

Kwartalnik

Tom 61

Zeszyt 2•2022

KWIECIEŃ – CZERWIEC

CODEN:

PMKMAV 61 (2)

2022

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advancements of Microbiology

Impact Factor = 0,947 (2020)

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:

Głony *Prototheca bovis* – pękające sporangium uwalniające dwie komórki potomne
Preparatyka: dr hab. Tomasz Jagielski, Zakład Mikrobiologii Medycznej, Instytut Mikrobiologii,
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
Image Copyright Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

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

ZAWIADOMIENIE O PRAKTYKACH PLAGIATOWYCH
ORAZ RETRAKCJI ARTYKUŁU

Redakcja *Postępów Mikrobiologii* z żalem informuje PT Czytelników, iż przesłany ostatnio do Redakcji artykuł pt. „Obecnie akceptowane i zalecane metody badania lekowrażliwości dermatofitów” autorstwa S. Gnat, M. Dyląg, D. Łagowski, A. Nowakiewicz został odrzucony na wstępie przez Redakcję i nie dopuszczony do dalszych etapów wydawniczych. Okazało się, że praca ta jest w dużej mierze plagiatem publikacji Dogra i wsp. zamieszczonej w 2019 r. w *Indian Dermatology Online Journal* 10, 225–233. Zarówno zachowanie układu rozdziałów, jak i tłumaczenia dużych fragmentów wzmiankowanej publikacji nosiły cechy plagiatu. Z kolei wydana już praca pt. „Mechanizmy powstawania oporności dermatofitów na substancje przeciwgrzybicze” autorstwa D. Łagowski, S. Gnat, A. Nowakiewicz, *Postępy Mikrobiologii* 2020, 59, 2, 153–165 ulega retrakcji ze względu na znamiona plagiatu. W publikacji tej znajdują się bardzo duże fragmenty publikacji przytoczone z innej, wcześniej wydanej publikacji Martinez-Rossi i wsp. 2018. *Dermatophyte resistance to antifungal drugs: mechanisms and prospectus*, *Frontiers in Microbiology* z 2018 r. (doi.org/10.3389/fmicb.2018.01108). Autorzy publika-

cji wydanej w *PM* przenieśli zarówno pomysł pracy jak i wspomniane obszerne elementy tekstu. Redakcja *Postępów Mikrobiologii* nie może pozostawać obojętna wobec takich praktyk.

Tłumaczenie naukowego dzieła lub artykułu z zagranicznej prasy nie stoi w kolizji z utworem pierwotnym. Jeśli jednak zostanie skopiowane i przetłumaczone, a następnie zaprezentowane jako twórczość własna – staje się plagiatem.

Dotychczas Redakcja brała za pewnik uczciwość naszych Autorów i podpisywana przez Autora korespondencyjnego deklaracja o oryginalności zgłaszanej pracy była wystarczającym zapewnieniem by rozpocząć proces recenzji pracy. Niestety czasy te minęły bezpowrotnie. Tym bardziej miło nam zakomunikować, że dzięki rozpoczętej w tym roku współpracy z domem wydawniczym Sciendo wdrożyliśmy do naszego procesu redakcyjnego program anty-plagiatowy iThenticate w celu zapewnienia, że publikowane materiały są oryginalnym i wartościowym źródłem wiedzy dla naszych Czytelników.

Redakcja

GRZYBY ENDOFITYCZNE W ROLI POTENCJALNYCH PRODUCENTÓW ZWIĄZKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH

Agnieszka Getinger-Panek*, Ilona Bednarek

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Wpłynęło w lutym, zaakceptowano w marcu 2022 r.

Streszczenie: Główną rolę w chemioterapii raka od ponad 50 lat, stanowią leki pochodzące w większości ze źródeł naturalnych. Przeciwko licznym dolegliwościom od stuleci rośliny służyły jako źródło związków bioaktywnych. Jednak to nie same rośliny, a mikroorganizmy z nimi związane oferują materiał i produkty o wysokim potencjale terapeutycznym. Endofity to organizmy, które kolonizują wewnętrzne tkanki roślin bez wywoływania objawów chorobowych. Stanowią endosymbiotyczną grupę drobnoustrojów, będących źródłem nowatorskich produktów naturalnych do wykorzystania we współczesnym przemyśle, rolnictwie oraz medycynie wykazując potencjalne właściwości terapeutyczne, w tym przeciwnowotworowe oraz przeciwdrobnoustrojowe, a także przeciwzapalne i antyoksydacyjne. Grzyby endofityczne stanowią bogate źródło bioaktywnych metabolitów, którymi można manipulować w celu uzyskania pożądanych, nowych analogów wykorzystywanych w chemioterapii, w tym: taksol, kamptotecyna, podofilotoksyna, winblastyna, winkrystyna, cytochalazyny i szereg innych. W tym przeglądzie podano przykłady produkcji związków przeciwnowotworowych przez grzyby endofityczne opublikowane od 2015 roku.

1. Wprowadzenie. 2. Endofity. 3. Związki o potencjale przeciwnowotworowym, syntetyzowane przez grzyby endofityczne. 4. Podsumowanie

ENDOPHYTIC FUNGI AS POTENTIAL PRODUCERS OF ANTICANCER COMPOUNDS

Abstract: Medicines derived mostly from natural sources have played a major role in cancer chemotherapy for over 50 years. Against numerous ailments, plants have served as a source of bioactive compounds for centuries. However, it is not the plants themselves, but the microorganisms associated with them that offer material and products with high therapeutic potential. Endophytes are organisms that colonize internal plant tissues without causing disease symptoms. They constitute an endosymbiotic group of microorganisms which are the source of innovative natural products for use in modern industry, agriculture and medicine, indicating potential therapeutic properties, including anti-cancer and antimicrobial, as well as anti-inflammatory and antioxidant properties. Endophytic fungi are a rich source of bioactive metabolites that can be manipulated to obtain to produce desirable the desired new analogs used in chemotherapy, including: taxol, camptothecin, podophyllotoxin, vinblastine, vincristine, cytochalasin and many others. This review gives provides examples of anti-cancer compound production by endophytic fungi published since 2015.

1. Introduction. 2. Endophytes. 3. Compounds with anticancer potential, synthesized by endophytic fungi. 4. Summary

Słowa kluczowe: grzyby endofityczne, grzybicze metabolity przeciwnowotworowe

Keywords: endophytic fungi, fungal anticancer metabolites

1. Wprowadzenie

Pomimo poprawy wskaźników przeżycia w ostatnich latach i postępów we wczesnym wykrywaniu i jakości dostępnego leczenia, nowotwory pozostają poważnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego w krajach na całym świecie [51, 57]. Przyczyną śmierci co szóstej osoby na świecie jest zdiagnozowana choroba nowotworowa, co czyni ją drugą wiodącą przyczyną śmierci (zaraz po chorobach sercowo-naczyniowych). Szacuje się, że w 2020 r. 10 mln osób zmarło z powodu różnych nowotworów. Ocenia się, że nowotwory staną się główną przyczyną zgonów i najważniejszą barierą

w zwiększaniu oczekiwanej długości życia w każdym kraju na świecie w XXI wieku. Ze statystyk globalnych zebranych w 2020 roku wynika, że najczęściej diagnozowanymi nowotworami na świecie były kobiece rak piersi (2,26 mln przypadków), rak płuc (2,21 mln) i rak prostaty (1,41 mln). Najczęstszymi przyczynami zgonów z powodu raka były płuca (1,79 miliona zgonów), wątroba (830 000) i rak żołądka (769 000) [33, 77]. Choroby nowotworowe stanowią narastający problem zdrowotny również polskiego społeczeństwa i są drugą po chorobach układu krążenia przyczyną zgonów w Polsce. W ciągu ostatnich 30 lat liczba nowych zachorowań na raka w Polsce podwoiła się. W 1980 roku

* Autor korespondencyjny: Mgr Agnieszka Getinger-Panek, Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-218, Sosnowiec; agetinger@sum.edu.pl

© 2022 Agnieszka Getinger-Panek & Ilona Bednarek

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

ogólna liczba zachorowań na raka wyniosła 64 820, podczas gdy w 2016 roku 164 140. Liczba zgonów z powodu nowotworów w Polsce również wzrasta, w ciągu ostatnich 50 lat aż 2,5-krotnie. Z dostępnych danych wynika, że w latach 1965 r. i 2016 r. ilość zgonów z powodu raka wyniosła odpowiednio 38 956 i 99 965 [73].

Obecnie obowiązujące standardy leczenia chorób nowotworowych często obejmują zabiegi chirurgiczne, radioterapię, po której zwykle następuje ogólnoustrojowa chemioterapia stosowana w leczeniu podtrzymującym. Głównymi wadami chemioterapii są nawroty raka dodatkowo powiązane z indukowaniem lekooporności komórek nowotworowych. Co istotne, często poważne działania niepożądane cytostatyków nie tylko mogą pogorszyć jakość życia pacjentów, ale przede wszystkim ograniczyć stosowanie wybranych leków przeciwnowotworowych. Niemniej jednak chemioterapia jest nadal jedną z najczęściej stosowanych metod leczenia wszystkich rodzajów nowotworów i na każdym etapie progresji raka [22, 72]. Prawie 80% obecnych leków przeciwnowotworowych pochodzi ze źródeł naturalnych. Odgrywają one główną rolę w chemioterapii raka od ponad 50 lat, zarówno pod względem dostarczania ustalonych leków i nowych związków do syntetycznej optymalizacji, jak i dostarczania substancji do badania komórkowych i molekularnych mechanizmów działania, mających znaczenie dla hamowania rozwoju nowotworu [15, 51, 72]. Szacuje się, że spośród 175 drobnocząsteczkowych leków przeciwnowotworowych stosowanych klinicznie i wykazujących znaczącą skuteczność w walce z rakiem, około 49% pochodzi z naturalnych produktów, których źródło stanowią rośliny, mikroorganizmy i organizmy morskie. Obecnie w chemioterapii nowotworów stosuje się następujące naturalne produkty pochodzenia drobnoustrojowego: aktynomycynę D, kilka pochodnych antracyklin, bleomycynę, aktynomycynę D, mitomycynę C i mitoksantron. Wykorzystuje się również środki pochodzenia roślin wyższych: alkaloidy bisindolowe, półsyntetyczne epipodofilotoksyny oraz taksony. W ostatnich latach na rynek wprowadzono także pierwsze małowcząsteczkowe środki przeciwnowotworowe pochodzenia morskiego, w tym trabektedynę [22, 49, 51]. Aktywność przeciwnowotworowa większości naturalnych produktów często działa poprzez regulację funkcji immunologicznej, indukowanie apoptozy lub autofagii, a także przez hamowanie proliferacji komórek [15]. W pracy przeglądowej podsumowano skuteczność różnych naturalnych leków przeciwnowotworowych w aspekcie ich zdolności do modulowania mikrośrodowiska raka i różnych kaskad sygnalizacji komórkowej. Zwrócono uwagę na aktywowanie i blokowanie przez związki pochodzenia naturalnego szlaków sygnalizacyjnych, w tym tych prowadzące do apoptozy i autofagii czy szlaków rozwoju embrionalnego (szlak Notch, szlak Wnt i szlak Hedgehog) [28].

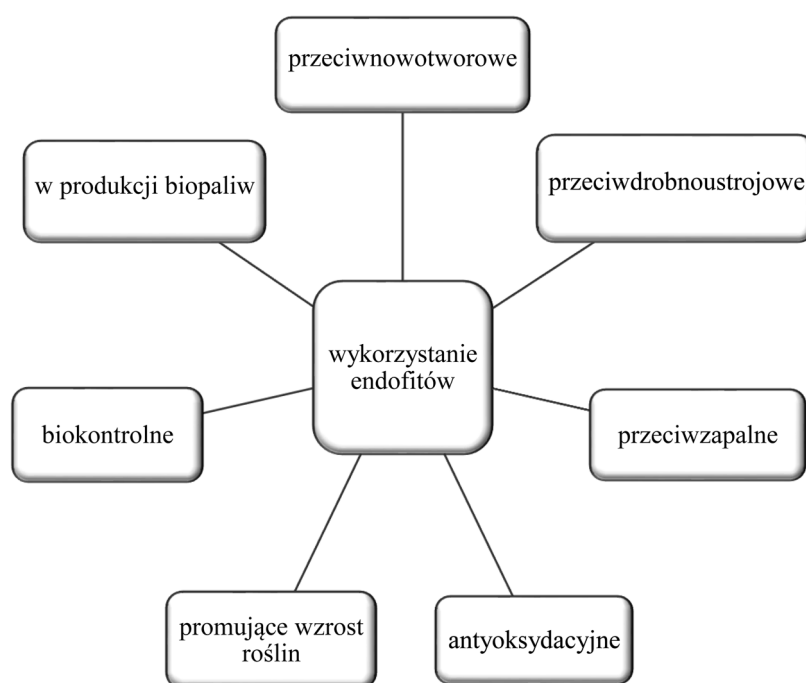
2. Endofity

Rośliny od stuleci służyły jako źródło związków bioaktywnych stosowanych przeciwko licznym dolegliwościom. W ostatnich latach okazało się, że często mikroorganizmy związane z roślinami, a nie same rośliny, dostarczają substancji o wysokim potencjale terapeutycznym. [5, 60]. Wszystkie rośliny są zamieszkiwane przez różnorodne społeczności mikroorganizmów obejmujące taksony bakteryjne, grzybowe, archeony i protista. Dla zdefiniowania tych zasiedlających rośliny ww. społeczności organizmów stosowane jest określenie: endofity. Przez lata definicja endofitów ulegała zmianie. Obecnie termin endofity odnosi się do mikroorganizmów, zarówno bakterii, jak i grzybów, które można wyizolować z powierzchniowo odkażonej tkanki roślinnej lub wyekstrahować z rośliny. Istotny dla definicji endofitów jest również zapis informujący, iż endofity kolonizują wewnętrzne tkanki roślin bez wywoływania objawów chorobowych czy negatywnego wpływu na swojego roślinnego gospodarza [39, 50].

Endofity są endosymbiotyczną grupą drobnoustrojów, działającą jako rezerwuary nowych, biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych, takich jak alkaloidy, kwasy fenolowe, chinony, steroidy, saponiny, garbniki i terpenoidy. Związki te wykazują potencjalne właściwości lecznicze, w tym przeciwnowotworowe oraz przeciwdrobnoustrojowe, a także przeciwzapalne i antyoksydacyjne [37, 75, 78]. Warto nadmienić, iż zauważono zwiększoną produkcję metabolitów wtórnych przez rośliny, u których obecne były drobnoustroje endofityczne [11, 70]. Związki produkowane przez mikroorganizmy endofityczne są wykorzystywane również w innych obszarach, niż medycyna. W rolnictwie, dzięki korzystnemu wpływowi na wzrost i rozwój roślin odgrywają ważną rolę w przetrwaniu roślin (modulowanie fotosyntezy, zwiększanie pobierania składników odżywczych, łagodzenie skutków różnych stresów) oraz biokontroli, poprzez syntezę związków wpływających na ochronę swoich gospodarzy roślinnych przed fitopatogenami [37, 75, 78]. Grzyby endofityczne znalazły również swoje zastosowanie w pozyskiwaniu źródeł energii odnawialnych, szczególnie biopaliw [64]. Potencjalne możliwości wykorzystania organizmów endofitycznych przedstawiono na rycinie 1.

Każda roślina jest gospodarzem jednego lub więcej gatunków endofitycznych grzybów. Mikroorganizmy te są różnorodnymi grupami parafiletycznymi i mogą rozwijać się bezobjawowo w różnych zdrowych tkankach żywych roślin nad i/lub pod ziemią, w tym w tkankach łodyg, liści, korzeni, kwiatów i owoców. Szacuje się, że w naturze występuje ponad milion endofitycznych gatunków grzybów [10, 44].

Substancje czynne izolowane z komórek/organizmów naturalnie występujących w środowisku stanowią



Ryc. 1. Potencjalne możliwości wykorzystania endofitów

ważne źródło dla opracowania nowych strategii terapeutycznych. Stosunkowo łatwy dostęp do organizmów środowiskowych, jak i ich ogromna bioróżnorodność jest cechą korzystną w poszukiwaniu nowych leków. W ostatnich latach zwiększyło się zainteresowanie organizmami endofitycznymi, ze względu na szereg związków bioaktywnych produkowanych przez nie, szczególnie w ujęciu ich potencjału terapeutycznego. Grzyby endofityczne stanowią bogate źródło bioaktywnych metabolitów, którymi można manipulować w celu uzyskania pożądaných, nowych analogów wykorzystywanych w chemioterapii [85].

Niniejsze opracowanie przedstawia zebrane informacje dotyczące związków o charakterze przeciwnowotworowym syntetyzowanych przez grzyby endofityczne, opublikowane w latach 2015–2021.

3. Związki o potencjale przeciwnowotworowym, syntetyzowane przez grzyby endofityczne

Spośród istotnych w aspekcie działania przeciwnowotworowego związków czynnych produkowanych przez grzyby endofityczne wymienia się: taksol, kampotecynę, podofilotoksynę, winblastynę i wynkrystynę oraz cytochalazyny.

3.1. Taksol

Wzrost zainteresowania poszukiwaniem związków przeciwnowotworowych wytwarzanych przez mikroorganizmy nastąpił po odkryciu taksolu [11]. Taksol (paklitaksel), to tetracykliczny diterpenoidowy związek

bioaktywny należący do klasy taksanów. Związek ten występuje w każdym gatunku cisu na świecie (*Taxus*), ale pierwotnie został wyizolowany z *Taxus brevifolia* (cis pacyficzny). Paklitaksel jest najskuteczniejszym i najczęściej stosowanym chemioterapeutykiem, wykorzystywanym w leczeniu raka sutka, płuca, jajników i raka szyjki macicy. Podstawowy mechanizm działania paklitakselu związany jest ze zdolnością do destabilizacji mikrotubul i zaburzania ich dynamicznej równowagi [23, 71]. Wykazano m.in. silną aktywność cytotoksyczną taksolu izolowanego z *Cladosporium oxysporum* wobec testowanych *in vitro* linii komórek ludzkiego raka HCT15 [35] oraz z izolatów grzyba *Grammothele lineata* wobec linii komórkowej HeLa [23].

Do wyleczenia około pięciuset pacjentów potrzebny jest 1 kg taksolu, do uzyskania którego wymagane jest 10 ton kory cisów, co odpowiada 300 drzewom [91]. Rosnące zapotrzebowanie na chemioterapeutyki i ograniczona podaż naturalnego taksolu ostatecznie podniosły koszt leku. Półsynteza z wykorzystaniem prekursorów taksoli nie jest w stanie zaspokoić globalnej podaży i zwiększyła potrzebę znalezienia innych możliwych sposobów produkcji taksolu [24]. Alternatywa wytwarzania taksolu pojawiła się wraz z odkryciem endofitycznych grzybów *Taxomyces andreanae*, wyizolowanych z gatunków *Taxus brevifolia*, których jednym z wytwarzanych metabolitów wtórnych był paklitaksel [86, 91]. W ostatnich kilku latach opublikowano szereg artykułów, w których wykazywano, że niski poziom taksolu można uzyskać z wielu izolowanych grzybów endofitycznych, nie tylko z gatunków *Taxus*, ale także z innych roślin (Tab. I).

Tabela I
Grzyby endofityczne produkujące taksol

Grzyb endofityczny	Gospodarz roślinny	Rok	Źródło
<i>Paraconiothyrium variabile</i> (SS1), <i>Epicoccum nigrum</i> (SS2)	<i>Taxus baccata</i>	2015	[79]
<i>Cladosporium oxysporum</i>	<i>Moringa oleifera</i>	2015	[36]
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Taxus wallichiana</i> var. <i>mairei</i>	2015	[96]
<i>Phoma</i> sp.	<i>Calotropis gigantea</i>	2015	[41]
<i>Paraconiothyrium variabile</i>	<i>Taxus baccata</i>	2016	[80]
<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Taxus baccata</i>	2017	[47]
<i>Grammothele lineata</i>	<i>Corchorus olitorius</i>	2017	[24]
<i>Aspergillus aculeatinus</i> Tax-6	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	2017	[69]
<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Taxus baccata</i>	2017	[97]
<i>Aspergillus fumigatus</i> TXD105	<i>Taxus distichum</i>	2017	[43]
<i>Aspergillus tenuissimus</i> TER995	<i>Taxus arjuna</i>		
<i>Epicoccum nigrum</i> (YEF 2)	<i>Taxus baccata</i>	2018	[74]
<i>Aspergillus fumigatus</i> (TPF-06)	<i>Taxus</i> sp.	2019	[52]
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Taxodium mucronatum</i>	2019	[81]
<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>Terminalia arjuna</i>	2019	[35]
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Zea mays</i>	2019	[29]
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Solanum nigrum</i>		
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Ocimum basilicum</i>		
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Erchharnia crassipes</i>		
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Ricinus communis</i>		
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Citrus xaurantium</i>		
<i>Epicoccum nigrum</i> TXB502	<i>Taxus baccata</i>	2020	[31]
<i>Penicillium polonicum</i> AUMC14487	<i>Ginkgo biloba</i>	2021	[2]
<i>Annulohypoxyylon</i> sp. MUS1	<i>Taxus wallichiana</i> Zucc.	2021	[34]

3.2. Kamptoteczyna

Kamptoteczyna (*camptothecin* – CPT) to pentacykliczny alkaloid pirochinolinowy, który po raz pierwszy wyizolowano z kory *Camptotheca acuminata* („chińskie szczęśliwe drzewo”) w 1966 r. [46, 85]. W latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku kamptoteczyna została zatwierdzona przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration* – FDA) do wstępnych badań klinicznych przeciwko rakowi okrężnicy, pomimo braku znajomości mechanizmu jej działania. Z uwagi na fakt, że kamptoteczyna powodowała poważne skutki niepożądane, takie jak zahamowanie czynności szpiku kostnego, wspomniane badania kliniczne zostały przerwane. W następnej dekadzie wykazano, iż aktywność przeciwnowotworowa kamptotecyny jest wynikiem hamowania przez nią topozomerazy I DNA. To odkrycie wzbudziło ponowne zainteresowanie CPT, jako lekiem i zaowocowało opracowaniem metody terapeutycznej z wykorzystaniem kamptotecyny [56, 87]. Poza CPT, rozpuszczalne w wodzie pochodne kamptotecyny – topotekan i irynotekan – zostały zatwierdzone przez FDA i są stosowane

w leczeniu różnych nowotworów, głównie jajnika, płuca i jelit. Niestety, ekstrakcja CPT z ograniczonych naturalnych zasobów roślinnych, nie zaspokaja rosnącego zapotrzebowania rynku na ten związek. Ze względu na niską zawartość kamptotecyny w roślinach (około 1 mg/g suchej masy), ponownie istotne staje się poszukiwanie alternatywnych źródeł i opracowanie nowych metod otrzymywania CPT do zastosowań klinicznych [46]. Pierwsze informacje o produkcji kamptotecyny przez grzyby endofityczne zanotowano w 2005 roku [67]. Od tego czasu zwiększyło się zainteresowanie wytwarzaniem CPT i jego pochodnych przez grzyby endofityczne. W literaturze można znaleźć informacje na temat skuteczności działania kamptotecyny produkowanej przez endofity względem różnych nowotworów. W badaniach *in vitro* potwierdzono np. wysoką cytotoksyczność kamptotecyny izolowanej z grzybów endofitycznych *Fusarium solani* ATLOY-8 względem linii komórkowej reprezentującej raka sutka – MCF-7 [20]. W przypadku kamptotecyny izolowanej z *Alternaria burnsii* cytotoksyczność potwierdzono względem pięciu niezależnych linii komórkowych: MCF7, SKOV3, H1299, HT29 i HEK293T, z których to linii każda

Tabela II
Grzyby endofityczne produkujące kamptotecynę

Grzyb endofityczny	Gospodarz roślinny	Rok	Źródło
<i>Fusarium oxysporum</i> NFX06	<i>Nothapodytes foetida</i>	2015	[59]
<i>Colletotrichum fruticola</i> SUK1 <i>Corynespora cassiicola</i> SUK2	<i>Nothapodytes nimmoniana</i>	2016	[14]
<i>Fusarium solani</i>	<i>Camptotheca acuminata</i>	2017	[70]
<i>Fusarium solani</i> ATLOY – 8	<i>Chonemorpha fragrans</i>	2020	[21]
<i>Meyerozyma</i> sp. OmF3 <i>Talaromyces</i> sp. OmF4	<i>Ophiorrhiza mungos</i>	2020	[8]
<i>Alternaria alstroemeriae</i> <i>Alternaria burnsii</i>	<i>Nothapodytes nimmoniana</i>	2021	[58]
<i>Phyllosticta elongata</i> MH458897	<i>Cipadessa baccifera</i>	2021	[27]
<i>Diaporthe caatingaensis</i> MT192326	<i>Buchanania axillaris</i>	2021	[26]
<i>Diaporthe</i> sp. F18	<i>Nothapodytes nimmoniana</i>	2021	[25]

reprezentuje inny nowotwór (odpowiednio: rak sutka, rak jajnika, rak płuca, rak jelita grubego) i immortalizowane embrionalne komórki nerki (linia HEK293T) [57]. Zestawienie danych literaturowych z przedstawionego zakresu tematycznego przedstawiono w tabeli II.

3.3. Podofilotoksyna

Podofilotoksyna (*podophyllotoxin* – PTOX) to naturalny środek leczniczy, należący do grupy lignanów, występujący w podofilinie, żywicy wytwarzanej przez rośliny z rodzaju *Podophyllum*. PTOX została po raz pierwszy wyizolowana w 1880 r. z północnoamerykańskiej rośliny *Podophyllum peltatum* L., zwanej potocznie amerykańską mandragorą lub majowym jabłkiem. Ten naturalny produkt został również wyizolowany z *Podophyllum emodi* (*Indian podophyllum*) [6]. Mechanizm działania podofilotoksyny związany jest z hamowaniem polimeryzacji tubuliny. Podofilotoksyna przyłącza się do tubuliny w domenie kolchicyny, co wpływa hamująco na tworzenie się mikrotubul i powoduje zablokowanie cyklu komórkowego w metafazie. Podofilotoksyna nie jest klinicznie użytecznym lekiem przeciwnowotworowym ze względu na wysoką tok-

syczność. Półsyntetyczne pochodne PTOX, takie jak etopozyd, tenipozyd i etopofos są natomiast wykorzystywane w leczeniu wielu rodzajów nowotworów, w tym raka szyjki macicy i raka sutka. Wymienione pochodne hamują aktywność topoizomerazy II, która jest niezbędna do replikacji DNA i podziału komórek [7, 98, 100]. Z powodu nadmiernej ekstrakcji i powolnego wzrostu rośliny *Podophyllum* zalicza się do zagrożonych gatunków roślin. W związku z powyższym, w celu utrzymania stałego zaopatrzenia w podofilotoksyny do wytwarzania cząsteczek przeciwnowotworowych, istnieje pilna potrzeba poszukiwania alternatywnych źródeł do izolacji tego chemioterapeutyku. Wśród dostępnych organizmów badano grzyby endofityczne pod kątem ich potencjału do produkcji podofilotoksyny. He i wsp. określali wpływ podofilotoksyny będącej metabolitem wtórnym grzybów endofitycznych izolowanych z *Ginko biloba* względem komórek raka szyjki macicy – linii HeLa. Efektem przeprowadzonych badań było wyraźne hamowanie proliferacji komórek HeLa, sprzyjanie ich apoptozie i blokowanie ich migracji [39]. Zdolność produkcji podofilotoksyny potwierdzono dla innych gatunków grzybów endofitycznych. Zestawienie danych źródłowych z tego zakresu przedstawiono w tabeli III.

Tabela III
Grzyby endofityczne produkujące podofilotoksynę

Grzyb endofityczny	Gospodarz roślinny	Rok	Źródło
<i>Phialocephala podophylli</i>	<i>Podophyllum peltatum</i>	2015	[7]
<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Sinopodophyllum emodi</i> (Wall.) Ying	2016	[53]
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	2017	[89]
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Dysosma versipellis</i>	2018	[82]
<i>Chaetomium globosum</i> MF564 <i>Chaetomium</i> sp. 4RF3 <i>Pseudallescheria</i> sp. T55	<i>Ginko biloba</i>	2020	[40]

Tabela IV
Grzyby endofityczne produkujące winblastynę

Grzyb endofityczny	Gospodarz roślinny	Rok	Źródło
<i>Talaromyces radicus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	2016	[62]
<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	2017	[9]
<i>Chaetomium globosum</i> Cr95	<i>Catharanthus roseus</i>	2019	[95]
<i>Curvularia verruculosa</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	2020	[63]
<i>Botryosphaeria larinica</i> CRS1	<i>Catharanthus roseus</i>	2020	[12]
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Melissa officinalis</i>	2021	[30]

Tabela V
Grzyby endofityczne produkujące winkrystynę

Grzyb endofityczny	Gospodarz roślinny	Rok	Źródło
<i>Talaromyces radicus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	2016	[62]
<i>Botryosphaeria larinica</i> CRS1	<i>Catharanthus roseus</i>	2020	[12]

3.4. Winblastyna i winkrystyna

Winblastyna (*vinblastine* – VBL) i winkrystyna (*vincristine* – VCR) należą do terpenoidowych alkaloidów indolowych (*terpenoid indole alkaloid* – TIA) izolowanych z *Catharanthus roseus* L., (barwinek różowy) rośliny o silnym znaczeniu leczniczym, należącej do rodziny *Apocynaceae* [3]. Winblastyna i winkrystyna są ważnymi środkami przeciwnowotworowymi, które są wytwarzane przez dimeryzację alkaloidów pochodzenia roślinnego, katarantyny i windoliny [17]. Ich odkrycie zdefiniowało ważny mechanizm działania przeciwnowotworowego, (obecnie uważanego za najbardziej skuteczny w onkologii), obejmujący hamowanie mitozy poprzez wiązanie tubuliny i hamowanie polimeryzacji mikrotubul. Głównym mechanizmem działania winkrystyny jest wpływ na układ mikrotubularny i na dynamikę powstawania wrzeciona mitotycznego. Formuła winkrystyny ułatwia wiązanie białka tubuliny i zapobiega separacji chromosomów w momencie metafazy, ostatecznie prowadząc do śmierci komórki. W mechanizmie działania przeciwnowotworowego winkrystyny ważne jest również zaburzenie transportu wewnątrzkomórkowego i zmniejszenie przepływu krwi przez tkankę nowotworową, prawdopodobnie z powodu hamowania angiogenezy [4, 18, 38].

Winblastyna jest stosowana w leczeniu ziarnicy złośliwej (choroby Hodgkina), chłoniaków nieziarniczych, raka jąder, raka sutka, płuca i innych typów nowotworów. Winkrystyna natomiast znalazła swoje zastosowanie w terapii ostrej białaczki limfoblastycznej, w leczeniu ziarnicy złośliwej, chłoniaków nieziarniczych, mięsaków i wielu innych rodzajów nowotworów oraz niezłośliwych zaburzeń hematologicznych [13, 18, 38]. Duże znaczenie farmakologiczne omawianych alkaloidów indolowych kontrastuje z ich niewielką

zawartością w roślinie (około 0,0005%). Ze względu na znaczenie, wysoką cenę i niewielkie ilości alkaloidów w *Catharanthus roseus* próby zwiększenia produkcji tych związków doprowadziły do szeroko zakrojonych badań nad tą rośliną. Kładzie się również nacisk na potrzebę izolacji różnorodnych nisz endofitów z barwinka różowego, celem zwiększenia możliwości pozyskiwania terpenoidowych alkaloidów indolowych o działaniu przeciwnowotworowym [48, 99]. Efektem przeprowadzonych badań *in vitro* było wykazanie działania cytotoksycznego winkrystyny i winblastyny produkowanych przez grzyby endofityczne, w tym *Nigrospora sphaerica* względem linii komórkowej raka sutka MDA-MB 231 [9] oraz *Alternaria alternata* względem linii komórkowych MCF-7 i HepG-2, reprezentujących kolejno: raka sutka i pierwotnego raka wątroby [29]. Literaturowe doniesienia ostatnich lat dotyczące grzybów endofitycznych wytwarzających winblastynę i winkrystynę oraz odpowiadające im rośliny żywicielskie zebrano w tabelach IV oraz V.

3.5. Cytochalazyny

Cytochalazyny są częścią dużej grupy metabolitów zwanych cytochalazami i zawierają różnorodne struktury hybrydowe poliketydowo-aminokwasowe o szerokim zakresie charakterystycznych funkcji biologicznych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, przeciwpasożytniczym, przeciwwirusowym i przeciwnowotworowym [32]. Związki te stanowią wtórne metabolity grzybów i jak wykazano w ponad trzech tysiącach publikacji (dane z bazy NCBI PubMed), wywierają one różny wpływ na komórki zdrowe i nowotworowe. Cytochalazyny są toksynami mikogennymi, które wiążą aktynę, blokując w ten sposób polimeryzację. W konsekwencji tworzenie mikrowłókien jest znacznie zahamowane,

Tabela VI
Grzyby endofityczne produkujące cytochalazyny o działaniu przeciwnowotworowym

Grzyb endofityczny	Gospodarz roślinny	Rok	Źródło
<i>Phoma multirostrata</i> EA-12	<i>Eupatorium adenophorum</i>	2015	[20]
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Cola nitida</i>	2015	[19]
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Garcinia kola</i>	2016	[45]
<i>Diaporthe phaseolorum</i> 92C	<i>Combretum lanceolatum</i>	2017	[16]
<i>Phomopsis</i> sp.	Namorzynny w Zhanjiang (Chiny)	2018	[55]
<i>Rosellinia sanctae-cruciana</i>	<i>Albizia lebbbeck</i>	2018	[76]
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Pinellia ternata</i>	2019	[92]
<i>Xylaria</i> cf. <i>curta</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	2019	[90]
<i>Phoma multirostrata</i> XJ-2-1	<i>Parasenecio albus</i>	2020	[65]
<i>Chaetomium globosum</i> P2-2-2	<i>Ptychomitrium</i>	2020	[66]
<i>Diaporthe</i> sp. SC-J0138	<i>Cyclosorus parasiticus</i>	2020	[93]
<i>Aspergillus flavipes</i> KIB-392	<i>Hevea brasiliensis</i>	2021	[88]
<i>Aspergillus</i> sp. FT1307	<i>Heliotropium</i> sp.	2021	[68]
<i>Xylaria</i> sp. CFL5	<i>Cephalotaxus fortunei</i>	2021	[54]

a to z kolei wpływa na morfologię komórek, zmienia ich cytoszkielet, hamuje procesy komórkowe, takie jak migracja komórek, zdolność do adhezji, transport wewnątrz- i międzykomórkowy, podziały komórkowe, a nawet indukuje regulowaną śmierć komórek, taką jak apoptoza. Inwazyjność guza i potencjał przerzutowy są ściśle związane z deregulacją cytoszkieletu aktynowego, dlatego cytochalazyny uznaje się za potencjalne leki przeciwnowotworowe. Spośród ponad 60 związków, najszerszej wykorzystywane w badaniach przeciwnowotworowych to cytochalazyny B, D i H [83, 90, 94].

Większość cytochalazyn jest wyposażona w 9 do 15-członowy pierścień makrocykliczny, który czasami może podlegać różnej wewnątrzcząsteczkowej rearanżacji, tworząc różne układy pierścieniowe. Ze względu na występowanie unikalnego rusztowania chemicznego w budowie cytochalazyn ich synteza chemiczna jest bardzo kosztowna [83, 90]. Początkowo doniesienia o występowaniu cytochalazyn ograniczały się do makroskopowych grzybów lądowych [1, 92], jednak w ostatnich latach zwiększyło się zainteresowanie produkcją cytochalazyn przez grzyby endofityczne w aspekcie ich potencjału przeciwnowotworowego [61]. Dotychczasowe osiągnięcia wskazują duże możliwości wykorzystania grzybów endofitycznych do produkcji cytochalazyn. Wykazano aktywność przeciwnowotworową cytochalazyny H izolowanej z *Diaporthe phaseolorum*-92C względem linii komórkowych reprezentujących raka sutka MDA-MB-231 i MCF-7 [16] oraz cytochalazyn będących metabolitami wtórnymi *Xylaria* sp. CFL5 skutecznymi względem komórek gruczolakoraka żołądka – linii AGS [53]. Wyizolowano także nową cytochalazynę z grzyba endofitycznego *Trichoderma harzianum* wykazującą działanie cytotoksyczne względem linii komórkowej mysiego chłonia (L5178Y)

i przeciwko liniom komórkowym ludzkiego raka jajnika (A2780) [19]. Opisane doniesienia literaturowe z lat 2015–2021 dotyczące grzybów endofitycznych produkujących cytochalazyny o działaniu cytotoksycznym zestawiono w tabeli VI.

4. Podsumowanie

Ciągle pojawiają się doniesienia na temat nowych substancji czynnych o działaniu przeciwnowotworowym izolowanych z grzybów endofitycznych. Do tych związków zalicza się: alternaliol, chetomugilid, czy emerydon B. Często są to związki z różnych grup chemicznych. Poza alkaloidami uwzględnia się również terpenoidy, laktony, chinony, pirany, pirony, aksany, ksantony, karotenoidy, związki siarkoorganiczne, poliketyny, związki fenolowe, peptydy i szereg innych [42, 84].

Rośliny lecznicze wytwarzają cenne metabolity wtórne o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych, jednak jak wykazano w niniejszej monografii, produkcja związków pochodzących z endofitów staje się alternatywnym źródłem chemioterapeutków. Endofity można uznać za potencjalne źródło nowych substancji aktywnych wykorzystywanych w leczeniu wielu chorób, nie tylko nowotworowych. Jako liczne zasoby mikroorganizmów endofity tworzą bogate pokłady nowych związków naturalnych o wysokim poziomie różnorodności strukturalnej i funkcjonalnej. Można stwierdzić, iż badania nad endofitami i produktami ich metabolizmu wydają się być istotne tak w aspektach poznawczych, jak i praktycznych, w tym szczególnie w odniesieniu do terapii chorób nowotworowych.

Praca finansowana ze środków: PCN-1-174/N/o/I

Piśmiennictwo

- Abate D., Abraham W.R., Meyer H.: Cytochalasins and phyto-toxins from the fungus *Xylaria obovata*. *Phytochemistry*, **44**, 1443–1448 (1997)
- Abdel-Fatah S.S., El-Batal A.I., El-Sherbiny G.M., Khalaf M.A., El-Sayed A.S.: Production, bioprocess optimization and γ -irradiation of *Penicillium polonicum*, as a new Taxol producing endophyte from *Ginkgo biloba*. *Biotechnol. Rep.* **30**, e00623 (2021)
- Alam M.M., Naeem M., Khan M.M.A., Uddin M.: Vincristine and Vinblastine Anticancer alkaloids: pharmacological applications and strategies for yield improvement. *Cathar. Roseus Curr. Res. Futur. Prospect.* 277–307 (2017)
- Allemann O., Brutsch M., Lukesh J.C., III, Brody D.M., Boger D.L.: Synthesis of a Potent Vinblastine: Rationally Designed Added Benign Complexity. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 8376 (2016)
- Altaf M.M., Ahmad Khan M.S., Ahmad I.: Diversity of Bioactive Compounds and Their Therapeutic Potential. *New Look to Phytomedicine*, **11**, 15–34 (2019)
- Ardalani H., Avan A., Ghayour-Mobarhan M.: Podophyllotoxin: a novel potential natural anticancer agent. *AJP*, **7**, 285–294 (2017)
- Arneaud S.L.B., Porter J.R.: Investigation and expression of the secoisolariciresinol dehydrogenase gene involved in podophyllotoxin biosynthesis. *Mol. Biotechnol.* **57**, 961–973 (2015)
- Aswani R., Jasim B., Arun Vishnu R., Antony L., Remakanthan A., Aravindakumar C.T., Radhakrishnan E.K.: Nanoelictor based enhancement of camptothecin production in fungi isolated from *Ophiorrhiza mungos*. *Biotechnol. Prog.* e3039 (2020)
- Ayob F.W., Simarani K., Abidin N.Z., Mohamad J.: First report on a novel *Nigrospora sphaerica* isolated from *Catharanthus roseus* plant with anticarcinogenic properties. *Microb. Biotechnol.* **10**, 926 (2017)
- Baker S., Prudnikova S.V., Volova T.: Siberian plants: untapped repertoire of bioactive endosymbionts. *Front. Biol.* **13**, 157–167 (2018)
- Baker S., Satish S.: Endophytes: natural warehouse of bioactive compounds. *Drug Invention Today*, **4**, 548–553 (2012)
- Bandara C.J., Siriwardhana A., Karunaratne D.N., Ratnayake Bandara B.M., Wickramasinghe A., Krishnarajah S.A., Karunaratne V.: Production of vincristine and vinblastine by the endophytic fungus *Botryosphaeria laricina* strain (CRS1) is dependent on stimulating factors present in catharanthus roseus. *Nat. Prod. J.* **11**, 221–230 (2020)
- Banyal A., Thakur V., Thakur R., Kumar P.: Endophytic microbial diversity: a new hope for the production of novel anti-tumor and anti-HIV agents as future therapeutics. *Curr. Microbiol.* **78**, 1699–1717 (2021)
- Bhalkar B.N., Patil S.M., Govindwar S.P.: Camptothecine production by mixed fermentation of two endophytic fungi from *Nothapodytes nimmoniana*. *Fungal Biol.* **120**, 873–883 (2016)
- Bishayee A., Sethi G.: Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. *Semin. Cancer Biol.* **41**, 1–3 (2016)
- Brissow E.R., Soares M.A. i wsp.: 18-Des-hydroxy Cytochalasin: an antiparasitic compound of diaporthe phaseolorum-92C, an endophytic fungus isolated from *Combretum lanceolatum* Pohl ex Eichler. *Parasitol. Res.* **116**, 1823–1830 (2017)
- Caputi L., O'Connor S.E. i wsp.: Missing enzymes in the biosynthesis of the anticancer drug vinblastine in Madagascar periwinkle. *Science*, **360**, 1235–1239 (2018)
- Castle B.T., McCubbin S., Prah L.S., Bernens J.N., Sept D., Odde D.J.: Mechanisms of kinetic stabilization by the drugs paclitaxel and vinblastine. *Mol. Biol. Cell.* **28**, 1238–1257 (2017)
- Chen H., Daletos G., Okoye F., Lai D., Dai H., Proksch P.: A New cytotoxic cytochalasin from the endophytic fungus *Trichoderma harzianum*. *Nat. Prod. Commun.* **10**, 585–587 (2015)
- Chen Z.M., Chen H.P., Li Y., Feng T., Liu J.K.: Cytochalasins from cultures of endophytic fungus *Phoma multirostrata* EA-12. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **68**, 23–26 (2015)
- Clarance P., Kim H.J. i wsp.: Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using endophytic fungi *Fusarium solani* and its *in-vitro* anticancer and biomedical applications. *Saudi J. Biol. Sci.* **27**, 706–712 (2020)
- Cragg G.M., Newman D.J.: Natural products as sources of anticancer agents: Current approaches and perspectives (w) Natural products as source of molecules with therapeutic potential, red.: Valdir Cechinel Filho, Springer International Publishing, 2018, s. 309–331
- Cremasco M.A., Hritzko B.J., Linda Wang N.H.: Experimental purification of paclitaxel from a complex mixture of taxanes using a simulated moving bed. *Brazilian J. Chem. Eng.* **26**, 207–218 (2009)
- Das A., Rahman M.I., Ferdous A.S., Amin A., Rahman M.M., Nahar N., Uddin M.A., Islam M.R., Khan H.: An endophytic *Basidiomycete*, *Grammothele lineata*, isolated from *Corchorus olitorius*, produces paclitaxel that shows cytotoxicity. *PLoS One*, **12**, e0178612 (2017)
- Degambada K.D., Kumara P.A.A.S.P., Salim N., Abeysekera A.M.: *Diaporthe* sp. F18; a new source of camptothecin producing endophytic fungus from *Nothapodytes nimmoniana* growing in Sri Lanka producing endophytic fungus from *Nothapodytes*. *Nat. Prod. Res.* DOI: 10.1080/14786419.2021.1946535 (2021)
- Dhakshinamoorthy M., Kilavan Packiam K., Kumar P.S., Saravanakumar T.: Endophytic fungus *Diaporthe caatingaensis* MT192326 from *Buchanania axillaris*: An indicator to produce biocontrol agents in plant protection. *Environ. Res.* **197**, 111147 (2021)
- Dhakshinamoorthy M., Ponnusamy S.K., Nyayiru Kannaian U.P., Srinivasan B., Shankar S.N., Kilavan Packiam K.: Plant-microbe interactions implicated in the production of camptothecin – An anticancer biometabolite from *Phyllosticta elongata* MH458897 a novel endophytic strain isolated from medicinal plant of Western Ghats of India. *Environ. Res.* **201**, 111564 (2021)
- Dutta S., Mahalanobish S., Saha S., Ghosh S., Sil P.C.: Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. *Food Chem. Toxicol.* **128**, 240–255 (2019)
- El-Sayed A.S., El Sayed M.T., Nada H.S., Hassan A.E., Yousef E.K.: Production and characterization of taxol as anticancer agent from *Aspergillus terreus*. *J. Pure. Appl. Microbiol.* **13**, 2055–2063 (2019)
- El-Sayed E.R.: Discovery of the anticancer drug vinblastine from the endophytic *Alternaria alternata* and yield improvement by gamma irradiation mutagenesis. *J. Appl. Microbiol.* **131**, 2886–2898 (2021)
- El-Sayed E.S.R., Zaki A.G., Ahmed A.S., Ismaiel A.A.: Production of the anticancer drug taxol by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* TXB502: enhanced production by gamma irradiation mutagenesis and immobilization technique. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**, 1–13 (2020)
- Evidente A., Kornienko A., Cimmino A., Andolfi A., Lefranc F., Mathieu V., Kiss R.: Fungal metabolites with anticancer activity. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 617–627 (2014)
- Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Parkin D.M., Piñeros M., Znaor A., Bray F.: Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer.* **149**, 778–789 (2021)
- Gauchan D.P., Véléz H., Acharya A., Östman J.R., Lundén K., Elfstrand M., García-Gil M.R.: *Annulohypoxylon* sp. strain MUS1, an endophytic fungus isolated from *Taxus wallichiana*

- Zucc., produces taxol and other bioactive metabolites. *Biotech.* **11**, 1–16 (2021)
35. Gill H., Vasundhara M.: Isolation of taxol producing endophytic fungus *Alternaria brassicicola* from non-Taxus medicinal plant *Terminalia arjuna*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 74 (2019)
 36. Gokul Raj K., Manikandan R., Arulvasu C., Pandi M.: Anti-proliferative effect of fungal taxol extracted from *Cladosporium oxysporum* against human pathogenic bacteria and human colon cancer cell line HCT 15. *Spectrochim. Acta – Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **138**, 667–674 (2015)
 37. Gouda, S.; Das, G.; Sen, S.K.; Shin, H.S.; Patra, J.K. Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Front. Microbiol.* **7**, 1–8 (2016)
 38. Gurgul A., Lityńska A.: Substancje pochodzenia roślinnego w terapii nowotworów. *Postępy Fitoter.* **18**, 203–208 (2017)
 39. Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Berg G., Pirttilä A.M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A.: The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **79**, 293–320 (2015)
 40. He Q., Zeng Q., Shao Y., Zhou H., Li T., Song F., Liu W.: Anti-cervical cancer activity of secondary metabolites of endophytic fungi from *Ginkgo biloba*. *Cancer Biomarkers*, **28**, 371–379 (2020)
 41. Hemamalini V., Mukesh Kumar D.J., Immaculate A., Rebecca N., Srimathi S., Muthumary J., Kalaichelvan P.T.: Isolation and characterization of taxol producing endophytic *Phoma* sp. from *Calotropis gigantea* and its anti-proliferative studies. *J. Acad. Ind. Res.* **3**, 645 (2015)
 42. Hridoy M., Mazid M.A. i wsp.: Putative anticancer compounds from plant-derived endophytic fungi: a review. *Mol.* **27**, 296 (2022)
 43. Ismaiel A.A., Ahmed A.S., Hassan I.A., El-Sayed E.S.R., Karam El-Din A.Z.A.: Production of paclitaxel with anticancer activity by two local fungal endophytes, *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria tenuissima*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **101**, 5831–5846 (2017)
 44. Jia M., Chen L., Xin H.L., Zheng C.J., Rahman K., Han T., Qin L.P.: A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review. *Front. Microbiol.* **7**, 906 (2016)
 45. Jouda J.B., Tamokou J. de D., Mbazona C.D., Douala-Meli C., Sarkar P., Bag P.K., Wandji J.: Antibacterial and cytotoxic cytochalasins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. harbored in *Garcinia kola* (Heckel) nut. *BMC Complement. Altern. Med.* **16**, 1–9 (2016)
 46. Kai G., Chao, Liyuan W., Liqiang G., Lijie Z.C., Ni X.: Biosynthesis and biotechnological production of anti-cancer drug camptothecin. *Phytochem. Rev.* **14**, 525–539 (2015)
 47. Kasaei A., Mobini-Dehkordi M., Mahjoubi F., Saffar B.: Isolation of taxol-producing endophytic fungi from iranian yew through novel molecular approach and their effects on human breast cancer cell line. *Curr. Microbiol.* **74**, 702–709 (2017)
 48. Kaur J., Singh A., Pathak T., Kumar K.: Role of PGRs in Anticancer Alkaloids (Vincristine and Vinblastine) Production. *Cathar. Roseus Curr. Res. Futur. Prospect.* 309–319 (2017)
 49. Khalifa S.A.M., Göransson U., i wsp.: Marine natural products: a source of novel anticancer drugs. *Mar. Drugs*. **17**, 491 (2019)
 50. Khare E., Mishra J., Arora N.K.: Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects. *Front. Microbiol.* **9**, 2732 (2018)
 51. Kinghorn A.D., Stockwell B.R. i wsp.: Discovery of anticancer agents of diverse natural origin. *Anticancer Res.* **36**, 5623–5637 (2016)
 52. Kumar P., Singh B., Thakur V., Thakur A., Thakur N., Pandey D., Chand D.: Hyper-production of taxol from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus isolated from *Taxus* sp. of the Northern Himalayan region. *Biotechnol. Rep.* **24**, e00395 (2019)
 53. Liang Z., Zhang J., Zhang X., Li J., Zhang X., Zhao C.: Endophytic fungus from *Sinopodophyllum emodi* (Wall.) Ying that produces podophyllotoxin. *J. Chromatogr. Sci.* **54**, 175–178 (2016)
 54. Ma K.L., Dong S.H., Li H.Y., Wei W.J., Tu Y.Q., Gao K.: Cytochalasins from *Xylaria* sp. CFL5, an endophytic fungus of *Cephalotaxus fortunei*. *Nat. Products Bioprospect.* **11**, 87–98 (2021)
 55. Ma Y., Wu X., Xiu Z., Liu X., Huang B., Hu L., Liu J., Zhou Z., Tang X.: Cytochalasin H isolated from mangrove-derived endophytic fungus induces apoptosis and inhibits migration in lung cancer cells. *Oncol. Rep.* **39**, 2899–2905 (2018)
 56. Martino E., Della Volpe S., Terribile E., Benetti E., Sakaj M., Centamore A., Sala A., Collina S.: The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **27**, 701–707 (2017)
 57. Miller K.D., Siegel R.L., Lin C.C., Mariotto A.B., Kramer J.L., Rowland J.H., Stein K.D., Alteri R., Jemal A.: Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* **66**, 271–289 (2016)
 58. Mohinudeen I.A.H.K., Kanumuri R., Soujanya K.N., Shaanker R.U., Rayala S.K., Srivastava S.: Sustainable production of camptothecin from an *Alternaria* sp. isolated from *Nothapodytes nimmoniana*. *Sci. Rep.* **11**, 1478 (2021)
 59. Musavi S.F., Dhavale A., Balakrishnan R.M.: Optimization and kinetic modeling of cell-associated camptothecin production from an endophytic *Fusarium Oxysporum* NFX06. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **45**, 158–172 (2015)
 60. Newman D.J., Cragg G.M.: Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **79**, 629–661 (2016)
 61. Okoye F.B.C., Nworu C.S., Debbab A., Esimone C.O., Proksch P.: Two new cytochalasins from an endophytic fungus, KL-1.1 isolated from *Psidium guajava* leaves. *Phytochem. Lett.* **14**, 51–55 (2015)
 62. Palem P.P.C., Kuriakose G.C., Jayabaskaran C.: Correction: An endophytic fungus, *Talaromyces radicus*, isolated from *Catharanthus roseus*, produces vincristine and vinblastine, which induce apoptotic cell death. *PLoS One*, **11**, e0153111 (2016)
 63. Parthasarathy R., Shanmuganathan R., Pugazhendhi A.: Vinblastine production by the endophytic fungus *Curvularia veruculosa* from the leaves of *Catharanthus roseus* and its *in vitro* cytotoxicity against HeLa cell line. *Anal. Biochem.* **593**, 113530 (2020)
 64. Paul S., Bhagobaty R.K., Nihalani M.C., Joshi S.R.: Characterization of oleaginous endophytic fungi of biodiesel plants as potential biofuel minifactories. *Biomass and Bioenergy*, **142**, 105750 (2020)
 65. Peng X.G., Liu J., Gao Y., Cheng F., Chang J.L., Chen J., Duan F.F., Ruan H.L.: Pchaeglobolactone A, spiropchaeglobosin A, and pchaeglobosols A and B: four rearranged cytochalasins from *Chaetomium globosum* P2-2-2. *Org. Lett.* **22**, 9665–9669 (2020)
 66. Peng X., Duan F., He Y., Gao Y., Chen J., Chang J., Ruan H.: Ergocytochalasin A, a polycyclic merocytochalasan from an endophytic fungus *Phoma multirostrata* XJ-2-1. *Org. Biomol. Chem.* **18**, 4056–4062 (2020)
 67. Puri S.C., Verma V., Amna T., Qazi G.N., Spiteller M.: An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *J. Nat. Prod.* **68**, 1717–1719 (2005)
 68. Qader M., Zaman K.A.U., Hu Z., Wang C., Wu X., Cao S.: Aspochalasin H1: a new cyclic aspochalasin from hawaiian plant-associated endophytic fungus *Aspergillus* sp. FT1307. *Molecules*, **26**, 4239 (2021)
 69. Qiao W., Ling F., Yu L., Huang Y., Wang T.: Enhancing taxol production in a novel endophytic fungus, *Aspergillus aculeatinus*

- Tax-6, isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Fungal Biol.* **121**, 1037–1044 (2017)
70. Ran X., Zhang G., Li S., Wang J.: Characterization and anti-tumor activity of camptothecin from endophytic fungus *Fusarium solani* isolated from *Camptotheca acuminata*. *Afr. Health Sci.* **17**, 566–574 (2017)
 71. Rana K.L., Kour D., Sheikh I., Dhiman A., Yadav N., Yadav A.N., Rastegari A.A., Singh K., Saxena A.K.: Endophytic fungi: biodiversity, ecological significance, and potential industrial applications (w) Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi, red.: Yadav A.N., Mishra S., Singh S., Gupta A. Springer, Cham, 2019, s. 1–62
 72. Rayan A., Raiyn J., Falah M.: Nature is the best source of anti-cancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. *PLoS One*, **12**, e0187925 (2017)
 73. Religioni U.: Cancer incidence and mortality in Poland. *Clin. Epidemiol. Glob. Heal.* **8**, 329–334 (2020)
 74. Salehi M., Moieni A., Safaie N.: Elicitors derived from hazel (*Corylus avellana* L.) cell suspension culture enhance growth and paclitaxel production of *Epicoccum nigrum*. *Sci. Rep.* **8**, 12053 (2018)
 75. Sarkar S., Dey A., Kumar V., Batiha G.E.S., El-Esawi M.A., Tomczyk M., Ray P.: Fungal endophyte: an interactive endosymbiont with the capability of modulating host physiology in myriad ways. *Front. Plant Sci.* **12**, 1780 (2021)
 76. Sharma N., Kushwaha M., Arora D., Jain S., Singamaneni V., Sharma S., Shankar R., Bhushan S., Gupta P., Jaglan S.: New cytochalasin from *Rosellinia sanctae-cruciana*, an endophytic fungus of *Albizia lebbek*. *J Appl Microbiol.* **125**, 111–120 (2018)
 77. Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A.: Cancer statistics, 2022. *CA. Cancer J. Clin.* **72**, 7–33 (2022)
 78. Singh M., Kumar A., Singh R., Pandey K.D.: Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. *3 Biotech.* **7**, 315 (2017)
 79. Somjaipeng S., Medina A., Kwaśna H., Ordaz Ortiz J., Magan N.: Isolation, identification, and ecology of growth and taxol production by an endophytic strain of *Paraconiothyrium variable* from English yew trees (*Taxus baccata*). *Fungal Biol.* **119**, 1022–1031 (2015)
 80. Somjaipeng S., Medina A., Magan N.: Environmental stress and elicitors enhance taxol production by endophytic strains of *Paraconiothyrium variable* and *Epicoccum nigrum*. *Enzyme Microb. Technol.* **90**, 69–75 (2016)
 81. Subban K., Subramani R., Madambakkam Srinivasan V.P., Johnpaul M., Chelliah J.: Salicylic acid as an effective elicitor for improved taxol production in endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. *PLoS One*, **14**, e0212736 (2019)
 82. Tan X., Zhou Y., Zhou X., Xia X., Wei Y., He L., Tang H., Yu L.: Diversity and bioactive potential of culturable fungal endophytes of *Dysosma versipellis*; A rare medicinal plant endemic to China. *Sci. Rep.* **8**, 5929 (2018)
 83. Trendowski M.: Using cytochalasins to improve current chemotherapeutic approaches. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **15**, 327 (2015)
 84. Tyagi G., Kapoor N., Chandra G., Gambhir L.: Cure lies in nature: medicinal plants and endophytic fungi in curbing cancer. *3 Biotech.* **11**, 1–24 (2021)
 85. Uzma F., Siddaiah C.N. i wsp.: Endophytic fungi-alternative sources of cytotoxic compounds: A review. *Front. Pharmacol.* **9**, 309 (2018)
 86. Vasundhara M., Kumar A., Reddy M.S.: Molecular approaches to screen bioactive compounds from endophytic fungi. *Front. Microbiol.* **7**, 1774 (2016)
 87. Wall M.E.: Camptothecin and taxol: discovery to clinic. *Med. Res. Rev.* **18**, 299–314 (1998)
 88. Wang L., Yu Z., Guo X., Huang J.P., Yan Y., Huang S.X., Yang J.: Bisaspochalasins D and E: two heterocycle-fused cytochalasan homodimers from an endophytic *Aspergillus flavipes*. *J. Org. Chem.* **86**, 11198–11205 (2021)
 89. Wang T., Ma Y.X., Ye Y.H., Zheng H.M., Zhang B.W., Zhang E.H.: Screening and identification of endophytic fungi producing podophyllotoxin compounds in *Sinopodophyllum hexandrum* stems. *Chinese J. Exp. Trad. Med. Formul.* **39**, 402–408 (2017)
 90. Wang W.X., Li Z.H., Ai H.L., Li J., He J., Zheng Y.S., Feng T., Liu J.K.: Cytotoxic 19,20-epoxycytochalasans from endophytic fungus *Xylaria* cf. *curta*. *Fitoterapia*, **137**, (2019)
 91. Wheeler N.C., Jech K., Masters S., Brobst S.W., Alvarado A.B., Hoover A.J., Snader K.M.: Effects of genetic, epigenetic, and environmental factors on taxol content in *Taxus brevifolia* and related species. *J. Nat. Prod.* **55**, 432–440 (1992)
 92. Xin X.Q., Chen Y., Zhang H., Li Y., Yang M.H., Kong L.Y.: Cytotoxic seco-cytochalasins from an endophytic *Aspergillus* sp. harbored in *Pinellia ternata* tubers. *Fitoterapia*, **132**, 53–59 (2019)
 93. Yang X., Wu P., Xue J., Li H., Wei X.: Cytochalasans from endophytic fungus *Diaporthe* sp. SC-J0138. *Fitoterapia*, **145**, 104611 (2020)
 94. Yuan S., Gopal J.V., Ren S., Chen L., Liu L., Gao Z.: Anticancer fungal natural products: mechanisms of action and biosynthesis. *Eur. J. Med. Chem.* **202**, 112502 (2020)
 95. Zafari D., Leylaiee S., Tajick M.A.: Isolation and identification of vinblastine from the fungus of *Chaetomium globosum* Cr95 isolated from *Catharanthus roseus* plant. *Biol. J. Microorg.* **8**, 1–14 (2019)
 96. Zaiyou J., Hongsheng W., Ning W., Li M., Guifang X.: Isolation and identification of an endophytic fungus producing paclitaxel from *Taxus wallichiana* var. *mairei*. *Nutr. Hosp.* **32**, 2932–2937 (2015)
 97. Zaiyou J., Li M., Xiqiao H.: An endophytic fungus efficiently producing paclitaxel isolated from *Taxus wallichiana* var. *mairei*. *Med.* **96**, e7406 (2017)
 98. Zhang X., Rakesh K.P., Shantharam C.S., Manukumar H.M., Asiri A.M., Marwani H.M., Qin H.L.: Podophyllotoxin derivatives as an excellent anticancer aspirant for future chemotherapy: A key current imminent needs. *Bioorganic Med. Chem.* **26**, 340–355 (2018)
 99. Zhang Y.W., Kong X.Y., Wang J.H., Du G.H.: Vinblastine and Vincristine. *Nat. Small Mol. Drugs from Plants*, **41**, 551–557 (2018)
 100. Zi C.T., Yang L., Xu F.Q., Dong F.W., Yang D., Li Y., Ding Z.T., Zhou J., Jiang Z.H., Hu J.M.: Synthesis and anticancer activity of dimeric podophyllotoxin derivatives. *Drug Des. Devel. Ther.* **12**, 3393–3406 (2018)

WYBRANE ZOONOZY BAKTERYJNE PRZENOSZONE PRZEZ MLEKO SUROWE

Maria J. Chmiel*, Agata Dziewońska

Katedra Mikrobiologii i Biomonitoringu, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

Wpłynęło w grudniu 2021 r., zaakceptowano w kwietniu 2022 r.

Streszczenie: Mleko surowe, które nie zostało poddane obróbce termicznej, może być ważnym źródłem drobnoustrojów chorobotwórczych przenoszonych drogą pokarmową, głównie takich jak: patogenne szczepy *Escherichia coli*, bakterie z rodzaju *Salmonella*, niektóre paciorkowce kałowe czy *Listeria monocytogenes*. Najgroźniejszym z patogenów związanych z surowym mlekiem jest *E. coli* VTEC, która wytwarza werocytotoksyny – zwłaszcza szczep O157:H7. *Enterococcus* spp. jest jednym z czynników zapalenia wymienia u krów i dlatego często występuje w surowym mleku, co może stanowić zagrożenie dla konsumentów. Spożywanie mleka surowego jest dobrym wyborem, pod warunkiem, że mamy gwarancję wysokiego poziomu higienicznego jego pozyskiwania.

1. Wstęp. 2. Infekcje patogennymi szczepami *Escherichia coli*. 3. Salmonelloza. 4. Zakażenia paciorkowcami kałowymi (*Enterococcus* spp.). 5. Listerioza. 6. Podsumowanie

SELECTED BACTERIAL ZONOSSES TRANSMITTED BY RAW MILK

Abstract: Raw milk, that has not been heat-treated, can be an important source of pathogenic microorganisms transmitted via the food route, mainly such as: pathogenic strains of *Escherichia coli*, bacteria of the genus *Salmonella*, some fecal streptococci or *Listeria monocytogenes*. The most dangerous of the pathogens associated with raw milk is VTEC *E. coli*, which produces verocytotoxins – especially the O157:H7 strain. *Enterococcus* spp. is a frequent factor of bovine mastitis and therefore is often found in raw milk, thus posing a risk to consumers. Consuming raw milk is a good choice as long as we have a guarantee of a high level of hygienic sourcing.

1. Introduction. 2. Infections with pathogenic strains of *Escherichia coli*. 3. Salmonellosis. 4. Infections with fecal streptococci (*Enterococcus* spp.). 5. Listeriosis. 6. Summary

Słowa kluczowe: bakterie patogenne, mleko surowe, zoonozy

Keywords: pathogenic bacteria, raw milk, zoonoses

1. Wstęp

W wielu państwach na świecie spożycie nieprzetworzonego mleka krowiego nadal jest wysokie i chociaż dotyczy to głównie krajów ubogich to również w bogatych produkt ten jest ceniony. Spożycie mleka surowego może przynosić korzyści prozdrowotne, gdyż nie zostało pozbawione wielu składników odżywczych w procesie pasteryzacji i zawiera żywe kultury wartościowych bakterii mlekowych, jednak w trosce o zdrowie osób spożywających mleko surowe lub produkty wytworzone z jego użyciem, zasadnym jest prowadzenie badań nad jego jakością mikrobiologiczną.

Niestety mleko surowe, nie poddane obróbce termicznej (m.in. pasteryzacji), może stanowić istotne źródło drobnoustrojów patogennych przenoszonych drogą pokarmową, głównie bakterii takich jak: patogenne szczepy

Escherichia coli, bakterie z rodzaju *Salmonella*, niektóre paciorkowce kałowe czy *Listeria monocytogenes*.

Ocena stanu higienicznego mleka surowego przydatna jest również w celu podniesienia świadomości zagrożeń płynących z zaniedbywania higieny udojowej, zdrowia krów oraz czystości ich otoczenia. Wielu hodowców bydła mlecznego (szczególnie drobnotowarowych) nie dba o to wystarczająco i przez to mogą przyczyniać się do wywołania u konsumentów problemów zdrowotnych.

Warto wiedzieć, że w obecnych czasach, nawet w krajach wysokorozwiniętych dochodzi do zachorowań spowodowanych przez skażone mikrobiologicznie surowe mleko. Przenoszenie się patogennych drobnoustrojów wraz z żywnością na ludzi nadal jest problemem aktualnym, który nie powinien być bagatelizowany, dlatego też higiena żywności z roku na

* Autor korespondencyjny: Maria J. Chmiel, Katedra Mikrobiologii i Biomonitoringu, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie; Al. A. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków; tel. +48 12 662 40 96; e-mail: maria.chmiel@urk.edu.pl

© 2022 Maria J. Chmiel & Agata Dziewońska.

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

rok nabiera coraz większej wagi – zwiększa się także ilość restrykcji i regulacji prawnych dotyczących jej jakości sanitarnej.

2. Infekcje patogennymi szczepami *Escherichia coli*

Istnieje sześć różnych patogennych podtypów *Escherichia coli* związanych z żywnością: enterotoksyczne (ETEC), enteroinwazyjne (EIEC), enteropatogenne (EPEC), enteroagregacyjne (EAEC), enterokrwotoczne (EHEC) i dyfuzyjnie przylegające (DAEC) [32].

Najbardziej niebezpiecznym z wegetatywnych patogenów związanych z surowym mlekiem jest *E. coli* typu VTEC wytwarzająca werocytotoksyny, a zwłaszcza szczep VTEC O157:H7. Wyróżnia się co najmniej trzy podtypy werotoksyny VT1 (VT1, VT1c i VT1d) oraz sześć podtypów werotoksyny VT2 (VT2a, VT2c, VT2d, VT2e, VT2f i VT2g).

Zakażenia *E. coli* typu VTEC mogą przebiegać bezobjawowo, powodować łagodną biegunkę a nawet prowadzić do stanów zagrażających życiu: krwotocznego zapalenia jelita grubego (HC), powikłanego zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS) czy zakrzepowej plamicy małopłytkowej (TTP), które mogą spowodować nawet zgon pacjenta. Niektóre VTEC, należące do serotypu O157:H7, są związane z ciężkimi zakażeniami. Oprócz produkcji toksyn, VTEC mają zdolność do adhezji i niszczenia komórek nabłonkowych jelita. [4, 7, 39].

Od dawna wiadomo, że bydło domowe jest ważnym rezerwuarem dla VTEC, w tym VTEC O157:H7 – chociaż większość zarażonego bydła nie wykazuje objawów klinicznych. Bakterie te są wydalane wraz z kałem do środowiska bytowania zwierząt, jednak w przypadku braku odpowiedniej higieny udoju mogą powodować biegunkę u cieląt. Częstość występowania VTEC w kale bydła mlecznego (w skali światowej) określono między 0,2% a 48,8% i 0,4% oraz 74,0% odpowiednio dla *E. coli* O157 i VTEC innych niż O157.

W badaniu izolatów VTEC pochodzących od zdrowego bydła oraz wykazującego biegunkę w Hiszpanii, 20% z nich posiadało geny odpowiedzialne za produkcję VT1, 54% VT2, a 26% geny obu typów werotoksyny. Ponadto wykryto enterohemizynę (*hlyA*) i gen intyminy (*eaeA*) odpowiednio u 63% i 29% izolatów. Ogółem 85% izolatów zidentyfikowano jako związane z chorobami człowieka, a 54% wszystkich serotypów było związanych (poprzez swoje cechy wirulencji) z zespołem hemolityczno-mocznicowym [5, 26, 40].

Pod koniec 2005 r. Urząd ds. Zdrowia w stanie Waszyngton odnotował wyższą niż zwykle liczbę zakażeń *E. coli* wśród mieszkańców i znalazł wspólne źródło tych infekcji. Prawdopodobnie było to surowe mleko, ponieważ wszystkie chore osoby piły surowe mleko od tej samej krowy. *E. coli* O157:H7 wyizolowano z próbek

surowego mleka i próbek środowiskowych pobranych z podłogi hali udojowej – wzorce PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) były nie do odróżnienia między pacjentami, próbkami surowego mleka i próbkami środowiskowymi [12].

We wrześniu 2006 roku w Kalifornii zidentyfikowano 6 przypadków krwawej biegunki u dzieci w wieku 6–18 lat, która była skutkiem spożycia mleka surowego i siary pochodzących z tej samej mleczarni. Kalifornijski Departament Zdrowia Publicznego (CDPH) potwierdził wówczas infekcję *E. coli* O157:H7 w pięciu z sześciu zgłoszonych przypadków zespołu hemolityczno-mocznicowego. W wyniku tego i innych zakażeń w Kalifornii wprowadzono prawnie limit liczebności bakterii grupy coli: do 10 j.t.k. $\cdot$ cm⁻³ dla surowego mleka sprzedawanego konsumentom [9].

Problem lokalnych epidemii *E. coli* typu VTEC (STEC), związanych z surowym mlekiem, nie wygasł również w Europie. W 2017 roku w Austrii wśród uczestników szkolnej wycieczki na narty, którzy zachorowali na zapalenie żołądka i jelit, potwierdzono obecność STEC w kale siedmiu z dziewięciu chorych, bakterie te wykryto również u pięciu osób bez objawów chorobowych – osiem izolatów miało identyczne wzory PFGE. Nie potwierdzono wówczas obecności tych bakterii u personelu hotelu ani w pobranych później do badań próbkach mleka surowego oferowanego w ośrodku, ale wykryto je również u osób z innych grup przebywających w tym samym czasie w hotelu. Jednak w gospodarstwie dostarczającym mleko STEC zostały zidentyfikowane w 26 z 35 próbek kału zwierząt w tym w 100% próbek pochodzących od krów mlecznych. Dalsze analizy wykazały, że szczepy STEC o niemal identycznym genomie jak w przypadku ludzi, były obecne w próbkach pochodzących od trzech zwierząt, w tym dwóch cieląt [37].

Zakażenie enterokrwotoczną *E. coli* (EHEC) powoduje objawy o różnym nasileniu – od niegroźnej biegunki do powikłań, które zagrażają życiu człowieka: hemolitycznego zespołu mocznicowego lub krwotocznego zapalenia jelita grubego. Modele zwierzęce wykazały rolę adhezyny w kolonizacji okrężnicy przez EHEC. Do innych czynników wirulencji tych bakterii należą: fimbrie, systemy pobierania żelaza oraz ureaza podobna do wytwarzanej przez *Klebsiella* sp. Ważnym rezerwuarem EHEC jest układ pokarmowy bydła. Zakażenie człowieka ułatwia niska dawka zakaźna – szacowana na mniej niż 100 komórek [28, 32].

Podczas badań przeprowadzonych w Indiach EHEC wyizolowano z 11,11% próbek zbiorczych i 8,26% próbek indywidualnych surowego mleka. Po zbadaniu uzyskanych izolatów EHEC stwierdzono następujący rozkład poszczególnych genów zjadliwości: *stx1*, *stx2*, *eaeA* i *hlyA*; 33,33%, 88,89%, 11,11% i 33,33% (odpowiednio) [44].

Szczepy enterotoksyczne *E. coli* (ETEC) również mogą przenosić się na człowieka wraz z pożywieniem. Zakażenie ETEC może powodować wymioty, ale nie towarzyszy temu gorączka. Biegunka jest wodnista, stąd prowadzi do utraty elektrolitów i odwodnienia. Najcięższe przypadki mogą wymagać hospitalizacji. *E. coli* typu ETEC uznano za jedną z najczęstszych przyczyn zakaźnej biegunki u niemowląt i małych dzieci w krajach rozwijających się. Szczepy ETEC produkują enterotoksyny ciepłostabilne (ST) oraz ciepłochwienne (LT). Działanie toksyny typu LT prowadzi do wzrostu poziomu cAMP (cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan), aktywacji kinaz zależnych od cAMP i aktywacji kanału chlorkowego komórek nabłonkowych (CTFR). Wynikiem kaskady reakcji jest intensywne wydzielanie jonów Cl^- z komórek krypt, co prowadzi do biegunki. Toksyny typu ST również wywołują efekt wydzielniczy w nabłonku jelit. ETEC kolonizuje błonę śluzową jelita cienkiego – w tym procesie biorą udział białkowe fimbrialne lub fibrylarne czynniki kolonizacyjne (CFs) [32, 46].

W wyniku badań przeprowadzonych w Egipcie stwierdzono występowanie *E. coli* w 55 i 62% badanych próbek mleka surowego, ich średnia liczebność wyniosła od $1.3 \cdot 10^4$ do $3.0 \cdot 10^4$ j.t.k. $\cdot \text{cm}^{-3}$. Ponadto w wielu próbkach potwierdzono obecność ETEC [2, 13].

Ostatnią istotną grupą *E. coli* związaną z bydłem i jego mlekiem są szczepy typu EPEC. Patogeneza zakażeń EPEC jest bardzo złożona. EPEC początkowo przylega do komórek nabłonkowych przez adhezynę co prowadzi do zniszczenia mikrokosmków. Aktywuje też m.in. receptor galaniny-1, zwiększając reakcję komórek na neuropeptyd – galaninę, który pobudza wydzielanie jelitowe. Opisano również inne czynniki wirulencji np. limfostatynę (LifA), hamującą limfocyty. Biegunka wynika z aktywnego wydzielania jonów, zwiększonej przepuszczalności jelit, zapalenia jelit i utraty powierzchni absorpcyjnej, wynikającej z zatarcia mikrokosmków [32].

Szczepy *E. coli* typu EPEC nie są stałym elementem odchodów bydła, ale w nim występują. Badania przeprowadzone w dwudziestu fermach bydła mięsnego i mlecznego w Irlandii wykazały odsetek 3,9% próbek kału pozytywnych na EPEC. Uzyskano 88 izolatów fekalnych EPEC i określono geny wirulencji. Zidentyfikowano następujące geny: *eaeA* (geny intyminy), *hlyA* (gen enterohemolizyny), *lpf* (gen kodujący fimbrie), *saa*, *iha*, *toxB* (geny adhezyn) oraz *tir* i grupę genów *esp* (A, B, P). Geny *tir* i *esp* kodują kluczowe elementy systemu przyczepiania się i zacierania (mikrokosmków), będącego ważnym czynnikiem patogenności EPEC *E. coli*. Bakterie te posiadają wyspy patogenności enterocytów – LEE (locus of enterocyte effacement), które są skupiskiem genów zaangażowanym w ten proces: genów systemu wydzielania typu III,

oraz genu *eaeA* kodującego intyminę – białko błonowe, które uczestniczy w wiązaniu bakterii z powierzchnią komórki gospodarza. Gen *eae* jest używany jako jeden z markerów do identyfikacji EPEC [36].

W badaniach przeprowadzonych w roku 2002 w Hiszpanii, analizą objęto odchody 412 sztuk zdrowego bydła – nosicielstwo EPEC wykazano u blisko 10% osobników (8,2%) [38]. Odsetek EPEC w odchodach bydła według doniesień z Irlandii w 2013 roku wyniósł 5,8% [6].

Do kontaminacji mleka surowego przez *E. coli* może dojść poprzez zanieczyszczenie wymienia kałem, skażoną wodą albo w wyniku zakaźnego zapalenia wymienia. Oto krótkie doniesienie o roli *mastitis* w zanieczyszczeniu mleka surowego *E. coli* z Tajlandii: z 17 gospodarstw mlecznych pobrano łącznie 38 próbek mleka od krów z subklinicznym zapaleniem wymienia oraz 35 próbek wody. Zidentyfikowano 185 izolatów jako *E. coli*: 116 z próbek wody i 69 z próbek mleka. Większość patogennych *E. coli* stanowiły szczepy typu EPEC (7,02%), a następnie EAEC (4,32%) i EHEC (1,62%). Wszystkie izolaty EPEC pochodziły z próbek wody. Szczepy EAEC pochodziły w większości z próbek mleka, a pozostałe z próbek wody, 2 izolaty EHEC pochodziły z mleka, a 1 z wody [22].

3. Salmonelloza

Bakterie z rodzaju *Salmonella* należą do najczęściej izolowanych patogenów przenoszonych przez żywność – mogą pojawić się na niehigienicznie produkowanych tuszkach drobiowych, na jajach, w mięsie wołowym oraz mleku i produktach mlecznych w wyniku zanieczyszczenia kałowego [42].

Prawie wszystkie szczepy *Salmonella* spp. są chorobotwórcze, ponieważ mają zdolność inwazji, replikacji i przeżycia w ludzkich komórkach. Dawkę zakaźną określono między 10^6 a 10^8 komórek, lecz czasem wprowadzenie nawet 10 komórek do organizmu prowadzi do rozwoju salmonellozy. Szczepy *Salmonella* spp. można podzielić na: durowe oraz nie durowe (NTS). Bakterie *Salmonella* durowe (*S. Typhi* i *S. Paratyphi*) praktycznie nie są bakteriami zoonotycznymi, natomiast szczepy NTS występują w rezerwuarach zwierzęcych [10, 16].

Infekcje NTS u ludzi obejmują zapalenie żołądka i jelit z objawami bezkrwawej biegunki, wymiotów, bólu głowy i mięśni. Powikłania infekcji NTS obejmują: zapalenie pęcherzyka żółciowego, trzustki lub wyrostka robaczkowego. Może również wystąpić bakteriemia – to stan, w którym bakterie dostają się do krwioobiegu po przekroczeniu bariery jelitowej. To groźny stan, któremu towarzyszy wysoka gorączka, nieleczony prowadzi do sepsy, a nawet zgonu. Prawie wszystkie serotypy *Salmonella* spp. mogą powodować bakteriemie [16].

Występuje kilka mechanizmów patogenności *Salmonella* spp. Bakterie te wytwarzają endotoksyny, egzotoksyny oraz adhezyny, posiadają także fimbrie – białka oddziałujące z receptorami komórek jelitowych. Mają tendencję do penetracji komórek nabłonka jelita cienkiego poprzez tzw. systemy sekrecyjne typu III, które pozwalają na wstrzyknięcie specjalnych ligandów do cytoplazmy. Ligandy te aktywują ścieżkę przekazywania sygnału i wywołują reakcję podobną do fagocytozy – rozciągnięcie na zewnątrz lub wzbudzenie błony komórkowej w celu pochłonięcia bakterii. Gdy bakteria znajdzie się w komórce, zostaje otoczona wakuolą. W normalnych warunkach obecność bakterii w komórce aktywowałaby odpowiedź immunologiczną – fuzję lizosomów i wydzielanie enzymów w celu degradacji bakterii. *Salmonella* blokuje taką reakcję, wykorzystując system sekrecyjny typu III do wstrzykiwania białek efektorowych do wakuoli, powodując zmianę jej struktury. Ogranicza to fuzję lizosomów, co umożliwia przeżycie i replikację bakterii wewnątrzkomórkowo [10, 16].

Przeprowadzono badanie przekrojowe obejmujące m.in. 82 stada bydła mlecznego w celu oszacowania częstości występowania *Salmonella* spp. w kale (na terenie Hiszpanii). Wykazano, że w 3,7% stad bydła mlecznego osobniki wydalały *Salmonella* spp. [25].

Zakażenie bydła następuje w wyniku spożycia zanieczyszczonej paszy, wody lub trawy. Młode, zestresowane lub ciężarne zwierzęta są najbardziej podatne na zakażenie. Bakterie z rodzaju *Salmonella* mogą przeżyć miesiące, a nawet lata w środowisku zewnętrznym, szczególnie w wilgotnym i ciepłym. Zakażenie u bydła może być bezobjawowe lub objawowe – pojawia się gorączka, cuchnąca biegunka i odwodnienie [40].

Badania przesiewowe często wykazują obecność *Salmonella* spp. w mleku surowym, mimo że krowy są klinicznie zdrowe. Zauważono to m.in. podczas badań 25 próbek surowego mleka rynkowego w Egipcie. Obecność *Salmonella* spp. stwierdzono w 3 próbkach (12%). Zidentyfikowano izolaty: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *S. tsevie*, które mają znaczenie również w zakażeniach u ludzi [14].

W lutym 2007 roku Departament Zdrowia Pensylwanii otrzymał raporty o dwóch osobach, u których potwierdzono zakażenie *S. enterica* – serotypem Typhimurium. Obie osoby zgłosiły picie surowego mleka z tego samego hrabstwa. Izolaty *S. Typhimurium* od tych osób były praktycznie identyczne. W tym samym miesiącu do Departamentu dotarły doniesienia o zakażeniach *S. Typhimurium* u klientów pewnej lokalnej mleczarni. Rozpoczęto dochodzenie w celu ustalenia źródła i zakresu epidemii. Ustalono, że 29 najświeższych przypadków biegunki wywołanej przez *S. Typhimurium*, było związanych ze spożyciem surowego mleka lub jego pochodnych. Wzięto pod lupę lokalną mle-

czarnię – sprzedawała ona (na podstawie specjalnego zezwolenia) mleko surowe bezpośrednio konsumentom – było to około 275 stałych klientów. W mleczarni wykonano 8 kontroli w 2007 r., gdzie badano próbki mleka surowego oraz sprawdzano stan higieniczny samego zakładu. Wyniki kontroli wykazały niewłaściwe czyszczenie sprzętu, niezdiagnozowaną chorobę krów w okresie laktacji oraz inwazję ptaków i gryzoni. Gdy tylko mleczarnia ta otrzymywała zakaz sprzedaży surowego mleka, przypadki zakażeń *S. Typhimurium* spadały do zera, ale gdy zakaz zdejmowano – pojawiały się nowe zakażenia. Mleko surowe z mleczarni poddanej kontroli okazało się kluczowym mediatorem *S. Typhimurium* [8].

Skażenie mleka przez *Salmonella* spp. najczęściej ma charakter wtórny poprzez odchody krowie lub zaniedbania ludzi. Może jednak zdarzyć się, że skażenie będzie miało charakter pierwotny jako efekt mastitis [15].

4. Zakażenia paciorkowcami kałowymi (*Enterococcus* spp.)

Rodzaj *Enterococcus* to bakterie, występujące w środowisku pokarmowym ludzi i zwierząt, które biorą udział w zakażeniach głównie jako patogeny fakultatywne. Najważniejszymi gatunkami w patogenie człowieka są: *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*. Choć izolaty *E. faecium* pochodzenia zwierzęcego zwykle nie stanowią zagrożenia dla człowieka, jednak mogą być źródłem genów lekooporności. *E. faecalis* pochodzenia zwierzęcego wydaje się być największym zagrożeniem, ponieważ te same typy *E. faecalis* można wykryć u zwierząt, w ich mięsie oraz w próbkach kału zarówno zdrowych ludzi, jak i pacjentów z zakażeniami krwi [21].

Enterokoki mogą być przyczyną bakteriemii, infekcji dróg moczowych, zapalenia wsierdza, zapalenia opon mózgowych lub zakażenia otrzewnej. Paciorkowce kałowe są zaangażowane też w zatrucia pokarmowe przez produkcję amin biogennych. Przy tego typu zatruciach występuje ból głowy, wzrost ciśnienia krwi, wymioty, a czasem reakcje alergiczne [20, 45].

Enterokoki posiadają geny, kodujące cały szereg czynników wirulencji, takich jak:

- substancję agregującą (*asaI*) – umożliwiającą adhezję bakterii do ściany jelita;
- białko powierzchniowe enterokoków (*esp*);
- cytolizynę (*cylA* – białko hemolityczne);
- bakteriocynę, która hamuje wzrost bakterii Gram-dodatnich;
- żelatynazę (*gel* – białko, hydrolizujące żelatynę, hemoglobinę, kolagen oraz kazeinę);
- hialuronidazę (*hyl*);
- antygen zapalenia wsierdza (*efaA*);
- białko wiążące kolagen (*ace*).

U tej grupy bakterii występują również geny oporności na antybiotyki [45, 47].

Podczas badań interakcji bakterii *E. faecalis* z układem odpornościowym wykazano, że są w stanie przeżyć stres oksydacyjny (testy *in vitro*), a także są wysoce odporne na zabijanie przez komórki fagocytarne [19].

Enterokoki występują powszechnie u bydła (również mlecznego), co zwiększa ryzyko kontaminacji mleka. Choć nie wszystkie gatunki są chorobotwórcze, nie można bagatelizować tego problemu. Bakterie te bowiem mogą występować w środowisku naturalnym kolonizując różne nisze ekologiczne i przenosić się drogą pokarmową, co wynika z ich odporności na niekorzystne warunki środowiskowe. Według badań, przeprowadzonych w Stanach Zjednoczonych, odsetek stad, gdzie przynajmniej jeden osobnik wydalal *Enterococcus* spp., wyniósł aż 96,7%. Odsetek krów, wydających paciorkowce, był niewiele niższy – ok. 90%. Wśród izolatów zidentyfikowano co najmniej 10 gatunków tych bakterii w tym m.in. *E. hirae*, *E. faecalis* i *E. faecium* [29, 41].

Poglądu na temat wirulencji enterokoków, izolowanych z kału bydła mlecznego, dostarczają badania przeprowadzone w 2014 r. na terenie Republiki Południowej Afryki. Najczęściej izolowano *E. faecium* (52,94%) oraz *E. durans* (23,53%). W przypadku pozostałych gatunków (*E. faecalis*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*) żaden z nich nie przekraczał 10% izolatów. Sprawdzono obecność następujących genów wirulencji: *ace*, *efaA*, *cylA*, *gel*, *esp* i *hlyE*. Okazało się, że każdy z tych genów: *ace*, *gel* i *esp* wystąpił u ponad 75% izolatów, więc były one związane praktycznie ze wszystkimi wykrytymi gatunkami. Pozostałych genów, odpowiedzialnych za patogeniczność enterokoków (*efaA*, *cylA*, *hlyE*), nie wykryto [27].

Badania przeprowadzone przez Shafeek i wsp. [41] wskazują na obecność *Enterococcus* spp. aż w 64% próbek mleka surowego. Średnia liczebność enterokoków (zidentyfikowanych jako *E. faecalis* i *E. faecium*) wyniosła aż $7,5 \times 10^7$ j.t.k. · cm⁻³.

Należy pamiętać też o istotnej roli paciorkowców (w tym kałowych) w wywoływaniu zapalenia wymienia u bydła – zarówno klinicznego jak i subklinicznego. Badania na tym gruncie oscylują m. in. wokół *E. faecalis* – jako najważniejszego udokumentowanego gatunku enterokoków w wywoływaniu *mastitis*. Obszerne badania przeprowadzone w Chinach wykazały obecność *E. faecalis* w 4,5% próbek mleka z potwierdzonym subklinicznym zapaleniem wymienia. Literatura donosi o dużych rozbieżnościach, jeśli chodzi o częstość występowania *E. faecalis* w mleku krów z subklinicznym *mastitis* – wynosi ona od poniżej 1% do nawet około 20%. Najczęściej występującym genem kodującym wirulencję w izolatach *E. faecalis* z Chin był *efaA* – wystąpił u aż 91,4% szczepów. Kolejne pod względem częstości były geny: *esp* (85,2%), *gelE* (70,4%),

asa (24,7%), *ace* (19,8%) i wreszcie *hly* – tylko 2,5% izolatów. Ponadto 95,1% izolatów posiadało minimum 2 geny patogeniczności [17, 47].

Badania przeprowadzone przez Erbas i wsp. [17] wykazały, że w 15,6% prób mleka ćwiartkowego czynnikiem etiologicznym *mastitis* były *Enterococcus* spp. Gatunkiem dominującym był *E. faecalis* (59,6% izolatów), zaś szczepy *E. faecium* – stanowiły 21,3%.

5. Listerioza

W obrębie rodzaju *Listeria* występują szczepy potencjalnie chorobotwórcze. Głównym gatunkiem, związanym z listeriozą u ludzi i zwierząt jest *Listeria monocytogenes*. Zagrożeniem dla zdrowia są głównie trzy serotypy tego gatunku: 1/2a i 1/2b (najczęściej identyfikowane w żywności) oraz 4b (izolowany od pacjentów klinicznych) [34]. Podstawowym wektorem zakażenia ludzi są zanieczyszczone patogenem produkty spożywcze. Kontrolę nad występowaniem *L. monocytogenes* w żywności utrudnia fakt, że może infekować również zwierzęta gospodarskie (w tym przeżuwacze). Gatunek ten ma większe pole do transmisji na ludzi poprzez swój zoonotyczny charakter. Najczęściej *Listeria monocytogenes* atakuje ludzi o obniżonej odporności, w podeszłym wieku, kobiety w ciąży oraz niemowlęta. Stąd określa się te bakterie jako patogeny oportunistyczne. Nie zmienia to jednak faktu, że infekcja niejednokrotnie kończy się zgonem pacjenta. Niepokojące dane w tym temacie prezentuje Europejski Urząd do spraw Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). Z raportu o zoonozach na rok 2019 wynika, że aż 17,6% przypadków listeriozy w krajach Unii Europejskiej było śmiertelnych. Dane z lat wcześniejszych (2018 i 2017 – odpowiednio 13,6 i 15,6%) również są bardzo niekorzystne [18, 43].

Dawkę zakaźną, wywołującą listeriozę u jednego człowieka, oszacowano na ok. 10² do 10⁶ komórek – w zależności od kondycji immunologicznej gospodarza. Schładzanie żywności (w tym mleka surowego) nie stanowi strategii eliminacji *L. monocytogenes*, ponieważ są one psychrotrofowe. Skuteczną metodą inaktywacji tych bakterii jest ogrzewanie pokarmu w temperaturze ok. 70°C przez kilka minut lub pełne zagotowanie [1, 31, 43].

Podstawowe objawy listeriozy u ludzi to: gorączka, wodnista biegunka, mdłości, bóle głowy stawów oraz mięśni. U kobiet ciężarnych może wywołać zapalenie błon płodowych, a nawet poronienie. Ogółem może skończyć się zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych, zapaleniem mózgu, bakteriecią lub ostatecznie – sepsą [1].

Drogą pokarmową *L. monocytogenes* trafia do organizmu, gdzie dochodzi do infekcji komórek jelita cienkiego poprzez aktywną fagocytozę. Proces ten jest

możliwy dzięki specyficznym bakteryjnym białkom powierzchniowym: m.in. internalinom InlA i InlB oraz poprzez białko Ami. Błona powstałego fagosomu jest degradowana poprzez hemolizynę (listeriolizynę O) oraz fosfolipazy i rozpoczyna się namnażanie bakterii w cytozolu komórkowym. Bakterie nabywają możliwość ruchu w obrębie komórki, poprzez pobór aktyny z cytoszkieletu gospodarza (z udziałem białka ActA). W błonie zainfekowanej komórki bakterie tworzą wypustki, które są fagocytowane przez sąsiednie komórki. W ten sposób powstaje fagosom podwójny z *L. monocytogenes* w środku. Wspomniane procesy umożliwiają bakterii namnażanie oraz rozprzestrzenianie się. Część bakterii przedostaje się do krwi i limfy, i dociera do śledziony oraz wątroby. Jeżeli przetrwają w tych narządach, to po ok. 20–30 dniach są wyrzucane do krwiobiegu i poważnie infekują organizm. Geny, kodujące czynniki wirulencji są regulowane m.in. przez aktywator transkrypcji PrfA [43].

W otoczeniu bydła mlecznego *L. monocytogenes* występuje dość powszechnie – można wyizolować ją z wody, paszy, cząstek gleby oraz ściółki. Listerioza u tych zwierząt jest jednak rzadka, a może objawiać się w różny sposób: w formie zapalenia opon mózgowych i mózgu, posocznicy lub – u ciężarnych samic – poronienia. Sporadycznie *L. monocytogenes* mają związek z zapaleniem gruczołu mlekowego u krów. Obecność bakterii u bydła nie zawsze powoduje objawy chorobowe – nosiciel wówczas tylko wydala te drobnoustroje wraz z kałem. Badania na temat wydalania *L. monocytogenes* przez bydło mleczne przeprowadzono m.in. w Stanach Zjednoczonych. Wyizolowano wówczas te bakterie z 31% próbek kału i z 38% próbek kiszonki, którą karmiono zwierzęta. Co zaskakujące, aż 94% krów wydalało je przynajmniej raz w okresie badania co potwierdza, że spożyta *L. monocytogenes* często tylko przechodzi przez przewód pokarmowy krowy bez powodowania infekcji [23, 31, 33].

W świetle powyższych danych skażenie zewnętrzne mleka surowego przez *L. monocytogenes* jest możliwe i udokumentowane. Można w tym miejscu przytoczyć również przykłady z krajów Europejskich.

W trakcie badań przeprowadzonych na Łotwie nie wykryto *L. monocytogenes* w próbkach z gospodarstwa ekologicznego, natomiast 1,4% próbek z gospodarstwa konwencjonalnego było zanieczyszczonych tymi bakteriami, obecność patogenów potwierdzono również w 20% próbek paszy [33]. Z kolei we Włoszech w latach 2010–2013 prowadzono badania dotyczące obecności *L. monocytogenes* w surowym mleku (mleko luzem i z automatów sprzedających) – wówczas gatunek ten wykryto w 1,66% próbek. Autorzy badań zaznaczyli, że ponad 80% skażonych próbek zawierało mniej niż 10 j.t.k. · ml⁻¹ *L. monocytogenes* [11]. Masową listeriozę u ludzi, którą oficjalnie uznano za spowodo-

waną przez mleko surowe, była epidemia w Niemczech w latach 1949–1957 [35].

Jak już wspomniano, *Listeria* spp. (w tym *L. monocytogenes*) może być przyczyną zapalenia wymienia (klinicznego i subklinicznego) u bydła mlecznego. Wówczas mleko skażone jest w sposób pierwotny (wewnętrzny). Za przykład mogą posłużyć badania z Irlandii gdzie zbadano krowy mleczne oraz ich środowisko bytowe. W próbkach środowiskowych nie znaleziono *L. monocytogenes*, jednak stwierdzono jej obecność w jednej z 4 ćwiartek u jednej krowy. Zarażona krowa nie miała żadnych objawów klinicznych choroby, a wygląd mleka nie wykazywał żadnych nieprawidłowości [24]. Wiedzy na temat obecności *L. monocytogenes* w mleku dostarczają również wyniki z Iranu, gdzie zbadano mleko krów chorych na *mastitis* i określono w nim obecność oraz dokonano identyfikacji kluczowych serotypów *L. monocytogenes*. Patogeny te znaleziono 8,2% próbek, a wśród izolatów przeważały 2 serotypy: 4b (47,1%) oraz 1/2a (41,2%). Były to serotypy związane również z infekcjami u ludzi [30].

6. Podsumowanie

Spożycie mleka surowego może przynosić korzyści prozdrowotne, gdyż nie zostało ono pozbawione części składników odżywczych i zawiera żywe kultury wartościowych bakterii mlekowych. Niestety, mleko surowe, nie poddane pasteryzacji, może stanowić istotne źródło drobnoustrojów patogennych przenoszonych drogą pokarmową. Według danych literaturowych ponad połowa badanych próbek mleka surowego zawiera *Escherichia coli*. Najbardziej niebezpiecznym z węgetatywnych patogenów związanych z surowym mlekiem jest *E. coli* typu VTEC, wytwarzająca werocytotoksyny – zwłaszcza szczep O157:H7. Skażenie mleka przez *Salmonella* spp. najczęściej ma charakter wtórny poprzez odchody krowie lub zaniedbania ludzi. *Enterococcus* spp. jest częstym czynnikiem etiologicznego zapalenia wymienia u bydła – według danych z różnych krajów nawet do 50% przypadków – dlatego też często wykrywane są w mleku surowym, stwarzając tym samym zagrożenie dla konsumentów. *Listeria monocytogenes* wykrywana jest w mleku rzadko – zawiera ją nie więcej niż 2% próbek – jednak nadal może stanowić istotny problem zdrowotny. Konsumpcja mleka surowego jest dobrym wyborem, pod warunkiem, że mamy gwarancję wysokiego poziomu higienicznego jego pozyskiwania.

Piśmiennictwo

1. Adzitey F., Huda N.: *Listeria monocytogenes* in foods: incidences and possible control measures. *Afr. J. Microbiol. Res.* **25**, 2848–2855 (2010)

2. Amin W.F., Ahmed E.H., Embarak M.S., Abo-Shama U.H., Thabit A.G., Ismail S.Y.: Molecular detection of enterotoxigenic *E. coli* in raw milk and milk products. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **11**, 856–864 (2017)
3. Astrup A., Dyerberg J., Elwood P., Hermansen K., Hu F.B., Jakobsen M.U., Kok F.J., Krauss R.M., Lecerf J.M., LeGrand P., Nestel P.: The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010? *Am. J. Clin. Nutr.* **4**, 684–688 (2011)
4. Baylis C.L.: Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Int. J. Dairy Technol.* **3**, 293–307 (2009)
5. Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Dahbi G., Alonso M.P., González E.A., Bernárdez M.I., Blanco J.: Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-ξ). *J. Clin. Microbiol.* **2**, 645–651 (2004)
6. Bolton D.J., Ennis C., McDowell D.: Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from twelve bovine farms in the north-east of Ireland. *Zoonoses Public Health*, **2**, 149–156 (2014)
7. Burland V., Shao Y., Perna N.T., Plunkett G., Blattner F.R., Sofia H.J.: The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res.* **18**, 4196–4204 (1998)
8. Centers for Disease Control and Prevention: *Salmonella* Typhimurium infection associated with raw milk and cheese consumption – Pennsylvania, 2007. *MMWR – Morbid. Mortal. W.* **44**, 1161–1164 (2007)
9. Centers for Disease Control and Prevention: *Escherichia coli* O157:H7 infections in children associated with raw milk and raw colostrum from cows – California, 2006. *MMWR – Morbid. Mortal. W.* **23**, 625–628 (2008)
10. Chlebicz A., Śliżewska K.: Campylobacteriosis, salmonellosis, yersiniosis, and listeriosis as zoonotic foodborne diseases: a review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **5**, 01–29 (2018)
11. Dalzini E., Bernini V., Bertasi B., Daminelli P., Losio M.N., Varisco G.: Survey of prevalence and seasonal variability of *Listeria monocytogenes* in raw cow milk from Northern Italy. *Food Control*, **60**, 466–470 (2016)
12. Denny J., Bhat M., Eckmann K.: Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with raw milk consumption in the Pacific Northwest. *Foodborne Pathog. Dis.* **3**, 321–328 (2008)
13. El Nahas A.W., Mohamed H.A., El Barbary H.A., Mohamed H.S.: Incidence of *E. coli* in raw milk and its products. *Benha Vet. Med. J.* **1**, 112–117 (2015)
14. El-Baz A.H., El-Sherbini M., Abdelkhalek A., Al-Ashmawy M.A.: Prevalence and molecular characterization of *Salmonella* serovars in milk and cheese in Mansoura city, Egypt. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* **1**, 45–51 (2017)
15. El-Tawab A., Ashraf A., Nabih A.M., Agag M.A., Ali A., Marwah H.: Molecular studies of virulence genes of *Salmonella* Typhimurium causing clinical mastitis in dairy cattle. *Benha Vet. Med. J.* **2**, 27–37 (2017)
16. Eng S.K., Pusparajah P., Ab Mutalib N.S., Ser H.L., Chan K.G., Lee L.H.: *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front. Life Sci.* **3**, 284–293 (2015)
17. Erbas G., Parin U., Turkyilmaz S., Ucan N., Ozturk M., Kaya O.: Distribution of antibiotic resistance genes in *Enterococcus* spp. isolated from mastitis bovine milk. *Acta Vet.* **3**, 336–346 (2016)
18. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control: The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2**, e06406 (2021)
19. Garsin D.A., Frank K.L., Silanpää J., Ausubel F.M., Hartke A., Shankar N., Murray B.E.: Pathogenesis and models of enterococcal infection. [w] *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Gilmore M.S., Clewell D.B., Ike Y. (eds), Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24649510/> (06.12.2021)
20. Giraffa G.: Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* **2**, 163–171 (2002)
21. Hammerum A.M.: Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**, 619–625 (2012)
22. Hinthong W., Pumipuntu N., Santajit S., Kulpeanpraisit S., Buranasinsup S., Sookrung N., Chaicumpa W., Aiumurai P., Indrawattana N.: Detection and drug resistance profile of *Escherichia coli* from subclinical mastitis cows and water supply in dairy farms in Saraburi Province, Thailand. *Peer J.* **5**, e3431 (2017)
23. Ho A.J., Ivanek R., Gröhn Y.T., Nightingale K.K., Wiedmann M.: *Listeria monocytogenes* fecal shedding in dairy cattle shows high levels of day-to-day variation and includes outbreaks and sporadic cases of shedding of specific *L. monocytogenes* subtypes. *Prev. Vet. Med.* **4**, 287–305 (2007)
24. Hunt K., Drummond N., Murphy M., Butler F., Buckley J., Jordan K.: A case of bovine raw milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Irish Vet. J.* **1**, 01–05 (2012)
25. Hurtado A., Oejo M., Oporto B.: *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* shedding in domestic ruminants and characterization of potentially pathogenic strains. *Vet. Microbiol.* **210**, 71–76 (2017)
26. Hussein H.S., Sakuma T.: Invited review: prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *J. Dairy Sci.* **2**, 450–465 (2005)
27. Iweriebor B.C., Obi L.C., Okoh A.I.: Macrolide, glycopeptide resistance and virulence genes in *Enterococcus* species isolates from dairy cattle. *J. Med. Microbiol.* **7**, 641–648 (2016)
28. Jaakkonen A., Salmenlinna S., Rimhanen-Finne R., Lundström H., Heinikainen S., Hakkinen M., Hallanvuo S.: Severe outbreak of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 via unpasteurized milk and farm visits, Finland 2012. *Zoonoses Public Health*, **6**, 468–475 (2017)
29. Jackson C.R., Lombard J.E., Dargatz D.A., Fedorka-Cray P.J.: Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from US dairy cattle. *J. Appl. Microbiol.* **4**, 1269–1278 (2011)
30. Jamali H., Radmehr B.: Frequency, virulence genes and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. isolated from bovine clinical mastitis. *Vet. J.* **2**, 541–542 (2013)
31. Jemmi T., Stephan R.: *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Rev. Sci. Tech.* **2**, 571–80 (2006)
32. Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.: 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123–140 (2004)
33. Konosonoka I.H., Jemeljanovs A., Osmans B., Ikaunieca D., Gulbe G.: Incidence of *Listeria* spp. in dairy cows feed and raw milk in Latvia. *Int. Scholarly Res. Not.* DOI: 10.5402/2012/435187 (2012)
34. Lewańska M., Godela A., Myga-Nowak M.: *Listerioza*. Współczesne postrzeganie zagrożenia epidemiologicznego. *Post. Mikrobiol.* **2**, 106–116 (2018)
35. Lundén J., Tolvanen R., Korkeala H.: Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *J. Dairy Sci.* **87**, 06–12 (2004)
36. Monaghan A., Byrne B., Fanning S., Sweeney T., McDowell D., Bolton D.J.: Serotypes and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from bovine farms and abattoirs. *J. Appl. Microbiol.* **2**, 595–603 (2013)

37. Mylius M., Dreesman J., Pulz M., Pallasch G., Beyrer K., Claußen K., Allerberger F., Fruth A., Lang C., Prager R., Flieger A.: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103: H2 outbreak in Germany after school trip to Austria due to raw cow milk, 2017 – The important role of international collaboration for outbreak investigations. *Int. J. Med. Microbiol.* **5**, 539–544 (2018)
38. Orden J.A., Cid D., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Garcia S., Martinez S., De la Fuente R.: Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. *J. Appl. Microbiol.* **1**, 29–35 (2002)
39. Panel E.B.: Scientific opinion of the Panel on BIOHAZ on a request from EFSA on monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp. *EFSA J.* **12**, 595 (2007)
40. Pelzer K.D., Currin N.: Zoonotic diseases of cattle. Virginia Cooperative Extension, <https://vtechworks.lib.vt.edu/bitstream/handle/10919/50703/400-460.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (06.12.2021)
41. Shafeek M., El-Malt L., Abdel Hameed K., El-Zamkan M.: Some virulence genes of pathogenic Enterococci isolated from raw milk and some milk products. *SVU – Int. J. Vet. Sci.* **1**, 102–113 (2018)
42. Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P.A., Teixeira P.: *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Front. Microbiol.* **2**, 01–12 (2011)
43. Sołtysiuk M., Sztetyn J., Wiszniewska-Łaszczych A.: Bakterie z rodzaju *Listeria* zagrożeniem dla zdrowia ludzi i zwierząt. *Med. Weter.* **4**, 214–220 (2019)
44. Vanitha H.D., Sethulekshmi C., Latha C., Prejit R., Mercey K.A.: Molecular detection of enterohae-morrhagic *Escherichia coli* in raw milk samples of Thrissur. *J. Vet. Anim. Sci.* **1**, 44–47 (2018)
45. Vu J., Carvalho J.: Enterococcus: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. *Front. Biol.* **5**, 357–366 (2011)
46. Wennerås C., Erling V.: Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* – associated diarrhoea and carrier state in the developing world. *J. Health Popul. Nutr.* **4**, 370–382 (2004)
47. Yang F., Zhang S., Shang X., Wang X., Yan Z., Li H., Li J.: Antimicrobial resistance and virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China. *J. Dairy Sci.* **1**, 140–144 (2019)

ENZYMATIC AND NON-ENZYMATIC RESPONSE DURING NITROSATIVE STRESS IN *ESCHERICHIA COLI*

Rohan Nath^a, Swarnab Sengupta^a, Arindam Bhattacharjee^{*}

Department of Microbiology, University of North Bengal

^aContributed equally

Received in November 2021, accepted in April 2022

Abstract: Nitrosative stress is an adverse physiological condition mediated by an excessive level of reactive nitrogen species (RNS). RNS react with the different macromolecules *in vivo* and result in the inactivation of these molecules. But the mechanism to counteract the effect of nitrosative stress is poorly understood. *Escherichia coli* is one of the best understood and well-studied microorganism. Although several studies have been reported on *Escherichia coli* to characterize the effect of various stress response but fewer works are there to see the effect of nitrosative stress. *Escherichia coli* encounter numerous stresses during its growth, survival, and infection. They respond to various stress conditions by activating common regulator proteins and thiols. These stress conditions result in the accumulation of these regulator proteins and thiols that allow cells to adjust to specific stress situations, conferring stress tolerance and survival. In this review, different enzymatic and non-enzymatic mechanisms to counteract the effect of nitrosative stress in *Escherichia coli* have been discussed and a hypothesis for the working mechanism of hybrid cluster protein that helps to combat nitrosative stress has been proposed. Here, we have tried to give a clear scenario about the mode of action of stress-responsive elements present in *Escherichia coli*.

1. Introduction. 2. *Escherichia coli* and nitrosative stress. 2.1. Protein damage caused by nitrosative stress. 2.2. DNA damage caused by nitrosative stress. 3. Nitrosative stress response components in *Escherichia coli*. 3.1. Flavohemoglobin. 3.2. Cytochrome *c* peroxidase (Ccp1). 3.3. Flavorubredoxin. 3.4. Catalase. 3.5. Superoxide dismutase (SOD). 3.6. Cytochrome *c* nitrite reductase (NrfA). 3.7. Hybrid cluster protein (HCP). 3.8. Tripeptide glutathione. 3.9. Cytochrome *bd* oxidase. 4. Summary

Keywords: *Escherichia coli*, nitrosative stress, protein tyrosine nitration, reactive nitrogen species, stress response

Abbreviations:

Ccp: Cytochrome *c* peroxidase, **flavoHbs/Hmp:** Flavohemoglobin, **flavoRbs:** Flavorubredoxin, **GSH:** Reduced glutathione, **GSNO:** S-Nitrosoglutathione, **GSSG:** Oxidized glutathione, **k_m:** Michaelis-Menten constant, **ROO:** Rubredoxin O₂ oxidoreductase, **ROS:** reactive oxygen species, **SNP:** Sodium nitroprusside

1. Introduction

In biology, a deleterious factor or any condition adversely affecting living cells' growth or survival could be stress [117]. Stresses like osmotic, cold, acid, heat, metal, oxidative, nitrosative, etc., challenge these microorganisms in their natural habitat [5, 12, 22, 43, 76, 78, 87, 108, 113]. In case of oxidative stress, the cellular redox homeostasis changes due to the elevated production of different reactive oxygen species (ROS) like superoxide (O₂•), peroxy (ROO•), singlet oxygen (O), semiquinone radical (HQ•), alkyl radical, alkoxy (RO•), ozone (O₃), hydroxyl (OH•) [43]. While nitrosative stress mediates by reactive nitrogen species (RNS), which formed due to reactions between NO• and ROS like peroxynitrite (ONOO⁻), alkyl peroxynitrites (ROONO), dinitrogen trioxide (N₂O₃), dinitrogen tetroxide (N₂O₄),

nitrous acid (HNO₂), nitronium ion (NO₂⁺), nitroxyl anion (NO⁻), nitrosonium ion (NO⁺), nitryl chloride (NO₂Cl) which can quickly react with different macromolecules *in vivo* [54, 60, 79, 96]. "Nitrosative stress" was coined by Stamler (1996), where reactive nitrogen species (RNS) were involved in mediating the stress. NO• is a small lipophilic molecule that also acts as a cell-signaling molecule *in vivo* [5, 12, 54, 60, 78, 79, 96]. A low amount of NO• helps in cell signaling and defense [80]. However, the elevation in NO• can cause an environment hazardous to microorganisms. This elevated level of NO• creates a toxic condition, which directly alters the stability of various lipids, proteins, enzymes of critical metabolic pathways, replication, transcription, and translation machinery, which makes it difficult for the microorganisms to survive [70, 73]. NO• synthesis within the cell during the catalytic conversion of

* Corresponding author: Arindam Bhattacharjee, Department of Microbiology, University of North Bengal, Raja Rammohunpur, Siliguri, Darjeeling, West Bengal, India, 734013; aribiochem@gmail.com, abmicrobio@nbu.ac.in

© 2022 Rohan Nath 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/>)

L-arginine to L-citrulline by nitric oxide synthases (NOSs) is carried out [79]. Research related to NOS in prokaryotes has shown a similar molecular activity compared to their mammalian counterparts. NO• is also generated during the nitrite respiration in several bacteria, including *E. coli*, by the activity of nitrite reductase [21].

To counteract the effect of reactive nitrogen species, *E. coli* activates a sensing mechanism that can lead to a programmed molecular response within the cell, otherwise known as “nitrosative stress response,” which is crucial for their survival and adaptation [53, 62]. Reports on cellular components like flavohemoglobin (HmpA), flavorubredoxin, cytochrome *c* nitrite reductase (NrfA), cytochrome *c* peroxidase, catalase, low molecular weight thiols, cytochrome *bd* oxidase, like enzymes are known to act as the stress response enzyme under nitrosative stress in different microorganisms, but the mechanisms are not well established [7, 19, 25, 35, 36, 101]. It is vital to characterize the counteracting mechanisms of microorganisms like *E. coli*, to understand the physicochemical condition of the cells during nitrosative stress.

Although *E. coli* has one of the most well-understood biochemical systems, very minimal studies concerning nitrosative stress are present. Thus, in this review, the response of *E. coli* under nitrosative stress was extensively studied. The mechanism of action of these components under nitrosative stress needs more studies [19, 25]. In this paper, we have attempted to characterize various cellular components of *E. coli* and their mechanism of action, which are involved in counteracting the nitrosative insults.

2. *Escherichia coli* and nitrosative stress

As an opportunistic pathogen, *E. coli* must enter the host and adapt to its environment while the host tries to eliminate the invading pathogens. Host organism secretes many types of antibacterial and antiviral molecules via their defense systems like the activated macrophages and neutrophils. Reactive species like NO• and ROS, and RNS are released [17, 88]. So the *E. coli* have to survive under the presence of ROS and RNS that can specifically damage bacterial lipids, proteins, and DNA. Along with the host cell, even bacterial cells could produce NO•.

In some cases, the denitrifying bacteria produces NO• as an obligate metabolic intermediate where the carbon (C) to NO₃⁻ ratio is strictly maintained [94, 95]. However, denitrifying bacteria are not very common in the gastrointestinal tract, where C to NO₃⁻ ratio is very high. Meanwhile, *E. coli* in the gut can reduce NO₃⁻/NO₂⁻ to ammonia [21, 102, 111], thus increasing the cells protection against nitrosative stress.

2.1. Protein damage caused by nitrosative stress

NO• is capable of inhibiting and modulating enzymes containing metal centers such as the [4Fe-4S] cluster of fumarate and nitrate reductase (FNR), heme iron center of guanylate cyclase and the [2Fe-2S]²⁺ of SoxR, carbonic anhydrase, catalase [24, 92]. Another inhibitory effect, i.e., nitration of tyrosine, is caused by RNS [47, 81]. Nitrosative agents directly bind and inhibit metabolic enzymes such as aconitase [51], terminal respiratory oxidases, etc., in *E. coli* [11]. Proteomic studies on the *E. coli* YtfE protein revealed a vital role in repairing the iron-sulfur cluster proteins [56]. In a cellular environment, NO• readily reacts with superoxide anion (O₂⁻) to produce peroxynitrite (ONOO⁻) [83]. Peroxynitrite readily reacts with carbon dioxide (CO₂) to produce ONOOCO₂⁻, which decomposes to give carbonate radical anion and NO₂⁻. This form of peroxynitrite can nitrate aromatic amino acids of protein like the tyrosine residues. Peroxynitrite is very toxic and can react to modify cysteine, tryptophan, and methionine residues of proteins [3]. One of the significant concerns of protein modification by the nitrating agent is protein tyrosine nitration (PTN) which may lead to the inactivation of most proteins in microorganisms [11, 24, 47, 51, 81].

Protein tyrosine nitration is a well-known effect of nitrosative stress within the cell. Nitrosants target the side chains of tyrosine in proteins [81], resulting in the formation of 3-nitrotyrosine. This specific reaction may lead to indiscriminate damage and irreversible modifications of various proteins, including those involved in stress responses like SODs. Usually, manganese superoxide dismutase (MnSOD) uses O₂⁻ as the critical substrate, but in the presence of the nitrating agent, pK_a of -OH of tyrosine gets decreased in such a way that may lead to a change in the redox status resulting in inhibition of the enzyme [82]. In *E. coli*, AtpA, AceF, FabB, GapA, IlvC, and TufA proteins contain RNS sensitive cysteine molecules [14]. In *E. coli*, dihydrolipoyltransacetylase (AceF) can scavenge environmental toxins such as arsenic in the cell. RNS can bind and modify the two vicinal thiol groups of AceF. That may lead to the inactivation of the protein [14]. In type II fatty acid biosynthesis, a carrier protein, namely 3-oxoacyl (acyl carrier protein) synthase I (FabB), plays a vital role where the FabB protein contains a highly conserved cysteine molecule that is vital for its catalytic activity. Modification of this conserved site leads to an interruption in fatty acid synthesis and thermoregulation of membrane fluidity [14].

2.2. DNA damage caused by nitrosative stress

At the time of nitrate to nitrite metabolism, reactive NO• and HNO₂ are formed. NO• does not directly react with DNA, but when it oxidizes to N₂O₃, it becomes

a robust nitrating agent, then it can damage DNA. N_2O_3 reacts with nucleotides having exocyclic amino groups like guanine, cytosine, and adenine, converted to uracil, xanthine, and hypoxanthine, respectively [97]. The exocyclic nucleotide amines can generate unstable N-nitroso ($-N-N=O$) derivatives, later deaminated. If not repaired by a cellular repair mechanism, these damaged bases are deleterious for the cell [97]. Cellular secondary amines and amides can be nitrated and may produce alkylating agents that lead to mutation in different sites of DNA. Nitrosative mutagenesis is very prominent when cells from a nitrate-dependent atmosphere shift to oxygen-dependent respiration [111]. Scientific reports have linked the overproduction of $NO\bullet$, which subsequently reacts with superoxide anion to form N_2O_3 during this period, causing nucleobase deamination like the formation of 2'-deoxyxanthosine (dX) and 2'-deoxyoxanosine (dO) from guanine, etc. [28, 111].

3. Nitrosative stress response components in *Escherichia coli*

Although not many components of nitrosative stress response in *E. coli* are fully understood, both enzymatic and non-enzymatic components are involved in combating the hostile situation. Some of those mechanisms involved in the nitrosative stress response will be discussed below in this paper.

3.1. Flavohemoglobin

Flavohemoglobin (HmpA) is a 44 kDa monomer in which two different modules get fused to form a multi-domain protein [115]. It was the first flavoHb's family protein, discovered in *E. coli* in 1991. An 1191 bp DNA fragment encodes this protein, and this was the first globin sequence obtained in a microorganism [19, 25, 101]. Regulation of HmpA protein expression by the FeS protein Fnr, which acts as a positive transcription factor [10]. While Fnr protein expression by exogenous signals like redox, oxidative, nitrosative, and anoxic stress is a potent transcription regulator [61]. Nitrating agents like $NO\bullet$, SNP, GSNO, etc., have been shown to induce *hmpA* transcription [2, 101]. While in another experiment carried out by Adolfsen et al. [2] showed that HmpA delayed the detoxification of $NO\bullet$ until oxidative stress agent H_2O_2 was present. Their experiment showed that H_2O_2 downregulated *hmpA* transcription. To understand the molecular mechanism behind this suppression, they used integrated computational modeling and wet-lab data, which showed that the presence of H_2O_2 repressed the transcription and translation of HmpA protein. The mechanism showed a distant similarity with carbon catabolite repression

(CCR), where glucose is the preferred carbon source and is consumed first by the cell, followed by consuming other less preferred carbon sources [2]. The exact mechanism of action needs further research.

To understand the importance of the flavohemoglobin protein in uropathogenic *E. coli*, where these cells in the urinary tracts face high $NO\bullet$ concentrations, generated as part of the host immune response. These experiments showed that isolates from patients with UTI showed a high expression of flavohemoglobin, and it shows the ability of the bacterium to colonize the urinary tract. Results showed *hmpA* mutants were less competitive in colonizing the urinary tracts and were less viable under heavy $NO\bullet$ exposure [13, 101].

Other HmpA protein regulators are MetR protein and NsrR protein [9, 61, 101]. Both of them regulate the HmpA expression in the exact opposite way. MetR is a positive regulator where *metR* mutant results in downregulation of HmpA protein while at the same time *nsrR* mutant shows constitutive HmpA protein expression, thus indicating that NsrR protein negatively regulates *hmpA* transcription [9].

Since most aerobic organisms produce ROS and $NO\bullet$ themselves; hence, they also possess flavohemoglobins (flavoHb) that help them in the detoxification of $NO\bullet$ at O_2 concentrations as low as 35 μM [79]. Interestingly, even the anaerobically growing organisms like the *E. coli* in gut microflora or those present in the urinary tract show efficient $NO\bullet$ detoxification systems. Justino et al. [57], in their article, demonstrated that *E. coli* growing under anaerobic conditions showed $NO\bullet$ detoxification by the protein YtfE and NrdHIEF gene cluster, along with the upregulation of flavohemoglobin (HmpA) and flavorubredoxin (NorV); they also found maximal HmpA expression only after 30–45 minutes under anaerobic condition [57]. Since HmpA protein can detoxify $NO\bullet$ in both aerobic and anaerobic conditions, it has been under the radar of redox biologists. X-ray structure of flavoHb shows that flavoHb's has a C-terminal NAD-binding and FAD-binding domain and a N-terminal globin domain. Purified HmpA possesses heme band FAD, confirmed by the crystal structures of HmpA [115]. Under anaerobic conditions, the heme portion of HmpA protein, i.e., Fe(III), is quickly reduced to Fe(II) by the action of physiological substrates NADPH through electron transfer from FAD. This event enables HmpA to react with $NO\bullet$ and results in highly stable nitrosyl species formation. Again $NO\bullet$ can be reduced to NO^- by transferring one electron from Fe(II). The NO^- is then separated from the complex and converted to N_2O via dimeric species. However, under aerobic conditions, $NO\bullet$ mainly reacts with Fe(II) O_2 , where preliminary a volatile nitrosyldioxygen complex (Fe[II]OONO) forms and nitrate as the final product [57, 101, 115] (Fig. 1). Kim et al. [114] proved

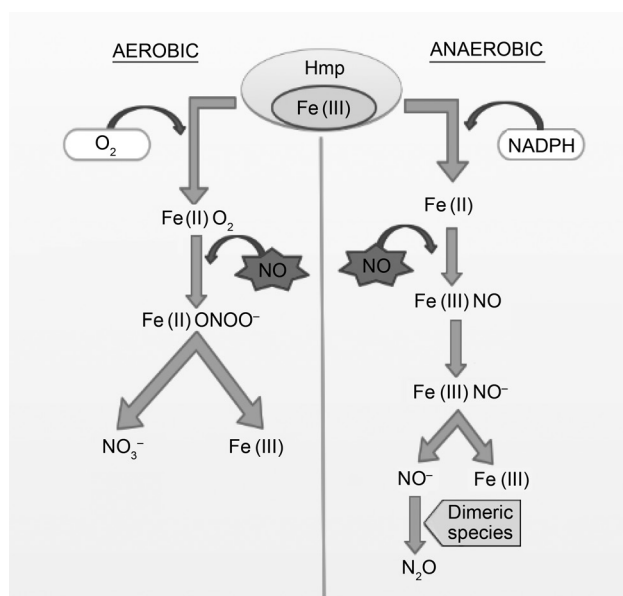


Fig. 1. Mechanism of action of flavohemoglobin under aerobic and anaerobic condition in presence of nitrating agent

Under aerobic condition Fe(II) present in Hmp remains associated with O_2 to form $Fe(II) O_2$ complex. Under nitrosative stress in presence of NO, it forms nitrosyldioxygen complex ($Fe(II) ONO$) and this complex ultimately breaks down to nitrate (NO_3^-) and heme group returns back to its original state [$Fe(III)$]. Under anaerobic condition, NO• reacts with Fe(II) and $Fe(III)NO$ is formed. $Fe(III)NO$ is again broken down to NO^- and then it is converted to N_2O via dimeric species.

spectrophotometrically that HmpA could bind NO• reversibly. The kinetics of the reaction of NO• and HmpA is estimated using stopped-flow analysis. After the flow of an anoxic mixture of HmpA and NO• stops, the maximum absorbance was at 422.5 nm, 534 nm, and 568 nm. It indicated the formation of nitrosyl complexes [114]. The mechanism of action of HmpA has some similarities with the action of cytochrome *c*, a vital stress response enzyme. Cytochrome *c* reacts with NO• of SNP in the Fe(II) state [23]. Similarly, HmpA reacts with NO• in the Fe(III) state, and nitrosyl complex formation occurs. Ferric-nitrosyl spectra predominate at high O_2 concentrations. This observation indicates that HmpA can nullify the activity of reactive NO• [45]. The NO• mediated inactivation of aconitase, reported earlier, is also diminished by the activity of flavoHb in the presence of O_2 . Experimentally it has been proved that under oxic conditions, elevated flavoHb can protect aconitase activity in gas mixtures containing 240 ppm NO•. This NO• metabolism for the protection and survival of *E. coli* is crucial [39].

3.2. Cytochrome *c* peroxidase (Ccp1)

Cytochrome *c* peroxidase (Ccp1) is the first heme enzyme analyzed with the help of its crystal structure. This enzyme can rapidly bind with cytochrome *c*. It also

shows the ability to react with hydroperoxides which oxidize the enzyme. It has a highly α -helical structure with a cylindrical shape. The heme group is present in a hydrophobic pocket in the protein, coordinated by the N ϵ 2 atom of H175, the only axial ligand to the heme iron. The sixth coordinate position remains vacant or engaged by a water molecule is available for binding to the peroxide substrate. Ccp1 heme contains a high-spin ($S = 5/2$) paramagnetic Fe(III) atom in the ground state. During the catalytic cycle, Fe(III) atom then oxidizes to a $Fe(IV)=O$ oxyferryl intermediate [25, 32, 59]. Some reports revealed that Ccp1 is efficiently active against H_2O_2 and efficiently active against $ONOO^-$ [32]. A recent report suggests that in *E. coli*, Ccp1 can use H_2O_2 as the terminal electron acceptor under anoxic conditions [59]. Peroxynitrous acid [$ONOO(H)$] and its conjugate base ($ONOO^-$) both undergo non-enzymatic and enzymatic reactions. Peroxynitrous acid is responsible for the production of sulfonic and sulfinic acids in critical metabolic enzymes such as aconitase [44] and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [67]. Peroxynitrite also promotes the nitrotyrosine formation of manganese superoxide dismutase (MnSOD), a critical antioxidant enzyme [116].

Cells must be able to identify and detoxify $ONOO(H)$ because of its potential toxicity. Like H_2O_2 , $ONOO(H)$ also binds to the heme moiety and forms an intermediate termed Compound I (Cmpd I) by oxidizing two-electron of peroxidases. The heterolytic cleavage of the $ONOOH$ results in the formation of NO_2^- which cannot diffuse from the active site of the enzymes like horseradish peroxidase (HRP), myeloperoxidase (MPO), and lactoperoxidase (LPO) but gets readily oxidized by the action of Cmpd I to give Cmpd II and $NO_2^\bullet$. This Cmpd II then transports $NO_2^\bullet$ out from the enzyme active site (Fig. 2). So, not surprisingly,

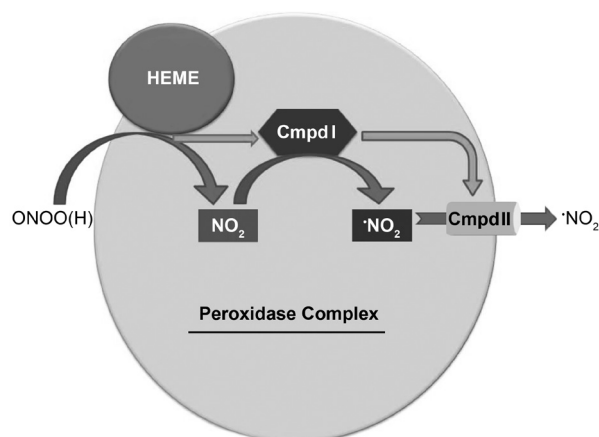


Fig. 2. Mechanism of action of cytochrome *c* peroxidase
Sequential transformation of peroxynitrite ($ONOO^-$) to nitrite NO_2^- . The nitrite (NO_2^-) formed by the action of Compound I (Cmpd I) diffuses out of the cell by the action of Compound II (Cmpd II).

ONOOH also quickly reacts with H_2O_2 metabolizing enzymes that oxidize NO_2^- to $\bullet\text{NO}_2$, including bacterial peroxiredoxins [16, 116].

Although H_2O_2 and ONOOH are efficient substrates of catalase and peroxidase, their stabilities differ significantly. H_2O_2 is reactive until redox-active metal centers or thiols will deactivate it. This peroxide is an appropriate secondary messenger in cells [34, 100, 105].

Cytochrome *c* peroxidase (Ccp1) reduces H_2O_2 efficiently. Ccp1 is a well-known H_2O_2 scavenger in *E. coli*. To form CmpdI, the ferric heme of Ccp1 rapidly reacts with H_2O_2 , and CmpdI comes back again to its resting stage by the action of two molecules of CycII. Reports suggest H_2O_2 and ONOO(H) involve similar Ccp1-dependent peroxide stress responses in microorganisms [41]. Inorganic peroxides can rapidly react on peroxidases, and peroxides are oxidized [29, 41, 106], making them feasible to act as secondary messengers because of their high specificity, as mentioned in the review article Forman et al. [33]. Reports suggest that the high reactivity of ONOOH towards Ccp1 inhibits signaling. So it is assumed that H_2O_2 and ONOO(H) can elicit a similar antioxidant response when reacting with the sensor Ccp1 [18, 68].

3.3. Flavorubredoxin

Nitric oxide is present throughout the biosphere. In the human body, tightly regulated NO• production generates sufficient NO• to affect neoplastic tissue, pathogens, and gut microflora [31]. Even the nanomolar level of NO• could potentially block the terminal oxidase and respiration [40] and changes the regulatory mechanism of the citric acid cycle by destroying its [4Fe-4S] centers. Also, significant secondary toxicity of NO• may occur via reactivity of ONOO⁻, NO⁻, NO₂⁻, nitrosothiols, and dinitrosyl-iron [55, 58, 75]. *E. coli* can combat this situation by the activity of flavorubredoxin [85].

In *E. coli*, *ygaA* encodes a transcription regulator named b2709, renamed NorR. It regulates the anaerobic NO• reduction and detoxification. Regulation of flavorubredoxin by *ygaK* (redesignated as *norV*), contains a NO•-binding non-heme di-iron center [45]. Facultative eubacteria and anaerobic archaea, including *Desulfovibrio* sp., *Methanococcus* sp., *Treponoma* sp., *Salmonella* sp., *Clostridium* sp., and the photosynthetic cyanobacterium *Synechocystis* sp. also possess the protein flavoRb [50, 71, 115]. *E. coli* flavoRb shares more than 34% amino acid similarity with rubredoxin-oxygen oxidoreductase (ROO) of *Desulfovibrio gigas* [93]. The main distinguishing feature of ROO from flavoRb is that the rubredoxin domain is present as a separate protein. The electrometric properties and Flavin mononucleotide (FMN) stoichiometry proved the presence of the di-iron center in flavoRb of *E. coli* [107]. Reports

suggest that rubredoxin oxidoreductase (Rbo) can also reduce ROS, combating oxidative stress in anaerobes [64]. The protective effect is due to the Rbo reduction of the superoxide oxidized [4Fe-4S] clusters. Again another report suggested that ROO and flavoRb can detoxify NO• in anaerobes lacking nitric oxide reductase (Nor), where O₂ reducing respiratory chains are clearly expressed [45]. Reports have shown that these enzymes can function as NO• and/or O₂ reductases, but *E. coli* flavoRb can only use NO• as the substrate, whereas ROO can use both the NO• and O₂ [85]. The critical catalytic site for NO• reduction is di-ferrous ($\text{Fe}^{2+}\text{-O-Fe}^{2+}$) center. The hypothetical mechanism involves the reduction of NO• by flavoRb via supplying two electrons at the di-ferrous center, which may result in the formation of two nitroxyl anions. The two molecules of nitroxyl anion can bind to form N₂O and water [37]. Another hypothesis suggests that NO• can reduce to $\text{Fe}^{3+}\text{-O-Fe}^{3+}\text{-NO}_2^-(\text{H}^+)$, an intermediate. This intermediate can again react with the second NO• to form N₂O [85] (Fig. 3). This NO• metabolism is crucial for the protection and growth of *E. coli* [45]. The rapid and irreversible O₂-mediated inactivation of NorV in *E. coli* via the formation of intermediates has been reported [38, 50]. Baptista et al. [7] reported that flavorubredoxin is a potent NO• detoxifier under anaerobic conditions. Prolonged exposure to both oxidative and nitrosative stress simultaneously renders it inactivated. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy data showed that the transcription activator NorR lost its activity; thereby, NorR ATPase could not

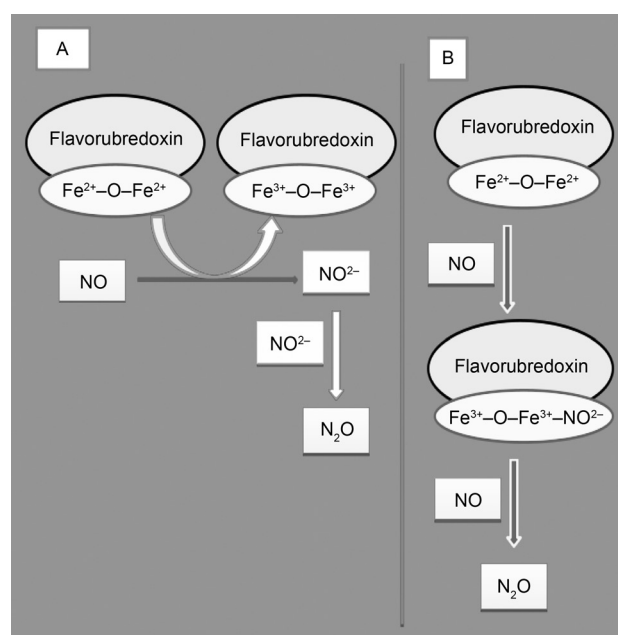


Fig. 3. Mechanism of action of flavorubredoxin

NO• can be reduced to N₂O by two mechanisms involving the [$\text{Fe}^{2+}\text{-O-Fe}^{2+}$]. (A) via formation of NO₂⁻, (B) Formation of N₂O from NO• via formation of [$\text{Fe}^{3+}\text{-O-Fe}^{3+}\text{-NO}_2^-$] as intermediate.

activate flavorubredoxin under double stress conditions [7]. Another report on NO• detoxification showed that the HmpA mode was the dominant system under aerobic conditions while the NorV mode of detoxification was more dominant under anaerobic conditions. Under microaerophilic conditions, *E. coli* NO• detoxification systems HmpA and NorV systems could not optimally function as both systems are severely compromised. Both systems lose approximately 60% of their combined NO• detoxification capacity [84]. *E. coli* has also been isolated from the urinary tract of humans, where they act as opportunistic microbe. Isolates from patients were analyzed, where they showed to have gained a competitive advantage by developing a mechanism to grow under anaerobic conditions in the presence of low concentrations of endogenously generated NO• by reprogramming its transcriptome. Differential gene expression analysis proved that NO• plays a critical role in their pathogenesis. These adaptations might have helped these microorganisms to colonize the bladder during UTIs successfully. Hence, both flavohemoglobin and flavorubredoxin play a vital role in NO• detoxification to keep the level of NO• in check, and at the same time, these low levels of NO• induce the required pathogenic genes required for colonization [69].

3.4. Catalase

Catalase is a well-known stress response enzyme conserved from prokaryotes to eukaryotes. The primary role of catalase is to detoxify H_2O_2 , which helps the cell combat oxidative stress [99]. When oxygen is present in the environment, aerobic bacteria utilize molecular oxygen as a terminal electron acceptor. In the electron reduction step, reactive oxygen species like superoxide ($O_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) form during the conversion of oxygen to water. Hydrogen peroxide gets further degraded into water and oxygen molecules in the presence of catalase. In *Saccharomyces cerevisiae*, catalase not only acts upon hydrogen peroxide but can also detoxify peroxynitrite ($ONOO^-$) [86]. After the generation of peroxynitrite, it can readily react with protein and nucleic acid, leading to cell damage and even death [82, 83]. Some reports speculated that if the concentration of peroxynitrite crosses a certain threshold level, catalase may emerge as protective machinery against peroxynitrite [86].

There are two different catalases in *E. coli*, namely HPI (hydroperoxidase I) and HPII (hydroperoxidase II). HPI, the product of the *katG* gene, is transcriptionally induced during logarithmic growth in response to low concentrations of hydrogen peroxide [72]. HPI is a tetrameric enzyme that contains a protoheme IX prosthetic group larger than the typical 84 kDa subunits. HPII is a mono-functional catalase but is uncommon

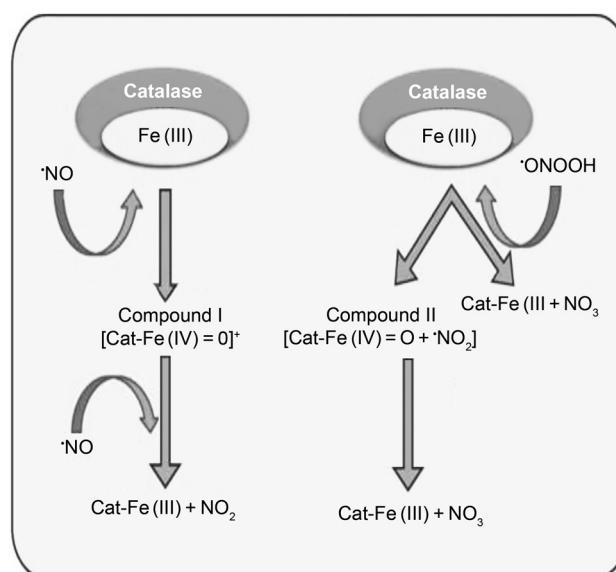


Fig. 4. Mechanism of action of catalase

Catalase has the Fe(III) center which helps in quenching of nitric oxide and peroxynitrite. When catalase encounters NO•, Compound I ([Cat-Fe(IV)=O]⁺) is formed due to oxidation by NO•. When such Compound I again reacts with another NO•, nitrite (NO₂⁻) is formed as end product. On the other hand, when catalase encounters peroxynitrite ((ONOOH), Compound II ([Cat-Fe(IV)=O + •NO₂]) is formed which breaks down to nitrite (NO₃⁻).

in most other respects, including its hexameric structure, the heme-D-like prosthetic group that gives the enzyme its characteristic green color, and the 93 kDa size of the subunit.

The catalase peroxy-nitrito complex formation occurs during the reaction between catalase and peroxynitrite is hypothesized. However, Gebicka and Didik [41] proposed that decay of peroxynitrite does not occur via the formation of compound I ([Cat-Fe(IV)=O]⁺). Unlike the decay of H_2O_2 , the decay of peroxynitrite involves the formation of Compound II ([Cat-Fe(IV)=O + •NO₂]) or peroxynitrite directly converts to nitrate by the action of catalase. Then Compound II is reduced by the action of •NO₂ (Fig. 4). Reports suggest that the increasing catalase concentration reduces peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. It is one of the most substantial evidence of the peroxynitrite scavenging activity of catalase [98]. *In vitro* experiment showed that in the presence of 20 mM NO•, the Soret band of native catalase peak shifted from 406 to 426 nm with an isosbestic point at 415 nm under aerobic and anaerobic conditions. Two new peaks appeared at 540 nm and 575 nm indicating the formation of nitric oxide-catalase complex and ferrous-nitrosyl complex, respectively [15]. Thus, catalase can scavenge the NO• by forming compound II is clearly understood. While NO• can react with compound I of catalase and oxidize to •NO₂. These mechanisms are mainly involved in reducing nitrosative stress effect in *E. coli* [41].

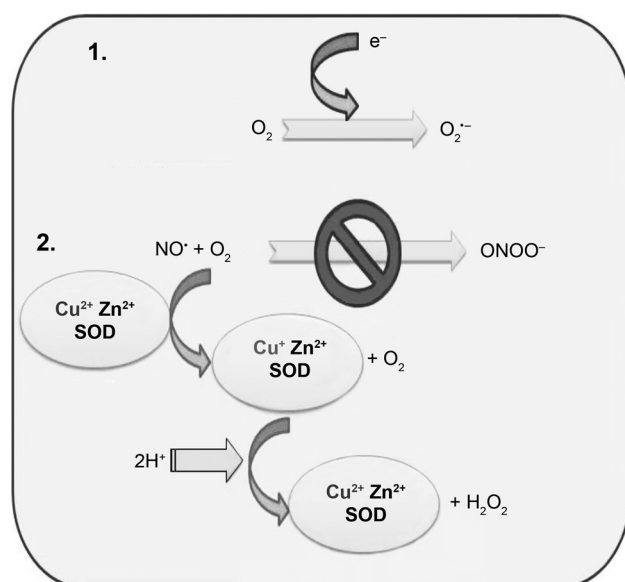


Fig. 5. Mechanism of action of CuZn-SOD

(1) Generation of superoxide (O_2^-) from oxygen by the addition of one electron. (2) The formed superoxide is used up by $Cu^{2+}Zn^{2+}SOD$ where Cu^{2+} is reduced to Cu^+ with the formation of molecular oxygen (O_2). The reduced Cu^+ of CuZn-SOD is again oxidized to Cu^{2+} with the formation of H_2O_2 . In this way CuZn-SOD inhibits the formation of $ONOO^-$ from NO and O_2^- .

3.5. Superoxide dismutase (SOD)

Superoxide dismutase (SOD) is an essential cellular metalloenzyme in prokaryotic and eukaryotic cells that helps to combat or minimize the potential cytotoxicity of the superoxide free radicals. SODs are well known for dismutating superoxide free radicals [52]. The designation of SODs is according to the presence of metal in their metallo-active core. In general, SODs are present in the cytoplasm and periplasmic space of *E. coli*. In *E. coli*, researchers have identified three types of SODs, namely manganese containing SOD (Mn-SOD), iron-containing SOD (Fe-SOD), and copper-zinc containing SOD (CuZn-SOD). Different studies reported that SODs could also act on RNS [65]. This characteristic stress response role is present in CuZn-SOD [1, 49].

CuZn-SOD was first characterized in 1969 by Fridovich and McCord [52]. They found that a blue copper protein could rapidly catalyze superoxide dismutation. Cu/Zn-SOD is a dimeric enzyme that contains zinc and copper, where the histidine imidazole bridges the enzyme's active sites zinc and copper [65]. The zinc present at the active site is bound by aspartate and two histidine molecules with a bridging imidazole, whereas the copper is bound to a water molecule and three additional histidines. In CuZn-SOD, Zn plays a role in stabilizing the protein, and Cu plays an essential role in catalysis via changing its oxidation state Cu^{2+}/Cu^+ [49]. This enzyme is present in the periplasmic space

of *E. coli*, and *sodC* gene encodes this protein. A study reported that CuZn-SOD is synthesized exclusively in the aerobic stationary phase in *E. coli*. Though prokaryotic SOD is structurally different from eukaryotic SOD, the function is similar in both cases [1, 49].

CuZn-SOD cannot directly react with the nitric oxide. Instead, it reacts with the superoxide or ROS. CuZn-SOD inhibits the RNS formation by interacting with the different ROS. So it can lower the ROS level in the cell. Thus, $NO\bullet$ cannot react with the ROS; thus, the formation of different RNS within the cell decreases. Simultaneously dismutation reaction of superoxide by both the oxidation and reduction processes are carried out. The copper (Cu) core of the CuZn-SOD is mainly responsible for the oxidation-reduction reaction. In the first step, one superoxide molecule converts to one molecule of oxygen but simultaneously, Cu^{2+} of CuZn-SOD reduces to Cu^+ . In the second step, Cu^+ of CuZn-SOD oxidizes back to its normal form while O_2 is reduced to H_2O_2 [1] (Fig. 5). This catalysis reaction directly interferes with the peroxynitrite formation by scavenging free *in vivo* superoxide, available for peroxynitrite formation [1].

3.6. Cytochrome c nitrite reductase (NrfA)

E. coli can convert nitrate to ammonium in its membrane with the help of two enzymes, namely periplasmic nitrate reductase and periplasmic nitrite reductase (NrfA). This NrfA can convert nitrate to ammonium by reducing nitrate. However, it can also catalyze the five electron reduction of $NO\bullet$ and two-electron reduction of hydroxylamine [6, 109]. *nrf* operon is mainly responsible for encoding NrfA and NrfB in the *E. coli* chromosome [20]. During the anaerobic growth of *E. coli*, it synthesizes at least five types of *c*-type cytochrome in response to stringent nutritional signals. During anaerobic growth and in the presence of trimethylamine-N-oxide (TMAO), TorC cytochrome formation occurs. Two other *c*-type cytochromes, namely periplasmic *c*-type nitrate reductase and pentaheme cytochrome *c*, are the products of *nrfA* and *nrfB* gene, respectively, located at the *E. coli* chromosome [77]. Nitrite strongly induces the expression of these cytochromes, while nitrate is a weak inducer.

The *nrf* operon encodes the NrfA protein [109]. Cytochrome *c* nitrite reductase embedded in periplasm uses nitrite as a terminal electron acceptor and formate as an electron donor. NrfA activity is strongly suppressed by high nitrate concentration because nitrate is a more potent oxidizing agent, and when available, it is the prime source of energy. *E. coli* holds three protein complexes that can reduce nitrate to nitrite. The *narGHJI* operon and *narZYWV* operon encode cytoplasmic reductases, whereas *nap* operon encodes the periplasmic nitrate reductase of *E. coli* [74, 109].

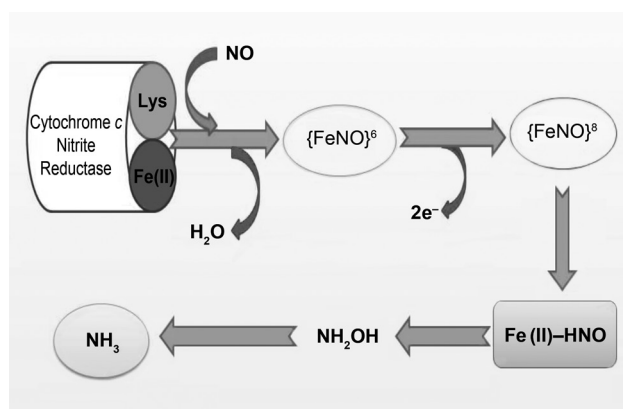


Fig. 6. Mechanism of action of cytochrome *c* nitrite reductase Cytochrome *c* nitrite reductase encounter $\text{NO}\bullet$ and $\{\text{FeNO}\}^6$ is formed with the removal of water, followed by the formation of $\{\text{FeNO}\}^8$ by removing 2 electrons. After that Fe(II)-HNO complex is formed which reduced to hydroxylamine (NH_2OH). Hydroxylamine is again reduced to ammonia (NH_3).

Characterization of the function of cytochrome *c* nitrite reductase by the analysis of reaction intermediates crystallographic structure and density functional calculation. This enzyme converts nitrite to ammonia without forming any potential reaction intermediate. It carries a unique lysine-coordinate heme group (Fe-Lys) [30] which facilitates nitrite reduction by cleaving the N-O bond heterolytically. The cleavage of the N-O bond occurs when the nitrogen interacts with reduced Fe(II) but not with the Fe(III) . This step generates a molecule of water and $\{\text{FeNO}\}^6$ species. Another H-bonding network weakens the N-O bond by introducing an electronic asymmetry in the nitrite molecule. Then, $\text{NO}\bullet$ is reduced rapidly by cytochrome *c* nitrite reductase via the addition of two electrons in *E. coli*. After that, a constructive two-electron two-proton step leads to the formation of hydroxylamine. Hydroxylamine is further dehydrated to give ammonia and water molecule with the help of the two-electron reduction step (Fig 6). The catalytic cycle is closed with a single electron reduction [30, 104].

3.7. Hybrid cluster protein (HCP)

Hybrid cluster protein is commonly known as “Prismane protein,” abundant in *E. coli* and most anaerobic, aerobic, and facultative organisms as a stress response enzyme [103]. An extensive study on this enzyme because of its unusual property of the iron-sulphur cluster is done [104]. Generally, in these proteins, a unique $[4\text{Fe-4S}]$ or $[2\text{Fe-2S}]$ cluster is present, while at the same time, a novel type of hybrid cluster, $[4\text{Fe-2S-2O}]$, has also been reported. This novel protein $[4\text{Fe-2S-2O}]$ cluster contains 4Fe atoms, two bridging oxo groups, two bridging sulfides, and an unidentified Fe-like fifth

bridging atom [103]. The $[4\text{Fe-4S}]$ cluster is similar to those found in ferredoxins. HCPs are related to the carbon monoxide dehydrogenase protein family [27, 66]. *In vitro* studies confirm that HCP produces NH_3 and H_2O due to NH_2OH degradation. [112]. A recent report suggested that HCP inhibits the inactivation of cytoplasmic proteins like aconitase and fumarase from nitrosative stress [110]. Experiments on aconitase and fumarase showed that these enzymes completely lost their catalytic activities when $1.5\ \mu\text{M}$ $\text{NO}\bullet$ was mixed every 30 min to cultures of the HCP mutant grown anaerobically. The activity of aconitase and fumarase in hcp^+ is higher than hcp^- mutant. This report also suggested that an NADH-dependent reductase, Hcr is needed for HCP activity. HCP interacts with Hcr and HCP-Hcr complex forms. This complex inhibits the accumulation of $\text{NO}\bullet$ via reduction of $\text{NO}\bullet$ to N_2O [110]. Balasiny et al. [5] checked the activity of aconitase and fumarase in $\text{hcp}^+\text{ytfE}^+$ and $\text{hcp}^+\text{ytfE}^-$ strains with nitrosative stress under anaerobic conditions. They found that $\text{hcp}^+\text{ytfE}^+$ strains showed higher aconitase and fumarase activity. This result clearly explained the prediction that YtfE chelates the $\text{NO}\bullet$ from nitrosylated Fe-S cluster proteins, and HCP actively converts this cytoplasmic $\text{NO}\bullet$ to N_2O . They also demonstrated how YtfE is involved in HCP induction. YtfE releases $\text{NO}\bullet$, which relieves the NsrR repressor from the HCP promoter [5]. Thus, at lower concentrations of $\text{NO}\bullet$ which is insufficient to induce the activation of *norV*, *hmpA*, *nrfA*, both YtfE, and HCP coordinately remove the toxic $\text{NO}\bullet$ from the cells under anaerobic conditions. However, even under low concentration $\text{NO}\bullet$ when aerobic and micro-aerobic conditions are present, the nitric oxide reductase activity of HCP in *E. coli* is inhibited by flavohemoglobin in an Hcr-independent pathway [91].

The mechanism of action of HCP needs further studies. Nevertheless, it can nullify the effect of RNS via its $[4\text{Fe-2S-2O}]$ and $[2\text{Fe-2S}]$ center. Recent reports predict that the iron center Fe(II) gets oxidized to Fe(III) in the presence of $\text{NO}\bullet$ or RNS, and $\text{NO}\bullet$ gets reduced to N_2O [112]. Breakdown of NH_2OH through $[2\text{Fe-2S}]$ center is a possible explanation. The reduction of hydroxylamine into ammonia and water may occur via the formation of the $[2\text{Fe}^{3+}\text{-2S}]$ compound. However, further study is needed to know the mechanism fully. Here we propose a model for the mechanism of action of HCP (Fig. 7).

3.8. Tripeptide glutathione

γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine is commonly known as glutathione (GSH). Tripeptide glutathione is the main low-molecular weight thiol in *E. coli*. It helps in scavenging toxic compounds such as naturally occurring electrophile methylglyoxal. GSH is also necessary

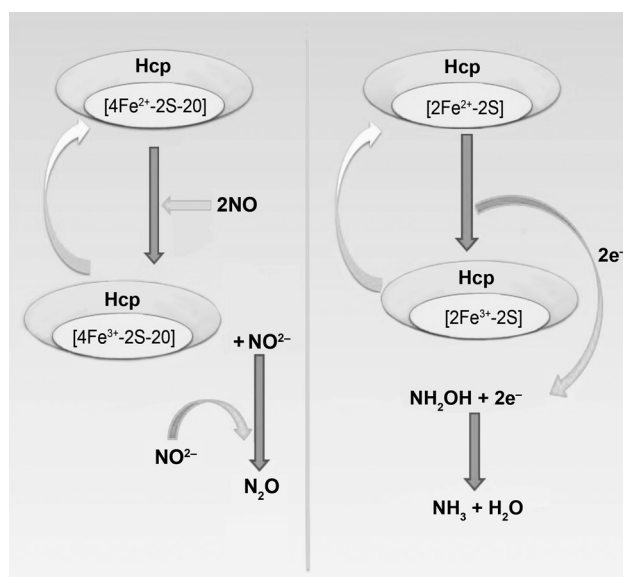


Fig. 7. Predicted mechanism of action of hybrid cluster protein

This predicted figure shows the mode of action of Hcp via two different mechanisms. In one pathway, the $[4\text{Fe}^{2+}\text{-}2\text{S-}20]$ containing Hcp can react with NO and Fe^{2+} is oxidized to Fe^{3+} with the formation of NO^{2-} . NO^{2-} can again react with another NO^{2-} and N_2O is formed as the end product. In another mechanism, $[2\text{Fe}^{2+}\text{-}2\text{S}]$ containing Hcp can react with NO and NH_2OH (hydroxylamine) is formed which may get converted to ammonia (NH_3). In this reaction also Fe^{2+} is oxidized to Fe^{3+} but it can again come back to its normal state.

for several cell processes, like controlling the redox status within the cell [46]. Under normal physiological and stress conditions, the reduced form of GSH is higher than the oxidized form of glutathione (GSSG). GSSG may form during the catalysis of GSH peroxidase (Gpx) or direct oxidation of GSH. GSSG may further be reduced back to GSH with the help of both of glutaredoxin (Grx)/thioredoxin (Trx) system and NADPH-dependent GSH reductase (Gsr) system. The change in the ratio between the reduced and oxidized form of glutathione indicates the redox stress environment within the cell [26]. The review article of Aquilano et al. [4] discusses glutathione's protective role against stress conditions by acting as a co-factor for several detoxifying enzymes, scavenging hydroxyl radicals and singlet oxygen directly.

Nitrosative stress leads to the generation of RNS like $\text{NO}\cdot$ and ONOO^- , which can damage cellular proteins and nucleic acids. It also affects the redox status of the cell. Studies showed that intracellular GSH could react with $\text{NO}\cdot/\text{ONOO}^-$. When $\text{NO}\cdot$ concentration is high in the cells, then the cysteine molecule of GSH reacts with $\text{NO}\cdot$. GSH acts as a $\text{NO}\cdot$ buffering molecule leading to the formation of GSNO. GSNO also acts as an endogenous $\text{NO}\cdot$ reservoir [4]. After its formation, GSNO may get transported outside the cell either by the GSH transporter system [118] or denitrosylation enzymes such as GSNO reductase and thioredoxin (Trx) [89].

Another study demonstrated that the incomplete oxidation of GSH under ONOO^- stress conditions might lead to the generation of thiyl radical. This radical initiates an oxygen-dependent chain reaction that results in the formation of peroxy radicals (one of the potent RNS) which can react with GSH. Thus, the amount of RNS decreases in the cell. Studies also reported that GSNO reductase (GSNOR), first discovered in *E. coli*, can also break down GSNO and remove its hazardous effect. GSNOR converts GSNO to GSSG and NH_3 [63] (Fig. 8). A very recent report proved that in *cydD* *E. coli* mutant, the intercellular concentration of GSH increases which helps in combating nitrosative stress. The $\text{NO}\cdot$ mediated stress tolerance was similar in both *cydD* mutant and wild type. Thus it can be assumed that low molecular weight thiols can restore heme incorporation into a cytochrome complex [48].

3.9. Cytochrome *bd* oxidase

Peroxynitrite is a potent nitrating agent where it directly damages DNA, protein modification/oxidation, and lipid oxidation that imbalances the cell redox homeostasis. The first report on peroxynitrite decomposition by cytochrome *bd* oxidase was by Borisov et al. [12]. A comparison between cytochrome *bd* oxidase and cytochrome *c* oxidase showed that the former was more resistant to ONOO^- where the possible explanation of this resistance is due to the absence of any redox-active copper centers in the enzyme [12]. While it was resistant to ONOO^- , results also indicated that it could successfully

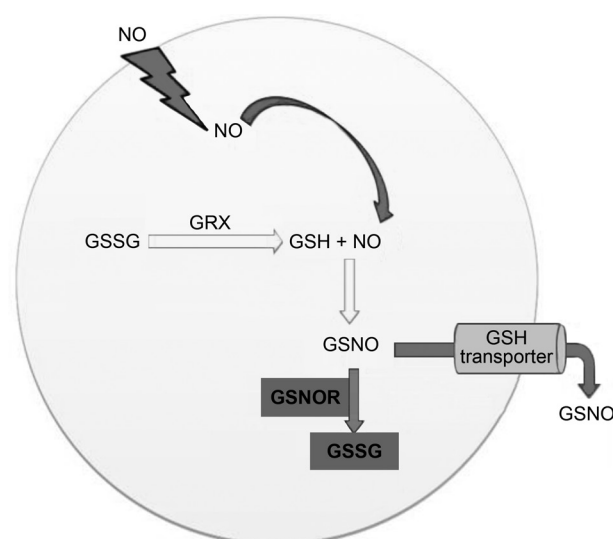


Fig. 8. Basic working principle of GSH under nitrosative stress

Under normal physiological condition, GSSG (oxidized glutathione) converts to GSH (reduced glutathione) by the action of GRX (glutaredoxin). Under nitrosative stress, GSH reacts with NO and stores the NO in the form of GSNO. It can again be transported outside the cell via GSH transporter or GSNO can be broken down to GSSG by the activity of GSNOR (blue arrow).

metabolize ONOO^- to $\text{NO}\bullet$. Time resolved absorption spectroscopy showed peroxynitrite decomposition was proportional to the enzyme concentration, and it increased with the electron flux at an apparent turnover rate of as high as $\sim 10 \text{ mol ONOO}^- (\text{mol enzyme})^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Recent reports on uropathogenic *E. coli* (UPEC) experiments on cytochrome *bd* oxidase have shown that this enzyme is also crucial for host colonization of the bladder under nitrosative stress in a microaerobic environment. At the same time, it also helps *E. coli* cells to survive inside macrophages. This enzyme also plays a vital role in biofilm formation, where transcriptomic data showed the upregulation of *cydABX* in mature UPEC biofilms [8, 42]. However, a high concentration of $\text{NO}\bullet$ renders it inactive [90].

4. Summary

Several reports on characterizing the effect of nitrosative stress in different organisms are present. Although *E. coli* is one of the best understood biochemical systems, very few reports are available to characterize nitrosative stress response. Here we have tried to compile and represent some of the major components involved in nitrosative stress response and their probable mode of action in *E. coli*. To overcome the stress condition, *E. coli* employs various defense systems like flavohemoglobin, which detoxifies $\text{NO}\bullet$ under aerobic and anaerobic conditions. Under the anoxic condition, $\text{NO}\bullet$ reacts with the reduced Fe(II) portion of HmpA to form highly stable nitrosyl species and gets converted to N_2O . While in the aerobic condition, the reactive $\text{NO}\bullet$ gets converted to nitrate as the final product. Another antioxidant system regulation by the enzyme CcpI shows the oxidation of H_2O_2 and peroxynitrous acid via the formation of intermediates CompoundI (CmpdI) and CompoundII (CmpdII) with subsequent release of $\text{NO}_2\bullet$. Flavorubredoxin, coded by *norV* gene, is another protein that can detoxify $\text{NO}\bullet$ under anaerobic conditions. Hypothetically its mode of action involves $\text{NO}\bullet$ reduction via di-ferrous center to form two nitroxyl anions, which then bind with each other to form N_2O and water. This mechanism is strictly anaerobic because of the transcription factor NorR, which is sensitive to the presence of oxygen.

Catalase is an enzyme that protects *E. coli* against peroxynitrite, which gets decomposed to $\text{NO}_2\bullet$ via the formation of CompoundII ($[\text{Cat-Fe(IV)}=\text{O}^+=\text{NO}_2]$). *In vitro* experiments with $\text{NO}\bullet$ and catalase indicated the formation of nitric oxide-catalase complex. Catalase is also involved in the detoxification of ROS like H_2O_2 . Similarly, another cellular enzyme, superoxide dismutase (SOD), helps *E. coli* overcome nitrosative stress by interacting with different ROS. The SOD directly interferes with peroxynitrite formation by scavenging free super-

oxide ions. Thus, when ROS levels get decreased inside a cell, RNS cannot be produced since the formation of RNS requires both $\text{NO}\bullet$ and ROS. Other enzymes like cytochrome *c* nitrite reductase (NrfA) enzyme detoxifies $\text{NO}\bullet$ by adding two electrons that lead to the formation of hydroxylamine. Hydroxylamine then further gets converted to ammonia and water.

On the other hand, the spectrophotometric analysis showed that cytochrome *bd* oxidase could decompose peroxynitrite. A unique mode of action in the hybrid cluster protein model shows that very low concentrations of $\text{NO}\bullet$ induce this cluster of proteins. YtfE & HCP complex chelates lower concentrations of $\text{NO}\bullet$ under anaerobic conditions. The iron centers of this complex reduce the $\text{NO}\bullet$ or RNS to N_2O is hypothesized, as its mode of action needs further research.

The non-enzymatic detoxification system, like the thiols of the cells, actively detoxifies $\text{NO}\bullet$. Here, the GSH helps reduce oxidized proteins that lead to the formation of GSNO, where it either gets transported outside the cell or gets converted to GSSG and NH_3 by GSNOR.

We have tried to compile the different functional strategies utilized by *E. coli* to counteract the nitrosative stress. Thus, more original research is needed to understand the complete mechanism of action under nitrosative stress response in *E. coli*. This review may prove helpful for such studies in the future.

Acknowledgement

The authors acknowledge Subham Saha (PG student) for helping compile the research materials and the University of North Bengal for providing essential infrastructure to carry out this research.

References

1. Abreu I.A., Cabelli D.E.: Superoxide dismutases a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 263–274 (2009)
2. Adolfsen K.J., Chou W.K., Brynildsen M.P.: Transcriptional regulation contributes to prioritized detoxification of hydrogen peroxide over nitric oxide. *J. Bacteriol.* **201**, e00081–19 (2019)
3. Alvarez B., Radi R.: Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids*, **25**, 295–311 (2003)
4. Aquilano K., Baldelli S., Ciriolo M.R.: Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front. Pharmacol.* **5**, 1–12 (2014)
5. Balasiny B., Rolfe M., Vine C., Bradley C., Green J., Cole J.: Release of nitric oxide by the *Escherichia coli* YtfE (RIC) protein and its reduction by the hybrid cluster protein in an integrated pathway to minimize cytoplasmic nitrosative stress. *Microbiology*, **164**, 563–575 (2018)
6. Bamford V.A., Angove H.C., Seward H.E., Thomson A.J., Cole J.A., Butt J.N., Hemmings A.M., Richardson D.J.: Structure and spectroscopy of the periplasmic cytochrome *c* nitrite reductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **41**, 2921–2931 (2002)
7. Baptista J.M., Justino M.C., Melo A.M., Teixeira M., Saraiva L.M.: Oxidative stress modulates the nitric oxide defense promoted

- by *Escherichia coli* flavorubredoxin. *J. Bacteriol.* **194**, 3611–3617 (2012)
8. Beebout C.J., Hadjifrangiskou M. et al.: Respiratory heterogeneity shapes biofilm formation and host colonization in uropathogenic *Escherichia coli*. *Mbio*, **10**, e02400–18 (2019)
 9. Bodenmiller D.M., Spiro S.: The yjeB (nsrR) gene of *Escherichia coli* encodes a nitric oxide-sensitive transcriptional regulator. *J. Bacteriol.* **188**, 874–881 (2006)
 10. Bonamore A., Boffi A.: Flavohemoglobin: Structure and reactivity. *IUBMB Life*, **60**, 19–28 (2008)
 11. Borisov V.B., Forte E., Konstantinov A.A.: Interaction of the bacterial terminal oxidase cytochrome *bd* with nitric oxide. *FEBS Lett.* **576**, 201–204 (2004)
 12. Borisov V.B., Forte E., Siletsky S.A., Sarti P., Giuffrè A.: Cytochrome *bd* from *Escherichia coli* catalyzes peroxynitrite decomposition. *Biochim. Biophys. Acta*, **1847**, 182–188 (2015)
 13. Bower J.M., Gordon-Raagas H.B., Mulvey M.A.: Conditioning of uropathogenic *Escherichia coli* for enhanced colonization of host. *Infect. Immun.* **77**, 2104–2112 (2009)
 14. Brandes N., Rinck A., Leichert L.I.: Nitrosative stress treatment of *E. coli* targets distinct set of thiol-containing proteins. *Mol. Microbiol.* **66**, 901–914 (2007)
 15. Brunelli L., Vladimir Y., Beckman J.S.: Modulation of catalase peroxidatic and catalatic activity by nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 709–714 (2001)
 16. Bryk R., Griffin P., Nathan C.: Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature*, **407**, 211–215 (2000)
 17. Brzuszkiewicz E., Gottschalk G., Ron E., Hacker J., Dobrindt U.: Adaptation of pathogenic *E. coli* to various niches: genome flexibility is the key. *Genome Dyn.* **6**, 110–125 (2009)
 18. Burner U., Furtmüller P.G., Kettle A.J., Koppenol W.H., Obinger C.: Mechanism of reaction of myeloperoxidase with nitrite. *J. Biol. Chem.* **275**, 20597–20601 (2000)
 19. Cardozo V.E., Lancheros C.A., Narciso A.M., Valereto E.C., Kobayashi R.K., Seabra A.B., Nakazato G.: Evaluation of antibacterial activity of nitric oxide-releasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from bovine mastitis. *Int. J. Pharm.* **473**, 20–29 (2014)
 20. Clarke T.A., Dennison V., Seward H.E., Burlat B., Cole J.A., Hemmings A.M., Richardson D.J.: Purification and spectropotentiometric characterization of *Escherichia coli* *nrfb* a decaheme homodimer that transfers electrons to the decaheme periplasmic nitrite reductase complex. *J. Biol. Chem.* **279**, 41333–41339 (2004)
 21. Corker H., Poole R.K.: Nitric oxide formation by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**, 31584–31592 (2003)
 22. Cotter P.D., Hill C.: Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 429–453 (2003)
 23. Cross R., Lloyd D., Poole R.K., Moir J.W.: Enzymatic removal of nitric oxide catalyzed by cytochrome *c* in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **183**, 3050–3054 (2001)
 24. Cruz-Ramos H., Crack J., Wu G., Hughes M.N., Scott C., Thomson A.J., Green J., Poole R.K.: NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin Hmp. *EMBO J.* **21**, 3235–3244 (2002)
 25. de Jesús-Berrios M., Liu L., Nussbaum J.C., Cox G.M., Stamler J.S., Heitman J.: Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence. *Curr. Biol.* **13**, 1963–1968 (2003)
 26. Dickinson D.A., Forman H.J.: Glutathione in Defense and Signaling: lessons from a small thiol. *Ann. New York Acad. Sci.* **973**, 488–504 (2002)
 27. Dobbek H., Svetlitchnyi V., Gremer L., Huber R., Meyer O.: Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster. *Science*, **293**, 1281–1285 (2001)
 28. Dong M., Vongchampa V., Gingipalli L., Cloutier J.F., Kow Y.W., O'Connor T., Dedon P.C.: Development of enzymatic probes of oxidative and nitrosative DNA damage caused by reactive nitrogen species. *Mutat. Res.* **594**, 120–134 (2006)
 29. Dubuisson M., Vander Stricht D., Clippe A., Etienne F., Nauser T., Kissner R., Koppenol W.H., Rees J.F., Knoop B.: Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS Lett.* **571**, 161–165 (2004)
 30. Einsle O., Messerschmidt A., Huber R., Kroneck P.M., Neese F.: Mechanism of the six-electron reduction of nitrite to ammonia by cytochrome *c* nitrite reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 11737–11745 (2002)
 31. Failli P., Nistri S., Quattrone S., Mazzetti L., Bigazzi M., Sacchi T.B., Bani D.: Relaxin up-regulates inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide generation in rat coronary endothelial cells. *FASEB J.* **16**, 252–254 (2002)
 32. Ferrer-Sueta G., Radi R.: Chemical biology of peroxynitrite: kinetics diffusion and radicals. *ACS Chem. Biol.* **14**, 161–177 (2009)
 33. Forman H.J., Maiorino M., Ursini F.: Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*, **49**, 835–842 (2010)
 34. Forman H.J., Ursini F., Maiorino M.: An overview of mechanisms of redox signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **73**, 2–9 (2014)
 35. Forrester M.T., Eyler C.E., Rich J.N.: Bacterial flavohemoglobin: a molecular tool to probe mammalian nitric oxide biology. *Bio-Techniques*, **50**, 41–45 (2011)
 36. Forrester M.T., Foster M.W.: Protection from nitrosative stress: a central role for microbial flavohemoglobin. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 1620–1633 (2012)
 37. Fournier M., Zhang Y., Wildschut J.D., Dolla A., Voordouw J.K., Schriemer D.C., Voordouw G.: Function of oxygen resistance proteins in the anaerobic sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J. Bacteriol.* **185**, 71–79 (2003)
 38. Gardner A.M., Gardner P.R.: Flavohemoglobin detoxifies nitric oxide in aerobic but not anaerobic *Escherichia coli*: Evidence for a novel inducible anaerobic nitric oxide scavenging activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 8166–8171 (2002)
 39. Gardner A.M., Helmick R.A., Gardner P.R.: Flavorubredoxin an inducible catalyst for nitric oxide reduction and detoxification in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 8172–8177 (2002)
 40. Gardner P.R., Martin L.A., Hall D., Gardner A.M.: Dioxygen-dependent metabolism of nitric oxide in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 191–204 (2001)
 41. Gebicka L., Didik J.: Catalytic scavenging of peroxynitrite by catalase. *J. Inorg. Biochem.* **103**, 1375–1379 (2009)
 42. Giuffrè A., Borisov V.B., Arese M., Sarti P., Forte E.: Cytochrome *bd* oxidase and bacterial tolerance to oxidative and nitrosative stress. *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1178–1187 (2014)
 43. Halliwell B.: Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1147–1150 (2007)
 44. Han D., Canali R., Garcia J., Aguilera R., Gallaher T.K., Cadenas E.: Sites and mechanisms of aconitase inactivation by peroxynitrite: modulation by citrate and glutathione. *Biochemistry*, **44**, 11986–11996 (2005)
 45. Hausladen A., Gow A., Stamler J.S.: Flavohemoglobin denitrosylase catalyzes the reaction of a nitroxyl equivalent with molecular oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10108–10112 (2001)
 46. Herrero E., Ros J., Bellí G., Cabisco E.: Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 1217–1235 (2008)
 47. Hill B.G., Dranka B.P., Bailey S.M., Lancaster J.R. Jr., Darley-Usmar V.M.: What part of NO don't you understand? Some questions to the cardinal questions in nitric oxide biology. *J. Biol. Chem.* **285**, 19699–19704 (2010)
 48. Holyoake L.V., Hunt S., Sanguinetti G., Cook G.M., Howard M.J., Rowe M.L., Poole R.K., Shepherd M.: CycDC mediated reduct-

- ant export in *Escherichia coli* controls the transcriptional wiring of energy metabolism and combats nitrosative stress. *Biochem. J.* **473**, 693–701 (2016)
49. Hough M.A., Hasnain S.S.: Structure of fully reduced bovine copper zinc superoxide dismutase at 115 Å. *Structure*, **11**, 937–946 (2003)
 50. Hutchings M.I., Mandhana N., Spiro S.: The NorR protein of *Escherichia coli* activates expression of the Flavorubredoxin gene *norV* in response to reactive nitrogen species. *J. Bacteriol.* **184**, 4640–4643 (2002)
 51. Hyde D.R., Jarboe L.R., Tran L.M., Chou K.J., Liao J.C.: Integrated network analysis identifies nitric oxide response networks and dihydroxyacid dehydratase as a crucial target in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 8484–8489 (2007)
 52. Imlay J.A.: Redox pioneer: Professor Irwin Fridovich. *Antioxid. Redox Sign.* **14**, 335–340 (2011)
 53. Imlay J.A., Hassett D.J.: Oxidative and nitrosative stress defense systems *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: A model organism of study versus a human opportunistic pathogen (in) *Advances in Molecular and Cellular Microbiology*, CABI Publishing, 2011, p.1–32
 54. Janssen-Heininger Y.M., Persinger R.L., Korn S.H., Pantano C., McElhinney B., Reynaert N.L., Langen R.C., Ckless K., Shrivastava P., Poynter M.E.: Reactive nitrogen species and cell signaling: implications for death or survival of lung epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **16**, S9–S16 (2002)
 55. Jourdhieu D., Jourdhieu F.L., Feelisch M.: Oxidation and nitrosation of thiols at low micromolar exposure to nitric oxide evidence for a free radical mechanism. *J. Biol. Chem.* **278**, 15720–15726 (2003)
 56. Justino M.C., Almeida C.C., Teixeira M., Saraiva L.M.: *Escherichia coli* di-iron YtfE protein is necessary for the repair of stress-damaged iron-sulfur clusters. *J. Biol. Chem.* **282**, 10352–10359 (2007)
 57. Justino M.C., Vicente J.B., Teixeira M., Saraiva L.M.: New genes implicated in the protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **280**, 2636–2643 (2005)
 58. Keszler A., Zhang Y., Hogg N.: Reaction between nitric oxide, glutathione, and oxygen in the presence and absence of protein: How are S-nitrosothiols formed? *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 55–64 (2010)
 59. Khademian M., Imlay J.A.: *Escherichia coli* cytochrome *c* peroxidase is a respiratory oxidase that enables the use of hydrogen peroxide as a terminal electron acceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E6922–E6931 (2017)
 60. Klandorf H., Dyke K.V.: Oxidative and nitrosative stresses: their role in health and disease in man and birds (in) *Oxidative Stress – Molecular Mechanisms and Biological Effects*, Ed. V. Lushchak, H. Semchyshyn, IntechOpen, London (2012), p. 47–60
 61. Köner H., Sofia H.J., Zumft W.G.: Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 559–592 (2003)
 62. Lindemann C., Lupilova N., Müller A., Warscheid B., Meyer H.E., Kuhlmann K., Eisenacher M., Leichert L.I.: Redox proteomics uncovers peroxynitrite sensitive proteins that help *Escherichia coli* to overcome nitrosative stress. *J. Biol. Chem.* **288**, 19698–19714 (2013)
 63. Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J.S.: A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature*, **410**, 490–494 (2001)
 64. Lumpio H.L., Shen N.V., Summers A.O., Voordouw G., Kurtz D.M. Jr.: Rubrerythrin and rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: a novel oxidative stress protection system. *J. Bacteriol.* **183**, 101–108 (2001)
 65. Lushchak O.V., Inoue Y., Lushchak V.I.: Regulatory protein Yap1 is involved in response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* to nitrosative stress. *Biochem. (Mosc.)* **75**, 629–635 (2010)
 66. Macedo S., Aragão D., Mitchell E.P., Lindley P.: Structure of the hybrid cluster protein (HCP) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 containing molecules in the oxidized and reduced states. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **59**, 2065–2071 (2003)
 67. Maller C., Schroeder E., Eaton P.: Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase is unlikely to mediate hydrogen peroxide signaling: studies with a novel anti-dime one sulfenic acid antibody. *Antioxid. Redox Sign.* **14**, 49–60 (2011)
 68. Martins D., Bakas I., McIntosh K., English A.M.: Peroxynitrite and hydrogen peroxide elicit similar cellular stress responses mediated by the Ccp1 sensor protein. *Free Radic. Biol. Med.* **85**, 138–147 (2015)
 69. Mehta H.H., Liu Y., Zhang M.Q., Spiro S.: Genome-wide analysis of the response to nitric oxide in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *Microb. Genom.* **1**, e000031 (2015)
 70. Meng Q., Yin J., Jin M., Gao H.: Distinct nitrite and nitric oxide physiologies in *Escherichia coli* and *Shewanella oneidensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, e00559–18 (2018)
 71. Mills P.C., Rowley G., Spiro S., Hinton J.C.D., Richardson D.J.: A combination of cytochrome *c* nitrite reductase (NrfA) and flavorubredoxin (NorV) protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium against killing by NO in anoxic environments. *Microbiology*, **154**, 1218–1228 (2008)
 72. Molodtsov V., Nawarathne I.N., Scharf N.T., Kirchhoff P.D., Showalter H.D., Garcia G.A., Murakami K.S.: X-ray crystal structure of the *Escherichia coli* RNA polymerase in complex with Benzoxazinorifamycin. *J. Med. Chem.* **56**, 4758–4763 (2013)
 73. Mukhopadhyay P., Zheng M., Bedzyk L.A., LaRossa R.A., Storz G.: Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 745–750 (2004)
 74. Nilavongse A., Brondijk T.H.C., Overton T.W., Richardson D.J., Leach E.R., Cole J.A.: The NapF protein of the *Escherichia coli* periplasmic nitrate reductase system: demonstration of a cytoplasmic location and interaction with the catalytic subunit NapA. *Microbiology*, **152**, 3227–3237 (2006)
 75. Paolucci N., Katori T., Champion H.C., St John M.E., Miranda K.M., Fukuto J.M., Wink D.A., Kass D.A.: Positive inotropic and lusitropic effects of nitroxyl (HNO/NO⁻) in failing hearts: independence from β -adrenergic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5537–5542 (2003)
 76. Periago, P. M., van Schaik, W., Abee, T., Wouters, J. A.: Identification of proteins involved in the heat stress response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3486–3495 (2002)
 77. Poock S.R., Leach E.R., Moir J.W., Cole J.A., Richardson D.J.: Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome *c* nitrite reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 23664–23669 (2002)
 78. Poole R.K.: Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 176–180 (2005)
 79. Poole R.K.: Flavohaemoglobin: the pre-eminent nitric oxide-detoxifying machine of microorganisms. *F1000Res.* **9**, F1000 Rev-7 (2020)
 80. Poole R.K., Hughes M.N.: New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Mol. Microbiol.* **36**, 775–783 (2000)
 81. Radi R.: Nitric oxide oxidants and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4003–4008 (2004)

82. Radi R.: Protein tyrosine nitration: Biochemical mechanisms and structural basis of its functional effects. *Acc. Chem. Res.* **46**, 550–559 (2013)
83. Radi R.: Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 5839–5848 (2018)
84. Robinson J.L., Brynildsen M.P.: Discovery and dissection of metabolic oscillations in the microaerobic nitric oxide response network of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E1757–E1766 (2016)
85. Romão C.V. & Frazão C. et al.: Structure of *Escherichia coli* Flavodiiron Nitric Oxide Reductase. *J. Mol. Biol.* **428**, 4686–4707 (2016)
86. Sahoo R., Bhattacharjee A., Majumdar U., Ray S.S., Dutta T., Ghosh S.: A novel role of catalase in detoxification of peroxynitrite in *S. cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **385**, 507–511 (2009)
87. Schade B., Jansen G., Whiteway M., Entian K.D., Thomas D.Y.: Cold adaptation in budding yeast. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 5492–5502 (2004)
88. Schairer D.O., Chouake J.S., Nosanchuk J.D., Friedman A.J.: The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence*, **3**, 271–279 (2012)
89. Sengupta R., Holmgren A.: Thioredoxin and thioredoxin reductase in relation to reversible s-nitrosylation. *Antioxid. Redox Sign.* **18**, 259–269 (2013)
90. Shepherd M., & Schembri M.A. et. al.: The cytochrome *bd*-I respiratory oxidase augments survival of multidrug-resistant *Escherichia coli* during infection. *Sci. Rep.* **6**, 35285 (2016)
91. Shimizu T., Matsumoto A., Noda M.: Cooperative roles of nitric oxide-metabolizing enzymes to counteract nitrosative stress in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **87**, e00334–19 (2019)
92. Sigfrid L.A., Cunningham J.M., Beeharry N., Lortz S., Tiedge M., Lenzen S., Carlsson C., Green I.C.: Cytokines and nitric oxide inhibit the enzyme activity of catalase but not its protein or mRNA expression in insulin-producing cells. *J. Mol. Endocrinol.* **31**, 509–518 (2003)
93. Silva G., LeGall J., Xavier A.V., Teixeira M., Rodrigues-Pousada C.: Molecular characterization of *Desulfovibrio gigas* neelaredoxin, a protein involved in oxygen detoxification in anaerobes. *J. Bacteriol.* **183**, 4413–4420 (2001)
94. Sobko T., Huang L., Midtvedt T., Norin E., Gustafsson L.E., Norman M., Jansson E.A., Lundberg J.O.: Generation of NO by probiotic bacteria in the gastro intestinal tract. *Free Radic. Biol. Med.* **41**, 985–991 (2006)
95. Sobko T., Reinders C.I., Jansson E., Norin E., Midtvedt T., Lundberg J.O.: Gastrointestinal bacteria generate nitric oxide from nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, **13**, 272–278 (2005)
96. Song M., Husain M., Jones-Carson J., Liu L., Henard C.A., Vázquez-Torres A.: Low molecular weight thiol-dependent antioxidant and antinitrosative defenses in *Salmonella* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **87**, 609–622 (2013)
97. Spek E.J., Wright T.L., Stitt M.S., Taghizadeh N.R., Tannenbaum S.R., Marinus M.G., Engelward B.P.: Recombinational repair is critical for survival of *Escherichia coli* exposed to nitric oxide. *J. Bacteriol.* **183**, 131–138 (2001)
98. Spence S.A., Clark V.L., Isabella V.M.: The role of catalase in gonococcal resistance to peroxynitrite. *Microbiology*, **158**, 560–570 (2012)
99. Stepniewska, Z., Wolińska, A., Ziomek, J.: Response of soil catalase activity to chromium contamination. *J. Environ. Sci. China*. **21**, 1142–1147 (2009)
100. Stone J.R., Yang S.: Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid. Redox Sign.* **8**, 243–270 (2006)
101. Svensson L., Poljakovic M., Säve S., Gilberthorpe N., Schön T., Strid S., Corker H., Poole R.K., Persson K.: Role of flavohemoglobin in combating nitrosative stress in uropathogenic *Escherichia coli* – implications for urinary tract infection. *Microb. Pathog.* **49**, 59–66 (2010)
102. Tiso M., Schechter A.N.: Nitrate reduction to nitrite, nitric oxide and ammonia by gut bacteria under physiological conditions. *Plos One*, **10**, e0127490 (2015) 11737–11745 (2002)
103. van den Berg W.A., Hagen W.R., van Dongen W.M.: The hybrid-cluster protein ('prismane protein') from *Escherichia coli* Characterization of the hybrid-cluster protein redox properties of the [2Fe-2S] and [4Fe-2S-2O] clusters and identification of an associated NADH oxidoreductase containing FAD and [2Fe-2S]. *Eur. J. Biochem.* **267**, 666–676 (2000)
104. van Wonderen J.H., Burlat B., Richardson D.J., Cheesman M.R., Butt J.N.: The nitric oxide reductase activity of cytochrome *c* nitrite reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **283**, 9587–9594 (2008)
105. Veal E.A., Day A.M., Morgan B.A.: Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cell.* **26**, 1–14 (2007)
106. Veal E.A., Ross S.J., Malakasi P., Peacock E., Morgan B.A.: Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. *J. Biol. Chem.* **278**, 30896–30904 (2003)
107. Vicente J.B., Teixeira M.: Redox and spectroscopic properties of the *Escherichia coli* nitric oxide-detoxifying system involving flavorubredoxin and its NADH-oxidizing redox partner. *J. Biol. Chem.* **280**, 34599–34608 (2005)
108. Vijayadeep C., Sastry P.S.: Effect of heavy metal uptake by *E. coli* and *Bacillus* spp. *J. Bioremediat. Biodegrad.* **5**, 1–3 (2014)
109. Vine C.E., Cole J.A.: Nitrosative stress in *Escherichia coli*: reduction of nitric oxide. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 213–215 (2011)
110. Wang J., Vine C.E., Balasany B.K., Rizk J., Bradley C.L., Tinajero-Trejo M., Poole R.K., Bergaust L.L., Bakken L.R., Cole J.A.: The roles of the hybrid cluster protein HCP and its reductase Hcr in high affinity nitric oxide reduction that protects anaerobic cultures of *Escherichia coli* against nitrosative stress. *Mol. Microbiol.* **100**, 877–892 (2016)
111. Weiss B.: Evidence for mutagenesis by nitric oxide during nitrate metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 829–833 (2006)
112. Wolfe M.T., Heo J., Garavelli J.S., Ludden P.W.: Hydroxylamine reductase activity of the hybrid cluster protein from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 5898–5902 (2002)
113. Wood J. M.: Bacterial responses to osmotic challenges. *J. Gen. Physiol.* **145**, 381–388 (2015)
114. Wu G., Wainwright L.M., Membrillo-Hernandez J., Poole R.K.: Bacterial haemoglobins: old proteins with “new” functions? Roles in respiratory and nitric oxide metabolism. In D. Zannoni (ed.), *Respiration in Archaea and Bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands* (2004) p. 251–286
115. Wu G., Wainwright L.M., Poole R.K.: Microbial globins. *Adv. Microb. Physiol.* **47**, 255–310 (2003)
116. Yamakura F., Kawasaki H.: Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 318–325 (2010)
117. Yousef A., Courtney P.: Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*, Chapter 1, 14–15 (2002)
118. Zeng H., Spencer N.Y., Hogg N.: Metabolism of S-nitrosoglutathione by endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281**, H432–H439 (2001)



INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

Od ostatniej informacji o działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, zamieszczonej w zeszytach nr 1 z 2022 r. kwartalników *Advancements of Microbiology* – *Postępy Mikrobiologii* i *Polish Journal of Microbiology*, ZG PTM zajmował się następującymi sprawami:

- I. Zgodnie ze Statutem PTM raz w roku odbywa się zebranie członków ZG PTM. Przeprowadzono je 28.03.2022 r. w formie on-line, korzystając z pomocy informatycznej Narodowego Instytutu Leków. Materiały związane z zebraniem wcześniej rozesłano e-mailowo do członków ZG PTM i zaproszonych osób.
W zebraniu udział wzięli Prezydium ZG PTM, Przewodniczący Oddziałów Terenowych PTM lub ich przedstawiciele, Przewodnicząca Głównej Komisji Rewizyjnej PTM oraz Redaktorzy naczelni czasopism PTM.
Podczas Zebrania ZG PTM poruszano następujące zagadnienia:
 1. Przedstawiono informację o działalności Prezydium PTM od 22.03.2021 r. – poprzedniego zebrania ZG PTM. W załączeniu przesłano informacje o PTM zamieszczone w numerach czasopism PM i PJM: 2–2021, 3–2021, 4–2021, 1–2022, zwracając uwagę na konferencje organizowane przez Oddziały PTM w minionym okresie.
Szerzej omówiono stanowisko PTM w sprawie agresji Rosji na Ukrainę, która rozpoczęła się 24.02.2022 r. Prezydium ZG PTM podjęło **Uchwałę 8-2022**, w której zaapelowało do FEMS, IUMS i ESCMID nie tylko o solidarność z Ukrainą, w tym z członkami Society of Microbiologists of Ukraine, wyrażoną przez towarzystwa mikrobiologiczne zrzeszone w FEMS/IUMS/ESCMID, ale i o podjęcie sankcji w stosunku do towarzystw mikrobiologicznych krajów agresorów. W powyższej Uchwale zawnieśliśmy do FEMS/IUMS/ESCMID o zawieszenie towarzystw mikrobiologicznych z Rosji i z Białorusi w prawach członka FEMS/IUMS/ESCMID oraz pozbawienie ich przywilejów przysługujących członkom federacji FEMS/IUMS oraz ESCMID do czasu zakończenia wojny. Zaproponowaliśmy również blokadę artykułów wydawanych przez czasopisma FEMS/IUMS nadsyłanych przez autorów z afiliacją Rosji i Białorusi do czasu zakończenia wojny. Prezydium ZG PTM jednogłośnie podjęło również **Uchwałę 9-2022** w sprawie blokady artykułów wydawanych przez czasopisma PTM: *Polish Journal of Microbiology* oraz *Advancements of Microbiology* – *Postępy Mikrobiologii*, nadsyłanych przez autorów z afiliacją Rosji i Białorusi do czasu zakończenia wojny. W związku z Uchwałą 8-2022 PTM w dniu 09.03.2022 r. odbyło się spotkanie Prezydent FEMS i 2 członków zarządu FEMS z prof. Elżbietą A. Trafny i prof. S. Tyskim reprezentującymi PTM, na temat stanowiska FEMS i PTM w sprawie wojny na Ukrainie. Uzgodniono, że FEMS podejmie działania wskazane w piśmie PTM. Nasza Uchwała 8-2022 została przez biuro FEMS rozesłana do wszystkich zrzeszonych w FEMS towarzystw mikrobiologicznych z informacją o zwołaniu w dniu 07.04.2022 r. Nadzwyczajnego Zebrania Delegatów – FEMS Council w sprawie podjęcia decyzji o zawieszeniu 4 towarzystw w FEMS. Ponadto na zebraniu ZG PTM w dniu 28.03.2022 r. podjęto **Uchwałę nr 10-2022** w sprawie akceptacji działalności Prezydium ZG PTM za miniony okres roczny.
 2. Podjęto **Uchwałę 11-2022** w sprawie uporządkowania listy członków zwyczajnych oraz członków wspierających PTM i usunięcia z niej osób i firm niepłacących składki członkowskiej za 2021 r. w statutowo przewidzianym terminie. W porównaniu z ubiegłym rokiem podobna jest liczba osób nieopłacających składki członkowskiej za rok 2021 r., pomimo przypominania o tym podstawowym obowiązku członka PTM przez OT PTM w styczniu 2022 r. i następnie dwukrotnie przez sekretariat ZG PTM w lutym i marcu b.r. Imienne listy osób usuwanych z poszczególnych Oddziałów zestawiono w **załączniku 1 do Uchwały 11-2022**.
 3. Podjęto **Uchwałę 12-2022** w sprawie przyjęcia 20 nowych członków zwyczajnych PTM (**Załącznik 1 do Uchwały 12-2022**).
 4. Spotykamy się z sytuacją, że osoby zaakceptowane Uchwałami PTM jako członkowie zwyczajni nie opłacają pierwszej składki członkowskiej, pomimo wyraźnej informacji, że trzeba spełnić oba warunki, aby być przyjętym do PTM. Na podstawie **Uchwały 12-2020**, usunięto kilka deklaracji członka zwyczajnego, zaakceptowanych Uchwałami ZG PTM, którym nie towarzyszyła pierwsza opłata składki członkowskiej wniesiona w ciągu 6 miesięcy od daty Uchwał.
 5. Zgodnie z **Uchwałą 33-2017** i **Uchwałą 2-2019** oraz „**Regulaminem wydatkowania i rozliczania środków pieniężnych przez Oddziały Terenowe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów**” każdy Oddział otrzymuje co roku fundusz złożony z 10% kwoty uzyskanej z tytułu składek członkowskich, 50% kwoty uzyskanej z tytułu pozyskania sponsora ogólnego, Członka Wspierającego PTM, darowizny, lub innej dodatkowej kwoty na rzecz PTM oraz 100% kwoty od sponsora konkretnego wydarzenia organizowanego przez dany Oddział. Przedstawiono Tabelę dotyczącą liczby członków w Oddziałach oraz Tabelę przyznanych Oddziałom środków finansowych na przestrzeni kolejnych ostatnich 4 lat.

6. Pozytywnie zagłosowano w sprawie **Uchwały 13-2022**, dotyczącej objęcia patronatem honorowym konferencji „V Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego”, która odbędzie się w dniu 10.06.2022 r. w Łodzi; **Uchwały 14-2022** dotyczącej objęcia patronatem honorowym konferencji „VI Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne ‘Metagenomy różnych środowisk’”, która odbędzie się w dniach 23–24.06.2022 r. w Puławach; **Uchwały 15-2022** dotyczącej objęcia patronatem honorowym konferencji „VII Konferencja Mikrobiologów i Epidemiologów”, która odbędzie się w dniu 9.05.2022 r. on-line w Warszawie; **Uchwały 16-2022** dotyczącej objęcia patronatem honorowym konferencji „VII Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen”, która odbędzie się w dniach 7–8 kwietnia 2022 roku on-line w Łodzi.
7. Przedstawiono informację o stanie finansowym PTM oraz Uchwałę Głównej Komisji Rewizyjnej PTM z 23.03.2022 r. w sprawie zatwierdzenia Sprawozdania Finansowego PTM za rok 2021. Z uznaniem podkreślono zakończenie roku 2021 zyskiem w wysokości ponad 34 tysięcy zł, co związane jest przede wszystkim z działalnością redakcji *Polish Journal of Microbiology*.
8. Przewodniczący Oddziałów Terenowych przedstawili sprawozdania z działalności Oddziałów w okresie od 22.03.2021 r. do 28.03.2022 r. oraz plany Oddziałów na 2022 r. Okres pandemii znacznie przyhamował działalność Towarzystwa. Większość Oddziałów przeprowadzała spotkania on-line. W dużej mierze adresy elektroniczne linków z dostępem do wykładów odbywających się w Oddziałach przesyłano do Sekretariatu ZG PTM, a następnie spotkania były udostępnione na stronie PTM do wykorzystania przez zainteresowane osoby z innych Oddziałów.
9. Przedstawiono informacje z FEMS oraz IUMS.
W terminie 30.06–02.07.2022 r. odbyła się konferencja FEMS „2nd FEMS Conference on Microbiology” w Belgradzie, Serbia. FEMS Congress on Microbiology odbędzie się w dniach 9–12.07.2023 r. w Hamburgu, Niemcy. Zachęcano, aby składać do FEMS wnioski o stypendia naukowe – nie ma już granicy 35 lat. Wnioski mogą składać osoby, które uzyskały stopień magistra lub doktora w ciągu ostatnich 5 lat, związane jest to z urlopami macierzyńskimi i wychowawczymi, których okres nie liczy się do tych 5 lat. Kolejny International Microorganisms Day organizowany przez FEMS będzie odbywać się 17 września 2022 r.
Kongres mikrobiologiczny IUMS odbył się w okresie 20–22.07.2022 r. w Rotterdamie, Holandia, w formie hybrydowej.
10. Redaktorzy naczelni wydawanych przez PTM czasopism: *Polish Journal of Microbiology* (PJM) oraz *Advancements of Microbiology – Postępy Mikrobiologii* (PM) przedstawili informacje o czasopismach, zmianie firmy wydawniczej z Exeley Inc. na Sciendo i problemach redakcyjnych, głównie związanych z pozyskiwaniem recenzentów manuskryptów. Oba czasopisma zwiększyły swoje współczynniki oceny: cytowalność i Impact Factor. PJM po raz kolejny przyniosło zysk Towarzystwu. Oba czasopisma znajdują się na liście filadelfijskiej, ale mają niską punktację MEiN: PM – 20, a PJM – 40 punktów. Postanowiono wystąpić do MEiN o zmianę punktacji po oczekiwanej w czerwcu nowej światowej ewaluacji czasopism.
11. Sprawa XXIX Zjazdu PTM organizowanego w Warszawie w dniach 15–17 września 2022 r. (www.zjazdptm2022.pl).
Przedstawiono trudności związane z organizacją Zjazdu oraz jego ograniczenia – 500 uczestników, obrady 3 dni spowodowane pandemią, koniecznością poszukiwania nowego miejsca na Zjazd oraz problemami finansowymi.
Omówiono stronę internetową Zjazdu, system rejestracji i logowania uczestników oraz system zgłaszania streszczeń.
Omówiono również sprawy związane z Walnym Zgromadzeniem Delegatów PTM i wyborami do nowych władz PTM, a także zgłaszaniem kandydatów na członków honorowych PTM przez OT PTM.
Ustalono terminarz „ważnych dat” związanych z powyższymi wydarzeniami:
Wyборы do Zarządów OT PTM i Komisji rewizyjnych OT PTM powinny odbyć się po Zjeździe PTM.
- II. Na dzień 31 marca 2022 r. Polskie Towarzystwo Mikrobiologów liczy 892 członków. Najliczniejsze oddziały terenowe, to OT Warszawa – 158 członków i OT Kraków – 115 członków.
- III. Podpisano listy intencyjne dotyczące współpracy pomiędzy PTM, a Wyższą Szkołą Inżynierii i Zdrowia w Warszawie w zakresie dostępu pracowników i studentów WSiLz do archiwalnych zeszytów czasopism *Postępy Mikrobiologii* oraz *Polish Journal of Microbiology*.
- IV. W dniu 30.03.2022 r. Oddział w Bydgoszczy PTM oraz firma Argenta zaprosili na spotkanie naukowo-szkoleniowe. Przedstawiono następujące wykłady: „Biofilm w zakażeniach klinicznych – w poszukiwaniu skutecznej terapii” – mgr Jana Przekwas; Katedra Mikrobiologii, Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, „Diagnostyka zakażeń z udziałem *Fusarium* spp. na podstawie przypadku fungemii o etiologii *Fusarium solani*” – mgr Tomasz Skalski; Pracownia Mykologii, Zakład Diagnostyki Mikrobiologicznej Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dr Jana Biziela w Bydgoszczy, „Pełen obraz lekowrażliwości przy pierwszym badaniu” – dr Andrzej Mikołajczak; Field Application Specialist, Thermo Fisher Scientific
- V. W dniu 31.03.2022 r. Zarząd Oddziału Krakowskiego PTM zaprosił na posiedzenie naukowo-szkoleniowe na wykład „Od bakterii do bakteriofagów na przykładzie shigatoksynicznych szczepów *E. coli*”, który wygłosił dr hab. inż. Paweł Nawrotek, prof. ZUT Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Centrum Dydaktyczno-Badawcze Nanotechnologii Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie.
- VI. W dniu 05.04.2022 r. Sekcja Mikrobiologii Środowiskowej PTM zaprosiła na wykład „Mikroorganizmy eukariotyczne w ekosystemach wodnych – jak nowoczesne metody sekwencjonowania umożliwiają poznanie ich różnorodności i funkcji”, który wygłosiła dr hab. Anna Karnkowska z Instytutu Biologii Ewolucyjnej, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego.
- VII. W dniu 07.04.2022 r. odbyło się nadzwyczajne zebranie FEMS Council poświęcone sprawie zawieszenia mikrobiologicznych towarzystw z Rosji (3) i Białorusi (1) w prawach członka FEMS. Przeprowadzono dyskusję w której wzięli udział: Prezes PTM jako wnioskodawca, przedstawiciele rozpatrywanych towarzystw oraz szereg przedstawicieli innych towarzystw mikrobiologicznych z Europy – większość mówców popierała Uchwałę 8-2022 PTM. Przeprowadzono głosowanie tajne.

Uprawnionych było 64 osoby, reprezentujące 56 towarzystw mikrobiologicznych i 8 członków zarządu FEMS. Obecnych było 53 osób uprawnionych. Za Uchwałą było 30 osób, 17 było przeciwnych, 6 osób wstrzymało się. Jednakże ustawa nie przeszła, ponieważ w Statucie FEMS jest przedziwny sposób liczenia głosów, w myśl którego nieobecni liczeni są jako wstrzymujący się. Aby ustawa przeszła zabrakło 3 głosów. Prezes PTM wysłał do władz FEMS list wskazujący na mało logiczny sposób liczenia głosów przyjęty w statucie FEMS [np. przy 64 osobach uprawnionych do głosowania, sensowny wniosek popierany jest przez 33 głosujących, jeden się wstrzymuje, a 31 osób jest nieobecnych i wniosek upada]. Sprawa zmian w Statucie PTM ma być rozważana na FEMS Council, które odbędzie się we wrześniu 2022 r. w Split. Przedstawiciele Ukrainy bardzo dziękowali PTM za okazaną inicjatywę pomocy i wyrażone wsparcie.

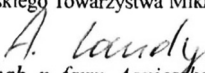
- VIII. Z głębokim smutkiem i żalem zawiadamiamy, że w dniu 22.04.2022 roku zmarła Pani prof. dr hab. Maria Lucyna Zaremba. Pani Profesor w latach 1995–2012 była kierownikiem Zakładu Mikrobiologii Akademii Medycznej w Białymstoku. Była Członkiem Honorowym PTM a także przez dwie kadencje pełniła funkcję Wiceprezesa Zarządu Głównego PTM. Przewodnicząca Zarządu Oddziału Białostockiego PTM w latach 1997–2008 oraz organizatorka XXIV Krajowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.
- Pani Profesor Maria Lucyna Zaremba była lekarzem, specjalistą w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej oraz cenionym dydaktykiem. Współtworzyła podstawy współczesnej diagnostyki mikrobiologicznej, łącząc trzy dyscypliny: mikrobiologię, choroby zakaźne i immunologię kliniczną. Była autorką wielu publikacji oraz podręcznika „Mikrobiologia Lekarska. Podręcznik dla studentów medycyny”.
- IX. W dniu 22.04.2022 odbyło się on-line spotkanie Komitetu Organizacyjnego Zjazdu PTM. Zatwierdzono wykładowców i tematy wykładów plenarnych oraz w sesjach tematycznych.
- X. I tura zgłaszania streszczeń na XXIX Zjazd PTM została przedłużona o 2 tygodnie – do 13.05.2022 r. Zgłoszono prawie 200 prac.
- XI. Ze względu na trudności w kontakcie i porozumieniu się z informatykiem opracowującym stronę internetową Zjazdu od 2019 r., podjęto decyzję o zmianie tej osoby. Aktualnie stroną Zjazdu PTM zarządza Pan Kamil Lipiński, prowadzący również stronę PTM.
- XII. Podjęto **Uchwałę 17-2022** w sprawie przyjęcia 8 nowych członków zwyczajnych PTM (Załącznik 1 do Uchwały 17-2022).
- XIII. FEMS ustanowiło nowy grant: FEMS Ukraine Support Grant. Wsparcie to skierowane jest zarówno do mikrobiologów wczesnej kariery, którzy są członkami Ukraińskiego Towarzystwa Mikrobiologów, w odbyciu badań i szkoleń w europejskiej instytucji goszczącej (akademickiej lub przemysłowej), jak i do członków innych stowarzyszeń członkowskich FEMS, którzy znajdują się na Ukrainie i są uwikłani w wojnę. Nie ma terminów przyznania dotacji, zamiast tego wnioski zostaną rozpatrzone bezpośrednio po złożeniu
- XIV. Rozstrzygnięty został Konkurs w sprawie przyznania Nagród Naukowych PTM im. Prof. Edmunda Mikulaszka za prace opublikowane w latach 2020–2021.
- Do Nagrody Naukowej im. prof. Edmunda Mikulaszka Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów zgłosiło się 5 kandydatów. Komisja Konkursowa pod przewodnictwem Pani prof. dr hab. Stefani Giedrys-Kalemby postanowiła przyznać:
- nagrodę I stopnia Panu lek. wet. Dominikowi M. Łagowskiemu za cykl monotematyczny 6 prac opublikowanych w latach 2020–2021 dotyczący dermatofitów najczęściej izolowanych od zwierząt oraz z przypadków zoonoz w krajach europejskich, tj. *Trichophyton verrucosum* i *Trichophyton mentagrophytes*.
 - nagrodę II stopnia ex aequo Pani dr n. biol. Mai Koseckiej-Strojek za cykl monotematyczny 5 prac opublikowanych w latach 2020–2021, z zakresu mikrobiologii medycznej, dotyczący możliwości wykorzystania nowych metod do rozpoznawania zakażeń oportunistycznymi szczepami z rodzaju *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Staphylococcus*. Wykazano m.in. przydatność metod genetycznych i białka HSP70 jako wskaźników infekcji.
 - nagrodę II stopnia ex aequo (3.000 zł) Pani dr n. biol. Zofii Bakuła za cykl 2 prac opublikowanych w latach 2020–2021, z zakresu mikrobiologii medycznej, dotyczący analizy sekwencji genomu jądrowego i genomu organelli bezchlorofilowej algi *Prototheca wickerhamii*, wywołującej zakażenia w obrębie skóry, tkanki podskórnej i mięśni (prototekozą). Badano istotne cechy struktury genetycznej gatunku, właściwości metaboliczne, patofizjologię i ewolucję.
- Prezydium ZG PTM w dniu 29.04.2022 r. podjęło **Uchwałę 18-2022** w sprawie przyznania Nagród Naukowych PTM im. Prof. Edmunda Mikulaszka za prace opublikowane w latach 2020–2021. Nagrody pieniężne zostaną przekazane laureatom na ich konta, natomiast uroczyste wręczenie dyplomów odbędzie się podczas Ogólnopolskiego XXIX Zjazdu PTM w Warszawie.
- XV. Polskie Towarzystwo Mikrobiologów otrzymało informację od Pana prof. dr hab. Jacka Bieleckiego Redaktora Naczelnego kwartalnika *Postępy Mikrobiologii* – *Advancements of Microbiology* (Editorial w bieżącym numerze kwartalnika), o praktykach plagiatowych, w tym dotyczących opublikowanego artykułu pt. „Mechanizmy powstawania oporności dermatofitów na substancje przeciwgrzybicze” autorstwa D. Łagowski, S. Gnat, A. Nowakiewicz, *Postępy Mikrobiologii* 2020, 59, 2, 153–165, który to artykuł ulega retrakcji ze względu na znamiona plagiatu. W publikacji tej znajdują się bardzo duże fragmenty tekstu przytoczone z innej, wcześniej wydanej publikacji Martinez-Rossi i wsp. „Dermatophyte resistance to antifungal drugs: mechanisms and prospectus”, *Frontiers in Microbiology* z 2018 r (doi.org/10.3389/fmicb.2018.01108). Autorzy publikacji wydanej w PM-AM przenieśli zarówno pomysł pracy jak i wspomniane obszerne elementy tekstu. W związku z ujawnieniem praktyk plagiatowych w artykule, którego pierwszym autorem jest Pan lek. wet. Dominik M. Łagowski, Prezydium ZG PTM zdecydowało, aby zmienić treść Uchwały 18-2022 i nie przyznawać Panu D. Łagowskiemu prestiżowej dla Towarzystwa nagrody im. Prof. E. Mikulaszka, z powodu jego niegodnego członka PTM postępowania.

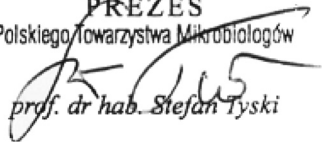
W opinii Prezydium zamieszczanie plagiatów prac w czasopismach, jest niedopuszczalne i naganne, a w tym przypadku jest działaniem na szkodę zarówno Stowarzyszenia jak również niszczy dobrą renomę czasopisma PTM.

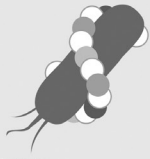
W związku z powyższym podjęto decyzję, aby przyznać Nagrody Naukowe PTM im. Prof. Edmunda Mikulaszka za prace opublikowane w latach 2020–2021 jedynie Pani dr n. biol. Mai Koseckiej-Strojek i Pani dr n. biol. Zofii Bakula. Nagrody pieniężne w wysokości 3000 zł brutto zostaną przekazane na ich konto, zaś uroczyste wręczenie dyplomów odbędzie się podczas Ogólnopolskiego XXIX Zjazdu PTM w Warszawie w 2022. Przyjęto stosowną **Uchwałę 20-2022** w tej sprawie.

- XVI.** Podjęto **Uchwałę 19-2022** w sprawie przyjęcia 20 nowych członków zwyczajnych PTM (Załącznik 1 do Uchwały 19-2022). Tak duża liczba chętnych do przystąpienia do PTM prawdopodobnie wiąże się z organizowanym we wrześniu Zjazdem PTM i niższymi opłatami rejestracyjnymi dla członków PTM.
- XVII.** Z głębokim żalem zawiadamiamy, że w dniu 23 maja 2022 r. zmarł Pan Prof. dr hab. n. med. Stanisław Kałużewski, specjalista w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej – bakteriologii i serologii, Członek Honorowy Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, wieloletni członek Zarządu Głównego PTM. Pan Profesor przez dwie kadencje, w latach 1987–1996, pełnił funkcję Prezesa Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Przez ponad 30 lat był Redaktorem Naczelnym kwartalnika Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia, organu PZH i PTM.
Pan Profesor przez ponad 40 lat pracował w Zakładzie Bakteriologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie i przez ponad 20 był kierownikiem tego Zakładu. Ponadto bardzo aktywnie włączał się w organizację i prowadzenie kursów związanych z diagnostyką bakteriologiczną organizowanych w PZH dla pracowników Stacji Sanitarno-Epidemiologicznych z całej Polski. Naukowe zainteresowania mikrobiologiczne związane przede wszystkim z diagnostyką i serologią pałeczek jelitowych i bakterii z rodzaju *Mycoplasma* zaowocowały około 200 publikacjami oraz opracowaniami metodycznymi, a także udziałem w komisjach egzaminacyjnych na I i II stopień specjalizacji z mikrobiologii. Pan Profesor był członkiem założycielem Stowarzyszenia Kolegium Medycyny Laboratoryjnej w Polsce
- XVIII.** W dniu 27.05.2022 r. Zarząd Oddziału Poznańskiego PTM zaprosił na wykład „Udział mikrobioty jelitowej w kształtowaniu odpowiedzi na immunoterapię czerniaka z zastosowaniem inhibitorów PD-1/PDL1”, który wygłosił prof. UPP dr hab. Marcin Schmidt z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.
- XIX.** W dniu 19.05.2022 odbyło się kolejne spotkanie Komitetu Organizacyjnego Zjazdu PTM. Omówiono proces zgłaszania streszczeń, postanowiono dopuścić pewną pulę klasycznych plakatów w II sesji rejestracyjnej, trudności z funkcjonowaniem strony Zjazdu i systemu rejestracyjnego, pozyskiwaniem firm.
- XX.** W trosce o standardy etyczne dotyczące XXIX Zjazdu PTM, uzyskano dwa certyfikaty:
- a) **certyfikat nr 5245 INFARMY** – zaświadcza, że XXIX Zjazd PTM spełnia standardy etyczne wynikające z Kodeksu Przejrzystości oraz Kodeksu Dobrych Praktyk Przemysłu Farmaceutycznego,
 - b) **certyfikat nr 302 SOWE** – Systemu Oceny Wydarzeń Edukacyjnych, który weryfikuje zgodność krajowych wydarzeń edukacyjnych organizowanych przez podmioty trzeciej z Kodeksem Etycznych Praktyk Biznesowych Izby POLMED oraz Kodeksem Etyki branży technologii medycznych MedTech Polska.
- XXI.** Informujemy, że zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z 2017 r. z dnia 24 lipca 2017 r. w sprawie ciągłego szkolenia Diagnostów Laboratoryjnych (Dz.U. z 2017 r., poz. 1519), każdy Diagnosta Laboratoryjny uczestniczący w stacjonarnej formie Zjazdu otrzyma certyfikat potwierdzający uczestnictwo w Zjeździe i 6 pkt. edukacyjnych tzw. „punktów miękkich”, a także każdy Diagnosta Laboratoryjny wygłaszający przygotowany przez siebie wykład (wykład plenarny lub wykład w sesji tematycznej lub doniesienie ustne trwające co najmniej 10 min. w sesji tematycznej) otrzyma 16 pkt. edukacyjnych tzw. „punktów miękkich”.
- XXII.** Przeprowadzono rozmowy z przedstawicielką czasopisma „Microorganisms” wydawnictwa MDPI w sprawie ewentualnej współpracy i udziału w Zjeździe PTM.
- XXIII.** W dniu 03.06.2022 r. Sekcja Mikrobiologii Środowiskowej Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów zaprosiła na wykład on-line na platformie Teams pt: „Zastosowanie bakterii promujących wzrost roślin do wspomagania fitoremediacji terenów skażonych”, który wygłosił Pan Tomasz Płociniczak z Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.
- XXIV.** W dniu 10.06.2022 r. przesłano e-sprawozdanie finansowe PTM za 2021 r. do Ministerstwa Finansów.
- XXV.** We wszystkich oddziałach terenowych naszego Stowarzyszenia odbywają się Wybory Delegatów PTM na kadencję 2022–2026 oraz na Walne Zgromadzenie Delegatów PTM w dniu 16.09.2022 r. Wybieranych jest łącznie około 160 delegatów.
- XXVI.** Zachęcamy wszystkich zainteresowanych mikrobiologią, a zwłaszcza członków PTM do uczestnictwa w Ogólnopolskim XXIX Zjeździe PTM: <https://zjazdptm2022.pl/>.

Warszawa, 20.06.2022 r.

SEKRETARZ
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

dr hab. n. farm. Agnieszka E. Laudy

PREZES
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

prof. dr hab. Stefan Tyski

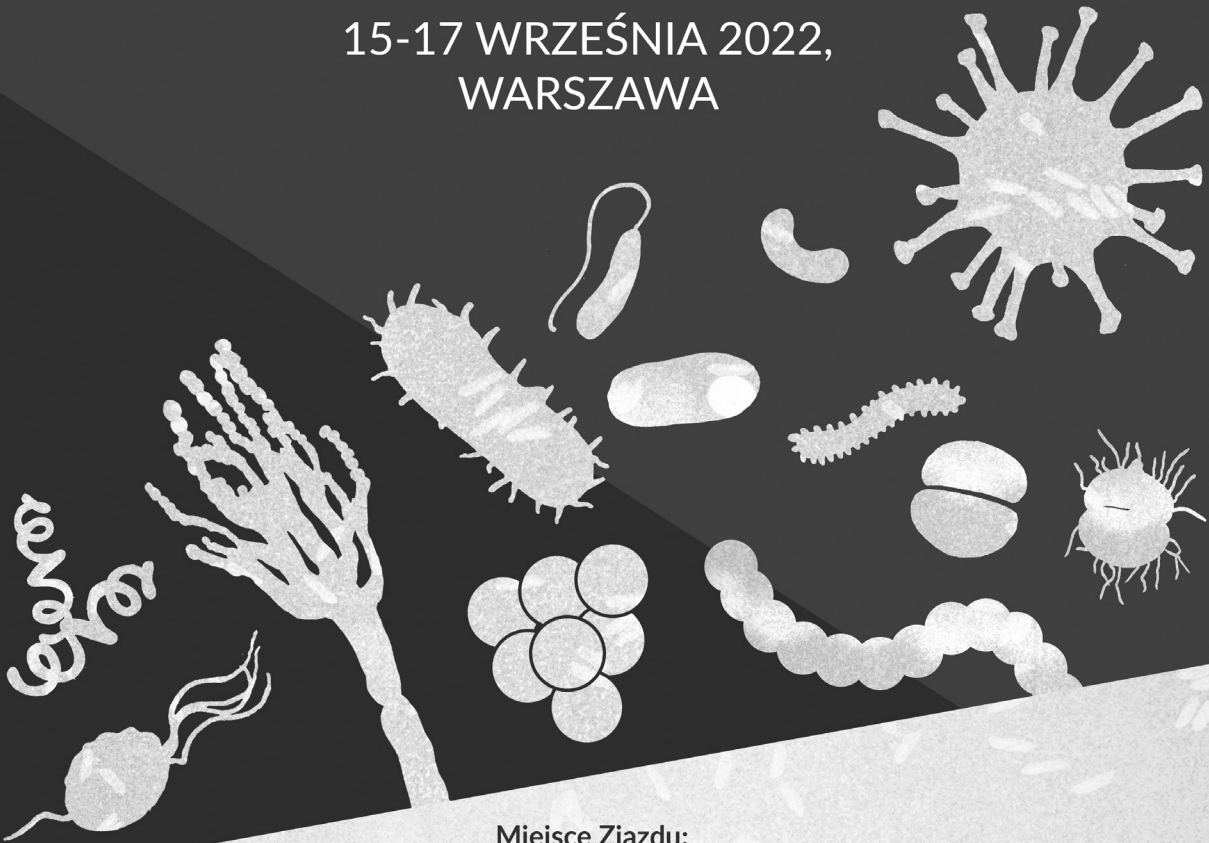


XXIX OGÓLNOPOLSKI ZJAZD
POLSKIEGO TOWARZYSTWA
MIKROBIOLOGÓW
15-17 WRZEŚNIA 2022,
WARSZAWA



XXIX OGÓLNOPOLSKI ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

15-17 WRZEŚNIA 2022,
WARSZAWA



Miejsce Zjazdu:

Arche Hotel Krakowska
Warszawa, Aleja Krakowska 237

Główny Organizator Zjazdu:

Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
ul. Stefana Banacha 1b, 02-097 Warszawa
ptm.zmf@wum.edu.pl, www.microbiology.pl

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY PTM

**Członek Wspierający PTM – Srebrny
od 12.09.2017 r.**



Firma Ecolab Sp. z o.o. zapewnia: najlepszą ochronę środowiska pracy przed patogenami powodującymi zakażenia podczas leczenia pacjentów, bezpieczeństwo i wygodę personelu, funkcjonalność posiadanego sprzętu i urządzeń. Firma jest partnerem dla przemysłów farmaceutycznego, biotechnologicznego i kosmetycznego.

**Członek Wspierający PTM – Zwyczajny
od 12.09.2017 r.**



Merck Sp. z o.o. jest częścią międzynarodowej grupy Merck KGaA z siedzibą w Darmstadt, Niemcy i dostarcza na rynek polski od roku 1992 wysokiej jakości produkty farmaceutyczne i chemiczne, w tym podłoża mikrobiologiczne

SPIS TREŚCI

OD REDAKCJI

Zawiadomienie o praktykach plagiatowych oraz retrakcji artykułu	61
A. Getinger-Panek, I. Bednarek – Grzyby endofityczne w roli potencjalnych producentów związków przeciwnowotworowych	63
M. J. Chmiel, A. Dziewońska – Wybrane zoonozy bakteryjne przenoszone przez mleko surowe ...	73
R. Nath, S. Sengupta, A. Bhattacharjee – Enzymatyczna i nieenzymatyczna odpowiedź na stres azotowy u <i>E. coli</i>	81
KOMUNIKATY, INFORMACJE	95

CONTENTS

EDITORIAL

Notice of plagiarism and article retraction	61
A. Getinger-Panek, I. Bednarek – Endophytic fungi as potential producers of anticancer compounds	63
M. J. Chmiel, A. Dziewońska – Selected bacterial zoonoses transmitted by raw milk	73
R. Nath, S. Sengupta, A. Bhattacharjee – Enzymatic and non-enzymatic response during nitrosative stress in <i>E. coli</i>	81
NEW REPORTS, INFORMATION	95

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 40 zł + VAT 8%