am-2022-025

OPPORTUNISTIC PATHOGENS OF THE GENUS *CRYPTOCOCCUS* IN LOUIS PASTEUR DAYS AND IN 200TH ANNIVERSARY OF HIS BIRTH

Mariusz Dyląg

Department of Mycology and Genetics, Faculty of Biological Sciences, University of Wroclaw, Poland

Submitted in October, accepted in November 2022

Abstract: This year we are celebrating the 200th anniversary of the birth of Louis Pasteur, one of the fathers of microbiology. Interestingly, the time when Pasteur disproved the doctrine of „spontaneous generation" and announced the "germ theory of disease" coincides with the discovery of *Cryptococcus neoformans* and its role in cryptococcosis. Today, only in the realm of guesswork can remain the correct answer to the question „whether the observed parallelism of these events was accidental?" or „whether Pasteur's discoveries constituted a solid foundation of the research on the etiological factors of cryptococcosis?". Until recently, it might seem that all major virulence factors of pathogenic fungi of the *Cryptococcus* species complex have been thoroughly described. Meanwhile, the simultaneous publication in 2018 of three *in vitro* protocols for the induction of Titan cells, also known as giant cells, opened up new possibilities for research on the relatively uncharacterized virulence factor that is crucial for *Cryptococcus* spp. Research on the titanization process makes us realize how little we know about the virulence factors of these fungi, and how much more can be improved in the context of the treatment and prevention of cryptococcosis. The following review is not only a historical outline of research on *Cryptococcus* spp. and cryptococcosis, but also synthetically describes the virulence factors of these basidiomycetous yeasts, with particular emphasis on the titanization process. The phenomenon of titanization as a process of a specific morphological transformation, like Titan cells, are completely new terms in Polish literature, which will be introduced to readers here. We live in a post-antibiotic era where the lack of effective and non-toxic drugs affects patients all over the world. Specifically, the availability of only fluconazole, amphotericin B and flucytosine in therapy of cryptococcosis constitutes a significant limitation. For this reason, research on the virulence factors of *Cryptococcus* spp. will allow to find new effective antimycotics, including inhibitors of the titanization process.

1. Background. 2. History of research on *Cryptococcus* and cryptococcosis. 3. Cryptococcal virulence factors/determinants. 4. Morphological transformation as a strategy to averting the host immune attack. 5. Titan cells formation is unique for members of the *Cryptococcus* species complex. 6. Conclusions

OPORTUNISTYCZNE PATOGENY Z RODZAJU CRYPTOCOCCUS W CZASACH LUDWIKA PASTEUR'A I W DWUSETNĄ ROCZNICĘ JEGO URODZIN

Streszczenie: W bieżącym roku obchodzimy 200-setną rocznicę urodzin Ludwika Pasteur'a, jednego z ojców mikrobiologii. Od chwili obalenia przez niego „teorii samorództwa" i ogłoszenia „zarazkowej teorii chorób" upłynęło niemalże tyle samo czasu, co od odkrycia *Cryptococcus neoformans* i opisania jego roli w patogenezie kryptokokozy. Dziś w sferze domysłów może pozostawać właściwa odpowiedź na pytanie: Czy obserwowana równoległość zdarzeń była przypadkowa, czy może raczej odkrycia Pasteur'a stanowiły solidny fundament dla badań nad czynnikami etiologicznymi kryptokokozy? Do niedawna jeszcze mogło się wydawać, że wiemy już bardzo dużo o czynnikach wirulencji patogennych grzybów z kompleksu gatunków *Cryptococcus*. Tymczasem, równoczesna publikacja w 2018 roku trzech protokołów indukcji komórek Tytan *in vitro* ukazała nowe możliwości badań nad kluczowym dla *Cryptococcus* spp. czynnikiem wirulencji. Badania nad procesem tytanizacji uświadamiają nam jak mało jeszcze wiemy na temat czynników zjadliwości tych grzybów, a zarazem ile jeszcze można zrobić w kontekście leczenia i profilaktyki kryptokokozy. Niniejsza praca stanowi nie tylko rys historyczny badań nad *Cryptococcus* spp. i kryptokokozą, ale także w sposób syntetyczny opisuje czynniki wirulencji tych drożdży podstawkowych ze szczególnym uwzględnieniem procesu tytanizacji. Zjawisko tytanizacji jako proces swoistej transformacji morfologicznej, podobnie jak komórki Tytan są terminami zupełnie nowymi w literaturze polskiej, które na łamach niniejszej pracy zostaną przybliżone czytelnikom. Nie ulega wątpliwości, że żyjemy w erze post-antybiotykowej gdzie brak skutecznych i nietoksycznych leków dotyka pacjentów na całym świecie. Podobnie, dostępność w terapii kryptokokozy jedynie flukonazolu, amfoterycyny B i flucytozyny nie napawa optymizmem i stanowi znaczne ograniczenie. Z tego względu badania nad czynnikami wirulencji *Cryptococcus* spp. pozwolą znaleźć nowe skuteczne antymykotyki, w tym inhibitory procesu tytanizacji.

1. Wprowadzenie. 2. Historia badań nad grzybami z rodzaju *Cryptococcus* i kryptokokozą. 3. Czynniki/determinanty wirulencji *Cryptococcus*. 4. Transformacja morfologiczna jako strategia unikania odpowiedzi immunologicznej. 5. Komórki Tytan jako unikatowe dla gatunków z kompleksu *Cryptococcus*. 6. Wnioski

Słowa kluczowe: *Cryptococcus*, kryptokokoza, zarys historyczny, komórki tytan, proces tytanizacji, czynniki wirulencji
Keywords: *Cryptococcus*, cryptococcosis, historical outline, Titan cells, titanization process, virulence factors

* Corresponding author: Mariusz Dyląg, Department of Mycology and Genetics, Faculty of Biological Sciences, University of Wroclaw, Poland, ul. S. Przybyszewskiego 63, 51-148 Wrocław; phone +48 71 375 63 51; e-mail: mariusz.dylag@uwr.edu.pl

© 2022 Mariusz Dyląg
This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

1. Background

As this year we are celebrating the 200th anniversary of the birth of Louis Pasteur (www.pasteur2022.com), microbiologists probably wonder what was the state of knowledge about the subject of their studies during times of Pasteur. This question also arose in my mind, namely, what was known about the fungi of the genus *Cryptococcus* in Louis Pasteur days? Long before the role of bacteria as the etiological agents of diseases was described [104] and before the germ theory of diseases was announced by Louis Pasteur [102, 103, 105], the pathogenicity of fungi was noticed [117]. Just during this period, before Pasteur disproved the theory of spontaneous generation [103], and long before the definition of „infection" was formulated, Robert Remak made a significant discovery in 1837 demonstrating the presence of fungal hyphae in yellow cup-shaped crusts (scutula). Indeed the description of *Trichophyton schöenleinii* (then known as *Achorion schöenleinii*) initiated the development of modern medical mycology [117] and, most importantly, gave rise to the perception of microscopic fungi, and thus other microorganisms, as potential etiological agents of infectious diseases. It wasn't long before other etiological agents of infectious diseases were discovered. Soon after the discovery of Remak, in 1843, David Gruby, working in Paris, proved that *Microsporum audouinii* is the etiological agent of tinea microsporica [1]. In turn, in 1848 the Swedish microbiologist Pehr Henrik Malmsten isolated and described *Trichophyton tonsurans* as an etiological agent of tinea trichophytica [1], which was an extraordinary achievement in the pre-Pasteur period.

2. History of research on *Cryptococcus* and cryptococcosis

Slightly before the original descriptions of dermatophyte species appeared, the genus *Cryptococcus* was established and first described in 1833 by Kützing, who isolated this microorganism as saprophytic from a dirty window [74]. According to his assumption and later suggestions of Benham [6] and Vuillemin [133], this genus was to gather yeast-like fungi that did not produce hyphae, are not capable of undergoing ascospore formation and showing inability to ferment carbon sources. A year before Louis Pasteur's death and 10 years after announcing the Koch's postulates [1, 5], *Cryptococcus neoformans* was discovered as an etiological agent of cryptococcosis, a disease entity, which in many parts of the world more often leads to death in the group of HIV/AIDS patients than tuberculosis [101]. This yeast-like fungus was first isolated in 1894 by Busse [14, 15] and Buschke [13], from sarcoma-like lesion of the tibia from a 31-year-old woman and skin eruptions of the patient suspected of coccidioidomycosis, respectively. While it remains unclear whether these two scientists were aware of Koch's postulates and Pasteur's discoveries, it is apparent that Koch's postulates and Pasteur's assumptions were fully met by both researchers. Importantly, Busse and Buschke isolated the same etiological agent from the examined lesions, ultimately obtaining pure cultures of *C. neoformans*. It can be easily noticed that Koch`s postulates and Pasteur's assumptions were fully met by both researchers. In the same year Francesco Sanfelice isolated mentioned fungus as saprophytic microorganism from peach juice in Italy incorrectly classifying it as *Saccharomyces neoformans*, but species epithet „neoformans" is accepted till these days [115]. Later, in 1896 Sanfelice for the second time isolated this fungus from lymph node of a cattle indicating on its pathogenic nature [116]. All these findings did not escape the attention of Vuillemin, who transferred both *Cryptococcus hominis* and *S. neoformans*, respectively described by Busse and Sanfelice, to the genus *Cryptococcus*, which comprises significantly different species than members of the *Saccharomyces* genus – fermenting yeasts [133]. The first discoveries by Busse and Buschke and the later Sanfelice and Frothingham [41] allowed to establish that *C. neoformans* causes infection in both humans and animals. As it is currently known *C. neoformans* is not the only etiological agent of cryptococcosis. A year after descriptions of cryptococcosis by Busse and Buschke, Ferdinand Curtis postulated that *Cryptococcus gattii*, described then by him as *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens* may also be an etiological agent of this disease entity [24]. The first cases of cryptococcal meningitis, caused respectively by *C. neoformans* and *C. gattii,* were noticed in 1914 by Verse in a dead woman [129] and in 1970 by Gatti and Eeckels in a 7-year-old leukemic child in Republic of Congo [45]. The significant progress in immunology in the 20th century and the availability of new serological techniques allowed Evans in 1949 to distinguish 3 different serotypes in the pool of pathogenic strains of *Cryptococcus* spp., which were isolated from humans [35]. Nearly 20 years later, Ralph Vogel added serotype D to previously described by Evans serotypes A, B and C. The new serotype introduced by Vogel was detected by using the indirect fluorescent antibody test (IFA) [132]. A growing awareness among clinicians and the availability of new diagnostic tools led to an increase of the new strains of *Cryptococcus* spp. isolated from sick people and animals. In the second half of the twentieth century, the name *C. neoformans* had 40 synonyms [112] and only in 1989 Jack W. Fell proposed conserving the genus name as *Cryptococcus* Vuillemin [37]. Still in 2010, in the pages of the 5th edition of the extensive monograph "The yeasts:

a taxonomic study" [38], the genus *Cryptococcus* included 70 species of both pathogenic and nonpathogenic yeasts. In the clinical and practical context, the classification of strains isolated from humans and animals, based on determination of their serotype, was particularly important. Since the discovery of the teleomorphs *Filobasidiella neoformans* and *F. bacillispora* [64–66], serotypes A and D as well as B and C have been assigned to them, respectively [67, 71]. According to the newest nomenclature modifications and the recommendations established during the XVIII International Botanical Congress, (Melbourne, July 18–22, 2011) the species names of basidiomycetous yeasts have also undergone changes [55, 56]. In case of *F. bacillispora*, the initial change was to *C. bacillisporus*, then to *C. neoformans* var. *gattii*, and finally to *C. gattii* [68]. In turn, *F. neoformans* was changed to *C. neoformans*, for which two varieties came to be distinguished, namely *C. neoformans* var. *neoformans* (representing serotype D) and *C. neoformans* var. *grubii* (representing serotype A) [39]. Only strains representing serotype D were classified in the first varietas, and isolates of serotype A in the second [39]. The presence of four distinct serotypes (A, B, C, D) was also confirmed by Wilson in 1968 [135], who showed significant differences on the level of antigens present in polysaccharide capsule. Currently, based on advanced phylogenetic analyzes and studies at the level of genotypes and phenotypes, the *Cryptococcus* species complex includes seven haploid and four hybrid species [54]. Thus, there are currently two acceptable species within the *Cryptococcus neoformans* species complex: *C. neoformans* (serotype A) and *C. deneoformans* (serotype D). Strains that are hybrids of serotypes A and D – *Cryptococcus neoformans* × *Cryptococcus deneoformans* were also isolated from the natural environment. In turn, additional molecular characteristics of the strains currently included in the *Cryptococcus gattii* species complex revealed the existence of five separate species: *C. gattii*, *C. deuterogattii*, *C. decagattii* (all represent serotype B), *C. bacillisporus* and *C. tetragattii* (represent serotype C). The existence of three interspecific hybrids has also been demonstrated: *Cryptococcus neoformans* × *Cryptococcus gattii* (AB serotype), *Cryptococcus neoformans* × *Cryptococcus deuterogattii* (AB serotype) and *Cryptococcus deneoformans* × *Cryptococcus gattii* (DB serotype) [54]. All the mentioned species were isolated several times as aetiological agents of different disease entities in humans and animals. The nomenclature adopted in 2015 was the result of earlier efforts to systematize the naming of these pathogenic species. Earlier attempts to organize the terminology were based on the Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP [8]. There have also been attempts to introduce genotype nomenclature based on the Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP [84]. Both of these approaches provided a solid base to propose new solution by Hagen et al. [54]. Phylogenetic analyzes carried out in recent years shed new light on the proposed new systematics of the genus *Cryptococcus*. Based on four genes, namely *LAC*, *URA5*, *mtLrRNA* and *ITS*, it was estimated that the *C. neoformans* species complex split from the *C. gattii* species complex about 37 million years ago, and *C. neoformans* and *C. deneoformans* species evolved from a common ancestor approximately 18.5 million years ago. In turn, *C. gattii* and *C. bacillisporus* differentiated into separate species about 9.5 million years ago [138]. Recent calculations based on the analysis of the genomes suggest that the divergence between species of the *C. neoformans* and *Cryptococcus gattii* complexes could have occurred 80 to 100 million years ago [17]. Considering this finding, it is striking that the participation of individual species in causing various forms of cryptococcosis is unequal. Specifically, about 95% of cryptococcal infections are caused by strains of the species *C. neoformans* (serotype A), and the remaining 4% to 5% of infections are caused by *C. deneoformans* (serotype D) or strains of the *C. gattii* species complex (serotypes B and C) [81].

3. Cryptococcal virulence factors/determinants

Virulence/pathogenicity has been defined as the relative ability of a microorganism to enter, cause tissue damage, and proliferate in the host body. Mortality is a commonly used measure of virulence/pathogenicity in human populations [18, 106]. Most pathogenic microorganisms have several virulence factors that can damage the host's tissues, which determines the overall net virulence phenotype [82]. Members of the *Cryptococcus* species complex present a particularly rich spectrum of virulence factors (recently presented during the webinar organized by Polish Mycological Society [https://tinyurl.com/bdhhurrv]). Members of the *Cryptococcus* species complex are well known because they produce two virulence factors that significantly interfere with the host's immune system, namely the polysaccharide capsule and melanin. These factors not only effectively disrupt the functions of the immune system, but also protect against phagocytosis and reactive oxygen species (ROS) released by elements of the immune system [141].

The virulence factor of pathogenic *Cryptococcus* species that is of considerable clinical importance is the polysaccharide capsule [82]. The synthesis of the capsule material begins in the early stages of infection and is important to the development of the disease to such an extent that acapsular strains are avirulent in murine models of cryptococcosis [20]. The capsule provides resistance to stress factors such as dehydration,

to which fungal cells are particularly exposed in the natural environment [143]. During infection, the capsule helps to reduce the risk of phagocytosis and increases the chance of survival of engulfed cryptococci through several mechanisms. For instance, capsule impairs the recognition of fungal cell surface antigens by macrophages, contributing to the avoidance of phagocytosis [88]. Moreover, capsular polysaccharides have antioxidant properties, protecting fungal cells against the toxic effects of ROS produced during intracellular parasitism inside the phagolysosome [143]. Capsule enlargement can also confer resistance to antimicrobial peptides and amphotericin B, but increases susceptibility to fluconazole [34, 143]. Chemically capsule consists mainly of glucuronoxylomannan (GXM, approx. 90%), galactoxylomannan (GXMGal, 5–8%), and mannoproteins (~ 1%). Variation at the level of this structure and in the proportions of the individual components of the capsule changes its antigenic properties, which are the basis for distinguishing between serotypes [16, 135]. Fluctuations in the size of the polysaccharide capsule impact the chances of yeast cell survival inside the macrophages [98].

There are several factors which can induce capsule production *in vitro*, such as CO_2, iron and other nutrient deficiency, and contact with mammalian serum [34]. Quantitative and qualitative changes at the capsule level result in the formation of a very heterogeneous population of *Cryptococcus* cells, differing in epitope composition, which reduces the effectiveness of a normal immune response [44]. Moreover, the structure and composition of the capsule can undergo microevolution even during the *in vitro* conditions, thanks to which the microbial population is phenotypically and antigenically variable depending on the growth conditions of the culture [83]. It is well known that the increase in capsule density makes it less permeable to elements of the immune response, such as antibodies, the complement system or antimicrobial peptides [34]. Capsule growth in thickness and increase in its density can be induced by various environmental factors. The *in vitro* studies showed that polysaccharides contained in the capsule are not only bound to the cell wall, but also released into the culture medium (exopolysaccharides). During infection, they can be found in tissues, cerebrospinal fluid, and blood [40]. Exopolysaccharides promote disease development through multiple mechanisms. Both GXM and GXMGal induce apoptosis of immune cells by activating membrane FasL/Fas proteins leading to the formation of complexes (trimerization) which initiates apoptosis in helper lymphocytes [130]. The secreted exopolysaccharides may also disturb the production of antibodies, induce conditions of complement deficiency [142], inhibit leukocyte migration [33], reduce the penetration of immune cells across the blood-brain barrier [26], or stimulate the production of cytokines and chemokines [128]. Thus, the polysaccharide capsule protects *Cryptococcal* cells in various ways, both against specific and non-specific mechanisms of host immune system defense, as well as against many environmental physico-chemical factors.

Another virulence factor of key importance for members of *Cryptococcus* species complex is the accumulation of dark pigment melanin in the cell wall, which may also be released extracellularly [32]. Unlike some fungi which constitutively synthesize dihydroxynaphthalene (DHN) melanin, *Cryptococcus* spp. produces DOPA-melanin only under induction conditions, in the presence of exogenous substrates such as 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) and other di/polyphenol compounds such as epinephrine and norepinephrine [12]. It is commonly known that the concentration of catecholamines, including adrenaline and noradrenaline, which are well known neurotransmitters, is higher in the cerebrospinal fluid than in the blood. This explains the neurotropism manifested by the cells of pathogenic *Cryptococcus* spp. [34]. Melanin synthesis depends on the enzyme diphenol oxidase, encoded by two genes: *LAC1* and *LAC2*, but only *LAC1* is significantly expressed under most conditions and its deletion results in a reduction in virulence [107]. Notably, the ability to synthesize melanin, and the presence of polysaccharide capsule, is not restricted to members of pathogenic *Cryptococcus* species complex. The presence of these virulence factors even in saprophytic species indicates the importance of these natural defense mechanisms for functioning in a changing natural environment [109]. Melanin plays an important role in changing environmental conditions, i.e. it protects against enzymatic degradation by soil microorganisms (amoebas), UV and gamma radiation [19, 62], heavy metals, and high temperature [90]. Melanin along with the capsule is described as one of the most important virulence factors for members of the *Cryptococcus* species complex [69]. Mutants incapable of melanization show much lower virulence [72]. Melanin has been shown to play a key role in the spread of pathogen cells from the lungs to the CNS [91], and to influence the host cytokine production [28]. This natural pigment may also directly bind and reduce efficacy of selected antifungal drugs, as has been shown for amphotericin B [27]. Laccase enzymes are mainly responsible for the synthesis of melanin which interfere with the massive release of ROS from cells, in part through iron sequestration and oxidation during the infection [139]. Moreover, it has also been shown that enzyme proteins of the laccase group are not only involved in the synthesis of melanin, but also play a role in the process of non-lytic exocytosis, allowing fungal cells to escape from macrophages, which in fact resembles the process of vomocytosis [96].

Urease is yet another important virulence factor common to fungi of the genus *Cryptococcus*. Urease catalyzes the decomposition of urea into carbon dioxide and ammonia, what is also manifested by an increase in pH. Urease enables yeast cells to use urea as a sole nitrogen source [141]. During infection, urease alkalizes the internal environment of the phagolysosome, limiting damage caused by the macrophage, and prolonging intracellular parasitism [42]. Relatively recently, it was shown that urease also influences non-lytic macrophage exocytosis, known as the vomocytosis phenomenon [42]. Urease has been shown to be required for CNS colonization as it promotes the sequestration of yeast cells in the microcapillary vessels of the brain. It has also been hypothesized that ammonia promotes the adhesion of *C. neoformans* / *C. gattii* cells to the surface of vascular endothelial cells, either by increasing the expression of adhesins on the endothelium, or by a direct toxic effect on the integrity of the tight connections of the blood-brain barrier, which facilitates invasion into the CNS [97]. Thus, urease contributes to virulence by allowing the pathogen to survive and spread in macrophages and invade the CNS. Interestingly, inhibition of urease activity does not block the development of infection, as mutants deficient in urease activity are still pathogenic in animal models and disseminated infections in humans caused by urease negative strains have been described [127].

One of the most important virulence determinants which enables the development of infection in the mammalian body is the ability to grow and proliferate at 37°C. It is a feature common to all pathogenic species clustered in the *Cryptococcus* species complex, although it is also found in some saprophytic strains of the genus *Cryptococcus*. This ability is believed to have allowed the members of *Cryptococcus* species complex to evolve into successful human and animal pathogens (reviewed in) [29]. Several proteins important for high temperature tolerance have been characterized [123]. Proteins important for high temperature growth include manganese-containing mitochondrial superoxide dismutase, which plays an important role in the response to this type of stress [50]. The importance of trechalose, a sugar specifically synthesized in fungal cells, that protects against various types of stress, including heat, was also described. Components of the trehalose biosynthetic pathway have been shown to be required for high temperature growth and thus determine the virulence of pathogen cells [134]. Various signal transduction pathways also play a role in detecting and responding to heat stress. These include the calcineurin pathway [63, 92], MAP kinase pathways, including the protein kinase C (PKC) cell integrity signaling pathway [47] and the high-osmolarity glycerol (HOG) mitogen-activated protein kinase pathway [140] and the Ras signaling pathway [3]. The pathway with the best documented influence on the ability to grow in mammal body temperature is the calcineurin A pathway. *C. neoformans* mutants with a deletion of the *CNA1* gene (encoding calcineurin catalytic subunit) are not able to grow at temperatures above 35°C and are avirulent. Apart from the involvement of the calcineurin pathway in thermotolerance, this pathway participates in the response to other types of stress, and thus significantly influences the virulence [34].

An indispensable ability for the survival of yeast cells in the environment and in the host is the adaptation of the pathogen to the changing pH. It is commonly known that the transcription factor Rim101 is involved in the alkaline pH response and is the major protein involved in this adaptation [99]. This protein indirectly influences also virulence factors, such as polysaccharide capsule, and Titan cell formation, and impact the integrity of the cell wall [100].

Despite a general strategy to avoiding phagocytosis, *Cryptococcus* spp cells require macrophages to efficiently leave the lung environment and spread to other host organs, including crossing the blood-brain barrier and penetration into the CNS. This strategy, known as the Trojan horse tactic, allows the infection to spread effectively. It has been shown that fungal cells inside macrophages remain viable and replicate efficiently in the acidic environment of the phagolysosome [23]. It is therefore puzzling that, on the one hand, *Cryptococcus* spp cells have developed mechanisms to avoid phagocytosis, and on the other hand, proliferation inside macrophages promotes the infection into other organs. These apparently contradictory mechanisms are, in fact, two complementary strategies that account for the enormous plasticity of the pathogen's cells depending on the prevailing conditions. In the context of antiphagocytic activity, the App1 protein, discovered by the Luberto et al. [76], plays an important role. This protein was first identified in the serum of AIDS patients and it has been shown that its release effectively inhibits the macrophage phagocytosis process [76]. In turn, proliferation inside macrophage phagolysosomes and transition to the CNS may be considered profitable for the pathogen's cells. Supporting this view, is an evolutionary mechanism called vomocytosis that allows the fungal cells to leave the interior of macrophages without any negative effect on the pathogen and host cells. The mechanism of release from macrophages without damaging the host cells and thus without inducing inflammation, so far has been described only for members of the *Cryptococcus* species complex [77]. Vomocytosis, also called non-lytic exocytosis, is the fusion of the phagolysosome membrane with the macrophage plasma membrane, as a result of which the fungi are pushed out of the phagocyte. The urease catalyzes the hydrolysis of urea to form

ammonia, which raises the phagosomal pH [118]. The alkalization of the phagolysosome environment causes the yeast to enter a resting state in which intracellular replication is delayed. This prolongs the intracellular parasitism of cells and increases the probability that fungal cells will have time to move from the lungs to the CNS before the yeasts will be released in the latent phase in an environment unfavorable for them [42].

An interesting and relatively recently discovered virulence factor are tubular mitochondria, the presence of which has so far been described only in members of the *Cryptococcus gattii* species complex [11, 131]. Tubular mitochondria form as a result of fusion, in a reversable process. The presence of this type of mitochondria in a subset of the population leads to the so-called „division of labor" [131]. The formation of cells with this phenotype is stimulated by host ROS, which are released in large quantities. As a result, some cells in the population that developed tubular mitochondria stop proliferating and are directly involved in neutralizing oxidative stress, allowing the remaining cells to proliferate intensively. It is currently known that *C. deuterogattii* (R265) strain that emerged recently on Vancouver Island, Canada due to its ability to form tubular mitochondria is characterized by a particularly hypervirulent phenotype [78, 89]. This is supported by the fact that mitochondria can be the source of the rapid evolution of pathogen virulence as their genomes are present in high copy numbers and show a much higher mutation rate than nuclear DNA [53].

The relatively recently described extracellular vesicles (EVs) seem to play an important role in cryptococcosis. Cells of the genus *Cryptococcus* produce EVs with a diameter of 80 to 500 nm, which cross the cell wall and are released into the environment. It is considered that fungal EVs participate in many biological processes related to virulence including induction of antifungal resistance and biofilm formation or transfer of virulence-associated molecules and modulation of host immune cells [111]. It has been shown that EVs are directly involved in the transport of the main component of the polysaccharide capsule – glucuronoxylomannan (GXM), but also such lipids as glucosylceramide and some sterols. These vesicles are also observed in acapsular strains, which suggests that *Cryptococcus* spp. may use vesicular transport to secrete very different compounds. EVs are also released during the proliferation of cryptococcal cells inside macrophages, suggesting a role in pathogenesis [75]. This is confirmed by the fact that the glucosylceramide released in this way induces the production of anticryptococcal antibodies during human infection [113]. It is currently known that glucosylceramide regulates the virulence of *Cryptococcus* spp. cells and is essential for fungal growth at neutral/alkaline pH *in vitro* and *in vivo* [110].

It has been shown that most of the virulence factors described herein can be regulated by both environmental factors and host environment. This means that the expression of virulence factors may be different in the natural environment compared to the environment of the host. A change in the expression level of individual virulence factors may affect the host-pathogen interaction, the host immune response, and finally the susceptibility of the pathogen's cells to antifungal drugs [85].

4. Morphological transformation as a strategy to averting the host immune attack

Morphological transformation, called in some cases phenotype switching, is a reversible phenomenon that occurs both *in vitro* as *in vivo* in case of cultivable fungal species. It is defined as the spontaneous appearance of cells with altered morphology accompanied by a rate faster than that known for somatic mutations [59, 122]. Morphological transformation involves a series of changes at the cellular level, but is a reversible, controlled process, which distinguishes it from random changes caused by point mutations in the genome. For this reason, *in vivo* morphological transitions of the pathogen often impact the host-pathogen interaction diametrically. For instance, entirely different virulence factors are associated with blastoconidia than with other mycelial forms [59,60]. Fungi have developed multiple regulatory pathways that recognize several environmental changes in response to which they react by switching phenotypes. The environmental signals inducing phenotype switching include the presence of blood serum, changes in temperature, pH, concentration of CO_2 and specific micronutrients. Those signals can trigger a transformation of yeast cells into mycelia or vice versa, or lead to an increase in the thickness of the capsule and initiate titanization process [60, 145]. Thanks to the ability to respond to signals from the environment, pathogenic fungi can dynamically adapt to changing conditions both in the environment and in the infected host. It is well known that the ability to switch phenotypes is one of the mechanisms to avert the host immune response [52, 60]. Microorganisms must constantly adapt to changing environments. In clonal populations this can be achieved by generating diversity through phenotype switching [73].

The phenotype switching phenomenon was first described in *Candida albicans* almost 40 years ago [120, 121]. In many pathogenic fungi, the ability to alter cell morphology is an integral part of the infection cycle. Dimorphic fungi of the genera *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Paracoccidioides, Emergomyces*, *Sporothrix* and *Talaromyces marneffei* develop in the environment mycelial form, while in the host undergo transformation

into the yeast form, which allows dissemination [125]. *C. albicans* and *Candida dubliniensis*, on the other hand, under appropriate conditions, both *in vitro* and *in vivo*, can switch between yeast and mycelial form. In the case of *C. albicans* and *C. dubliniensis*, blastoconidia play an important role in the spread of the pathogen cells within body fluids, while mycelial form plays an important role at the stage of tissue and organ colonization [80]. The recently described Goliath cells represent another manifestation of the morphological transformation specific only to some *Candida* species. Goliath cells are formed primarily under zinc starvation conditions what is related with immune system's strategy of limiting the development of infection [79, 136]. Phylogenetic and phenotypic analyses showed that the cell enlargement as response to zinc starvation was species-specific and developed in the common ancestor of *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. tropicalis* and was not observed in other *Candida* species studied so far [2, 79]. It is well known that many other species of the genus *Candida* can form pseudohyphae, however these structures do not display the virulence characteristics known to true hyphae [119].

Some filamentous fungi also have an ability to induce a transformation that is not associated with changing the shape of the cell, but with a significant increase in size and in the thickness of the cell wall. [125]. One example are pathogens of the genus *Emmonsia* that cause adiaspiromycosis. In the lung tissue, the conidia (typically 2–4 μm in diameter) of some *Emmonsia* species grow in size, reaching a diameter of 40–500 μm and increasing in volume up to a million times [9] transforming into adiaspores. These structures are *de facto* non-endosporulating spherules. Species of the genus *Emmonsia* are phylogenetically closely related with *Coccidioides* but the last one has endosporulating spherules unique among fungal pathogens, which within the infected tissue can achieve 30–80 μm in diameter [58, 125].

5. Titan cells formation is unique for members of the *Cryptococcus* species complex

Pathogenic species of the genus *Cryptococcus* developed the richest spectrum of virulence factors which have contributed to their evolutionary success as pathogens [7, 29]. One of the key virulence factors is the ability to undergo morphological transformation into giant (Titan) cells. Some literature sources questioned that Titan cells are necessary for infection development as some clinical isolates of *C. neoformans* are presumably not capable of undergoing this morphological transition [25, 57, 124]. Such cells, due to their ten to twenty times larger volume, can effectively avoid macrophage phagocytosis. The unique phenotype of these cells consists not only of their size (diameter > 10 μm), but also significantly enlarged capsule, a thick layer of the cell wall, the presence of a large central vacuole and one polyploid nucleus [48, 94, 146]. Titan cells are not a final phenotype and are still capable of proliferation, producing both haploids, diploids and aneuploids daughter cells. In addition, Titan cells, as well as daughter cells, especially those with an aneuploid set of chromosomes, exhibit resistance to a number of physical and chemical factors [48]. The protocols for the induction of Titan cells in the presence of serum (10% or 5% fetal bovine serum, FBS), published simultaneously in 2018 [25, 124], make it possible to conduct large-scale *in vitro* studies on the titanization process. It has been shown that this ability to undergo such specific morphological transformation is unique for pathogenic yeasts of the *Cryptococcus* species complex [30]. It was confirmed then by two independent research centers that, as in the case of members of the *C. neoformans* species complex, species of the complex *C. gattii*, were able to form Titan cells, respectively according to commonly known *in vitro* serum protocol [31] and the newest protocol based on RPMI medium [114]. Moreover, recently it has been shown that strategies for titanization in case of members of *C. gattii* and *C. neoformans* species complexes are significantly different. While for *C. neoformans* typical is synchronous occurrence of cells enlargement and polyploidization, in the case of *C. gattii* we can observe delay in DNA endoreduplication and cell growth to around 30 μm as a haploid cell. Only after ~ 3 days incubation under titanization conditions DNA endoreduplication can be observed, which finally leads to uninucleate polyploid cells [114]. Moreover, this process was equally effective. At the same time, it has been shown that the incubation conditions provided according to the protocol described by Hommel [57] yield typical Titan cells only for members of the *C. neoformans* species complex [31]. None of the tested strains belonging to *C. gattii* species complex was able to form Titan cells under such conditions [31]. More recent studies allowed to identify the minimum conditions sufficient to induce Titan cell formation in case of all the members of *Cryptococcus* species complex. Thus, it has been shown that, contrary to the assumptions made so far, serum is not a necessary and irreplaceable factor inducing the titanization process. This formed the basis for the development of a new serum-independent Titan cell induction protocols [31, 114]. In addition to determining the minimum quantitative and qualitative composition of the medium conditioning the formation of giant cells, the key role of the slightly alkaline pH (7.2–7.3) of the liquid medium used in the induction of Titan cells formation has been demonstrated [31]. Moreover, it was showed that Titan cells can be formed under lower temperature than

typical for mammal body [30]. Such a new findings allow to conclude that the titanization process has been known to a limited extent only. It is commonly known, that formation of Titan cells allows averting the host immune attack [145] and it is likely a unique feature of human and animal fungal pathogens belonging to *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex [30]. Moreover, the ability to form enlarged polyploid Titan cells seems to be important for dissemination of cryptococcosis yet it remains poorly described [145].

The qualitative changes that occur at the cell surface as a result of titanization have also been described [4, 86]. *C. neoformans* population present in the patient's body is dominated by typical cells (5–7 μm in diameter) with a capsule consisting mainly of GXM and GalXM and a cell wall containing chitin, chitosan, α-glucan, melanin and β-glucan. In addition to typical blastoconidia, a significant percentage (~10–20%) may constitute Titan cells with a diameter above 10 μm, which show thickened cell wall resulting from the deposition of additional chitin layers at the expense of β-1,3-glucan [4]. Additionally, in the cell walls of Titan cells there is a more exposed mannan layer [86]. It is now known that the population of *C. neoformans* found in body fluids is much more diverse. The so-called microcells with diameter below 1 μm and having thickened cell walls [36] and the so-called titanides (2–4 μm in diameter) with an oval shape and thinner cell walls have been identified. Titanides are associated with the induction of Titan cells *in vitro*, but surprisingly have not yet been observed *in vivo* [25]. Undoubtedly, the differentiation of cell sizes in the population present in the infected organism significantly influences the host-pathogen interactions. Some studies suggest that cell size varies depending on where the infection is located. Cells taken from the lungs of mice had thicker capsules and were larger, while cells isolated from the brain were smaller with thinner capsules [21]. This organ-dependent variation in cell size of *Cryptococcus* spp. has been also reported in human infections [137]. Different cell sizes may be advantageous at various stages of infection. For example, smaller cells may aid in proliferation and survival in macrophages, while larger cells may facilitate pathogen survival in lung tissue under conditions of increased oxidative stress. It has been shown, inter alia, that during the infection, a significant proportion of the yeast in the lungs has a volume of up to 900 times greater than that of cells grown under standard laboratory conditions [144]. This hypothesis seems to be the most correct since the highest percentage of Titan cells and also those with the largest size have been found so far in lungs (up to 100 μm including the capsule) [94]. It has also been shown that these cells promote pathogenesis by reducing the rate of phagocytosis and increasing stress tolerance [48, 93]. In the context of pathogenesis, the faster rate of budding (~60 min/per bud) and a higher degree of melanization, demonstrated for Titan cells, also seem to be important [48]. It has also been shown that Titan cells grow from senescent cells and that the daughter cells they produce are of typical size [57].

It is currently known that the induction of titanization is mediated by Gpr5 and Ste3 G-protein coupled receptors which induce the protein kinase A cycle (cAMP/PKA) via the α subunit of Gpa1 [95]. Cyclic AMP also regulates the formation of polysaccharide capsule, in particular by acting on the ubiquitin-proteasome pathway [46]. It has been shown that adequate intracellular concentration of cAMP is required for titanization thus cells deficient in adenylate cyclase do not form Titan cells [25]. Carbon dioxide is also required to induce the titanization process. The carbonic anhydrase enzyme converts CO_2 into HCO_3^-, which activates adenylate cyclase [49], so a higher concentration of CO_2 (optimally 5%) induces cell growth via the cAMP pathway [124]. In the context of the information provided here, it is also worth noting that the appropriate concentration of HCO_3^- in the blood is extremely important for maintaining the proper pH [51]. The role of Titan cells in cryptococcosis has not been fully elucidated, but they have been shown to be involved in several processes that allow to evade the immune system and persist in the host organism for a long time. The number of Titan cells is especially high during asymptomatic infections, which led to the conclusion that this type of cells can survive in the host organism for a long time as a latent form without causing disease [144]. Titan cells cannot be phagocytosed due to their size. Interestingly, they are also able to confer resistance to phagocytosis to smaller, neighboring yeast cells, what may be caused by extracellular vesicles produced by the pathogen [34, 93]. Given how large their capsule is, it is also likely that the exopolysaccharide secreted may have a strong influence on the surrounding environment and phagocytic cells. The number of formed Titan cells is highly dependent on the host environment, and therefore the percentage of these cells observed *in vivo* can vary considerably, as shown in experimentally infected mice. In mice that develop a Th1-type immune response (interferon-γ and TNF-α dependent), the percentage of Titan cells is low (approximately 15%). In contrast, mice that induce a Th2-type response (related with interleukines 4, 5, 10, and 13) have a very high percentage of Titan cells, even above 50% of the total population of *Cryptococcus* spp. cells [43]. Currently, it is impossible to clearly explain this relationship, however, Th2-type immune response which is *de facto* anti-inflammatory response is associated with a less aggressive environment, which, unlike the environment generated by Th1 lymphocytes and the associated with them proinflammatory response, significantly favors the formation of Titan cells [34].

6. Conclusions

At the end of the 19th century, exactly 128 years ago, Busse and Buschke almost simultaneously described the first two cases of cryptococcosis [13–15]. Certainly no one assumed that at the end of the next century, this disease entity in many places around the world would collect a greater death toll than tuberculosis [101], which was one of the most significant health problems in the nineteenth century. Observations performed during the last two to three decades demonstrate that members of the *Cryptococcus* species complex cause infection in approximately 1 million people per year, with more than 600 thousand mortalities, contributing to death toll in one-third AIDS patients [101, 108]. In recent years, thanks to the antiretroviral therapy (ART) implemented in many countries, the number of deaths caused by cryptococcosis in the group of AIDS patients has started to decline [10,87]. For comparison, only in 2014 and 2020 on a global scale 223,100 and 152,000 people suffered from cryptococcosis of the central nervous system (CNS), of which 181,100 and 112,000 died, respectively [61, 108]. Currently, thanks to the increasingly better knowledge of the virulence factors of pathogenic fungi of the *Cryptococcus* species complex and thanks to the sequenced genomes of these fungi, there is a hope for more effective and less toxic anti-cryptococcal therapy. Furthermore, promising is also an ongoing intensive work on the anticryptococcal vaccine [22,126] and the cyclical International Conferences on *Cryptococcus* and Cryptococcosis (ICCC) every three years [70]. Future work to delineate a set of unsolved problems in the cryptococcal virulence factors field will provide fertile ground for future improvements of therapies against cryptococcosis. It is impossible not to notice that the real need for research on pathogenic fungi of the genus *Cryptococcus* and the disease entities caused by them means that from the day of discovering this life-threatening etiological agent we have to deal with a never ending story.

Acknowledgments

The author thank Lukasz Kozubowski (Clemson University, Clemson, SC, USA) for helpful comments on the manuscript and critical review.

References

1. Ainsworth G.C.: Introduction to the History of Mycology; Cambridge University Press, 1–246, (1976)
2. Alamir O.F., Oladele R.O., Ibe C.: Nutritional Immunity: Targeting Fungal Zinc Homeostasis. *Heliyon* **7**, e07805 (2021)
3. Alspaugh J.A., Cavallo L.M., Perfect J.R., Heitman J.: RAS1 Regulates filamentation, mating and growth at high temperature of Cryptococcus neoformans. *Mol. Microbiol.* **36**, 352–365 (2000)
4. Altamirano S., Li Z., Fu M.S., Ding M., Fulton S.R., Yoder J.M., Tran V., Nielsen K. The Cyclin Cln1 Controls Polyploid Titan Cell Formation Following a Stress-Induced G2 Arrest in Cryptococcus. *mBio* **12**, e02509-21 (2021)
5. Antonelli G., Cutler S.: Evolution of the Koch postulates: towards a 21st-century understanding of microbial infection. *Clin Microbiol Infect.* **22**, 583–584 (2016)
6. Benham R.W.: Cryptococci-Their Identification by Morphology and by Serology. *J. Infect. Dis.* **57**, 255–274 (1935)
7. Bielska E., May R.C.: What Makes Cryptococcus gattii a Pathogen? *FEMS Yeast Res.* **16**, fov106 (2016)
8. Boekhout T., Theelen B., Diaz M., Fell J.W., Hop W.C.J., Abeln E.C.A., Dromer F., Meyer W.: Hybrid Genotypes in the Pathogenic Yeast Cryptococcus neoformans. *Microbiology* **147**, 891–907 (2001)
9. Borman A.M., Simpson V.R., Palmer M.D., Linton C.J., Johnson E.M.: Adiaspiromycosis Due to Emmonsia crescens Is Widespread in Native British Mammals. *Mycopathologia* **168**, 153–163 (2009)
10. Boulware D.R., Meya D.B., Muzoora C., Rolfes M.A., Huppler Hullsiek K., Musubire A., Taseera K., Nabeta H.W., Schutz C., Williams D.A., Rajasingham R., Rhein J., Thienemann F., Lo M.W., Nielsen K., Bergemann T.L., Kambugu A., Manabe Y.C., Janoff E.N., Bohjanen P.R., Meintjes G.: Timing of Antiretroviral Therapy after Diagnosis of Cryptococcal Meningitis. *N. Engl. J. Med.* **370**, 2487–2498 (2014)
11. Bovers M., Hagen F., Kuramae E.E., Boekhout T.: Promiscuous Mitochondria in Cryptococcus gattii. *FEMS Yeast Res.* **9**, 489–503 (2009)
12. Brilhante R.S.N., Rocha M.G., Oliveira J.S., Pereira-Neto W.A., Guedes G.M., Cordeiro R., Sidrim J.J.C., Rocha M.F.G., Castelo-Branco D.: Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii Species Complex Melanized by Epinephrine: Increased Yeast Survival after Amphotericin B Exposure. *Microb. Pathog.* **143**, 104123 (2020)
13. Buschke A.: Uber Eine Durch Coccidien Hervergerufene Krankheit Des Menschen. *Dtsch. Med Wochenschr* **21**, 14 (1895)
14. Busse O.: Über Parasitare Zelleinschlusse Und Ihre Zuchtung. *Zentralbl Bakteriol* **16**, 175–180 (1894)
15. Busse O.: Über Saccharomycosis Hominis. *Virchows Arch. Path. Anat.* **140**, 23–46 (1895)
16. Casadevall A., Coelho C., Cordero R.J.B., Dragotakes Q., Jung E., Vij R., Wear M.P.: The Capsule of Cryptococcus neoformans. *Virulence* **10**, 822–831 (2019)
17. Casadevall A., Freij J.B., Hann-Soden C., Taylor J.: Continental Drift and Speciation of the Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii Species Complexes. *mSphere* **2**, e00103-17 (2017)
18. Casadevall A., Pirofski L.A.: Host-Pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. *Infect. Immun.* **67**, 3703–3713 (1999)
19. Casadevall A., Rosas A.L., Nosanchuk J.D.: Melanin and Virulence in Cryptococcus Neoformans. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 354–358 (2000)
20. Chang Y.C., Kwon-Chung K.J.: Complementation of a Capsule-Deficient Mutation of Cryptococcus neoformans Restores Its Virulence. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4912–4919 (1994)
21. Charlier C., Chrétien F., Baudrimont M., Mordelet E., Lortholary O., Dromer F.: Capsule Structure Changes Associated with Cryptococcus neoformans Crossing of the Blood-Brain Barrier. *Am. J. Pathol.* **166**, 421–432 (2005)
22. Chaturvedi A.K., Wormley F.L.: Methodology for Anti-Cryptococcal Vaccine Development BT – Vaccines for Invasive Fungal Infections: Methods and Protocols, Kalkum M., Semis M., (eds), Springer, New York 129–140 (2017)

23. Coelho C., Bocca A.L., Casadevall A.: The Intracellular Life of Cryptococcus neoformans. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **9**, 219–238 (2014)
24. Curtis F.: Contribution à l'étude de La Saccharomycose Humaine. *Ann. Inst. Pasteur* **10**, 20 (1896)
25. Dambuza I.M., Drake T., Chapuis A., Zhou X., Correia J., Taylor-Smith L., LeGrave N., Rasmussen T., Fisher M.C., Bicanic T., Harrison T.S., Jaspars M., May R.C., Brown G.D., Yuecel R., MacCallum D.M., Ballou E.R.: The Cryptococcus neoformans Titan Cell Is an Inducible and Regulated Morphotype Underlying Pathogenesis. *PLOS Pathog.* **14**, e1006978 (2018)
26. Denham S.T., Verma S., Reynolds R.C., Worne C.L., Daugherty J.M., Lane T.E., Brown J.C.S.: Regulated Release of Cryptococcal Polysaccharide Drives Virulence and Suppresses Immune Cell Infiltration into the Central Nervous System. *Infect. Immun.* **86**, e00662-17 (2018)
27. Duin D., Casadevall A., Nosanchuk J.D.: Melanization of Cryptococcus Neoformans and Histoplasma Capsulatum Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3394-3400 (2002)
28. Duin D., Casadevall A., Nosanchuk J.D.: Melanization of Cryptococcus neoformans Affects Lung Inflammatory Responses during Cryptococcal Infection. *Infect. Immun.* **73**, 2012–2019 (2005)
29. Dyląg M.: Etiological factors of cryptococcosis – what makes them pathogens ? *Med. Dosw. Mikrobiol.* **67**, 221–231 (2015)
30. Dyląg M., Colon-Reyes R.J., Kozubowski L.: Titan cell formation is unique to Cryptococcus species complex. *Virulence* **11**, 719–729 (2020)
31. Dyląg M., Colón-Reyes R.J., Loperena-Álvarez Y., Kozubowski L.: Establishing minimal conditions sufficient for the development of Titan-like cells in Cryptococcus neoformans/gattii species complex. *Pathogens* **11**, 768 (2022)
32. Eisenman H.C., Nosanchuk J.D., Webber J.B.W., Emerson R.J., Camesano T.A., Casadevall A.: Microstructure of Cell Wall-Associated Melanin in the Human Pathogenic Fungus Cryptococcus neoformans. *Biochemistry* **44**, 3683–3693 (2005)
33. Ellerbroek P.M., Hoepelman A.I., Wolbers F., Zwaginga J.J, Coenjaerts F.E.: Cryptococcal Glucuronoxylomannan Inhibits Adhesion of Neutrophils to Stimulated Endothelium In Vitro by Affecting Both Neutrophils and Endothelial Cells. *Infect. Immun.* **70**, 4762–4771 (2002)
34. Esher S.K., Zaragoza Ó., Alspaugh J.A.: Cryptococcal Pathogenic Mechanisms: A Dangerous Trip from the Environment to the Brain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **113**, e180057 (2018)
35. Evans E.E.: An Immunologic Comparison of Twelve Strains of Cryptococcus neoformans (Torula histolytica). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **71**, 644–646 (1949)
36. Feldmesser M., Kress Y., Casadevall A.: Dynamic Changes in the Morphology of Cryptococcus neoformans during Murine Pulmonary Infection. *Microbiology* **147**, 2355–2365 (2001)
37. Fell J.W., Kurtzman C.P., Kwon-Chung K.J.: Proposal to Conserve Cryptococcus (Fungi). *Taxon* **38**, 151–152 (1989)
38. Fonseca Á., Fell J.W., Boekhout T.: Cryptococcus Vuillemin. In The yeasts, a taxonomic study; Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T., (eds), Elsevier: Amsterdam 1665–1740 (2010)
39. Franzot S.P., Salkin I.F., Casadevall A.: Cryptococcus neoformans var. grubii: Separate Varietal Status for Cryptococcus neoformans Serotype A Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 838–840 (1999)
40. Frases S., Nimrichter L., Viana N.B., Nakouzi A., Casadevall A.: Cryptococcus neoformans Capsular Polysaccharide and Exopolysaccharide Fractions Manifest Physical, Chemical, and Antigenic Differences. *Eukaryot. Cell* **7**, 319–327 (2008)
41. Frothingham L.: A Tumor-like Lesion in the Lung of a Horse Caused by a Blastomyces (Torula). *J. Med. Res.* **8**, 31–43 (1902)
42. Fu M.S., Coelho C., De Leon-Rodriguez C.M., Rossi D.C.P., Camacho E., Jung E.H., Kulkarni M., Casadevall A.: Cryptococcus neoformans Urease Affects the Outcome of Intracellular Pathogenesis by Modulating Phagolysosomal PH. *PLOS Pathog.* **14**, e1007144 (2018)
43. García-Barbazán I., Trevijano-Contador N., Rueda C., de Andrés B., Pérez-Tavárez R., Herrero-Fernández I., Gaspar M.L., Zaragoza O.: The Formation of Titan Cells in Cryptococcus neoformans Depends on the Mouse Strain and Correlates with Induction of Th2-Type Responses. *Cell. Microbiol.* **18**, 111–124 (2016)
44. Garcia-Hermoso D., Dromer F., Janbon G.: Cryptococcus neoformans Capsule Structure Evolution In Vitro and during Murine Infection. *Infect. Immun.* **72**, 3359–3365 (2004)
45. Gatti F., Eeckels R.: An Atypical Strain. *Ann. Soc. belge Méd. trop* **50**, 689–694 (1970)
46. Geddes J.M.H., Caza D., Croll N., Stoynov L.J., Foster J.W., Kronstad J.: Analysis of the Protein Kinase A-Regulated Proteome of Cryptococcus neoformans Identifies a Role for the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Capsule Formation. *mBio* **7**, e01862-15 (2016)
47. Gerik K.J., Bhimireddy S.R., Ryerse J.S., Specht C.A., Lodge J.K.: PKC1 Is Essential for Protection against Both Oxidative and Nitrosative Stresses, Cell Integrity, and Normal Manifestation of Virulence Factors in the Pathogenic Fungus Cryptococcus neoformans. *Eukaryot. Cell* **7**, 1685–1698 (2008)
48. Gerstein A.C., Fu M.S., Mukaremera L., Li Z., Ormerod K.L., Fraser J.A., Berman J., Nielsen K.: Polyploid Titan Cells Produce Haploid and Aneuploid Progeny to Promote Stress Adaptation. *mBio* **6**, e01340–15 (2015)
49. Gewiss M.E., Guilhem J., James C., Clemens S., Shun F.M., Frédérique M., Torsten K., Jochen B.: Cryptococcus neoformans Senses CO2 through the Carbonic Anhydrase Can2 and the Adenylyl Cyclase Cac1. *Eukaryot. Cell* **5**, 103–111 (2006)
50. Giles S.S., Batinic-Haberle I., Perfect J.R., Cox G.M.: Cryptococcus neoformans Mitochondrial Superoxide Dismutase: An Essential Link between Antioxidant Function and High-Temperature Growth. *Eukaryot. Cell* **4**, 46–54 (2005)
51. Gomez H., Kellum J.A.: Understanding Acid Base Disorders. *Crit. Care Clin.* **31**, 849–860 (2015)
52. Guerrero A., Jain N., Goldman D.L., Fries B.C.: Phenotypic Switching in Cryptococcus neoformans. *Microbiology* **152**, 3–9 (2006)
53. Haag-Liautard C., Coffey N., Houle D., Lynch M., Charlesworth B., Keightley P.D.: Direct Estimation of the Mitochondrial DNA Mutation Rate in Drosophila Melanogaster. *PLOS Biol.* **6**, e204 (2008)
54. Hagen F., Khayhan K., Theelen B., Kolecka A., Polacheck I., Sionov E., Falk R., Parnmen S., Lumbsch H.T., Boekhout T.: Recognition of Seven Species in the Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans Species Complex. *Fungal Genet. Biol.* **78**, 16–48 (2015)
55. Hawksworth D.L.: A New Dawn for the Naming of Fungi: Impacts of Decisions Made in Melbourne in July 2011 on the Future Publication and Regulation of Fungal Names. *IMA Fungus* **2**, 155–162 (2011)
56. Hibbett D.S., Taylor J.W.: Fungal Systematics: Is a New Age of Enlightenment at Hand? *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 129–133 (2013)
57. Hommel B., Mukaremera L., Cordero R.J.B., Coelho C., Desjardins C.A., Sturny-Leclère A., Janbon G., Perfect J.R., Fraser J.A., Casadevall A., Cuomo C.A., Dromer F., Nielsen K., Alanio A.: Titan Cells Formation in Cryptococcus Neoformans Is Finely Tuned by Environmental Conditions and Modulated by Positive and Negative Genetic Regulators. *PLOS Pathog.* **14**, e1006982 (2018)

58. Hung C.Y., Xue J., Cole G.T.: Virulence Mechanisms of Coccidioides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1111**, 225–235 (2007)
59. Jain N., Guerrero A., Fries B.C.: Phenotypic Switching and Its Implications for the Pathogenesis of Cryptococcus neoformans. *FEMS Yeast Res.* **6**, 480–488 (2006)
60. Jain N., Hasan F., Fries B.C.: Phenotypic Switching in Fungi. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **2**, 180–188 (2008)
61. Kabir Z., Cunningham C.: The global burden of cryptococcosis-a neglected tropical disease? *Lancet Infect. Dis.* S1473-3099(22)00516-3 (2022)
62. Khajo A., Bryan R.A., Friedman M., Burger R.M., Levitsky Y., Casadevall A., Magliozzo R.S., Dadachova E.: Protection of Melanized Cryptococcus Neoformans from Lethal Dose Gamma Irradiation Involves Changes in Melanin's Chemical Structure and Paramagnetism. *PLoS One* **6**, e25092 (2011)
63. Kraus P.R., Heitman J.: Coping with Stress: Calmodulin and Calcineurin in Model and Pathogenic Fungi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 1151–1157 (2003)
64. Kwon-Chung K.J.: A New Genus, Filobasidiella, the Perfect State of Cryptococcus neoformans. *Mycologia* **67**, 1197–1200 (1975)
65. Kwon-Chung K.J.: A New Species of Filobasidiella, the Sexual State of Cryptococcus neoformans B and C Serotypes. *Mycologia* **68**, 942–946 (1976)
66. Kwon-Chung K.J.: Filobasidiella Kwon-Chung. In The yeast, a taxonomic Study; Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (eds) Elsevier: Amsterdam, 1443–1455 (2010)
67. Kwon-Chung K.J., Bennett J.E., Theodore T.S.: Cryptococcus bacillisporus sp. nov.: Serotype BC of Cryptococcus neoformans. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **28**, 616–620 (1978)
68. Kwon-Chung K.J., Boekhout T., Fell J.W., Diaz M.: Proposal to Conserve the Name Cryptococcus gattii against C. hondurianus and C. bacillisporus (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* **51**, 804–806 (2002)
69. Kwon-Chung K.J., Fraser J.A., Doering T.L., Wang Z., Janbon G., Idnurm A., Bahn Y.S.: Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, e019760 (2014)
70. Kwon-Chung K.J., Perfect J.R., Levitz S.M.: A Chronological History of the International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis (ICCC), an Invaluable Forum for Growth of the Cryptococcal Research Field and Clinical Practice. *Mycopathologia* **173**, 287–293 (2012)
71. Kwon-Chung K.J., Polacheck I., Bennett J.E. Improved Diagnostic Medium for Separation of Cryptococcus neoformans var. neoformans (Serotypes A and D) and Cryptococcus Neoformans Var. Gattii (Serotypes B and C). *J. Clin. Microbiol.* **15**, 535–537 (1982)
72. Kwon-Chung K.J., Polacheck I., Popkin T.J.: Melanin-Lacking Mutants of Cryptococcus Neoformans and Their Virulence for Mice. *J. Bacteriol.* **150**, 1414–1421 (1982)
73. Kussell E., Leibler S.: Phenotypic Diversity, Population Growth, and Information in Fluctuating Environments. *Science* **309**, 2075–2078 (2005)
74. Kützing F.: Systematische Zusammenstellung Der Niedern Algen-Gattungen Und Arten. *Linnaea* **8**, 365 (1833)
75. Lei Z., Keming Z., Hang L., Carolina C., Diego S.G., Shun F.M., Xinhua L., Young-Mo K., Wanqing L., Weihua P., Casadevall A.: Cryptococcus Neoformans-Infected Macrophages Release Proinflammatory Extracellular Vesicles: Insight into Their Components by Multi-Omics. *MBio* **12**, e00279-21 (2021)
76. Luberto C., Martinez-Mariño B., Taraskiewicz D., Bolaños B., Chitano P., Toffaletti D.L., Cox G.M., Perfect J.R., Hannun Y.A., Balish E., del Poeta M.: Identification of App1 as a Regulator of Phagocytosis and Virulence of Cryptococcus neoformans. *J. Clin. Invest.* **112**, 1080–1094 (2003)
77. Ma, H., Croudace J.E., Lammas D.A., May R.C.: Expulsion of Live Pathogenic Yeast by Macrophages. *Curr. Biol.* **16**, 2156–2160 (2006)
78. Ma H., Hagen F., Stekel D.J., Johnston S.A., Sionov E., Falk R., Polacheck I., Boekhout T., May R.C.: The Fatal Fungal Outbreak on Vancouver Island Is Characterized by Enhanced Intracellular Parasitism Driven by Mitochondrial Regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 12980–12985 (2009)
79. Malavia D., Lehtovirta-Morley L.E., Alamir O., Weiß E., Gow N.A.R., Hube B., Wilson D.: Zinc Limitation Induces a Hyper-Adherent Goliath Phenotype in Candida albicans. *Front Microbiol* **8**, e2238 (2017)
80. Mavor L.A., Thewes S., Hube B.: Systemic Fungal Infections Caused by Candida Species: Epidemiology, Infection Process and Virulence Attributes. *Current Drug Targets.* **6**, 863–874 (2005)
81. Maziarz E.K., Perfect J.R.: Cryptococcosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **30**, 179–206 (2016)
82. McClelland EE, Bernhardt P, Casadevall A.: Estimating the Relative Contributions of Virulence Factors for Pathogenic Microbes. *Infect. Immun.* **74**, 1500–1504 (2006)
83. McFadden D., Zaragoza O., Casadevall A.: The Capsular Dynamics of Cryptococcus neoformans. *Trends Microbiol.* **14**, 497–505 (2006)
84. Meyer W., Castañeda A., Jackson S., Huynh M., Castañeda E.: Molecular Typing of IberoAmerican Cryptococcus neoformans Isolates. *Emerg. Infect. Dis. J.* **9**, 189–195 (2003)
85. Momin M., Webb G.: The Environmental Effects on Virulence Factors and the Antifungal Susceptibility of Cryptococcus neoformans. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, e6302 (2021)
86. Mukaremera L., Lee K.K., Wagener J., Wiesner D.L., Gow N.A.R., Nielsen K.: Titan Cell Production in Cryptococcus neoformans Reshapes the Cell Wall and Capsule Composition during Infection. *Cell Surf.* **1**, 15–24 (2018)
87. Muzazu S.G.Y., Assefa D.G., Phiri C., Getinet T., Solomon S., Yismaw G., Manyazewal T.: Prevalence of Cryptococcal Meningitis among People Living with Human Immuno-Deficiency Virus and Predictors of Mortality in Adults on Induction Therapy in Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Medicine*. **9**, e989265 (2022)
88. Netski D., Kozel T.R.: Fc-Dependent and Fc-Independent Opsonization of Cryptococcus neoformans by Anticapsular Monoclonal Antibodies: Importance of Epitope Specificity. *Infect. Immun.* **70**, 2812–2819 (2002)
89. Ngamskulrungroj P., Price J., Sorrell T., Perfect J.R., Meyer W.: Cryptococcus gattii Virulence Composite: Candidate Genes Revealed by Microarray Analysis of High and Less Virulent Vancouver Island Outbreak Strains. *PLoS One* **6**, e16076 (2011)
90. Nosanchuk J.D., Casadevall A.: Impact of Melanin on Microbial Virulence and Clinical Resistance to Antimicrobial Compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3519–3528 (2006)
91. Noverr M.C., Williamson P.R., Fajardo R.S., Huffnagle G.B.: CNLAC1 Is Required for Extrapulmonary Dissemination of Cryptococcus neoformans but Not Pulmonary Persistence. *Infect. Immun.* **72**, 1693–1699 (2004)
92. Odom A., Muir S., Lim E., Toffaletti D.L., Perfect J., Heitman J.: Calcineurin Is Required for Virulence of Cryptococcus neoformans. *EMBO J.* **16**, 2576–2589 (1997)
93. Okagaki L.H., Nielsen K.: Titan Cells Confer Protection from Phagocytosis in Cryptococcus neoformans Infections. *Eukaryot. Cell* **11**, 820–826 (2012)
94. Okagaki L.H., Strain A.K., Nielsen J.N., Charlier C., Baltes N.J., Chrétien F., Heitman J., Dromer F., Nielsen K.: Cryptococcal Cell Morphology Affects Host Cell Interactions and Pathogenicity. *PLoS Pathogens* **6**, e1000953 (2010)

95. Okagaki L.H., Wang Y., Ballou E.R., O'Meara T.R., Bahn Y., Alspaugh J.A., Xue C., Nielsen K.: Cryptococcal Titan Cell Formation Is Regulated by G-Protein Signaling in Response to Multiple Stimuli. *Eukaryot. Cell* **10**, 1306–1316 (2011)
96. Oliveira F.S., de Sousa H.R., da Silva l.G., dos Santos J., Gorgonha K.C., de Oliveira G.P., Soares M.S., Silva-Pereira F.I., Casadevall A., Moraes N., Albuquerquea P.: Laccase Affects the Rate of Cryptococcus neoformans Nonlytic Exocytosis from Macrophages. *MBio* **11**, e02085-20 (2020)
97. Olszewski M.A., Noverr M.C., Chen G.H., Toews G.B., Cox G.M., Perfect J.R., Huffnagle G.B.: Urease Expression by Cryptococcus neoformans Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. *Am. J. Pathol.* **164**, 1761–1771 (2004)
98. O'Meara T.R., Alspaugh J.A.: The Cryptococcus neoformans Capsule: A Sword and a Shield. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 387–408 (2012)
99. O'Meara T.R., Norton D., Price M.S., Hay C., Clements M.F., Nichols C.B., Alspaugh J.A.: Interaction of Cryptococcus neoformans Rim101 and Protein Kinase A Regulates Capsule. *PLOS Pathog.* **6**, e1000776 (2010)
100. Ost K.S., O'Meara T.R., Huda N., Esher S.K., Alspaugh J.A.: The Cryptococcus neoformans Alkaline Response Pathway: Identification of a Novel Rim Pathway Activator. *PLOS Genet.* **11**, e1005159 (2015)
101. Park B.J., Wannemuehler K.A., Marston B.J., Govender N., Pappas P.G., Chiller T.M.: Estimation of the Current Global Burden of Cryptococcal Meningitis among Persons Living with HIV/AIDS. *AIDS* **23,** 525–530 (2009)
102. Pasteur L.: Memoire sur la fermentation alcoolique. *Ann. Chim. Phys.* **58**, 323–426 (1860)
103. Pasteur L.: Memoirs sur les corpuscles organises qui existent dans l'atmosphere. Examen de la doctrine des generations spontanees. *Ann. Sci. Nat.* **16**, 5–98 (1861)
104. Pasteur L.: Sur les maladies virulentes, et en particulier sur la maladie appelee vulgairement cholera des poules. *C.R. Acad. Sci.* **90**, 248–249 (1880)
105. Pasteur L.: Mémoire Sur La Fermentation Appelée Lactique (Extrait Par l'auteur). *Molecular Medicine* **1**, 599–601 (1995)
106. Poulin R., Combes C.: The Concept of Virulence: Interpretations and Implications. *Parasitol. Today* **15**, 474–475 (1999)
107. Pukkila-Worley R., Gerrald Q.D., Kraus P.R., Boily M.J., Davis M.J., Giles S.S., Cox G.M., Heitman J., Alspaugh J.A.: Transcriptional Network of Multiple Capsule and Melanin Genes Governed by the Cryptococcus neoformans Cyclic AMP Cascade. *Eukaryot. Cell* **4**, 190–201 (2005)
108. Rajasingham R., Smith R.M., Park B.J., Jarvis J.N., Govender N.P., Chiller T.M., Denning D.W., Loyse A., Boulware D.R.: Global Burden of Disease of HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: An Updated Analysis. *Lancet. Infect. Dis.* **17**, 873–881 (2017)
109. Reiko I., Takashi S.S., Takako S.: Laccase and Melanization in Clinically Important Cryptococcus Species Other than Cryptococcus neoformans. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1214–1218 (2002)
110. Rittershaus P.C., Kechichian T.B., Allegood J.C., Merrill A.H., Hennig M., Luberto C., Del Poeta M.: Glucosylceramide Synthase Is an Essential Regulator of Pathogenicity of Cryptococcus neoformans. *J. Clin. Invest.* **116**, 1651–1659 (2006)
111. Rizzo J., Wong S.S., Gazi A.D., Moyrand F., Chaze T., Commere P.H., Novault S., Matondo M., Péhau-Arnaudet G., Reis F.C.G., Vos M., Alves L.R., May R.C., Nimrichter L., Rodrigues M.L., Aimanianda V., Janbon G.: Cryptococcus Extracellular Vesicles Properties and Their Use as Vaccine Platforms. *J. Extracell. Vesicles* **10**, e12129 (2021)
112. Rodrigues M.L.: Genus 5.Cryptococcus Kutzing emend. Phaff et Spencer In: Kreger-van Rij NJW (ed) The yeasts: a taxonomic study, 3rd edn. Elsevier, Amsterdam, 845–872 (1984)
113. Rodrigues M.L., Travassos L.R., Miranda K.R., Franzen A.J., Rozental S., de Souza W., Alviano C.S., Barreto-Bergter E.: Human Antibodies against a Purified Glucosylceramide from Cryptococcus neoformans Inhibit Cell Budding and Fungal Growth. *Infect. Immun.* **68**, 7049–7060 (2000)
114. Saidykhan L., Correia J., Romanyuk A., Peacock A.F.A., Desanti G.E., Taylor-Smith L., Makarova M., Ballou E.R., May R.C.: An in Vitro Method for Inducing Titan Cells Reveals Novel Features of Yeast-to-Titan Switching in the Human Fungal Pathogen Cryptococcus gattii. *PLOS Pathog.* **18**, e1010321 (2022)
115. Sanfelice F.: Contributo Alla Morfologia e Biologia Dei Blastomiceti Che Si Sviluppano Nei Succhi Di Alcuni Frutti. *Ann Ig.* **4**, 463–495 (1894)
116. Sanfelice F.: Ueber Die Pathogene Wirkung Der Blastomyceten. *Zeitschrift für Hyg. und Infekt.* **22**, 171–200 (1896)
117. Seeliger H.P.R.: The Discovery of Achorion Schoenleinii: Facts and "Stories": Die Entdeckung Des Achorion Schoenleinii Tatsachen Und „Geschichten". *Mycoses* **28**, 161–182 (1985)
118. Seoane P.I., May R.C.: Vomocytosis: What We Know so Far. *Cell. Microbiol.* **22**, e13145 (2020)
119. Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D.W., Azeredo J.: Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: Biology, Epidemiology, Pathogenicity and Antifungal Resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 288–305 (2012)
120. Slutsky B., Buffo J., Soll D.R.: High-Frequency Switching of Colony Morphology in Candida albicans. *Science* **230**, 666–669 (1985)
121. Slutsky B., Staebell M., Anderson J., Risen L., Pfaller M., Soll D.R.: 'White-Opaque Transition': A Second High-Frequency Switching System in Candida albicans. *J. Bacteriol.* **169**, 189–197 (1987)
122. Soll D.R.: High-Frequency Switching in Candida albicans. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**, 183–203 (1992)
123. Stempinski P.R., Zielinski J.M., Dbouk N.H., Huey E.S., McCormack E.C., Rubin A.M., Chandrasekaran S., Kozubowski L.: Genetic Contribution to High Temperature Tolerance in Cryptococcus neoformans. *Genetics* **217**, 1–15 (2021)
124. Trevijano-Contador N., de Oliveira H.C., García-Rodas R., Rossi S.A., Llorente I., Zaballos Á., Janbon G., Ariño J., Zaragoza Ó.: Cryptococcus neoformans Can Form Titan-like Cells in Vitro in Response to Multiple Signals. *PLOS Pathog.* **14**, e1007007 (2018)
125. Van Dyke M.C.C., Teixeira M.M., Barker B.M.: Fantastic Yeasts and Where to Find Them: The Hidden Diversity of Dimorphic Fungal Pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* **52**, 55–63 (2019)
126. Van Dyke M.C., Wormley J.F.L.: A Call to Arms: Quest for a Cryptococcal Vaccine. *Trends Microbiol.* **26**, 436–446 (2018)
127. Varma A., Wu S., Guo N., Liao W., Lu G., Li A., Hu Y., Bulmer G., Kwon-Chung K.J.: Identification of a Novel Gene, URE2, That Functionally Complements a Urease-Negative Clinical Strain of Cryptococcus neoformans. *Microbiology* **152**, 3723–3731 (2006)
128. Vecchiarelli A., Pericolini E., Gabrielli E., Chow S.K., Bistoni F., Cenci E., Casadevall A.: Cryptococcus neoformans Galactoxylomannan Is a Potent Negative Immunomodulator, Inspiring New Approaches in Anti-Inflammatory Immunotherapy. *Immunotherapy* **3**, 997–1005 (2011)
129. Verse M.: Über Einen Full von General Isofierter Blastomycose Beim Menschen. *Dtsch. Pathol. Ges.* **17**, 275–278 (1914)
130. Villena S.N., Pinheiro R.O., Pinheiro C.S., Nunes M.P., Takiya C.M., DosReis G.A., Previato J.O., Mendonça-Previato L., Freire-de-Lima C.G.: Capsular Polysaccharides Galactoxy-

lomannan and Glucuronoxylomannan from Cryptococcus neoformans Induce Macrophage Apoptosis Mediated by Fas Ligand. *Cell. Microbiol.* **10**, 1274–1285 (2008)
131. Voelz K., Johnston S.A., Smith L.M., Hall R.A., Idnurm A., May R.C.: 'Division of Labour' in Response to Host Oxidative Burst Drives a Fatal Cryptococcus gattii Outbreak. *Nat. Commun.* **5**, 5194 (2014)
132. Vogel R.A. The Indirect Fluorescent Antibody Test for the Detection of Antibody in Human Cryptococcal Disease. *J. Infect. Dis.* **116**, 573–580 (1966)
133. Vuillemin P.: Les Blastomycètes Pathogènes. *Rev. Gen. Sci. Pures. Appl.* **12**, 732–751, (1901)
134. Wills E.P., Himmelreich U., Mylonakis E., Rude T., Toffaletti D., Cox G.M., Miller J.L., Perfect J.R.: Characterization and Regulation of the Trehalose Synthesis Pathway and Its Importance in the Pathogenicity of Cryptococcus neoformans. *Infect. Immun.* **74**, 5877–5887 (2006)
135. Wilson D.E., Bennett J.E., Bailey J.W.: Serologic Grouping of Cryptococcus neoformans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **127**, 820–823 (1968)
136. Wilson D.: The Role of Zinc in the Pathogenicity of Human Fungal Pathogens, chapter two. *Academic Press*, **117**, 35–61 (2021)
137. Xie S., Sao R., Braun A., Bottone E.J.: Difference in Cryptococcus neoformans Cellular and Capsule Size in Sequential Pulmonary and Meningeal Infection: A Postmortem Study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **73**, 49–52 (2012)
138. Xu J., Vilgalys R., Mitchell T.G.: Multiple Gene Genealogies Reveal Recent Dispersion and Hybridization in the Human Pathogenic Fungus Cryptococcus neoformans. *Mol. Ecol.* **9**, 1471–1481 (2000)
139. Xudong Z., Gibbons J., Garcia-Rivera J., Casadevall A., Williamson PR.: Laccase of Cryptococcus neoformans Is a Cell Wall-Associated Virulence Factor. *Infect. Immun.* **69**, 5589–5596 (2001)
140. Yong-Sun B., Scarlett G.B., Joseph H.: Ssk2 Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Governs Divergent Patterns of the Stress-Activated Hog1 Signaling Pathway in Cryptococcus neoformans. *Eukaryot. Cell* **6**, 2278–2289 (2007)
141. Zaragoza O.: Basic Principles of the Virulence of Cryptococcus. *Virulence* **10**, 490–501 (2019)
142. Zaragoza O., Casadevall A.: Monoclonal Antibodies Can Affect Complement Deposition on the Capsule of the Pathogenic Fungus Cryptococcus Neoformans by Both Classical Pathway Activation and Steric Hindrance. *Cell. Microbiol.* **8**, 1862–1876 (2006)
143. Zaragoza O., Chrisman C.J., Castelli M.V., Frases S., Cuenca-Estrella M., Rodríguez-Tudela J.L., Casadevall A.: Capsule Enlargement in Cryptococcus Neoformans Confers Resistance to Oxidative Stress Suggesting a Mechanism for Intracellular Survival. *Cell. Microbiol.* **10**, 2043–2057 (2008)
144. Zaragoza O., García-Rodas R., Nosanchuk J.D., Cuenca-Estrella M., Rodríguez-Tudela J.L., Casadevall A.: Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection. *PLoS Pathog.* **6**, e1000945 (2010)
145. Zaragoza O., Nielsen K.: Titan Cells in Cryptococcus Neoformans: Cells with a Giant Impact. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 409–413 (2013)
146. Zhou X., Ballou E. R.: The Cryptococcus Neoformans Titan Cell: From In Vivo Phenomenon to In Vitro Model. *Curr. Clin. Microbiol. Reports* **5**, 252–260 (2018)

SPIS TREŚCI

OD REDAKCJI 167

T. Saleem, M. Ishfaq, M. Faheem, S.B. Jamal – *Bdellovibrio bacteriovorus*: więcej niż bakteryjny drapieżnik 169
I.A. Cruz-Rodríguez, N.G. Rojas-Avelizapa, A.M. Rivas-Castillo – Mikrobiologicznie produkowane kwasy organiczne jako środki ługujące w procesach odzyskiwania metali 179
K. Jaworska, W. Staniszewska, P. Gomza, P. Rożen, K. Brzostek, A. Raczkowska – Oddziaływania pomiędzy małymi, regulatorowymi RNA a dwuskładnikowymi systemami transdukcji sygnału u bakterii Gram-ujemnych 191
D. Salamon, T. Jagielski – Różne oblicza sławnego odkrywcy Pamięci Ludwika Pasteura w 200. rocznicę urodzin 205
R. Jabłuszewski, A. Wyszyńska – Współczesne metody identyfikacji białkowych antygenów szczepionkowych 211
B. Tokarz-Deptuła, P. Dudziak, N. Gurgacz, W. Deptuła – Mikrobiom przewodu pokarmowego człowieka – wybrane dane 223
K. Pachnowska, A. Augustyniak, J. Karakulska – Dawne i współczesne metody stabilizacji wina 235
M. Dyląg – Oportunistyczne patogeny z rodzaju *Cryptococcus* w czasach Ludwika Pasteur'a i w dwusetną rocznicę jego urodzin 247

CONTENTS

EDITORIAL 167

T. Saleem, M. Ishfaq, M. Faheem, S.B. Jamal – *Bdellovibrio bacteriovorus*: more than just a bacterial hunter 169
I.A. Cruz-Rodríguez, N.G. Rojas-Avelizapa, A.M. Rivas-Castillo – Microbially-produced organic acids as leaching agents for metal recovery processes 179
K. Jaworska, W. Staniszewska, P. Gomza, P. Rożen, K. Brzostek, A. Raczkowska – Interactions between small regulatory RNAs and two-component signal transduction systems in Gram-negative bacteria 191
D. Salamon, T. Jagielski – Different faces of the famous discoverer In memory of Louis Pasteur on the 200th anniversary of his birthday 205
R. Jabłuszewski, A. Wyszyńska – Modern methods of identification of protein vaccine antigens .. 211
B. Tokarz-Deptuła, P. Dudziak, N. Gurgacz, W. Deptuła – The human gastrointestinal tract microbiome – selected data 223
K. Pachnowska, A. Augustyniak, J. Karakulska – Former and contemporary methods for wine stabilization 235
M. Dyląg – Opportunistic pathogens of the genus *Cryptococcus* in Louis Pasteur days and in 200th anniversary of his birth 247

Warunki prenumeraty

Zapytania o warunki prenumeraty oraz zamówienia proszę kierować do Wydawcy
Roma Walendzewicz
tel. 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com

Wpłaty należy dokonywać na rachunek bankowy
Bank BGŻ 57 2030 0045 1110 0000 0261 2550
Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
ul. Banacha 1 b, 02-097 Warszawa

Cena 1 zeszytu 48 zł + VAT 8%